

Summary

The disulfide relay system represents the major import pathway into the IMS of mitochondria, MIA40 and ALR as the system's key components. In this study, the interaction between yeast Erv1 and its electron acceptor cytochrome *c* was explored. By using solution NMR spectroscopy, we could show that Erv1 and cytochrome *c* interact in a collision type manner which underlines that cytochrome *c* is the preferred electron acceptor of Erv1. The efficient interaction between both proteins prevents ROS production in the IMS.

The disulfide relay system includes a diverse substrate spectrum not only localized in the IMS but also in the matrix. We identified a subgroup of twinCX₉C proteins that are localized to the matrix. CHCHD1, CHCHD2, CHCHD9, CHCHD10, isoform 2 of COA6 and NDUFAF8 showed dual localization in the IMS and matrix. All these proteins bear a weak MTS targeting the proteins into the matrix. Based on our studies on NDUFAF8, we could show that the weak MTS allows oxidation of NDUFAF8 by MIA40 during its translocation into the matrix. The redox state of NDUFAF8 is crucial for its stability in both compartments. We could identify YME1 and CLPP involved in proteolysis of NDUFAF8, respectively in the IMS and matrix. Disturbances in the disulfide relay hampers NDUFAF8 import which leads to CI deficiency. Interestingly, the energy state of the IMS also heavily affected NDUFAF8 import. We could show that disturbances in the NAD⁺/NADH ratios caused impaired NDUFAF8 import. While matrix proteins rely on the membrane potential, the impact of the energy state in the IMS has not yet been explored. The two-step import pathway depends on the energy state in both compartments.

In this study, we explored the two major aspects of the DRS. We could identify the underlying mechanism for preferred electron acceptor of Erv1, which recycles Mia40, the key oxidoreductase of the disulfide relay system. Furthermore, we characterized the two-step import pathway which allowed to explore the impact of the energy state in the IMS regarding protein import.

Zusammenfassung

Proteine, die im Intermembran Raum von Mitochondrien lokalisiert sind, folgen hauptsächlich den MIA40 abhängigen Importweg. Zwei essenzielle Komponenten, MIA40 und ALR, gewährleisten den Import von MIA40 Substraten. In der vorliegenden Studie wurde die Interaktion zwischen, dem in Hefe vorliegenden, Erv1 und Cytochrom *c* untersucht. Anhand von NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine in einer Kollisionsartigen Interaktion miteinander wechselwirken. Dieser Befund zeigt, dass Cytochrom *c* der präferierte Elektronen-Akzeptor von Erv1 ist. Durch die höchst effiziente Elektronenübergabe kann die Entstehung von ROS vermieden werden.

An dem MIA40 abhängigem Importweg ist ein diverses Spektrum an Proteinen beteiligt, die nicht nur im Intermembran Raum lokalisiert sind, sondern auch in der mitochondrialen Matrix. Für eine Subgruppe von TwinCX₉C Proteinen konnten wir zeigen, dass sie auch in der Matrix lokalisiert sind. CHCHD1, CHCHD2, CHCHD9, CHCHD10, COA6 Isoform 2 und NDUFAF8 sind dual lokalisierte Proteine im Intermembran Raum und Matrix. Sie besitzen eine schwache MTS, welches ihnen erlaubt in die Matrix zu gelangen. Für die weitere Charakterisierung des Importweges wurde der Fokus auf NDUFAF8 gelegt, dessen schwache MTS eine Oxidation durch MIA40 während des Imports gewährleistet. Der Redox-Status bewies sich als entscheidend für die Stabilität von NDUFAF8 in beiden Kompartimenten. Die Proteasen YME1 und CLPP sind zuständig für die proteolytische Beseitigung von NDUFAF8 im Intermembran Raum und der Matrix. Fehlerhafter Import von NDUFAF8 sorgt für Instabilität des Proteins und folglich zu CI Defizienz. Nicht nur Defekte im MIA40 abhängigem Import sind entscheidend für NDUFAF8, sondern auch die NADH-Level im Intermembran Raum. Während Proteine, die in der Matrix stark vom Membran Potential des Mitochondriums abhängen, ist der Einfluss des Energie Status im Intermembran Raum noch nicht erforscht. Der in dieser Arbeit gezeigte Importweg wird von dem Energie Status beider Kompartimente beeinflusst.

In der vorliegenden Studie wurde zwei Aspekte des MIA40 abhängigen Importwegs erforscht. Wir konnten mechanistisch zeigen, welcher Interaktion der Elektronen Akzeptor Cytochrom *c* und Erv1 unterliegt, welches essenziell für die Regenerierung von MIA40 ist. Des Weiteren wurde ein sogenannter Zwei-Schritt-Importweg vorgestellt, das beweist, dass der Energie Status im Intermembran ebenfalls einen Einfluss auf den Import von Proteinen haben kann.