

**Funktionelle Analyse einer
neuartigen Proteininteraktion des
TNF-receptor associated protein 1 (TRAP1)**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Judith Richter

aus

Bonn

Bonn 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Voos

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höfeld

Tag der Promotion: 04.09.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Molekulare Chaperone.....	1
1.2 Hsp90-Chaperone	3
1.2.1 Die Hsp90-Chaperonfamilie.....	3
1.2.2 Domänenstruktur von Hsp90	4
1.2.3 Mitglieder der Hsp90-Familie besitzen eine ATPase-Aktivität.....	6
1.2.4 Der ATP gekoppelte Chaperonzyklus (ATPase-Zyklus) von Hsp90	7
1.2.5 Interaktionspartner und posttranslationale Modifikationen von Hsp90	9
1.2.6 Klienten von Hsp90	10
1.2.7 Regulation von Hsp90 durch Co-Chaperone.....	11
1.2.8 Regulation von Hsp90 durch posttranslationale Modifikationen.....	13
1.3 TRAP1.....	15
1.3.1 Allgemeine Eigenschaften von TRAP1	15
1.3.2 Identifizierung und Lokalisation von TRAP1	17
1.3.3 Funktion von TRAP1 auf zellulärer Ebene.....	18
1.3.3.1 Zellschützende Funktion von TRAP1 im Zusammenhang mit Apoptose und oxidativem Stress.....	19
1.3.3.2 Die zellschützende Funktion von TRAP1 in Tumorzellen.....	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Materialien.....	25
2.1 Geräte	25
2.2 Chemikalien.....	26
2.3 Verbrauchsmaterialien	27
2.4 Vektoren	27
2.5 Antikörper	28
2.6 Chemisch kompetente Zellen.....	29
2.7 Oligonukleotide	29
2.8 Zelllinien	30
2.9 Zellkulturmedien und in der Zellkultur verwendete Lösungen und Materialien.....	30
2.10 Allgemeine Lösungen und Puffer.....	31

3 Methoden.....	34
3.1 DNS und RNS Techniken.....	34
3.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
3.1.2 Auftrennung von DNS in Agarosegelen	35
3.1.3 Spaltung von DNS mittels Restriktionsendonukleasen	35
3.1.4 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	36
3.1.5 Saure Ethanolfällung von DNS.....	36
3.1.6 Dephosphorylierung des Vektors und Ligation	36
3.1.7 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNS	37
3.1.8 Isolierung von Plasmid-DNS	37
3.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.1.10 Erstellung von siRNS	38
3.2 Zellkultur	39
3.2.1 Teilen von Zellkulturzellen.....	39
3.2.2 Zählen von Zellkulturzellen.....	40
3.2.3 Transfektion von Zellkulturzellen.....	40
3.2.4 Präparation von Mitochondrien aus Zellkulturzellen	41
3.2.4.1 Präparation von Mitochondrien aus Mausegewebe.....	41
3.2.5 Subzelluläre Fraktionierung.....	42
3.2.6 Submitochondriale Fraktionierung	42
3.2.7 Immunzytochemie (ICC).....	43
3.2.8 Atmungsmessungen.....	44
3.2.9 Membranpotential-Messungen.....	44
3.2.10 Enzymassay Succinat-Dehydrogenase (SDH)	45
3.2.11 Enzymassay Cytochrom-c-Oxidase (COX).....	46
3.3 Proteinbiochemie.....	46
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.3.2 Nativ-Gelelektrophorese (Blue native PAGE)	47
3.3.3 Western-Blot nach dem Semidry-Verfahren	48
3.3.4 Detektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran mit Antikörpern	49
3.3.5 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	50
3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe	50
3.3.7 Massenspektrometrische Analyse nach der LC-MS-Methode.....	51
3.3.8 Affinitätschromatographie.....	52
3.3.8.1 Aufreinigung von <i>Strep</i> -tag Fusionsproteinen.....	52
3.3.8.2 Aufreinigung von <i>Strep</i> -tag Fusionsproteinen und Interaktionspartnern in Abhängigkeit von ATP.....	53
3.3.8.3 Immunpräzipitation	53
3.3.9 Chemische Vernetzung.....	54
3.3.10 Import von radioaktiv markierten Proteinen in isolierte Mitochondrien	54

3.3.10.1 Translation	55
3.3.10.2 Import und Assemblierung	55
3.3.11 OxyBlot.....	56
4 Ergebnisse	58
4.1 Allgemeine Untersuchungen	58
4.1.1 Nachweis von carbonylierten Proteinen mit Hilfe des OxyBlots	58
4.1.2 Mitochondrialer Import nach Inhibition von TRAP1	59
4.2 Lokalisation von TRAP1	61
4.2.1 Klonierung von TRAP1- <i>Strep</i> -tag Konstrukten	61
4.2.2 Subzelluläre Lokalisation von TRAP1	61
4.2.3 Intramitochondriale Lokalisation von TRAP1	63
4.3 Screening nach Interaktionspartnern von TRAP1.....	67
4.3.1 Aufreinigung der TRAP1-ST-Fusionsproteine und Screening nach Interaktionspartnern mit Hilfe der Massenspektrometrie	68
4.3.2 Aufreinigung der TRAP1-ST Fusionsproteine und Screening nach Interaktionspartnern mit Hilfe verschiedener Antiseren	71
4.3.3 Chemische Vernetzung von TRAP1 und SDHA	72
4.3.4 Bindung von SDHA an TRAP1 unter Einfluss von ATP.....	74
4.4 Funktionelle Konsequenzen der Interaktion von TRAP1 mit SDHA	76
4.4.1 SDH-Enzymaktivität in Abhängigkeit von der TRAP1-Expression	76
4.4.1.2 Enzymaktivität der Cytochrom-c-Oxidase (COX) in Abhängigkeit von der TRAP1-Expression	78
4.4.2 Mitochondriale Atmung in Abhängigkeit von TRAP1	78
4.4.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials nach Knockdown von TRAP1	81
4.4.4 Nativ-Gele nach Überexpression und Knockdown von TRAP1.....	85
4.4.5 Import der SDHA und Assemblierung des SDH-Komplexes	86
4.4.5.1 Import der SDHA in HeLa-Mitochondrien nach Überexpression von TRAP1	87
4.4.5.2 Assemblierung der SDHA	87
4.4.6 Morphologische Veränderung von HeLa-Zellen nach Knockdown von TRAP1	89
5 Diskussion.....	93
5.1 Auswirkungen von oxidativem Stress auf humane Mitochondrien	93
5.2 Allgemeine Untersuchungen zur mitochondrialen Funktion von TRAP1	94
5.2.1 Mitochondrialer Import in Abhängigkeit von TRAP1	94
5.2.2 Auswirkungen eines TRAP1-Knockdowns auf die Morphologie von HeLa-Zellen	95
5.2.3 Auswirkungen von Punktmutationen auf die Funktion von TRAP1	96
5.3 Zelluläre und intramitochondriale Lokalisation von TRAP1	97
5.3.1 Zelluläre Lokalisation von TRAP1	97
5.3.2 Intramitochondriale Lokalisation von TRAP1	98
5.4 Identifizierung von TRAP1-Interaktionspartnern	100

5.4.1 LC-MS-Analyse zur Identifikation neuer Interaktionspartner	100
5.4.2 Screening mit Hilfe der Antikörperdetektion zur Identifikation neuer Interaktionspartner	101
5.4.3 Die SDHA als ein neuer Interaktionspartner von TRAP1.....	101
5.4.4 TRAP1-SDHA-Interaktion in Abhängigkeit von ATP	103
5.5 Funktionelle Analysen der Interaktion von TRAP1 mit SDHA.....	104
5.5.1 Messung der SDH-Aktivität	105
5.5.2 Messung der mitochondrialen Atmung und des Membranpotentials.....	105
5.5.3 Assemblierung des SDH-Komplexes	107
6 Zusammenfassung	109
7 Literaturverzeichnis	111
8 Anhang	119
9 Abkürzungsverzeichnis.....	123
Lebenslauf.....	125
Erklärung	126
Danksagung	127

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hsp90-Chaperonfamilie	5
Abbildung 2: Model des ATPase-Zyklus von Hsp90.....	8
Abbildung 3: Regulation der Hsp90 Chaperon-Aktivität.....	9
Abbildung 4: Regulation der MPTP in normalen und Tumorzellen.....	23
Abbildung 5: OxyBlot.....	59
Abbildung 6: Mitochondrialer Import nach Inhibition von TRAP1 durch 17-AAG.....	60
Abbildung 7.1: Schema der subzellulären Fraktionierung	62
Abbildung 7.2: Subzelluläre Lokalisation von TRAP1 und TRAP1-Mutanten nach Überexpression	63
Abbildung 8.1: Schema der submitochondrialen Fraktionierung	65
Abbildung 8.2: Submitochondriale Lokalisation von TRAP1 nach Überexpression	67
Abbildung 9.1: Ergebnisse der „MASCOT“-Analyse 1	69
Abbildung 9.2: Ergebnisse der „MASCOT“-Analyse 2	70
Abbildung 10: Aufreinigung von TRAP1-ST mittels Affinitätschromatographie	72
Abbildung 11: Chemische Vernetzung mit Hilfe des homobifunktionalen löslichen Vernetzers DSG	73
Abbildung 12: Bindung von SDHA an TRAP1 unter Einfluss von ATP.....	75
Abbildung 13: SDH-Enzymaktivität nach Überexpression von TRAP1 und TRAP1-Mutanten sowie nach Knockdown von TRAP1	77
Abbildung 14: COX-Enzymaktivität nach Überexpression von TRAP1 und TRAP1-Mutanten sowie nach Knockdown von TRAP1	78
Abbildung 15.1: Messung des Sauerstoffverbrauchs von permeabilisierten HeLa-Zellen nach Überexpression von TRAP1 und TRAP1-Mutanten.....	80
Abbildung 15.2: Messung des Sauerstoffverbrauchs von permeabilisierten HeLa-Zellen nach Knockdown von TRAP1.....	81
Abbildung 16.1: Membranpotential von HeLa-Zellen nach Färbung mit JC-1	82
Abbildung 16.2: Membranpotential von HeLa-Zellen nach Färbung mit TMRE	83
Abbildung 17: Membranpotential von HeLa-Zellen nach TRAP1-Knockdown und Überexpression	84
Abbildung 18: Nativ-Gele von Proteinkomplexen nach Überexpression von TRAP1 und TRAP1- Mutanten.....	86
Abbildung 19: Import der Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A (SDHA).....	87
Abbildung 20: Assemblierung der Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A (SDHA).....	89
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen nach TRAP1-Knockdown	91
Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen nach Behandlung mit Valinomycin	92
Abbildung 23: Vektorkarte von pcDNA3 TRAP1-ST	119
Abbildung 24: Submitochondriale Lokalisation von endogenem TRAP1.....	120
Abbildung 25: Ergebnisse der „MASCOT“ Analyse	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte Funktionen und Klienten der einzelnen Hsp90-Homologe.....	11
Tabelle 2: Bekannte Interaktionspartner des mitochondrialen Hsp90 (TRAP1)	16

1 Einleitung

1.1 Molekulare Chaperone

Proteine sind vielseitige und strukturell komplexe, biologische Makromoleküle aus langen Aminosäureketten, welche in nahezu allen biologischen Prozessen involviert sind. Um ihre Funktion ausführen zu können, müssen Proteine in ihre spezifische, dreidimensionale Struktur gefaltet werden (Hartl et al. 2011). Dabei wird die Konformation eines Proteins durch die Abfolge der Aminosäuren bestimmt, indem die Seitenketten der Aminosäuren, welche sauer, basisch, ungeladen polar oder unpolar sein können, in Wechselwirkung miteinander treten. Dadurch sind Proteine potentiell in der Lage sich alleine aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in ihre spezifische dreidimensionale Struktur zu falten (Hartl et al. 2011). Dennoch falten sich Proteine in der zellulären Umgebung meistens nicht spontan und ohne Hilfe. Zum einen würden große Proteine Minuten bis Stunden brauchen, um sich korrekt zu falten oder ihren nativen Zustand gar nicht erreichen (Hartl et al. 2011). Zum anderen erschwert die hohe Konzentration an Proteinen im Zytosol (300-400 g/l) die Faltung von Proteinen *in vivo* (Hartl et al. 2011) und verstärkt die Tendenz von Proteinen zu aggregieren (Ellis und Minton 2006).

Um die inkorrekte Faltung und die Aggregation von Proteinen zu verhindern, existiert in Zellen ein Netzwerk aus molekularen Chaperonen (vom frz. *chaperon* = Anstandsdame). Diese verhindern die Aggregation von Proteinen, unterstützen neu synthetisierte Proteine in ihrer Faltung und spielen eine Rolle in der Faltung von durch Stress denaturierten Proteinen. Weiterhin helfen sie bei der Zusammenlagerung von Proteinkomplexen und der Proteinsortierung, sind aber selber kein Bestandteil der finalen Struktur des Proteins oder des Proteinkomplexes (Hartl et al. 2011). Chaperone können neben der Funktion als Faltungshelfer auch aktiv am Abbau von Proteinen beteiligt sein (Kettern et al. 2010). Viele der molekularen Chaperone werden unter zellulärem Stress hochreguliert und sind daher auch als Hitzeschockproteine (Hsp's) bekannt. Üblicherweise werden sie nach ihrem Molekulargewicht klassifiziert. Es gibt die

Familie der Hsp60, Hsp70, Hsp90 und Hsp100 Chaperone sowie die kleinen Hsp's (Hartl et al. 2011).

Die kleinen Hitzeschockproteine (sHsp's; „small heat shock proteins“) sind eine Familie von Proteinen mit einem geringen Molekulargewicht von 12-43 kDa und einer konservierten C-terminalen α -Crystallin-Domäne, welche die Fähigkeit besitzen, Oligomere zu bilden. Die meisten der sHsp's sind nicht konstitutiv aktiv, sondern werden durch zellulären Stress, wie z. B. hohe Temperaturen, aktiviert. Im Unterschied zu den anderen Hsp's, deren Chaperonzyklus an die Bindung und Hydrolyse von ATP gekoppelt ist, sind die sHsp's unabhängig von ATP. Unter Stressbedingungen binden sie ihre Substrate und bewahren sie davor zu aggregieren. Die Freigabe der Substrate erfolgt an ein geeignetes ATP-abhängiges Chaperon-System, welches das Substratprotein aktiv zurückfaltet (Haslbeck et al. 2005). Ein solches System ist z. B. das Hsp70/Hsp40-System. In diesem Zusammenhang dient Hsp40, auch bekannt als DnaJ, als Co-Chaperon von Hsp70 (Hartl et al. 2011). Hsp70-Chaperone wirken an vielen Faltungsprozessen mit, wie der Faltung und Assemblierung von neu synthetisierten Proteinen und der Faltung von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen (Mayer und Bukau 2005). Die Bindung an ihre Substratproteine wird dabei durch die Bindung und Hydrolyse von Nukleotiden reguliert. Hsp70-Chaperone durchlaufen einen spezifischen Reaktionszyklus, bei dem die Substratbindung in einem ATP-gebundenen Zustand von Hsp70 erfolgt. Die Hydrolyse von ATP zu ADP verstärkt die Bindung zum Substrat und der anschließende Austausch von ADP gegen ATP induziert die Freisetzung des Substrates (Voos 2013). Wenn nötig können Proteine an Hsp60, auch bekannt als Chaperonin, weitergereicht werden, um sich vollständig zu falten. Chaperonine können Substratproteine welche kleiner als 60 kDa sind falten und werden in zwei Klassen unterteilt. Die Gruppe I-Chaperonine kommen überwiegend in Prokaryoten, Mitochondrien und Plastiden vor. Ein bekanntes Beispiel ist das GroEL aus *E.coli* (Mayer 2010). Sie bestehen aus 2 Ringen mit je 7 Untereinheiten und bilden eine Kammer. Das apikale Ende wird durch den Kofaktor Hsp10 (GroES in Bakterien) abgedeckt, welcher einen Deckel aus 7 Hsp10-Proteinen bildet. Durch Hydrolyse von ATP erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch das Innere der Kammer hydrophil wird und sich das in der Kammer eingeschlossene Proteine falten kann (Voos 2013). Die Gruppe II-

Chaperonine bilden ebenfalls eine Kammer, in der sich Proteine falten können. Sie kommen in Archaea (Thermosome) und im Zytosol von Eukaryoten vor und bilden Ringe aus 8 oder 9 Untereinheiten. Jeweils 2 Ringen lagern sich zu einem Chaperonin zusammen. Im Gegensatz zu den Gruppe I-Chaperoninen benötigen sie keinen Kofaktor und schließen sich in Folge einer ATP-Hydrolyse (Mayer 2010). Die Chaperone der Hsp100/Clp-Familie (Clp = „caseinolytic protease“) gehören zur Superfamilie der AAA+ -ATPasen („ATPasen associated with various cellular activities“). Sie enthalten ein oder zwei AAA+ -Domänen, welche in hexameren Ringen angeordnet sind und eine Pore bilden, mit der sie Substrate aufnehmen und durch ATP-Hydrolyse umsetzen können (Mayer 2010). Sie spielen wie auch andere Chaperone eine Rolle in der Proteostase, indem sie die Aggregation von Proteinen wieder auflösen. Die meisten Mitglieder dieser Proteinfamilie entfalten unter Verwendung von ATP ihre Substrate und leiten sie an eine assoziierte Protease weiter, welche das Protein abbaut (z. B. das Chaperon ClpX und die ClpP-Protease) (Mayer 2010). Andere Mitglieder, wie das bakterielle ClpB und das mitochondriale Hsp104 aus Hefe, können aggregierte Proteine wieder löslich machen. Unter extremen Hitzestress verhindern sie die Bildung von unlöslichen Aggregaten, die entstehen können, wenn das proteolytische System nicht mehr in der Lage ist die großen Mengen an beschädigten Polypeptiden abzubauen (Hodson et al. 2012).

1.2 Hsp90-Chaperone

1.2.1 Die Hsp90-Chaperonfamilie

Die Hsp90-Chaperone („Heat shock protein 90“) sind eine Familie von ubiquitär vorkommenden, molekularen Chaperonen, welche essentielle Rollen in vielen zellulären Prozessen wie Zellzykluskontrolle, zelluläre Homöostase und Signaltransduktion, übernehmen (Jackson 2013). Nahezu alle Organismen, außer Archaeobakterien, besitzen mindestens ein Hsp90-codierendes Gen. Je nach Organismus oder zellulären Kompartimenten werden unterschiedliche Hsp90-Homologe exprimiert, welche in der Hsp90-Chaperonfamilie zusammengefasst werden. Die Hsp90-Familie wird entsprechend des zellulären Vorkommens der Mitglieder in 5 Unterfamilien eingeteilt. Es gibt jeweils eine Familie von

zytosolischen Hsp90, ER-lokalisierten Hsp90, Hsp90 in Chloroplasten, mitochondrialen Hsp90 (TRAP1) und bakteriellen Hsp90 (Chen et al. 2006; Taipale et al. 2010).

Die meisten Eubakterien besitzen das Hsp90-Homolog HtpG („high temperature protein G“), welches mit 624 Aminosäuren Länge das kürzeste Mitglied der Hsp90-Familie ist (Johnson 2012). In Eukaryoten sind alle Hsp90-Gene im Zellkern codiert. Die Proteine sind hingegen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert und kommen im Zytosol, im ER, den Chloroplasten und den Mitochondrien vor. Das zytosolische Hsp90 wird in zwei Isoformen exprimiert, einer induzierbaren Form (Hsp90- α) und in einer konstitutiven Form (Hsp90- β). Das ER-Homolog, Grp94 (94 kDa „glucose-regulated protein“) genannt, kommt in allen Eukaryoten außer den Pilzen vor (Chen et al. 2006). Es besitzt eine 21 Aminosäuren lange N-terminale ER-Signalsequenz und eine KDEL-Sequenz (ER-Retentionssignal) (Jackson 2013). Das mitochondriale Hsp90-Homolog, TRAP1 („tumor necrosis factor receptor-associated protein 1“), ist am nächsten mit HtpG verwandt und kommt nur in Animalia vor. Durch phylogenetische Analysen konnte gezeigt werden, dass TRAP1 seinen Ursprung nicht in einer Endosymbiose von Bakterien hat, sondern sich aus einer ursprünglichen Form von Hsp90, parallel zu den Homologen aus Zytosol, ER und Chloroplasten, entwickelte (Chen et al. 2006). Für den Import in Mitochondrien enthält es eine mitochondriale Lokalisationssequenz (Felts et al. 2000).

1.2.2 Domänenstruktur von Hsp90

Alle Mitglieder der Hsp90-Familie liegen als Dimere in der Zelle vor. Die Monomere bestehen im Wesentlichen aus 3 konservierten Domänen, der N-terminalen Domäne (NTD), der mittleren Domäne (MD) und der C-terminalen Domäne (CTD). Neben diesen Domänen kommen auch noch Signalsequenzen und Linker Sequenzen, wie die geladene Region bei zytosolischem Hsp90 und Grp94, vor (siehe Abbildung 1) (Johnson 2012).

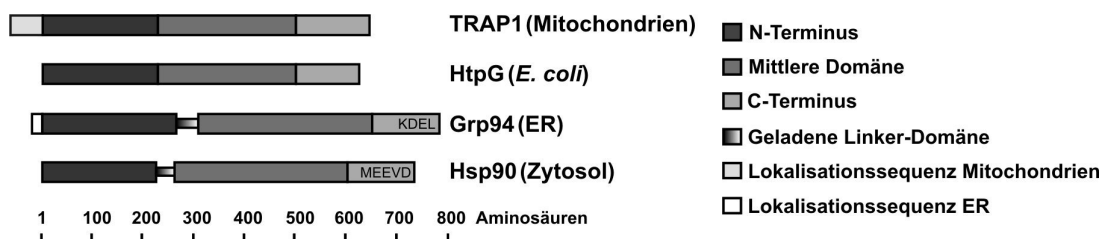


Abbildung 1: Hsp90-Chaperonfamilie

Schema der Domänenstruktur der Hsp90-Homologe. Alle Hsp90 bestehen aus einer N-terminalen, einer mittleren und einer C-terminalen Domäne. Der N-Terminus enthält die Nukleotidbindestelle und die mittlere Domäne ist wichtig für die Interaktion mit Klienten. Die C-terminale Domäne ist für die Dimerisierung zuständig. TRAP1 und Grp94 besitzen außerdem eine N-terminale Lokalisationssequenz und das ER Hsp90-Homolog Grp94 ein ER-Retentionssignal (KDEL). Das MEEVD-Motiv des zytosolischen Hsp90 dient als Bindestelle für Co-Chaperone mit TPR-Domänen (Modifiziert nach (Johnson 2012)).

Die NTD ist die am höchsten konservierte Domäne der Hsp90-Chaperone. Sie enthält die Nukleotidbindestelle (Chen et al. 2005) und besitzt eine strukturelle Homologie zu ATPasen der GHKL-Superfamilie (Gyrase, Hsp90, Histidin Kinase, MutL), wie den Typ-II Topoisomerasen und dem „mismatch“ Reparaturprotein MutL (Bergerat et al. 1997). Durch Geldanamycin (GA) und Radicol (RA) kann die ATPase-Aktivität von Hsp90 inhibiert werden. Sie binden wie ATP/ADP ebenfalls an die Nukleotidbindestelle von Hsp90 und wirken dadurch als kompetitive Inhibitoren der Hsp90 ATPase-Aktivität (Jackson 2013). Praktische Anwendung findet die Inhibierung der ATPase-Aktivität des Hsp90 in der Krebstherapie, wo sie eine viel versprechende Strategie darstellt (Jhaveri und Modi 2012). Eine Verwendung von Geldanamycin und Radicol als Arzneimittel wurde aufgrund ihrer Instabilität nicht in Betracht gezogen. Andere Hsp90-Inhibitoren, wie die Geldanamycin-Derivate 17-AAG (Tanespimycin) oder 17-DMAG (Alvespimycin), sind hingegen neben weiteren Hsp90-Inhibitoren Objekte von klinischen Studien (Jackson 2013). Aktuell gibt es aber noch keine Marktzulassung für einen Hsp90-Inhibitor als Krebstherapeutikum.

Zytosolisches Hsp90 und Grp94 besitzen zwischen der NTD und der MD eine geladene Linker-Domäne (Soldano et al. 2003), wohingegen HtpG nur eine sehr kurze und TRAP1 keine Linker-Domäne enthält. In Hsp90 aus Hefe spielt diese Sequenz eine wichtige Rolle. Die komplette Deletion der Linkersequenz in Hefe führt, durch Verlust der Interaktion mit Co-Chaperonen, zu einem letalen

Phänotyp. Außerdem bewirkt eine verkürzte Linkersequenz eine geringere Interaktion von Hsp90 mit seinen Klienten (Hainzl et al. 2009).

Die MD ist wichtig für die Interaktion von Hsp90 mit seinen Klienten und die ATPase-Aktivität von Hsp90. In verschiedenen Studien konnten eine hydrophobe und eine amphipathische Struktur ermittelt werden, welche entscheidend für die Interaktion von Hsp90 mit seinen Klienten sind (Taipale et al. 2010). Weiterhin enthält die MD einen konservierten Argininrest, welcher, analog zu einem Lysinrest in GHKL Proteinen, eine Rolle in der Interaktion von Hsp90 mit dem γ -Phosphat von ATP spielt und für die ATPase-Aktivität von Hsp90 benötigt wird (Meyer et al. 2003).

Die CTD von Hsp90 ist für die Dimerisierung zuständig und ist weniger konserviert als der Rest des Proteins (Taipale et al. 2010). Das Ende der C-terminalen Domäne des zytosolischen Hsp90 besteht aus einem MEEVD-Motiv. Dieses dient als eine Bindestelle für Proteine mit TPR-Domänen (TPR = „tetratricopeptide repeat“), welche in vielen Co-Chaperonen vorkommen (Young et al. 1998). Die KDEL-Sequenz am Ende des C-Terminus von Grp94 dient als ER-Retentionssignal (Jackson 2013).

1.2.3 Mitglieder der Hsp90-Familie besitzen eine ATPase-Aktivität

In den 1990er Jahren war eine Bindung von ATP an Hsp90 und eine Funktion von Hsp90 als ATPase umstritten. Einige Studien beschrieben Hsp90 als ein Protein ohne ATPase-Aktivität, andere Studien berichteten von einer hohen ATPase-Aktivität (Panaretou et al. 1998). Durch Strukturanalysen und biochemische Studien konnte schließlich eine ATP/ADP-Bindestelle in der N-terminalen Region von Hsp90 ermittelt werden, welche in der Hsp90-Familie konserviert ist (Prodromou et al. 1997; Scheibel et al. 1997). 1998 konnten Panaretou et al. durch *in vitro* Experimente mit Hsp90 (aus Hefe) und HtpG (aus *E. coli*) die Bindung und Hydrolyse von ATP nachweisen. Sie konnten zeigen, dass die ATPase-Aktivität durch den spezifischen Hsp90-Inhibitor Geldanamycin inhibiert wird und dadurch Geldanamycin als kompetitiven Inhibitor der ATPase-Aktivität von Hsp90 etablieren (Panaretou et al. 1998). Mutationen des katalytischen Rests Glutamat 33 in der Hsp90-Nukleotid-

bindestelle zeigten, dass die ATPase-Aktivität essentiell für die *in vivo* Funktion von Hsp90 ist und dass *S. cerevisiae* Zellen, welche durch die Mutation nicht mehr in der Lage sind ATP zu hydrolysieren, nicht mehr lebensfähig sind (Obermann et al. 1998; Panaretou et al. 1998). In anderen Studien konnten weiterführende Erkenntnisse zur ATPase-Aktivität von Hsp90 erlangt werden. So konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität von Hsp90 und TRAP1 unter Hitzeschockbedingungen zunimmt (Frey et al. 2007; Leskovar et al. 2008). Das ER-Homolog Grp94 zeigte hingegen keine erhöhte ATPase-Aktivität unter Hitzeschockbedingungen (Frey et al. 2007). Außerdem ist bekannt, dass die ATPase-Aktivität von Hsp90 durch Co-Chaperone, posttranslationale Modifikation und Bindung von Klienten beeinflusst werden kann (Jackson 2013). Die Erkenntnisse bezüglich der ATPase-Aktivität und der Vergleich mit dem ATPase-gekoppelten „clamp“-Mechanismus der DNA-Gyrase und MutL führten zu einem Model des ATP-gekoppelten Chaperonzyklus von Hsp90, auch ATPase-Zyklus genannt (Prodromou et al. 2000).

1.2.4 Der ATP gekoppelte Chaperonzyklus (ATPase-Zyklus) von Hsp90

Alle Hsp90-Homologe durchlaufen Konformationsänderungen durch Binden und Hydrolysieren von ATP (Johnson 2012). Der ATP gekoppelte Chaperonzyklus (ATPase-Zyklus) beschreibt das Öffnen und Schließen des Hsp90-Dimers in Abhängigkeit von ATP und ADP. Nach Nukleotidbindung (ATP) gehen die Hsp90-Chaperone, welche als Dimere vorliegen, von der offenen V-Form (Apo-Hsp90) in eine geschlossene Konformation über. In diesem Zustand interagieren zusätzlich zum C-Terminus auch die beiden N-terminalen Domänen. Die Bindung von ATP erfolgt dabei in zwei Stufen. In der ersten Stufe bindet ATP in einer schnellen Reaktion an die Nukleotidbindestelle. Dieser Reaktion folgt eine langsame Konformationsänderung im N-Terminus, wobei sich der sogenannte „ATP-lid“ umlagert. Darauf folgt in einem weiteren Schritt eine transiente Dimerisierung der N-terminalen Domänen. Die Interaktion der N-terminalen Domäne mit der mittleren Domäne führt zu einer Konformationsänderung, wodurch sich die geschlossene Konformation ausbildet. In diesem Zustand erfolgt die Hydrolyse von ATP. Anschließend liegt

das Hsp90-Dimer in einem ADP-gebundenen Zustand vor, in welchem die N-terminalen Domänen weiterhin dimerisiert vorliegen. Durch Ablösen von ADP geht das Hsp90-Dimer wieder in eine offene Konformation über und kann erneut ATP binden (Abbildung 2) (Hessling et al. 2009; Trepel et al. 2010). Die grundlegende Abfolge des ATP-Zyklus ist bei allen Mitgliedern der Hsp90-Familie gleich. Je nach Mitglied gibt es jedoch geringe Unterschiede. Diese beziehen sich auf die Konformationsänderung der N-terminalen Domäne und die Festlegung zur Hydrolyse nach Bindung von ATP (Weikl et al. 2000; Frey et al. 2007; Leskovar et al. 2008; Richter et al. 2008; Graf et al. 2009).

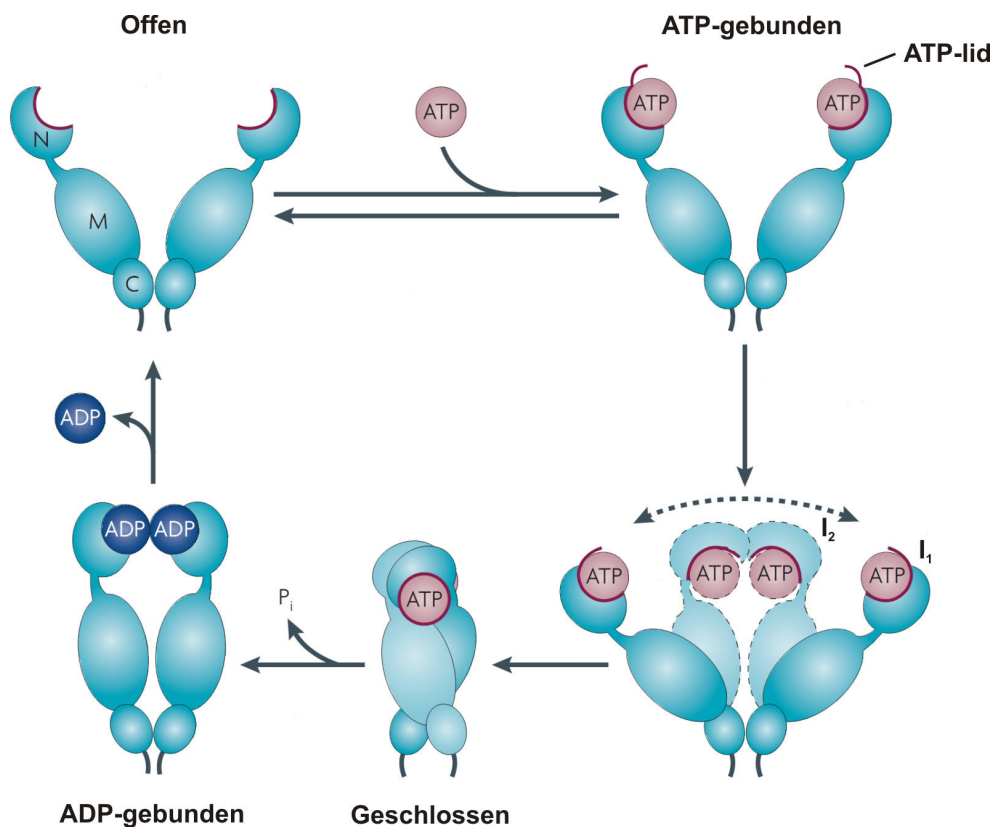


Abbildung 2: Model des ATPase-Zyklus von Hsp90

Nach Bindung von ATP an die Nukleotidbindestelle lagert sich der sogenannte „ATP-lid“ um (I₁). In einem weiteren Schritt dimerisieren die beiden N-terminalen Domänen des Hsp90-Dimers (I₂) (Hessling et al. 2009). Durch strukturelle Umlagerung bildet sich die geschlossene Konformation aus. In diesem Zustand kann Hsp90 ATP hydrolysieren und liegt anschließend in einem ADP-gebundenen Zustand vor, in welchem die N-terminalen Domänen weiterhin miteinander interagieren. Das Ablösen von ADP führt zu einer weiteren Konformationsänderung, wodurch sich das Hsp90-Dimer wieder öffnet und erneut ATP binden kann. N: N-terminale Domäne; M: mittlere Domäne; C: C-terminale Domäne; P_i: Phosphat (Modifiziert nach Trepel et al. 2010)

1.2.5 Interaktionspartner und posttranslationale Modifikationen von Hsp90

Für das zytosolische Hsp90 ist eine Reihe von Interaktionspartnern bekannt. Das erste Substratprotein von Hsp90, die Protein-Tyrosinkinase pp60v-src, wurde 1981 von Brugge et al. und Oppermann et al. identifiziert. Seitdem ist die Zahl der Interaktionspartner von Hsp90 beachtlich angestiegen. Neben den Substratproteinen von Hsp90, den sogenannten Klienten, interagiert Hsp90 auch mit den sogenannten Co-Chaperonen. In Eukaryoten wurden mehr als 20 Co-Chaperone des zytosolischen Hsp90 identifiziert. Ihre Aufgabe besteht in der Stimulation oder Inhibition der ATPase-Aktivität von Hsp90, der Regulation des ATPase-Zyklus von Hsp90, der Rekrutierung von Klienten zu Hsp90 und der Koordination der Interaktion von Hsp90 zu anderen Chaperon-Systemen (Taipale et al. 2010). Zusammen mit den posttranslationalen Modifikationen von Hsp90, wie Phosphorylierung, Acetylierung, S-Nitrosylierung, Oxidation und Ubiquitinierung, regulieren sie die Chaperonfunktion. (Trepel et al. 2010; Mollapour und Neckers 2012).

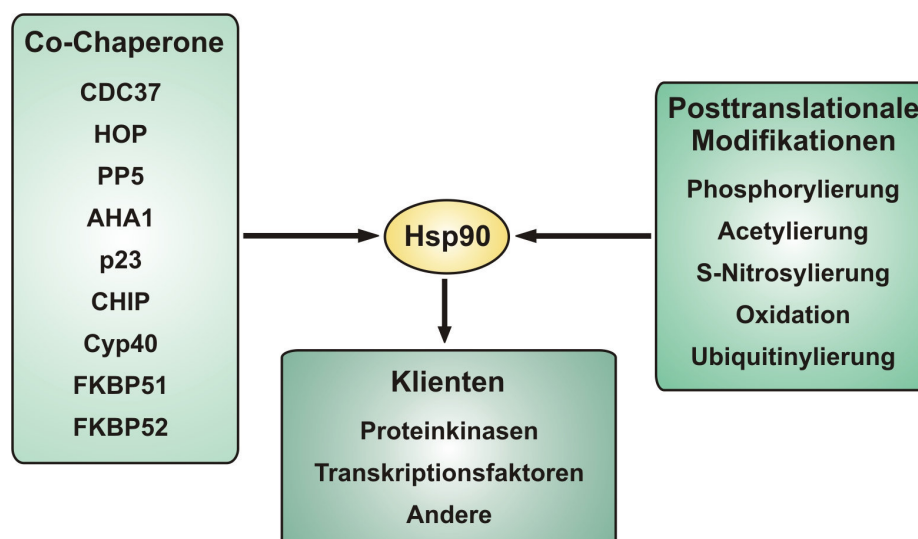


Abbildung 3: Regulation der Hsp90 Chaperon-Aktivität

Eine Reihe von Co-Chaperonen assistieren Hsp90 in seiner Chaperon-Aktivität. Weiterhin kann die Aktivität von Hsp90 durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. Dadurch wird die Interaktion von Hsp90 mit seinen Klienten reguliert. (Modifiziert nach Taipale et al. 2010)

Eine aktuelle Auflistung der bekannten Interaktionspartner, welche ständig ergänzt wird, ist unter <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf> zu finden.

1.2.6 Klienten von Hsp90

Die Interaktion von Hsp90 mit Substratproteinen war in den letzten 20 Jahren Thema intensiver Forschung. Mittlerweile sind über 200 Klienten des zytosolischen Hsp90 bekannt. Zu den Klienten von Hsp90 gehören vor allem Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Steroidhormonrezeptoren (Taipale et al. 2010). Viele der Klienten des zytosolischen Hsp90 sind Onkoproteine, wodurch Hsp90 ein wichtiges Ziel für Krebstherapien darstellt (Trepel et al. 2010).

Durch die Interaktion von Hsp90 mit seinen Klienten werden verschiedene zelluläre Prozesse reguliert (Taipale et al. 2010). Die Aufgabe von Hsp90 besteht dabei in der Unterstützung der Reifung oder Degradation seiner Klienten sowie in der korrekten Assemblierung der Klienten in Proteinkomplexe (Makhnevych und Houry 2012). Im Gegensatz zu Hsp60 und Hsp70 hat Hsp90 aber nur einen begrenzten Einfluss auf die Proteinfaltung *in vivo*. Es wird nicht für die *de novo* Faltung von Proteinen benötigt, sondern unterstützt Proteine, welche Probleme haben ihre native Konformation zu erreichen (Nathan et al. 1997). Die Entscheidung zwischen Faltung oder Degradation des Klienten wird durch ein Qualitätskontroll-System aus Chaperonen vermittelt, bei dem Hsp90 eine zentrale Stelle einnimmt, da es sowohl die Faltung als auch die Degradation seiner Klienten fördern kann (Theodoraki und Caplan 2012). Eine Inhibition von Hsp90 führt zu einer Degradation dieser Klienten über den Ubiquitin-Proteasom Weg und außerdem zu einer Aktivierung von Hsp70-Chaperonen.

Über die molekulare Basis der Erkennung von Hsp90-Klienten ist bisher nur wenig bekannt. Trotz intensiver Forschung konnten keine gemeinsamen Sequenzen oder strukturelle Motive ermittelt werden. Aufgrund der Vielfalt der Klienten kann man darauf schließen, dass eine gemeinsame Signalsequenz nicht existiert (Taipale et al. 2010). Die Erkennung der Klienten wird hingegen durch Co-Chaperone und andere Faktoren reguliert. Eine wichtige Rolle spielt

dabei die Affinität von Hsp90 zu seinen Klienten, welche vom ATPase-Zyklus und posttranslationalen Modifikationen abhängig sein kann (siehe Kapitel 1.2.7 und 1.2.8).

Tabelle 1: Bekannte Funktionen und Klienten der einzelnen Hsp90-Homologe

(modifiziert nach Johnson 2012)

Hsp90-Homolog	Bekannte Funktionen und Klienten
Hsp90 (Zytosol)	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilisierung von Klienten bei der Assemblierung in Multiproteinkomplexe - Regulation der Aktivität seiner Klienten
TRAP1 (Mitochondrien)	<ul style="list-style-type: none"> - Cyclophilin D (CypD) ist wahrscheinlich ein Klient von TRAP1; TRAP1 reguliert die Funktion von CypD (Kang 2012) - Es sind weitere Interaktionspartner bekannt (siehe Kapitel 1.3.1). Ob diese Klienten von TRAP1 sind, ist aber noch nicht eindeutig geklärt.
Grp95 (ER)	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilisierung und/oder Aktivierung von Klienten - Klienten: Toll-like Rezeptoren; Immunglobuline; Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)-II
HtpG (Bakterien)	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilisierung von Klienten bei der Assemblierung in Multiproteinkomplexe - Regulation der Aktivität seiner Klienten - Klienten: „Phycobilisome rod linker polypeptide L30R“; Uroporphyrinogen-Decarboxylase (HemE)

1.2.7 Regulation von Hsp90 durch Co-Chaperone

Für Hsp90 ist eine Reihe an Co-Chaperonen bekannt, die Hsp90 in seiner Funktion unterstützen. Co-Chaperone des zytosolischen Hsp90 sind z.B. p23, Hop, FKBP51 und 52, Cyp40, PP5, Cdc37, SGT-1, CHIP und Aha1 (Jackson 2013).

Eine große Gruppe von Co-Chaperonen enthalten TPR-Domänen, welche an das C-terminale MEEVD-Motiv von Hsp90 binden. Die Mitglieder dieser Gruppe von Co-Chaperonen sind in ihren Funktionen sehr unterschiedlich, besitzen aber einen gemeinsamen Mechanismus der Bindung an Hsp90 (Taipale et al. 2010). Ein Beispiel eines solchen Co-Chaperons ist HOP („Hsp70-Hsp90

organizing protein“), welches über seine multiplen TPR-Domänen gleichzeitig an Hsp90 und Hsp70 bindet. In einem Heterokomplex zusammen mit Hsp70, Hsp90 und Hsp40 spielt es eine wichtige Rolle bei der Konformationsänderung von Steroidrezeptoren (Pratt und Toft 2003). Weiterhin bewirkt die Bindung von HOP an Hsp90 und Hsp70 eine Veränderung in der Aktivität der Chaperone. HOP erhöht die ATPase-Aktivität von Hsp70 und inhibiert die ATPase-Aktivität von Hsp90 (Taipale et al. 2010). Weitere Co-Chaperone mit einer TPR-Domäne sind FKBP51 und 52 („FK506 binding protein“), Cyp40 (Cyclophilin 40), PP5 (Ser/Thr Proteinphosphatase 5) und CHIP („carboxy terminus of Hsc70 interacting protein“). Die Immunophiline FKBP51, FKBP52, Cyp40 und PP5 sind an der Regulation der Steroidhormon-Rezeptoren beteiligt (Wochnik et al. 2005) (Silverstein et al. 1997). Die Peptidylprolylisomerasen (PPIase) FKBP51, FKBP52 und Cyp40 besitzen neben der TPR-Domäne eine PPIase-Domäne und PP5 besitzt eine Phosphatase-Aktivität. Durch die Bindung über die TPR-Domäne werden diese funktionellen Gruppen an Hsp90 gekoppelt (Taipale et al. 2010); (Jackson 2013). Das Co-Chaperon CHIP besitzt ebenfalls eine TPR-Domäne und zusätzlich eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Die Interaktion von CHIP und Hsp90 führt dazu, dass Klienten von Hsp90 ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut werden (McDonough und Patterson 2003).

Andere Co-Chaperone ohne TPR-Domäne, wie p23, Cdc37 und Aha1, binden Hsp90 nicht über das MEEVD-Motiv. Das Co-Chaperon p23 (Prostaglandin E-Synthase 3, PTGES3) bindet an die N-terminale Domäne von Hsp90, bevorzugt, wenn dieses in der Nukleotid-gebundenen Form vorliegt (Ali et al. 2006; McLaughlin et al. 2006). Diese Bindung verstärkt die Affinität von ATP zu Hsp90 und inhibiert dessen ATPase-Aktivität. Dadurch wird Hsp90 in einer geschlossenen, ATP-gebundenen Konformation gehalten, welche eine höhere Affinität zu Klienten besitzt (McLaughlin et al. 2006). Cdc37 („cell division cycle 37“) wirkt wie Hop und p23 ebenfalls inhibierend auf die ATPase-Aktivität von Hsp90 (Siligardi et al. 2002). Es verbindet Hsp90 mit Klienten (Proteinkinasen), indem es mit dem C-Terminus an die N-terminale Domäne von Hsp90 und mit dem N-Terminus an Kinasen bindet. (Roe et al. 2004). Das Co-Chaperon Aha1 („activator of Hsp90 ATPase activity“) aktiviert die ATPase-Aktivität von Hsp90 (Panaretou et al. 2002). Es bindet an die mittlere Domäne von Hsp90 und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung in dem katalytischen „Loop“ der

mittleren Domäne, wodurch der katalytische Rest Arg380 (in Hefe) freigesetzt wird und mit der Nukleotidbindedomäne von Hsp90 interagieren kann. Dadurch wird Hsp90 in einer Konformation stabilisiert die ATP effizient hydrolysieren kann (Meyer et al. 2004).

Von den über 20 Co-Chaperonen sind die genauen Abläufe und Auswirkungen der Interaktion mit Hsp90, besonders im Zusammenhang mit der Regulation des ATPase-Zyklus, noch zu großen Teilen unklar und werden weiterhin intensiv untersucht. Die Frage, ob die anderen Hsp90-Homologe ebenfalls Co-Chaperone benötigen, ist zum größten Teil noch ungeklärt. So gibt es bereits für das ER-Homolog Grp94 mögliche Co-Chaperone (Jackson 2013), für das mitochondriale Homolog TRAP1 sind aber bisher noch keine Co-Chaperone bekannt.

1.2.8 Regulation von Hsp90 durch posttranslationale Modifikationen

Neben der Regulation durch Co-Chaperone kann die Funktion von Hsp90 auch durch verschiedene posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Nitrosylierung, Oxidation und Ubiquitinylierung, reguliert werden (Scroggins und Neckers 2007). Diese Modifikationen werden dem Protein nach der Translation angefügt und können dessen biologische Aktivität verändern.

Bei einer Phosphorylierung wird durch eine Protein-Kinase die γ -Phosphatgruppe von einem ATP-Molekül kovalent auf die Hydroxylgruppe einer Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Seitenkette eines Proteins übertragen. Diese Phosphatgruppen können durch Proteinphosphatasen wieder entfernt werden, wodurch die Aktivität eines Proteins je nach Situation angepasst werden kann. In der Literatur gibt es für Hsp90 einige Beispiele für Phosphorylierungen. Ein Beispiel ist die Phosphorylierung von Hsp90 durch *Saccharomyces* WEE1 (Swe1), einem Klienten von Hsp90. Diese Tyrosin-Kinase phosphoryliert einen konservierten Tyrosin-Rest in der N-terminalen Domäne von Hsp90 (Mollapour et al. 2010). Die Phosphorylierung ist abhängig vom Zellzyklus und ermöglicht Hsp90 mit einer ausgewählten Gruppe von Klienten zu interagieren. Eine Phosphorylierung kann auch zur Inhibierung der Interaktion von Hsp90 mit seinen Klienten führen. Dies konnte z. B. durch Deletion des *ppt1*-Gens in

Saccharomyces cerevisiae gezeigt werden. Dieses Gen codiert für die Serin/Threonin-Proteinphosphatase T, welche Hsp90 dephosphoryliert. Ein Knockout von Ppt1 führt zu einer Hyperphosphorylierung von Hsp90, was eine Reifung von Hsp90-Klienten verhindert (Wandinger et al. 2006).

Eine weitere posttranslationale Modifikation ist die Acetylierung von Lysinen. Bei dieser wird durch Acetyltransferasen eine Acetylgruppe auf die freie Aminogruppe von Lysinen übertragen (Sadoul et al. 2008). Das Entfernen der Acetylgruppen wird durch die Deacetylasen katalysiert. Scroggins et al. konnten zeigen, dass die Acetylierung/Deacetylierung der Aminosäure Lys294 des humanen Hsp90 α eine wichtige Rolle in der Regulation des Hsp90-Chaperonzyklus (ATPase-Zyklus) spielt (Scroggins et al. 2007). Eine weitere Studie beschreibt den Einfluss von reversiblen Acetylierungen auf die Hsp90-Chaperon-Aktivität. Die Inaktivierung der Histon-Deacetylase (HDAC) führt zu einer Hyperacetylierung von Hsp90 und der Dissoziation von dem Co-Chaperon p23, wodurch die Bindung an Klienten, wie dem Glukokortikoidrezeptor (GR), inhibiert wird (Kovacs et al. 2005).

Auch die S-Nitrosylierung hat einen Einfluss auf die Aktivität von Hsp90. Dabei wird Stickstoffmonoxid (NO) an die Thiolgruppe (SH) von Cystein gebunden, wodurch eine Thionitrit-Gruppe (-S-NO Brücke) entsteht (Martinez-Ruiz und Lamas 2004). Ein Beispiel ist die S-Nitrosylierung des Cys597 der C-terminalen Domäne von Hsp90 β , welche die Chaperonfunktion von Hsp90 inhibiert (Martinez-Ruiz et al. 2005). Außerdem kann Hsp90 durch oxidativen Stress posttranslational modifiziert werden. Ein Beispiel ist eine durch Tubocapsenolid A (TA) ausgelöste Inhibition der Aktivität des Hsp90/Hsp70-Chaperonkomplexes. Dies führt zu einem transienten Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was zu einer Thiol-Oxidation und einer damit verbundenen Aggregation von Hsp90 und Hsp70 führt. Die Folge ist eine Destabilisierung und Degradation von Hsp90-Klienten (Chen et al. 2008). Auch eine Ubiquitinylierung wirkt sich inhibierend auf Hsp90 und somit destabilisierend auf Hsp90-Klienten aus (Blank et al. 2003).

1.3 TRAP1

1.3.1 Allgemeine Eigenschaften von TRAP1

Das „tumor necrosis factor receptor-associated protein 1“ (TRAP1) ist das mitochondriale Hsp90-Homolog. Im Gegensatz zum zytosolischen Hsp90 sind nur wenige Interaktionspartner bekannt. Keiner dieser Interaktionspartner scheint eine Funktion als Co-Chaperon von TRAP1 zu besitzen. Weiterhin gibt es bedeutende funktionelle Unterschiede zwischen TRAP1 und dem zytosolischen Hsp90, welche auf eine kompartiment-spezifische Funktion von TRAP1 hinweisen. So ist TRAP1 nicht in der Lage einen stabilen Komplex mit den klassischen Co-Chaperonen von Hsp90, Hop und p23, zu bilden und hat außerdem keinen Effekt auf die Hsp90 abhängige Wiederherstellung des Progesteronrezeptors. Im Gegensatz dazu können sowohl Hsp90 als auch TRAP1 ATP hydrolysieren und die ATPase-Aktivität wird bei beiden durch die Hsp90-Inhibitoren Geldanamycin und Radicicol inhibiert (Felts et al. 2000). In weiteren Studien konnten vor allem eine zellschützende Funktion von TRAP1 im Zusammenhang mit der Einleitung von Apoptose und der Überlebensfähigkeit von Tumorzellen gezeigt werden (Altieri et al. 2012). Auf welche Art und Weise TRAP1 in diese Vorgänge involviert ist, erfordert jedoch noch weitere Untersuchungen.

Tabelle 2: Bekannte Interaktionspartner des mitochondrialen Hsp90 (TRAP1)

Überblick über bekannte Interaktionspartner von TRAP1 sowie über die Funktion der Interaktion.

Interaktionspartner	Funktion
Hsp90 (Zytosol)	<ul style="list-style-type: none"> - Komplex mit TRAP1 und Hsp60 - Regulation der Funktion von CypD und des Öffnens der „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP) (Ghosh et al. 2010)
Hsp60 (Mitochondrien)	<ul style="list-style-type: none"> - Komplex mit TRAP1 und Hsp90 - Regulation der Funktion von CypD und des Öffnens der MPTP (Ghosh et al. 2010)
Cyclophilin D (CypD) (Mitochondrien)	<ul style="list-style-type: none"> - TRAP1 reguliert die Funktion von CypD und darüber das Öffnen der MPTP (Kang 2012)
PTEN induced putative kinase 1 (PINK1) (Mitochondrien)	<ul style="list-style-type: none"> - PINK1 phosphoryliert TRAP1: verhindert Freisetzung von Cytochrom c und Auslösen von Apoptose (Pridgeon et al. 2007)
Sorcin (Mitochondrien)	<ul style="list-style-type: none"> - Wahrscheinlich unterstützende Funktion im antiapoptotischen Netzwerk von TRAP1 (Landriscina et al. 2010) - Spielt wie TRAP1 ebenfalls eine Rolle in der Multi Drug Resistance (MDR) (Landriscina et al. 2010)
Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) (Zytosol)	<ul style="list-style-type: none"> - Identifikation von TRAP1 durch Interaktion mit dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) (Song et al. 1995)
Retinoblastom Protein (Rb) (Zytosol)	<ul style="list-style-type: none"> - Identifikation von TRAP1 durch Interaktion mit dem Rb - Vermutlich Funktion als Chaperon von Rb während zellulärem Stress und zum Ende der Mitose (Chen et al. 1996)
Tat-binding protein 7 (TBP7) (Zytosol)	<ul style="list-style-type: none"> - Proteinqualitätskontrolle für fehlgeleitete oder fehlgefaltete, mitochondriale Proteine am ER (Amoroso et al. 2012)

1.3.2 Identifizierung und Lokalisation von TRAP1

TRAP1 (Tumor necrosis factor receptor associated protein 1) wurde als Erstes, mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (yeast two-hybrid), als Interaktionspartner des Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) identifiziert (Song et al. 1995). Ein Sequenzvergleich von Mitgliedern der Hsp90 Proteinfamilie mit TRAP1 zeigte eine Sequenzidentität von 34% und eine Homologie von 60%. Ein auffallender Unterschied war das Fehlen der stark geladenen Domäne in der TRAP1-Sequenz. Das identifizierte Protein wurde in einer Vielzahl von Geweben, wie Herz, Gehirn, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas sowie Krebszelllinien (z. B. HeLa Zellen), exprimiert (Song et al. 1995). TRAP1 interagiert mit der intrazellulären Domäne des TNFR1 und bindet diesen außerhalb der Todesdomäne (Song et al. 1995). Der TNFR1 ist ein Transmembranprotein der Plasmamembran (Zelloberfläche). Eine Aktivierung durch den Tumornekrosefaktor (TNF) führt zur Induktion von Proliferationsprozessen, Apoptose und einer „receptor interacting protein“ (RIP) 1 und RIP 3 abhängigen, programmierten Nekrose (Nekroptose). Die Signaltransduktion erfolgt durch Binden von Adaptorproteinen an die Todesdomäne (death domain) des TNFR1 (Cabal-Hierro und Lazo). Eine regulatorische Funktion von TRAP1 in der TNF-Signalübertragung wurde 2010 von Liu et al. beschrieben. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass TRAP1 die Zellproliferation und das Tumorwachstum über den TNF-Signalweg fördert und das der Knockdown von TRAP1 zu einer verringerten Proliferation, mit einer Zunahme im metastasbildenden Potential, führt. Eine direkte Interaktion von Trap1 und TNFR1 konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden (Liu et al. 2010).

In einem zweiten unabhängigen Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde ein 75 kDa großes Protein identifiziert, welches mit dem Retinoblastom-Protein (Rb) interagiert. Dieses Protein zeigte Homologien zur Hsp90-Familie und wurde Hsp75 genannt. Es wurde ubiquitär in Mausgeweben nachgewiesen und zeigte eine zytoplasmatische Lokalisation (Chen et al. 1996). Aufgrund der nukleären Lokalisation des Rb wurde eine Interaktion von Rb mit Hsp75 während der Mitose vermutet, wenn sich das Rb ebenfalls im Zytoplasma befindet. Weiterhin konnte eine Interaktion des Rb mit Hsp75 nach Hitzeschock und eine Hsp75

unterstützte Faltung von denaturiertem Rb nachgewiesen werden. Daher wurde vermutet, dass Hsp75 als Chaperon von Rb während zellulärem Stress und zum Ende der Mitose fungiert (Chen et al. 1996).

Durch Sequenzabgleich von TRAP1 und Hsp75 konnte gezeigt werden, dass beide Proteine identisch sind (Felts et al. 2000). Weiterhin konnten Felts et al. (2000) durch Immunzytochemie nachweisen, dass TRAP1 ein mitochondriales Protein ist. Die mitochondriale Lokalisation wurde außerdem durch die Identifikation einer mitochondrialen Lokalisationssequenz bekräftigt. Diese umfasst die ersten 59 Aminosäuren des N-Terminus und ist reich an den basischen Aminosäuren Arginin und Leucin, wohingegen saure Aminosäuren, bis auf Glutamat 4, fehlen (Felts et al. 2000). Die Lokalisationssequenz wird nach Aminosäure 59 abgespalten. Das reife TRAP1 ist anschließend 645 Aminosäuren lang und besitzt eine Größe von 75 kDa (Q12931 [TRAP1_HUMAN]; UniProt Datenbank). Die mitochondriale Lokalisation konnte durch Immunfluoreszenz, Immunogoldmarkierung und Western-Blot von Cechetto et al. (2000) bestätigt werden. Durch Fraktionierung der Mitochondrien in intakte Mitochondrien, Matrix, Innenmembran und Außenmembran wurde TRAP1 als mitochondriales Matrixprotein identifiziert (Cechetto und Gupta 2000). Für TRAP1 wurde aber auch eine Lokalisation im Intermembranraum und an der Innenmembran der Mitochondrien beschrieben (Pridgeon et al. 2007).

Aufgrund der mitochondrialen Lokalisation und der verwendeten Methode des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ist eine generelle Interaktion mit den zytosolischen Proteinen TNFR1 oder Rb unwahrscheinlich. TRAP1 konnte zwar auch an spezifischen Stellen außerhalb der Mitochondrien nachgewiesen werden (Cechetto und Gupta 2000), die überwiegend mitochondriale Lokalisation deutet aber auf eine vorwiegend Mitochondrien bezogene Funktion von TRAP1 hin.

1.3.3 Funktion von TRAP1 auf zellulärer Ebene

Aufgrund der bisher veröffentlichten Ergebnisse scheint TRAP1, ähnlich dem zytosolischen Hsp90, vielfältige Funktionen zu besitzen. Mitochondriale Funktionen von TRAP1 scheinen vor allem im Zusammenhang mit einer zellschützenden Funktion vor oxidativem Stress und der über den

mitochondrialen Signalweg eingeleiteten Apoptose zu stehen (Altieri et al. 2012). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass TRAP1 das Teilen und Verschmelzen von Mitochondrien („fission and fusion“) kontrolliert, indem es die Expression von „fission“-Proteinen reguliert (Takamura et al. 2012). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass TRAP1 einen Einfluss auf die oxidative Phosphorylierung, die β -Oxidation und den Citratzyklus hat (Yoshida et al. 2013). Es wurden aber auch Funktionen beschrieben, welche nicht Mitochondrien-spezifisch sind. Dazu gehört z. B. die Regulation der Zelladhäsion und der Morphologie von Synapsen durch die Veränderung der N-Cadherin-Expression (Kubota et al. 2009) und die Regulation der „unfolded protein response“ (UPR) im ER (Takemoto et al. 2011). Weiterhin wird TRAP1 verstärkt in Tumorzellen exprimiert, wodurch TRAP1 auch ein interessantes Ziel in der Krebstherapie darstellt (Altieri et al. 2012).

Im Folgenden wird die Funktion von TRAP1 als Regulator von oxidativem Stress und die zellschützende Funktion von TRAP1 in Tumorzellen näher erläutert.

1.3.3.1 Zellschützende Funktion von TRAP1 im Zusammenhang mit Apoptose und oxidativem Stress

Die Apoptose beschreibt eine Art des Zelltods, bei der die Zelle stirbt ohne ihre Nachbarn zu schädigen. Dabei zerfällt die Kernhülle und die DNS wird fragmentiert. Die Zelle verdichtet sich und es bilden sich runde Körperchen, welche phagozytiert werden können. Die Apoptose kann durch zwei Wege ausgelöst werden, einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg. Der extrinsische Weg wird durch Aktivierung der Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche induziert. Der intrinsische Weg wird durch interzelluläre Signale ausgelöst, welche dazu führen dass Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird, was das Einleiten der Apoptose zur Folge hat (Kroemer et al. 2007). Reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“; ROS) können durch Aktivierung des intrinsischen Weges Apoptose auslösen (Circu und Aw 2010). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass TRAP1 vor der durch oxidativen Stress ausgelösten Apoptose schützen kann. Es wurde z. B. gezeigt, dass die Behandlung von Zellen mit β -Hydroxyisovalerylshikonin (β -

HIVS), einem Inhibitor von Protein-Tyrosinkinasen, welcher Apoptose in verschiedenen Krebszelllinien auslöst, zu einer verringerten Expression von TRAP1 in Tumorzellen führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von TRAP1 die durch β -HIVS ausgelöste Apoptose verstärkt. Durch das Antioxidans N-Acetylcystein konnte die Verringerung der TRAP1-Expression wieder aufgehoben werden, was darauf hindeutet, dass ROS an der Regulation der TRAP1-Expression beteiligt sind. Dies führte zu der Theorie, dass die Verringerung der Expression von TRAP1 eine wichtige Rolle in der durch ROS ausgelösten Apoptose spielt (Masuda et al. 2004). In weiteren Studien konnte die Beteiligung von TRAP1 in der durch ROS ausgelösten Apoptose bestätigt werden. Zwei unabhängige Studien zeigten, dass TRAP1 eine antagonistische Funktion gegenüber ROS besitzt. In der ersten Studie wurde die Bildung von ROS durch die Behandlung der Zellen mit Granzym M (GzmM) induziert, welches eine Kaspase-abhängige Apoptose auslöst. Durch eine Überexpression von TRAP1 konnte die Bildung von ROS vermindert werden. Im Gegensatz dazu führte ein Knockdown von TRAP1 zu einer verstärkten ROS-Akkumulation, was eine Freisetzung von Cytochrom c und eine Verstärkung der durch GzmM ausgelösten Apoptose zur Folge hatte (Hua et al. 2007). In der zweiten Studie führte die Behandlung von Zellen mit Deferoxamin (DFO), einem Eisenchelator, zu einer verringerten Expression von TRAP1 und zu einer verstärkten Bildung von ROS. Eine Überexpression von TRAP1 führte hingegen zu einer Verringerung der DFO vermittelten ROS-Produktion (Im et al. 2007).

Ein weiterer Zusammenhang zwischen TRAP1 und oxidativem Stress zeigt sich in der Phosphorylierung von TRAP1 durch die „PTEN induced putative kinase 1“ (PINK1). PINK1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche eine Rolle in der Entstehung von Parkinson spielt und vor einer durch oxidativen Stress ausgelösten Apoptose schützt, indem die Freisetzung von Cytochrom c verhindert wird. Dies beruht auf der durch PINK1 vermittelten Phosphorylierung von TRAP1. Parkinson-spezifische Mutationen in PINK1 führen zu einer Beeinträchtigung der Kinase-Aktivität von PINK1 und dadurch zu einer verstärkten, durch oxidativen Stress ausgelösten Apoptose (Pridgeon et al. 2007). Dieser Zusammenhang von TRAP1 und PINK1 konnte durch eine kürzlich veröffentlichte Studie bestätigt werden, welche zeigt, dass *Drosophila*

Trap1 vor einer Schädigung der Mitochondrien in *Drosophila Pink1* Mutanten schützt (Costa et al. 2013). Ein weiterer Zusammenhang von TRAP1 und Parkinson zeigt sich darin, dass TRAP1 die Toxizität von α -Synuclein abschwächt. Mutationen oder Genduplikationen/-triplikationen von α -Synuclein führen zu einer autosomal dominanten, vererbten Form von Parkinson (Butler et al. 2012).

Die zuvor beschriebene Lokalisation von TRAP1 in der mitochondrialen Matrix (Cechetto und Gupta 2000) und die kürzlich beschriebene Lokalisation von PINK1 an der äußeren Membran der Mitochondrien (Becker et al. 2012) stehen jedoch im Gegensatz zu der von Pridgeon et al. (2007) beschriebenen Lokalisation von TRAP1 und PINK1 im Intermembranraum und an der Innenmembran. Daher ist fraglich auf welche Art und Weise TRAP1 und PINK1 miteinander interagieren.

1.3.3.2 Die zellschützende Funktion von TRAP1 in Tumorzellen

TRAP1 wird in vielen Tumorgeweben und Krebszelllinien, im Vergleich zu normalem Gewebe, verstärkt exprimiert. Dazu gehören unter anderem Krebszelllinien aus einem Zervixkarzinom (HeLa), einem Mammakarzinom (MCF-7), einem Kolonkarzinom (HCT116) und aus einem Burkitt-Lymphom (Raji) (Kang et al. 2007). Weiterhin konnte eine verstärkte Expression von TRAP1 in verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen werden. Dazu gehören unter anderem Adenokarzinome des Pankreas, der Brust, des Kolons und der Lunge (Kang et al. 2007) sowie Nasopharynxkarzinome (Fang et al. 2008) und Prostatakarzinome (Leav et al. 2010).

Die zellschützende Funktion von TRAP1 wird von Tumorzellen dazu genutzt, Apoptose zu verhindern, die Bildung von ROS zu reduzieren und die Zelle gegen Chemotherapeutika resistent zu machen („Multi Drug Resistance“ = MDR) (Altieri et al. 2012). So wird z. B. die mRNA von TRAP1 in Cisplatin-resistenten Zellen einer Ovarialkarzinom-Zelllinie verstärkt exprimiert (Macleod et al. 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von TRAP1 in ungefähr 60 % von humanen kolorektalen Karzinomen erhöht ist und dass dies einen MDR-Phänotyp in Kolonkarzinom-Zellen verursacht (Costantino et al. 2009). Außerdem wurde eine Interaktion von TRAP1 mit dem Kalzium-

bindenden Protein Sorcin nachgewiesen, welches ebenfalls eine Rolle in der MDR spielt (Landriscina et al. 2010). Der genaue Mechanismus wie TRAP1 an der MDR mitwirkt, ist jedoch noch nicht geklärt und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Auch die Mechanismen, durch die TRAP1 zum Überleben der Tumorzelle beiträgt, sind nur ansatzweise geklärt. Ein Model schlägt TRAP1 als ein Mitglied eines Multichaperon-Kompexes aus TRAP1 und einem in Mitochondrien vorkommenden Hsp90 vor, welcher das Öffnen der „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP) durch Binden an Cyclophilin D (CypD) reguliert. Eine verstärkte Expression von TRAP1 und Hsp90, wie sie in Tumorzellen vorkommt, verhindert das Binden von CypD an die MPTP. Dies führt zum Schließen der MPTP, wodurch das Membranpotential erhalten bleibt, was einer Apoptose entgegenwirkt (siehe Abbildung 4). Im Gegensatz dazu führt die Inhibition von TRAP1 zu einem Verlust des Membranpotentials und in der Folge zur Apoptose von Tumorzellen (Kang et al. 2007). In einer weiteren Studie wurde der beschriebene Komplex aus TRAP1 und Hsp90 um das mitochondriale Hsp60 ergänzt und es konnte gezeigt werden, dass die Bindung dieses Komplexes an CypD spezifisch in Tumorzellen stattfindet (Ghosh et al. 2010). Da außerdem die Inhibition von TRAP1 spezifisch das Wachstum von Tumorzellen verhindert (Kang et al. 2007), stellt TRAP1 ein interessantes Ziel für Krebstherapeutika dar.

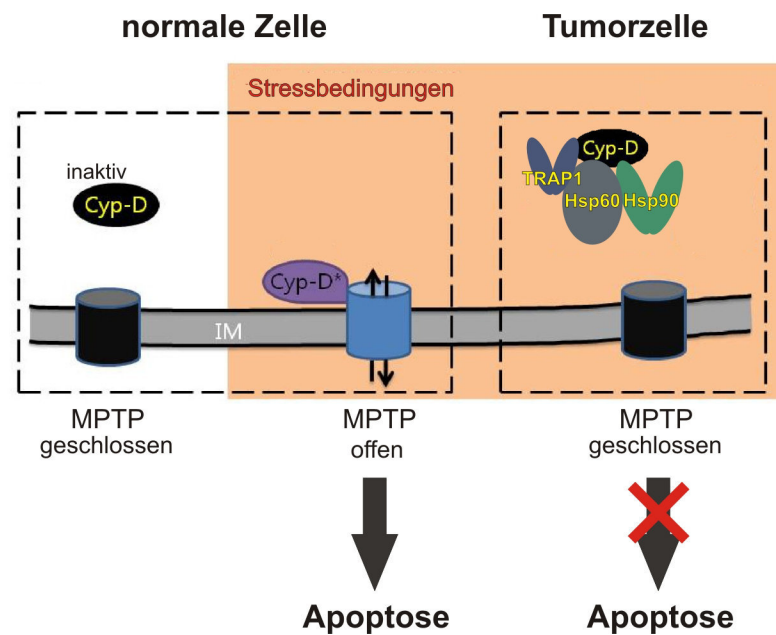


Abbildung 4: Regulation der MPTP in normalen und Tumorzellen

Der Multichaperon-Komplex aus TRAP1, Hsp90 und Hsp60 reguliert durch Binden an CypD das Öffnen der MPTP. In normalen Zellen bindet CypD unter Stressbedingungen an die MPTP, was zur Apoptose der Zelle führt. In Tumorzellen werden TRAP1 und Hsp90 verstärkt exprimiert. Durch das Binden des Multichaperon-Komplexes (TRAP1, Hsp90, Hsp60) an CypD wird daher spezifisch in Tumorzellen das Öffnen der MPTP verhindert, was einer Apoptose entgegenwirkt. IM = Innenmembran der Mitochondrien. (Abbildung modifiziert nach Kang et al. 2007; Ghosh et al. 2010; Kang 2012)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das mitochondriale Hsp90-Homolog TRAP1 vor allem eine wichtige zellschützende Funktion bei oxidativem Stress und der über den mitochondrialen Signalweg eingeleiteten Apoptose einnimmt. Weiterhin sind Studien bekannt, die Hinweise darauf geben, dass TRAP1 ebenfalls an der Aufrechterhaltung der Morphologie und des Metabolismus von Mitochondrien mitwirkt.

Da teilweise widersprüchliche Ansichten über die mitochondriale Lokalisation von TRAP1 bestehen, sollte diese in einem ersten Teil der Arbeit näher charakterisiert werden. Um weitere Einblicke in die komplexe Funktion von TRAP1 zu erhalten, sollten im Hauptteil der vorliegenden Arbeit neue Interaktionspartner für TRAP1 identifiziert werden. Nach erfolgreicher Identifizierung der Kandidatenproteine sollten die Interaktionen näher analysiert werden. Für das zytosolische Hsp90 ist bekannt, dass es zwei Möglichkeiten der Interaktion mit anderen Proteinen gibt. Zum einen kann es mit Co-Chaperone interagieren, welche Hsp90 in seiner Chaperon-Aktivität assistieren, zum anderen mit Substratproteinen, den sogenannten Klienten. Bis heute konnten noch keine Co-Chaperone von TRAP1 identifiziert werden. Es ist zudem noch nicht ausreichend geklärt, ob die bisher identifizierten Interaktionspartner von TRAP1 als Klienten bezeichnet werden können. Daher sollte untersucht werden, ob eine Veränderung der TRAP1-Expression die Aktivität der Interaktionspartner beeinflusst, was ein Hinweis darauf wäre, dass es sich um Klienten von TRAP1 handelt. Weiterhin sollte die ATP-Abhängigkeit der Interaktion untersucht werden, um zu ermitteln, ob diese spezifisch und Nukleotid-reguliert ist, wie für Chaperon-Substrate typisch. Da das zytosolische Hsp90 eine unterstützende Funktion in der Proteinfaltung sowie der Assemblierung von Klienten in Proteinkomplexe besitzt, sollte außerdem untersucht werden, ob TRAP1 einen Einfluss auf eine mögliche Komplexbildung der Interaktionspartner hat.

Die Identifikation neuer Interaktionspartner und die Untersuchung der Auswirkungen eines TRAP1-Knockdowns auf Mitochondrien sollten damit weitere Einblicke in die Funktion von TRAP1 bei der Aufrechterhaltung mitochondrialer Aktivitäten liefern.

2 Materialien

2.1 Geräte

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte. Allgemeine Geräte wie Kühlschränke und Schüttler sind nicht aufgeführt.

Elektrophorese und Western-Blot:

- | | | |
|------------------------------|--------------------------|----------|
| · Elektrophoresekammer groß | | Eigenbau |
| · Elektrophoresekammer klein | Mini-PROTEAN® Tetra Cell | BioRad |
| · Semy Dry Western-Blot | | PeqLab |
| · CCD Kamera | LAS-4000 mini | Fujifilm |

Elektrophoresekammer
(Agarosegele)

Eigenbau

Mikroskope:

- | | | |
|------------------------|----------------|-------|
| · Lichtmikroskop | Wilovert S | Will |
| · Fluoreszenzmikroskop | Axiovert 100 M | ZEISS |

Photometer

BioPhotometer plus Eppendorf

Spektralphotometer

Genesys 10S UV-Vis Thermo Scientific

Phosphorimager

FLA-5100 Fujifilm

Mikrotiterplatten-Lesegerät

GENios TECAN

Durchflusszytometer

CyFlow® space CY-S3001 Partec

PCR-Gerät

T3 Thermocycler Biometra

Ultraschallgerät

Sonifier250 Branson

Schüttelinkubator

Thermomixer comfort Eppendorf

Ultrazentrifuge

Optima™ MAX-XP Beckmann

Oxygraph

Oroboros Anton Paar

Ionenfallen-Massenspektrometer

HCT Ultra Bruker

2.2 Chemikalien

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien. Standardchemikalien sind nicht extra aufgeführt. Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Sigma, Merck, Roth, BioRad, Fermentas, Invitrogen oder Fluka bezogen.

Adenosintriphosphat (ATP)	Roche
Acrylamid / Bisacrylamid Mix (30/0.8)	Roth
17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin	BioTrend
Antimycin A	Sigma
Dichlorphenolindophenol (DCIP)	Sigma
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DPX Mounting Medium for Histology	Fluka
DSG	Thermo Scientific
Express Protein Labeling Mix- ^[35S] -, 2 mCi	PerkinElmer
JC-1	eBioscience
LumiLight PLUS	Roche
Menadion	Sigma
Oligomycin	Sigma
Phenazinmethosulfat (PMS)	AppliChem
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Sigma
ProLong® Gold	Invitrogen
Protease-Inhibitoren	Roche
Succinat (Bernsteinsäure; Dinatriumsalz Hexahydrat)	Roth
Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypsin	Seromed
Trypsin-Inhibitor	Sigma
Tween 20	Roth
Valinomycin	Sigma

2.3 Verbrauchsmaterialien

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien. Standard-Verbrauchsmaterialien sind nicht extra aufgeführt.

<i>Strep</i> -Tactin Superflow	Quiagen
Protein-A-Agarose (PAA)	Roche
PVDF-Membran	Millipore
Röntgenfilm Super RX	Fuji

2.4 Vektoren

In der folgenden Auflistung sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren aufgeführt.

Name	Beschreibung
pcDNA3-ST	<ul style="list-style-type: none"> - Klonierungs- und Expressionsvektor mit einer <i>Strep</i>-tag (ST) Sequenz in der „multiple cloning site“ (MCS) (Erstellt von Sebastian Franken) - CMV-Promotor, T7- und Sp6-Promotoren
pcDNA3 TRAP1-ST	<ul style="list-style-type: none"> - pcDNA3; - eingefügt: TRAP1 cDNS mit c-terminalem <i>Strep</i>-tag
pcDNA3 TRAP1 _{E115A} -ST	<ul style="list-style-type: none"> - pcDNA3; - eingefügt: TRAP1_{E115A} mit c-terminalem <i>Strep</i>-tag - von Cornelia Rüb
pcDNA3 TRAP1 _{R402A} -ST	<ul style="list-style-type: none"> - pcDNA3; - eingefügt: TRAP1_{R402A} mit c-terminalem <i>Strep</i>-tag - von Cornelia Rüb

2.5 Antikörper

Überblick über die im Western-Blot und in der Immunzytochemie verwendeten Antikörper zur Detektion von Proteinen. Es ist jeweils der Antikörper und der Hersteller angegeben. Soweit nicht gesondert erwähnt sind die Antikörper gegen humane Proteine gerichtet.

Primärantikörper	Hersteller
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-TRAP1	Gramsch
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-TRAP1 (Hsp75)	BD Biosciences
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-Strep-tag (gerichtet gegen Strep-tag)	Gramsch
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-SDHA (Komplex II Untereinheit A, Flavoprotein ;70 kDa)	Invitrogen
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-Komplex I (α -Subkomplex 9; 39 kDa)	Invitrogen
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-Komplex III (FeS-Untereinheit, 29,6 kDa)	Invitrogen
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-CoxIV (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit IV; 19,6 kDa)	Invitrogen
Polyklonaler Antikörper Maus-anti-CoxIV	Cell Signal
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-Grp75 (Mortalin)	Stressgen
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-Hsp60	Santa Cruz
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-Lon	Gramsch
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-Tim23	BD Biosciences
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-Tom40	Santa Cruz
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-Cytochrome c	Santa Cruz
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-PDI	Sigma
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-PMPCA (MPP)	Sigma
Monoklonaler Antikörper Maus-anti-Tubulin, beta-3	Dianova
Polyklonaler Antikörper Kaninchen-anti-Aktin	Sigma

Sekundärantikörper

	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen IgG Peroxidase-gekoppelt	Sigma
Ziege-anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelt	Sigma
Ziege-anti-Maus IgG Alexa Fluor 488-gekoppelt	Life Technologies
Ziege-anti-Kaninchen Cy3-gekoppelt	Dianova

2.6 Chemisch kompetente Zellen**Stamm Genotyp**

XL-1 Blue ^r	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F'[proAB⁺, lac^r lacZΔM15 Tn10 (tet^r)]</i> ; Bullock et al. (Bullock et al. 1987).
NEB	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96</i>
5αalpha	<i>recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 (von NEB)</i>

2.7 Oligonukleotide

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer.

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	Verwendung
KpnI TRAP1 fw	ATTACTGGTACCTACGACATGG CGCGCGAG	Primer Schnittstelle KpnI
KpnI TRAP1 rev	TAATCTGGTACCGTGTCTGCTCC AGGCCTTG	Primer Schnittstelle KpnI

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	Verwendung
Kontrolle antisense	GGAUAGAGGAUCGCGUUGUTT	siRNS
Kontrolle sense	ACAACGCGAUCCUCUAUCCTT	siRNS
siTRAP antisense	UAUAGUGCAGGGUGUAGCGTT	siRNS
siTRAP sense	CGCUACACCCUGCACUAUATT	siRNS

2.8 Zelllinien

Für Versuche mit Zellkulturzellen wurde folgende Zelllinie verwendet:

Zelllinie	Verwendung
HeLa (Human cervix adenocarcinoma Cells)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

2.9 Zellkulturmedien und in der Zellkultur verwendete Lösungen und Materialien

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien.

Wachstumsmedium

- | | |
|---|------------|
| · RPMI 1640 | Invitrogen |
| · 5 oder 10% [v/v] FCS | Invitrogen |
| · 2 mM L-Glutamin (L-Glut) | Invitrogen |
| · 5000 Units Penicillin pro 100 ml Medium | Invitrogen |
| · 5000 µg Streptomycin pro 100 ml Medium | Invitrogen |

Einfriermedium

- | | |
|-------------------|------------|
| · RPMI 1640 | Invitrogen |
| · 20 % [v/v] FCS | Invitrogen |
| · 10 % [v/v] DMSO | Sigma |

2.10 Allgemeine Lösungen und Puffer

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer. Die für eine Methode spezifische Lösungen und Puffer sind in der Beschreibung der Methode aufgeführt. Die Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, in destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst.

Acrylamid (Nativ-Gelelektrophorese)	49,5% [w/v] T, 3 % [w/v] C (96 g Acrylamid, 3 g bis-Acrylamid/ 200 ml)
Agarplatten	LB-Medium 1,5 % [w/v] Agar Lösung autoklaviert auf ca. 50°C abgekühlt und in Petrischalen gegossen.
Anoden-Puffer (Nativ-Gelelektrophorese)	500 mM Bis-Tris / HCl pH 7,0
Blocklösung	3 % [w/v] Magermilch 1 % [w/v] BSA in TBS-Tween gelöst
Coomassie-Färbelösung	0,1 % [w/v] Coomassie Brilliant Blue R250 10% [v/v] Essigsäure 40% [v/v] Methanol in ddH ₂ O
Deko Salt	0,15 M NaCl 50 mM Tris für Deko Salt mit Tween + 0,1 % [v/v] Tween
Entfärber	40% [v/v] Methanol 10% [v/v] Essigsäure in ddH ₂ O
3 x Gel-Puffer (Nativ-Gelelektrophorese)	200 mM ε-Aminocapronsäure 150 mM Bis-Tris / HCl pH 7,0

Kalium-Phosphat-Puffer (KPi)	1 M K_2HPO_4 mit 1 M KH_2PO_4 titrieren bis pH 7,4
Kathoden-Puffer (Nativ-Gelelektrophorese)	500 mM Tricine pH 7,0 150 mM Bis-Tris
LB-Medium	1 % [w/v] Bacto-Trypton 0,5 % [w/v] Bacto-Hefe Extrakt 1 % [w/v] NaCl in 1000 ml ddH ₂ O gelöst; pH 7,5;
Paraformaldehyd (PFA)- Lösung	40 g PFA 325 μ l NaOH (zum Lösen von PFA) 100 ml 10-fach PBS 100 g Saccharose hinzufügen pH-Wert auf 7,4 einstellen ad 1000ml mit ddH ₂ O
10-fach PBS	1,4 M NaCl 270 mM KCl 100 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4 18 mM KH_2PO_4
Sammelgelpuffer	0,8 M Tris pH 6,8
SDS Laufpuffer	250 mM Tris 1,91 M Glycin 10% [w/v] SDS
SDS-Probenpuffer	2 % [w/v] SDS 10 % [v/v] Glycerol 60 mM Tris-HCl pH 6,8 0,02 % [w/v] Bromphenolblau 5 % [v/v] β -Mercaptoethanol
Selektives LB-Medium / Agarplatten	+ 100 μ g/ml Ampicillin oder 50 μ g/ml Kanamycin

50-fach TAE-Puffer	2,5 M Tris 100 mM EDTA 1 M Natriumacetat mit Essigsäure (Eisessig) auf pH 8,0 eingestellt
TBS	200 mM Tris/HCl pH 7,5 1,25 M NaCl
Transferpuffer	20 mM Tris-Base 0,15 M Glycin (ICN Biomedicals, Inc.) 0,1 % [w/v] SDS 20 % [v/v] Methanol
Trenngelpuffer	1,87 M Tris pH 8,8

3 Methoden

3.1 DNS und RNS Techniken

3.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation von DNS-Fragmenten. Benötigt werden dazu eine thermostabile DNS-Polymerase und zwei spezifische Oligonukleotid-Primer, welche die zu amplifizierende DNS-Sequenz flankieren. In dieser Arbeit wurde die „Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase“ (Finnzymes) verwendet. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

10 µl	5 x Phusion-Puffer
1 µl	10 mM dNTPmix
2 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
2 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
10 ng	Template DNS
0,5 µl	Phusion DNA Polymerase
ad 50 µl	PCR-H ₂ O

Die Reaktionsansätze wurden in einen Heizblock gestellt und bei den für die jeweilige PCR optimalen Bedingungen inkubiert. Im Folgenden ist ein Reaktionsbeispiel für eine PCR mit der „Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase“ dargestellt:

30 sek	98 °C Initiale Denaturierung	} 35
10 sek	98 °C Denaturierung	
30 sek	58 °C Primer-Anlagerung (T _m +3°C des niedrigeren T _m)	
1 min	72 °C Primer-Verlängerung (30 sek/kb)	
10 min	72 °C Finale Verlängerung	
∞	4 °C	

T_m = Schmelztemperatur eines Primers

3.1.2 Auftrennung von DNS in Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen oder präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren. Diese lassen sich, aufgrund ihrer negativen Ladung durch Phosphatreste, im Gleichspannungsfeld durch ein komplexes Polymer aus Agarose, nach der Größe auftrennen (Sambrook et al. 1989). Mit Hilfe von Ethidiumbromid, das in die DNS interkaliert, kann unter UV-Licht bis zu 1 ng DNS nachgewiesen werden.

Die Konzentration der Agarose, richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNS-Fragmente. In dieser Arbeit wurden 1 oder 1,5-prozentige Agarosegele verwendet. Die benötigte Menge an Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst (Mikrowellenherd) und nach Abkühlen auf ungefähr 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,7 µg/ml). Anschließend wurde die gelöste Agarose in eine Form gegossen und bei Raumtemperatur abgekühlt. Das erstarrte Gel wurde in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die Proben wurden mit 6-fach Beladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese mit einer Spannung von 3-4 V/cm² durchgeführt. Durch das Auftragen eines Molekulargewichtstandards konnte zum Einem die Größe von DNS-Fragmenten bestimmt werden und zum Anderem, anhand der Fluoreszenzintensität der Probe und des Standards, die DNS-Konzentration der aufgetragenen Probe. Als Standard, diente der „Gene Ruler 1 kb DNA Ladder“ (Fermentas).

3.1.3 Spaltung von DNS mittels Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNS, erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme erkennen spezifische Basensequenzen und spalten in dieser Region die Phosphodiesterbindung beider DNS-Stränge, wobei entweder ein überhängendes Ende oder ein nicht-überhängendes Ende entstehen kann. Da durch die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen definierte Enden entstehen, können diese DNS-Fragmente bei Klonierungen eingesetzt werden. Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. In dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) und das Puffersystem von Fermentas verwendet. Zur Durchführung der Spaltung

wurden 2 µg Plasmid-DNS oder PCR-Produkt mit 10 U des benötigten Restriktionsenzym für 1 h bei vorgegebener Temperatur inkubiert. Durch Auftrennung der Fragmente in einem Agarosegel wurde die Vollständigkeit der Spaltung überprüft.

3.1.4 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die DNS-Isolierung aus Agarosegelen wurde das „NucleoSpin® Extract II Kit“ (Macherey-Nagel) verwendet. Die gewünschten DNS-Fragmente wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und die DNS nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.1.5 Saure Ethanol-fällung von DNS

Die saure Ethanol-fällung ist eine Methode, um DNS aus einer wässrigen Lösung zu fällen. Dazu wurde 1/10 des Probenvolumens an 3 M NaAC pH 4,6 und das 2,5-fache des Probenvolumens an 95-prozentigem Ethanol zur Probe hinzugefügt. Der Ansatz wurde gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei 16.550 x g zentrifugiert, um die DNS zu fällen (RT; Eppendorf Tischzentrifuge). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 250 µl 70-prozentigem EtOH gewaschen und anschließend weitere 5 min bei 16.550 x g zentrifugiert (RT; Eppendorf Tischzentrifuge). Nach Abnehmen des Überstandes und kurzem Trocknen des DNS-Pellet wurde die DNS in PCR-H₂O (ddH₂O) gelöst.

3.1.6 Dephosphorylierung des Vektors und Ligation

Mit Hilfe der Ligation kann die durch einen Restriktionsverdau linearisierte Plasmid-DNS mit einem anderen DNS-Fragment (Insert) verknüpft werden. Diese Reaktion wird durch DNS-Ligasen katalysiert. In dieser Arbeit wurde für die Ligation und die Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten das „Rapid DNA Dephos & Ligation Kit“ (Roche) verwendet.

Für die Dephosphorylierung wurde der linearisierte Vektor nach Herstellerangaben mit Phosphatase-Puffer und der „rAPId Alkaline

Phosphatase“ gemischt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase für 2 min bei 75 °C inaktiviert. Für die Ligation wurden 50 ng dephosphorylierter Vektor und 100 ng Insert mit den Puffern und der T4 DNA Ligase gemischt und für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert (Durchführung siehe Herstellerangaben).

Die Berechnung von Vektor- und Insertmenge, die für eine optimale Ligation benötigt wird, wurde durch folgende Formel berechnet:

$$X \text{ ng Insert} = \frac{(\text{bp Insert}) \cdot (10 \text{ ng Vektor})}{(\text{bp Vektor})} \cdot \text{gewünschtes molares Verhältnis}$$

3.1.7 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNS

Für eine Transformation wurden zunächst 100 µl chemisch kompetente Bakterien (NEB 5-alpha Competent *E. coli*) für 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde der Ligationsansatz (bzw. 10 ng reiner Vektor) dazu pipettiert. Der Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 30 sek ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt, der eine effektivere Aufnahme des Plasmids bewirkt. Der Ansatz wurde direkt nach dem Hitzeschock für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 950 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert. 1/10 und 9/10 der Bakterienkultur wurden auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen (Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml) und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.1.8 Isolierung von Plasmid-DNS

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus *E.coli* wurde die von chromosomaler DNS abgetrennte Plasmid-DNS über eine Silika-Gelmembran aufgereinigt und in PCR-H₂O (ddH₂O) oder Elutionspuffer eluiert. Je nachdem welche Menge an Plasmid-DNS gewonnen werden sollte, wurde eine Präparation mit dem „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas) oder dem „PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Eigenschaft von Nukleinsäure, Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 200-400$ nm zu absorbieren, kann sich zu Nutze gemacht werden, wenn man die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmen will. Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung erfolgte im Spektralphotometer bei 260 und 280 nm, gegen H₂O als Nullwert. Die zu messenden Proben wurden 1:50 in ddH₂O verdünnt. Dabei geben die Extinktion bei 260 nm die Menge der DNS und der Quotient aus 260nm/280 nm die Reinheit der DNS an. Bei einer proteinfreien Nucleinsäurelösung liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0.

Die Konzentration von DNS wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$C [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \cdot V \cdot F$$

c = Konzentration der Ausgangslösung

OD260 = Absorption bei 260 nm

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor

Der Multiplikationsfaktor F leitet sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz her. Er beträgt für doppelsträngige DNS (ds DNS) 50 $\mu\text{g/ml}$, für einzelsträngige DNS (ss DNS) 33 $\mu\text{g/ml}$, für RNS 40 $\mu\text{g/ml}$ und für Oligonukleotide 20 $\mu\text{g/ml}$. (Der Experimentator, S.26, 4. Auflage 2003)

3.1.10 Erstellung von siRNS

(Quellen: Sigma Aldrich und protocol-online)

Zum Erstellen von siRNS wurde eine geeignete Sequenz zum Knockdown von TRAP1 ermittelt und die dazu passende Kontroll-Sequenz mit der gleichen Basen-Zusammensetzung erstellt. Die Spezifität der Sequenzen wurde mit Hilfe des NCBI-Blast untersucht, wobei die gegen das Zielprotein gerichtete siRNS-Sequenz einen „Expect Value“ (E) von unter 1 aufweisen sollte. Dieser Wert

gibt an wie signifikant die erstellte Sequenz an die Zielsequenz bindet. Je näher dieser Wert bei Null liegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die siRNS an die Zielsequenz bindet. Für die Kontrollsequenz wurde überprüft, ob eine Bindung an eine Zielsequenz wahrscheinlich ist. Dies wurde ebenfalls über den „Expect Value“ abgeschätzt. Für die Kontrollsequenz sollte dieser möglichst hoch liegen.

Zur Erstellung der siRNS wurden jeweils zwei komplementäre RNS-Oligonukleotide, mit einer Länge von 19 Basenpaaren und einem 3' dTdT Überhang, synthetisiert (Firma biolegio). Die getrockneten RNS-Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 µM in RNase freiem Wasser (kein DEPC-Wasser) gelöst. Pro Milliliter wurden jeweils 200 µl des Oligonukleotid 1, 200 µl des Oligonukleotid 2, 200 µl 5 x Annealing Puffer (100 mM Kalium-Acetat, 30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 2 mM Magnesium-Acetat) und 400 µl RNase freies Wasser gemischt und im Wasserbad für 1 min auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde das Wasserbad ausgeschaltet und über einen Zeitraum von 45-60 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Die siRNS wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Ein mehrmaliges Einfrieren und Auftauen wurde vermieden. Alle Puffer und Materialien waren RNase frei.

3.2 Zellkultur

Die meisten Versuche dieser Arbeit wurden mit HeLa-Zellen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI1640 Medium (Gibco, Invitrogen), mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt, in einer wassergesättigten Atmosphäre.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und es wurden sterile Einmalplastikmaterialien oder hitzesterilisierte Materialien verwendet.

3.2.1 Teilen von Zellkulturzellen

Zum Teilen von Zellkulturzellen wurden die Zellen 1-mal mit sterilem PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese, mit 1 ml Trypsin-Lösung pro 10 cm Schale, für 3-5 min bei 37 °C

inkubiert. Dabei wurde das Ablösen der Zellen regelmäßig per Mikroskop kontrolliert, um die Inkubationszeit mit Trypsin so kurz wie möglich zu halten. Durch Zugabe von 4 ml FCS-haltigem Medium pro 10 cm Schale wurde das Trypsin inhibiert und die Zellen wurden durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf neuen Zellkulturschalen, meist in 1:3-, 1:4-, oder 1:5-Verdünnung, ausgesät.

3.2.2 Zählen von Zellkulturzellen

Das Zählen von Zellkulturzellen erfolgte entweder mit einer Neubauer-Zählkammer oder mit dem „Scepter™ Automated Cell Counter“ von Millipore.

Zum Zählen der Zellen mit dem Mikroskop wurden 10 µl einer Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden 32 (2 * 16) Quadrate ausgezählt. Die so bestimmte Anzahl an Zellen wurde durch 2 geteilt und mit 10 multipliziert, woraus sich die Zellzahl pro µl ergab.

Zum Zählen der Zellen mit dem „Scepter™ Automated Cell Counter“ wurden 15 µl einer Zellsuspension in 135 µl PBS verdünnt und nach Herstellerangaben mit dem „Scepter™ Automated Cell Counter“ gezählt. Die erhaltene Zellzahl wurde mit 10 multipliziert, woraus sich die Zellzahl pro ml ergab.

3.2.3 Transfektion von Zellkulturzellen

Die Transfektion beschreibt eine Methode, bei der Fremd-DNS oder RNS in eine eukaryotische Zelle eingebracht wird. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Transfektionsreagenzien verwendet. Die Transfektion von Plasmid-DNS erfolgte mit dem „TurboFect™ Transfection Reagent“ (Thermo Scientific). Bei der Transfektion mit TurboFect™, einem kationischen Polymer, bilden sich positiv-geladene Komplexe, welche an die Zelloberfläche adhären und endozytiert werden. Zur Transfektion von siRNS wurde das „Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent“ (Invitrogen) verwendet. Die Transfektion mit Lipofectamine™ beruht auf der von Felgner 1987 beschriebenen Lipofektion (Felgner et al. 1987). Bei dieser Methode werden kationische Lipide eingesetzt, welche durch Ultraschall behandelt wurden und so Liposomen gebildet haben. Bei der Zugabe von DNS bilden sich Liposomen-

DNS-Komplexe, die mit der Zellmembran fusionieren. Die Durchführung der Transfektionen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.4 Präparation von Mitochondrien aus Zellkulturzellen

Die Präparation von Zellkulturzellen erfolgte mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation (Becker et al.). Dabei wird sich zunutze gemacht, dass Mitochondrien bei 12.000 x g pelletieren. Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin, Waschen in PBS und Pelletieren für 5 min bei 800 x g und 4 °C, wurden die Zellen in HMSEB-Puffer aufgenommen (0,22 M Mannitol, 0,07 M Saccharose, 0,02 M HEPES, pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,1% [w/v] BSA, 1 mM PMSF). Nach Schwellen für 20 min bei 4 °C wurden die Zellen mit einem Homogenisator durch 30 Hübe homogenisiert. Anschließend wurden durch eine Zentrifugation für 5 min bei 1.500 x g und 4 °C die Zellkerne und schweren Zellbestandteile pelletiert. Das Homogenisieren wurde ein zweites Mal mit 15 Hüben durchgeführt. Der Überstand mit den Mitochondrien, Mikrosomen und dem Zytosol wurde abgenommen. Durch Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C wurden die Mitochondrien pelletiert. Die isolierten Mitochondrien wurden 1-mal in HMSE-Puffer (0,22 M Mannitol, 0,07 M Saccharose, 0,02 M HEPES-KOH pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) gewaschen und erneut für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Mitochondrien in HMSE-Puffer resuspendiert und entweder sofort für einen Versuch verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.4.1 Präparation von Mitochondrien aus Mausgewebe

Die Präparation von Mitochondrien aus Mausgewebe erfolgte überwiegend wie für die Präparation aus Zellkulturzellen beschrieben (siehe Kapitel 3.2.4). Folgende Änderungen wurden durchgeführt. Leber oder Gehirn wurden frisch aus einer Maus präpariert und in ungefähr 0,5 cm große Stücke geschnitten. Das Homogenisieren erfolgte in einem Durchgang mit 40 Hüben. Das Homogenisat wurde für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit den Mitochondrien für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Zum Entfernen aller Gewebereste wurden die Mitochondrien 2-mal gewaschen.

3.2.5 Subzelluläre Fraktionierung

Zur subzellulären Fraktionierung wurden die Zellen in Zellhomogenat (alle Zellbestandteile), Zytosol, Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Mitochondrien aufgeteilt. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte wie bereits für die Präparation von Mitochondrien beschrieben. Dazu wurde der HMSE-Puffer (ohne BSA) verwendet. Das Zellhomogenat (Probe 1) wurde für 5 min bei 4 °C und 1.500 x g zentrifugiert, um die Zellkerne und schweren Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 12.000 x g in die mitochondriale Fraktion (Probe 4) und in Zytosol mit ER aufgeteilt. Zytosol (Probe 2) und ER (Probe 3) wurden durch Zentrifugation für 30 min, bei 4 °C und 100.000 x g getrennt (Schema siehe Abbildung 7.1). Jeweils 5 % der Fraktionen wurden mit SDS-Probenpuffer gemischt und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.2.6 Submitochondriale Fraktionierung

Die Fraktionierung der Mitochondrien wurde durch stufenweise Permeabilisierung erreicht. Die äußere Membran der Mitochondrien (OM) wurde, durch Inkubation der Mitochondrien für 25 min in hypoosmotischem Schwellpuffer, zerrissen (20 mM KPi pH 7,4, 0,005 % [w/v] BSA), was zur Ausbildung von Mitoplasten führte. Um die innere Membran der Mitochondrien (IM) zu durchlöchern, wurde eine Ultraschallbehandlung durchgeführt (4 x 10 Pulse bei 50 % Auslastungsgrad („duty cycle“), Ausgangsregler („output control“) auf 3–4; Branson Sonifier 250). Durch Inkubation mit Triton X-100 wurden auch die Membranen der Mitochondrien komplett aufgelöst. Basierend auf dieser Methode wurden zwei Experimente durchgeführt. Zum einen wurde die Proteasesensitivität und zum anderen wurde die Löslichkeit bzw. Membranassoziation von TRAP1 und anderen Proteinen untersucht (Schema siehe Abbildung 8.1).

Die Proteasesensitivität wurde durch Inkubation mit 50 µg/ml (f.c.) Trypsin für 30 min auf Eis untersucht. Trypsin wurde durch Zugabe von 200 µg/ml (f.c.) Trypsin-Inhibitor (Sigma) und 1 mM PMSF inaktiviert. Für jede Fraktion wurde auch eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

Die Membranassoziation der Proteine wurde durch Trennen der einzelnen Fraktionen in Pellet und Überstand untersucht. Dazu wurden die Kontroll- und die Schwellfraktion für 10 min bei 20.000 x g und die Ultraschall- und Tritonfraktion für 30 min bei 100.000 x g zentrifugiert.

Alle Pellets wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Überstände wurden mit Trichloressigsäure (TCA) behandelt, um die Proteine zu fällen (siehe Abschnitt TCA-Fällung). Nach der TCA-Fällung wurden die Pellets ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.2.7 Immunzytochemie (ICC)

Um die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen oder die Expression von Proteinen nach einer Transfektion zu untersuchen, kann die Immunzytochemie angewendet werden. Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Protein mittels Antikörpern nachgewiesen. Dazu wird in der Regel ein Primärantikörper benutzt, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist und ein Sekundärantikörper, welcher den Primärantikörper bindet. An den Sekundärantikörper ist ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden, welcher unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Die Zellen auf den Deckgläsern wurden mit Hilfe von Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (4 % [w/v] PFA und 10 % [w/v] Saccharose in PBS) für 10-12 min bei 4 °C fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch 0,5 % [v/v] Triton-X 100 in PBS für 5 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Vermeidung einer unspezifischen Bindung der Antikörper wurden freie Bindestellen mit 2 % [w/v] BSA in PBS für 30-60 min bei RT geblockt. Der primäre Antikörper wurde in ebenfalls 2 % [w/v] BSA/PBS verdünnt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in einer feuchten Kammer (eine Lage angefeuchtetes Whatman-Papier wurde mit einer Lage Parafilm bedeckt). Pro Deckglas wurden 30 µl der Antikörperlösung auf den Parafilm gegeben. Jedes Deckglas wurde mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen gelegt und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Deckgläser wurden durch dreimaliges Eintauchen in PBS gewaschen und anschließend, wie oben beschrieben, auf einen Tropfen Antikörperlösung mit dem sekundären

Antikörper gelegt. Zum Ansetzen dieser Lösung wurden der sekundäre Antikörper und eine DAPI-Gebrauchslösung (1 mg/ml; 1:100 verdünnt) in 2 % [w/v] BSA/PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Danach wurden die Deckgläser einmal mit PBS und anschließend zweimal mit ddH₂O gewaschen, bevor die Zellen auf einem Tropfen Eindeckelmedium (ProLong® Gold, Invitrogen oder DPX Mounting Medium, Fluka) fixiert wurden.

3.2.8 Atmungsmessungen

(durchgeführt von Susanne Schöler, LIFE & BRAIN Center, UKB Bonn)

Die mitochondriale Atmung von transfizierten und mit Digitonin permeabilisierten Zellen (10 µg Digitonin/10⁶ Zellen) wurde durch den Verbrauch von Sauerstoff in einem high resolution Oroboros Oxygraphen (Anton Paar, Graz, Österreich) bei 30 °C gemessen. Alle Experimente wurden in Atmungs-Puffer (110 mM Mannitol, 60 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM Na₂EDTA and 60 mM Tris-HCl pH 7,4) durchgeführt. Es konnte entweder die Komplex I oder die Komplex II spezifische Atmung gemessen werden.

Die Messung der Komplex I-spezifischen Atmung erfolgte durch Zugabe von 10 mM Glutamat und 5 mM Malat. Die Messung der Komplex II-spezifischen Atmung konnte, nach Inhibition des Komplex I durch 1 µM Rotenon, gemessen werden. Als Komplex II-Substrat wurde 10 mM Succinat hinzugefügt. In beiden Fällen erfolgte die Messung der maximalen Atmung nach Zugabe von 2 mM ADP. Die Hemmung der ATP/ADP-Translokase erfolgte durch Zugabe von 2 mM Atractylosid. Als letztes wurde 3-mal der Entkoppler 4,5,6,7-tetrachloro-2-trifluoro-methylbezimidazole (TTFB; 200 nM) hinzugefügt.

3.2.9 Membranpotential-Messungen

Messungen des Membranpotentials von Mitochondrien wurden an einem Durchflusszytometer (Partec CyFlow® space CY-S-3001, Partec) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode lässt sich die Größe (forward scatter, FSC) und die Granularität (sideward scatter, SSC) einer Zelle bestimmen. Weiterhin ist es möglich die Fluoreszenz einer Zelle zu messen. Dabei können gleichzeitig zwei

Fluoreszenzen gemessen werden. Die Messung des Membranpotentials erfolgte entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TMRE) oder 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodid (JC-1).

TMRE ist ein membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich bei intaktem Membranpotential an die Mitochondrien anlagert und rot fluoresziert. Zur Färbung der Zellen mit TMRE wurden diese 20 min bei 37 °C in Wachstumsmedium mit 0,5 µM TMRE inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und 2-mal in PBS gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 5 min bei 200 x g (RT) durchgeführt. Für die Messung wurden die Zellen in PBS mit 0,1 % [w/v] BSA resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gehalten.

JC-1 ist ein membranpotentialsensitiver Fluoreszenzfarbstoff, welcher abhängig vom Membranpotential entweder als Monomer (grün, niedriges Membranpotential) oder in Form von Aggregaten (rot, hohes Membranpotential) vorliegt. Zur Färbung der Zellen mit JC-1 wurden diese von der Zellkulturschale abgelöst und in einer Konzentration von 800.000 Zellen pro ml in FACS-Puffer (PBS + 0,1 % [w/v] BSA) resuspendiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 5 min bei 200 x g durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 37 °C mit 10 µl JC-1 inkubiert und bis zur Messung auf Eis gehalten.

Als Negativkontrolle diente in beiden Fällen das K⁺-spezifische Ionophor Valinomycin, welches das Membranpotential zerstört. Dazu wurden die Zellen vor der Färbung mit TMRE oder JC-1 für 1 h mit 5 µM Valinomycin inkubiert.

3.2.10 Enzymassay Succinat-Dehydrogenase (SDH)

Die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (SDH) wurde nach Zugabe des SDH-Substrats Succinat, mit Hilfe von Phenazinmethosulfat (PMS) und Dichlorphenolindophenol (DCIP), gemessen. Das Prinzip dieses Enzymassays ist die Übertragung von Elektronen aus der Oxidation von Succinat zu Fumarat auf das im oxidierten Zustand blaue DCIP, welches durch die Reduktion farblos wird. Zur Messung der Enzymaktivität wurden jeweils 100 µg Mitochondrien in SDH-Puffer (75 mM KPO₄, 150 µM EDTA, 3,75 mM Na-Azid, 0,15 % [w/v] BSA) gelöst. Kurz vor der Messung wurden 70 mM Na-Succinat (pH 7,4), 0,61 mM

Phenazinmethosulfat (PMS) und 0,14 mM Dichlorphenolindophenol (DCIP) hinzugefügt. Die Abnahme der blauen Färbung von DCIP wurde in einem Spektralphotometer bei 600 nm gemessen. Von den gemessenen Proben wurden pro Spur 20 µg Mitochondrien mit SDS-Probenpuffer gemischt und zur Überprüfung der Proteinlevel auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.2.11 Enzymassay Cytochrom-c-Oxidase (COX)

(durchgeführt von Karin Kappes-Horn, LIFE & BRAIN Center, UKB Bonn)

Zur Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidase (COX) Aktivität wurde die Veränderung der Absorption von Cytochrom c gemessen. Die Messung der COX-Aktivität erfolgte nach Zugabe von reduziertem Cytochrom c, welches durch die Cytochrom-c-Oxidase oxidiert wird. Die Veränderung der Absorption kann bei 550 nm gemessen werden, da die Absorption abhängig vom Oxidationszustand ist. Die Messung erfolgte bei 30 °C für 5 min in einer Quarzküvette. Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 M KPO₄, 0,1 % Dodecylmaltosid, Cytochrom c und 20 µl Zellhomogenat. Die Zellen wurden durch Aufnahme in KPO₄ und anschließender Ultraschallbehandlung homogenisiert.

Die Proteinmenge eines Reaktionsansatzes wurde nach Herstellerangaben mit dem „Total Protein Kit“ (Sigma) bestimmt.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden die Methode der SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli verwendet (Laemmli 1970; Laemmli 1970). Bei dieser Methode werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Porengröße des Polyacrylamidgels kann durch die Konzentration an Acrylamid variiert werden. Es wurden entweder Mini-Gele mit dem System von Biorad oder große Gele mit einem selber hergestellten System

gegossen. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden standardmäßig zur Auftrennung von Proteinen bis 70 kDa 12,5 %ige Gele verwendet. Zur Auftrennung von Proben für die Massenspektrometrie und nach Behandlung mit einem chemischen Vernetzer wurden 8 %ige Gele verwendet. Für kleine Gele betrug das Trenngelvolumen 5 ml und das Sammelgelvolumen 1 ml, während für große Gele 17 ml Trenngel und 5 ml Sammelgel benötigt wurden. Die verwendeten SDS-Gele setzen sich wie folgt zusammen:

Gelvolumen	Sammelgel (5 %)	Trenngel (8 %)	Trenngel (12,5 %)
	1 ml	5 ml	5 ml
H ₂ O	720 µl	2,6 ml	1,85 ml
40 % Acrylamid	166 µl	1,325 ml	2,075 ml
1,875 M Tris HCl pH 8,8	-	1 ml	1 ml
0,8 M Tris HCl pH 6,8	100 µl	-	-
10 % [w/v] SDS	10 µl	50 µl	50 µl
10 % [w/v] APS	10 µl	30 µl	30 µl
TEMED	2 µl	3 µl	3 µl

Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden mit einer Mikroliterspritze in die Taschen der Gele aufgetragen. Als Standards wurden die Proteinmarker „Low Molecular Weight Marker“ (14 kDa – 66 kDa) und „High Molecular Weight Marker“ (29 kDa – 200 kDa) von Sigma verwendet. Bis zum Erreichen des Trenngels wurde eine Stromstärke von 25 A und nach Erreichen des Trenngels von 30 A eingestellt.

3.3.2 Nativ-Gelelektrophorese (Blue native PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen wurden die Methode der Nativ-Gelelektrophorese (Blue native PAGE) nach Schagger verwendet (Laemmli 1970; Laemmli 1970; Schagger und von Jagow 1991). Mit dieser Methode können Proteine, Oligomere und Proteinkomplexe in ihrer nativen Form aufgetrennt werden. Auch in diesem System werden die Proteine durch eine negative Ladung in einem Acrylamidgel aufgetrennt. Die negative Ladung kommt dabei nicht wie bei der SDS-PAGE durch das geladene Detergenz Natrium Dodecyl Sulfat (SDS), sondern einerseits durch die Eigenladung der

Proteine und andererseits durch an die Proteine angelagertes Coomassie Brilliant Blue G 250. Als Detergenz wurde Triton X-100 verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nativ-Gelelektrophorese im Mini-Gel Maßstab durchgeführt. Dazu wurde das Mini-Gel System von Biorad benutzt.

Jeweils 40 µg Mitochondrien pro Spur wurden in 18 µl Nativ-Lysepuffer (10 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl, 10% [v/v] Glycerol, 2 mM EDTA, 0,2 % [v/v] Triton X-100 und 1 mM PMSF), durch 20-mal auf- und abpipettieren mit einer gelben Spitze, aufgeschlossen. Anschließend folgte eine Inkubation für 15 min auf Eis. Um größere, ungelöste Bestandteile zu entfernen wurden die Proben für 10 min, bei 12.000 x g, zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 2 µl 10-fach Nativ-Ladepuffer (5% [w/v] Coomassie Brilliant Blue G250, 100 mM Bis-Tris, pH 7,0, 500 mM ε-Aminocaprinsäure) gemischt. Die Proben wurden auf ein gekühltes 9 % Nativ-Gel aufgetragen. Der Anoden und der Kathoden-Puffer (Zusammensetzung Kapitel 2.10) wurden ebenfalls gekühlt. Als Marker diente der „NativeMARK™ Unstained Protein Standard“ (Invitrogen). Die Proben wurden trocken auf das Gel aufgetragen und anschließend vorsichtig mit dem Kathoden-Puffer überschichtet. Die Spuren ohne Probe wurden mit Nativ-Ladepuffer, verdünnt in Nativ-Lysepuffer ohne Triton, beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h mit einer Spannung von 100 V und anschließend mit einer Spannung von 200 V.

Mischung für 1 Gel (je 5 ml):

	Trenngel (9 %)	Sammelgel
3 x Gel Puffer	1665 µl	1000 µl
Acrylamid (49,5% T, 3 % C)	912,5 µl	240 µl
10 % [w/v] APS (µl)	17 µl	30 µl
TEMED (µl)	2 µl	3 µl
Wasser	2403,5 µl	1727 µl

3.3.3 Western-Blot nach dem Semidry-Verfahren

Unter dem Begriff Western-Blot versteht man den Transfer von Proteinen von einem Gel auf eine Membran, z.B. aus PVDF. Für den Western-Blot wurden pro Gel 6 Lagen Whatman-Papier und ein Stück PVDF-Membran auf die Größe des zu transferierenden Gels zugeschnitten. Das Whatman-Papier wurde in Transferpuffer (Zusammensetzung siehe S. 20) getränkt und die PVDF-

Membran wurde in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer überführt. Drei Lagen des in Transferpuffer getränkten Whatman-Papiers wurden auf die Anode gelegt, gefolgt von der angefeuchteten PVDF-Membran, dem zu transferierenden Gel und den restlichen drei Lagen Whatman-Papier. Bei dem Aufbau des Blots wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen befanden. Anschließend wurde der Deckel der Apparatur (die Kathode) auf den Aufbau gelegt und das Gel mit einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche für 90-120 min transferiert.

Nach dem Blot wurde mittels Coomassie-Färbung das Blotresultat überprüft. Dafür wurde die PVDF-Membran für 1 min in der Coomassie-Färbelösung bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran durch Inkubation in Entfärber entfärbt. Nach dem Trocknen der Membran konnten die transferierten Proteinbanden erkannt und gegebenenfalls die Membran in einzelne Teile zerschnitten werden.

3.3.4 Detektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran mit Antikörpern

Nach dem Blot der Proteine auf eine PVDF-Membran konnten diese mittels Antikörperdetektion nachgewiesen werden. Dazu wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in Blocklösung, für 60 min bei Raumtemperatur (RT), unter Schütteln geblockt. Nach der Blockierung wurde die Membran 3-mal für 5 min mit DekoSalt-Tween (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.10) gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Der Primärantikörper wurde in benötigter Verdünnung in DekoSalt-Tween angesetzt. Die Inkubation erfolgte entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter Schütteln. Danach wurde die Membran 3-mal für jeweils 10 min mit DekoSalt gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in DekoSalt-Tween verdünnt und die Membran wurde für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde erneut 3-mal für 10 min mit DekoSalt gewaschen.

Der Nachweis des gebundenen Zweitantikörpers erfolgte über das System der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) (LumiLight PLUS, Roche). Das erzeugte

Lichtsignal wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fujifilm) oder Aufnahme an einer „Charged coupled device“ (CCD) Kamera (LAS-4000, Fujifilm) nachgewiesen.

3.3.5 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Zur Fällung von Proteinen wurde Trichloressigsäure (TCA) verwendet. Dazu wurden 1/5 Endvolumen von 72 % [w/v] TCA zu den Proben geben und gemischt. Anschließend wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation, für 30 min bei 20.000 x g und 4 °C, wurden die gefällten Proteine pelletiert. Das Pellet wurde mit 600 µl eiskaltem Aceton gewaschen und erneut für 12 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets bei RT für 2-3 min, wurde dieses in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Durch Schütteln für 5 min bei RT, Inkubation bei 95 °C für 5 min und erneutem Schütteln für 5 min bei RT, wurde das Pellet in dem SDS-Probenpuffer gelöst.

3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des „BioRad DC Assay“ Systems, welches auf der Methode nach Lowry basiert (Lowry et al. 1951). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers für eine Mikrotiterplatte.

Als Proteinstandard diente eine BSA-Eichkurve mit folgenden BSA-Konzentrationen: 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml.

Mit Hilfe der aus der BSA-Eichkurve erhaltenen Formel, konnte die Proteinkonzentration in µg/µl berechnet werden.

3.3.7 Massenspektrometrische Analyse nach der LC-MS-Methode

(durchgeführt von Sebastian Franken, Serviceabteilung Massenspektrometrie, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn)

Mit Coomassie angefärbte Proteinbanden wurden ausgeschnitten und die Proteine mit Hilfe des „Trypsin Profile IGD Kit“ (Sigma) aus den Gelfragmenten nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die aufgereinigten Proben wurden mit Hilfe eines HCT-Ultra Ionenfallen-Massenspektrometers (Bruker) analysiert. Dazu wurden die getrocknete Peptide, nach in-Gel-Verdau mit Trypsin, in 0,1 % [v/v] Trifluoressigsäure gelöst und mit einem Autosampler auf eine Vorsäule mit Umkehrphase (C18) geladen. Die Auftrennung von Peptiden wurde ebenfalls auf einer C18-Säule durchgeführt. Die Laufmittel waren 0,1 % [v/v] Ameisensäure (Lösung A) sowie 80 % [v/v] Acetonitril und 0,1 % [v/v] Ameisensäure (Lösung B). Die Elution der Peptide wurde mit einem linearen Gradienten von 5 % bis 50 % innerhalb von 30 min erreicht. Die Chromatographie wurde direkt mit einer Electrospray-Ionisierung (ESI) an einem HCT-Ultra Ionenfallenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) gekoppelt. Die fünf intensivsten Peptidionen im Massenbereich von 300-3000 m/z wurden zur Fragmentierung mit „Collision Induced Dissociation“ ausgewählt. Die Massenlisten wurden durch Prozessierung der Rohdaten mit ESI Compass 1.3 (Bruker Daltonik) generiert und über Proteinscape 1.3 (Bruker Daltonik) zur Datenbanksuche an einen Mascot-Server (Version 2.4.1, Matrix Science Ltd., London) gesandt. Zum Abgleich der Fragmentationenspektren mit den humanen Sequenzen aus SwissProt (Version 2012_11) wurden folgende Parameter gesetzt: Proteolytische Spezifität Trypsin mit einer Fehlstelle, Peptidionentoleranz 300 ppm, Fragmentionentoleranz 1,1 Da, Ladungen 1+ bis 3+ und ESI-Trap Ionenserie. Als variable Modifikationen wurden Acetylierung (Protein-N-Terminus), Carbamidomethylierung (Cys) und Oxidation (Met) zugelassen. Nur Proteine mit mindestens einem Peptid über dem Identity-Score wurden berücksichtigt. Mindestens zwei Peptide pro Protein und ein Score von mindesten 80 waren für die Proteinidentifizierung erforderlich.

3.3.8 Affinitätschromatographie

3.3.8.1 Aufreinigung von *Strep*-tag Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von Proteinen mit einem *Strep*-tag, erfolgte mit Hilfe der Affinitätschromatographie über „*Strep*-Tactin Superflow Plus Beads“ (Qiagen). Hierbei ist *Strep*-Tactin, eine modifizierte Form von Streptavidin, an das Trägermaterial „Superflow Plus“ gebunden. Zur Aufreinigung wurden 200 µg isolierte Mitochondrien in 100 µl Lysepuffer durch 20-mal auf- und abpipettieren mit einer gelben Spitze aufgeschlossen. Je nach Bedingung wurde dafür der Lysepuffer mit ATP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 x protease inhibitor mix (Roche), 2 mM ATP, 0,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 % [v/v] Triton X-100) oder ohne ATP (10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 1 x protease inhibitor mix (Roche); 2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 % [v/v] Triton X-100) verwendet. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden größere, ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation, für 10 min, bei 12.000 x g und 4 °C, entfernt. Für die Aufreinigung wurden die *Strep*-Tactin Beads durch 3-mal Waschen mit Waschpuffer äquilibriert. Je nach Bedingung wurde der Waschpuffer mit ATP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 x protease inhibitor mix, 0,5 mM DTT, 2 mM ATP, 0,5 mM MgCl₂) oder ohne ATP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 x protease inhibitor mix, 0,5 mM DTT) verwendet. Für die Aufreinigung wurden jeweils 100 µl Lysat mit 100 µl der äquilibrierten *Strep*-Tactin Beads (1:1 Mix) und 100 µl Waschpuffer gemischt und für 1 h bei 4 °C auf einem Drehschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 1 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Durchlauf aufbewahrt (je 10 % pro Spur aufgetragen). Die Beads wurden 3-mal durch Zugabe 50 µl Waschpuffer und Zentrifugation, für 1 min, bei 2000 x g, gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch aufkochen in SDS-Probenpuffer. Das erste Mal wurde 40 µl 2-fach SDS-Probenpuffer auf die Beads gegeben und das zweite Mal 40 µl 1-fach SDS-Probenpuffer. Beide Male wurden die Proben für 5 min bei 14000 rpm geschüttelt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und ein zweites Mal 5 min bei 14000 rpm geschüttelt. Beide Eluate einer Probe wurden vereint. Es wurden jeweils 10 % Lysat, 10 % Durchlauf und 100 % Eluat (von 100 µg Mitochondrien) auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.3.8.2 Aufreinigung von *Strep*-tag Fusionsproteinen und Interaktionspartnern in Abhängigkeit von ATP

Zur Untersuchung der ATP-Abhängigkeit der Bindung wurden die Mitochondrien vor der Affinitätschromatographie unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Für allen Bedingungen ohne ATP-Zugabe wurden die Mitochondrien in HMSE-Puffer (20 mM HEPES pH 7,6; 220 mM Mannitol; 70 mM Saccharose; 1 mM EDTA), für alle Bedingungen mit ATP-Zugabe in HMS-Puffer (20 mM HEPES pH 7,6; 220 mM Mannitol; 70 mM Saccharose) aufgenommen und für 15-20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C pelletiert und 1-mal in HMSE oder HMS-Puffer gewaschen.

Zur Aufreinigung unbehandelter Mitochondrien wurden diese in HSME-Puffer aufgenommen und wie oben beschrieben inkubiert. Für die Aufreinigung unter Bedingungen mit reduzierter ATP-Konzentration wurden die Mitochondrien während der Vorbehandlung mit 0,01 U/µl Apyrase und 20 µM Oligomycin behandelt. Für die Aufreinigung unter Bedingungen mit erhöhter ATP-Konzentration wurden die Proben mit 5 mM Glutamat und 5 mM Malat behandelt. Die Lyse und Aufreinigung der Proben erfolgte wie in Kapitel 3.3.8.1 beschrieben.

3.3.8.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Art der Affinitätschromatographie. Bei dieser Methode wird ein Antikörper, welcher gegen ein Protein gerichtet ist welches aufgereinigt werden soll, an ein Trägermaterial gebunden. In dieser Arbeit wurde als Trägermaterial Protein A Agarose (PAA) verwendet. Die Kopplung des Antikörpers an die PAA erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für 1 h in Kopplungspuffer (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl und 0,1 % [v/v] Triton X-100). Anschließend wurden die Mitochondrien, wie in Abschnitt 3.3.8.1 beschrieben, lysiert und die Proteine aufgereinigt.

3.3.9 Chemische Vernetzung

Mit dem homobifunktionalen chemischen Vernetzer DSG ist es möglich, interagierende Proteine kovalent miteinander zu verbinden. DSG ist ein wasserunlöslicher homobifunktionaler N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester), dessen reaktive Gruppen 7,7 Ångström auseinander liegen. NHS-Ester reagieren mit primären Aminen des N-Terminus von Peptiden und mit der freien Aminogruppe von Lysinen, wodurch unter Freilassung der NHS-Gruppe eine kovalente Amidbindung entsteht.

Isolierte Mitochondrien wurden in HS-Puffer (20 mM HEPES, pH 7,6; 250 mM Saccharose; 5 mM MgAc; 80 mM KAc) aufgenommen und auf Eis für 30 min mit 25 µM DSG inkubiert. Die Vernetzung wurde durch Zugabe von 25 mM Tris/HCl pH 7,5 abgestoppt und die Proben wurden für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien für 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95 °C inkubiert.

3.3.10 Import von radioaktiv markierten Proteinen in isolierte Mitochondrien

Mit einem *in vitro* Import ist es möglich, ein radioaktiv markiertes Vorläuferprotein in isolierte Mitochondrien zu importieren. Dazu wurden die Mitochondrien in einer Konzentration von 400 µg/ml in Import-Puffer (20 mM HEPES, pH 7,6; 250 mM Saccharose; 5 mM MgAc; 80 mM KAc, 5 mM Glutamat, 5 mM Malat, 1 mM DTT, 5 mM KPO₄ pH 7,4 und 2 mM ATP) aufgenommen. Das radioaktiv markierte Vorläuferprotein wurde zu den in Import-Puffer gelösten Mitochondrien gegeben und für unterschiedliche Zeitpunkte bei 30 °C in die Mitochondrien importiert. Der Import wurde durch Zugabe von 0,5 µM Valinomycin abgestoppt. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Als Negativkontrolle für den Import wurde eine Mischung aus Antimycin, Valinomycin und Oligomycin (AVO) vor dem Import zu einer Probe hinzugefügt, um das Membranpotential zu zerstören und dadurch zu verhindern, dass das Vorläuferprotein importiert wird. Die Proben wurden geteilt und bei einer Hälfte wurde das noch gebundene Vorläuferprotein durch eine

Inkubation für 30 min auf Eis mit 100 µg/ml Trypsin entfernt. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 800 µg/ml Trypsin-Inhibitor und 1 mM PMSF inhibiert. Anschließend folgte eine weitere Inkubation für 15 min auf Eis. Durch Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C wurden die Mitochondrien pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit Import-Puffer gewaschen, in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95 °C inkubiert.

3.3.10.1 Translation

Die für die Synthese des Vorläuferproteins benötigte mRNA wurde nach Herstellerangaben mit dem „mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit“ von Ambion hergestellt. Für die *in vitro* Translation wurde das „Reticulocyte lysate system“ von Promega verwendet. Dazu wurden die mRNA, das Retikulozyten Lysat und [35S]-methionine/cysteine gemischt und nach Herstellerangaben inkubiert.

3.3.10.2 Import und Assemblierung

Das Vorläuferprotein wurde, wie bereits beschrieben (Kapitel 3.3.10), für 5 min, bei 37 °C importiert und die Reaktion wurde durch 0,5 µM Valinomycin abgestoppt. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt, um eine Assemblierung zu verhindern. Zur Assemblierung der SDHA in den SDH-Komplex wurden die Proben, für die in Abbildung 16.1 angegebenen Zeitpunkte, erneut bei 37 °C inkubiert. Die Assemblierung wurde durch zurückstellen auf Eis abgestoppt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C. Das Pellet wurde durch 20-mal auf- und abpipettieren mit einer gelben Spitze in 37 µl Nativ-Lysepuffer (10 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl, 10 % [v/v] Glycerol, 2 mM EDTA, 0,2% [v/v] Triton X-100 und 1 mM PMSF) aufgeschlossen. Anschließend folgte eine Inkubation für 15 min auf Eis. Um größere, ungelöste Bestandteile zu entfernen, wurden die Proben für 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Jeweils 18 µl Probe wurden, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, mit Nativ-Ladepuffer gemischt und auf ein Nativ-Gel aufgetragen. Jeweils 9 µl Probe wurden mit SDS-Probenpuffer gemischt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Western Blot auf eine PVDF-Membran wurden die Signale der mit [35S]-markierten Proteine, mit Hilfe der digitalen

Autoradiographie an einem FLA 5100 Phosphoimager (Fujifilm), ausgewertet. Die quantitative Analyse erfolgte mit der MultiGauge Software (Fujifilm).

3.3.11 OxyBlot

Der OxyBlot wurde verwendet, um carbonylierte Proteine nachzuweisen. Diese sind ein Maß für reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche durch oxidativen Stress der Zellen entstehen können. Durch die ROS werden Carbonylgruppen in Proteine eingefügt, welche mit Hilfe des OxyBlot nachgewiesen werden können.

Zur Vorbehandlung wurden jeweils 120 µg isolierte Mitochondrien (aus Mausleber) für 10 min, bei 12.000 x g und 4 °C pelletiert und in 200 µl Resuspendierungspuffer (250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM MOPS-KOH, 3 mM ATP, 5 mM Glutamat, 5 mM Malat) aufgenommen. Anschließend wurden die Mitochondrien unter verschiedenen Bedingungen für 15 min inkubiert. Als Kontrolle diente eine Inkubation bei 0 °C. Um die Auswirkung eines Hitzeschocks zu testen, wurden die Mitochondrien bei 42 °C inkubiert. Die Inkubation mit 5 mM H₂O₂ oder 1 mM Menadion erfolgte bei 25 °C. Nach der Inkubation wurden die Mitochondrien für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die pelletierten Mitochondrien wurden in 30 µl Lyse-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1-fach Protease-Inhibitoren, 2 mM EDTA, 50 mM DTT, 1 % [v/v] Triton X-100) durch 20-mal auf- und abpipettieren aufgeschlossen und zur Lyse für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 30 min bei 125.000 x g und 4 °C in einer Ultrazentrifuge (Beckmann) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Das Pellet wurde in 100 µl Lyse-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend folgte erneut eine Zentrifugation für 30 min bei 125.000 x g und 4 °C. Das Pellet wurde in 10 µl Lyse-Puffer aufgenommen. Jeweils 5 µl des Überstandes aus der ersten Zentrifugation und 5 µl der Pellet-Fraktion nach der zweiten Zentrifugation wurden mit 5 µl einer 12 %-igen SDS-Lösung gemischt. Für den Nachweis carbonylierter Proteine wurde das „OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit“ (Chemicon) verwendet. Die Derivatisierung erfolgte durch Mischen von jeweils 10 µl Probe mit 10 µl „1-fach DNPH-Solution“ und Inkubation für 15 min bei RT. Zu 10 µl der Negativkontrolle

wurden 10 µl „Derivatization-Control Solution“ gegeben. Die Derivatisierung wurde durch Zugabe von 7,5 µl „Neutralization Solution“ und 0,74 M 2-mercaptoethanol abgestoppt. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu DNP-Hydrason derivatisierten Carbonylgruppen erfolgte mit einem Antiserum gegen DNP.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Untersuchungen

4.1.1 Nachweis von carbonylierten Proteinen mit Hilfe des OxyBlots

Zur Untersuchung einer möglichen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursachten Carbonylierung von mitochondrialen Proteinen wurde die Methode des OxyBlots verwendet. Mit dieser Methode können Carbonylgruppen detektiert werden, welche direkt oder indirekt durch ROS in die Proteine eingefügt wurden (Dalle-Donne et al. 2003). Das Prinzip besteht dabei in der Derivatisierung von Carbonylgruppen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP-Hydrazon). Dazu wurden, wie im Methodenteil beschrieben (siehe Kapitel 3.2.4.1), Mitochondrien aus Mausleber präpariert und anschließend unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Nach Lyse der Mitochondrien wurden diese durch einen Zentrifugationsschritt für 30 min bei 125.000 x g in Pellet und Überstand aufgetrennt. Anschließend folgte die Derivatisierung (siehe Kapitel 3.3.11). Die Proben wurden durch Elektrophorese in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion des DNP-Hydrazon erfolgte mit Hilfe eines Antiserums gegen DNP. Nach Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper konnte dieser mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.4).

Die nachgewiesenen carbonylierten Proteine waren fast ausnahmslos größer als 43 kDa (siehe Abbildung 5). Als Kontrolle wurden die Mitochondrien entweder ohne vorherige Inkubation oder nach 15 min, bei 0 °C weiterbehandelt. In beiden Fällen sind im Vergleich zu den Stressbedingungen (42 °C, H₂O₂, Menadion) weniger Proteine carbonyliert. Nach Inkubation für 15 min unter Stressbedingungen konnten deutlich mehr carbonylierte Proteine nachgewiesen werden. Dabei sind die Signale nach Hitzestress (42 °C) geringer als nach H₂O₂- oder Menadion-Behandlung. Wie in der Diskussion

näher erläutert (siehe Kapitel 5.1), wurde diese Methode aufgrund der deutlich vorhandenen Carbonylierung unter Kontrollbedingungen (siehe Abbildung 5, Spur 1 bis 4) nicht weiter verfolgt.

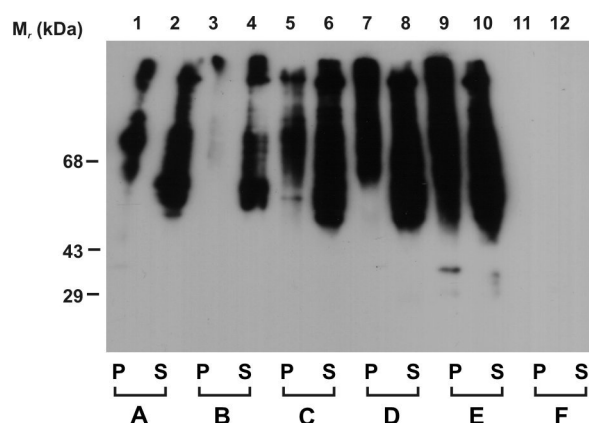


Abbildung 5: OxyBlot

HeLa-Mitochondrien wurden unter den angegebenen Bedingungen inkubiert. Nach Lyse der Mitochondrien wurden diese durch Zentrifugation für 30 min, bei 125.000 x g, in Pellet (P) und Überstand (S) aufgetrennt. Anschließend folgten eine SDS-Gelelektrophorese, ein Western-Blot und eine Antikörperdetektion gegen DNP. Der Nachweis gebundener Sekundärantikörper erfolgte mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL). 1. AK: anti-DNP; 2. AK: anti-Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt; DNP-Marker

Zu erkennen sind die mittels ECL detektierten Signale für carbonylierte Proteine im Pellet (P) oder im Überstand (S). Diese nehmen nach Inkubation für 15 min bei 42 °C, mit 5 mM H₂O₂ oder mit 1 mM Menadion (5-10), im Vergleich zu den Kontrollen ohne vorherige Inkubation (1 + 2) oder bei 0 °C (3 + 4), zu. Die Signale lagen fast ausschließlich über 43 kDa. Die Negativkontrolle (11 + 12) wurde mit einer Lösung ohne DNPH inkubiert, wodurch keine Derivatisierung der Carbonylgruppen zu DNP-Hydrason erfolgte. Ansonsten waren die Inkubationsbedingungen dieser Probe mit denen der anderen Proben identisch.

A = ohne Inkubation; B = 0 °C; C = 42 °C; D = 5 mM H₂O₂ bei 25 °C; E = 1 mM Menadion bei 25 °C; F = Negativkontrolle

4.1.2 Mitochondrialer Import nach Inhibition von TRAP1

Molekulare Chaperone spielen eine bedeutende Rolle in der Protein-Homöostase von Zellen (siehe Einleitung Kapitel 1.1). Ein wichtiges mitochondriales Chaperon ist das Hsp90-Homolog TRAP1. Um zu untersuchen ob TRAP1 am mitochondrialen Import beteiligt ist wurde die Auswirkung der Inhibition von TRAP1 auf den Import eines mitochondrialen Matrixproteins mit Hilfe des Hsp90-spezifischen Inhibitors 17-AAG getestet. Dazu wurde das radioaktiv markierte Vorläuferprotein der Malatdehydrogenase 2 (pMDH2), wie im Methodenteil (Kapitel 3.3.10) beschrieben, in HeLa-Mitochondrien importiert, welche mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors 17-AAG behandelt

wurden. Die Auswertung des Imports erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese, mit anschließender Trocknung des Gels und Auswertung anhand von digitaler Autoradiographie (siehe Abbildung 6). Hierbei ist eine Abnahme des Imports bei steigender Konzentration von 17-AAG in der Inkubationslösung zu erkennen. Bei einer Konzentration von 200 μM 17-AAG beträgt der Import von MDH2 im Vergleich zur Kontrolle nur noch 60 %.

Um sicherzustellen, dass das mitochondriale Membranpotential durch 17-AAG nicht beeinflusst wird, wurde dieses nach Inkubation mit 17-AAG und anschließender Inkubation mit JC-1 in einem Durchflusszytometer analysiert (Kapitel 3.2.9). Bis zu einer Konzentration von 200 μM ergaben die Messungen keinen Unterschied. Erst nach Zugabe von 400 μM 17-AAG wurde ein verringertes Membranpotential gemessen. Die Negativkontrolle nach Zugabe von Valinomycin zeigte, aufgrund dessen Wirkung als Ionophor, ein deutlich verringertes Membranpotential (siehe Abbildung 6).

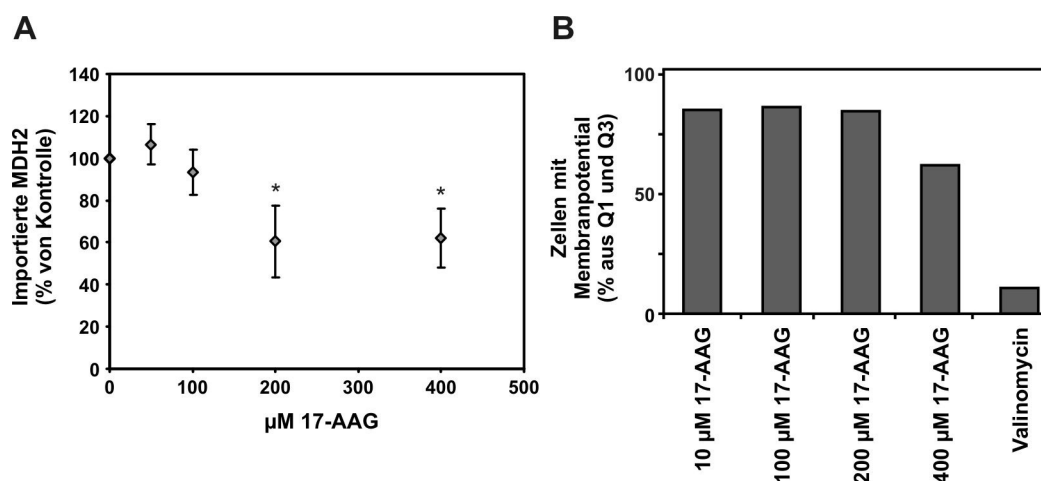


Abbildung 6: Mitochondrialer Import nach Inhibition von TRAP1 durch 17-AAG

A: HeLa-Mitochondrien wurden für 15 min in HMSE-Puffer unter den oben angegebenen Konzentrationen an 17-AAG inkubiert. Nach der Inkubation wurde das mit 35S markierte Vorläuferprotein pMDH2 in die Mitochondrien importiert. Anschließend folgten eine SDS-Gelelektrophorese, das Trocknen des Gels und die Auswertung mit Hilfe der digitalen Autoradiographie. Nach Inkubation mit 50 und 100 μM 17-AAG war keine Veränderung in der Menge der importierten MDH2 zu erkennen. Ab einer Konzentration von 200 μM war der Import der MDH2 signifikant um 40 % verringert. $n=5$ **B:** HeLa-Mitochondrien wurden für 15 min in HMSE-Puffer, unter den oben angegebenen Konzentrationen an 17-AAG, inkubiert. Anschließend wurde das Membranpotential nach Zugabe von JC-1 mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen. Als Negativkontrolle (kein Membranpotential) wurde die Zellesuspension für 10 min unter Zugabe von 5 μM Valinomycin inkubiert. Nach Inkubation der Zellen mit 400 μM 17-AAG war das Membranpotential um 25 % verringert. Zellen welche sich in den Abschnitten Q1 und Q3 befanden zeigten eine rote Fluoreszenz was für ein positives Membranpotential steht (Erklärung siehe Abbildung 16.1). $n=1$

4.2 Lokalisation von TRAP1

4.2.1 Klonierung von TRAP1-*Strep*-tag Konstrukten

Zur Untersuchung der Funktion des „Tumor necrosis factor receptor associated protein 1“ (TRAP1) wurden drei verschiedene Konstrukte erstellt. Für das erste Konstrukt wurde die hTRAP1-cDNS in den Expressionsvektor pcDNA3-*Strep*-tag (pcDNA3-ST) inseriert (Vektorkarte siehe Anhang Abbildung 23). Dieser Vektor enthält eine *Strep*-tag (ST) codierende Sequenz in der „multiple cloning site“ (MCS), unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalovirus (CMV) Promotor. Neben dem Vektor zur Überexpression des Wildtyp TRAP1 wurden zwei Punktmutanten von TRAP1 durch eine zwei Stufen PCR kloniert (durchgeführt von Cornelia Rüb). Die Mutationen wurden so gewählt, dass die klonierte DNS für Mutanten codiert, welche nicht mehr in der Lage sein sollten ATP zu hydrolysieren. Dazu wurden bereits bekannte Mutanten des zytosolischen Hsp90 ausgesucht (Obermann et al. 1998; Meyer et al. 2003) und die entsprechenden homologen Aminosäuren in der humanen Sequenz von TRAP1 mutiert.

4.2.2 Subzelluläre Lokalisation von TRAP1

Im Vergleich zu allen anderen Mitgliedern der Hsp90 Proteinfamilie besitzt TRAP1 eine mitochondriale Lokalisationssequenz (Felts et al. 2000). Neben der hauptsächlich mitochondrialen Lokalisation von TRAP1 wurde auch eine zytosolische Lokalisation beschrieben (Cechetto und Gupta 2000). Um zu überprüfen, ob die Lokalisation von TRAP1 und den TRAP1-Mutanten mit einem c-terminalen *Strep*-tag nach Überexpression auch mitochondrial ist, wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt (Kapitel 3.2.5; Schema: Abbildung 7.1). Dazu wurden TRAP1 und die TRAP1-Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} transient überexprimiert. Als Negativkontrolle wurde der entsprechende Leervektor (pcDNA3-ST) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen homogenisiert und in Homogenat, Zytosol, Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Mitochondrien mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation fraktioniert.

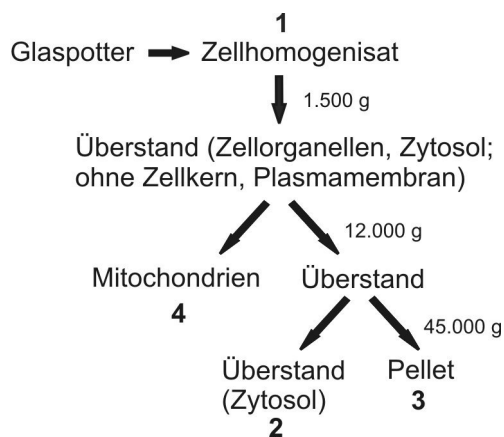


Abbildung 7.1: Schema der subzellulären Fraktionierung

Die Mitochondrien wurden in einem Glaspotter homogenisiert und in vier Fraktionen aufgeteilt. Das Zellhomogenat (1) besteht aus allen Zellbestandteilen. Für die anderen Fraktionen wurden Zellkern und Plasmamembran entfernt (für 5 min bei 4 °C und 1.500 x g). Das Zytosol mit den Zellorganellen wurde in die Fraktionen Zytosol (2, Überstand), ER (3, Pellet) und Mitochondrien (4) aufgeteilt. Es wurden jeweils 5 % der Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Zur Analyse der Proben wurden diese auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach SDS-Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurde eine Antikörperdetektion gegen TRAP1, Grp75 (Matrix), PDI (ER), Aktin (Zytosol) und Tom40 (Mitochondrien) durchgeführt. Der Nachweis des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mittels ECL.

Wie in Abbildung 7.2 zu erkennen, konnten TRAP1 und die TRAP1-Mutanten auch nach Überexpression überwiegend in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden, wobei nach der Überexpression der Mutanten auch ein Teil des TRAP1 in der zytosolischen Fraktion detektiert werden konnte. Die mitochondrialen Proteine Grp75 und Tom40 waren ebenfalls in den Fraktionen Homogenat und Mitochondrien lokalisiert. Die ER-spezifische Proteindisulfid-Isomerase (PDI) konnte in den Fraktionen Homogenat, ER, Mitochondrien und zum geringen Teil auch im Zytosol nachgewiesen werden. Als zytosolischer Marker diente das Zytoskelett-Protein Aktin. Eine teilweise Schädigung der Mitochondrien nach Überexpression der TRAP1-Mutanten ist daran zu erkennen, dass sich das mitochondriale Matrixprotein Grp75 (Mortalin) zu einem geringen Teil ebenfalls im Zytosol befindet.

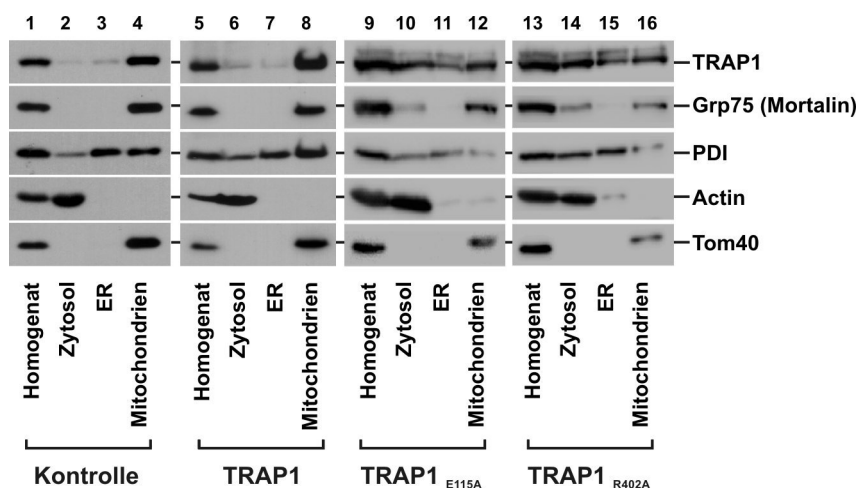


Abbildung 7.2: Subzelluläre Lokalisation von TRAP1 und TRAP1-Mutanten nach Überexpression

Dargestellt ist die zelluläre Lokalisation von TRAP1 und TRAP1-Mutanten. Nach transienter Überexpression von Trap1, Trap1_{E115A} und Trap1_{R402A} wurden HeLa-Zellen in die Fraktionen Homogenat, Zytosol, ER und Mitochondrien aufgeteilt. Nach einer SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot folgte eine Antikörperdetektion gegen Trap1, Grp75 (Matrix), PDI (ER), Aktin (Zytosol) und Tom40 (Mitochondrien). Der Nachweis gebundener Sekundärantikörper erfolgte mittels ECL. Alle untersuchten Proteine konnten in der Homogenat-Fraktion nachgewiesen werden. Die mitochondrialen Proteine TRAP1, Grp75 und Tom40 konnten zusätzlich in den Mitochondrien-Fractionen und das Zytoskelett-Protein Aktin konnte zusätzlich in der Zytosol-Fraktion detektiert werden. Der ER-Marker PDI war in den Fraktionen ER und Mitochondrien sowie zum geringeren Teil auch im Zytosol nachweisbar. Die TRAP1 Signale geben nicht den Unterschied der Expression zwischen Kontrolle und TRAP1 Überexpression wieder. Die Fraktionierung der TRAP1-Mutanten wurde von Cornelia Rüb durchgeführt.

4.2.3 Intramitochondriale Lokalisation von TRAP1

Zu der intramitochondrialen Lokalisation von TRAP1 gibt es unterschiedliche Veröffentlichungen. Einerseits wurde beschrieben, dass TRAP1 ein mitochondriales Matrixprotein ist (Cechetto und Gupta 2000), andererseits wurde ebenfalls eine Lokalisation im Intermembranraum und an der Innenmembran der Mitochondrien beschrieben (Pridgeon et al. 2007). Um die intramitochondriale Lokalisation von endogenem und überexprimiertem TRAP1 sowie TRAP1-Mutanten zu untersuchen, wurde eine submitochondriale Fraktionierung (Kapitel 3.2.6) durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen transient mit Trap1, Trap1_{E115A}, Trap1_{R402A} oder dem Kontrollvektor pcDNA3-ST transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Mitochondrien aus den transfizierten Zellen isoliert. Die Fraktionierung wurde durch stufenweise Permeabilisierung

der Membran erreicht. Für jede Fraktion wurde die Sensitivität von TRAP1 gegenüber Trypsin getestet und die Löslichkeit von TRAP1 nach Zentrifugation untersucht. In beiden Fällen wurden die Mitochondrien entweder nicht behandelt (intakt; Kontrolle), mit Schwellpuffer inkubiert, mit Ultraschall behandelt oder mit Triton X-100 inkubiert (siehe Abbildung 8.1). Das Schwellen wurde durch einen hypotonischen Puffer mit geringer Salzkonzentration hervorgerufen, welcher bewirkte, dass Wasser in die Matrix aufgenommen wurde und sich dadurch die Innenmembran ausdehnte. Da die Innenmembran im Vergleich zur Außenmembran eine größere Fläche besitzt, wurde die Außenmembran auseinander gerissen. Über Komplexe wie den TIM/TOM-Komplex war die äußere Membran weiterhin mit der inneren Membran verbunden. Nach dem Schwellen wurden die Mitochondrien entweder mit Ultraschall behandelt oder mit Triton X-100 inkubiert. Durch die Ultraschallbehandlung wurde auch die innere Membran auseinander gerissen. Dadurch war es möglich, die Membranfraktion von der löslichen Fraktion zu trennen. Durch Behandlung mit Triton X-100 wurden die Membranen aufgelöst (siehe Abbildung 8.1). Die behandelten Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Es folgte ein Western-Blot und eine Antikörperdetektion gegen Trap1, Grp75 (Matrix), „Mitochondrial processing peptidase“ (MPP), Tim23 (Innenmembran) und Tom40 (Außenmembran). Der Nachweis des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mittels ECL.

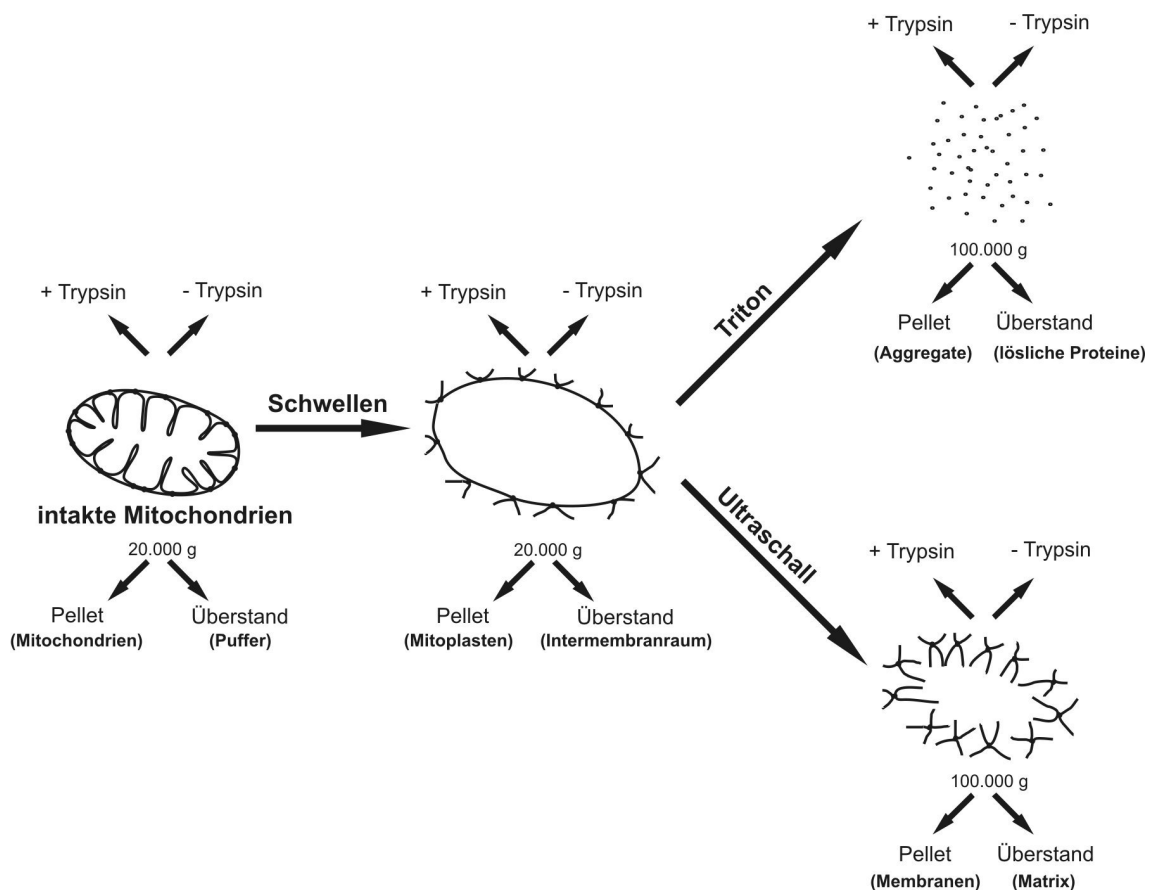


Abbildung 8.1: Schema der submitochondrialen Fraktionierung

Fraktionierung der Mitochondrien durch stufenweise Permeabilisierung der Membran. Als Kontrollfraktion dienten unbehandelte, intakte Mitochondrien. Zur weiteren Fraktionierung wurde die äußere Membran der Mitochondrien durch hypoosmotisches Schwellen auseinander gerissen (Fraktion Schwellen). Nach dem Schwellen wurden die Mitochondrien entweder mit Triton (Triton-Fraktion) inkubiert oder mit Ultraschall behandelt (Ultraschallfraktion). Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils entweder in Pellet und Überstand (unten) oder – Trypsin und + Trypsin (oben) aufgeteilt.

In Abbildung 8.2 ist die submitochondriale Fraktionierung nach Überexpression von TRAP1 dargestellt. TRAP1 wird erst nach Ultraschallbehandlung Proteasesensitiv (siehe Abbildung 8.2 A). Das mitochondriale Protein Grp75, welches ebenfalls in der Matrix lokalisiert ist, zeigt ein vergleichbares Verhalten gegenüber Trypsin. Eine erfolgreiche Durchführung des Versuchs konnte durch die mitochondrialen Transmembranproteine Tim23 und Tom40 bestätigt werden. Das Schwellen der Mitochondrien wurde durch Tim23, einem Transmembranprotein der Innenmembran, überprüft. Tim23 zeigte nach Schwellen der Mitochondrien eine Sensitivität gegenüber Trypsin, was ein erfolgreiches Auseinanderreißen der äußeren Membran nachweist. Tom40 wird wie Tim23 ebenfalls nach Schwellen verdaut, zum Teil aber bereits schon ohne

Behandlung der Mitochondrien. Dies ist dadurch zu erklären, dass Tom40 ein Transmembranprotein der Außenmembran der Mitochondrien ist und dadurch auch schon bei intakten Mitochondrien durch Trypsin angegriffen werden kann. Das Matrixprotein MPP zeigte keine Trypsin-Sensitivität.

Der Nachweis der Löslichkeit von TRAP1 zeigte ebenfalls, dass TRAP1 in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist (siehe Abbildung 8.2 B). Erst nach Ultraschallbehandlung war TRAP1 überwiegend im Überstand zu finden. Nach Überexpression konnte TRAP1 allerdings auch in geringen Mengen außerhalb von intakten Mitochondrien und Mitoplasten nachgewiesen werden. Bei endogener Expression wurde TRAP1 nicht in diesen Fraktionen detektiert (siehe Anhang, Abbildung 24). Weiterhin war nach Ultraschallbehandlung ein Anteil von TRAP1 in der Pelletfraktion zu finden. Eine erfolgreiche Ultraschallbehandlung konnte durch das lösliche Matrixprotein MPP nachgewiesen werden, welches erst nach Ultraschallbehandlung im Überstand zu finden war. Das Matrixprotein Grp75 zeigte wieder eine mit TRAP1 vergleichbare Lokalisation. Die Transmembranproteine Tim23 und Tom40 befanden sich erst nach Behandlung mit Triton im Überstand. Die Kontrolle, welche mit dem Leervektor (pcDNA3-ST) transfiziert wurde (siehe Anhang Abbildung 24) und die Überexpression der TRAP1-Mutanten (siehe Diplomarbeit Cornelia Rüb) zeigten ein vergleichbares Ergebnis.

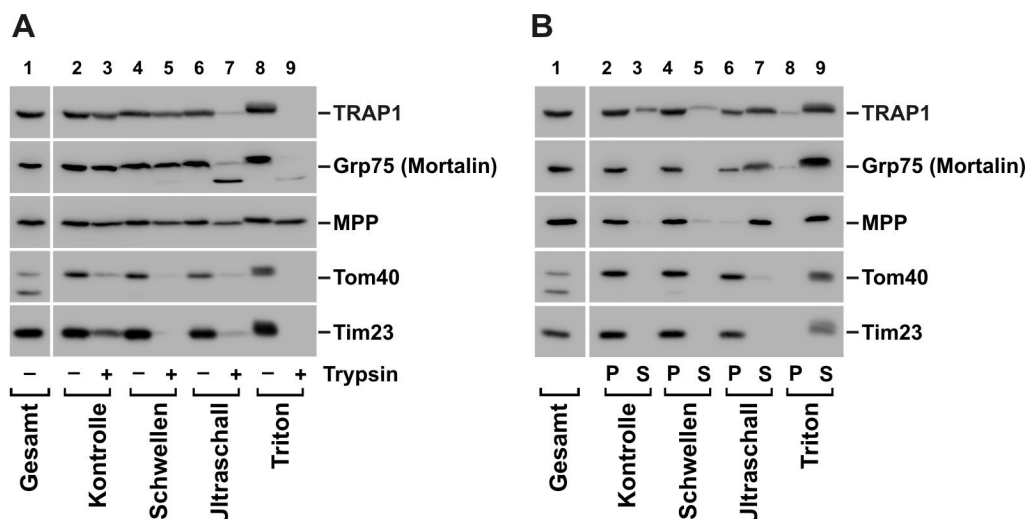


Abbildung 8.2: Submitochondriale Lokalisation von TRAP1 nach Überexpression

Dargestellt ist die submitochondriale Lokalisation von TRAP1 nach Überexpression. HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1 transfiziert. Nach 48 h wurden die Mitochondrien aus den Zellen präpariert. Anschließend wurde einerseits die Sensitivität von TRAP1 gegenüber Trypsin, andererseits die Löslichkeit von TRAP1 nach Zentrifugation untersucht. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion gegen TRAP1, Grp75 (Matrix), MPP (Matrix), Tom40 (Außenmembran) und Tim23 (Innenmembran). Der Nachweis gebundener Sekundärantikörper erfolgte mittels ECL. **A:** Trypsin-Sensitivität von TRAP1. Die Mitochondrien wurden nach Kontroll-Behandlung, Schwellen, Ultraschall- und Triton-Behandlung mit oder ohne Trypsin inkubiert. TRAP1 wurde erst nach Ultraschallbehandlung Proteasesensitiv. Das Matrix-Protein Grp75 zeigte eine mit TRAP1 vergleichbare Proteasesensitivität. Weitere Kontroll-Proteine waren MPP, Tom 40 und Tim23. **B:** Löslichkeit von TRAP1. Die Mitochondrien wurden nach Kontroll-Behandlung und Schwellen durch Zentrifugation bei 20.000 x g (10 min, 4 °C) sowie nach Ultraschall- und Triton-Behandlung durch Zentrifugation bei 100.000 x g (30 min, 4 °C) in Überstand (S) und Pellet (P) aufgeteilt. TRAP1 befand sich erst nach Ultraschallbehandlung vor allem im Überstand, was der Matrix-Fraktion entspricht. Ein Teil von TRAP1 konnte ebenfalls im Pellet nachgewiesen werden, was der Membran-Fraktion entspricht. Das Matrix-Protein Grp75 zeigte wieder eine mit TRAP1 vergleichbare Lokalisation. Weitere Kontroll-Proteine waren MPP, Tom 40 und Tim23.

4.3 Screening nach Interaktionspartnern von TRAP1

Aufgrund der Homologie zum zytosolischen Hsp90 und der zentralen Bedeutung des zytosolischen Hsp90 bei Prozessen wie Stabilisierung und Faltung von Proteinen nach Stress, Signaltransduktion, Zell-Proliferation und Differenzierung besteht die Frage, ob TRAP1 ähnliche Funktionen und Interaktionspartner besitzt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TRAP1 nicht mit denselben Co-Chaperone interagiert wie das zytosolische HSP90 (Felts et al. 2000). Außerdem sind bisher nur wenige Bindungspartner von TRAP1, wie z. B. das Kalzium-bindende Protein Sorcin (Landriscina et al. 2010) und das mitochondriale Chaperon Hsp60 (Ghosh et al. 2010), bekannt. Um weitere

Interaktionspartner zu ermitteln, wurde TRAP1-ST (Wildtyp und Mutanten) in HeLa-Zellen transient überexprimiert. Anschließend wurden die Mitochondrien isoliert und das überexprimierte Protein TRAP1-ST mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das Ziel war es, an TRAP1 gebundene Interaktionspartner mit aufzureinigen. Die mit SDS-Probenpuffer eluierten Proben wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt. Zur Identifikation von Interaktionspartnern wurden zwei Methoden angewendet. Zum einen wurden Banden aus einem SDS-Gel ausgeschnitten und mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht, zum anderen wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und die gebundenen Proteine mittels einer Reihe verschiedener Antikörper ermittelt.

4.3.1 Aufreinigung der TRAP1-ST-Fusionsproteine und Screening nach Interaktionspartnern mit Hilfe der Massenspektrometrie

Zur Identifikation von Bindungspartner mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden HeLa-Zellen mit einem Leervektor oder mit dem Vektor pcDNA3 TRAP1-ST transient transfiziert und die Mitochondrien 48 h nach Transfektion isoliert. Nach Aufreinigung der Proteine mit Hilfe der Affinitätschromatographie über ein *Strep*-Tactin gekoppeltes Trägermaterial (siehe Kapitel 3.3.8.1) wurden die Eluate beider Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend die Bandenmuster nach Coomassie-Färbung miteinander verglichen. Banden, welche in der TRAP1-ST Spur zusätzlich vorkamen, wurden ausgeschnitten und die tryptischen Peptide aus den Gelfragmenten extrahiert. Die aufgereinigten Proben wurden mit Hilfe eines HCT Ultra Ionenfallen-Massenspektrometers (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) analysiert. Zur Überprüfung wurden aus der Kontrollspur auf derselben Höhe der ausgeschnittenen Banden ebenfalls Gelfragmente ausgeschnitten und analysiert (Durchführung siehe Kapitel 3.3.7).

A

▼1 **ATPB_HUMAN** 263 ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3

1.1	ATPB_HUMAN	Score	Mass	Matches	Sequences	empAI
	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3	263	56525	10 (9)	5 (5)	0.66

▼10 peptide matches (7 non-duplicate, 3 duplicate)

Query Dupes	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
14		730.1400	1458.2655	1456.8323	984.0	53	0.00061	1	U	K.TVLMELINNVAK.A
201	1	640.4000	1918.1782	1918.0888	46.71	66	2.5e-05	1	U	K.VLDSGAPIKIPVGPETLGR.I
204	2	994.5000	1986.9854	1987.0262	-20.50	71	7.5e-06	1	U	R.AIAELGIYPAVDPLDSTSR.I
206		663.3700	1987.0882	1987.0262	31.20	56	0.00023	1	U	R.AIAELGIYPAVDPLDSTSR.I
232		892.4900	2674.4481	2674.3735	27.91	56	0.0002	1	U	K.SLQDIIAILGMDELSEEDKLTVSR.A
233		897.9100	2690.7081	2690.3684	1261	15	2.2	5	U	K.SLQDIIAILGMDELSEEDKLTVSR.A + Oxidation (M)
252		961.5100	3842.0109	3841.9738	9.661	70	7.8e-06	1	U	K.KGSITSVQAIYVPADLTDPAATTFHAALDATTVLSR.A

B

Search Type Combined MS/MS - ProteinExtractor

Search Result HCT_human_relaxed_2013-01-25 19:40:22

Search Location /Judith Wengenroth 100204/B/JW_B_BA6_01_6606.d/

Protein 1: ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3

Accession: ATPB_HUMAN **Score:** 315.30

Database: SwissProt **MW [kDa]:** 56.50

Seq. Coverage [%]: 21.20 % **pI:** 5.14

No. of Peptides: 5

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MLGFGVRVAA	AFASGALRRL	TFSASLPPAQ	LLLRAPATV	HPVRDYAAQT	SPSPKAGAAAT	GRIVAVIGAV	VDVQFDEGLF	FILNLEVOG	RETRLVLEVA	QHLGESTVRT	IAMDGTEGLV
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
RQKVLDSGA	PIKIPVGPET	LGRINNVIGE	PIDERSPIKT	KQFAPIHAEA	PEFMEMSEVO	EILVTGKIVV	DLLAPYAKGS	KIGLFGAGV	GKTVLHLELI	NNVAKAHGY	SVFAGVGERT
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
REGNDLVHEM	IESGVINKD	ATSKVALVYG	QNEPPGARA	RVALTGLTYA	EYFRDQEQD	VLLFDNIER	FTQAGSEVSA	LLGRIPSAVG	YQPTLATMG	TMQERITTK	KGSITSVQAI
370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
YVPADLTDPE	APATTFAMLD	ATTVLSRAIA	ELGIYPAVDF	LDSTSRINDP	NIVGSEHYDV	ARGVQKILQD	YKSLQDIIAI	LGMDELSEED	KLTVSRARKI	QRFLSQPFQV	AEVPTGHRK
490	500	510	520	530							
LVFLKETIKG	FQQLIAGEYD	HLPEQAFIMV	GPIEEAVAKA	DKLAEHS							

Abbildung 9.1: Ergebnisse der „MASCOT“-Analyse 1

Auswertungen der massenspektrometrischen Daten. **A:** Identifikation der Untereinheit B der humanen ATP-Synthase (ATP5B). Der Peptidscore reflektiert die Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung der Fragmentmassen zu einer Peptidsequenz nicht zufällig ist. Aus der Summe der Peptidscores eines Proteins ergibt sich dessen Proteinscore (Zeile 1.1). Der Peptidscore ist in der Reihe des jeweiligen Peptids aufgeführt. Weiterhin sind die gemessene Masse [Mr (expt)] und die theoretische Masse [Mr (calc)] sowie der relative Fehler (ppm) angegeben. Der „Expectation“-Wert (Expect) gibt die Zahl der Peptide an, die mit besseren Scores gefunden werden konnten, aber auf zufälligen Übereinstimmungen beruhen. Je niedriger dieser Wert ist, desto wahrscheinlicher ist das Peptid identifiziert. **B:** Sequenz der ATP5B im Report der Software „Proteinscape“. Zusätzlich sind die identifizierten Peptide (grau) und die in einem Peptid identifizierten Fragmente dargestellt. Die Länge der Fragmente wird durch die roten Kästchen angegeben. Ein Fragment kann am N-Terminus des Peptids anfangen (rotes Kästchen oben) oder am C-Terminus anfangen (rotes Kästchen unten). Je mehr Fragmente eines Peptides mit der Aminosäuresequenz des Proteins abgedeckt werden, desto sicherer ist die Identifizierung.

Die Analyse wurde von Sebastian Franken, IBMB, Universität Bonn durchgeführt.

A

Peptidliste siehe Anhang, Abbildung 25

B

Search Result	Location	Search Engine	Database	Ident. Compounds
HCT_human_relaxed_2013-01-31 08:19:45	/Judith Wengenroth 100204/A 7042/ JW_A_BD1_01_7042.mgf	Mascot, 2.4.1	SwissProt, SwissProt_2012_11.fasta	65/724

Protein 1:	Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4	Score:	3632.40
Accession:	MYH9_HUMAN	MW [kDa]:	226.40
Database:	SwissProt	pl:	5.38
Seq. Coverage [%]:	37.80 %	No. of Peptides:	59

Modification(s):	Oxidation
-------------------------	-----------

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MAQQAADKYL	YVDKFINNP	LAQADWAARK	LWVPSDKSG	FEPASLKEEV	GERAIVLVE	NGKKVKVND	DIQKMPPKF	SKVEDMAELT	CLNEASVLHN	LKERYYSGLI	VTYSGLFCVV
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
INPKYKLIYI	SEEVEMKGG	KKRHMPPHI	YAITDTAKS	MMQDRDQSI	LCTGESGAGK	TENTKKVIGY	LAVVASSHK	KKDQGELEK	LLQANFLEA	FQNAKTVKND	NSSRFGKPIR
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
INFVDVNGIV	GANIETYLLE	KSRAIRQAEK	ERTFHIFVYL	LSGAGEHLKT	DLLLEPYNKY	RFLSNGHVTI	FGQDQDMFQ	ETREAMRING	IFEEEQMGLL	RVISGVVLGG	NIIVFKKERT
370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
DOASMPDPTA	AQKVSHLGI	NYDPTFGIL	TPRIKVGVDY	VQKAQTEQA	DFAIALAKA	TYERMFRLV	LRINKALDKT	KRQGSFIGI	LDIAGFEIPD	LNSFELOIIN	YFNEKLOQLF
490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
NHTFLEIQE	EYOREGIWV	FIDFGLDLP	CIDLIEKPAQ	PPGILLALLE	ECWFPPKATK	SPVEKVMQEQ	GTHPKFKPK	QLKDKADFCI	IHYAGKVDYK	ADEWLMQMD	PLINDNIATLL
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720
HOSSDRFVSE	LWRDVRRII	LQVAGMSET	ALPGAFTKTR	GMFRTVGGLY	KEQLAKMAT	LRNTNPFVR	CIIIPNHEKKA	GKLDPHLVLD	QLRCNGVLEG	IRICRQGGPPH	RVYFQEFQR
730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840
YEILTFNSIP	KGFMDGKQAC	VLMIKALELD	SNLYRIGQSK	VFFRAGVLAH	LEEEEDLKIT	DVIIGFQACC	RGYLARKAFA	KRQQQLTAMK	VLQRNCAAYL	KLRNWQWRL	FTKVKPLIQV
850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
SRQEEEMAK	EEELVKVREK	QLAAENLITE	METLQSQMA	EKLQIQEQLQ	AEELCAEAE	ELRRLTAKK	QELLEICHDL	EARVEEEER	CQHLQAEKKK	MQONIQELEE	QLEEEESARQ
970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
KLQLEKVTTE	AKLKLKEEQE	IILEDQCKL	AKEKKLEDR	IAEFTTILTE	EEKSKSLK	LKNKHEAMIT	DLEERLRREE	KQRQLEKTR	RKLEGDSTDL	SDQIALQAO	IAELKMLAK
1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
KEELQALAL	FVEEAAQKN	MALKKIIELE	SQISELQEDL	ESERASRNKA	EKQKRDLEGE	LEALKTELED	TLDSTAAQOE	LRSKREQEVN	ILKKTLEEA	KTHEAQIQEH	RQKHSQAVEE
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
LAEQLEQTRK	VKANLEKAKQ	TLENERGELA	NEVKVLLQOK	GDSEHKRKYV	EAQLQELQVK	FNEGERVYTE	LADKVTKLQV	ELDNVYGLLS	QSDSKSKLIT	KDPSALESOL	QDTQELLEQE
1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
NRQKLSLSTK	LKQVEDEKNS	FREQLEEEEE	AKHNLEKQIA	TLHAQVALMK	KQMEDSVGCL	ETAEVFRKIL	QKDLGLSQR	HEEKVAAYDK	LEKTKTRLQQ	ELDDLLVOLD	HQRQSACNLE
1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
KKQKFPDQLL	AEETISAKY	AERDRRAEAE	AREKETKALS	LARALEEAME	QKAELERLNK	QFRTEMEDLM	SSKDDVQKSV	HELEKSKRAL	EQQVEEMKQV	LEELEDELOA	TEDAKLREV
1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
NLQAMKAQFE	RDLQGRDEQS	EKKKQLVRQ	VREHEAELED	ERKQRSMVA	ARKKLEMDLK	DLEAHIDSAN	KNREDAIKQL	RKLQAQMKDC	MRELDPTRAS	REEILAQAQE	NEKKLKQMEA
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
EMIQLORELA	AAERAKRQAG	QERDELADEI	ANSKRGALA	LEEKRRLEAR	IAQLEEELEE	EQNTELEIND	RLKAGANLQID	QINTDLNLER	SHAQKNENAR	QQLERQWREL	KVKLOEHEGT
1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
VRSKYKASIT	ALEAKIAOLE	EQLDNEKER	QAACKQVRRT	EKKLQDVLQ	VDDERRNAEQ	YKQADKAST	RLKQLKROLE	EAEEEAQRAN	ASRRKLOREL	EDATEADAM	NREVSLSLQK
1930	1940	1950	1960	1970							

Abbildung 9.2: Ergebnisse der „MASCOT“-Analyse 2

Auswertungen der massenspektrometrischen Daten. **A:** Identifikation von Myosin-9 (Homo Sapiens). Peptidliste siehe Anhang Abbildung 25 **B:** Sequenz von Myosin-9 im Report der Software „Proteinscape“. Zusätzlich sind die identifizierten Peptide (grau) und die in einem Peptid identifizierten Teilfragmente dargestellt. Beschreibung siehe Abbildung 9.1 B Die Analyse wurde von Sebastian Franken, IBMB, Universität Bonn durchgeführt.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten die Untereinheit B der humanen ATP-Synthase (ATP5B) und Myosin-9 als mögliche Bindungspartner identifiziert werden. Beide wurden nicht in den Kontrollspuren nachgewiesen. Je größer der Score, desto wahrscheinlicher ist die Identifikation des Proteins bzw. des Peptids. Für die ATP5B lag der Gesamtscore aus den identifizierten Peptiden bei 263 mit 6 hohen Peptidscores von über 30. Für Myosin-9 lag der Gesamtscore bei 1566 mit über 30 hohen Peptidscores. Versuche, die Bindung

von ATP5B und Myosin-9 zu reproduzieren, waren nicht erfolgreich. Außerdem konnte die Untereinheit B der humanen ATP-Synthase nach Affinitätschromatographie nicht mit einem Antikörper gegen die ATP-Synthase nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10).

4.3.2 Aufreinigung der TRAP1-ST Fusionsproteine und Screening nach Interaktionspartnern mit Hilfe verschiedener Antiseren

Da die Identifikation von Interaktionspartnern mit Hilfe der Massenspektrometrie kein eindeutiges Ergebnis zeigte, wurde ein Screening mit Hilfe verschiedener Antiseren durchgeführt. Dazu wurden, Trap1-ST, Trap1_{E115A}-ST und Trap1_{R402A}-ST über ein *Strep*-Tactin gekoppeltes Trägermaterial (Kapitel 3.3.7.1) aufgereinigt und die Eluate mittels eines SDS-Gels aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und auf mögliche Interaktionspartner mittels Antikörperdetektion überprüft. Hierzu wurden Antikörper gegen unterschiedliche mitochondriale Proteine ausgewählt, welche gegen die Chaperone Hsp60 und Mortalin, die Transmembranproteine Tim23 und Tom40 sowie gegen Atmungskettenkomplexe gerichtet waren. Der Nachweis des an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers erfolgte mittels ECL. Die Antikörper gegen Atmungskettenkomplexe wurden gewählt, da eine zellschützende Funktion von TRAP1 im Zusammenhang mit ROS beschrieben wurde (Hua et al. 2007; Im et al. 2007) und außerdem die Untereinheit B der humanen ATP-Synthase durch eine massenspektrometrische Analyse gefunden wurde (siehe Abbildung 9.1).

Die Aufreinigung von TRAP1-ST zeigte eine Bindung der Chaperone Hsp60 und Grp75 (Mortalin) sowie der Untereinheit A des Atmungskettenkomplexes II (Succinat-Dehydrogenase; Komplex II). Diese Bindungen bestanden auch nach Aufreinigung beider Mutanten (siehe Abbildung 10). Da die Interaktion von TRAP1 mit der Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A (SDHA) bisher noch nicht publiziert ist, wurde diese im Folgenden näher untersucht.

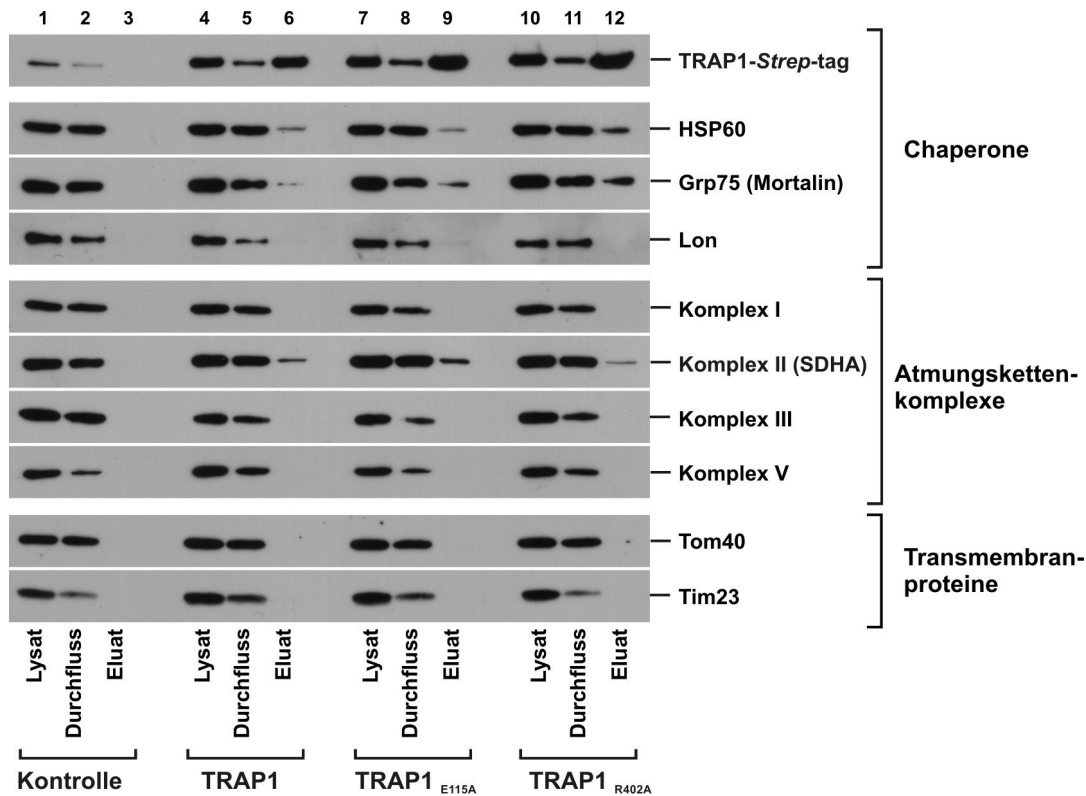


Abbildung 10: Aufreinigung von TRAP1-ST mittels Affinitätschromatographie

Screening nach Interaktionspartner durch Aufreinigung von TRAP1-ST (Wildtyp und Mutanten Trap1_{E115A} und Trap1_{R402A}) mit Hilfe der Affinitätschromatographie über ein *Strep*-Tactin gekoppeltes Trägermaterial. TRAP1-ST (Wildtyp und Mutanten) wurde transient überexprimiert. Nach 48 h wurden die Mitochondrien aus den HeLa-Zellen präpariert und in Lysepuffer mit 0,5 % [v/v] Triton X-100 aufgeschlossen. Durch einen Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 10 min) wurden intakte Mitochondrien entfernt. Nach der Affinitätschromatographie wurden die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend folgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und die Identifizierung der gebundenen Proteine durch Detektion mit Hilfe verschiedener Antikörper. Der Nachweis gebundener Sekundärantikörper erfolgte mittels ECL. Die Reihen 3, 6, 9 und 12 zeigen die Eluatfraktionen der Kontrolle oder von TRAP1 (Wildtyp und Mutanten). Zusammen mit TRAP1-ST (Wildtyp und Mutanten) konnten die mitochondrialen Proteine Hsp60, Grp75 und SDHA in der Eluatfraktion nachgewiesen werden.

4.3.3 Chemische Vernetzung von TRAP1 und SDHA

Um die Interaktion von TRAP1 mit der Untereinheit A der Succinat-Dehydrogenase (SDHA) zu bestätigen, wurden weitere Versuche durchgeführt. Durch Inkubation der Mitochondrien mit dem homobifunktionalen chemischen Vernetzer DSG sollte erreicht werden, dass TRAP1 mit SDHA kovalent verbunden wird, wenn beide Proteine miteinander interagieren (siehe Kapitel 3.3.9). Nach Auftrennen der Proben über ein SDS-Gel und Transfer auf eine PVDF-Membran durch Western-Blot, wurde eine Hälfte der Membran mit TRAP1-Antiserum inkubiert und die andere Hälfte der Membran mit SDHA-

Antiserum. Der Nachweis des an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers erfolgte mittels verstärkter Chemilumineszenz. Es konnte eine gemeinsame Bande bei ungefähr 145 kDa nachgewiesen werden, was dem Molekulargewicht eines Komplexes aus einem TRAP1-Molekül (75 kDa) und einem SDHA-Molekül (68 kDa) entsprechen würde (siehe Abbildung 11).

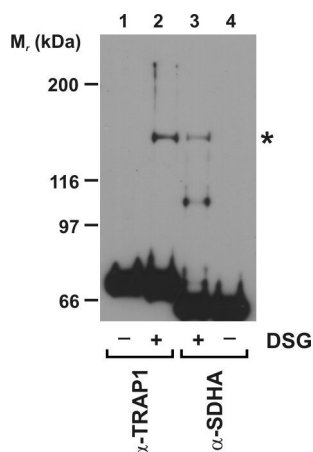


Abbildung 11: Chemische Vernetzung mit Hilfe des homobifunktionalen löslichen Vernetzers DSG

Intakte, isolierte Mitochondrien aus HeLa-Zellen wurden mit dem homobifunktionalen löslichen Vernetzers DSG inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion gegen TRAP1 und SDHA. Der Nachweis gebundener Sekundärantikörper erfolgte mittels ECL. Der Stern markiert einen mittels DSG vernetzten Komplex aus TRAP1 und SDHA. Die starken Signale bei 66 kDa stellen jeweils die monomeren Formen dar. (Durchführung siehe 3.3.9)

Um zu bestätigen, dass es sich bei dieser Bande um eine chemische Vernetzung von TRAP1 und SDHA handelt, wurde versucht, den durch DSG vernetzten Komplex aus TRAP1 und SDHA mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen. Dazu wurde eine Immunpräzipitation zur Aufreinigung von endogenem TRAP1 durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.8.3). Es konnte jedoch, trotz Bindung des TRAP1-Antikörpers an das Trägermaterial Protein A Agarose (PAA), nur wenig TRAP1 und kein vernetzter Komplex aus TRAP1 und SDHA aufgereinigt werden. Ein weiteres Problem war die anschließende Detektion der Proteine mit Antiseren, was durch die Immunpräzipitation, die ebenfalls mit Antiseren durchgeführt wurde, zu einem starken Hintergrund führte. Aufgrund dessen wurde versucht, den vernetzten Komplex aus TRAP1 und SDHA nach Überexpression von TRAP1-ST über ein *Strep*-Tactin gekoppeltes Trägermaterial aufzureinigen (siehe Kapitel 3.3.8.1). Auch mit dieser Methode konnte kein vernetzter Komplex aus TRAP1 und SDHA in der Eluatfraktion nachgewiesen werden (siehe Diskussion Kapitel 5.4.3). Ein Import von radioaktiv-markierter SDHA mit anschließender Vernetzung und Aufreinigung über *Strep*-Tactin-Beads war ebenfalls nicht erfolgreich (siehe Diskussion Kapitel 5.4.3). Eine Aufreinigung des SDHA-Monomers zusammen mit TRAP1-ST konnte hingegen in beiden Fällen nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde versucht einen gemeinsamen Komplex aus TRAP1 und SDHA mit Hilfe der Nativ-Gelelektrophorese nachzuweisen und den Komplex durch Inkubation mit anti-TRAP1-Serum im Laufverhalten spezifisch zu verändern. Als Kontrolle diente das Prä-Immunsrum eines Kaninchens, welches mit TRAP1 immunisiert wurde. Ein Komplex aus TRAP1 und SDHA konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Auch die Inkubation mit dem TRAP1-Antiserum zeigte keine Bande, welche in ihrem Laufverhalten verändert war.

4.3.4 Bindung von SDHA an TRAP1 unter Einfluss von ATP

Um zu untersuchen, ob der ATP-Zyklus von TRAP1 einen Einfluss auf die Interaktion von TRAP1 und SDHA hat, wurde die ATP-Abhängigkeit der Bindung untersucht. Dazu wurden Trap1-ST, Trap1_{E115A}-ST und Trap1_{R402A}-ST transient überexprimiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Mitochondrien aus HeLa-Zellen isoliert und vor der Aufreinigung unter drei verschiedenen Bedingungen behandelt. Um eine reduzierte ATP-Konzentration (- ATP) zu erreichen, wurden die Proben mit Apyrase und Oligomycin inkubiert. Eine erhöhte ATP-Konzentration wurde durch die Inkubation der Mitochondrien in Puffer mit Glutamat und Malat sowie durch Zugabe von ATP erhalten (+ ATP). Die Kontrollprobe wurde ohne weitere Behandlung in HMSE-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Mitochondrien lysiert und TRAP1-ST bzw. die Mutanten mittels Affinitätschromatographie über ein *Strep*-Tactin gekoppeltes Trägermaterial aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.8.2). Die gebundene SDHA wurde nach SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot mit Hilfe einer Antikörperdetektion gegen SDHA nachgewiesen. Die Auswertung der gebundenen Sekundärantikörper erfolgte mittels ECL. Es konnte gezeigt werden, dass für TRAP1, TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} die Interaktion mit SDHA von ATP abhängig war. Die Bindung nach erhöhter ATP-Konzentration (+ ATP) war dabei jeweils ungefähr um die Hälfte geringer als die Bindung nach reduzierter ATP-Konzentration (- ATP). Weiterhin konnte ein Unterschied zwischen TRAP1 und den Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrolle war die Bindung von TRAP1 an SDHA nach reduzierter ATP-Konzentration (- ATP) signifikant verstärkt. Im Gegensatz dazu war die Bindung der Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A}, im Vergleich zur

Kontrolle, nach erhöhter ATP-Konzentration (+ ATP) signifikant schwächer, zeigte aber keinen Unterschied nach reduzierter ATP-Konzentration (- ATP) (siehe Abbildung 12).

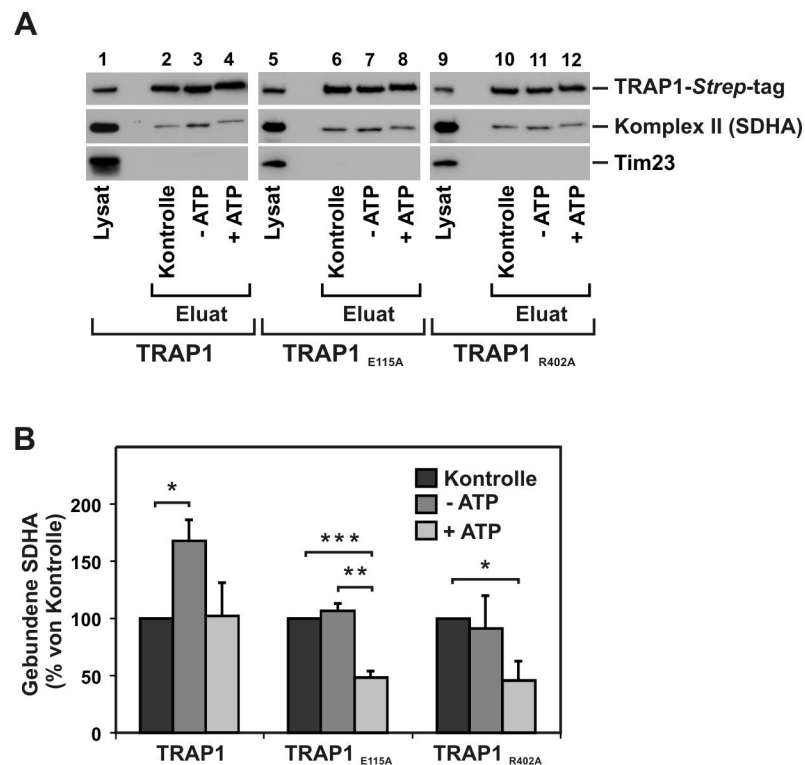


Abbildung 12: Bindung von SDHA an TRAP1 unter Einfluss von ATP

TRAP1-ST, Trap1_{E115A}-ST und Trap1_{R402A}-ST aus Mitochondrien von transient transfizierten HeLa-Zellen wurden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Vor der Aufreinigung wurden die Mitochondrien unter verschiedenen Bedingungen behandelt. Um eine reduzierte ATP-Konzentration (- ATP) zu erreichen wurden die Mitochondrien für 20 min in Import-Puffer mit Apyrase (0,01 U/ μ l) und Oligomycin (20 μ M) inkubiert und in Lysepuffer mit 0,5 % [v/v] Triton X-100 ohne ATP aufgeschlossen. Um eine erhöhte ATP-Konzentration (+ ATP) zu erreichen wurden die Mitochondrien für 20 min in Import-Puffer mit Glutamat (5 mM) und Malat (5 mM) inkubiert und in Lysepuffer mit 0,5 % [v/v] Triton X-100 und 2 mM ATP aufgeschlossen. **A:** Nach SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot wurde die an TRAP1 gebundene SDHA mit Hilfe einer Antikörperdetektion gegen SDHA nachgewiesen. Die Auswertung gebundener Sekundärantikörper erfolgte mit Hilfe von ECL. Als Positivkontrolle diente TRAP1 und als Negativkontrolle diente Tim23. **B** Auswertung der Bindung von SDHA an TRAP1 nach reduzierter und erhöhter ATP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Der TRAP1-Wildtyp zeigte nach reduzierter ATP-Konzentration (- ATP) eine signifikant stärkere Bindung im Vergleich zur Kontrolle. Die Mutanten Trap1_{E115A} und Trap1_{R402A} zeigten hingegen nach erhöhter ATP-Konzentration (+ ATP) eine geringere Bindung an SDHA. Für die Mutante Trap1_{E115A} war die Änderung im Vergleich mit den anderen Bedingungen signifikant, für die Mutante Trap1_{R402A} nur im Vergleich mit der Kontrolle. Der Kontrollwert wurde für jedes Experiment auf 100 % gesetzt. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente ausgewertet. n=3

4.4 Funktionelle Konsequenzen der Interaktion von TRAP1 mit SDHA

Um die TRAP1-SDHA-Interaktion näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Zum einen wurde die Aktivität der SDH in einem Enzymassay sowie durch Messung der mitochondrialen Atmung bestimmt, zum anderen wurde die Assemblierung der SDHA analysiert.

4.4.1 SDH-Enzymaktivität in Abhängigkeit von der TRAP1-Expression

Um die Auswirkung einer Veränderung der TRAP1-Expression auf die Enzymaktivität der SDH zu untersuchen, wurde ein SDH-spezifischer Enzymassay durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.10). Hierbei besteht das Prinzip darin, dass der Komplex IV durch Zugabe von Natriumazid inhibiert wird und daher der Elektronenfluss über die Atmungskette gehemmt ist. Dadurch fließen die Elektronen aus der von der SDH katalysierten Reaktion (Succinat \leftrightarrow Fumarat) nicht mehr über die Atmungskette, sondern über Phenazinmethosulfat (PMS) auf Dichlorphenolindophenol (DCIP). DCIP ist ein Indophenol-Farbstoff und dient im Versuchsansatz als Elektronenakzeptor. PMS ist ebenfalls ein Elektronenakzeptor und dient im Versuchsansatz als Verstärker, welcher Elektronen auf DCIP überträgt. Durch die Eigenschaft von DCIP, im oxidierten Zustand blau und in der reduzierten Form farblos zu sein, kann die Reaktion von Succinat zu Fumarat durch die Abnahme der blauen Färbung gemessen werden. Diese ist ein Maß für die Aktivität der SDH (siehe Abbildung 13 A).

In dem beschriebenen Versuch wurden die Auswirkung der Überexpression (48 h) von TRAP1 und den TRAP1-Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} sowie des Knockdowns (72 h) von TRAP1 auf die Aktivität der SDH untersucht. Die Transfektion der Zellen und Präparation der Mitochondrien erfolgte wie in Kapitel 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben. Nach Präparation der Mitochondrien wurden diese in SDH-Puffer mit 70 mM Succinat und den Elektronenakzeptoren PMS und DCIP gelöst und die Färbänderung von DCIP bei 600 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Wie in Abbildung 13 zu erkennen, war nur nach

Überexpression des TRAP1-Wildtyps die Aktivität der SDH signifikant verringert. Nach Überexpression der TRAP1-Mutanten sowie nach Knockdown von TRAP1 konnte kein signifikanter Unterschied in der SDH-Aktivität ermittelt werden. Eine Überexpression von TRAP1 bewirkte eine um 30 % verminderte Aktivität der SDH, im Vergleich zu nativ exprimiertem TRAP1 (Kontrolle; mit einem Leervektor transfiziert).

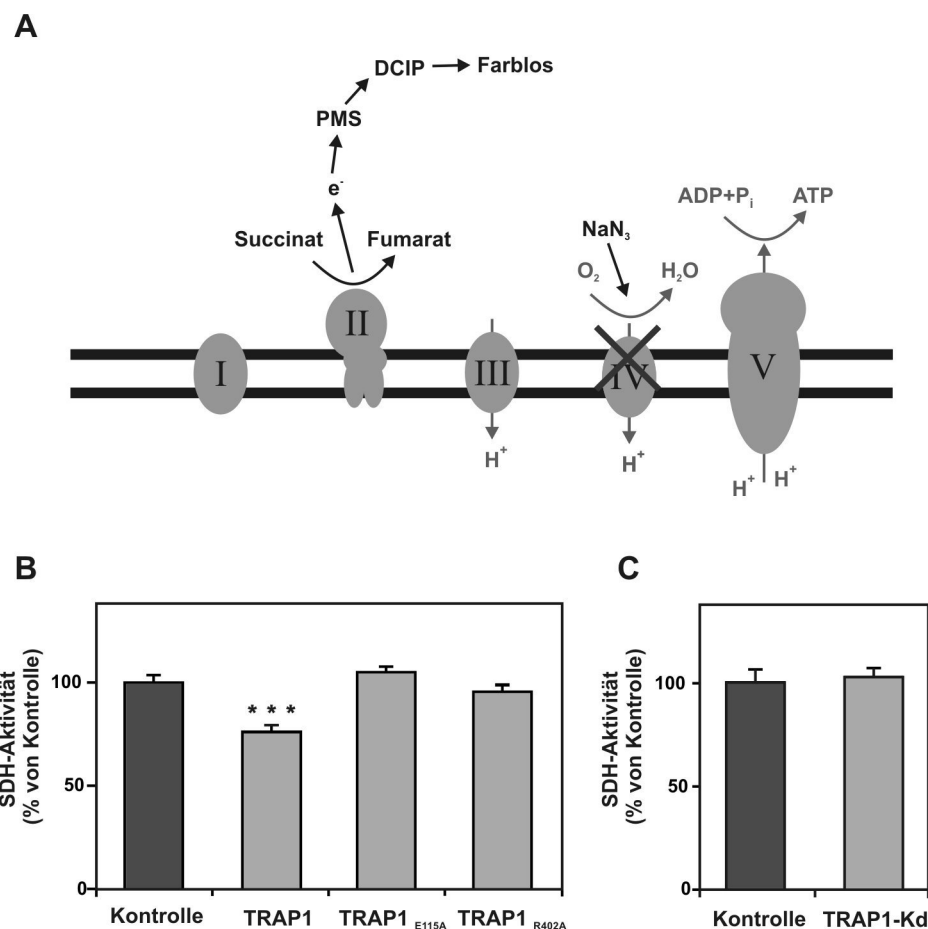


Abbildung 13: SDH-Enzymaktivität nach Überexpression von TRAP1 und TRAP1-Mutanten sowie nach Knockdown von TRAP1

Messung der SDH-Aktivität. **A:** Schema. Mitochondrien wurden in Puffer mit 70 mM Succinat und den Elektronenakzeptoren Phenazinmethosulfat (PMS) und Dichlorphenolindophenol (DCIP) gelöst. Die bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat freigesetzten Elektronen wurden durch PMS an DCIP weitergegeben und DCIP so reduziert. In der oxidierten Form ist DCIP blau und im reduzierten Zustand farblos. Dadurch konnte eine Farbänderung durch Reduktion von DCIP bei 600 nm in einem Spektralphotometer gemessen werden. **B:** HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1 und TRAP1-Mutanten transfiziert. Nach 48 h wurden die Mitochondrien aus den Zellen präpariert und die Aktivität der SDH bestimmt. Nach Überexpression von TRAP1 (Wildtyp) war die SDH-Aktivität, im Vergleich zur Kontrolle und der Überexpression der TRAP1-Mutanten, hoch signifikant um 25 % verringert. n=9 **C:** HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1-siRNS und Kontroll-siRNS transfiziert. Nach 72 h wurden die Mitochondrien aus den Zellen präpariert und die Aktivität der SDH bestimmt. Die SDH-Aktivität wurde durch einen TRAP1-Knockdown nicht beeinflusst. n=14

4.4.1.2 Enzymaktivität der Cytochrom-c-Oxidase (COX) in Abhängigkeit von der TRAP1-Expression

Neben der Aktivität der SDH wurde auch die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (COX) der Atmungskette (Komplex IV) gemessen (Kapitel 3.2.11). Dadurch sollte eine generelle Auswirkung einer TRAP1-Überexpression auf Enzymaktivitäten mitochondrialer Proteine ausgeschlossen werden. Die Messung der COX-Aktivität ergab nach Überexpression von TRAP1 und den TRAP1-Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} keinen signifikanten Unterschied. Im Gegensatz dazu war die COX-Aktivität nach Knockdown von TRAP1 um 50 % verringert (siehe Abbildung 14).

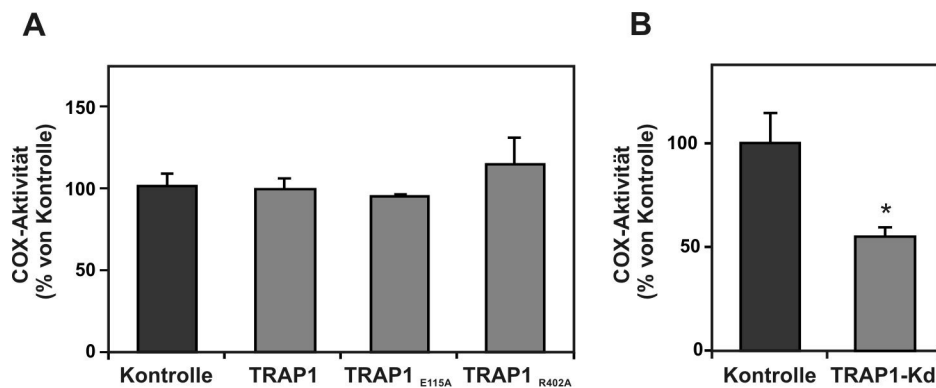


Abbildung 14: COX-Enzymaktivität nach Überexpression von TRAP1 und TRAP1-Mutanten sowie nach Knockdown von TRAP1

Messung der COX-Aktivität. Die gemessene Aktivität wurde auf die Proteinmenge normalisiert. **A:** HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1 und TRAP1-Mutanten transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in Kaliumphosphat-Puffer aufgenommen und die Aktivität des Komplex IV gemessen. Die SDH-Aktivität wurde durch eine TRAP1-Überexpression (Wildtyp und Mutanten) nicht beeinflusst. n=3 **B:** HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1-siRNS und Kontroll-siRNS transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen in Kaliumphosphat-Puffer aufgenommen und die Aktivität des Komplex IV gemessen. Nach Knockdown von TRAP1 war die SDH-Aktivität, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant um 50 % verringert. n=3

Die Messung der COX-Aktivität wurde von Karin Kappes-Horn der AG Kunz, UKB Bonn durchgeführt.

4.4.2 Mitochondriale Atmung in Abhängigkeit von TRAP1

Neben der Messung der SDH- und der COX-Aktivität in Abhängigkeit von TRAP1-Expression wurde auch die Auswirkung auf die gesamte mitochondriale Atmung untersucht. Bei diesem Versuch wurde die SDH- oder die COX-Aktivität

nicht separat untersucht, sondern in Zusammenhang mit den anderen Enzymen der Atmungskette. Dadurch kann ein genauerer Eindruck über die Funktion der TRAP1-SDHA-Interaktion im Zusammenhang mit den Komplexen der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) vermittelt werden. Hierbei wurden von Zellen, welche TRAP1 und die TRAP1-Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} transient überexprimierten sowie von Zellen in denen TRAP1 transient herunter reguliert wurde der Sauerstoffverbrauch in einem Oxygraphen gemessen. Dieser Versuch wurde, wie unter Material und Methoden beschrieben (siehe Kapitel 3.2.8), von Susanne Schöler (AG Kunz, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt. Zur Analyse der Maximalatmung („state 3“), welche den maximalen Verbrauch von Sauerstoff bei Überschuss an ADP darstellt, wurde der Sauerstoffverbrauch von Digitonin-permeabilisierten Zellen nach Zugabe von ADP gemessen. Weiterhin wurde der Respirationskontrollindex („state 3“/„state 2“) ermittelt, welcher darstellt wie gut sich der Sauerstoffverbrauch der Zellen durch die Zugabe von ADP stimulieren lässt. Dieser Wert wurde aus dem Quotient des Wertes nach ADP-Zugabe („state 3“) und des Wertes nach Zugabe des Komplex II-spezifischen Substrats Succinat bzw. den Substraten für die Komplex I-abhängige Atmung Malat/Glutamat („state 2“) gebildet.

Nach Überexpression (48 h) von TRAP1 wurde im Vergleich zur nativen Expression von TRAP1 (Kontrolle; mit Leervektor transfiziert) eine signifikant verringerte, Komplex II-abhängige Maximalatmung („state 3“) gemessen. Die Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied in der Komplex II-abhängigen Maximalatmung. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei der Komplex I-abhängigen Maximalatmung erhalten, wobei in diesem Fall nur die Überexpression von TRAP1 zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich mit den kontrolltransfizierten Zellen führte. Die Bestimmung des Respirationskontrollindex („state 3“/„state 2“) zeigte unter keinen der getesteten Bedingungen signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 15.1).

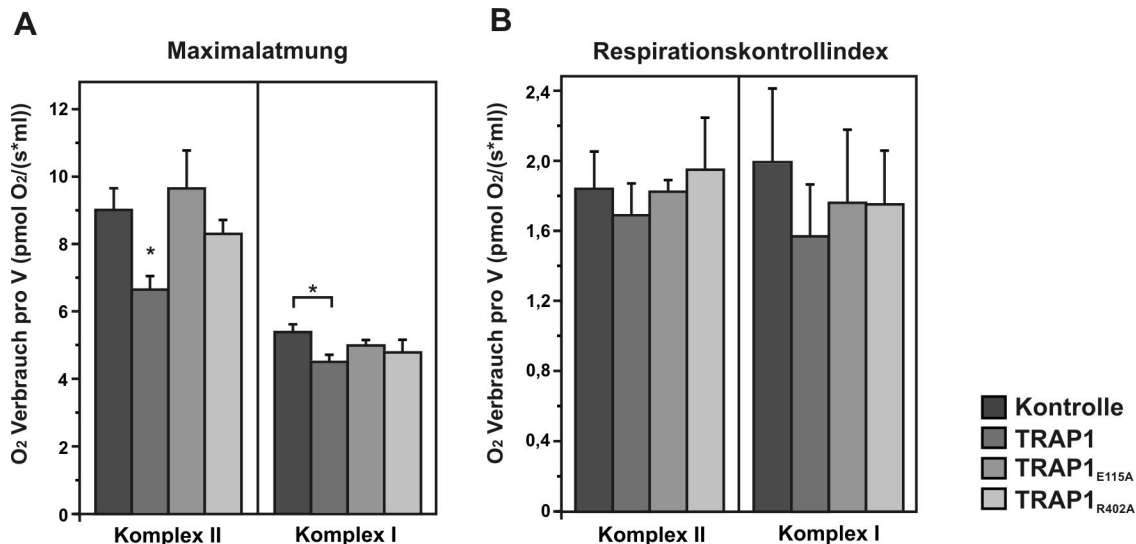


Abbildung 15.1: Messung des Sauerstoffverbrauchs von permeabilisierten HeLa-Zellen nach Überexpression von TRAP1 und TRAP1-Mutanten

Messung der Atmung von transient transfizierten HeLa-Zellen (TRAP1 und TRAP1-Mutanten). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und der Sauerstoffverbrauch mit Hilfe eines „high resolution Oroboros Oxygraphen“ (Anton Paar, Graz, Österreich) gemessen.

A: ADP-stimulierte Maximalatmung („state 3“). Bestimmung des Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von ADP. Nach Überexpression von TRAP1 war die Komplex II-abhängige Maximalatmung, im Vergleich zur Kontrolle und den Mutanten, signifikant verringert. Die Komplex I-abhängige Maximalatmung war nur nach Überexpression von TRAP1 im Vergleich mit der Kontrolle signifikant verringert. Komplex II: n=4; Komplex I: n=3

B: Respirationskontrollindex („state 3“/„state 2“). Dieser Wert stellt dar, wie gut sich die Atmung der Zellen durch die Zugabe von ADP stimulieren lässt. Es wurden der Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von ADP („state 3“) und Succinat („state 2“, Komplex II) sowie von ADP („state 3“) und Malat/Pyruvat („state 2“, Komplex I) gemessen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Komplex II: n=4; Komplex I: n=3

Die Messungen wurden von Susanne Schöler, AG Kunz, UKB Bonn durchgeführt.

Weiterhin wurde der Sauerstoffverbrauch der Zellen nach Knockdown von TRAP1 (72 h) durch TRAP1-siRNS (Biologo) gemessen. Hierbei konnte im Vergleich zu der nativen Expression von TRAP1 (Transfektion mit einer Kontroll-siRNS) eine signifikante Verringerung in der Komplex II-abhängigen Maximalatmung gemessen werden. Im Vergleich dazu ergab die Messungen des Respirationskontrollindex von Komplex II keinen signifikanten Unterschied. Die Messungen der Komplex I-abhängigen Atmung zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede, weder im Bezug auf die maximale Atmung noch auf den Respirationskontrollindex.

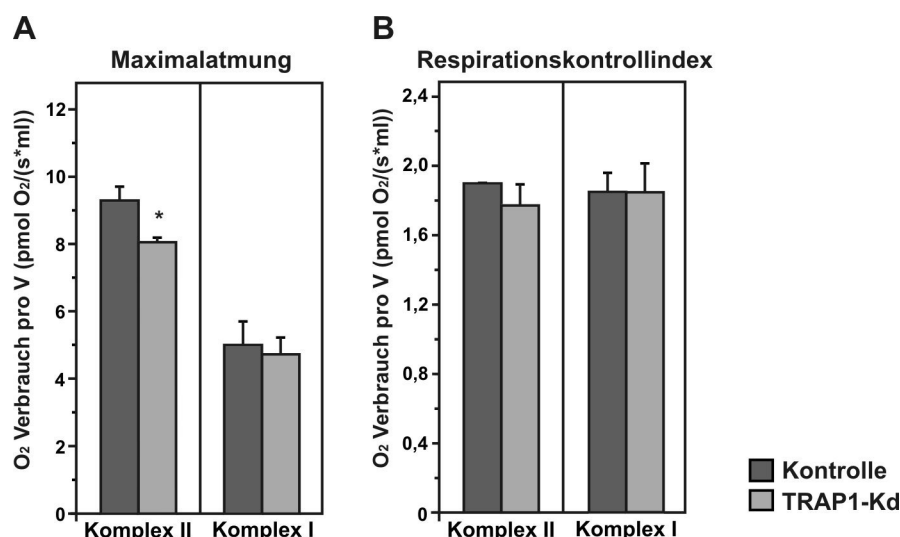


Abbildung 15.2: Messung des Sauerstoffverbrauchs von permeabilisierten HeLa-Zellen nach Knockdown von TRAP1

Messung der Atmung von transient transfizierten HeLa-Zellen (TRAP1-siRNS und Kontroll-siRNS) 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und der Sauerstoffverbrauch mit Hilfe eines „high resolution Oroboros Oxygraphen“ (Anton Paar, Graz, Österreich) gemessen.

A: ADP-stimulierte Maximalatmung („state 3“). Bestimmung des Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von ADP. Nach Knockdown von TRAP1 war die Komplex II-abhängige Maximalatmung, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant verringert. Die Komplex I-abhängige Maximalatmung zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied. n=3

B: Respirationskontrollindex („state 3“/„state 2“). Dieser Wert stellt dar, wie gut sich die Atmung der Zellen durch die Zugabe von ADP stimulieren lässt. Es wurden der Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von ADP („state 3“) und Succinat („state 2“, Komplex II) sowie von ADP („state 3“) und Malat/Pyruvat („state 2“, Komplex I) gemessen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. n=3

Die Messungen wurden von Susanne Schöler, AG Kunz, UKB Bonn durchgeführt.

4.4.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials nach Knockdown von TRAP1

Neben der Messung der SDH- und der COX-Enzymaktivität sowie der mitochondriale Atmung in Abhängigkeit von TRAP1 wurde auch die Auswirkung einer Veränderung der TRAP1-Expression auf das mitochondriale Membranpotential untersucht. Dazu wurden in Vorversuchen zuerst die idealen Bedingungen für die Messung des Membranpotentials ermittelt. Die Messungen wurden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, JC-1 und Tetramethylrhodamin (TMRE), durchgeführt. Um das Membranpotential zu zerstören, wurde das K⁺-spezifische Ionophor Valinomycin verwendet (siehe Kapitel 3.2.9).

Zur Bestimmung des Membranpotentials mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 wurde die Veränderung der JC-1-spezifischen Fluoreszenz betrachtet (siehe Abbildung 16.1). In den Mitochondrien liegt JC-1-abhängig vom Membranpotential reversibel entweder als Monomer oder in Form von Aggregaten vor. Die monomere Form bildet sich bei niedrigem Membranpotential, ist nicht an die Mitochondrien gebunden und erscheint grün. Bei hohem Membranpotential liegt JC-1 als Aggregat in membrangebundener Form vor und erscheint rot (Quelle: Datenblatt eBioscience).

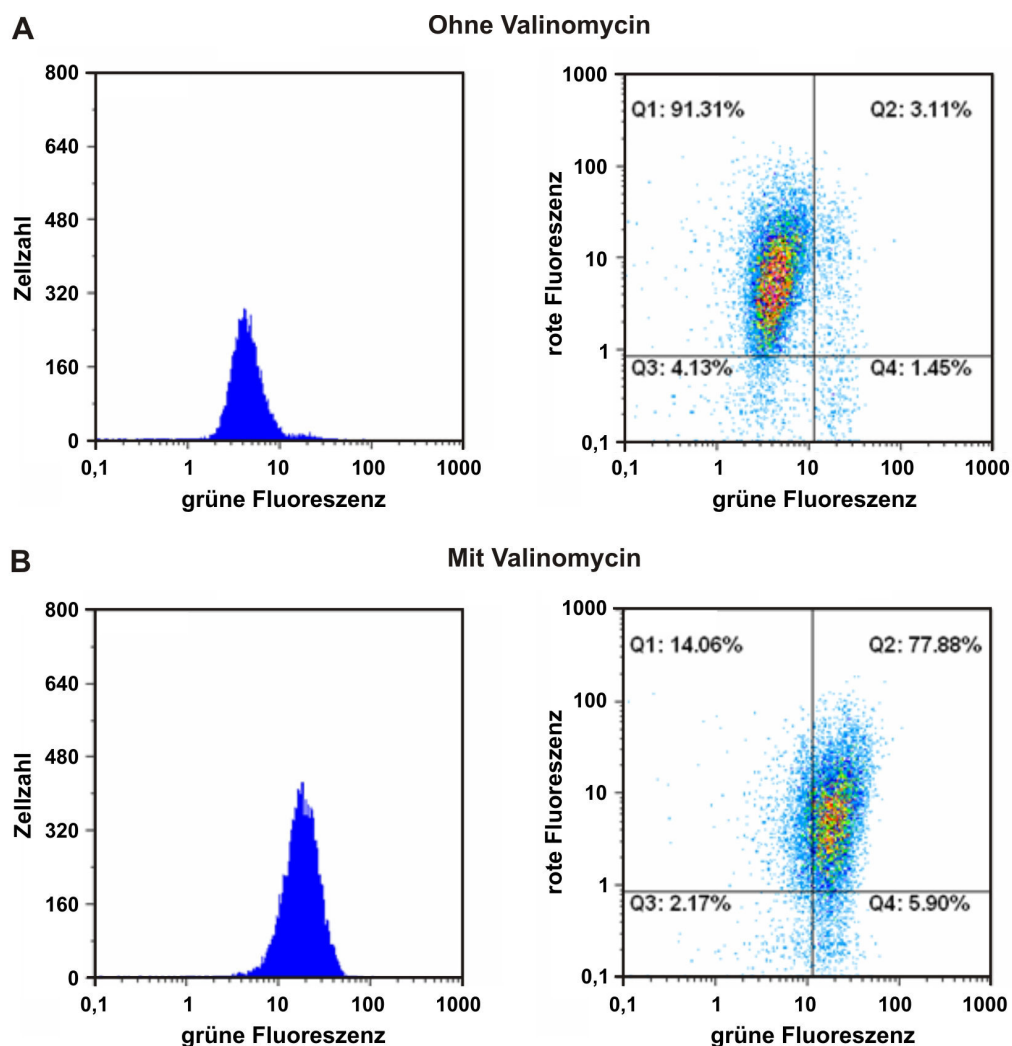


Abbildung 16.1: Membranpotential von HeLa-Zellen nach Färbung mit JC-1

HeLa-Zellen wurden von der Zellkulturschale abgelöst und in einer Konzentration von 800.000 Zellen/ml in FACS-Puffer (PBS + 0,1 % [w/v] BSA) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 37 °C mit 10 µl JC-1 inkubiert und mit einem Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind jeweils ein Histogramm der grünen Fluoreszenz (links) und ein DotPlot der grünen und roten Fluoreszenz der Zellen (rechts). Unterer Grenzwert für Fluoreszenzmessung = 1. **A:** Messung ohne Zugabe des K^+ -spezifischen Ionophors Valinomycin. **B:** Messung nach Zugabe von Valinomycin. Durch die Zugabe von Valinomycin wurde das Membranpotential zerstört.

Obwohl mit JC-1 eine Abnahme des Membranpotentials gemessen werden konnte, war die Unterscheidung zwischen roter und grüner Fluoreszenz teilweise nicht eindeutig. Daher wurde ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff getestet. Der gewählte Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TMRE) bindet bei vorhandenem Membranpotential an die Mitochondrien. Durch Waschen der Zellen wird überschüssiger Farbstoff entfernt und die rote Fluoreszenz von TMRE kann mit einem Durchflusszytometer gemessen werden (siehe Abbildung 16.2).

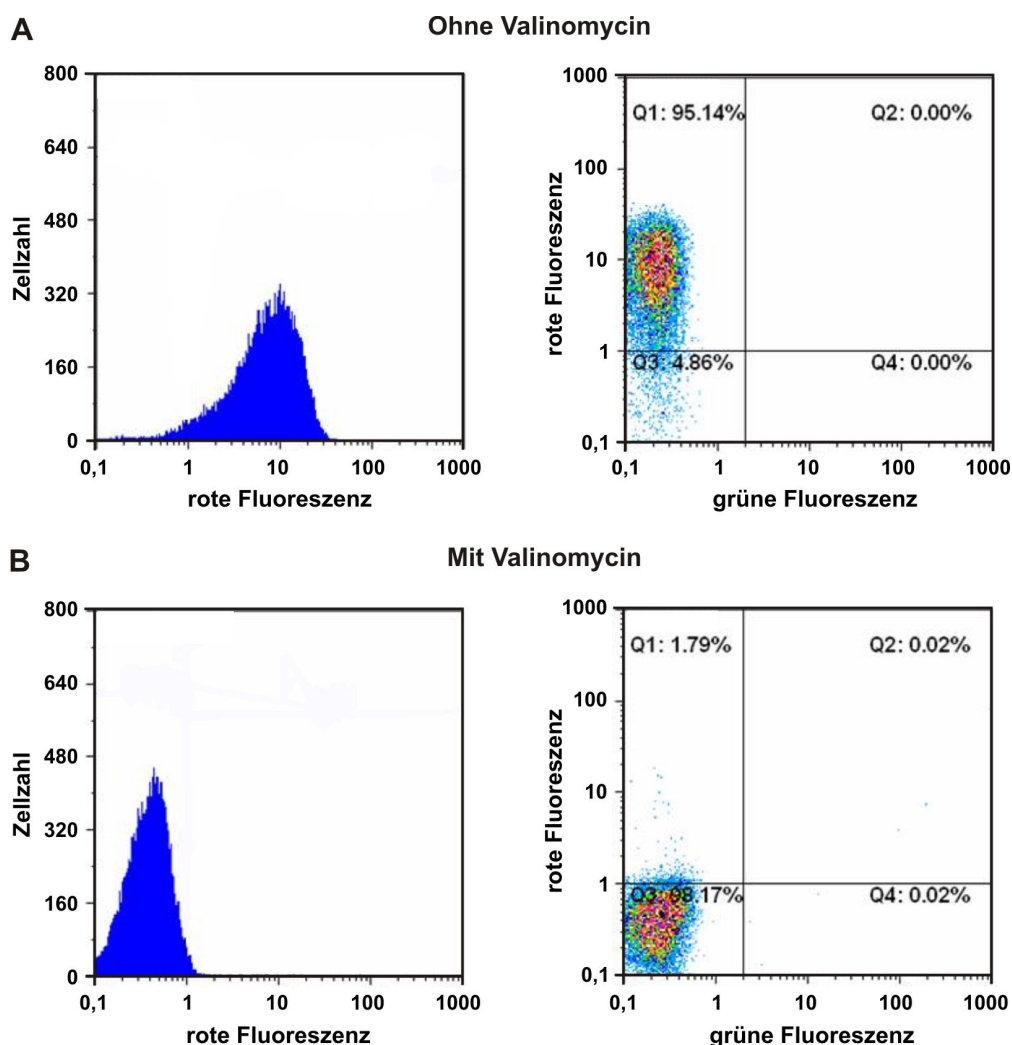


Abbildung 16.2: Membranpotential von HeLa-Zellen nach Färbung mit TMRE

HeLa-Zellen wurden für 20 min mit 15 μM TMRE bei 37 °C inkubiert, von der Zellkulturschale abgelöst und in FACS-Puffer (PBS + 0,1 % [w/v] BSA) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind ein Histogramm der roten Fluoreszenz (links) und ein DotPlot der grünen und roten Fluoreszenz der Zellen (rechts). Unterer Grenzwert für Fluoreszenzmessung = 1. **A:** Messung ohne Zugabe des K^+ -spezifischen Ionophors Valinomycin. **B:** Messung nach Zugabe von Valinomycin. Durch die Zugabe von Valinomycin wurde das Membranpotential zerstört.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass nur noch zwischen vorhandener und nicht vorhandener roter Fluoreszenz unterschieden werden muss. Ein weiterer Vorteil ist die mögliche zusätzliche Expression von GFP und damit Selektion der transfizierten Zellen, wenn das zu untersuchende Protein und GFP auf demselben Plasmid codiert sind.

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Veränderung der TRAP1-Expression auf das Membranpotential wurden entweder TRAP1, TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} überexprimiert (48 h) oder TRAP1 herunterreguliert (72 h). Anschließend wurden die Zellen mit dem membranpotentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoff TMRE inkubiert und die rote Fluoreszenz mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen (siehe Kapitel 3.2.9). Nach Überexpression von TRAP1, TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} konnte keine Veränderung des Membranpotentials nachgewiesen werden. Der Knockdown von TRAP1 bewirkte hingegen eine Verringerung des Membranpotentials bei einem Teil der gemessenen HeLa-Zellen (siehe Abbildung 17).

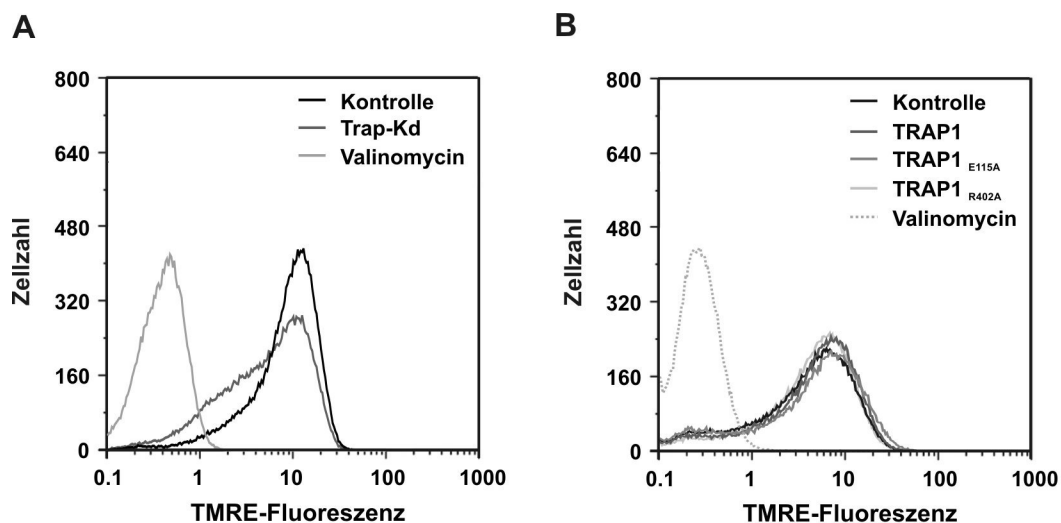


Abbildung 17: Membranpotential von HeLa-Zellen nach TRAP1-Knockdown und Überexpression

Transfizierte HeLa-Zellen wurden für 20 min bei 37 °C mit TMRE (15 µM) inkubiert und anschließend in PBS mit 0,1 % [w/v] BSA aufgenommen. TMRE ist ein membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich bei intaktem Membranpotential an die Mitochondrien anlagert. Diese Färbung wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen. Als Negativkontrolle diente das K⁺-spezifische Ionophor Valinomycin, welches das Membranpotential zerstört. Unterer Grenzwert für Fluoreszenzmessung = 1.

A: HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1-siRNS und Kontroll-siRNS transfiziert und nach 72 h vermessen. Es konnte eine Verringerung des Membranpotentials bei einem Teil der HeLa-Zellen beobachtet werden. **B:** HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1 und den Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} transfiziert und nach 48 h vermessen. Die Überexpression hatte keinen Einfluss auf das Membranpotential.

4.4.4 Nativ-Gele nach Überexpression und Knockdown von TRAP1

Neben den Auswirkungen einer Veränderung der TRAP1-Expression auf die SDH-Aktivität wurden außerdem der Import der SDHA und die Assemblierung der SDHA in den SDH-Komplex nach Überexpression von TRAP1 (Wildtyp und Mutanten) untersucht.

Der Aufbau des endogenen SDH-Komplexes wurde mit Hilfe der Nativ-Gel-elektrophorese analysiert (Kapitel 3.3.2). Dazu wurden nach Überexpression von TRAP1, TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} und nach Knockdown von TRAP1 Mitochondrien präpariert und in Nativ-Lysepuffer aufgeschlossen. Die Komplexe wurden, wie im Methodenteil beschrieben (siehe Kapitel 3.3.2), auf einem Nativ-Gel aufgetrennt und mit Hilfe der Antikörperdetektion ausgewertet. Der an den Primärantikörper gebundene Sekundärantikörper wurde mit Hilfe von ECL nachgewiesen. Nach Überexpression von TRAP1, TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} konnte deutlich ein verstärktes TRAP1-Signal, im Vergleich zur nativen Expression von TRAP1 (Kontrolle), nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde für SDHA ein verstärktes Signal nach Überexpression der beiden Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} nachgewiesen. Dieses Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt werden. Das entsprechende SDS-Gel zeigte hingegen keine signifikante Veränderung der Expression von SDHA, SDHB, Tom40 und Tim23. Nach Transfektion mit TRAP1-siRNS konnte erfolgreich ein deutlich verringertes TRAP1 Signal, im Vergleich zur nativen Expression von TRAP1 (Kontrolle), festgestellt werden. Das Signal für SDHA zeigte hingegen keinen Unterschied. Auch die Auswertung des entsprechenden SDS-Gels zeigte keine signifikante Veränderung der Expressionslevel von SDHA, SDHB, Tom 40 und Tim23 (siehe Abbildung 18). Das beobachtete Signal nach Detektion des TRAP1-Antikörpers entspricht wahrscheinlich einem TRAP1-Dimer, das des SDHA-Antikörpers wahrscheinlich dem SDH-Komplex (124 kDa) aus SDHA (68 kDa), SDHB (29,4 kDa), SDHC (15,3 kDa) und SDHD (11 kDa) (Schilling et al. 2006).

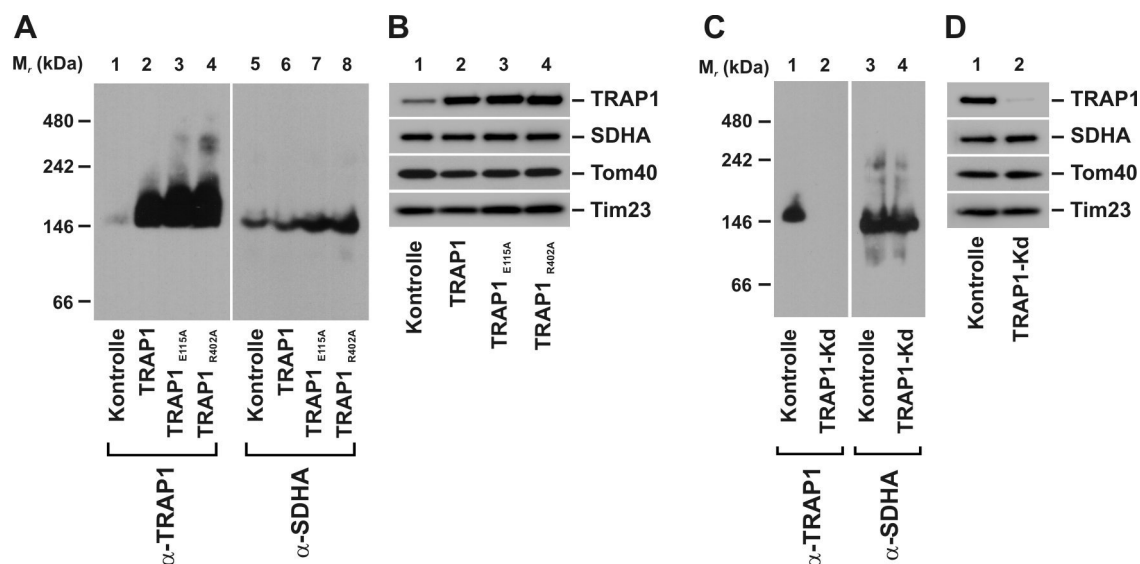


Abbildung 18: Nativ-Gele von Proteinkomplexen nach Überexpression von TRAP1 und TRAP1-Mutanten

A und C: Analyse von Proteinkomplexen. Die Analyse der Komplexe erfolgte mittels Nativ-Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion gegen TRAP1 und SDHA. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit Hilfe von ECL. **A:** HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1 und TRAP1-Mutanten transfiziert. Nach 48 h wurden die Mitochondrien isoliert und in Nativ-Lysepuffer mit 0,2 % [v/v] Triton X-100 aufgeschlossen. Eine Überexpression von TRAP1 war deutlich zu erkennen (2-4). Außerdem war nach Überexpression der Mutanten ein verstärktes Signal für SDHA nachweisbar. **C:** HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1-siRNS und Kontroll-siRNS transfiziert. Nach 72 h wurden die Mitochondrien isoliert und in Nativ-Lysepuffer mit 0,2 % [v/v] Triton X-100 aufgeschlossen. Ein Knockdown von TRAP1 war deutlich zu erkennen (2). Das Signal für SDHA (3+4) war nicht verändert. **B und D:** SDS-Gel zur Kontrolle der Expressionslevel. Mitochondrien in Nativ-Lysepuffer mit 0,2 % [v/v] Triton X-100 wurden in Lämmli aufgenommen. Pro Spur wurden 20 µg Mitochondrien aufgetragen. Nach SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot wurde eine Antikörperdetektion gegen Trap1, SDHA, Tom40 und Tim23 durchgeführt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit Hilfe von ECL. **B:** Eine Überexpression von TRAP1 war deutlich zu erkennen (2-4). Die Expression der anderen Proteine war nicht verändert. **D:** Ein Knockdown von TRAP1 war deutlich zu erkennen (1+2). Die Expression der anderen Proteine war nicht verändert.

4.4.5 Import der SDHA und Assemblierung des SDH-Komplexes

Um auch die Assemblierung von neu-importierter SDHA in den SDH-Komplex untersuchen zu können, wurde ein radioaktiv markiertes SDHA-Vorläuferprotein in TRAP1, TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} überexprimierende Mitochondrien importiert. Die radioaktiven Signale wurden mit Hilfe der digitalen Autoradiographie ausgewertet. Dazu wurde der FLA 5100 Phosphoimager (Fujifilm) und das Programm MultiGauge (Fujifilm) verwendet.

4.4.5.1 Import der SDHA in HeLa-Mitochondrien nach Überexpression von TRAP1

Die Auswirkung der Überexpression von TRAP1, TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} auf den Import der SDHA wurde durch den Import (5 min) eines radioaktiv markierten SDHA-Vorläuferproteins in isolierte Mitochondrien untersucht (siehe Kapitel 3.3.10 und 3.3.10.1). Die Auswertung der Daten zeigte eine signifikante Verringerung des Imports um 20 % in TRAP1_{E115A} überexprimierenden Mitochondrien und eine signifikante Erhöhung des Imports um 10 % in TRAP1_{R402A} überexprimierenden Mitochondrien im Vergleich zur Kontrolle. Die Überexpression von TRAP1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Import der SDHA.

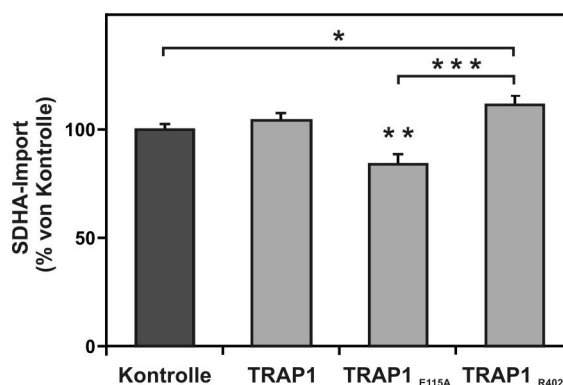


Abbildung 19: Import der Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A (SDHA)

HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1 und TRAP1-Mutanten transfiziert. Nach 48 h wurden die Mitochondrien isoliert und das mit ³⁵S-markierte Vorläuferprotein pSDHA für 5 min bei 37 °C importiert. Durch Zugabe von Valinomycin wurde der Import abgestoppt. Die Mitochondrien wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot wurde das SDHA-Signal mit Hilfe von digitaler Autoradiographie nachgewiesen. Für jedes Experiment wurde der Mittelwert der Kontrolle auf 100 % gesetzt. Nach Überexpression von TRAP1_{E115A} war der Import signifikant verringert und nach Überexpression von TRAP1_{R402A} sehr signifikant erhöht. n = 4

4.4.5.2 Assemblierung der SDHA

Die Assemblierung des SDH-Komplexes wurde durch Import eines radioaktiv markierten SDHA Vorläuferproteins in TRAP1, TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} überexprimierenden Mitochondrien mit anschließender Inkubation bei 37°C untersucht (siehe Abbildung 16.1 A, Schema). Dazu wurden TRAP1, TRAP1_{E115A} oder TRAP1_{R402A} überexprimiert und die Mitochondrien nach 48 h

präpariert. Diese wurden, wie im Methodenteil beschrieben (siehe Kapitel 3.3.10.2), in Import-Puffer aufgenommen und das radioaktiv markierte SDHA-Vorläuferprotein wurde für 5 min bei 37 °C in die Mitochondrien importiert. Anschließend wurde der Import der SDHA mit Hilfe von Valinomycin abgestoppt und die Mitochondrien wurden weiterhin bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Assemblierung des SDH-Komplexes. Um diese zu verfolgen, wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen. Nach Zentrifugation und Waschen der Proben wurden diese lysiert und auf ein Nativ-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 20 A). Abbildung 20 C zeigt beispielhaft ein entsprechendes Nativ-Gel. Es konnten der neu gebildete SDH-Komplex (124 kDa) und die monomere Form der SDHA (68 kDa) nachgewiesen werden. Ein erfolgreicher Import ist daran zu erkennen, dass ohne Membranpotential kein SDHA importiert wurde.

Die Auswertung von jeweils 4 Versuchen zeigte eine um ungefähr 30 % signifikant höhere Assemblierung des SDH-Komplexes nach Überexpression der Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} und einer Inkubation von 15 min. Zusätzlich wurde eine um 10 % signifikant verringerte Assemblierung nach Überexpression des TRAP1 Wildtyps im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Um die Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils die 15 min-Werte der Kontrolle auf 100 % gesetzt (siehe Abbildung 20). Der 20 min Wert wurde wegen Ungenauigkeit der letzten entnommenen Probe nicht ausgewertet.

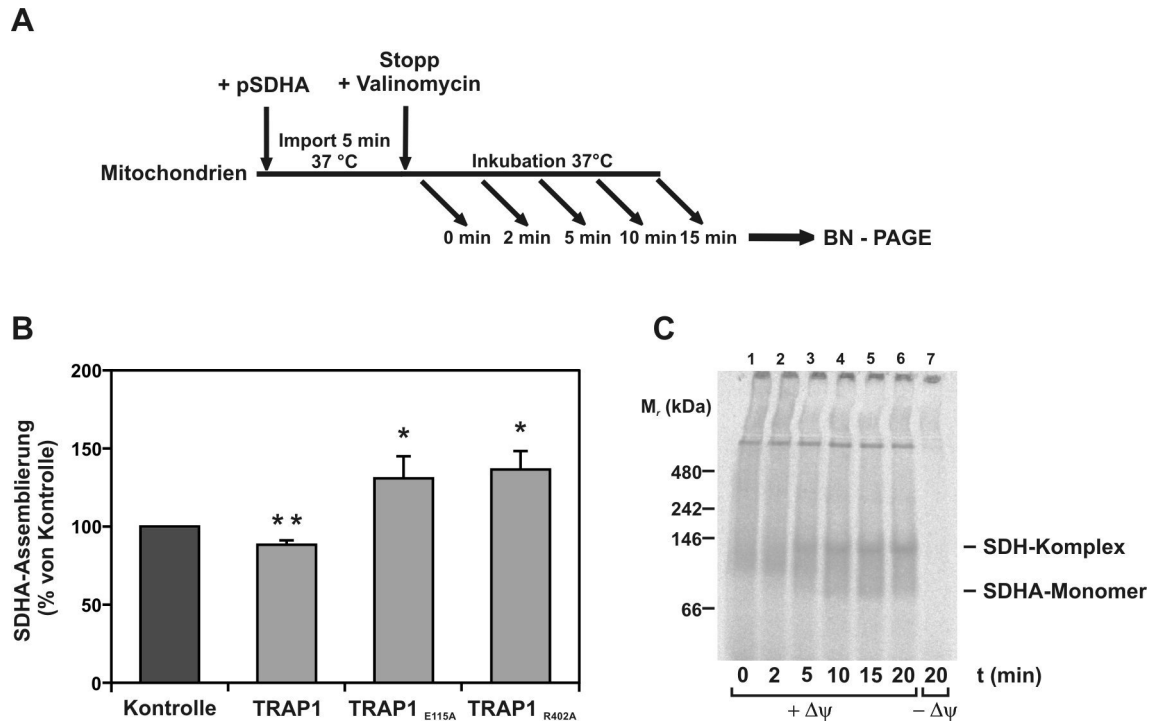


Abbildung 20: Assemblierung der Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A (SDHA)

HeLa-Zellen wurden transient mit TRAP1 und TRAP1-Mutanten transfiziert. Nach 48 h wurden die Mitochondrien isoliert und ³⁵S-markierte SDHA importiert. Die Auswertung der Assemblierung erfolgte nach Normalisierung auf die Menge der importierten SDHA. **A:** Schema. Das mit ³⁵S markierte Vorläuferprotein pSDHA wurde für 5 min bei 37 °C importiert. Durch Zugabe von Valinomycin wurde der Import abgestoppt. Die Mitochondrien wurden für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach 0, 2, 5, 10 und 15 min wurden Proben entnommen und die Mitochondrien in Lysepuffer mit 0,2 % [v/v] Triton X-100 aufgeschlossen. Nach Nativ-Gelelektrophorese und Western-Blot wurde die Menge des neu gebildeten SDH-Komplexes mit Hilfe von digitaler Autoradiographie nachgewiesen. **B:** Menge des SDH-Komplexes nach 15 min Assemblierung. Nach Überexpression der Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} war die Assemblierung signifikant um 30 % erhöht und nach Überexpression von TRAP1 sehr signifikant um 10 % verringert. Für jedes Experiment wurde der Kontrollwert auf 100 % gesetzt. n = 4 **C:** Beispiel eines Nativ-Gels nach Auswertung mit Hilfe der digitalen Autoradiographie. Es sind die monomere (68 kDa) Form der SDHA und der SDH-Komplex (124 kDa) zu erkennen. Aufgetragen sind die entnommenen Proben nach 0, 2, 5, 10, 15 und 20 min. Spur 7 zeigt die Probe ohne Membranpotential.

4.4.6 Morphologische Veränderung von HeLa-Zellen nach Knockdown von TRAP1

Neben der Interaktion von TRAP1 und SDHA wurde außerdem die Morphologie von HeLa-Zellen nach Knockdown von TRAP1 untersucht. Hierbei sollte analysiert werden, ob die verringerte Atmung oder das verringerte Membranpotential nach Knockdown von TRAP1 eine Auswirkung auf die Morphologie der transfizierten HeLa-Zellen haben. Dazu wurden die Zellen

nach Transfektion mit TRAP1-siRNS sowie Kontroll-siRNS nach 24 h, 48 h und 72 h mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend eine immunzytochemische Färbung durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.7). Dazu wurden der Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur Zellkernfärbung und Antiseren gegen TRAP1 und CoxIV oder Antiseren gegen Aktin und Tubulin verwendet. Als Sekundärantikörper dienten der „Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG“ (Invitrogen) und der Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-Cy3 (Dianova). Der Antikörper gegen CoxIV diente als mitochondrialer Marker. Die Mitochondrien waren als fädige Strukturen zu erkennen. (siehe Abbildung 21).

Im Vergleich zur Kontrolle war nach Transfektion mit TRAP1-siRNS eine Abnahme des TRAP1-Signals zu erkennen. Nach 24 h war die grüne Fluoreszenz (TRAP1) bereits verringert und nach 72 h war fast keine grüne Fluoreszenz mehr nachweisbar. Dies ist daran zu erkennen, dass nach Überlagerung der blauen, grünen und roten Fluoreszenz die Farbe vom Gelblichen (rot + grün) ins Rote übergeht. Bei Betrachtung der Morphologie war eine Veränderung der fädigen, durch die Zelle verteilten Struktur der Mitochondrien, zu einer näher am Zellkern liegenden Struktur zu erkennen (siehe Abbildung 21). Außerdem bewirkte ein Knockdown von TRAP1 eine Veränderung in der Struktur des Zytoskeletts. Nach 72 h war zu erkennen, dass die Zellen nur noch an einzelnen Stellen über das Aktinzytoskelett an den Untergrund hafteten. Dadurch hatten die Zellen nicht mehr eine flache, ausgebreitete Struktur wie nach Transfektion mit Kontroll-siRNS.

Um zusätzlich die Auswirkung eines Verlusts des Membranpotentials auf die Morphologie der Zellen zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen für 24 h mit 1 μ M und 5 μ M Valinomycin behandelt. Die Morphologie der Zellen unter Kontrollbedingungen entsprach der typischen fädigen, durch die Zelle verteilten Struktur der Mitochondrien. Nach Behandlung mit Valinomycin veränderte sich die Struktur der Mitochondrien zu einer näher am Zellkern liegenden Struktur (siehe Abbildung 22).

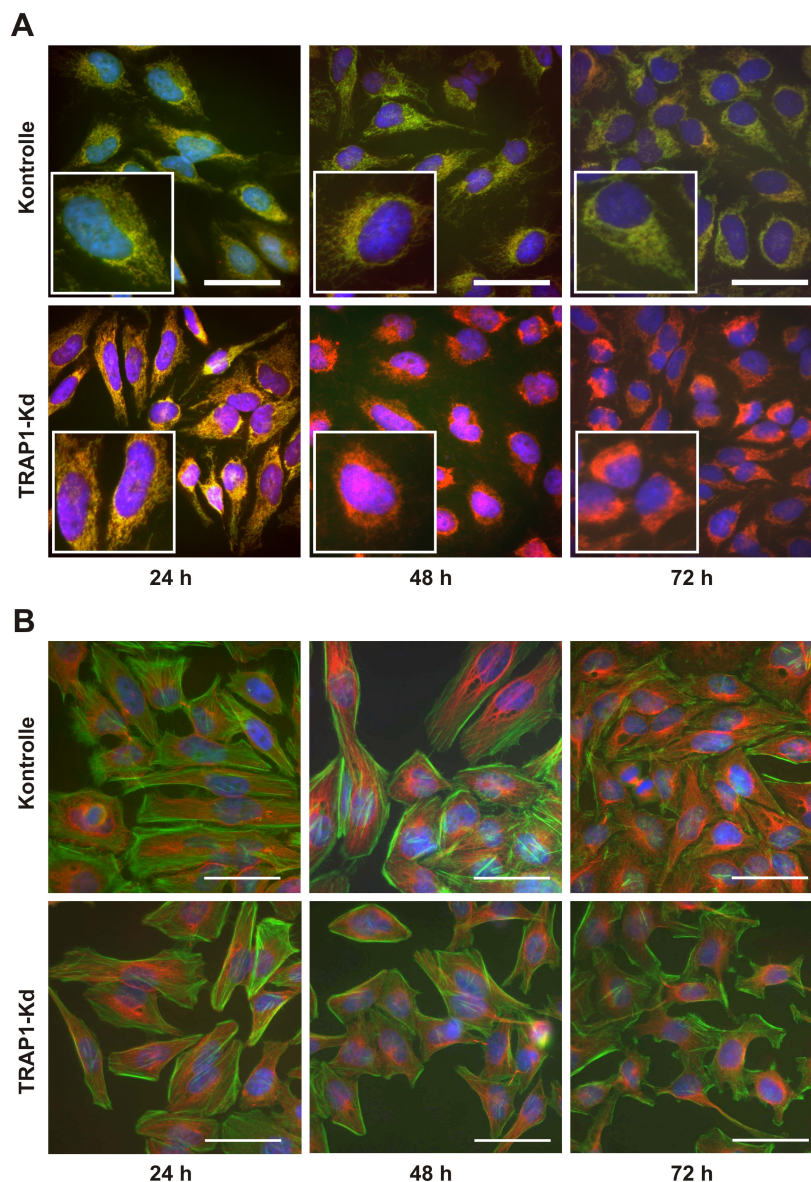


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen nach TRAP1-Knockdown

Immunfluoreszenzfärbung nach Transfektion der Zellen mit TRAP1-siRNS sowie Kontroll-siRNS und Fixierung nach 24 h, 48 h und 72 h. Als Primärantikörper wurden der monoklonale Antikörper Maus-anti-TRAP1, der polyklonale Antikörper Maus-anti-CoxIV, der monoklonale Antikörper Maus-anti-Tubulin und der polyklonale Antikörper Kaninchen-anti-Aktin verwendet. Als Sekundärantikörper wurden der „Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG“ (Invitrogen) und der Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-Cy3 (Dianova) verwendet. Dargestellt ist eine Überlagerung der blauen, grünen und roten Fluoreszenz. Der Balken entspricht 50 μ m.

A: Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau) und der Mitochondrien mit Antiseren gegen TRAP1 (grün) und CoxIV (rot). Nach Knockdown von TRAP1 ist eine Abnahme des TRAP1-Signals (grün) zu erkennen. Außerdem liegen die Mitochondrien (rot) 72 h nach Transfektion mit TRAP1-siRNS näher am Zellkern, als nach 24 h. Nach Kontrolltransfektion ist keine Änderung in den Fluoreszenzsignalen und der Struktur der Mitochondrien zu erkennen.

B: Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau) und zytoskeletaler Proteine mit Antiseren gegen Aktin (grün) und Tubulin (rot). Nach Transfektion ist keine Veränderung in der Stärke der Fluoreszenzsignale zu erkennen. 72 h nach Transfektion mit TRAP1-siRNS verändert sich der Aufbau des Zytoskeletts. Die Zellen haften über Aktin nur noch an einzelnen Stellen an der Zellkulturplatte. Nach Kontrolltransfektion ist keine Veränderung im Zytoskelett zu sehen.

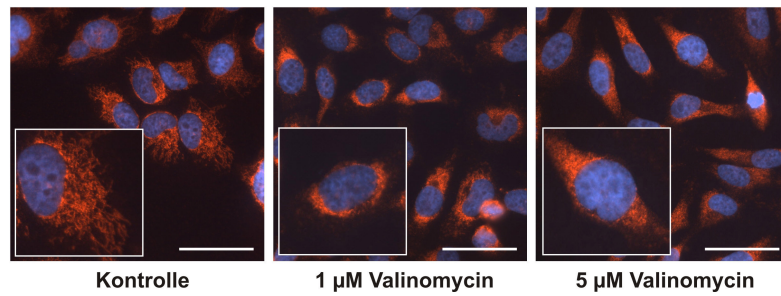


Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen nach Behandlung mit Valinomycin

Immunfluoreszenzfärbung nach Behandlung der Zellen mit 1 µM oder 5 µM Valinomycin. Färbung des Zellkerns mit DAPI (blau) und der Mitochondrien mit einem Antiserum gegen Cytochrom c (rot). Als Sekundäntikörper wurde der Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-Cy3 (Dianova) verwendet. Dargestellt ist eine Überlagerung der blauen und roten Fluoreszenz. Nach Behandlung mit Valinomycin sind die Mitochondrien weniger durch die Zelle verteilt und liegen näher am Zellkern, im Vergleich mit der Kontrolle. Der Balken entspricht 50 µm.

5 Diskussion

5.1 Auswirkungen von oxidativem Stress auf humane Mitochondrien

Neben der essentiellen Funktion als Energielieferant der Zelle spielen Mitochondrien eine entscheidende Rolle beim Auslösen der Apoptose über den intrinsischen Weg (Kroemer et al. 2007). Dieser kann unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) über eine oxidative Modifizierung mitochondrialer Proteine eingeleitet werden (Circu und Aw 2010). Solche Modifikationen können zu einem Funktionsverlust von Proteinen führen. Ein gut untersuchtes Beispiel ist das irreversible Einfügen von Carbonylgruppen durch ROS (Dalle-Donne et al. 2006). Während das Proteasom gering carbonylierte Proteine abbauen kann, führt eine starke Carbonylierung oft zur Ausbildung hochmolekularer Aggregate, welche zytotoxisch auf die Zelle wirken können (Nystrom 2005). Daher sind intrazelluläre Reparaturmechanismen und ein kontrollierter Abbau geschädigter Proteine von großer Bedeutung für die Zelle. Diese Vorgänge können unter anderem durch die Proteinfamilie der molekularen Chaperone gesteuert werden (Kettern et al. 2010; Hartl et al. 2011).

Zur Untersuchung der Auswirkung von oxidativem Stress auf mitochondriale Proteine sollte die Methode des OxyBlot getestet werden, mit deren Hilfe carbonylierte Proteine nachgewiesen werden können. Auch wenn Stressbedingungen zu einer stärkeren Carbonylierung führten, so waren die Carbonylierungen unter Kontrollbedingungen ebenfalls deutlich sichtbar (siehe Abbildung 5). Diese waren eventuell schon vor der Präparation vorhanden, sind während Präparation der Mitochondrien eingefügt worden oder wurden durch den Sauerstoffgehalt in den Puffern verursacht. Um die bereits starke Carbonylierung von Proteinen unter Kontrollbedingungen zu reduzieren wurden die Puffer entgast. Da dies aber keine sichtbare Verbesserung brachte und die Unterschiede zwischen den einzelnen Stressbedingungen nur sehr gering waren, konnte mit dieser Methode keine Aussage über die oxidative

Modifikation von Proteinen gemacht werden. Daher wurde die Auswirkung von oxidativem Stress auf mitochondriale Proteine nicht näher betrachtet.

5.2 Allgemeine Untersuchungen zur mitochondrialen Funktion von TRAP1

Durch molekulare Chaperone besitzt eine Zelle die Möglichkeit, den Abbau oder die Reparatur von Proteinen zu kontrollieren (Kettern et al. 2010; Hartl et al. 2011). Ein wichtiges mitochondriales Chaperon, welches eine zellschützende Funktion vor oxidativem Stress und einer über den mitochondrialen Signalweg eingeleiteten Apoptose besitzt, ist das „Tumor necrosis factor receptor associated protein 1“ (TRAP1) (Altieri et al. 2012). Durch Untersuchung der mitochondrialen Funktion von TRAP1 und durch die Identifizierung von Interaktionspartnern konnten weitere Einblicke in die Bedeutung von TRAP1 bei der Aufrechterhaltung mitochondrialer Aktivitäten erhalten werden.

5.2.1 Mitochondrialer Import in Abhängigkeit von TRAP1

Aufgrund der Beteiligung von Chaperonen am mitochondrialen Import und der anschließenden Faltung mitochondrialer Proteine (Voos 2013) wurde untersucht, ob TRAP1 für den Import von mitochondrialen Proteinen in humane Mitochondrien benötigt wird. Dabei konnte ein verringerter Import nach Inhibition von TRAP1 mit einem Hsp90-Inhibitor festgestellt werden. Das Membranpotential war trotz Behandlung mit dem Inhibitor weiterhin intakt, wodurch in diesem Fall ein verringerter Import durch ein nicht mehr intaktes Membranpotential ausgeschlossen werden konnte (siehe Abbildung 6). Auch die in Abschnitt 5.2.3 näher beschriebenen TRAP1 Punktmutanten hatten einen Einfluss auf den mitochondrialen Import (Überexpression; Abbildung 19). Das mitochondriale Membranpotential zeigte hierbei ebenfalls keine Veränderung (siehe Abbildung 17).

Eine Beteiligung von TRAP1 am Import mitochondrialer Proteine wurde bisher noch nicht beschrieben. Möglich wäre eine Interaktion von TRAP1 mit den am Import beteiligten mitochondrialen Proteinen. Sehr gut untersucht ist der mitochondriale Import im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*, wobei

verschiedene Transportwege für mitochondriale Präproteine bekannt sind (Neupert und Herrmann 2007). Proteine, welche in die mitochondriale Matrix importiert werden, benötigen z. B. eine mitochondriale Signalsequenz. An diesem Weg ist unter anderem das mitochondriale Hsp70 (Ssc1, Hefe-Homolog) beteiligt (Chacinska et al. 2009). Die in dieser Arbeit für den Import verwendeten Proteine Malatdehydrogenase 2 (MDH2) und Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A (SDHA) besitzen beide eine mitochondriale Signalsequenz, wodurch ein Import über den Signalsequenz-vermittelten Transportweg wahrscheinlich ist. Da TRAP1 mit dem humanen mitochondrialen Hsp70-Homolog (Grp75) interagiert (siehe Abbildung 10) und allgemein angenommen wird, dass Grp75 wie Ssc1 ebenfalls am Import mitochondrialer Matrixproteine beteiligt ist, könnte die Regulation des Imports über eine Interaktion von TRAP1 mit Grp75 erfolgen.

5.2.2 Auswirkungen eines TRAP1-Knockdowns auf die Morphologie von HeLa-Zellen

Die Auswirkungen eines TRAP1-Knockdowns auf die Morphologie von Mitochondrien wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Durch den Knockdown von TRAP1 veränderte sich die Verteilung der Mitochondrien in der Zelle. 48 Stunden nach Transfektion mit TRAP1-siRNS konnte eine Veränderung der fädigen, durch die Zelle verteilten Strukturen der Mitochondrien, zu näher am Zellkern liegenden Strukturen beobachtet werden (siehe Abbildung 21 A). Weiterhin hatte der Knockdown von TRAP1 einen Einfluss auf das Zytoskelett. Durch die Veränderung des Zytoskeletts besaßen die Zellen nicht mehr ihre typische flache, ausgebreitete Struktur (siehe Abbildung 21 B). Beim Vergleich des Zytoskeletts mit der Verteilung der Mitochondrien ist auffällig, dass sich Tubulin 72 h nach Transfektion mit TRAP1-siRNS ebenfalls näher am Zellkern befand. Da Mitochondrien nicht frei in der Zelle verteilt sind, sondern ihre Dynamik und Anordnung durch Aktinfilamente und Mikrotubuli bestimmt wird (Kuznetsov et al. 2009), ist es möglich, dass die Veränderung der mitochondrialen Morphologie nach Knockdown von TRAP1 durch die Veränderung des Zytoskeletts verursacht wurde. Weiterhin wäre es möglich, dass diese veränderte Morphologie der

Mitochondrien durch das verringerte Membranpotential nach Knockdown von TRAP1 (siehe Abbildung 17) zu begründen ist. Ein Vergleich des TRAP1-Knockdowns mit Zellen, welche mit dem Ionophor Valinomycin behandelt wurden, zeigte eine vergleichbare Veränderung der mitochondrialen Morphologie (siehe Abbildung 22). Valinomycin besitzt die Eigenschaft die Permeabilität von Membranen für K^+ -Ionen zu erhöhen, wodurch das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht (Kroten et al. 2010).

5.2.3 Auswirkungen von Punktmutationen auf die Funktion von TRAP1

Zur genaueren Charakterisierung von TRAP1 und zur Aufreinigung von TRAP1 mit Hilfe der Affinitätschromatographie wurde die hTRAP1-cDNS in den Expressionsvektor pcDNA3-ST inseriert. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit zwei Punktmutanten näher charakterisiert, welche Cornelia Rüb im Rahmen ihrer Diplomarbeit erstellt hat (siehe Abbildung 23). Die Mutationen wurden ausgehend von zwei bereits charakterisierten Punktmutanten des Hsp90-Homologs Hsp82 ausgewählt. Nach Austausch des Glutamats 33 zu Alanin ist die Mutante Hsp82_{E33A} nicht mehr in der Lage, ATP zu binden und zu hydrolysieren. Dadurch sind Hefezellen, welche ausschließlich die Mutante Hsp82_{E33A} besitzen, nicht mehr lebensfähig (Obermann et al. 1998). Auch ein Austausch des Arginins 380 zu Alanin bewirkt den Verlust der Lebensfähigkeit. Arginin 380 ist verantwortlich für die Interaktion von Hsp82 mit dem γ -Phosphat von ATP und spielt eine wichtige Rolle in der katalytischen Aktivität von Hsp82 (Meyer et al. 2003). Zur Klonierung der beiden Punktmutanten des mitochondrialen Hsp90 (TRAP1) wurden die homologen Aminosäuren im humanen TRAP1 gegen die neutrale Aminosäure Alanin ausgetauscht. Die entstandenen Mutanten sollten ebenfalls einen Defekt der katalytischen Aktivität von TRAP1 besitzen, welcher jedoch methodisch bedingt nicht nachgewiesen werden konnte. Ein dominant letaler Phänotyp nach Überexpression der Mutanten TRAP1_{E115A} oder TRAP1_{R402A} lässt sich aber bereits ausschließen, da Zellen, welche TRAP1_{E115A} oder TRAP1_{R402A} überexprimierten, weiterhin lebensfähig waren. Weshalb diese Mutanten im Gegensatz zu den Hsp82-Mutanten nicht letal sind ist jedoch unklar, könnte aber mit der mitochondrialen

Lokalisation von TRAP1 begründet werden. Hsp82 und TRAP1 übernehmen jeweils verschiedene, kompartimentspezifische Aufgaben (siehe Kapitel 1.2 und 1.3).

Erste Hinweise für eine Auswirkung der hier dargestellten Punktmutationen auf die Funktion von TRAP1 konnten in der vorliegenden Arbeit gesammelt werden und zeigten sich nach Überexpression der Mutanten in der zu TRAP1-Wildtyp veränderten Substratinteraktion in Abhängigkeit von ATP (siehe Kapitel 5.4.4), dem veränderten Import (siehe Kapitel 5.2.1) sowie der verstärkten Assemblierung des SDH-Komplexes (siehe Kapitel 5.5.3).

5.3 Zelluläre und intramitochondriale Lokalisation von TRAP1

5.3.1 Zelluläre Lokalisation von TRAP1

Um die zelluläre und die intramitochondriale Lokalisation von TRAP1 vertiefend zu analysieren, wurden eine subzelluläre und eine submitochondriale Fraktionierung durchgeführt. Aus einer Studie von Felts et al. (2000) ist bekannt, dass TRAP1 eine mitochondriale Lokalisationssequenz besitzt. Durch Immunzytochemie konnte in der genannten Studie weiterhin bestätigt werden, dass TRAP1 ein mitochondriales Protein ist (Felts et al. 2000), welches auch in spezifischen Kompartimenten außerhalb der Mitochondrien vorkommen kann (Cechetto und Gupta 2000). Um sicherzustellen, dass sich trotz Überexpression und Mutationen die intrazelluläre Lokalisation von TRAP1 nicht verändert, wurde die zelluläre Lokalisation der Fusionsproteine TRAP1-ST, TRAP1_{E115A}-ST und TRAP1_{R402A}-ST mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung untersucht (siehe Abbildung 7.2). Neben der überwiegend mitochondrialen Lokalisation konnte auch eine zytosolische Lokalisation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7.2). Diese war nach Überexpression von TRAP1 (vor allem der TRAP1-Mutanten) verstärkt und könnte auf einen unvollständigen Import in die Mitochondrien zurückzuführen sein. Da aber ebenfalls eine schwache zytosolische Lokalisation nach endogener Expression von TRAP1 zu erkennen war, deuten diese Ergebnisse eher darauf hin, dass TRAP1 teilweise zytosolisch lokalisiert ist. Dies konnte auch bereits von Cechetto et al. (2000)

gezeigt werden. Das Vorkommen der PDI in der mitochondrialen Fraktion wird wahrscheinlich durch die Verbindung von Mitochondrien und ER über „mitochondria-associated membranes“ (MAM) verursacht (Raturi und Simmen 2013). Diese Verbindungen bewirken, dass bei Aufreinigung von Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation auch immer ein Teil des ER mit aufgereinigt wird.

5.3.2 Intramitochondriale Lokalisation von TRAP1

Die intramitochondriale Lokalisation von TRAP1 ist bisher nicht eindeutig charakterisiert. Einerseits ist eine Lokalisation von TRAP1 in der mitochondrialen Matrix beschrieben (Cechetto und Gupta 2000), andererseits gibt es eine Studie, welche eine Lokalisation im Intermembranraum und an der Innenmembran der Mitochondrien gezeigt hat (Pridgeon et al. 2007). Aufgrund unterschiedlicher Ansichten bezüglich der TRAP1-Lokalisation wurden zwei Versuche durchgeführt, um diese eindeutiger beschreiben zu können. Zum einen wurde die Sensitivität von TRAP1 gegenüber der Protease Trypsin getestet, zum anderen wurde die Löslichkeit von TRAP1 nach Zentrifugation unterschiedlich behandelte Mitochondrien untersucht. TRAP1 wird erst nach dem Zerreißen der inneren Mitochondrienmembran durch eine Ultraschallbehandlung Proteasesensitiv, was bedeutet, dass TRAP1 in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist (siehe Abbildung 8.2 A). Weiterhin wurde diese Lokalisation durch die Betrachtung der Löslichkeit von TRAP1 bestätigt, welche zeigte, dass TRAP1 erst nach Ultraschallbehandlung im Überstand zu finden ist. Zusätzlich war ein geringer Teil von TRAP1 in der Pellet-Fraktion (Membranen) zu finden (siehe Abbildung 8.2 B), was auf eine Interaktion mit Proteinen der Innenmembran, welche zur Matrix gerichtet sind, hindeutet. In beiden Versuchen zeigte Grp75, ebenfalls ein Protein der mitochondrialen Matrix (Daugaard et al. 2007), eine zu TRAP1 vergleichbare Proteasesensitivität und Löslichkeit. Grp75 ist wahrscheinlich, wie Ssc1, ein Bestandteil des „presequence translocase-associated motor“ (PAM), welcher über Tim23 an die Innenmembran der Mitochondrien bindet (Schmidt et al. 2010). Dadurch ist ein Teil von Grp75 an die Innenmembran der Mitochondrien gebunden. Die vergleichbare Lokalisation von TRAP1 könnte durch die in

dieser Arbeit identifizierte Interaktion mit der Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A (SDHA) (siehe Abbildung 10) erklärt werden. Die Succinat-Dehydrogenase (SDH), auch als Komplex II der Atmungskette bekannt, ist ein membrangebundener Enzymkomplex der mitochondrialen Innenmembran und besteht aus 4 Untereinheiten (A-D). Die Untereinheiten C und D enthalten Transmembrandomänen, welche die SDH in der Membran verankern. Die Untereinheiten B und A sind die katalytischen Untereinheiten der SDH und über die Untereinheiten C und D an die mitochondriale Innenmembran gebunden (Cecchini 2003). Sie sind zur mitochondrialen Matrix gerichtet, wodurch eine Interaktion mit dem mitochondrialen Matrixprotein TRAP1 möglich ist.

Die in diesem Versuch erhaltenen Ergebnisse stehen im Kontrast zu der Aussage von Pridgeon et al. (2007), dass TRAP1 hauptsächlich in der Innenmembranfraktion und ebenfalls im Intermembranraum der Mitochondrien, aber nicht in der mitochondrialen Matrix zu finden ist. Eine Assoziation mit der Innenmembran der Mitochondrien konnte in der hier vorliegenden Arbeit, genau wie von Pridgeon et al. (2007), nachgewiesen werden, ist aber nicht die hauptsächliche Lokalisation von TRAP1. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen eher mit der von Cechetto et al. (2000) beschriebenen TRAP1-Lokalisation in der mitochondrialen Matrix überein. Weshalb TRAP1 in diesem Versuch eine andere Lokalisation zeigte als in der Arbeit von Pridgeon et al. ist jedoch unklar. Eventuell könnten diese auf unterschiedliche Methoden zur Fraktionierung der Mitochondrien und/oder auf verschiedene Antikörper gegen TRAP1 zurückzuführen sein.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kann zusammengefasst werden, dass TRAP1 ein mitochondriales Matrixprotein ist, welches teilweise an die Innenmembran der Mitochondrien bindet.

5.4 Identifizierung von TRAP1-Interaktionspartnern

Bisher sind nicht viele Interaktionspartner von TRAP1 bekannt. Im Hauptteil der vorliegenden Arbeit sollten daher, zur genaueren Charakterisierung von TRAP1, mit Hilfe der Affinitätschromatographie neue Interaktionspartner identifiziert und die Funktion dieser Bindung untersucht werden. Dabei sollte ermittelt werden, ob es sich bei diesen Interaktionspartnern um Substratproteine (Klienten) oder Co-Chaperone handelt.

5.4.1 LC-MS-Analyse zur Identifikation neuer Interaktionspartner

Um weitere Interaktionspartner zu ermitteln, wurde das Fusionsprotein TRAP1-ST über Affinitätschromatographie aufgereinigt und mit Hilfe der LC-MS-Analyse und durch Screening mit verschiedenen Antiseren nach neuen Interaktionspartnern gesucht. Unter den verwendeten Bedingungen konnten beim Vergleich der Kontrolle mit der TRAP1-ST-Aufreinigung nur wenige potentielle Interaktionspartner ermittelt werden. Die LC-MS-Analyse ergab zwei potentielle Interaktionspartner, die ATP-Synthase Untereinheit B (ATP5B) und Myosin-9 (siehe Abbildung 9.1 und 9.2). Die ATP5B wurde mit 6 hohen „Peptidscores“ und Myosin-9 mit über 30 hohen „Peptidscores“ als möglicher Bindungspartner von TRAP1 ermittelt. Der „Score“ ist ein Maß für die Genauigkeit der Identifizierung. Wenn mindestens zwei Peptide eines Proteins mit einem „Score“ von über 30 ermittelt werden, gilt das Protein als in der Probe nachgewiesen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die identifizierten Proteine eine Interaktion mit TRAP1 eingehen. Um diese zu bestätigen, wurden weitere Versuche durchgeführt. Da die Interaktion mit ATP5B jedoch nicht reproduziert werden konnte und der Nachweis mit einem Antiserum gegen ATP5B ebenfalls kein positives Ergebnis ergab (siehe Abbildung 10), ist davon auszugehen, dass TRAP1 nicht mit ATP5B interagiert. Die Interaktion mit Myosin-9 wurde nicht weiter untersucht, da Myosin-9 im Zytosol und TRAP1 in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, was eine Interaktion dieser beiden Proteine in Frage stellt.

5.4.2 Screening mit Hilfe der Antikörperdetektion zur Identifikation neuer Interaktionspartner

Durch das „Screening“ nach Interaktionspartnern mit verschiedenen Antisera konnten drei Interaktionspartner von TRAP1 nachgewiesen werden, die Chaperone Hsp60 und Grp75 (Mortalin) sowie die Untereinheit A der Succinat-Dehydrogenase (siehe Abbildung 10).

Eine Interaktion von Hsp60 und TRAP1 in einem Multichaperon-Komplex, zusammen mit Hsp90, wurde bereits beschrieben. Dieser Komplex verhindert durch Binden an Cyclophilin D (CypD) das Öffnen der „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP), wodurch eine Tumorentstehung begünstigt wird (Ghosh et al. 2010). Eine Interaktion von TRAP1 mit dem mitochondrialen Hsp70 (Grp75) wurde noch nicht beschrieben, es ist aber bekannt, dass das zytosolische Hsp90 mit dem zytosolischen Hsp70 interagiert. Sehr gut untersucht ist ein Heterokomplex aus Hsp90, Hsp70, Hop und Hsp40, welcher eine wichtige Rolle bei der Konformationsänderung von Steroidrezeptoren spielt (Pratt und Toft 2003). Weiterhin wurde durch eine chemische Vernetzung eine direkte Interaktion von Hsp90 mit Hsp70 nachgewiesen (Murphy et al. 2001). In den Mitochondrien könnten demnach TRAP1 und Grp75 ebenfalls einen Komplex bilden, welcher hier die Aufgabe übernehmen könnte, den mitochondrialen Import von Präproteinen in die mitochondriale Matrix zu regulieren (siehe Kapitel 5.2.1). Demnach übernehmen beide Interaktionspartner (Hsp60 und Grp75) keine Funktion als Co-Chaperon, da sie selber eine Chaperonfunktion besitzen. Weiterhin konnte unter den applizierten Bedingungen keine Interaktion ermittelt werden, welche darauf schließen lässt, dass TRAP1, wie sein zytosolisches Homolog Hsp90, in Verbindung mit Co-Chaperonen arbeitet (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.7).

5.4.3 Die SDHA als ein neuer Interaktionspartner von TRAP1

Ein potentieller Klient von TRAP1 ist die in dieser Arbeit identifizierte SDHA. Diese Interaktion wurde bisher noch nicht beschrieben und ist ein Hinweis auf einen Zusammenhang von TRAP1 mit der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung. Da diese in direktem Zusammenhang mit der Bildung von ROS und der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials steht und beide

Faktoren bei der Einleitung von Apoptose eine Rolle spielen (Kroemer et al. 2007; Circu und Aw 2010), könnte die TRAP1-SDHA-Interaktion einen Einfluss auf die zellschützende Funktion von TRAP1 haben. Daher sollte diese Interaktion in der vorliegenden Arbeit durch funktionelle Analysen näher charakterisiert werden.

Durch eine chemische Vernetzung von TRAP1 und SDHA mit Hilfe eines homobifunktionalen Vernetzers (engl.: crosslinker) konnte eine direkte Interaktion bestätigt werden. Dies konnte anhand einer gemeinsamen Bande bei ungefähr 145 kDa ermittelt werden, was dem Molekulargewicht von TRAP1 (75 kDa) und SDHA (68 kDa) entsprechen würde (siehe Abbildung 11). Bei dieser Bande handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Vernetzung von TRAP1 mit SDHA und nicht um Vernetzungen von TRAP1- oder SDHA-Dimeren, da ein Unterschied von 10 kDa erkennbar sein müsste. Außerdem wurde bisher noch nicht gezeigt, dass SDHA als Dimer vorliegen kann. Auch eine Vernetzung des kompletten SDH-Komplexes (124 kDa) ist unwahrscheinlich, da dazu alle 4 Untereinheiten miteinander vernetzt werden müssten. Eine Vernetzung der Untereinheiten SDHA mit SDHB (29,4 kDa) wurde wahrscheinlich bei einer Höhe von ungefähr 100 kDa beobachtet (siehe Abbildung 11, Spur 3). Da TRAP1 als Dimer vorliegt würde man erwarten, dass ebenfalls eine Vernetzung von TRAP1-Dimeren zu beobachten sein müsste. Es konnte jedoch kein zusätzliches Signal zu der TRAP1-SDHA-Vernetzung nachgewiesen werden. Diese fehlende Vernetzung von TRAP1-Dimeren bedeutet jedoch nicht, dass keine Bindung vorliegt, sondern lediglich, dass der verwendete Vernetzer die beiden Proteine wahrscheinlich aufgrund des Abstands seiner reaktiven Gruppen oder der ungünstigen Lage der freien Aminogruppen von Lysinen nicht kovalent miteinander verbinden konnte.

Weiterhin wurde versucht die Vernetzung von TRAP1 und SDHA mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen. Wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, war dies aus verschiedenen Gründen nicht möglich. Das SDHA-Monomer konnte hingegen erfolgreich aufgereinigt werden (Daten nicht dargestellt). Dabei ist ein entscheidender Faktor, dass der Vernetzer methodisch bedingt nur einen geringen Teil von Interaktionspartnern kovalent miteinander verbindet. Da weiterhin nur wenig SDHA aufgereinigt werden konnte, lag die Menge der vernetzten TRAP1-SDHA-Komplexe wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze

der gebundenen Antikörper bzw. von radioaktiven Signalen mittels digitaler Autoradiographie.

Auch der Versuch, mit Hilfe der Nativ-Gelelektrophorese und durch Inkubation mit anti-TRAP1-Serum das Laufverhalten des Komplexes aus TRAP1 und SDHA im Nativ-Gel spezifisch zu verändern, war nicht erfolgreich. Die schwache Interaktion von TRAP1 mit SDHA (siehe Abbildung 10) deutet darauf hin, dass die Menge des TRAP1-SDHA-Komplexes wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze der gebundenen Antikörper bzw. von radioaktiven Signalen mittels digitaler Autoradiographie lag.

5.4.4 TRAP1-SDHA-Interaktion in Abhängigkeit von ATP

Da TRAP1, wie auch andere Mitglieder der Hsp90-Proteinfamilie, eine ATPase-Aktivität besitzt, wurde die Interaktion von TRAP1 und SDHA in Abhängigkeit von ATP untersucht. Es ist bereits bekannt, dass die Substratinteraktion von Hsp90 und auch anderen ATPasen, wie dem Chaperon Hsp70, von der ATP-Bindung und der ATP-Hydrolyse abhängt (Voos und Rottgers 2002; McLaughlin et al. 2004).

Daher sollte die ATP-Abhängigkeit der TRAP1-SDHA-Interaktion durch Entfernen oder Zugabe von ATP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle getestet werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Interaktion ATP-abhängig ist und dass die TRAP1-Mutanten anders auf unterschiedliche ATP-Konzentrationen reagieren als der TRAP1-Wildtyp (siehe Abbildung 12). Im Vergleich zur Kontrolle war die Bindungsstärke von TRAP1 (Wildtyp) an SDHA nur bei reduzierter ATP-Konzentration nach Apyrase-Behandlung verändert (erhöht), während die der Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} ausschließlich bei erhöhter ATP-Konzentration verändert (verringert) war. Dieser Unterschied ist ein erster Hinweis darauf, dass die Mutanten einen funktionellen Defekt besitzen. Dieser Defekt könnte durch eine veränderte Affinität zu ATP oder durch eine verringerte Hydrolyse-Aktivität der Mutanten erklärt werden. Dies könnte bewirken, dass die TRAP1-Mutanten den für Hsp90 typischen ATPase-Zyklus nicht mehr vollständig durchlaufen und dadurch nicht mehr voll funktionsfähig sind. Um dies zu analysieren müsste man jedoch die TRAP1-Mutanten aufreinigen und die Hydrolyse-Aktivität oder die Bindung von ATP

unter spezifischen Bedingungen untersuchen. Die in dieser Arbeit verwendete Methode kann daher nur einen ersten Hinweis auf eine veränderte Funktion der Mutanten geben.

Anhand des durchgeführten Versuchs kann man auf eine Nukleotid-regulierte Proteininteraktion schließen. Diese ist auch für andere ATPasen, wie den Hsp70-Chaperonen (Voos und Rottgers 2002) und für das zytosolische Hsp90, bekannt. Untersuchungen zum ATPase-Zyklus von Hsp90 konnten zeigen, dass Hsp90 in der ATP-gebundenen Form eine höhere Affinität zu Klienten besitzt als in der ADP-gebundenen Form (McLaughlin et al. 2004). In dem vorliegenden Versuch wurden während der Inkubation jedoch keine definierten ATP-Konzentrationen in den Mitochondrien erreicht, da diese erst nach der Behandlung lysiert und dadurch das ATP-ADP-Verhältnis in den Mitochondrien nur indirekt beeinflusst wurde. Daher sind die erhaltenen Ergebnisse nicht direkt mit der Affinität von zytosolischem Hsp90 zu seinen Klienten vergleichbar. Die Unterschiede, welche durch das Entfernen oder die Zugabe von ATP zum Puffer verursacht wurden, lassen sich aber durch den ATPase-Zyklus von TRAP1 erklären. Hierbei liegt das TRAP1-Dimer, wie auch andere Mitglieder der Hsp90-Familie, nach ATP-Bindung in der geschlossenen Konformation vor und öffnet sich nach Hydrolyse von ATP (Leskovar et al. 2008).

Zusammenfassend zeigt dieser Versuch, dass die TRAP1-SDHA-Interaktion von ATP-abhängig ist und dass die Mutanten einen ATP-spezifischen Defekt aufweisen, welcher sich jedoch unter den gewählten Bedingungen nicht weiter spezifizieren lässt.

5.5 Funktionelle Analysen der Interaktion von TRAP1 mit SDHA

Um die TRAP1-SDHA-Interaktion näher zu beschreiben, wurden die Aktivität und die Komplexbildung der SDH, nach Veränderung der TRAP1 Expression, untersucht. Die Aktivität der SDH wurde durch einen Enzymtest und Atmungsmessungen bestimmt. Weiterhin wurde das mitochondriale Membranpotential gemessen.

5.5.1 Messung der SDH-Aktivität

Die Messung der SDH-Aktivität zeigte nur nach Überexpression von TRAP1 eine um 30 % signifikant verringerte Aktivität der SDH. Die Überexpression der Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} sowie der Knockdown von TRAP1 hatten keine Auswirkung auf die SDH-Aktivität (siehe Abbildung 13). Dies zeigt, dass übermäßige Mengen an intaktem TRAP1 die Aktivität der SDH beeinflussen können, was eine direkte funktionale Verbindung von TRAP1 mit der SDHA bekräftigt. Dadurch kommt die Frage auf, wie TRAP1 dazu in der Lage ist, die Aktivität der SDHA zu regulieren. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Interaktion von TRAP1 mit SDHA die Bindung von Succinat an SDHA verhindert. In diesem Zusammenhang stellt sich jedoch die Frage, weshalb die Mutanten, welche noch eine Interaktion mit der SDH eingehen konnten, keine Verringerung der SDH-Aktivität verursachten. Daher ist es wahrscheinlicher, dass die Veränderung der Aktivität im Zusammenhang mit der Bildung oder Veränderung des SDH-Komplexes steht (siehe Diskussion Kapitel 5.5.3). Diese Möglichkeit würde auch eher mit einer Chaperon-ähnlichen Funktion von TRAP1 übereinstimmen (siehe Einleitung Kapitel 1.1).

5.5.2 Messung der mitochondrialen Atmung und des Membranpotentials

Die Bestimmung der mitochondrialen Atmung erfolgte durch Messung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen. Dabei konnte entweder die Atmung in Abhängigkeit von Komplex I-Substraten oder Komplex II-Substraten nach Veränderung der TRAP1-Expression gemessen werden (siehe Abbildung 15.1 und 15.2). Mit Hilfe des Respirationskontrollindex („state 3“/„state 2“) wurde ermittelt, wie gut sich der Sauerstoffverbrauch der Zellen durch ADP stimulieren lässt. Dieser Wert zeigte bei allen Untersuchungen keine signifikante Veränderung. Dies bedeutet, dass TRAP1 keinen direkten Einfluss auf die Stimulierbarkeit durch ADP und die generelle Funktionsfähigkeit der Atmungskette hat.

Die Bestimmung der Maximalatmung („state 3“) ergab nach Überexpression von TRAP1 (Wildtyp) eine signifikante Verringerung der Komplex II-abhängigen

Maximalatmung. Dies stimmt mit der verringerten SDH-Aktivität (Komplex II) nach Überexpression von TRAP1 überein (siehe Abbildung 13). Die Überexpression hatte jedoch auch eine Auswirkung auf die Komplex I-abhängige Maximalatmung (verringerte Atmung). Dies bedeutet, dass die TRAP1-Überexpression keinen Komplex II-spezifischen Effekt auf die mitochondriale Atmung hat. Nach Knockdown von TRAP1 war die Komplex II-abhängige Maximalatmung ebenfalls signifikant verringert. Die Komplex I-abhängige Maximalatmung war hingegen nicht verändert, was für einen Komplex II spezifischen Effekt spricht. Anscheinend wird die geringere Atmung jedoch nicht ausschließlich durch die SDH verursacht, da die Enzymaktivität der SDH durch einen Knockdown von TRAP1 nicht beeinflusst wurde (siehe Abbildung 13). Eine Messung der Enzymaktivität des Komplex IV (COX IV) zeigte hingegen eine um 50 % geringere Aktivität (siehe Abbildung 14) und könnte ein Grund für die geringere Komplex II-abhängige Maximalatmung sein. Bei genauerer Betrachtung ist dies jedoch unwahrscheinlich, da die Komplex I-abhängige Maximalatmung nicht verringert ist. Daher kann nicht beurteilt werden weshalb die Komplex II-abhängige Maximalatmung nach Knockdown von TRAP1 verringert ist. Die erhaltenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer kürzlich veröffentlichten Studie, in welcher gezeigt wurde, dass ein TRAP1-Knockdown den gesamten Sauerstoffverbrauch von HeLa-Zellen erhöhte (Yoshida et al. 2013). Da in dieser Studie jedoch der Sauerstoffverbrauch mit einer anderen Methode gemessen und außerdem der gesamte Sauerstoffverbrauch der Zelle bestimmt wurde, sind diese Ergebnisse nicht direkt vergleichbar.

Der Vergleich der Messung der Komplex II-abhängigen Maximalatmung sowie der COX-Aktivität mit der Bestimmung des Membranpotentials zeigt, dass nach Knockdown von TRAP1 ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. Das Membranpotential von Zellen, welche weniger bzw. kein TRAP1 mehr exprimierten, war ebenfalls verringert (siehe Abbildung 17). Insgesamt konnten weniger Zellen mit maximalem Membranpotential nachgewiesen werden. Möglicherweise lässt sich das verringerte Membranpotential dadurch erklären, dass aufgrund eines Defektes der Atmungskette weniger Protonen in den Intermembranraum gepumpt werden und somit auch weniger Sauerstoff verbraucht wird. Dieser Defekt steht aber nicht in Zusammenhang mit der SDH-

Aktivität, da diese durch einen Knockdown nicht beeinflusst wurde. Die hier beschriebenen Ergebnisse stimmen mit bisherigen Beobachtungen überein, dass TRAP1 eine antagonistische Funktion gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) besitzt (siehe Abschnitt 1.3.3.1). Die ROS-Produktion steht im direkten Bezug zur Atmungskette, welche die Hauptquelle der intrazellulären ROS-Produktion ist (Circo und Aw 2010). Durch Inhibition der Atmungskettenkomplexe kann die ROS-Produktion über die Atmungskette verstärkt werden (Murphy 2009). Daher könnten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse einen Hinweis darauf geben, wie ein TRAP1-Knockdown zu einer verstärkten ROS-Akkumulation führen kann.

5.5.3 Assemblierung des SDH-Komplexes

Neben der Aktivität der SDH wurde auch die Assemblierung des SDH-Komplexes untersucht. Dadurch sollte analysiert werden, ob TRAP1, ähnlich der Funktion anderer Chaperone (siehe Kapitel 1.1), die Assemblierung des SDH-Komplexes reguliert. Interessanterweise war nach Überexpression von TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} das durch die Antikörperdetektion hervorgerufene Signal des SDH-Komplexes im Gegensatz zur Kontrolle und Überexpression von TRAP1 verstärkt (siehe Abbildung 18 A). Ein Knockdown von TRAP1 zeigte hingegen keine Veränderung (siehe Abbildung 18 C). Auch nach Import von radioaktiv markierter SDHA konnte nach Überexpression der Mutanten TRAP1_{E115A} und TRAP1_{R402A} ein verstärktes radioaktives Signal und zusätzlich nach Überexpression von TRAP1 ein verringertes radioaktives Signal des SDH-Komplexes detektiert werden (siehe Abbildung 20). Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die Mutanten nicht mehr ihre eigentliche Funktion ausüben können. Dies passt zu dem in Kapitel 5.3.4 beschriebenen funktionellen Defekt der TRAP1-Mutanten. Eine Hypothese ist, dass die TRAP1-Mutanten den für Hsp90 typischen ATPase-Zyklus nicht mehr vollständig durchlaufen können und dadurch nicht mehr voll funktionsfähig sind. Das verringerte Signal der radioaktiv markierten SDHA nach Überexpression von TRAP1 könnte demnach bedeuten, dass TRAP1 die SDHA langsamer als bei endogener Expression in den SDH-Komplex einbaut. Möglicherweise könnte dies ein Grund für die verringerte SDH-Aktivität sein. Die TRAP1-Mutanten scheinen hingegen die

SDHA schneller in den SDH-Komplex einzubauen, eventuell aufgrund einer höheren Affinität zum Substrat. Da jedoch nach Überexpression der Mutanten keine verstärkte SDH-Aktivität gemessen werden konnte (siehe Abbildung 13), ist es möglich, dass die TRAP1-Mutanten die SDHA zwar in den SDH-Komplex einbauen können, aber dieser Komplex noch nicht seine volle Aktivität besitzt. Möglicherweise müsste dazu der SDH-Komplex modifiziert werden, was jedoch aufgrund des Funktionsverlustes der Mutanten nicht mehr möglich sein könnte. Die mit der Kontrolle vergleichbare Aktivität des SDH-Komplexes (siehe Abbildung 13) könnte darauf zurückgeführt werden, dass die Mutanten nur transient überexprimiert wurden. Die gemessene Aktivität stellt daher vielleicht die des endogen exprimierten SDH-Komplexes dar, welcher bereits vor der Transfektion vorhanden war.

Die hier beschriebene Hypothese passt zu der bekannten Funktion des zytosolischen Hsp90 bei der Assemblierung und Zusammenlagerung von Komplexen. Es ist bekannt, dass Hsp90 die Assemblierung von Komplexen durch das Stabilisieren seiner Klienten und das Koordinieren der Assemblierung in Multiproteinkomplexe steuert, ohne ein Bestandteil des finalen Komplexes zu sein (Makhnevych und Houry 2012). Daher ist es möglich, dass TRAP1 den Einbau der SDHA in den SDH-Komplex reguliert. Weiterhin lässt sich postulieren, dass TRAP1 die SDH-Aktivität beeinflussen kann. Ob oder inwieweit diese Funktionen im Zusammenhang stehen, kann derzeit noch nicht beurteilt werden. Dafür wären weitere Untersuchungen erforderlich. Durch die erhaltenen Ergebnisse kann jedoch die SDHA als ein neuer Klient von TRAP1 identifiziert und weiterhin ein direkter Bezug von TRAP1 zur oxidativen Phosphorylierung aufgestellt werden.

6 Zusammenfassung

Molekulare Chaperone, auch als Hitzeschockproteine (Hsp) bekannt, kommen in allen Organismen vor und sind essentiell für das Überleben einer Zelle. Das mitochondriale „Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1“ (TRAP1) gehört zur Familie der Hsp90-Chaperone. In der vorliegenden Arbeit konnte TRAP1 als mitochondriales Matrixprotein verifiziert werden. Durch die Aufreinigung von TRAP1 mittels Affinitätschromatographie wurde die Untereinheit A der Succinat-Dehydrogenase (SDHA) als Interaktionspartner von TRAP1 ermittelt. Die Nukleotidabhängigkeit der TRAP1-SDHA-Interaktion sowie eine erfolgreiche chemische Vernetzung von TRAP1 und SDHA konnten die Spezifität dieser Interaktion bestätigen.

Enzymatische Messungen ergaben eine signifikante Verringerung der SDH-Aktivität nach Überexpression von TRAP1. Weiterhin war die mitochondriale Atmung herabgesetzt. Im Gegensatz dazu wurde die SDH-Aktivität durch einen Knockdown von TRAP1 nicht beeinflusst. Die mitochondriale Atmung, die COX-Aktivität und das Membranpotential waren hingegen durch den Knockdown verringert. Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Knockdown von TRAP1 einen Defekt der Atmungskette auslöst, was möglicherweise erklärt wie ein TRAP1- Knockdown zu einer verstärkten ROS-Akkumulation führen kann.

Neben dem Einfluss auf die SDH-Aktivität konnte auch ein Einfluss auf die Assemblierung des SDH-Komplexes beobachtet werden. Punktmutanten von TRAP1, welche potentiell nicht mehr in der Lage sind ATP zu hydrolysieren, zeigten eine signifikant verstärkte Bildung des SDH-Komplexes, wohingegen eine Überexpression das Gegenteil bewirkte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass TRAP1 an der Assemblierung von SDHA in den SDH-Komplex beteiligt ist. Wie TRAP1 die Assemblierung koordiniert und dadurch möglicherweise die SDH-Aktivität beeinflusst, konnte jedoch bis jetzt noch nicht eindeutig ermittelt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass SDHA als ein Klient von TRAP1 bezeichnet werden kann, da die Aktivität und die Assemblierung des SDH-Komplexes von TRAP1 reguliert wird. Durch die Identifikation der SDHA

als Klienten von TRAP1 konnte nun erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen TRAP1 und der oxidativen Phosphorylierung nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von TRAP1 das Membranpotential von Mitochondrien verringert, was sich auf den intrinsischen Weg zur Einleitung von Apoptose auswirken kann. Diese Ergebnisse liefern die Grundlage für weitere Studien, wie TRAP1 auch in Tumorzellen zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase beitragen könnte.

7 Literaturverzeichnis

- Ali, M. M., S. M. Roe, C. K. Vaughan, P. Meyer, B. Panaretou, P. W. Piper, C. Prodromou and L. H. Pearl (2006). "Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex." Nature **440**(7087): 1013-7.
- Altieri, D. C., G. S. Stein, J. B. Lian and L. R. Languino (2012). "TRAP-1, the mitochondrial Hsp90." Biochim. Biophys. Acta **1823**(3): 767-773.
- Amoroso, M. R., D. S. Matassa, G. Laudiero, A. V. Egorova, R. S. Polishchuk, F. Maddalena, A. Piscazzi, S. Paladino, D. Sarnataro, C. Garbi, M. Landriscina and F. Esposito (2012). "TRAP1 and the proteasome regulatory particle TBP7/Rpt3 interact in the endoplasmic reticulum and control cellular ubiquitination of specific mitochondrial proteins." Cell Death Differ. **19**(4): 592-604.
- Becker, D., J. Richter, M. A. Tocilescu, S. Przedborski and W. Voos (2012). "Pink1 kinase and its membrane potential (Deltapsi)-dependent cleavage product both localize to outer mitochondrial membrane by unique targeting mode." J Biol Chem **287**(27): 22969-87.
- Bergerat, A., B. de Masy, D. Gadelle, P. C. Varoutas, A. Nicolas and P. Forterre (1997). "An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination." Nature **386**(6623): 414-7.
- Blank, M., M. Mandel, Y. Keisari, D. Meruelo and G. Lavie (2003). "Enhanced ubiquitylation of heat shock protein 90 as a potential mechanism for mitotic cell death in cancer cells induced with hypericin." Cancer Res **63**(23): 8241-7.
- Bullock, J. C., J. M. Fernandez and J. M. Short (1987). "XL-1 Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection." Bio/Techniques.
- Butler, E. K., A. Voigt, A. K. Lutz, J. P. Toegel, E. Gerhardt, P. Karsten, B. Falkenburger, A. Reinartz, K. F. Winklhofer and J. B. Schulz (2012). "The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates alpha-Synuclein toxicity." PLoS Genet. **8**(2): e1002488.
- Cabal-Hierro, L. and P. S. Lazo "Signal transduction by tumor necrosis factor receptors." Cell Signal **24**(6): 1297-305.
- Cecchini, G. (2003). "Function and structure of complex II of the respiratory chain." Annu Rev Biochem **72**: 77-109.
- Cechetto, J. D. and R. S. Gupta (2000). "Immunoelectron microscopy provides evidence that tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP-1) is a mitochondrial protein which also localizes at specific extramitochondrial sites." Exp. Cell Res. **260**(1): 30-39.
- Chacinska, A., C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow and N. Pfanner (2009). "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms." Cell **138**(4): 628-44.
- Chen, B., W. H. Piel, L. Gui, E. Bruford and A. Monteiro (2005). "The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution." Genomics **86**(6): 627-637.

- Chen, B., D. Zhong and A. Monteiro (2006). "Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms." BMC Genomics **7**: 156.
- Chen, C. F., Y. Chen, K. Dai, P. L. Chen, D. J. Riley and W. H. Lee (1996). "A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock." Mol. Cell. Biol. **16**(9): 4691-4699.
- Chen, W. Y., F. R. Chang, Z. Y. Huang, J. H. Chen, Y. C. Wu and C. C. Wu (2008). "Tubocapsenolide A, a novel withanolide, inhibits proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-231 cells by thiol oxidation of heat shock proteins." J Biol Chem **283**(25): 17184-93.
- Circu, M. L. and T. Y. Aw (2010). "Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis." Free Radic Biol Med **48**(6): 749-62.
- Costa, A. C., S. H. Loh and L. M. Martins (2013). "Drosophila Trap1 protects against mitochondrial dysfunction in a PINK1/parkin model of Parkinson's disease." Cell Death Dis **4**: e467.
- Costantino, E., F. Maddalena, S. Calise, A. Piscazzi, V. Tirino, A. Fersini, A. Ambrosi, V. Neri, F. Esposito and M. Landriscina (2009). "TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptosis in human colorectal carcinoma cells." Cancer Lett. **279**(1): 39-46.
- Dalle-Donne, I., G. Aldini, M. Carini, R. Colombo, R. Rossi and A. Milzani (2006). "Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression." J Cell Mol Med **10**(2): 389-406.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani and R. Colombo (2003). "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." Clin Chim Acta **329**(1-2): 23-38.
- Daugaard, M., M. Rohde and M. Jaattela (2007). "The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions." FEBS Lett **581**(19): 3702-10.
- Ellis, R. J. and A. P. Minton (2006). "Protein aggregation in crowded environments." Biol Chem **387**(5): 485-97.
- Fang, W., X. Li, Q. Jiang, Z. Liu, H. Yang, S. Wang, S. Xie, Q. Liu, T. Liu, J. Huang, W. Xie, Z. Li, Y. Zhao, E. Wang, F. M. Marincola and K. Yao (2008). "Transcriptional patterns, biomarkers and pathways characterizing nasopharyngeal carcinoma of Southern China." J Transl Med **6**: 32.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7.
- Felts, S. J., B. A. Owen, P. Nguyen, J. Trepel, D. B. Donner and D. O. Toft (2000). "The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties." J. Biol. Chem. **275**(5): 3305-3312.
- Frey, S., A. Leskovaar, J. Reinstein and J. Buchner (2007). "The ATPase cycle of the endoplasmic chaperone Grp94." J Biol Chem **282**(49): 35612-20.
- Ghosh, J. C., M. D. Siegelin, T. Dohi and D. C. Altieri (2010). "Heat shock protein 60 regulation of the mitochondrial permeability transition pore in tumor cells." Cancer Res. **70**(22): 8988-8993.

- Graf, C., M. Stankiewicz, G. Kramer and M. P. Mayer (2009). "Spatially and kinetically resolved changes in the conformational dynamics of the Hsp90 chaperone machine." *Embo J* **28**(5): 602-13.
- Hainzl, O., M. C. Lapina, J. Buchner and K. Richter (2009). "The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function." *J Biol Chem* **284**(34): 22559-67.
- Hartl, F. U., A. Bracher and M. Hayer-Hartl (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." *Nature* **475**(7356): 324-32.
- Haslbeck, M., T. Franzmann, D. Weinfurter and J. Buchner (2005). "Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins." *Nat Struct Mol Biol* **12**(10): 842-6.
- Hessling, M., K. Richter and J. Buchner (2009). "Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90." *Nat Struct Mol Biol* **16**(3): 287-93.
- Hodson, S., J. J. Marshall and S. G. Burston (2012). "Mapping the road to recovery: the ClpB/Hsp104 molecular chaperone." *J Struct Biol* **179**(2): 161-71.
- Hua, G., Q. Zhang and Z. Fan (2007). "Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis." *J. Biol. Chem.* **282**(28): 20553-20560.
- Im, C. N., J. S. Lee, Y. Zheng and J. S. Seo (2007). "Iron chelation study in a normal human hepatocyte cell line suggests that tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) regulates production of reactive oxygen species." *J. Cell. Biochem.* **100**(2): 474-486.
- Jackson, S. E. (2013). "Hsp90: structure and function." *Top Curr Chem* **328**: 155-240.
- Jhaveri, K. and S. Modi (2012). "HSP90 inhibitors for cancer therapy and overcoming drug resistance." *Adv Pharmacol* **65**: 471-517.
- Johnson, J. L. (2012). "Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins." *Biochim Biophys Acta* **1823**(3): 607-13.
- Kang, B. H. (2012). "TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-targeted TRAP1 inhibitors." *BMB Rep.* **45**(1): 1-6.
- Kang, B. H., J. Plescia, T. Dohi, J. Rosa, S. J. Doxsey and D. C. Altieri (2007). "Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network." *Cell* **131**(2): 257-270.
- Kettern, N., M. Dreiseidler, R. Tawo and J. Höhfeld (2010). "Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction." *Biol Chem* **391**(5): 481-9.
- Kovacs, J. J., P. J. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J. T. Wu, C. V. Nicchitta, M. Yoshida, D. O. Toft, W. B. Pratt and T. P. Yao (2005). "HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor." *Mol Cell* **18**(5): 601-7.
- Kroemer, G., L. Galluzzi and C. Brenner (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* **87**(1): 99-163.
- Krotten, M. A., M. Bartoszewicz and I. Swiecicka (2010). "Cereulide and valinomycin, two important natural dodecadepsipeptides with ionophoretic activities." *Pol J Microbiol* **59**(1): 3-10.
- Kubota, K., K. Inoue, R. Hashimoto, N. Kumamoto, A. Kosuga, M. Tatsumi, K. Kamijima, H. Kunugi, N. Iwata, N. Ozaki, M. Takeda and M. Tohyama

- (2009). "Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 regulates cell adhesion and synaptic morphology via modulation of N-cadherin expression." J Neurochem **110**(2): 496-508.
- Kuznetsov, A. V., M. Hermann, V. Saks, P. Hengster and R. Margreiter (2009). "The cell-type specificity of mitochondrial dynamics." Int J Biochem Cell Biol **41**(10): 1928-39.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Landriscina, M., G. Laudiero, F. Maddalena, M. R. Amoroso, A. Piscazzi, F. Cozzolino, M. Monti, C. Garbi, A. Fersini, P. Pucci and F. Esposito (2010). "Mitochondrial chaperone Trap1 and the calcium binding protein Sorcin interact and protect cells against apoptosis induced by antineoplastic agents." Cancer Res. **70**(16): 6577-6586.
- Leav, I., J. Plescia, H. L. Goel, J. Li, Z. Jiang, R. J. Cohen, L. R. Languino and D. C. Altieri (2010). "Cytoprotective mitochondrial chaperone TRAP-1 as a novel molecular target in localized and metastatic prostate cancer." Am. J. Pathol. **176**(1): 393-401.
- Leskovar, A., H. Wegele, N. D. Werbeck, J. Buchner and J. Reinstein (2008). "The ATPase cycle of the mitochondrial Hsp90 analog Trap1." J. Biol. Chem. **283**(17): 11677-11688.
- Liu, D., J. Hu, J. Agorreta, A. Cesario, Y. Zhang, A. L. Harris, K. Gatter and F. Pezzella (2010). "Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) regulates genes involved in cell cycle and metastases." Cancer Lett. **296**(2): 194-205.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Macleod, K., P. Mullen, J. Sewell, G. Rabiasz, S. Lawrie, E. Miller, J. F. Smyth and S. P. Langdon (2005). "Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer." Cancer Res **65**(15): 6789-800.
- Makhnevych, T. and W. A. Houry (2012). "The role of Hsp90 in protein complex assembly." Biochim Biophys Acta **1823**(3): 674-82.
- Martinez-Ruiz, A. and S. Lamas (2004). "S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction." Cardiovasc Res **62**(1): 43-52.
- Martinez-Ruiz, A., L. Villanueva, C. Gonzalez de Orduna, D. Lopez-Ferrer, M. A. Higuera, C. Tarin, I. Rodriguez-Crespo, J. Vazquez and S. Lamas (2005). "S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8525-30.
- Masuda, Y., G. Shima, T. Aiuchi, M. Horie, K. Hori, S. Nakajo, S. Kajimoto, T. Shibayama-Imazu and K. Nakaya (2004). "Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by beta-hydroxyisovalerylshikonin." J. Biol. Chem. **279**(41): 42503-42515.
- Mayer, M. P. (2010). "Gymnastics of molecular chaperones." Mol Cell **39**(3): 321-31.
- Mayer, M. P. and B. Bukau (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." Cell Mol Life Sci **62**(6): 670-84.

- McDonough, H. and C. Patterson (2003). "CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems." *Cell Stress Chaperones* **8**(4): 303-8.
- McLaughlin, S. H., F. Sobott, Z. P. Yao, W. Zhang, P. R. Nielsen, J. G. Grossmann, E. D. Laue, C. V. Robinson and S. E. Jackson (2006). "The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins." *J Mol Biol* **356**(3): 746-58.
- McLaughlin, S. H., L. A. Ventouras, B. Lobbezoo and S. E. Jackson (2004). "Independent ATPase activity of Hsp90 subunits creates a flexible assembly platform." *J Mol Biol* **344**(3): 813-26.
- Meyer, P., C. Prodromou, B. Hu, C. Vaughan, S. M. Roe, B. Panaretou, P. W. Piper and L. H. Pearl (2003). "Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions." *Mol Cell* **11**(3): 647-58.
- Meyer, P., C. Prodromou, C. Liao, B. Hu, S. M. Roe, C. K. Vaughan, I. Vlastic, B. Panaretou, P. W. Piper and L. H. Pearl (2004). "Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery." *Embo J* **23**(6): 1402-10.
- Mollapour, M. and L. Neckers (2012). "Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation." *Biochim Biophys Acta* **1823**(3): 648-55.
- Mollapour, M., S. Tsutsumi, A. C. Donnelly, K. Beebe, M. J. Tokita, M. J. Lee, S. Lee, G. Morra, D. Bourbouli, B. T. Scroggins, G. Colombo, B. S. Blagg, B. Panaretou, W. G. Stetler-Stevenson, J. B. Trepel, P. W. Piper, C. Prodromou, L. H. Pearl and L. Neckers (2010). "Swe1Wee1-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function." *Mol Cell* **37**(3): 333-43.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* **417**(1): 1-13.
- Murphy, P. J., K. C. Kanelakis, M. D. Galigniana, Y. Morishima and W. B. Pratt (2001). "Stoichiometry, abundance, and functional significance of the hsp90/hsp70-based multiprotein chaperone machinery in reticulocyte lysate." *J Biol Chem* **276**(32): 30092-8.
- Nathan, D. F., M. H. Vos and S. Lindquist (1997). "In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 12949-56.
- Neupert, W. and J. M. Herrmann (2007). "Translocation of proteins into mitochondria." *Annu Rev Biochem* **76**: 723-49.
- Nystrom, T. (2005). "Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence." *Embo J* **24**(7): 1311-7.
- Obermann, W. M., H. Sondermann, A. A. Russo, N. P. Pavletich and F. U. Hartl (1998). "In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis." *J Cell Biol* **143**(4): 901-10.
- Panaretou, B., C. Prodromou, S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper and L. H. Pearl (1998). "ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo." *Embo J* **17**(16): 4829-36.
- Panaretou, B., G. Siligardi, P. Meyer, A. Maloney, J. K. Sullivan, S. Singh, S. H. Millson, P. A. Clarke, S. Naaby-Hansen, R. Stein, R. Cramer, M. Mollapour, P. Workman, P. W. Piper, L. H. Pearl and C. Prodromou

- (2002). "Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1." Mol Cell **10**(6): 1307-18.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft (2003). "Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery." Exp Biol Med (Maywood) **228**(2): 111-33.
- Pridgeon, J. W., J. A. Olzmann, L.-S. Chin and L. Li (2007). "PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1." PLoS Biol. **5**(7): 1494-1503.
- Prodromou, C., B. Panaretou, S. Chohan, G. Siligardi, R. O'Brien, J. E. Ladbury, S. M. Roe, P. W. Piper and L. H. Pearl (2000). "The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains." Embo J **19**(16): 4383-92.
- Prodromou, C., S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper and L. H. Pearl (1997). "Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone." Cell **90**(1): 65-75.
- Raturi, A. and T. Simmen (2013). "Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM)." Biochim Biophys Acta **1833**(1): 213-24.
- Richter, K., J. Soroka, L. Skalniak, A. Leskovar, M. Hessling, J. Reinstein and J. Buchner (2008). "Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90." J Biol Chem **283**(26): 17757-65.
- Roe, S. M., M. M. Ali, P. Meyer, C. K. Vaughan, B. Panaretou, P. W. Piper, C. Prodromou and L. H. Pearl (2004). "The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37)." Cell **116**(1): 87-98.
- Sadoul, K., C. Boyault, M. Pabion and S. Khochbin (2008). "Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases." Biochimie **90**(2): 306-12.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**(2): 223-31.
- Scheibel, T., S. Neuhofen, T. Weikl, C. Mayr, J. Reinstein, P. D. Vogel and J. Buchner (1997). "ATP-binding properties of human Hsp90." J Biol Chem **272**(30): 18608-13.
- Schilling, B., J. Murray, C. B. Yoo, R. H. Row, M. P. Cusack, R. A. Capaldi and B. W. Gibson (2006). "Proteomic analysis of succinate dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c reductase (Complex II and III) isolated by immunoprecipitation from bovine and mouse heart mitochondria." Biochim Biophys Acta **1762**(2): 213-22.
- Schmidt, O., N. Pfanner and C. Meisinger (2010). "Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 655-67.
- Scroggins, B. T. and L. Neckers (2007). "Post-translational modification of heat-shock protein 90: impact on chaperone function." Expert Opin Drug Discov **2**(10): 1403-14.

- Scroggins, B. T., K. Robzyk, D. Wang, M. G. Marcu, S. Tsutsumi, K. Beebe, R. J. Cotter, S. Felts, D. Toft, L. Karnitz, N. Rosen and L. Neckers (2007). "An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function." *Mol Cell* **25**(1): 151-9.
- Siligardi, G., B. Panaretou, P. Meyer, S. Singh, D. N. Woolfson, P. W. Piper, L. H. Pearl and C. Prodromou (2002). "Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37/p50cdc37." *J Biol Chem* **277**(23): 20151-9.
- Silverstein, A. M., M. D. Galigniana, M. S. Chen, J. K. Owens-Grillo, M. Chinkers and W. B. Pratt (1997). "Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin." *J Biol Chem* **272**(26): 16224-30.
- Soldano, K. L., A. Jivan, C. V. Nicchitta and D. T. Gewirth (2003). "Structure of the N-terminal domain of GRP94. Basis for ligand specificity and regulation." *J Biol Chem* **278**(48): 48330-8.
- Song, H. Y., J. D. Dunbar, Y. X. Zhang, D. Guo and D. B. Donner (1995). "Identification of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor." *J. Biol. Chem.* **270**(8): 3574-3581.
- Taipale, M., D. F. Jarosz and S. Lindquist (2010). "HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(7): 515-28.
- Takamura, H., Y. Koyama, S. Matsuzaki, K. Yamada, T. Hattori, S. Miyata, K. Takemoto, M. Tohyama and T. Katayama (2012). "TRAP1 controls mitochondrial fusion/fission balance through Drp1 and Mff expression." *PLoS One* **7**(12): e51912.
- Takemoto, K., S. Miyata, H. Takamura, T. Katayama and M. Tohyama (2011). "Mitochondrial TRAP1 regulates the unfolded protein response in the endoplasmic reticulum." *Neurochem. Int.* **58**(8): 880-887.
- Theodoraki, M. A. and A. J. Caplan (2012). "Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins." *Biochim Biophys Acta* **1823**(3): 683-8.
- Trepel, J., M. Mollapour, G. Giaccone and L. Neckers (2010). "Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer." *Nat Rev Cancer* **10**(8): 537-49.
- Voos, W. (2013). "Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis." *Biochim Biophys Acta*.
- Voos, W. and K. Rottgers (2002). "Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis." *Biochim Biophys Acta* **1592**(1): 51-62.
- Wandinger, S. K., M. H. Suhre, H. Wegele and J. Buchner (2006). "The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90." *Embo J* **25**(2): 367-76.
- Weikl, T., P. Muschler, K. Richter, T. Veit, J. Reinstein and J. Buchner (2000). "C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle." *J Mol Biol* **303**(4): 583-92.
- Wochnik, G. M., J. Ruegg, G. A. Abel, U. Schmidt, F. Holsboer and T. Rein (2005). "FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells." *J Biol Chem* **280**(6): 4609-16.
- Yoshida, S., S. Tsutsumi, G. Muhlebach, C. Sourbier, M. J. Lee, S. Lee, E. Vartholomaiou, M. Tatokoro, K. Beebe, N. Miyajima, R. P. Mohny, Y. Chen, H. Hasumi, W. Xu, H. Fukushima, K. Nakamura, F. Koga, K. Kihara, J. Trepel, D. Picard and L. Neckers (2013). "Molecular chaperone

TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis." Proc Natl Acad Sci U S A.

Young, J. C., W. M. Obermann and F. U. Hartl (1998). "Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90." J Biol Chem **273**(29): 18007-10.

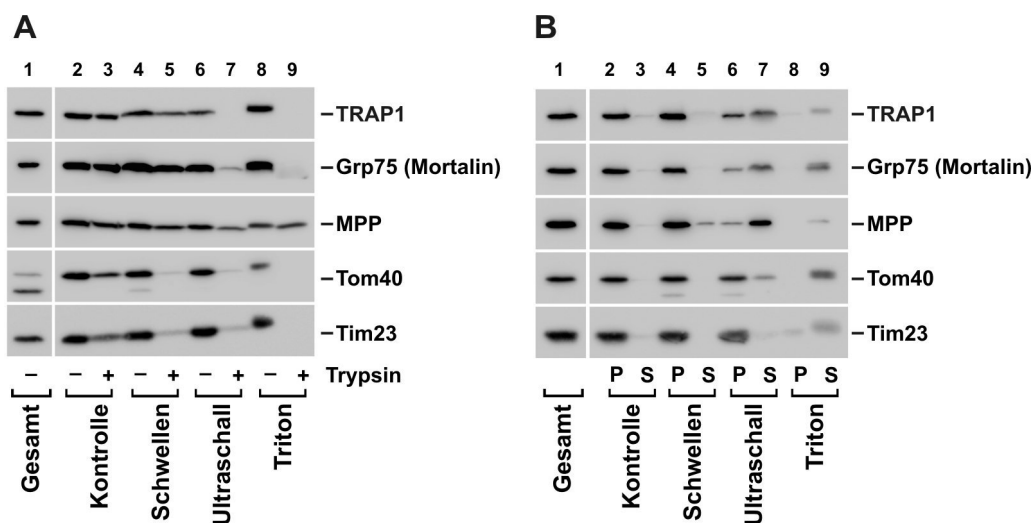


Abbildung 24: Submitochondriale Lokalisation von endogenem TRAP1

Dargestellt ist die submitochondriale Lokalisation von endogenem TRAP1. Die Mitochondrien wurden aus HeLa-Zellen präpariert. Anschließend wurde einerseits die Sensitivität von TRAP1 gegenüber Trypsin, andererseits die Löslichkeit von TRAP1 nach Zentrifugation untersucht. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot und Antikörperdetektion gegen TRAP1, Grp75 (Matrix), MPP (Matrix), Tom40 (Außenmembran) und Tim23 (Innenmembran). Der Nachweis gebundener Sekundärantikörper erfolgte mittels ECL

A: Trypsin-Sensitivität von TRAP1. Die Mitochondrien wurden nach Kontroll-Behandlung, Schwellen, Ultraschall und Triton-Behandlung mit oder ohne Trypsin inkubiert. TRAP1 wurde erst nach Ultraschallbehandlung Proteasesensitiv. Das Matrix-Protein Grp75 zeigte eine mit TRAP1 vergleichbare Proteasesensitivität. Weitere Kontroll-Proteine waren MPP, Tom 40 und Tim23. **B:** Löslichkeit von TRAP1. Die Mitochondrien wurden nach Kontroll-Behandlung und Schwellen durch Zentrifugation bei 20.000 x g (10 min, 4 °C) sowie nach Ultraschall und Triton-Behandlung durch Zentrifugation bei 100.000 x g (30 min, 4 °C) in Überstand (S) und Pellet (P) aufgeteilt. TRAP1 befand sich erst nach Ultraschallbehandlung im Überstand, was der Matrix-Fraktion entspricht. Ein Teil von TRAP1 konnte ebenfalls im Pellet nachgewiesen werden, was der Membran-Fraktion entspricht. Das Matrix-Protein Grp75 zeigte wieder eine mit TRAP1 vergleichbare Lokalisation. Weitere Kontroll-Proteine waren MPP, Tom 40 und Tim23.

▼1 **MYH9_HUMAN** 1566 Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4

	Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
1.1 MYH9_HUMAN	1566	226392	100 (54)	60 (37)	1.07

Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4

▼100 peptide matches (88 non-duplicate, 12 duplicate)

Query	Dupes	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
66		577.3320	1728.9741	1728.8642	63.6	1	25	0.21	1	U	K.QTLENERGELANEV.K
141		744.0440	1486.0735	1485.8919	122.0	33	33	0.032	1	U	R.VISGVLQGNIVFK.K
256		454.7810	907.5475	907.4803	74.0	29	39	0.18	2	U	K.FVSELWK.D
267	1	462.7810	923.5475	923.4865	66.0	39	39	0.014	1	U	R.VVFQEFR.Q
284		472.2950	942.5755	942.5175	61.5	20	20	0.76	1	U	K.LVWVPSDK.S
382		518.8520	1035.6894	1035.5600	125.1	32	32	0.026	1	U	K.VAAYDKLEK.T
387		520.2530	1038.4914	1038.6550	-157.0	29	29	0.15	1	U	K.VKPLLQVSR.Q
389		347.2510	1038.7312	1038.6550	73.4	39	39	0.015	1	U	K.VKPLLQVSR.Q
399		523.2740	1044.5334	1044.5637	-29.0	26	26	0.28	1	U	R.LEVNLQAMK.A
408		531.3530	1060.6915	1060.5587	125.0	15	15	1.3	2	U	R.LEVNLQAMK.A + Oxidation (M)
422		536.3310	1070.6474	1070.6124	32.7	19	19	1.9	5	U	K.KLVWVPSDK.S
478		578.3900	1154.7655	1154.6560	94.8	74	74	4.3e-06	1	U	R.RGDLPFVVR.R
479		385.9680	1154.8821	1154.6560	196.1	33	33	0.048	1	U	R.RGDLPFVVR.R
514		597.3420	1192.6694	1192.6088	50.8	74	74	5.4e-06	1	U	K.ALELDSNLYR.I
520		602.8300	1203.6455	1203.5805	54.0	52	52	0.00077	1	U	K.ALEQQVEEMK.T
521		603.3620	1204.7094	1204.6339	62.7	66	66	3.6e-05	1	U	K.TDLLLEPYNK.Y
524		606.8200	1211.6255	1211.5782	39.0	46	46	0.0022	1	U	K.DLEAHIDSANK.N
525		608.3660	1214.7175	1214.6618	45.8	29	29	0.18	1	U	R.ASREIILAQAK.E
528		610.8450	1219.6754	1219.6448	25.1	45	45	0.0036	1	U	K.KFDQLLAEEK.T
530		612.3140	1222.6135	1222.6306	-14.0	59	59	0.00016	1	U	R.AGVLAHLEEEER.D
539	1	621.8270	1241.6395	1241.5822	46.1	34	34	0.044	1	U	K.THEAQIQEMR.Q
540		414.8890	1241.6452	1241.5822	50.7	18	18	2.2	6	U	K.THEAQIQEMR.Q
545		1247.5920	2493.1695	2492.1667	402.0	70	70	3.1e-05	1	U	K.DFSALESQLODTEQLLEENR.Q
549	1	629.4190	1256.8235	1256.6724	120.1	51	51	0.0011	1	U	K.KEEELQAALAR.V
550		420.2320	1257.6742	1257.5772	77.1	13	13	1.7	4	U	K.THEAQIQEMR.Q + Oxidation (M)
554		637.8940	1273.7734	1273.6918	64.1	35	35	0.038	1	U	R.YEILTPNSIPK.G
561		653.4210	1304.8275	1304.6612	127.0	46	46	0.0034	1	U	K.EQAFIAIEALAK.A
562		440.2890	1317.8452	1317.7405	79.5	51	51	0.0009	1	U	K.LDPLHLVLDQLR.C
563		659.9530	1317.8915	1317.7405	115.0	50	50	0.0013	1	U	K.LDPLHLVLDQLR.C
572		706.9520	1411.8895	1411.8035	60.9	67	67	2.2e-05	1	U	K.KVEAQLQELQVK.F
573	1	471.6530	1411.9372	1411.8035	94.7	49	49	0.0014	1	U	K.KVEAQLQELQVK.F
575		713.4120	1424.8094	1424.7446	45.5	32	32	0.041	1	U	K.QIATLHAQVADM.K
576		475.9510	1424.8311	1424.7446	60.8	36	36	0.031	1	U	K.QIATLHAQVADM.K
579	1	481.2760	1440.8062	1440.7395	46.3	12	12	1.8	6	U	K.QIATLHAQVADM.K + Oxidation (M)
583		739.9640	1477.9134	1477.7929	81.6	37	37	0.019	1	U	K.VIQLYAYVASSHK.S
584		493.6520	1477.9342	1477.7929	95.6	26	26	0.25	1	U	K.VIQLYAYVASSHK.S
589		765.8660	1529.7175	1529.7573	-26.0	75	75	3.9e-06	1	U	K.IAQLEEQLDNETK.E
590		510.9520	1529.8342	1529.7573	50.3	29	29	0.15	1	U	K.IAQLEEQLDNETK.E
594		520.3150	1557.9232	1557.8515	46.0	34	34	0.042	1	U	R.QRYEILTPNSIPK.G
595		783.8920	1565.7695	1564.6675	704.0	50	50	0.00089	1	U	R.ELEDATETADAMNR.E
598		524.3110	1569.9111	1568.8344	686.1	32	32	0.077	1	U	K.QIATLHAQVADM.KK + Oxidation (M)
599		786.4960	1570.9774	1570.8468	83.2	68	68	1.6e-05	1	U	K.VSHLLGINVDFTR.G
600		524.6820	1571.0242	1570.8468	113.0	38	38	0.019	1	U	K.VSHLLGINVDFTR.G
602		791.8700	1581.7254	1580.6624	673.0	16	16	0.56	1	U	R.ELEDATETADAMNR.E + Oxidation (M)
610	1	534.9430	1601.8072	1600.7515	659.1	14	14	1.9	3	U	K.NKHEAMITDLEER.L + Oxidation (M)
611		808.4290	1614.8435	1614.8109	20.2	68	68	1.7e-05	1	U	R.IMGIPPEEQMGLLR.V
613		816.4430	1630.8714	1630.8058	40.2	28	28	0.18	1	U	R.IMGIPPEEQMGLLR.V + Oxidation (M)
614		816.4580	1630.9015	1630.8058	58.6	18	18	0.71	2	U	R.IMGIPPEEQMGLLR.V + Oxidation (M)
616		827.4360	1652.8574	1652.7781	48.0	94	94	4.3e-08	1	U	R.IAEFTTNLTTEEEK.S
619		837.4610	1672.9074	1671.8369	640.0	101	101	8e-09	1	U	K.NFINNLAQADWAAK.K
622		864.0370	1726.0594	1725.9413	68.4	60	60	8.4e-05	1	U	R.QLLQANPILEAFGNAK.T
623		576.3650	1726.0731	1725.9413	76.4	87	87	1.9e-07	1	U	R.QLLQANPILEAFGNAK.T
624		864.4750	1726.9354	1726.8487	50.2	64	64	4e-05	1	U	K.NLPIYSEEIVMYK.G
625		872.4460	1742.8774	1742.8436	19.4	48	48	0.0015	1	U	K.NLPIYSEEIVMYK.G + Oxidation (M)
627		876.4810	1750.9475	1750.8481	56.8	79	79	1.5e-06	1	U	R.LTEMETLQSQLMAEK.L
628	1	584.6630	1750.9672	1750.8481	68.1	47	47	0.0022	1	U	R.LTEMETLQSQLMAEK.L
630		585.9220	1754.7442	1753.7750	553.1	18	18	0.91	1	U	R.QEEEMMAKEEELVK.V + 2 Oxidation (M)
639		614.0180	1839.0322	1838.9010	71.3	64	64	4.1e-05	1	U	K.HSQAVEELAEQLQTK.R
640		928.0090	1854.0034	1853.8642	75.1	19	19	0.43	1	U	R.EQLEEEEEAKHNLEK.Q
641		619.0110	1854.0111	1853.8642	79.2	19	19	1.4	7	U	R.EQLEEEEEAKHNLEK.Q
643	1	935.5460	1869.0775	1868.9592	63.3	110	110	9.7e-10	1	U	K.ANLQIDQINTDLNLER.S
644		624.0410	1869.1012	1868.9592	76.0	61	61	6.7e-05	1	U	K.ANLQIDQINTDLNLER.S
647		639.3880	1915.1422	1913.9094	644.0	62	62	5.9e-05	1	U	R.HEMPPHIYAITDTAYR.S
650		644.3520	1930.0341	1929.9043	67.3	46	46	0.0022	1	U	R.HEMPPHIYAITDTAYR.S + Oxidation (M)
655		973.5650	1945.1155	1945.0004	59.2	155	155	2.9e-14	1	U	K.LQVELDNVTGLLSQSDSK.S
656		649.3990	1945.1751	1945.0004	89.8	79	79	1e-06	1	U	K.LQVELDNVTGLLSQSDSK.S
657	1	650.7070	1949.0991	1948.9854	58.3	73	73	4.8e-06	1	U	R.LQQELDDLVDLDHQR.Q
659		976.0650	1950.1155	1948.9854	580.0	79	79	1.1e-06	1	U	R.LQQELDDLVDLDHQR.Q
661		666.0390	1995.0952	1995.0254	35.0	26	26	0.22	1	U	R.TFHIFYLLSGAGEHLK.T
662		998.6960	1995.3774	1995.0021	188.1	70	70	1e-05	1	U	K.HSQAVEELAEQLQTK.R
663		666.4060	1996.1962	1995.0021	599.1	44	44	0.0038	1	U	K.HSQAVEELAEQLQTK.R.V
664		666.7170	1997.1291	1997.0541	37.5	29	29	0.12	1	U	K.KANLQIDQINTDLNLER.S

<u>667</u>	673.7850	2018.3331	2017.0554	633 0	61	7.3e-05	▶ ₁	U R.IIGLDQVAGMSETALPGAFK .T
<u>670</u>	678.5850	2032.7332	2032.9436	-103 0	28	0.15	▶ ₁	U R.ELESQISELQEDLESER .A
<u>671</u>	678.7260	2033.1562	2033.0503	52.1 0	73	4e-06	▶ ₁	U R.IIGLDQVAGMSETALPGAFK .T + Oxidation (M)
<u>673</u>	1025.1030	2048.1915	2047.9554	115 0	48	0.0013	▶ ₁	U K.SMEAEMIQLQEELAAAER .A
<u>674</u>	684.0070	2048.9992	2047.9554	510 0	83	4.8e-07	▶ ₁	U K.SMEAEMIQLQEELAAAER .A
<u>675</u>	688.9730	2063.8972	2063.9503	-25.7 0	71	7.8e-06	▶ ₁	U K.SMEAEMIQLQEELAAAER .A + Oxidation (M)
<u>678</u>	696.9940	2087.9602	2087.9719	-5.59 1	84	3.2e-07	▶ ₁	U R.QAQQERDELADEIANSSGK .G
<u>683</u> ▶ ₁	714.7690	2141.2851	2141.0059	130 0	56	0.00025	▶ ₁	U K.NMDPLNDNIATLLHQSSDK .F + Oxidation (M)
<u>690</u> ▶ ₁	768.4480	2302.3222	2302.1288	84.0 1	73	4.7e-06	▶ ₁	U K.IRELESQISELQEDLESER .A
<u>692</u>	778.7420	2333.2042	2332.0488	495 0	77	1.5e-06	▶ ₁	U K.MQQNIQEELEEEESAR .Q
<u>698</u>	823.4970	2467.4692	2466.2002	515 0	76	2.2e-06	▶ ₁	U K.LQQLFNHTMFILEQEEYQR .E
<u>701</u>	825.1010	2472.2812	2471.1663	451 0	77	1.5e-06	▶ ₁	U R.IAQLLEELEEEQGNTLINDR .L
<u>702</u>	829.8310	2486.4712	2486.2388	93.5 0	67	1.9e-05	▶ ₁	U K.LEGDSTDLSQIAELQAIAELK .M
<u>703</u> ▶ ₁	831.7900	2492.3481	2492.1667	72.8 0	80	8.5e-07	▶ ₁	U K.DFSALESQLQDTQELLQEENR .Q
<u>707</u>	872.5170	2614.5293	2614.3337	74.8 1	77	1.7e-06	▶ ₁	U R.KLEGDSTDLSQIAELQAIAELK .M
<u>708</u>	887.5610	2659.6611	2659.3228	127 1	28	0.16	▶ ₁	U K.SGFEPASLKEEVGEEAIVLVENGK .K

Abbildung 25: Ergebnisse der „MASCOT“ Analyse

Peptidliste zu Abbildung 9.2. Identifikation von Myosin-9 (Homo Sapiens). Der Peptidscore reflektiert die Wahrscheinlichkeit, dass die Zuordnung der Fragmentmassen zu einer Peptidsequenz nicht zufällig ist. Aus der Summe der Peptidscores eines Proteins ergibt sich dessen Proteinscore (Zeile 1.1). Der Peptidscore ist in der Reihe des jeweiligen Peptids aufgeführt. Weiterhin sind die gemessene Masse [Mr (expt)] und die theoretische Masse [Mr (calc)] sowie der relative Fehler (ppm) angegeben. Der „Expectation“-Wert (Expect) gibt die Zahl der Peptide an, die mit besseren Scores gefunden werden konnten, aber auf zufälligen Übereinstimmungen beruhen. Je niedriger dieser Wert ist, desto wahrscheinlicher ist das Peptid identifiziert.

9 Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (Tanespimycin)
ATP	Adenosintriphosphat
AVO	Antimycin A, Valinomycin, Oligomycin
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	„charged coupled device“
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COX	Cytochrom-c-Oxidase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCIP	Dichlorphenolindophenol
ddH ₂ O	doppelt demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSG	Disuccinimidyl-Glutarat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FCS	fötale Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Hsp	Hitzeschockprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
LC	Flüssigkeitschromatographie
MDH2	Malatdehydrogenase 2

MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MDR	Multi Drug Resistance
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMS	Phenazinmethosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
RT	Raumtemperatur
SDHA	Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNS	„short interfering“ Ribonukleinsäure
ST	<i>Strep</i> -tag
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMRE	Tetramethylrhodamin Ethyl Esther
TRAP1	“Tumor necrosis factor receptor associated protein” 1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Lebenslauf

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Weiterhin versichere ich, dass die vorgelegte Arbeit nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn, Mai 2013

Judith Richter

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Voos für die Möglichkeit der Promotion, sein Interesse an dieser Arbeit und die vielen konstruktiven Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Jörg Höfeld danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Cornelia Rüb, Uschi Gerken, Ilka Lewrenz, Giovanna Cenini, Michael Bruderek, Patrick Günther, den ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Voos sowie allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie möchte ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und guten Tipps danken.

Besonders möchte ich Cornelia Rüb für das freundliche Überlassen der von ihr während ihrer Diplomarbeit erstellten TRAP1-Punktmutanten danken. Uschi Gerken möchte ich vor allem für ihre Unterstützung und Ratschläge bei technischen Fragen danken. Weiterhin danke ich der Serviceabteilung Massenspektrometrie des IBMB für die Durchführung und die Auswertung der „MASCOT“-Analyse.

Sabine Topka vom Anatomischen Institut danke ich für die freundliche Einführung in die Durchflusszytometrie.

Für die freundliche Kollaboration bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfram Kunz, LIFE & BRAIN Center, UKB Bonn. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Susanne Schöler für die Durchführung der Atmungsmessungen und die konstruktiven Ratschläge bei der Auswertung der Daten. Außerdem möchte ich Karin Kappes-Horn für die Messung der COX-Aktivität danken.

Von ganzem Herzen möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden danken. Ihr habt mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt und wart immer für mich da.