

**A NADPH-independent switch-off mechanism
protects mitochondrial E_{GSH} from oxidation
and H_2O_2 -induced cell death**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Gaetano Calabrese

aus Bari, Italien

Köln 2019

Summary

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is a molecule which can either serve beneficial roles acting as a signaling messenger and regulating protein activity or become a destructive element eventually leading to cellular damages and cell death.

Mitochondria are the major intracellular source of H_2O_2 and recent evidence supports that in the mitochondrial matrix, local H_2O_2 detoxification is directly coupled to the glutathione system, although a comprehensive picture of the interplay of the various redox systems *in vivo* is missing. A reduced glutathione pool is required to support this and other fundamental cellular functions, including iron-sulfur cluster biosynthesis, protein folding, redox regulation. To ensure a reducing glutathione environment the matrix is kinetically disconnected from the rest of the cell and only relies on a NADPH-dependent reducing pathway. It is uncertain whether this single option is sufficient for the task or other unknown alternative pathways are available.

We employed highly sensitive genetically-encoded fluorescent redox probes (roGFPs) to monitor *in vivo* changes in H_2O_2 levels and E_{GSH} dynamics in the mitochondrial matrix of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Thereby, we could show that **glutathione becomes oxidized to support the H_2O_2 -detoxification activity of the mitochondrial peroxiredoxin Prx1. The increase of GSSG is the main cause of H_2O_2 -induced cell death.** Furthermore, we discovered two new NADPH-independent mechanisms adopted by the cell to ensure a reducing mitochondrial glutathione pool: first, under conditions of acute oxidative stress, **hyperoxidation of Prx1 abolishes the production of GSSG** in the mitochondrial matrix; second, impairments of matrix H_2O_2 handling induces a **transcriptional response improving cytosolic H_2O_2 -handling capacity** to limit the flux of H_2O_2 towards mitochondria.

Taken together, we could unravel the cellular mechanisms that ensure a fine balance between H_2O_2 handling and GSSG accumulation in the matrix which is critical to prevent cell death.

Zusammenfassung

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann in der Zelle entweder eine positive Rolle annehmen, indem es unter anderem als Signalmolekül wirkt und die Aktivität verschiedener Proteine reguliert, oder eine destruktive, die über Zellschäden hin zum Zelltod führt.

Mitochondrien sind die größte ROS-Quelle in der Zelle. Studien belegten, dass die lokale H_2O_2 -Entgiftung in der mitochondrialen Matrix direkt an das Glutathionsystem gekoppelt ist, obwohl die genauen Redoxmechanismen *in vivo* noch nicht ausreichend untersucht wurden. Reduziertes Glutathion (GSH) wird für viele grundlegende zelluläre Funktionen wie der Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese, Proteinfaltung, Redoxregulation und Antioxidation benötigt. Um eine reduzierende GSH-Umgebung in der Matrix aufrecht zu erhalten, ist die Matrix vom Rest der Zelle isoliert. Dort wird GSH durch die NADPH-abhängige Reduktion des oxidierten Glutathions (GSSG) regeneriert. Ob diese Reaktion ausreichend GSH regeneriert oder ob es Alternativen für diese Reaktion gibt ist bislang noch unklar.

Mit Hilfe sensitiver, genetisch codierter fluoreszierender Redoxsensoren (roGFPs) konnten wir Änderungen des H_2O_2 -Spiegels und der E_{GSH} -Dynamik in Echtzeit in der mitochondrialen Matrix der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* *in vivo* beobachten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass **Glutathion in der Matrix oxidiert wird, um die H_2O_2 -Entgiftungsaktivität des mitochondrialen Peroxiredoxins Prx1 zu ermöglichen. Erhöhte Level des oxidierten Glutathions (GSSG) lösen in der mitochondrialen Matrix einen H_2O_2 -induzierten Zelltod aus.** Zusätzlich wurden zwei neue NADPH-unabhängige Prozesse zur Aufrechterhaltung von GSH-reduzierenden Bedingungen in der Matrix entdeckt. Zum einen kann bei akutem oxidativem Stress **Prx1 durch Hyperoxidation ausgeschaltet werden**, um die Produktion von GSSG zu verhindern. Zum anderen werden bei einer Schädigung von Redoxenzymen in der Matrix **Transkriptionsmechanismen im Zytosol aktiviert, um die H_2O_2 Entgiftung im Zytosol zu stärken**, wodurch die Menge an H_2O_2 , die die mitochondriale Matrix erreicht, reduziert wird.

Zusammengenommen konnten die zellulären Mechanismen nachgewiesen werden, die das Gleichgewicht zwischen der Entgiftung von H_2O_2 und der Begrenzung der GSSG-Akkumulation in der mitochondrialen Matrix steuert und dadurch den Zelltod verhindert.

Berichtersteller:

Prof. Dr. Jan Riemer

Prof. Dr. Elena Rugarli

Tag der mündlichen Prüfung:

29.03.2019