

## Abstract

Mitochondria are double-membrane enclosed dynamic organelles whose function is essential for eukaryotic cells. Diverse processes including respiratory energy generation, synthesis of iron sulphur clusters and calcium storage take place in mitochondria. *Saccharomyces cerevisiae* is a eukaryotic model organism that has been used extensively to study mitochondrial function, especially since the cells can grow under aerobic as well as anaerobic growth conditions. Some mitochondrial processes like ATP generation through oxidative phosphorylation or protein import have been studied in great detail, while other processes like phospholipid regulation remain poorly understood.

Prohibitins (Phb1 and Phb2) are conserved proteins that form large ring shaped complexes in the mitochondrial inner membrane (Tatsuta, *et al.* 2005). Recently, a synthetic genetic array was performed to elucidate the function of this complex and genes that are synthetically lethal with *PHB1* were identified. Interestingly, yeast containing the single deletions of many of these genes displayed defects in phosphatidylethanolamine (PE) and cardiolipin (CL) levels. However, the deletion of other genes synthetically lethal with prohibitins did not affect phospholipid levels (Osman, *et al.* 2009a).

One of the genes, whose presence was important for PE accumulation, was *MDM35*. The protein encoded by this gene was originally identified as a component required for mitochondrial distribution and morphology and was localized to the mitochondrial intermembrane space (Dimmer, *et al.* 2002; Gabriel, *et al.* 2007). In this thesis the nature of the PE deficiency in  $\Delta m d m 3 5$  mitochondria is analysed in more detail. While mitochondrial PE synthesis is enhanced in the absence of Mdm35, the cells fail to accumulate PE due to increased turnover. Furthermore, it is shown that Mdm35 is required for the stability of Ups1 and Ups2, two mitochondrial intermembrane space proteins that have previously been linked to the regulation of PE and CL levels (Osman, *et al.* 2009a; Tamura, *et al.* 2009).

*ATP23* represents another gene synthetically lethal with *PHB1*. However, in contrast to *MDM35*, it is not required for the accumulation of CL or PE (Osman, *et al.* 2009a). Similar to Mdm35, Atp23 is localized to the mitochondrial intermembrane space. Recent data indicate that Atp23 is required for Atp6 processing and its subsequent assembly into the  $F_1F_0$ -ATP

synthase (Wilmes 2006; Osman\*, Wilmes\*, *et al.* 2007). Here, Atp23 is analysed in further detail and its direct interaction with mature Atp6 is shown. Moreover, Ups1 is identified as a novel substrate that is not processed and stabilized like Atp6 but degraded by Atp23. Therefore, by degrading Ups1, Atp23 acts as an antagonistic player of Mdm35.

The analysis of Atp23 and Mdm35 presented in this study provides further insight into a complex regulatory network of proteins located in the mitochondrial intermembrane space that ensures mitochondrial phospholipid composition.

## Zusammenfassung

Mitochondrien sind dynamische Organellen eukaryotischer Zellen. Viele, zum Teil lebenswichtige, Prozesse finden in Mitochondrien statt. Während einige dieser Prozesse detailliert untersucht wurden und bereits gut verstanden sind, blieb die Funktion vieler hoch konservierter mitochondrialer Proteine bisher unverstanden.

Prohibitine formen einen Komplex von einem Mega Dalton bestehend aus Phb1 und Phb2 in der mitochondrialen inneren Membran (Tatsuta, *et al.* 2005). Eine kürzlich durchgeführte Studie identifizierte Gene, die mit *PHB1*, synthetisch letal sind (Osman, *et al.* 2009a). Die darauffolgende Untersuchung zeigte, dass das Fehlen dieser Gene in vielen Fällen zu reduziertem Cardiolpin (CL) und/oder Phosphatidylethanolamin (PE) Gehalt in Mitochondrien führt. Einige der identifizierten Gene schienen jedoch keinen Einfluss auf die mitochondriale Phospholipidzusammensetzung zu haben.

Eines der Gene, dessen Beseitigung zu reduzierten PE Leveln führt, codiert Mdm35. Mdm35 wird für die mitochondriale Verteilung (Distribution) und Morphologie benötigt und befindet sich im mitochondrialen Intermembranraum (Dimmer, *et al.* 2002; Gabriel, *et al.* 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der reduzierte PE Gehalt in Mitochondrien, denen Mdm35 fehlt, nicht durch defekte Synthese sondern durch erhöhten Umsatz verursacht wird. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Mdm35 wichtig für die Akkumulation von Ups1 und Ups2 in Mitochondrien ist. Ups1 und Ups2 wiederum sind wichtige Regulatoren des CL und PE Gehalts in Mitochondrien (Osman, *et al.* 2009a; Tamura, *et al.* 2009). Die Bildung stabiler Proteinkomplexe mit Mdm35 wirkt dem proteolytischer Abbau von Ups1 und Ups2 im mitochondrialen Intermembranraum entgegen.

Zusätzlich zu Mdm35 wurde Atp23 analysiert. *ATP23* ist eines der Gene, die synthetisch letal sind mit *PHB1* jedoch den PE oder CL Gehalt in Mitochondrien nicht merklich beeinflussen. Die Metalloprotease Atp23 befindet sich im mitochondrialen Intermembranraum und ist für die Prozessierung und Assemblierung von Atp6 in die  $F_1F_0$ -ATP Synthase verantwortlich (Wilmes 2006). In dieser Arbeit wird Atp23 genauer untersucht und direkte Interaktion von Atp23 mit der gereiften Form von neu synthetisiertem Atp6 gezeigt. Atp23 ist hoch konserviert doch funktionelle Redundanz zwischen Atp23 und dem humanen Homolog KUB3 konnte im Bezug auf Atp6 nicht gezeigt werden. Ein zweites Substrat, Ups1, wurde in dieser

Arbeit identifiziert. Anders als Atp6 wird Ups1 nicht prozessiert und stabilisiert sondern proteolytisch abgebaut durch Atp23. Da Ups1 ebenfalls konserviert ist bleibt zu zeigen, ob KUB3 diese Funktion von Atp23 übernehmen kann und ob das humane Homolog von Ups1 im Menschen durch KUB3 abgebaut wird.

Die beiden hier untersuchten Proteine haben unterschiedlichen Einfluss auf Ups1. Während Atp23 bei der Proteolyse von Ups1 eine Rolle spielt, stabilisiert Mdm35 sowohl Ups1 also auch Ups2. Somit sind Atp23 und Mdm35 Antagonisten in einem Netzwerk aus Proteinen im Intermembranraum, die den CL und PE Gehalt in Mitochondrien regulieren.