

Funktion der *m*-AAA-Protease bei der Regulation mitochondrialer Translation

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Mark Nolden

aus Euskirchen

Köln, 2005

Berichtersteller:

Professor Dr. Thomas Langer

Professor Dr. R. Jürgen Dohmen

Professor Dr. J. Höhfeld

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 30.11.2005

Abstract

Regulated protein degradation by conserved ATP-dependent proteases plays a fundamental role for protein quality control in mitochondria and the biogenesis of the organelles. The inactivation of the membrane associated *m*-AAA protease causes severe pleiotropic phenotypes in various organisms including respiratory deficiencies, mitochondrial morphology defects and axonal degeneration in hereditary spastic paraplegia. The molecular basis of these defects, however, is not understood. Further insights into the regulatory role of the *m*-AAA protease within mitochondria can be obtained by the identification of endogenous substrates in yeast mitochondria. In a first approach, proteomes of wild type and *m*-AAA protease deficient mitochondria were compared by two-dimensional-PAGE to identify short-lived mitochondrial proteins with potential regulatory functions. These experiments revealed a remarkable stability of the mitochondrial proteome, but did not allow the identification of substrates of the *m*-AAA protease.

In a second approach, a proteolytically inactive variant of the yeast *m*-AAA protease was used to identify substrates irreversibly associated with the mutant protease via affinity purification. With this approach, MrpL32, a component of the large ribosomal subunit, could be identified. The *m*-AAA protease was shown to process MrpL32 both at the N- and C-terminus. This results in the tight association of MrpL32 with the inner mitochondrial membrane where it assembled with ribosomal particles. This mechanism permits the activation of the synthesis of mitochondrial encoded proteins in close proximity to the inner membrane. The expression of mature MrpL32 partially restored the respiratory competence of *m*-AAA protease deficient strains identifying the maturation of MrpL32 as a key function of the protease in yeast. The *m*-AAA protease-dependent processing of MrpL32 is conserved throughout evolution. The loss of paraplegin, a subunit of the homologous murine *m*-AAA protease, leads to a MrpL32 processing and a mitochondrial translation defect. The regulatory role of the *m*-AAA protease for mitochondrial ribosome assembly and mitochondrial translation may therefore help to understand why the loss of paraplegin results in axonal degeneration in hereditary spastic paraplegia.

Inhaltsverzeichnis

Abstract

1	EINLEITUNG	6
1.1	Funktion und Bedeutung der Mitochondrien in der eukaryontischen Zelle	6
1.1.1	Das mitochondriale Ribosom	7
1.1.2	Mitochondriale Translation und Membraninsertion der Translationsprodukte	8
1.1.3	Assemblierung der Cytochromoxidase in der inneren Mitochondrienmembran	10
1.2	Mitochondriale Proteolyse	12
1.2.1	Proteasen und ATP-abhängige Proteolyse	13
1.2.2	Lon-Proteasen	15
1.2.3	Clp-Proteasen	16
1.2.4	AAA-Proteasen	17
1.2.5	Die Rolle der AAA-Proteasen im Mitochondrium	19
1.3	Proteolyse in der inneren Mitochondrienmembran	21
1.4	Regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung	23
1.4.1	Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems im NF- κ B-Signalweg	24
1.4.2	Regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung von Spt23	25
1.5	Zielsetzung der Arbeit	27
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Klonierungen	28
2.1.1	<i>In vitro</i> Transkriptions-/Translations-Plasmide	28
2.1.2	Expressionsplasmide	28
2.2	Verwendete Hefestämme	31
2.3	Untersuchungen zur Stabilität des mitochondrialen Proteoms	33
2.3.1	Radioaktive Markierung von mitochondrialen Proteinen	33
2.3.2	Zweidimensionale-Gelelektrophorese	34
2.3.3	Peptidexport von mitochondrialen Proteinen	35
2.4	Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie	35
2.5	Radioaktive Markierung von mitochondrialen Translationsprodukten	36
2.6	Analyse mitochondrialer Ribosomen durch Dichtegradientenzentrifugation	37
2.7	Membranassoziation von MrpL32	37
2.7.1	Alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen	37
2.7.2	Triton X-114-Extraktion von mitochondrialen Membranen	38
2.7.3	Membranassoziation von Ribosomen mit der inneren Mitochondrienmembran	38
2.8	Superose 6-Gelfiltration	39
2.9	Co-Immundefällung von Proteinen	39
2.10	Herstellung von Antikörpern	41
2.11	Verschiedene Methoden	41

3	ERGEBNISSE	42
3.1	Stabilität des mitochondrialen Proteoms	42
3.1.1	Proteom-Vergleich von Wildtyp- und $\Delta yta10$ -Mitochondrien	42
3.1.2	Stabilität von neu synthetisierten Proteinen	43
3.1.3	Abbauprodukte von mitochondrial- und nuklear-kodierten Proteinen werden aus Mitochondrien exportiert	46
3.2	MrpL32 interagiert mit der <i>m</i>-AAA-Protease	48
3.3	Reifung von MrpL32	50
3.3.1	<i>m</i> -AAA-Protease-abhängige Prozessierung von MrpL32 <i>in vitro</i>	50
3.3.2	MrpL32 ist in Eubakterien und eukaryontischen Mitochondrien konserviert	52
3.3.3	<i>m</i> -AAA-Protease-abhängige Prozessierung von MrpL32 <i>in vivo</i>	53
3.3.4	C-Terminale Prozessierung von MrpL32	54
3.4	Die ersten 77 Aminosäuren von MrpL32 sind notwendig für den Import in Mitochondrien	57
3.5	Die Prozessierung ist essentiell für die Funktion von MrpL32	58
3.5.1	Die Expression von reifem MrpL32 rettet den $\Delta mrpL32$ -Phänotyp	58
3.5.2	Reifes MrpL32 komplementiert den Atmungsdefekt von <i>m</i> -AAA-Protease-defizienten Zellen	60
3.5.3	Die Reifung des Hybridproteins Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) ist MPP abhängig	61
3.6	Der Verlust der <i>m</i>-AAA-Protease führt zu einer defekten mitochondrialen Translation	62
3.7	Assemblierung mitochondrialer Ribosomen in Abwesenheit der <i>m</i>-AAA-Protease	64
3.8	Die Insertion von MrpL32 ins Ribosom findet an der inneren Mitochondrienmembran statt	66
3.9	<i>m</i>-AAA-Protease-abhängige Prozessierung von MrpL32 in Mitochondrien der Maus	71
4	DISKUSSION	75
4.1	Die Stabilität des mitochondrialen Proteoms	75
4.2	Prozessierung von MrpL32	76
4.3	Der Einfluss der <i>m</i>-AAA-Protease auf die mitochondriale Translation	77
4.4	Die membrangebundene Translation in Mitochondrien	80
4.5	Die Prozessierung von MrpL32 ist ein konservierter Prozess	83
5	ZUSAMMENFASSUNG	85
6	LITERATURVERZEICHNIS	86
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
8	ANHANG	104

Eidesstattliche Erklärung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 *Funktion und Bedeutung der Mitochondrien in der eukaryontischen Zelle*

Mitochondrien haben sich sehr wahrscheinlich aus aeroben Purpurbakterien entwickelt, die während der Evolution durch Endosymbiose mit eukaryontischen Zellen fusioniert sind (Yang *et al.*, 1985; Andersson *et al.*, 1998). Im Laufe der Evolution haben die Mitochondrien vom anfänglichen bakteriellen Genom über 90% der DNA verloren (Gray *et al.*, 2001). Die Reduktion des mitochondrialen Genoms beruht höchstwahrscheinlich auf der Deletion von nicht essentiellen Genen und dem Transfer von mitochondrialen Genen in den Kern (Kurland und Andersson, 2000). Das mitochondriale Proteom wird in Folge dessen von zwei Genomen kodiert. Die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine (~99%) ist kernkodiert und wird, nachdem sie im Cytosol synthetisiert wurde, posttranslational in die Mitochondrien importiert. Das mitochondriale Genom selbst enthält nur noch wenige Gene, die von mitochondrialen Ribosomen translatiert werden. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind zum Beispiel eine Komponente der kleinen Ribosomenuntereinheit (Var1), 24 tRNAs, die kleine (15S) und große (21S) ribosomale RNA, die 9S-RNA Komponente der RNase P und sieben Proteine der Atmungskette von dem mitochondrialen Genom kodiert. Die Atmungskettenkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran liegen in einer genau definierten Stöchiometrie von mitochondrial- und kernkodierten Untereinheiten vor, was ein hohes Maß an Koordination von cytosolischen und mitochondrialen Syntheseprozessen voraussetzt.

Mitochondrien sind für eine Vielzahl von Reaktionen verantwortlich, wie zum Beispiel den Tricarbonsäurezyklus, den Elektronentransport, die oxidative Phosphorylierung und ATP-Gewinnung. Des Weiteren spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Fettsäureoxidation, der Häm-Biosynthese und der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern (Reichert und Neupert, 2004). Die Bedeutung der Mitochondrien für den zellulären Metabolismus zeigt sich auch darin, dass viele menschliche Krankheiten auf Defekten in kernkodierten mitochondrialen Proteinen oder auf Mutationen bzw. Deletionen von mitochondrialer DNA beruhen (DiMauro, 2004). Die meiste Energie, die Grundlage für Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zellentwicklung ist, wird durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien gewonnen. Es ist bekannt,

dass eine gestörte Translation der mitochondrial-kodierten Atmungskettenkomponenten, entweder durch Deletion oder Mutation der Gene selbst oder in Komponenten des mitochondrialen Translationsapparats, zu verschiedenen mitochondrialen Krankheiten führt, wie zum Beispiel Myopathien und sensorineuralen Funktionsstörungen (DiMauro und Schon, 2003; Sylvester *et al.*, 2004; Taylor und Turnbull, 2005). Für die mitochondriale Translation werden mindestens 78 kern-kodierte Proteine benötigt (O'Brien, 2003). Inzwischen konnten einige Krankheiten, wie zum Beispiel Taubheit, Retinitis Pigmentosa und Usher-Syndrom 1E, mit Mutationen in mitochondrialen ribosomalen Genen in Verbindung gebracht werden (Kenmochi *et al.*, 2001; Sylvester *et al.*, 2004). So führt zum Beispiel eine Nonsense-Mutation in dem Gen *MRPS16* zu einer verringerten Translation (Miller *et al.*, 2004). Patienten mit dieser Mutation leiden an einer Agenesie des Corpus callosum, an Dysmorphismus und einer unheilbaren frühkindlichen Laktatazidose mit einem außergewöhnlichen Verlust der Komplex I- und Komplex-IV Aktivität im Muskel und in der Leber (Miller *et al.*, 2004).

1.1.1 Das mitochondriale Ribosom

Die Assemblierung der mitochondrialen Ribosomen ist ein koordinierter Prozess der Prozessierung und Modifizierung von rRNAs bei zeitgleicher Assoziation mit ribosomalen Proteinen. Zur Aufrechterhaltung und Expression von mtDNA werden ca. 200 kernkodierte Proteine benötigt, die im Cytosol synthetisiert und post-translational in Mitochondrien importiert werden (Barrientos *et al.*, 2003; Sickmann *et al.*, 2003; Rehling *et al.*, 2004). Die Mehrzahl der ribosomalen Proteine besitzt eine N-terminale Signalsequenz, die nach dem Import abgespalten wird (Graack und Wittmann-Liebold, 1998). Bisher konnten mit verschiedenen Methoden 65 mitochondriale ribosomale Proteine identifiziert werden (Graack und Wittmann-Liebold, 1998; Grivell *et al.*, 1999; Sickmann *et al.*, 2003). Überraschenderweise besitzen nur ca. 60% dieser Proteine eine signifikante Homologie mit bakteriellen ribosomalen Proteinen (O'Brien, 2002). Daher wird angenommen, dass die konservierten Proteine für die zentralen Schritte der Proteinbiosynthese verantwortlich sind. Zusätzliche Proteine erfüllen spezialisierte Aufgaben, wie zum Beispiel die Lokalisierung des Ribosoms an der inneren Mitochondrienmembran, der Bestimmungsort der sieben hydrophoben Translationsprodukte (Fox, 1996).

Die Sedimentationskoeffizienten (S) von mitochondrialen Ribosomen unterscheiden sich deutlich zwischen Metazoen (55S), Ciliaten (80S), Pilzen (70-74S) und höheren Pflanzen (77-78S) (Graack und Wittmann-Liebold, 1998). Im Vergleich dazu beträgt der Sedimentationskoeffizient des bakteriellen Ribosoms 70S und des eukaryontischen cytoplasmatischen Ribosoms 80S. Das Protein-rRNA-Verhältnis ist im Vergleich von bakteriellen Ribosomen zu mitochondrialen Ribosomen invertiert. So beträgt das Verhältnis in bakteriellen Ribosomen 33% Proteine zu 67% rRNA, in mitochondrialen Ribosomen dagegen 69% Proteine zu 31% rRNA (Suzuki *et al.*, 2001a). Der Verlust der rRNA wird durch eine Erhöhung des Proteinanteils kompensiert, was sich in der Regel in einer Verlängerung der Proteine widerspiegelt (Suzuki *et al.*, 2001a; Suzuki *et al.*, 2001b; O'Brien, 2002). Obwohl mitochondriale Ribosomen aus Metazoen einen geringeren RNA-Gehalt und Sedimentationskoeffizienten aufweisen, sind sie dennoch größer als die bakteriellen 70S-Ribosomen. Das mitochondriale Ribosom, zum Beispiel einer Rattenzelle, besitzt eine molekulare Masse von 3,57 MDa, im Vergleich zu 2,49 MDa des *E. coli* Ribosoms (Patel *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001a). Die molekulare Masse der kleinen Untereinheit (28S) wurde mit 1,01 MDa und die der großen Untereinheit (39S) mit 1,63 MDa bestimmt (Matthews *et al.*, 1982).

1.1.2 Mitochondriale Translation und Membraninsertion der Translationsprodukte

Das mitochondriale Ribosom ist für die Translation der Mehrzahl hydrophober Proteine verantwortlich, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind und in Atmungskettenkomplexe integriert werden müssen (Attardi und Schatz, 1988). Dies wird über eine Interaktion der Ribosomen mit der inneren Mitochondrienmembran und über eine membrangebundene Translation erreicht. Erste Hinweise auf eine Interaktion von Ribosomen mit der inneren Mitochondrienmembran ergaben elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* (Linnane *et al.*, 1973). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen der inneren Mitochondrienmembran und den Ribosomen Salz-abhängig ist (Obbink *et al.*, 1977; Spithill *et al.*, 1978; Van der Klei *et al.*, 1994; Liu und Spremulli, 2000b). Elektrostatische Kräfte zwischen der polaren Membranoberfläche und den geladenen Gruppen der Ribosomen sind mit großer Wahrscheinlichkeit für die Wechselwirkung

verantwortlich. Jedoch können, selbst in Gegenwart von Triton X-100, nicht alle Ribosomen von der Membran abgelöst werden, was darauf hindeutet, dass diese Assoziation über Interaktionen mit großen Komplexen in der Membran vermittelt wird (Liu und Spremulli, 2000b).

Zur Initiierung der Translation an der inneren Mitochondrienmembran werden membrangebundene Translationsaktivatoren benötigt. Mitochondriale mRNAs besitzen keine Cap-Struktur und keinen Poly-A-Schwanz (Christianson und Rabinowitz, 1983). Die 5'-untranslatierten Regionen von mRNAs variieren von 50 bis zu mehreren Hundert Nukleotiden (Dieckmann und Staples, 1994) und werden spezifisch von Aktivatoren erkannt (Fox, 1996). Die Translation von möglicherweise fast allen mitochondrialen mRNAs wird von spezifischen kernkodierten Aktivatoren reguliert. So ist zum Beispiel die Expression von *COXI* von Pet309 (Manthey und McEwen, 1995), *COXII* von Pet111 (Mulero und Fox, 1993a; Mulero und Fox, 1993b) und *COXIII* von Pet54, Pet122 und Pet494 (Costanzo und Fox, 1988; Brown *et al.*, 1994) abhängig. Die Translationsaktivatoren verstärken offenbar die Assoziation von Ribosomen mit der Membran. So interagiert die kleine Untereinheit des Ribosoms sowohl mit membrangebundenen Translationsaktivatoren (McMullin *et al.*, 1990; Haffter *et al.*, 1991; Haffter und Fox, 1992) als auch mit Bereichen in den 5'-untranslatierten Regionen der mRNAs (Green-Willms *et al.*, 1998). Des Weiteren beschränken sie wahrscheinlich die Proteinsynthese auf spezifische Regionen im Mitochondrium und definieren so die Assemblierungsstellen in der inneren Mitochondrienmembran (Naithani *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2004).

Die Membraninsertion, zum Beispiel von *CoxI*, *CoxII* und *CoxIII*, wird durch *Oxa1* vermittelt, welches homooligomere Komplexe in der inneren Mitochondrienmembran bildet (He und Fox, 1997; Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001; Nargang *et al.*, 2002; Herrmann und Neupert, 2003). *Oxa1* gehört zu einer großen konservierten Familie von Membranproteinen, die die Insertion von mitochondrial- und kernkodierten Proteinen in Membranen vermittelt (Stuart, 2002; Kuhn *et al.*, 2003). Der Verlust von *Oxa1* bewirkt zum Beispiel eine gestörte Insertion der mitochondrial kodierten Untereinheiten der Cytochromoxidase in die innere Mitochondrienmembran und in Folge dessen eine Akkumulation dieser Untereinheiten in der Matrix (Bonneyfoy *et al.*, 1994; Lemaire *et al.*, 2000). *CoxI*, *CoxII* und *CoxIII* interagieren mit *Oxa1* während ihrer Synthese und werden kotranslational in die innere Mitochondrienmembran inseriert. Die Koordination der Synthese und der Insertion der mitochondrialen Translations-

produkte wird durch die C-terminale Domäne von Oxa1 vermittelt. Diese Domäne bindet an mitochondriale Ribosomen und verbindet somit die mitochondriale Translationsmaschinerie mit dem Insertionskomplex in der inneren Mitochondrienmembran (Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003).

1.1.3 Assemblierung der Cytochromoxidase in der inneren Mitochondrienmembran

Die Assemblierung von Atmungskettenkomplexen ist nicht nur von der Synthese von mitochondrial kodierten, sondern auch der von kernkodierten Komponenten abhängig. Im Falle der Cytochromoxidase werden zwar die drei größten Untereinheiten CoxI, CoxII und CoxIII, welche das katalytische Zentrum des Enzyms ausbilden, mitochondrial translatiert, jedoch wird zusätzlich noch eine Vielzahl von kernkodierten Untereinheiten für die Assemblierung benötigt, welche im Cytosol synthetisiert und posttranslational in die Mitochondrien importiert werden. Der Import dieser Assemblierungsfaktoren wird durch Translokasen vermittelt (Rehling *et al.*, 2004). Mitochondriale Vorläuferproteine enthalten spezifische mitochondriale Signalsequenzen, welche von speziellen Rezeptorproteinen, die in der äußeren Membran lokalisiert sind, erkannt werden. Die Rezeptoren bilden zusammen mit der generellen Importpore einen 450 kDa großen Membrankomplex, den so genannten TOM-Komplex (für "translocase of the outer membrane") (Neupert, 1997; Koehler, 2004; Rehling *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2004). Der TOM-Komplex vermittelt neben dem Import von Proteinen in die innere Membran und in die Matrix auch die Insertion von Membranproteinen in die äußere Mitochondrienmembran. Dabei interagiert der Komplex mit einer weiteren Translokationsmaschinerie, die SAM genannt wurde (für "sorting and assembly machinery in the outer membrane") (Milenkovic *et al.*, 2004; Waizenegger *et al.*, 2004). Die innere Mitochondrienmembran beherbergt zwei Importkomplexe, den TIM23- und den TIM22-Komplex (für "translocase of the inner membrane"). Mitochondriale Vorläuferproteine mit einer abspaltbaren Signalsequenz werden über den TOM- und TIM23-Komplex in die innere Mitochondrienmembran bzw. in die Matrix importiert. Dabei werden die Vorläuferproteine nach ihrem Import durch den TOM-Komplex durch die TIM23-Komponente Tim50 erkannt und anschließend in den Tunnel, welcher von Tim23 gebildet wird, inseriert. Der Import ist vom Membranpotential ($\Delta\Psi$) als eine der

treibenden Kräfte abhängig. Der vollständige Import von Proteinen in die Matrix wird durch den PAM-Komplex (für "presequence translocase-associated motor") vermittelt. Dieser besteht aus mtHsp70, Tim44, Mge1, Pam18 und Pam16. mtHsp70 bindet während des Imports an die ungefalteten Vorläuferproteine und ermöglicht durch wiederholte ATP-abhängige Zyklen von aufeinander folgenden Bindungen an die Vorläuferproteine den Import (Neupert, 1997; Koehler, 2004; Rehling *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2004). Dies ist ein koordinierter Vorgang, der von den anderen Proteinen kontrolliert wird. Tim44 transferiert die Vorläuferproteine von Tim23 auf mtHsp70, wobei die Bindung von mtHsp70 an die Vorläuferproteine die Hydrolyse von ATP benötigt. Die ATPase-Aktivität von mtHsp70 wird stimuliert durch das Co-Chaperon Pam18, welches über Pam16 an den Tim23-Komplex gebunden ist (Frazier *et al.*, 2004; Kozany *et al.*, 2004). Des Weiteren vermittelt der Nukleotid-Austauschfaktor Mge1 den ADP/ATP-Austausch und bereitet somit den nächsten Zyklus vor. Transporterproteine mit mehreren Transmembrandomänen werden über den TIM22-Komplex in die innere Mitochondrienmembran inseriert. Dabei binden während des Imports die hydrophoben Segmente im Intermembranraum an Tim9-Tim10-Komplexe, die ein Zurückgleiten und Aggregieren verhindern. Anschließend erfolgt die Insertion über den TIM22-Komplex, welche ebenfalls abhängig von dem Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran ist (Koehler, 2004; Rehling *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2004).

Das folgende Beispiel der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe anhand der Cytochromoxidase macht deutlich, dass es sich hierbei um komplizierte Prozesse handelt, die eine exakte Koordination der Expression beider Genome voraussetzt. Bei CoxI handelt es sich um ein Membranprotein mit zwölf Transmembrandomänen, in denen zwei Häm A-Kofaktoren und zwei Kupfer-Ionen in einer Cu_B-Bindestelle eingebettet sind (Tsukihara *et al.*, 1996). Die Insertion dieser Gruppen erfolgt vermutlich kotranslational (Carr und Winge, 2003) und benötigt die Hilfe mehrerer kernkodierter Proteine. Die Herstellung der beiden Häm A-Kofaktoren aus Häm B-Kofaktoren erfolgt durch die Farnesyltransferase-Aktivität von Cox10 und Cox15 (Barros *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2002). Die Insertion der Kupfer-Ionen ist abhängig von Cox11 und Cox17, wobei Cox17 für den Transport der Ionen aus dem Cytosol ins Mitochondrium verantwortlich ist (Beers *et al.*, 1997). Der Transfer der Ionen von Cox17 auf CoxI wird anschließend durch Cox11 vermittelt (Horng *et al.*, 2004). Neu synthetisiertes CoxI wird dann von dem Chaperon Mss51 und von Cox14 gebunden,

wodurch dessen Aggregation verhindert wird (Perez-Martinez *et al.*, 2003). Für die Assemblierung spielt Shy1/Surf-1 eine wichtige Rolle, jedoch ist die genaue Funktion des Proteins noch unklar (Zhu *et al.*, 1998). CoxII wird nach der Synthese und Insertion in die Membran von dem Chaperon Cox20 gebunden (Hell *et al.*, 2000). Diese Bindung ist notwendig, damit CoxII von der Imp1-Protease prozessiert werden kann (Hell *et al.*, 2000). CoxII koordiniert ebenfalls zwei Kupfer-Ionen, die durch Cox17 und Sco1 auf CoxII transferiert werden (Horng *et al.*, 2004; Leary *et al.*, 2004). Die Assemblierung der kleinen Unterkomplexe zur reifen Cytochromoxidase ist noch nicht ganz geklärt. Es wird angenommen, dass CoxI mit dem kernkodierten Protein Cox4 assoziiert und so einen Sub-Komplex S2 bildet. Dieser bildet dann zusammen mit CoxII, CoxIII und anderen kernkodierten Proteinen einen S3-Komplex. Der vollständige Enzymkomplex setzt sich dann aus dem S3-Komplex und aus den Untereinheiten CoxVIa und CoxVIIa oder b zusammen (Herrmann und Funes, 2005; Horan *et al.*, 2005). Dabei interagiert das Membranprotein Pet100 mit diesen Komplexen und vermittelt die Assemblierung (Church *et al.*, 2005).

1.2 Mitochondriale Proteolyse

Die Assemblierung von mitochondrial- und kernkodierten Proteinen setzt ein hohes Maß an Koordination von cytosolischen und mitochondrialen Syntheseprozessen voraus. Daraus ergibt sich zwangsläufig die Notwendigkeit eines Qualitätskontrollsystems, da die korrekte Faltung und Assemblierung von Proteinen für deren Funktion und damit für die gesamte Zelle essentiell ist. Verschiedene zelluläre Ereignisse, wie zum Beispiel Mutationen, Hitzestress, oxidativer Stress oder Abwesenheit von notwendigen Bindungspartnern, führen zur Akkumulation missgefalteter und nicht assemblierter Proteine, die meist durch ATP-abhängige Proteasen abgebaut werden. Die Notwendigkeit eines Qualitätskontrollsystems für die Zelle zeigt sich auch darin, dass viele Krankheitsbilder mit missgefalteten Proteinen, Protein-Aggregaten und fehlerhafter Qualitätskontrolle in Verbindung gebracht werden (Dobson, 2004). Im Menschen führen solche Defekte häufig zu neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Erkrankung, dem Morbus Parkinson (Selkoe, 2001; Taylor *et al.*, 2002), dem Huntington-Syndrom (Orr und Zoghbi, 2000), Tauopathien (Taylor *et al.*, 2002), der hereditären spastischen Paraplegie (Casari *et al.*, 1998) sowie unterschiedlichen Ausbildungen von spongi-

formen Enzephalopathien, wie Kuru Kuru und der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (Dalsgaard, 2002). Die Mitochondrien besitzen als Organelle endosymbiontischen Ursprungs zum Abbau von missgefalteten Proteinen ein eigenes proteolytisches System, das in allen Eukaryonten konserviert ist. Neben Prozessierungspeptidasen, die für die proteolytische Spaltung der Signalsequenzen von importierten Vorstufenproteinen verantwortlich sind (Gakh *et al.*, 2002), enthalten Mitochondrien eine Reihe von ATP-abhängigen Proteasen, die bei der Qualitätskontrolle und Biogenese mitochondrialer Proteinkomplexe eine Rolle spielen (Nolden *et al.*, 2005a).

1.2.1 Proteasen und ATP-abhängige Proteolyse

Die ATP-abhängigen Proteasen im Mitochondrium können aufgrund von Sequenzhomologien in drei Klassen unterteilt werden: Lon-Proteasen, Clp-artige Proteasen und AAA-Proteasen (Ogura und Wilkinson, 2001; Frickey und Lupas, 2004). All diese Proteasen besitzen eine stark konservierte ATPase-Domäne, welche meistens aus 200 bis 250 Aminosäuren besteht und kennzeichnend für ATPasen der AAA⁺-Superfamilie (für "ATPase associated with a variety of cellular activities") ist (Neuwald *et al.*, 1999; Ogura und Wilkinson, 2001; Frickey und Lupas, 2004). Proteine der AAA⁺-Superfamilie sind an einer Reihe von zellulären Prozessen wie der Membranfusion (Rowe und Balch, 1997), der Biogenese von Organellen (Uchiyama und Kondo, 2005), der DNA-Replikation (Neuwald, 2005) und Rekombination (Yamada *et al.*, 2004), der Transkription, dem Zellzyklus, dem vesikulären Transport (Weber *et al.*, 1998) und der Signaltransduktion involviert. Sie besitzen außerdem Chaperon-artige Eigenschaften, die an der Entwindung der DNA, der Entfaltung und Translokation von Proteinen und der Zerlegung von Proteinkomplexen beteiligt sind (Confalonieri und Duguet, 1995; Beyer, 1997; Subramani, 1998; Sauer *et al.*, 2004).

Die ATPase-Domäne enthält zwei konservierte Motive: das Nukleotid-bindende Walker A (GXXXXGKS/T)- und das Magnesiumionen-bindende Walker B (vier hydrophobe Aminosäurereste gefolgt von DEXX)-Motiv, welche für die Aktivität der ATPase von besonderer Bedeutung sind (Walker *et al.*, 1982; Lupas *et al.*, 1997). Die ATPase-Domäne der AAA-Proteine enthält zusätzlich in ihrem C-terminalen Bereich eine Sequenz, die als "second region of homology" (SRH) bezeichnet wird (Beyer, 1997; Patel und Latterich, 1998; Ogura und Wilkinson, 2001). Röntgen-

kristallstrukturanalysen von verschiedenen AAA-Proteinen haben gezeigt, dass konservierte Arginin-Reste in diesem Sequenzbereich die Kontaktregion zwischen zwei Untereinheiten in oligomeren AAA-Komplexen bilden und essentiell für die ATP-Hydrolyse sind (Karata *et al.*, 1999; Karata *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2004). Übereinstimmend mit dieser intermolekularen katalytischen Funktion führt ein Austausch der Arginin-Reste zur Inaktivierung von bakteriellen und mitochondrialen AAA-Proteasen (Karata *et al.*, 1999; Karata *et al.*, 2001; Korbel *et al.*, 2004).

Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass verschiedene AAA⁺-Familien-Vertreter oligomere, häufig hexamere ringförmige Komplexe formen (Guenther *et al.*, 1997; Lenzen *et al.*, 1998; Bochtler *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000a; Wang *et al.*, 2001). Die Ausbildung solcher Mikrokompimente ermöglicht eine abgeschirmte Proteolyse (Lupas *et al.*, 1997). Dies konnte bereits für ClpP (Wang *et al.*, 1997), HslV (Groll *et al.*, 1997) und das 20S-Proteasom (Löwe *et al.*, 1995; Coux *et al.*, 1996; Hilt und Wolf, 1996) gezeigt werden. Bei diesen Proteasen ragen die proteolytisch aktiven Zentren ins Innere der Reaktionskammern. Neben der proteolytischen Aktivität besitzen einige Proteasen, wie die ATPase-Untereinheiten der Clp-Proteasen (Wickner *et al.*, 1994; Weber-Ban *et al.*, 1999) und die AAA-Domänen der *i*- und *m*-AAA-Protease in *S. cerevisiae* (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1999), auch eine den molekularen Chaperonen vergleichbare Funktion. Die Hydrolyse der Peptidbindung durch AAA-Proteasen ist ein ATP-unabhängiger Schritt. Die Energie aus der Hydrolyse von ATP wird zur Bindung des Substrates und für Konformationsänderungen während der Entfaltung des Substrates benötigt (Neuwald *et al.*, 1999). Wie am Beispiel der Clp-Proteasen gezeigt werden konnte, ist die zur Denaturierung nötige ATP-Menge viermal geringer als die zur Translokation des Substrates in das Reaktionszentrum benötigte (Kenniston *et al.*, 2003). Durch den wiederholten Einsatz mehrerer ATP-Moleküle können auch stabilere Proteine abgebaut werden.

In den folgenden Abschnitten sollen die aufgrund von Sequenzhomologien identifizierten drei Klassen von AAA⁺-Proteasen aus Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien näher vorgestellt werden.

1.2.2 Lon-Proteasen

Die Lon-Proteasen bilden eine stark konservierte Proteinfamilie mit Vertretern in Eubakterien, Archaeobakterien und eukaryontischen Zellen, wobei die Proteasen in eukaryontischen Zellen ausschließlich in der Matrix von Mitochondrien lokalisiert sind (Wang *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). Diese Proteasen formen höchstwahrscheinlich ringförmige, hexamere oder heptamere homooligomere Komplexe (Abb. 1) (Stahlberg *et al.*, 1999; Botos *et al.*, 2005). Sie sind der Gruppe der Serinproteasen zuzuordnen, die durch eine katalytische Serin-Lysin-Dyade gekennzeichnet ist (Botos *et al.*, 2004; Rotanova *et al.*, 2004). Lon-Proteasen bestehen aus drei funktionellen Domänen: einer variablen N-terminalen Domäne, einer stark konservierten AAA⁺-ATPase-Domäne und einer C-terminalen proteolytischen Domäne (Van Dijl *et al.*, 1998; Botos *et al.*, 2004). Die ATPase-Domäne besteht wiederum aus zwei strukturellen Sub-Domänen (Lupas und Martin, 2002): einer RecA-ähnlichen α/β -Domäne und einer α -Domäne, die höchstwahrscheinlich mit Substraten interagiert. Die ATP-Hydrolyse bewirkt eine Konformations- und Orientierungsänderung der Domänen. Diese mechanischen Bewegungen in der ATPase-Domäne sind die treibende Kraft für verschiedene Aufgaben, wie zum Beispiel Bindung und Entfaltung von Substraten, Translokation der Substrate zur proteolytischen Domäne und die koordinierte Aktivierung der funktionellen Domänen (Lupas *et al.*, 1997; Wickner *et al.*, 1999; Zwickl *et al.*, 2000; Maurizi und Li, 2001; Lupas und Martin, 2002). Neben dem Abbau von missgefalteten Proteinen haben Lon-ähnliche Proteasen noch andere Aufgaben in der Zelle. In *S. cerevisiae* ist die Lon-Protease PIM1 auch für die Aufrechterhaltung funktioneller mitochondrialer DNA und die Atmungskompetenz verantwortlich (Suzuki *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.*, 1994). Des Weiteren ist PIM1 an der Expression von mitochondrial kodierten Proteinen auf posttranskriptionaler Ebene beteiligt (Costanzo und Fox, 1990; Grivell, 1995; Van Dyck *et al.*, 1998; Van Dyck und Langer, 1999b). Die Rolle der proteolytischen Aktivität von PIM1 im mitochondrialen DNA-Metabolismus ist noch ungeklärt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Lon-Protease von *E. coli* einzel- und doppelsträngige DNA binden kann, was zu einer Stimulation der ATPase-Aktivität führt (Zehnbauser *et al.*, 1981; Chung und Goldberg, 1982; Charette *et al.*, 1984). Weiterhin haben andere Arbeiten gezeigt, dass die bakterielle und die murine Lon-Protease auch spezifisch an GT-reiche DNA-Sequenzen binden können (Fu *et al.*, 1997; Fu und Markovitz, 1998; Lu *et al.*, 2003).

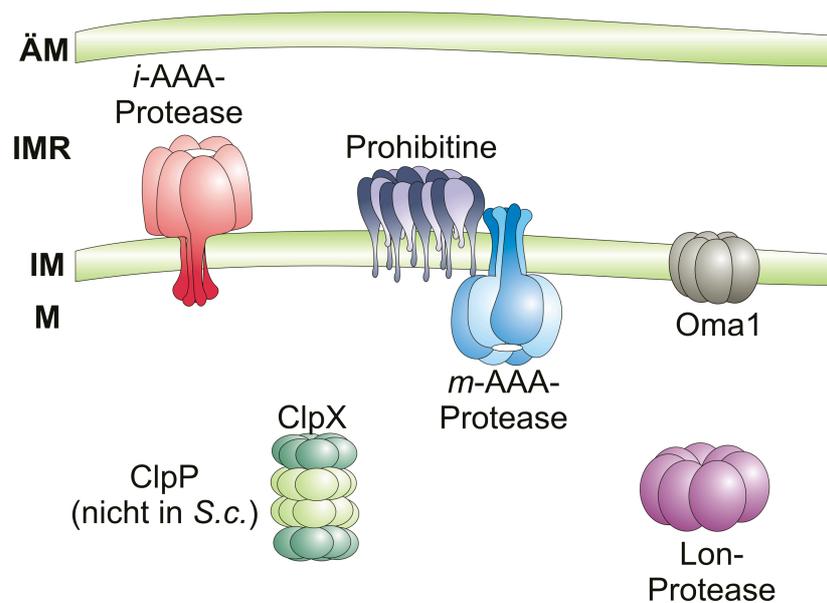


Abb. 1: Das mitochondriale Qualitätskontrollsystem. Die Lon-Protease ist ubiquitär in allen eukaryontischen Zellen vorhanden, im Gegensatz zu der Clp-Protease, die nicht in *S. cerevisiae* vorhanden ist. In der inneren Mitochondrienmembran sind die *i*-AAA- und die *m*-AAA-Protease lokalisiert. Die *m*-AAA-Protease bildet mit dem Prohibitin-Komplex einen Superkomplex von etwa 2 MDa. Bei Oma1 handelt es sich um eine konservierte ATP-unabhängige Metallopeptidase in der inneren Mitochondrienmembran. ÄM, äußere Mitochondrienmembran; IMR, Intermembranraum; IM, innere Mitochondrienmembran; M, Matrix.

1.2.3 Clp-Proteasen

In Bakterien werden fehlgefaltete Proteine neben der schon erwähnten Lon-Protease auch durch die so genannte Clp-Protease (Clp, für "Caseino-Lytic-Protease") abgebaut (Schirmer *et al.*, 1996). Hierbei handelt es sich um eine Zweikomponenten-Protease. Sie bildet eine große heterooligomere, Fass-ähnliche Struktur aus, welche sich aus regulatorischen ATPase-Untereinheiten und proteolytischen Untereinheiten zusammensetzt (Gottesman *et al.*, 1990; Maurizi, 1992; Gottesman *et al.*, 1997; Gottesman, 1999). Die Komplexe bestehen meistens aus ein oder zwei homooligomeren hexameren Ringen aus ATPase-Untereinheiten und aus einem homooligomeren heptameren Doppelring aus proteolytischen ClpP Untereinheiten (Abb. 1) (Horwich *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2002; Sauer *et al.*, 2004). Die regulatorischen ATPase-Untereinheiten vermitteln die Entfaltung von Substratproteinen und sorgen für die Substratspezifität (Weber-Ban *et al.*, 1999). Neben der ursprünglich identifizierten ATPase-Untereinheit ClpA konnten inzwischen noch ClpX und ClpY (HslU) als zusätzliche ATPase-Untereinheiten identifiziert werden (Schmidt *et al.*, 1999). Sie sind auch in der Lage, homooligomere hexamere Ringe auszubilden, was dazu führt, dass in der Zelle mehrere ATP-abhängige Clp-Proteasen, wie ClpAP,

ClpXP und ClpQY (HslUV), vorliegen (Bochtler *et al.*, 1997; Porankiewicz *et al.*, 1999; Bochtler *et al.*, 2000; Glover und Tkach, 2001; Wang *et al.*, 2001; Song und Eck, 2003).

Chloroplasten höherer Pflanzen besitzen ebenfalls eine zu ClpP homologe Untereinheit, die mit ClpC, einer ATP-bindenden Komponente, interagiert (Adam, 2000). Interessanterweise konnten nicht in allen Mitochondrien eukaryontischer Zellen ClpP-Homologe identifiziert werden. Im Gegensatz dazu besitzen jedoch alle Mitochondrien ClpX-ähnliche ATPase Untereinheiten (Corydon *et al.*, 1998; Van Dyck *et al.*, 1998a; Halperin *et al.*, 2001). Die im Menschen gefundenen Untereinheiten ClpX und ClpP bilden auch proteolytisch aktive Ringkomplexe aus (Coates *et al.*, 1997; Corydon *et al.*, 1998; Corydon *et al.*, 2000), wobei ClpX hier ebenfalls die Substratspezifität vermittelt (Kang *et al.*, 2002). Eine Casein abbauende ClpXP-Protease konnte des Weiteren in pflanzlichen Mitochondrien nachgewiesen werden (Halperin *et al.*, 2001). In Mitochondrien aus *S. cerevisiae* konnten bisher nur ATPase-Untereinheiten der ClpB- und der ClpX-Familie identifiziert werden (Leonhardt *et al.*, 1993; Van Dyck *et al.*, 1998a), jedoch keine proteolytische ClpP-Untereinheit. Das ClpB-Homolog Hsp78 ist hierbei für die Thermotoleranz der Mitochondrien und für den effizienten Abbau von mitochondrialen Matrixproteinen in Zusammenarbeit mit der Lon-Protease verantwortlich (Schmitt *et al.*, 1996; Germaniuk *et al.*, 2002; Rottgers *et al.*, 2002).

1.2.4 AAA-Proteasen

AAA-Proteasen bilden eine hoch konservierte Klasse membranständiger, ATP-abhängiger Metallopeptidasen der Thermolysin-Familie (Rawlings und Barrett, 1995). Vertreter dieser Klasse wurden in Membranen von Eubakterien, Chloroplasten und Mitochondrien gefunden, jedoch nicht in Archaeobakterien (Juhola *et al.*, 2000; Langer, 2000; Ruepp *et al.*, 2000). Bei den zentralen Komponenten des Qualitätskontrollsystems in der inneren Mitochondrienmembran handelt es sich um zwei AAA-Proteasen, die homolog zur bakteriellen AAA-Protease FtsH sind (Langer, 2000). Die Untereinheiten dieser oligomeren Proteasen besitzen eine konservierte AAA-Domäne mit den für diese Klasse der AAA⁺-Superfamilie typischen Walker A- und Walker B-Motiven, die für die Nukleotidbindung und Hydrolyse verantwortlich sind, und die "second region of homology" (SRH) (Abb. 2) (Neuwald *et al.*, 1999; Ogura

und Wilkinson, 2001; Lupas und Martin, 2002; Frickey und Lupas, 2004; Iyer *et al.*, 2004).

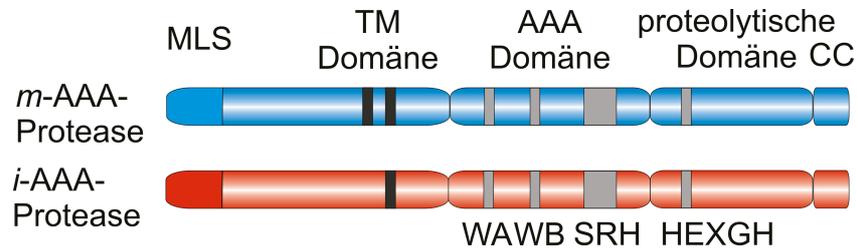


Abb. 2: Domänenstruktur der mitochondrialen *i*- und *m*-AAA-Protease. MLS, mitochondriale Lokalisierungssequenz; TM, Transmembran-Domäne; AAA, ATPase-Domäne; WA, Walker A-Box; WB, Walker B-Box; SRH, "second region of homology"; HEXGH, konservierte Metallbindestelle des proteolytischen Zentrums; CC, "coiled-coil"-Region.

Neben der AAA-Domäne besitzen diese Proteasen eine proteolytische Domäne mit der für Zink-abhängige Metallopeptidasen typischen HEXXH Sequenz (Nolden *et al.*, 2005a). Diese Sequenz bildet das aktive Zentrum der Protease. Das Zink-Ion wird über Histidine koordiniert, während die Glutaminsäure ein Wasser-Molekül aktiviert und auf diese Weise einen nukleophilen Angriff auf eine Peptidbindung ermöglicht (Vallee und Auld, 1990; Hooper, 1994; Mock und Stanford, 1996). Am C-Terminus befindet sich eine helikale, Coiled-Coil Leucin-Zipper-Struktur, die für die Funktion von FtsH in *Escherichia coli* essentiell ist (Shotland *et al.*, 2000).

In den Mitochondrien von Hefe, *Neurospora crassa* und Mensch wurden zwei AAA-Proteasen identifiziert. Aufgrund ihrer verschiedenen Topologien wurden sie als *i*- oder *m*-AAA-Protease bezeichnet. Die *m*-AAA-Protease exponiert ihr katalytisches Zentrum zur Matrixseite, die *i*-AAA-Protease zum Intermembranraum (Abb. 1). Die *m*-AAA-Protease ist in Hefe aus den Untereinheiten Yta10 (Afg3) und Yta12 (Rca1) zusammengesetzt (Arlt *et al.*, 1996), die menschliche *m*-AAA-Protease aus Afg3l2 und Paraplegin (Atorino *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der *m*-AAA-Protease aus *N. crassa* möglicherweise um ein Homooligomer, da bisher nur MAP-1 als einzige Komponente identifiziert wurde (Klanner *et al.*, 2001). Die *i*-AAA-Protease setzt sich sowohl in der Hefe (Leonhard *et al.*, 1996) als auch im Menschen (Shah *et al.*, 2000) ausschließlich aus Yme1- bzw. aus Yme1L1-Untereinheiten zusammen. Im Gegensatz zu den Untereinheiten der *m*-AAA-Protease, die zwei Transmembrandomänen besitzen, weist die der *i*-AAA-Protease nur eine Transmembrandomäne auf (Pajic *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1996). Die

i- und *m*-AAA-Proteasen bilden in der inneren Mitochondrienmembran, wie andere Energie-abhängige Proteasen, hochmolekulare Komplexe von etwa 1 MDa (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1996). Es ist bisher jedoch nichts über die stöchiometrische Zusammensetzung der Protease-Untereinheiten bekannt. Aufgrund von Röntgenkristallstruktur-Vergleichen anderer AAA-Proteine wird eine hexamere Ringstruktur angenommen (Lenzen *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Übereinstimmend mit diesen Strukturen konnte auch die AAA-Domäne von Yme1 auf Basis von p97 in eine hexamere Ringstruktur modelliert werden (Nolden *et al.*, 2005a). Die *m*-AAA-Protease wurde als Bestandteil eines 2 MDa großen Superkomplexes mit Prohibitinen in der inneren Mitochondrienmembran identifiziert (Steglich *et al.*, 1999; Nijtmans *et al.*, 2000; Artal-Sanz *et al.*, 2003). Der etwa 1,2 MDa große Prohibitin-Komplex, bestehend aus Prohibitin 1 und Prohibitin 2, hat einen negativen Einfluss auf die Proteolyse von nicht-assemblierten Membranproteinen durch die *m*-AAA-Protease (Steglich *et al.*, 1999), ähnlich wie HflK und HflC bei der bakteriellen AAA-Protease FtsH (Kihara *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 1998; Saikawa *et al.*, 2004). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an isolierten Prohibitin-Komplexen ergaben, dass Prohibitine Ringstrukturen mit äußeren Abmessungen von ~270 Å x 200 Å ausbilden können (Tatsuta *et al.*, 2005a).

1.2.5 Die Rolle der AAA-Proteasen im Mitochondrium

Die *i*- und *m*-AAA-Protease sind die Hauptbestandteile des Qualitätskontrollsystems in der inneren Mitochondrienmembran. Sie sind in der Lage, missgefaltete oder nicht-assemblierte Polypeptidketten abzubauen und verhindern damit deren Akkumulation. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine große Anzahl von nicht-assemblierten Proteinen der inneren Mitochondrienmembran von *S. cerevisiae* durch AAA-Proteasen abgebaut wird. Die mitochondrial kodierten Atmungskettenuntereinheiten CoxI, CoxIII und Cob sowie die F₀-Untereinheiten 6, 8 und 9 der ATP-Synthase sind Substrate der *m*-AAA-Protease (Pajic *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1996; Guélin *et al.*, 1996). Substrate der *i*-AAA-Protease sind nicht assembliertes CoxII (Nakai *et al.*, 1994; Nakai *et al.*, 1995; Pearce und Sherman, 1995), Yme2 (Leonhard *et al.*, 2000), Phb1 (Kambacheld *et al.*, 2005) und die kürzlich identifizierte NADH-Dehydrogenase (Nde1) (Augustin *et al.*, 2005). AAA-Proteasen sind jedoch nicht nur Teil des Qualitätskontrollsystems in der inneren Mitochondrienmembran, sondern auch noch

für andere Prozesse im Mitochondrium notwendig. *m*-AAA-Protease-defiziente Hefestämme sind nicht in der Lage, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen (Guélin *et al.*, 1994; Tauer *et al.*, 1994; Tzagoloff *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1998). Die Protease ist während der Biogenese von Atmungskettenkomponenten von großer Bedeutung. So wird die Expression von zwei Atmungskettenkomponenten, Cytochromoxidase 1 (CoxI) und Cytochrom *b* (Cob), von der *m*-AAA-Protease kontrolliert (Arlt *et al.*, 1998). Beide vom mitochondrialen Genom kodierten Gene (Burger *et al.*, 2003) enthalten Introns, die abhängig von der *m*-AAA-Protease gespleißt werden (Arlt *et al.*, 1998). Des Weiteren führt ein Defekt in der *m*-AAA-Protease zu einem posttranslationalen Assemblierungsdefekt von Atmungskettenkomplexen und der F₁F₀-ATP-Synthase (Paul und Tzagoloff, 1995; Arlt *et al.*, 1998; Galluhn und Langer, 2004). In Säugetieren konnten bisher drei Proteine (Afg3L1, Afg3L2 und Paraplegin) identifiziert werden, die homolog zu den *m*-AAA-Proteasen-Untereinheiten sind (Casari *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 1998; Banfi *et al.*, 1999; Kremmidiotis *et al.*, 2001). Die humane *m*-AAA-Protease besteht aus den Untereinheiten Afg3L2 und Paraplegin (Atorino *et al.*, 2003) und spielt offenbar eine wichtige Rolle während der mitochondrialen Biogenese. So führt der Verlust von Paraplegin im Menschen zu einer autosomal rezessiven Form der spastischen Paraplegie (Casari *et al.*, 1998; Casari und Rugarli, 2001). Diese Krankheit tritt mit einer Häufigkeit von 1:10.000 in der westlichen Bevölkerung auf (Polo *et al.*, 1993) und zeichnet sich durch eine zunehmende Schwäche und Spastizität der unteren Extremitäten aus (Harding, 1981; Fink, 1997; Reid, 1997). Ursache dafür ist eine axonale Degeneration von motorischen und sensorischen Neuronen des cortico-spinalen Traktes, dessen Axone die längsten des zentralen Nervensystems sind (Schwarz und Liu, 1956; Harding, 1984; Deluca *et al.*, 2004). Paraplegin-defiziente Mäuse zeigen darüber hinaus eine distale Axonopathie der spinalen und peripheren Axone, die sich durch ein Anschwellen und den Abbau der Axone auszeichnet (Ferreirinha *et al.*, 2004). Lange bevor diese Defekte auftreten, sind jedoch schon mitochondriale Morphologiedefekte in den synaptischen Enden und in den distalen Regionen der Axone zu beobachten (Ferreirinha *et al.*, 2004). Das Anschwellen der Axone wird durch eine massive Akkumulation von Organellen und Neurofilamenten bewirkt und lässt auf eine Beeinträchtigung des anterograden axonalen Transports schließen. Inzwischen konnten 20 genetische Loci identifiziert werden, die eine hereditäre spastische Paraplegie hervorrufen. Bei Zwei dieser Gene handelt es sich

um Komponenten des mitochondrialen Qualitätskontrollsystems; andere wiederum sind für den zellulären Transport verantwortlich (Bross *et al.*, 2004).

Die *i*-AAA-Protease-Untereinheit Yme1 wurde ursprünglich in einem genetischen "Screen" für Hefemutanten identifiziert, die einen erhöhten Transfer von mitochondrialer DNA aus dem Mitochondrium zum Kern besitzen (Thorsness und Fox, 1993a). Die Deletion von *YME1* führt bei hohen Temperaturen (37°C) zu einem Verlust der Atmungskompetenz (Thorsness *et al.*, 1993b). Ebenso führt die Inaktivierung von IAP-1, die *i*-AAA-Protease-Untereinheit von *N. crassa*, bei hohen Temperaturen zum Verlust der Atmungskompetenz, was auf eine konservierte Funktion der Protease hinweist (Klanner *et al.*, 2001). Die *i*-AAA-Protease ist außerdem für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie wichtig (Campbell *et al.*, 1994). Die gleichzeitige Inaktivierung der *i*- und *m*-AAA-Protease führt zu einem letalen Phänotyp, was auf eine überlappende Substratspezifität beider Proteasen hinweist (Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000). Der Grund dafür könnte der gestörte Abbau von regulatorischen Proteinen oder die Anhäufung fehlgefalteter oder nicht assemblierter Proteine sein (Nolden *et al.*, 2005a). Die molekularen Grundlagen der beobachteten Phänotypen können jedoch bisher nicht erklärt werden, da weder Proteinaggregate noch die Akkumulation kurzlebiger Regulatorproteine in Protease-defizienten Zellen nachgewiesen werden konnten.

1.3 Proteolyse in der inneren Mitochondrienmembran

Nach derzeitigen Modellvorstellungen werden Proteine durch ATP-abhängige Proteasen vollständig zu Peptiden abgebaut, die dann wiederum durch Oligopeptidasen in Aminosäuren zerlegt werden (Kuzela und Goldberg, 1994; Wenzel *et al.*, 1994; Kisselev *et al.*, 1998). Die *i*- und *m*-AAA-Proteasen besitzen Chaperon-ähnliche Eigenschaften und sind in der Lage, zwischen gefalteten und ungefalteten Domänen zu unterscheiden (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1999). Die ATPase-Domäne agiert dabei als ein Faltungssensor und stellt die Spezifität der Proteolyse sicher. Für die Bindung und Proteolyse von Substraten benötigen beide AAA-Proteasen mindestens 20 Aminosäuren, die aus der Membran ragen (Leonhard *et al.*, 2000). Übereinstimmend mit diesen Daten kann FtsH ebenfalls nur Proteine abbauen, wenn sie mindestens 20 Aminosäuren außerhalb der Membran exponieren (Chiba *et al.*, 2000). Je nach Topologie der entfalteten Domäne des Substrates

werden diese entweder von der *i*- oder der *m*-AAA-Protease abgebaut (Leonhard *et al.*, 1999; Leonhard *et al.*, 2000). Ein Substrat kann jedoch nur abgebaut werden, wenn die Domänen auf beiden Seiten der Membran entfaltet sind (Leonhard *et al.*, 2000). Über den Abbau von Membranproteinen mit mehreren Transmembrandomänen ist dagegen wenig bekannt. Eine Punktmutation in dem Protein Oxa1, welches fünf Transmembrandomänen und je eine gefaltete Domäne am N- und C-Terminus besitzt, bewirkt, dass dieses Protein von der *m*-AAA-Protease erkannt und abgebaut wird, obwohl die Punktmutation (Oxa1^{ts}) in einer Schleife im Intermembranraum vorliegt (Käser *et al.*, 2003). Möglicherweise führt die Mutation zu einer Konformationsänderung, die sich auf die in der Matrix lokalisierten Schleifen ausweitet. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die AAA-Proteasen auch Schleifenstrukturen erkennen können. In Abwesenheit der *m*-AAA-Protease kann Oxa1^{ts} jedoch von der ATP-unabhängigen Metallopeptidase Oma1 abgebaut werden (Abb. 1). Der Abbau von Oxa1^{ts} durch Oma1 ist allerdings nicht vollständig und führt zur Akkumulation von Abbaufragmenten im Mitochondrium (Käser *et al.*, 2003). Interessanterweise wird Oxa1^{ts} auch in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease und Oma1 abgebaut, was auf eine weitere Peptidase in der inneren Mitochondrienmembran hinweist (Käser *et al.*, 2003).

Ein weiteres Substrat der *m*-AAA-Protease ist die Cytochrom *c* Peroxidase 1 (Ccp1), ein kernkodierte, lösliches Hämprotein, das im mitochondrialen Intermembranraum von *S. cerevisiae* lokalisiert ist (Kaput *et al.*, 1989). Es ist an der Zerstörung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt, indem es die Peroxid-abhängige Oxidation von Cytochrom *c* katalysiert (Edwards *et al.*, 1988). Hierbei handelt es sich jedoch nicht um ein klassisches Substrat im Sinn der Qualitätskontrolle. Ungewöhnlicherweise wird Ccp1 von der *m*-AAA-Protease nicht vollständig abgebaut, sondern nur prozessiert. Das Protein enthält eine zweiteilige, 68 Aminosäuren lange, N-terminale mitochondriale Importsequenz (Maccacchini *et al.*, 1979; Kaput *et al.*, 1982; Kaput *et al.*, 1989), die in zwei Schritten proteolytisch abgespalten wird (Gasser *et al.*, 1982). In einem ersten essentiellen Schritt wird die Vorläuferform von Ccp1 von der *m*-AAA-Protease, deren katalytisches Zentrum in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist, prozessiert (Esser *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass die *m*-AAA-Protease die Transmembrandomäne von Ccp1 weiter in die Matrix transloziert und entfernt. Im Anschluss daran wird die intermediäre Form in einem zweiten Schritt durch die Rhomboid-ähnliche Peptidase Pcp1 prozessiert (Esser *et al.*, 2002; McQuibban *et*

al., 2003; Michaelis *et al.*, 2005), bei der das katalytische Zentrum in der inneren Mitochondrienmembran liegt (Esser *et al.*, 2002). Dies führt zur Freisetzung von reifem Ccp1 als lösliches Protein in den mitochondrialen Intermembranraum. Bei der Reifung von Ccp1 durch die *m*-AAA-Protease handelt es sich um das bisher einzige Beispiel einer regulierten Prozessierung durch die *m*-AAA-Protease. Es ist jedoch noch völlig unklar, warum die *m*-AAA-Protease Ccp1 nur prozessiert und nicht vollständig zu Peptiden abbaut. Mögliche Hinweise auf den molekularen Mechanismus könnten sich aus den Vergleichen mit anderen ATP-abhängigen Proteasen ergeben, bei denen die Proteasen ebenfalls in die Prozessierung und Aktivierung von Substraten involviert sind.

1.4 Regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung

Das 26S-Proteasom, das sich aus einem proteolytisch aktiven 20S-Kern-Partikel und einem regulatorischen 19S-Partikel zusammensetzt, ist für den Abbau der meisten zellulären Proteine in Eukaryonten verantwortlich (Voges *et al.*, 1999; Zwickl *et al.*, 2000; Glickman und Ciechanover, 2002; Pines und Lindon, 2005). Ähnlich wie die beschriebenen Clp- und Lon-Proteasen bildet das Proteasom einen Hohlzylinder, in dem eine abgeschirmte Proteolyse erfolgen kann (Baumeister und Lupas, 1997; Baumeister *et al.*, 1998; Voges *et al.*, 1999). Proteine, die durch das Proteasom abgebaut werden, sind in der Regel mit mehreren Ubiquitin-Molekülen markiert worden. Bei Ubiquitin handelt es sich um ein stark konserviertes, 76 Aminosäuren großes Protein. In einem ersten ATP-abhängigen Schritt wird Ubiquitin über die Carboxylgruppe mittels Thioester-Bindung an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) gebunden. Ubiquitin wird danach auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Letztendlich transferiert eine Ubiquitin-Ligase (E3), durch die Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins des Substrates, Ubiquitin von dem E2-Enzym auf das Substratprotein (Glickman und Raveh, 2005; Miller und Gordon, 2005). Die Substratspezifität wird dabei hauptsächlich durch verschiedene E3-Enzyme vermittelt (Weissman, 2001). In einem weiteren Schritt sorgt ein E4-Enzym für eine effiziente Multi-Ubiquitinierung von Substraten (Koegl *et al.*, 1999), die von dem regulatorischen 19S-Komplex erkannt werden können. Nach der Entfaltung wird das Protein in die proteolytische Kammer des 20S-Komplexes eingeführt und vollständig in kleine

Peptide von vier bis zehn Aminosäuren abgebaut, während Ubiquitin "recycelt" wird (Ciechanover, 1994; Varshavsky, 1997; Swaminathan *et al.*, 1999; Wickner *et al.*, 1999; Hartmann-Petersen *et al.*, 2003; Hartmann-Petersen und Gordon, 2004; Miller und Gordon, 2005).

Normalerweise werden bei diesem Vorgang die Proteine vollständig zu kleinen Peptiden abgebaut. In einigen Fällen baut das Proteasom nur spezielle Proteinsegmente ab, was zu einer Prozessierung und in Folge dessen zu einer veränderten Funktion der Proteine führt. Dieser Prozess wird auch als *regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung (RUP)* bezeichnet. In den beiden folgenden Kapiteln werden zwei Beispiele beschrieben, bei denen das 26S-Proteasom in die Prozessierung und Aktivierung von Substraten involviert ist.

1.4.1 Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems im NF- κ B-Signalweg

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (für "nuclear factor kappa enhancer binding protein") kontrolliert verschiedene Prozesse wie Immunität, Zellteilung, Entzündungen und Apoptose (Viatour *et al.*, 2005). Die Ubiquitinierung verschiedener Proteine spielt dabei in mindestens drei Schritten des NF- κ B-Signalwegs eine wichtige Rolle. Neben dem Ubiquitin/Proteasom-abhängigen Abbau von I- κ B, einem Inhibitor von NF- κ B, (Karin und Ben-Neriah, 2000) und der Ubiquitin-abhängigen Aktivierung der I κ B Kinase (IKK) durch einen Abbau-unabhängigen Mechanismus (Chen *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001) findet außerdem eine regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung von Vorläuferproteinen statt. Bei NF- κ B handelt es sich um einen dimeren Transkriptionsfaktor. Der Faktor setzt sich aus einem Vertreter der REL-Familie (Li und Verma, 2002) und p50 bzw. p52 zusammen. Die Proteine p50 bzw. p52 entstehen durch Prozessierung bzw. unvollständigen Abbau der Vorläuferproteine p105 bzw. p100 durch das Proteasom (Rape und Jentsch, 2004). Die ubiquitinierten Substrate werden vom Proteasom rekrutiert und dabei wird eine interne unstrukturierte, Glycin-reiche Region als Haarnadelstruktur in die proteolytische Kammer des Proteasoms inseriert (Lin und Ghosh, 1996). Mit Hilfe von Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass die Öffnung des Hefe-Proteasoms einen Durchmesser von etwa 13 Å besitzt und damit ausreichend groß ist, um eine Haarnadelstruktur zu inserieren (Groll *et al.*, 1997). Die Proteolyse beginnt an der Haarnadelstruktur und setzt sich zum N- und C-Terminus fort. Viele gefaltete

Domänen können durch das Proteasom entfaltet und vollständig abgebaut werden. In diesem Fall kann die N-terminale p52-Domäne aufgrund sehr starker Faltung nicht abgebaut werden (Lin und Kobayashi, 2003), im Gegensatz zur C-terminalen inhibitorischen Domäne, die vollständig abgebaut wird (Abb. 3). Der aktivierte dimere Transkriptionsfaktor (REL+p52) ist dann in der Lage, im Kern NF- κ B-Zielgene zu aktivieren.

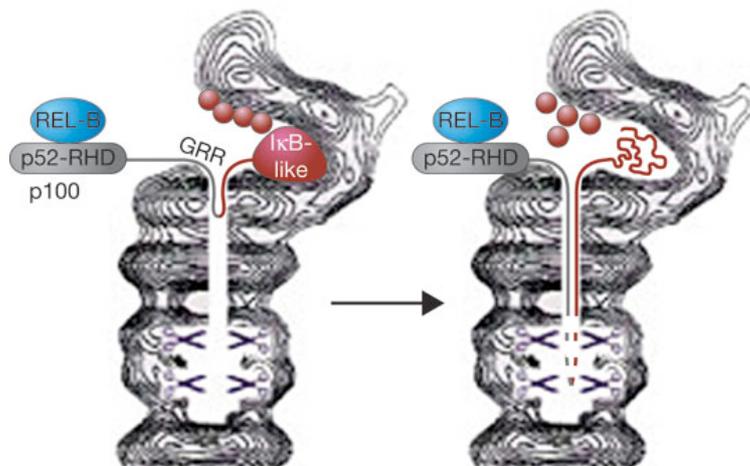


Abb. 3: Modell für eine regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung von p100. Erklärung siehe Text. GRR, flexible Glycin-reiche Region. Entnommen aus Chen *et al.*, 2005.

1.4.2 Regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung von Spt23

Der Transkriptionsfaktor Spt23 wird in der Hefe, ähnlich wie NF- κ B, durch das Proteasom prozessiert. Jedoch handelt es sich hierbei um einen membranständigen Transkriptionsfaktor, welcher die zelluläre Konzentration des Enzyms Ole1 reguliert. Dieses Enzym ist an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und katalysiert als Fettsäure-Desaturase die Herstellung von einfach ungesättigten Fettsäuren in der Hefe (Black *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2002). Die Vorläuferform von Spt23, auch p120 genannt, ist über einen C-terminalen Transmembrananker mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums verbunden und in der Lage, Homodimere auszubilden (Hoppe *et al.*, 2000; Rape *et al.*, 2001). In Folge einer Mono-Ubiquitinierung wird eine Spt23-Untereinheit durch das 26S-Proteasom proteolytisch gespalten (Rape *et al.*, 2001). Die prozessierte Spt23-Untereinheit (p90) wird anschließend mit Hilfe des CDC48^{USD1/NPL4}-Komplexes von der nicht prozessierten

p120-Untereinheit freigesetzt (Rape *et al.*, 2001). Freigesetztes p90 gelangt dann in den Kern und reguliert die Transkription von *OLE1*. Auch in diesem Fall wird davon ausgegangen, dass eine stabile Tertiärstruktur den vollständigen Abbau von Spt23 durch das Proteasom verhindert. Zusätzlich wird vermutet, dass die Dimerisierung von Spt23 eine weitere Stabilisierung und somit einen weiteren Schutz der p90-Domäne bewirkt (Rape und Jentsch, 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die mitochondriale Biogenese wird von verschiedenen ATP-abhängigen Proteasen reguliert, die im Mitochondrium nicht-native mitochondriale Proteine abbauen und möglicherweise wichtige Schritte während der Organellbiogenese regulieren. Der Verlust der ATP-abhängigen *m*-AAA-Protease führt sowohl in der Hefe als auch im Menschen zu schweren Defekten, die auf molekularer Ebene jedoch nicht mit einer gestörten Proteolyse der schon bekannten Substrate erklärt werden können. Es wird vermutet, dass diese Phänotypen auf einer gestörten Proteolyse von bisher unbekanntem kurzlebigen Regulatorproteinen beruhen. Für das Verständnis der Proteasefunktion und möglicherweise des pathogenen Mechanismus der Krankheit (hereditäre spastische Paraplegie) ist es daher wichtig, diese Regulatorproteine zu identifizieren.

Aus diesem Grund sollten neue Substrate der *m*-AAA Protease in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden. In einem ersten Ansatz sollten die mitochondrialen Proteome von Wildtyp und *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen mit Hilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese verglichen werden. Mögliche Substrate sollten in *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen nicht abgebaut werden und somit in den Mitochondrien akkumulieren bzw. im Falle einer gestörten Prozessierung zu einem veränderten Proteinmuster führen. In einem zweiten Ansatz sollte eine proteolytisch inaktive Variante der *m*-AAA-Protease mit möglichen interagierenden Substraten über eine Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dabei sollte die Inaktivierung der Protease zu einer Anreicherung von Substraten an der Protease führen, die sonst sogleich von der Protease abgebaut und als Peptide freigesetzt werden. Weitere Experimente sollten die Funktion dieser identifizierten Substrate und damit die Rolle der *m*-AAA-Protease in den Mitochondrien näher charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Klonierungen

2.1.1 *In vitro* Transkriptions-/Translations-Plasmide

MrpL32 (1-183) aus *S. cerevisiae* wurde unter der Kontrolle des Sp6-Promotors *in vitro* exprimiert. Dazu wurde *MRPL32* unter Verwendung der Primer-Oligonukleotide TL1490 und 1491 von genomischer DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und in den Vektor pCRII-TOPO (Invitrogen) kloniert. Das *MRPL32*-Fragment (72-183) wurde mit den Oligonukleotiden TL2317 und 2318 von dem Plasmid pCRII-TOPO-MrpL32 (1-183) amplifiziert und in die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* des Vektors pGEM4 (Promega) kloniert. Zur Expression der MrpL32-DHFR-Fusionskonstrukte wurden verschiedene Fragmente von *MRPL32* mittels PCR amplifiziert (1-71, TL1786 und 1887; 1-77, TL1786 und 2588; 1-90, TL1786 und 1789; 1-183, TL1786 und 1792). Als Matrize diente das Plasmid pCRII-TOPO-MrpL32 (1-183). Die PCR-Fragmente wurden anschließend in die *EcoRI*- und *BamHI*-Schnittstellen des Vektors pGEM4-DHFR (Vestweber und Schatz, 1988) kloniert. Alle Vorwärts-Oligonukleotide enthielten zusätzlich eine Kozak-Konsensussequenz (Kozak, 1987), um eine effiziente Translation zu erzielen. Die Plasmide pGEM4-mMrpL32 zur *in vitro* Expression von murinem MrpL32 (Nolden *et al.*, 2005b) und pGEM4-Su9-DHFR (Stan *et al.*, 2000) wurden schon vorher beschrieben.

2.1.2 Expressionsplasmide

Das Plasmid YCplac22^{ADH1}-Yta10^{E559Q/HIS} wurde aus dem Plasmid YCplac22^{ADH1}-Yta10^{E559Q} (Arlt *et al.*, 1998) erzeugt. Letzteres diente als Matrize für eine PCR unter Verwendung der Oligonukleotide TL1370 und 1371. Dazu wurde ein YTA10^{E559Q}-Fragment (1.010-2.316 Basenpaare) amplifiziert, welches für den C-terminalen Bereich von Yta10 kodiert. Der Primer TL1371 fügte zusätzlich die Information für eine sechs Histidine umfassende Peptidsequenz am C-Terminus ein. Das Fragment wurde dann in die *MscI*- und *HindIII*-Schnittstellen des Vektors YCplac 22^{ADH1}-Yta10^{E559Q} kloniert.

Zur Expression von MrpL32 (1-183) unter der Kontrolle des endogenen Promotors wurde *MRPL32* inklusive 500 Basenpaare stromaufwärts vom Start-ATG mit Hilfe der

Oligonukleotide TL1706 und 1975 von genomischer DNA amplifiziert. Das daraus resultierende PCR-Fragment wurde anschließend in die *Xba*I- und *Hind*III-Schnittstellen des Vektors YCplac111 kloniert. Zur Überexpression des Hybridproteins Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) wurde *MrpL32* (72-183) mit den Oligonukleotiden TL1888 und 1890 amplifiziert. Das Plasmid pCRII-TOPO-MrpL32 (1-183) diente dabei als Matrize. Das PCR-Fragment wurde in die *Kpn*I- und *Xho*I-Schnittstellen des Vektors pVT100U^{ADH1}-Su9(1-69)-GFP (Westermann und Neupert, 2000) kloniert. Mit dieser Strategie wurde das *GFP*-Gen ("green fluorescent protein") durch die Information für MrpL32 (72-183) ersetzt und konnte somit als Fusionsprotein mit Su9 (1-69) überexprimiert werden.

Tab. 1: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz
TL1370	5' - TAAGACTCTCTTGGCCAAGGCCACCGC - 3'
TL1371	5' - GGGGGGAAGCTTTTAATGGTGATGGTGATGGTGATTTGTTGCTG CAGGTGCCTCAGGCG - 3'
TL1488	5' - TAACTATTTGGAACGTCGCGTTCGGACTTTAAAAAAGGACCGGAT CCCCGGGTTAATTAA - 3'
TL1489	5' - AAGTTTATTTAAAAAGGAAACCACTAGATGAAAGATGAGCGAATT CGAGCTCGTTTAAAC - 3'
TL1490	5' - CGCGGATCCCCACCATGAATTCTTTGATTTTTGGTAAAC - 3'
TL1491	5' - ACGCGTCGACCTAGTCCTTTTTTAAAGTCCGAAC - 3'
TL1552	5' - AATTCTTTGATTTTTGGTAAACAATTAGCATTTCACAAAACGGATC CCCGGGTTAATTAA - 3'
TL1553	5' - GTCCTTTTTTAAAGTCCGAACGCGACGTTCCAAATAGTTAGAATT CGAGCTCGTTTAAAC - 3'
TL1706	5' - TCTAGTCTAGAGCGAACGCGGTCTCCACA - 3'
TL1786	5' - CCGGAATTCCCACCATGAACTCTTTGATTTTTGGTAAACAA TTAG - 3'
TL1789	5' - CGCGGATCCTGGACCGTAAAGTTTTTGCC - 3'
TL1792	5' - CGCGGATCCGTCCTTTTTTAAAGTCCGAACGCGACGTT - 3'
TL1887	5' - CGCGGATCCTAGTAGAATACCATTATTAGAGAAAA - 3'
TL1888	5' - CCGGGGTACCGCAGTTCCTAAAAAAAAGTATC - 3'

TL1890	5' - CCCGCTCGAGCTAGTCCTTTTTTAAAGTCCGAACGCGACGTT - 3'
TL1975	5' - GGGAAGCTTCTAGTCCTTTTTTAAAGTCCGAACGCGACGT TCC - 3'
TL2317	5' - CCGGAATTCCCGCCATGGCAGTTCCTAAAAAAAAGTATCAC - 3'
TL2318	5' - CGCGGATCCCTAGTCCTTTTTTAAAGTCCGAACGCGACGTT - 3'
TL2588	5' - CGCGGATCCTTTTTTTTTAGGAACTGCTAGTAGAATACC

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Referenz
pCRII-TOPO	Invitrogen
pCRII-TOPO-MrpL32 (1-183)	diese Arbeit
pGEM4	Promega
pGEM4-MrpL32 (72-183)	diese Arbeit
pGEM4-DHFR	(Vestweber und Schatz, 1988)
pGEM4-MrpL32 (1-71)-DHFR	diese Arbeit
pGEM4-MrpL32 (1-77)-DHFR	diese Arbeit
pGEM4-MrpL32 (1-90)-DHFR	diese Arbeit
pGEM4-MrpL32 (1-183)-DHFR	diese Arbeit
pGEM4-mMrpL32	(Nolden <i>et al.</i> , 2005b)
pGEM4-Su9-DHFR	(Stan <i>et al.</i> , 2000)
pAG25	(Goldstein und McCusker, 1999)
pFA6a-GFP-kanMX6	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)
YCplac22 ^{ADH1} -Yta10 ^{E559Q}	(Arlt <i>et al.</i> , 1998)
YCplac22 ^{ADH1} -Yta10 ^{E559Q/HIS}	diese Arbeit
YCplac111 ^{ADH1} -Yta12 ^{E614Q}	diese Arbeit
YCplac111 ^{MRPL32} -MrpL32 (1-183)	diese Arbeit

pVT100U ^{ADH1} -Su9(1-69)-GFP	(Westermann und Neupert, 2000)
pVT100U ^{ADH1} -Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183)	diese Arbeit
YEplac181 ^{YTA10} -Yta10 (1-61)-Paraplegin (44-781)	(Nolden <i>et al.</i> , 2005b)
YEplac112 ^{YTA10} -Yta10 (1-61)-Afg3l2 (36-802)-HA	(Nolden <i>et al.</i> , 2005b)

2.2 Verwendete Hefestämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme sind Derivate von W303. Der Hefestamm *yta10*^{EQ/HIS}*yta12*^{EQ} (YMN101) wurde durch Transformation des Hefestammes $\Delta yta10 \Delta yta12$ (YHA301) (Arlt *et al.*, 1998) mit den Plasmiden YCplac22^{ADH1}-Yta10^{E559Q/HIS} und YCplac111^{ADH1}-Yta12^{E614Q} hergestellt. Die Hefestämme $\Delta yta10 \Delta yta12$ mit Expression von Yta10^{E559Q} und Yta12^{E614Q} (YGS302), $\Delta yta10$ (YGS101), *yta10*^{E559Q} (YHA103), *yta12*^{E614Q} (YHA203) (Arlt *et al.*, 1998), $\Delta yme1$ (Leonhard *et al.*, 1996) und $\Delta yta10 \Delta yta12$ mit Expression von murinem Afg3l2 und Paraplegin (YKO267) (Nolden *et al.*, 2005b) wurden bereits beschrieben. Die Stämme $\Delta mrp132$ (YMN201) oder $\Delta yta12$ (YSW1) (Nolden *et al.*, 2005b) wurden durch Deletion der Gene *MRPL32* oder *YTA12* in W303 oder W303-1A hergestellt. Dazu wurden die entsprechenden Gene über homologe Rekombination durch eine Selektionsmarker kodierende Kasette ersetzt, welche mit Hilfe der PCR erstellt wurde (Longtine *et al.*, 1998; Goldstein und McCusker, 1999). Im Falle von *MRPL32* wurden die Oligonukleotide TL1552 und 1553 und als Matrize das Plasmid pAG25 verwendet (Goldstein und McCusker, 1999). Die genomische Markierung von *MRPL32* mit einem dreifachen Hämagglutinin-Epitop (HA) bzw. mit einem GFP-Epitop wurde ebenfalls mit Hilfe der homologen Rekombination hergestellt, indem die Oligonukleotide TL1488 und 1489 und die Plasmide pFA6a-3HA-KANMX6 bzw. pFA6a-GFP-KANMX6 (Longtine *et al.*, 1998) verwendet wurden. Die Markierungen wurden sowohl im Hefestamm W303-1A (*MRPL32HA3*, YMN401; *MRPL32GFP*, YMN403) als auch in den Hefestämmen $\Delta yta10$ ($\Delta yta10/MRPL32HA3$, YMN402) oder $\Delta yta12$ ($\Delta yta12/MRPL32GFP$, YMN404) durchgeführt.

Zur Expression von MrpL32 (1-183) und Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) wurde der diploide Stamm *MRPL32*/ $\Delta mrp132$ (YMN301) mit den Plasmiden YCplac111^{MRPL32}-MrpL32 (1-183) bzw. pVT100U^{ADH1}-Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) transformiert. Nach

Sporulation und Tetradenanalyse wurde auf haploide Sporen selektioniert, die die Deletion von *MRPL32* und das Plasmid YCplac111-^{MRPL32}-MrpL32 (1-183) (YMN311) oder pVT100U^{ADH1}-Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) (YMN312) enthielten. Der Stamm $\Delta yta10$ mit Expression von Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) (YMN102) wurde hergestellt, indem der Hefestamm $\Delta yta10$ (YGS101) mit dem Plasmid pVT100U^{ADH1}-Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) transformiert wurde. Des Weiteren wurde ein Hefestamm hergestellt, der Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) im $\Delta yta10\Delta mrp132$ -Hintergrund exprimiert (YMN313). Dazu wurde zusätzlich *YTA10* in dem Hefestamm YMN312 deletiert.

Tab. 3: Verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
W303	<i>MATa/α ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i>	(Rothstein und Sherman, 1980)
W303-1A	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i>	(Rothstein und Sherman, 1980)
YMN101	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yta10::URA3 yta12::KANMX6 YCplac 22^{ADH1}-Yta10^{E559Q/HIS} YCplac111^{ADH1}-Yta12^{E614Q}</i>	diese Arbeit
YMN102	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yta10::HIS3MX6 pVT100U^{ADH1}-Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183)</i>	diese Arbeit
YMN201	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 mrp132::CloneNAT</i>	diese Arbeit
YMN301	<i>MATa/α ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 mrp132::CloneNAT</i>	diese Arbeit
YMN311	<i>MAT * ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 mrp132::CloneNAT YCplac111^{MRPL32}-MrpL32 (1-183)</i>	diese Arbeit
YMN312	<i>MAT * ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 mrp132::CloneNAT pVT100U^{ADH1}-Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183)</i>	diese Arbeit
YMN313	<i>MAT * ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 mrp132::CloneNAT yta10::KANMX6 pVT100U^{ADH1}-Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183)</i>	diese Arbeit
YMN401	<i>MAT * ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 MRPL32HA3 (KANMX6)</i>	diese Arbeit

YMN402	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10::HIS3MX6 MRPL32HA3 (KANMX6)</i>	diese Arbeit
YMN403	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-10 MRPL32GFP (TRP)</i>	diese Arbeit
YMN404	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta12::KANMX6 MRPL32GFP (TRP)</i>	diese Arbeit
YGS101	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10::HIS3MX6</i>	(Arlt <i>et al.</i> , 1998)
YGS302	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10::URA3 yta12::KANMX6 YCplac 22^{ADH1}-Yta10^{E559Q} YCplac111^{ADH1}-Yta12^{E614Q}</i>	(Arlt <i>et al.</i> , 1998)
YHA103	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10::URA3 YCplac 22^{ADH1}-Yta10^{E559Q}</i>	(Arlt <i>et al.</i> , 1998)
YHA203	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta12::HIS3MX6 YCplac111^{ADH1}-Yta12^{E614Q}</i>	(Arlt <i>et al.</i> , 1998)
YHA301	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10::URA3 yta12::HIS3MX6</i>	(Arlt <i>et al.</i> , 1998)
$\Delta yme1$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yme1::URA3</i>	(Leonhard <i>et al.</i> , 1996)
YKO267	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10::URA3 yta12::HIS3MX6 YEplac181^{YTA10}-Yta10 (1-61)-Paraplegin (44-781)</i> <i>YEplac112^{YTA10}-Yta10 (1-61)-Afg3l2 (36-802)-HA</i>	(Nolden <i>et al.</i> , 2005b)
YSW1	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta12::KANMX6</i>	(Nolden <i>et al.</i> , 2005b)

* = Der Mating-Typ wurde im Rahmen dieser Untersuchungen nicht bestimmt.

2.3 Untersuchungen zur Stabilität des mitochondrialen Proteoms

2.3.1 Radioaktive Markierung von mitochondrialen Proteinen

Mitochondriale Proteine wurden in Gegenwart von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Dazu wurden zuerst die entsprechenden Hefestämme in Minimalmedium (SC) kultiviert (Sherman, 2002), welches mit 2% Galaktose (Gal) versetzt worden war. Zur Markierung wurden entweder 1 bzw. 8 OD₆₀₀-Einheiten-Zellen in 250 μ l bzw. 2 ml

SC-Gal Medium ohne Methionin resuspendiert. Wenn im Text vermerkt, wurde vor der Markierung die mitochondriale und/oder die cytosolische Proteinsynthese mit Chloramphenicol (6 mg/ml) bzw. Cycloheximid (1 mg/ml) für 15 min bei 30°C gehemmt. Anschließend wurden 50 bzw. 300 μCi ^{35}S -Methionin zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 30°C inkubiert. Die Proteinsynthese wurde durch die Zugabe von 10 mM Methionin und 6 mg/ml Chloramphenicol bzw. 1 mg/ml Cycloheximid abgestoppt.

2.3.2 Zweidimensionale-Gelelektrophorese

Das mitochondriale Proteom wurde mittels zweidimensionaler (2D)-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dies erfolgte nach Standardprotokollen (Gorg *et al.*, 1995; Gorg *et al.*, 2000; Hoving *et al.*, 2000) mit den folgenden Modifikationen: Die über einen Saccharosegradienten gereinigten Mitochondrien wurden in 8 M Harnstoff, 4% (m/v) CHAPS, 50 mM DTT, 40 mM Tris, 0,2 mM PMSF 60 min unter Schütteln (1.400 U/min) bei 23°C solubilisiert. Anschließend wurden die Proben mit Rehydrierungspuffer [8 M Harnstoff, 2% (m/v) CHAPS, 20 mM DTT, 0,5% (v/v) IPG Puffer 3-10NL (GE Healthcare)] versetzt und für 30 min bei 125.000 g und 23°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf immobilisierte pH-Gradienten (IPG)-Streifen (13 cm, pH 3-10NL, GE Healthcare) gegeben und über Nacht zur Rehydrierung bei Raumtemperatur inkubiert.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit Hilfe der Multiphor II-Einheit (GE Healthcare). Die Fokussierung startete bei 300 V, 5 W und 1 mA für 1 min und stieg dann langsam an (300 V, 3 h; Gradient bis auf 1.400 V für 6 h, dann konstant 1.400 V für 10 h; Gradient bis auf 3.500 V über 3 h, konstant 3.500 V für 2 h; die Voltstunden betragen 34 kWh). Dieses Programm ermöglichte ein langsames Einlaufen der Proteine in die IPG-Streifen. Nach der Fokussierung erfolgte die Äquilibrierung der Streifen mit 1% (m/v) DTT und 2,5% (m/v) Iodacetamid. Als zweite Dimension schloss sich eine Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) an (Laemmli, 1970). Die Proteine wurden entweder mit colloidalem Coomassie angefärbt (Neuhoff *et al.*, 1990) oder auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979) und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software PDQuest von BioRad. Dazu wurden die Daten mehrerer Gele (mindestens drei) von verschiedenen Analysen der gleichen

Probe zu einem so genannten Mastergel zusammengefasst. Anschließend wurden Mastergele verschiedener Proben Gruppen miteinander verglichen, um so die signifikanten Unterschiede in den Proteinmengen zu ermitteln. Die abgebildeten Gele zeigen nicht die Mastergele, sondern nur jeweils ein exemplarisches Gel.

2.3.3 Peptidexport von mitochondrialen Proteinen

Die Stabilität mitochondrialer Proteine spiegelt sich indirekt auch in der Peptidexportrate wider, da die Abbauprodukte der Proteolyse, die Peptide, aus Mitochondrien exportiert werden (Young *et al.*, 2001). Zur Bestimmung der Exportraten wurden die mitochondrialen Proteine von 8 OD₆₀₀-Einheiten entsprechenden Hefezellen, wie in 2.3.1 beschrieben, radioaktiv markiert. Im Anschluss daran wurden die Mitochondrien isoliert und zusätzlich über einen Saccharosegradienten gereinigt (Tatsuta und Langer, 2005b). Die Mitochondrien wurden in Puffer A [0,6 M Sorbitol, 150 mM KCl (pH 7,4), 15 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4), 20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 13 mM MgSO₄, 4 mM ATP, 0,5 mM GTP, 3 mM Aminosäuremix (inklusive alle proteinogenen Aminosäuren ohne Methionin, Cystein, Tyrosin), 66 µM Cystein, 7 µM Tyrosin, 6 mM α -Ketoglutarat, 5 mM Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase (0,04 mg/mg Mitochondrien)] resuspendiert. Dann wurden sie viermal mit 0,5 ml eiskaltem SHKCl Puffer [0,6 mM Sorbitol, 50 mM HEPES/KOH (pH 7,2), 80 mM KCl] gewaschen und wiederum in Puffer A (ohne Pyruvatkinase) resuspendiert. Die Probe wurde in vier Ansätze geteilt und bei 24°C, 30°C, 37°C bzw. bei 42°C inkubiert. Nach der angegebenen Zeit wurden die Proben sofort für 4 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Radioaktivität im Überstand und im Pellet wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt, nachdem die Fraktionen intensiv mit 1 ml Szintillationslösung (Ultima Gold) gemischt worden waren.

2.4 Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie

Zur Identifizierung von Substraten der *m*-AAA-Protease wurden isolierte Mitochondrien des Stammes YMN101 verwendet. Dieser Stamm exprimiert die proteolytisch inaktiven Varianten von Yta10 und Yta12. Zusätzlich enthielt Yta10 eine sechs Histidine umfassende Peptidsequenz am Carboxy-Terminus. Die Anreicherung des Komplexes erfolgte an einer 1 ml HiTrap Chelating HP®-Säule (GE Healthcare), die

nach Angaben des Herstellers zuvor mit 0,5 ml einer 0,1 M NiSO₄-Lösung beladen sowie mit H₂O und Ladepuffer [0,5% (m/v) Digitonin, 1x PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄), 1 mM ATP] gewaschen und äquilibriert worden war. Mitochondrien (20 mg) wurden bei einer Proteinkonzentration von 4 mg/ml in Lysepuffer [2% (w/v) Digitonin, 1 mM ATP, 1 mM PMSF, EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail (Roche) in 1x PBS] 30 min unter Schütteln (1.400 U/min) bei 4°C solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation für 30 min bei 125.000 g und 4°C sedimentiert. Der mitochondriale Extrakt wurde mit einer Flussrate von 0,1 ml/min auf die Säule geladen und diese im Anschluss mit 20 ml 20 mM Imidazol/HCl (pH 7,4) [in Ladepuffer] gewaschen (0,4 ml/min). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch je 10 ml 100 mM und 400 mM Imidazol/HCl (pH 7,4) [in Ladepuffer]. Die 400 mM Imidazol-Elution wurde fraktioniert (2 ml) und anschließend mit TCA versetzt. Die gefällten Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt und mit colloidalem Coomassie angefärbt (Neuhoff *et al.*, 1990). Zur Identifizierung von einem Protein wurde die jeweilige Proteinbande aus dem Gel ausgeschnitten und ein "peptide-mass-fingerprint" durchgeführt. Dazu wurden die in den Gelstücken enthaltenen Proteine verdaut und anschließend die Peptide aus dem Gel extrahiert. Der Verdau erfolgte durch das Enzym Trypsin, das Proteine an den Aminosäuren Arginin und Lysin schneidet, so dass definierte Peptide entstehen. Das Molekulargewicht der Peptide wurde mittels eines Massenspektrometers (MALDI-TOF) bestimmt. Durch Vergleich der experimentell bestimmten Peptidmassen mit den Massen "theoretisch verdauter" Proteine aus Datenbanken kann das ursprüngliche Protein identifiziert werden.

2.5 Radioaktive Markierung von mitochondrialen Translationsprodukten

Die radioaktive Markierung der mitochondrialen Translationsprodukte erfolgte wie in 2.3.1 beschrieben. Dazu wurden je Ansatz die Translationsprodukte von einer OD₆₀₀-Einheit-Hefe in Gegenwart von Cycloheximid (1 mg/ml) radioaktiv markiert und im Anschluss mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen (Yaffe und Schatz, 1984). Die Translationsprodukte wurden mit einer SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979) und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Des Weiteren wurde die gesamte Radioaktivitätsmenge

mit einem Szintillationszähler bestimmt, nachdem ein Viertel der Probe intensiv mit 1 ml Szintillationslösung (Ultima Gold) gemischt worden war.

2.6 Analyse mitochondrialer Ribosomen durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Auftrennung von Ribosomenpartikel erfolgte durch Ultrazentrifugation in einem Dichtegradienten von 23-40% Saccharose. Isolierte Mitochondrien (300 µg) wurden mit einer Proteinkonzentration von 0,75 mg/ml in Lysepuffer [1% (w/v) Digitonin, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4), 80 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF] 30 min unter Schütteln (1.400 U/min) bei 4°C solubilisiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 21.000 g und 4°C wurde der Überstand auf einen linearen 23-40%igen Saccharosegradienten (4 ml) aufgetragen. Zur Herstellung des Gradienten wurden 2 ml 40%ige Saccharoselösung mit 2 ml 23%iger Saccharoselösung [in 0,1% (w/v) Digitonin, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4), 50 mM MgSO₄, 20 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF] in einem 5 ml-Zentrifugationsröhrchen (für Rotor MLS-50, Beckman) überschichtet. Anschließend wurde das Röhrchen verschlossen, in die waagerechte Lage gebracht und für 2 h bei 4°C zur Gradientendiffusion gelagert. Die Proben wurden auf den Gradienten aufgetragen, nachdem er wieder vorsichtig in die vertikale Position gebracht worden war. Nach einer Zentrifugation für 3 h bei 270.000 g und 4°C (MLS-50, Beckman) wurde der Gradient entweder fraktioniert (11 Fraktionen á 400 µl), die Fraktionen mit TCA versetzt und die gefällten Proteine mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) analysiert oder durch eine kontinuierliche Durchflusszelle gepumpt. Mit Hilfe eines Photometers (Thermo UV1) wurde dann die Absorption der ribosomalen RNA bei 254 nm gemessen.

2.7 Membranassoziation von MrpL32

2.7.1 Alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen

Die Membraninsertion von MrpL32 wurde mittels alkalischer Extraktion der Membranen in einem Natriumcarbonat-Puffer überprüft (Fujiki *et al.*, 1982). Nach der Extraktion und anschließender Zentrifugation verbleiben integrale Membranproteine

in der Pelletfraktion, lösliche und peripher an die Membran gebundene Proteine befinden sich im Überstand. Dazu wurden 100 µg isolierte Mitochondrien bei 16.000 g für 10 min bei 4°C sedimentiert und in 1 ml 0,1 M Na₂CO₃ (pH 11,5) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden die löslichen Bestandteile und die nicht extrahierbaren Bestandteile der Membran durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 125.000 g und 4°C getrennt. Das Pellet wurde in 1 ml 0,1 M Na₂CO₃ (pH 11,5) resuspendiert und wie der Überstand mit TCA versetzt. Die gefällten Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) analysiert. Die Trennung von integralen Membranproteinen und löslichen Proteinen wurde durch immunologischen Nachweis mit Antiseren gegen das integrale Membranprotein Aac2 und das lösliche Matrixprotein Mge1 überprüft.

2.7.2 Triton X-114-Extraktion von mitochondrialen Membranen

Die Extraktion von Membranproteinen mit Hilfe von Triton X-114 wurde im wesentlichen schon früher beschrieben (Bordier, 1981; Knittler *et al.*, 1998). Hierzu wurden 100 µg isolierte Mitochondrien in 1 ml eiskaltem 1%igem (v/v) Triton X-114 [in PBS] resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für 5 min auf 25°C erwärmt und anschließend einer Phasentrennung unterworfen. Dazu wurden die Proben für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Solubilisierte Membranproteine befanden sich in der TX-114-Phase, lösliche Proteine in der wässrigen Phase. Nach einer TCA-Fällung wurden die Proteine beider Phasen durch eine SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt und mittels Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) analysiert.

2.7.3 Membranassoziation von Ribosomen mit der inneren Mitochondrienmembran

Die Membranassoziation von Ribosomen mit der inneren Mitochondrienmembran wurde mit einer Ultraschallbehandlung in Gegenwart von ansteigenden Kaliumchlorid-Konzentrationen untersucht. Dazu wurden 100 µg isolierte Mitochondrien in 1 ml Ultraschallpuffer resuspendiert [20 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgSO₄, 20 mM MgCl₂, 0 – 300 mM KCl, 0,5 mM PMSF]. Nach einer Ultraschallbehandlung

(3 x 10 s, Level 2, Duty cycle 80%, dazwischen 10 s auf Eis) wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei 600 g für 45 min bei 4°C abgetrennt. Der Überstand, welcher sowohl Fragmente der inneren und äußeren Mitochondrienmembran als auch Matrixproteine enthält, wurde anschließend einer Ultrazentrifugation für 12 min bei 150.000 g und 4°C unterzogen. Dadurch wurden Membranproteine und periphere Membranproteine im Sediment, lösliche Matrixproteine im Überstand angereichert. Proteine beider Fraktionen wurden mit TCA gefällt und mit Hilfe von SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) analysiert. Die Quantifizierung der Proteinmengen nach Immunodekoration wurde mit Hilfe des Infrared-Imaging-Systems ODYSSEY der Firma LI-COR durchgeführt.

2.8 Superose 6-Gelfiltration

Die Bestimmung des nativen Molekulargewichts von MrpL32 und die Analyse von Proteinkomplexen erfolgten mittels Gelfiltration. Dazu wurden isolierte Mitochondrien (900 µg) in 220 µl Lysepuffer [1% (w/v) Digitonin, 150 mM KAc (pH 7,4), 4 mM MgAc, 30 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM ATP, 1 mM PMSF] 15 min unter Schütteln (1.400 U/min) bei 4°C solubilisiert. Nicht solubilisierbare Proteinaggregate wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 125.000 g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend auf eine mit Laufpuffer [1% (w/v) Digitonin, 150 mM KAc pH (7,4), 4 mM MgAc, 30 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM ATP] äquilibrierte Superose 6-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) geladen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,3 ml/min. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt und nach einer TCA-Fällung die gefällten Proteine mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) analysiert. Die Proteinmengen wurden densitrometrisch quantifiziert (QuantityOne, Bio-Rad) und auf die gesamte eluierte Menge normiert.

2.9 Co-Immundefällung von Proteinen

Die Co-Immundefällung wird zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt, indem ganze Proteinkomplexe mit Hilfe von Antikörpern präzipitiert werden. Dazu macht man sich die hohen spezifischen Affinitäten von Antikörpern für ihre jeweiligen Antigene zunutze. Zuerst werden Antikörper an Protein-A-Sepharose

(PAS)-Partikel gebunden, die eine hohe Affinität für Immunglobuline der Klasse G besitzen. Pro Ansatz wurden 50 µl PAS-Partikel (100 mg/ml) eingesetzt und zweimal mit 500 µl Waschpuffer [0,1% (w/v) Digitonin, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4), 80 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF] gewaschen. Zur Bindung der Antikörper wurden die PAS-Partikel mit 400 µl Waschpuffer und 50 µl Antiserum für 1 h bei 4°C unter leichtem Rotieren inkubiert. Anschließend wurden die Partikel noch einmal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. In der Zwischenzeit wurden 600 µg isolierte Mitochondrien in 800 µl Lysepuffer [1% (w/v) Digitonin, 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4), 80 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF] resuspendiert und für 30 min unter Schütteln (1.400 U/min) bei 4°C solubilisiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 21.000 g und 4°C abgetrennt. Zur Kontrolle der Solubilisierung wurden jeweils von dem Überstand und der Pelletfraktion 10% abgenommen und mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) analysiert. Der restliche Überstand wurde dann zu den vorbereiteten PAS-Partikeln gegeben. Nach Inkubation für 2 h bei 4°C unter leichtem Rotieren wurden die PAS-Partikel zweimal mit Lysepuffer und einmal mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,4) gewaschen.

Anschließend wurden die Proben einer Triton X-114-Extraktion unterzogen, da die großen Mengen von Antikörpern das Laufverhalten des Präzipitates im Gel stören würden. Die PAS-Partikel wurden dazu mit 1 ml eiskaltem Elutionspuffer [1% (v/v) Triton X-114, 1% Essigsäure] gemischt und für 10 min unter leichtem Rotieren bei 4°C inkubiert. Die PAS-Partikel wurden durch eine Zentrifugation für 10 s bei 16.000 g und 4°C abgetrennt. Der Überstand, der die eluierten Proteine enthielt, wurde zur Phasentrennung für 5 min auf 37°C erwärmt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g und 23°C trennen sich die Phasen. Die wässrige Phase enthält lösliche Proteine, unter anderem die leichten und schweren Ketten der Antikörper, während sich in der Triton X-114-Phase alle vorher interagierenden Membranproteine wieder finden. Diese Phase wurde zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen, um noch restliche lösliche Proteine zu entfernen. Dazu wurde die Triton X-114-Phase mit 1 ml eiskaltem Wasser versetzt, erneut für 5 min auf 37°C erwärmt und für weitere 5 min bei 16.000 g und 23°C zentrifugiert. Alle Fraktionen wurden mit TCA versetzt und die gefällten Proteine mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) analysiert.

2.10 Herstellung von Antikörpern

Zur Herstellung von spezifischen Antiseren gegen MrpL32 wurden chemisch synthetisierte Oligopeptide als Antigene eingesetzt. So wurden die Peptide C-RWLREKLQQDHKDTE (entspricht den Aminosäuren 45-59) und C-HTAKEEIKPRQEEEL (entspricht den Aminosäuren 131-145) zur Herstellung von Hefe-spezifischen MrpL32-Antikörpern in Kaninchen verwendet. Zur Herstellung eines Maus-spezifischen Antikörpers gegen MrpL32 wurde das Peptid C-RRTIEVNRSRRRNPQK (entspricht den Aminosäuren 83-98) verwendet. Die Synthese der Peptide und die Immunisierung der Kaninchen wurden von der Firma BioGenes (Berlin) durchgeführt.

2.11 Verschiedene Methoden

Des Weiteren wurden folgende schon veröffentlichte Methoden verwendet: Klonierungen (Sambrook und Russell, 2001), Hefemedien und Tetradenanalyse (Sherman, 2002), Proteinimport in isolierte Hefe- und Maus-Mitochondrien (Kambacheld *et al.*, 2005; Tatsuta und Langer, 2005b).

3 Ergebnisse

3.1 *Stabilität des mitochondrialen Proteoms*

3.1.1 Proteom-Vergleich von Wildtyp- und $\Delta yta10$ -Mitochondrien

Zur Identifizierung von neuen Substraten der *m*-AAA-Protease wurde ein Proteom-Ansatz gewählt. Dazu sollten die Proteome von Wildtyp- und *m*-AAA-Protease-defizienten Mitochondrien mit Hilfe der zweidimensionalen (2D) Gelelektrophorese verglichen werden. In Mitochondrien, denen die *m*-AAA-Protease fehlt, sollten Substratproteine nicht abgebaut werden und somit in den Mitochondrien akkumulieren bzw. im Falle einer defekten Prozessierung zu einem veränderten Protein-Muster führen. Zur Analyse wurden Mitochondrien aus einer logarithmisch wachsenden Kultur isoliert. Eine anschließende Reinigung über einen Saccharosegradienten sollte zu einer weiteren Anreicherung mitochondrialer bzw. einer Abnahme von nicht mitochondrialen Proteinen führen. Die Auftrennung des mitochondrialen Proteoms erfolgte in der ersten Dimension mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG)-Streifen (pH 3-10NL) und in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE (Abb. 4). Je Ansatz wurden mindestens drei 2D-Gele angefertigt, aus deren Daten dann mit Hilfe der Software PDQuest (BioRad) je ein Mastergel generiert wurde. Die Mastergele von Wildtyp- und $\Delta yta10$ -Mitochondrien wurden anschließend miteinander verglichen.

Im Einklang mit der Veröffentlichung von Sickmann *et al.* konnten ~280 Proteinpunkte in jedem Gel identifiziert werden (Sickmann *et al.*, 2003). Die Quantifizierung jedes einzelnen Punktes in den Mastergelen ließen keine Unterschiede zwischen WT und $\Delta yta10$ erkennen, die den als signifikant angenommen Faktor von zwei überschritten, um experimentelle Artefakte bei der 2D-Gelanalyse auszuschließen. Der Verlust der *m*-AAA-Protease bewirkt somit keine deutliche Akkumulation von Substraten im Mitochondrium. Es muss an dieser Stelle jedoch erwähnt werden, dass in 2D-Gelen Proteine mit extremen Eigenschaften, wie Membranproteine, sehr große, sehr kleine, stark saure und stark basische Proteine, unterrepräsentiert sind (Gygi und Aebersold, 2000) und daher solche Substrate aus der Analyse fallen.

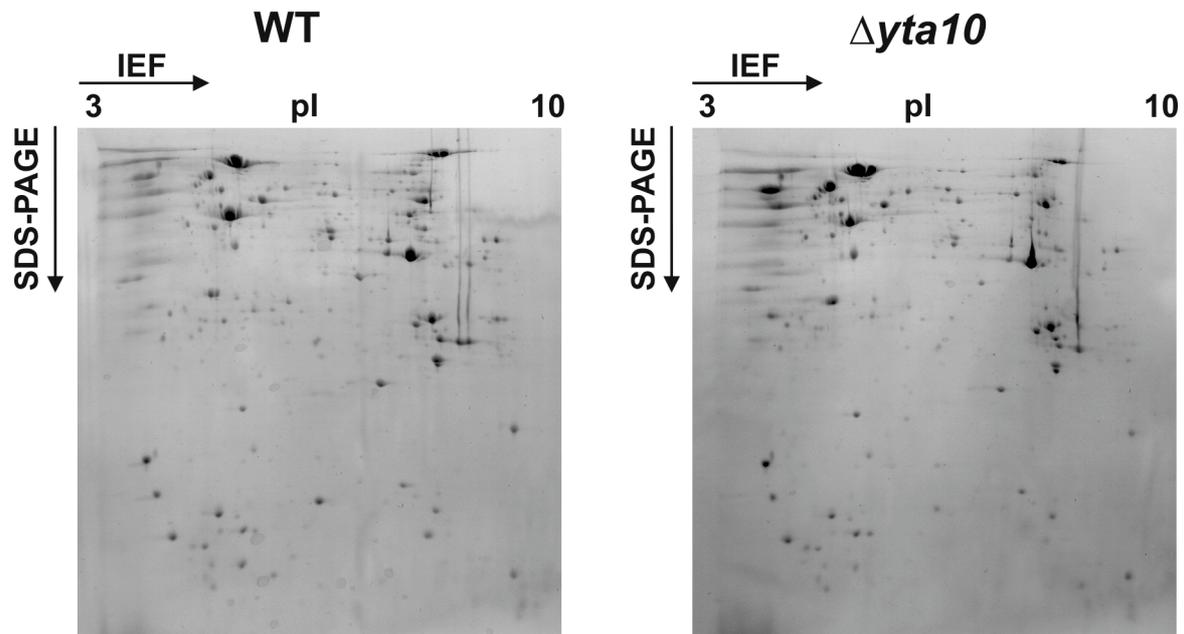


Abb. 4: Vergleich des mitochondrialen Proteoms von Wildtyp- und $\Delta yta10$ -Mitochondrien. Mitochondrien (600 μg) aus Wildtyp (WT)- und $\Delta yta10$ -Hefenzellen wurden mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht. In der ersten Dimension wurden IPG-Streifen mit einem nicht-linearen pH-Gradienten von 3-10 verwendet. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte durch eine SDS-PAGE. Proteine wurden mit colloidalem Coomassie angefärbt. ~280 Proteinpunkte wurden identifiziert und durch Mastergele, die auf mindestens drei unabhängigen Experimenten beruhten, mit Hilfe der PDQuest-Software analysiert. Die abgebildeten Gele zeigen nicht die Mastergele, sondern nur jeweils ein exemplarisches Gel.

Das Ergebnis deutet entweder auf eine überraschende Stabilität des mitochondrialen Proteoms oder auf einen geringen Einfluss der *m*-AAA-Protease bzw. eine redundante Funktion beim Abbau von Proteinen hin. In der Tat besitzen die *i*-AAA-Protease (Leonhard *et al.*, 2000) bzw. die PIM1-Protease (Savel'ev *et al.*, 1998) überlappende Substratspezifitäten mit der *m*-AAA-Protease, d.h. sie sind in der Lage, Substrate der anderen Protease abzubauen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass korrekt gefaltete Proteine sehr stabil in der Zelle vorliegen und nur ein kleiner Prozentsatz abgebaut wird. Die Daten von Untersuchungen der Proteinstabilität in Fibroblasten stützen diese Vermutung, da hier pro Stunde nur 1-2% aller Proteine abgebaut werden (Gronostajski *et al.*, 1985).

3.1.2 Stabilität von neu synthetisierten Proteinen

Die vorangegangenen Analysen lassen vermuten, dass mitochondriale Proteine unter normalen Bedingungen sehr stabil in der Zelle vorliegen. Die Stabilität von Proteinen ist neben vielen anderen Faktoren auch von der Temperatur abhängig,

d.h. ein Temperaturanstieg führt in der Regel zur Entfaltung von Proteinen. Im folgenden Versuch wurde daher die Stabilität des mitochondrialen Proteoms nach einer kurzen Inkubation bei 37°C für 30 min, wie in 3.1.1 beschrieben, analysiert (Abb. 5A). Neben der Stabilität von schon korrekt gefalteten Proteinen wurde auch die Stabilität von neu synthetisierten bzw. neu importierten Proteinen untersucht. Im Gegensatz zum Cytosol, wo ca. 30% der neu synthetisierten Proteine nicht ihre native Faltung erreichen (Schubert *et al.*, 2000), liegen für das Mitochondrium keine Daten über die Stabilität von neu synthetisierten bzw. neu importierten Proteinen vor. Dazu wurden Proteine in Wildtyp-Hefezellen für 10 min in Gegenwart von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Nach anschließender Isolierung und Reinigung über einen Saccharosegradienten wurden die Mitochondrien ebenfalls für 30 min bei 37°C inkubiert (Abb. 5B). Die Auswertung der Gele erfolgte wie in 3.1.1 beschrieben. Auch nach einer kurzen Inkubation bei 37°C zeigte das mitochondriale Proteom eine bemerkenswerte Stabilität. Es konnten keine Proteine identifiziert werden, die nach einem 30-minütigen Hitzeschock signifikant, d.h. mindestens um Faktor 2, abgebaut wurden. Im Falle der radioaktiv markierten Proteine war ebenfalls kein signifikanter Abbau zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass die Biogenese von neu synthetisierten und neu importierten Proteinen offenbar sehr effizient ist.

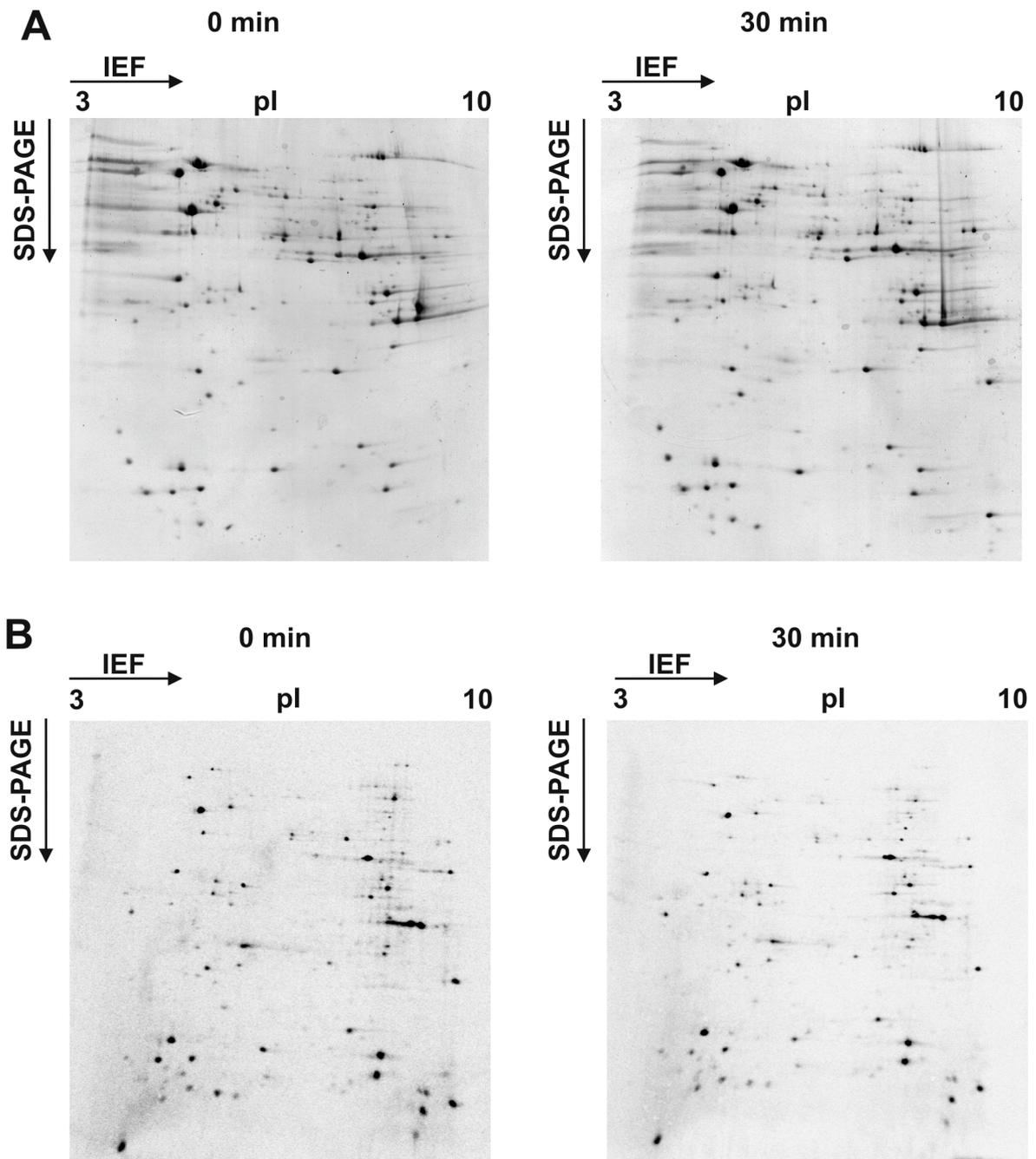


Abb. 5: Stabilität des mitochondrialen Proteoms bei 37°C. Die Proteine von gereinigten Wildtyp-Mitochondrien wurden mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, nachdem sie für 30 min bei 37°C inkubiert wurden. **(A)** Die mitochondrialen Proteine (600 µg) wurden mit colloidalem Coomassie angefärbt, **(B)** neu synthetisierte Proteine (entsprechend 8 OD₆₀₀-Einheiten), welche für 10 min mit ³⁵S-Methionin markiert worden waren, wurden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. ~280 Proteinpunkte wurden identifiziert und durch Mastergele, die auf mindestens drei unabhängigen Experimenten beruhten, mit Hilfe der PDQuest Software analysiert. Die abgebildeten Gele zeigen nicht die Mastergele, sondern jeweils ein exemplarisches Gel.

3.1.3 Abbauprodukte von mitochondrial- und nuklear-kodierten Proteinen werden aus Mitochondrien exportiert

Die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese gaben Hinweise darauf, dass das Proteom von Mitochondrien sehr stabil ist. Jedoch hat diese Methode auch Nachteile. So ist es nur sehr schwer möglich, Membranproteine und Proteine mit einem hohen isoelektrischen Punkt (pI) aufzutrennen. Möglicherweise gehen solche Substrate in diesen Analysen verloren und der reelle Gesamtumsatz des mitochondrialen Proteoms ist tatsächlich viel höher. Aus diesem Grunde sollte versucht werden, die Abbaurate von mitochondrialen Proteinen indirekt über den Peptidexport zu bestimmen. Es konnte schon früher gezeigt werden, dass Peptide, welche durch den Abbau von Proteinen der inneren Mitochondrienmembran entstehen, durch den ABC-Transporter Mdl1 aus der Matrix exportiert werden (Young *et al.*, 2001). Wie im vorherigen Versuch wurden mitochondriale Proteine *in vivo* für 10 min radioaktiv markiert, die Mitochondrien isoliert und über einen Saccharosegradienten gereinigt. Nach gründlichem Waschen der Mitochondrien wurden diese bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Mitochondrien von dem Überstand, der exportierte Peptide enthält, durch Zentrifugation getrennt. In beiden Fraktionen wurde die Radioaktivität mit einem Szintillationszähler bestimmt und der prozentuale Anteil von exportiertem radioaktivem Material berechnet (Abb. 6). Kontrollexperimente zeigten, dass es sich beim exportierten Material um Peptide handelt, da sich die Radioaktivität nach einer TCA-Fällung im TCA-löslichen Überstand befindet, welcher kleine Peptide und einzelne Aminosäuren enthält (Daten nicht gezeigt, (Young *et al.*, 2001)). Es ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Temperatur und Zeit die Menge an exportiertem Material zunimmt. So wird nach 30 min und 37°C ungefähr 6% des inkorporierten ³⁵S-Methionins von den Mitochondrien freigesetzt. Diese geringe Umsatzrate steht im Einklang mit der zuvor in den 2D-Gelanalysen beobachteten Stabilität des Proteoms. Eine Abbaurate von nur 6% kann mit Hilfe der 2D-Gele nicht analysiert werden. Die Analyse des mitochondrialen Proteoms mittels Peptidexport deutet auf eine hohe Effizienz der mitochondrialen Biogenese von über 90% hin.

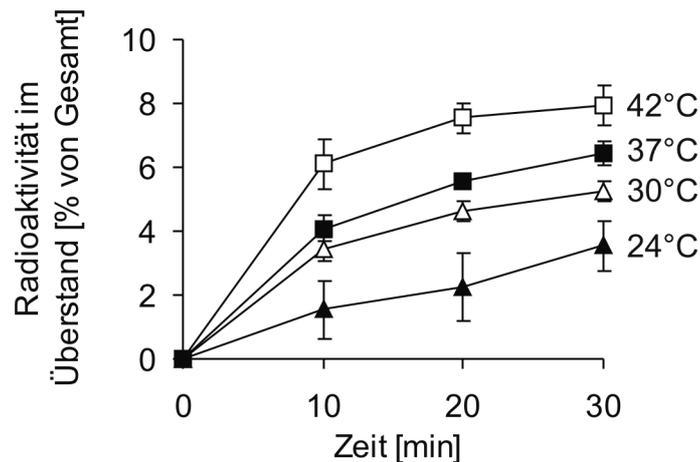


Abb. 6: Temperatur- und Zeitabhängigkeit des Exports von mitochondrialen Abbauprodukten. Die cytosolischen und mitochondrialen Translationsprodukte wurden *in vivo* in Gegenwart von ^{35}S -Methionin für 10 min radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Mitochondrien isoliert und bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Nach 0, 10, 20 und 30 min wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation von dem Überstand abgetrennt und die Radioaktivität in beiden Fraktionen bestimmt. Die angegebene Radioaktivität im Überstand ist der prozentuale Anteil von beiden Fraktionen (Pellet und Überstand). Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Mit Hilfe des Peptidexports wurde der Umsatz von mitochondrialen Proteinen untersucht. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob mehr mitochondrial- oder kernkodierte Proteine abgebaut werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde der Peptidexport wiederholt, jedoch wurden die Hefen in An- und Abwesenheit von Chloramphenicol für 10 min in einem Minimal-Medium, welches ^{35}S -Methionin enthielt, inkubiert. Die Zugabe von Chloramphenicol bewirkt eine spezifische Hemmung der mitochondrialen Translation (Freeman, 1970), somit werden nur cytosolische Translationsprodukte markiert. Falls vermehrt mitochondrial kodierte Proteine abgebaut werden, sollte nach einer Inhibition der mitochondrialen Translation durch Chloramphenicol der Export von radioaktivem Material stark zurückgehen. Die Zugabe von Chloramphenicol führte zu keiner signifikanten Veränderung sowohl der absoluten (Daten nicht gezeigt) als auch der relativen Exportrate, was bedeutet, dass die Abbauprodukte mitochondrial-kodierter Proteine nur einen kleinen Prozentsatz ausmachen und mehr Abbauprodukte von kernkodierten Proteinen exportiert werden (Abb. 7A). Die Chloramphenicol-abhängige Hemmung der mitochondrialen Translation konnte in einem Kontrollexperiment belegt werden. Die Zugabe von Chloramphenicol vor und

während der Markierung inhierte vollständig die mitochondriale Translation (Abb. 7B).

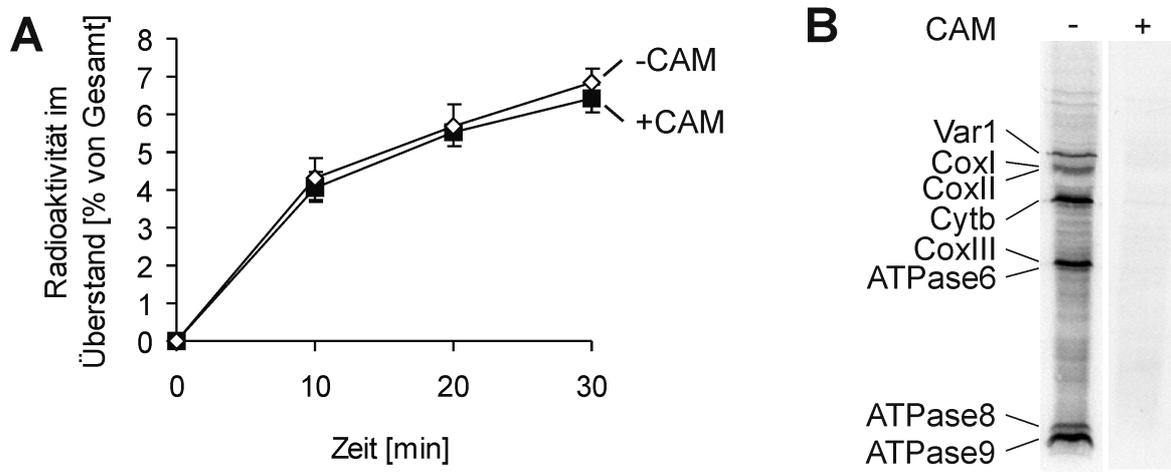


Abb. 7: Export von kernkodierten Abbauprodukten aus Mitochondrien. (A) Die cytosolischen und mitochondrialen Translationsprodukte wurden mit ^{35}S -Methionin in der An- bzw. Abwesenheit von Chloramphenicol radioaktiv markiert. Die isolierten Mitochondrien wurden bei 37°C inkubiert und der Export der Abbauprodukte, wie in Abb. 6 beschrieben, untersucht. (B) Chloramphenicol inhibiert die mitochondriale Translation. Mitochondrialkodierte Translationsprodukte wurden in logarithmisch wachsenden Hefezellen mit ^{35}S -Methionin in Gegenwart von Cycloheximid radioaktiv markiert. Zusätzlich wurde, wenn angegeben, Chloramphenicol hinzu gegeben. Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

3.2 MrpL32 interagiert mit der m-AAA-Protease

Mit Hilfe von Proteom-Analysen war es nicht möglich, neue Substrate der *m*-AAA-Protease zu identifizieren. Aus diesem Grunde wurde versucht, die mit der *m*-AAA-Protease interagierenden Substrate über eine Affinitätschromatographie zu reinigen. Dazu wurde ein Hefestamm verwendet, der die proteolytisch inaktiven Varianten von Yta10 und Yta12 exprimiert. Die Inaktivierung des proteolytischen Zentrums sollte den Abbau verhindern und somit zu einer Anreicherung von möglichen Substraten an der Protease führen. Die *m*-AAA-Protease zählt zu den Zink-abhängigen Metalloproteasen und besitzt ein charakteristisches HEXXH-Motiv (Nolden *et al.*, 2005a). Die Histidine (H) dieses Motivs sind für die Koordination des Zink-Atoms verantwortlich, während die Glutaminsäure (E) ein Wasser-Molekül aktiviert und somit einen nukleophilen Angriff auf eine Peptidbindung ermöglicht (Mock und Stanford, 1996). Die Inaktivierung erfolgte, durch Austausch der Aminosäure Glutaminsäure (E) gegen Glutamin (Q) im katalytischen Zentrum (Abb. 8). Diese Inaktivierung beeinträchtigt nicht die Assemblierung beider Untereinheiten und die

prinzipielle Bindung von Substraten an die Protease (Arlt *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde am Carboxy-Terminus der *m*-AAA-Protease-Untereinheit Yta10 eine sechs Histidine umfassende Peptidsequenz eingeführt, die eine Reinigung der Protease mit möglichen gebundenen Substraten über eine Nickel-chelatisierende Affinitätschromatographie ermöglichte. Die Einführung des Hexahistidinpeptids führte zu keinem Assemblierungsdefekt der beiden Untereinheiten (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren beeinträchtigte die Markierung im Wildtyp-Hintergrund auch nicht die Aktivität der Protease, da diese Hefen auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen können (Daten nicht gezeigt).

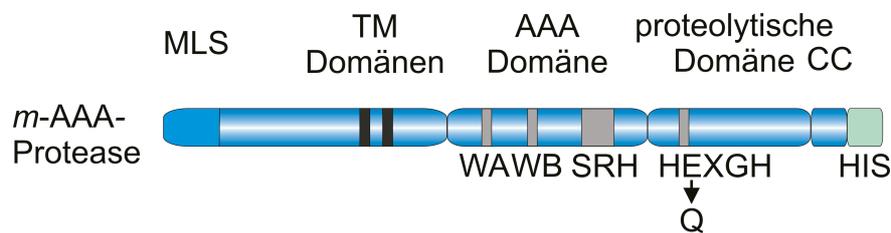


Abb. 8: Domänenstruktur einer *m*-AAA-Protease-Untereinheit. MLS, mitochondriale Lokalisierungssequenz; TM, Transmembran-Domäne; AAA, ATPase Domäne; WA, Walker A-Box; WB, Walker B-Box; SRH, "second region of homology"; HEXGH, konservierte Metallbindestelle des proteolytischen Zentrums; E->Q, Punktmutation zur Inaktivierung des proteolytischen Zentrums; CC, "coiled-coil"-Region; HIS, Hexahistidinpeptid.

Zur Identifizierung neuer Substrate wurden Mitochondrien von $\Delta yta10\Delta yta12$ -Hefezellen verwendet, die $Yta12^{E614Q}$ und $Yta10^{E559Q}$ mit oder ohne Hexahistidinpeptid exprimieren. Um mögliche Interaktionen zwischen der Protease und Substraten nicht zu zerstören, wurden die Mitochondrien unter milden Solubilisierungsbedingungen mit Hilfe von Digitonin lysiert. Nachdem die mitochondrialen Extrakte auf eine NiNTA-Affinitätssäule aufgetragen worden waren, wurden gebundene Proteine mit 400 mM Imidazol eluiert (Abb. 9). In dieser Fraktion eluierte die assemblierte *m*-AAA-Protease, bestehend aus $Yta10^{HIS}$ und Yta12. Des Weiteren konnten auch Prohibitin 1 (Phb1) und Prohibitin 2 (Phb2) immunologisch in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden. Phb1 und Phb2 bilden hochmolekulare Prohibitin-Komplexe (~1,2 MDa) in der inneren Mitochondrienmembran (Steglich *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass diese Komplexe mit der *m*-AAA-Protease interagieren und deren Aktivität regulieren können (Steglich *et al.*, 1999). Neben dieser schon bekannten Interaktion konnte noch eine weitere Bande identifiziert werden. Das ~20 kDa große Protein wurde mit Hilfe der "peptide-mass-fingerprint"-

Analyse als MrpL32, ein Bestandteil der großen mitochondrialen Ribosomenuntereinheit (Grohmann *et al.*, 1991), identifiziert. Hierbei handelte es sich um eine spezifische Koelution von MrpL32 mit der *m*-AAA-Protease, da MrpL32 nicht in der Fraktionierung von *yta10^{EQ}yta12^{EQ}*-Mitochondrien nachgewiesen werden konnte.

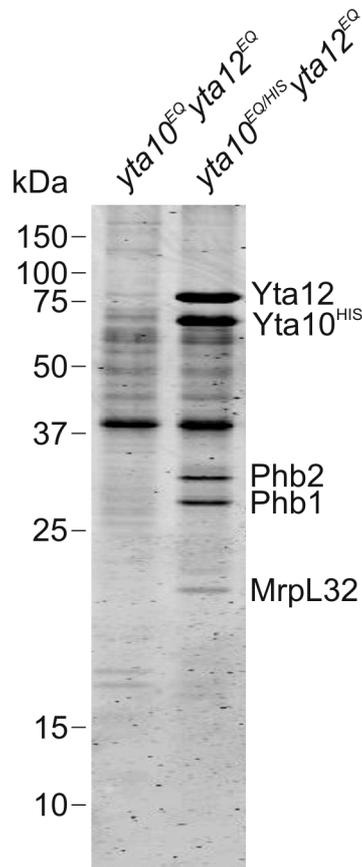


Abb. 9: MrpL32 interagiert, neben dem Prohibitin-Komplex, mit der *m*-AAA-Protease. *yta10^{EQ}yta12^{EQ}*- und *yta10^{EQ/HIS}yta12^{EQ}*-Mitochondrien wurden auf eine NiNTA-Affinitätssäule aufgetragen und gebundene Proteine mit Imidazol eluiert. Die präzipitierten Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit colloidalem Coomassie angefärbt. MrpL32 wurde mit Hilfe der "peptide-mass-fingerprint"-Analyse identifiziert.

3.3 Reifung von MrpL32

3.3.1 *m*-AAA-Protease-abhängige Prozessierung von MrpL32 *in vitro*

Die Interaktion von MrpL32 mit der proteolytisch inaktiven Variante der *m*-AAA-Protease deutet daraufhin, dass MrpL32 ein neues Substrat der *m*-AAA-Protease ist. Um dies zu testen, wurde MrpL32 in einem zellfreien System in Gegenwart von ³⁵S-Methionin synthetisiert und posttranslational in isolierte Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10$ - und $\Delta yta12$ -Mitochondrien importiert (Abb. 10). Der Import von MrpL32 in die WT-

Mitochondrien war vom Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran abhängig ($+\Delta\Psi$). Es fiel jedoch auf, dass eine kleinere Form (m) von MrpL32 nach dem Import erzeugt wurde, welche im Gegensatz zu der größeren Form (p) resistent gegenüber Proteinase K (PK) war. Dies bedeutet, dass diese Form durch die äußere Mitochondrienmembran vor der Protease geschützt wurde. Zur submitochondrialen Lokalisierung von MrpL32 wurde die äußere Membran durch osmotisches Schwellen in Gegenwart von PK geöffnet. Auch unter diesen Bedingungen war MrpL32 gegenüber Proteinase K resistent. MrpL32 ist daher in der Matrix lokalisiert und wird von der inneren Mitochondrienmembran vor der Protease geschützt.

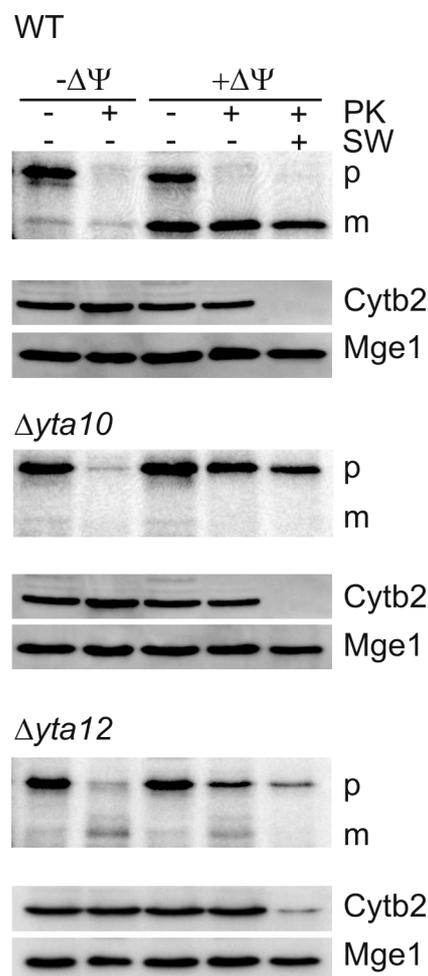


Abb. 10: Die Reifung von MrpL32 nach Import in Mitochondrien ist abhängig von der *m*-AAA-Protease. Radioaktiv markiertes MrpL32 wurde posttranslational für 30 min bei 25°C in isolierte Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10$ -, $\Delta yta12$ -Mitochondrien importiert. Das Membranpotential wurde durch die Zugabe von Valinomycin zerstört ($-\Delta\Psi$). Nicht importiertes Material wurde durch die Zugabe von Proteinase K (PK; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 30 min bei 4°C abgebaut. Die äußere Membran wurde zur Bestimmung der submitochondrialen Lokalisierung durch osmotisches Schwellen (SW) in Gegenwart von PK geöffnet. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Zur Kontrolle des Schwell-Experimentes wurde ein Western-Blot gegen das Intermembranraumprotein Cytochrom *b*2 (Cytb2) und das Matrixprotein Mge1 durchgeführt. p, Vorstufenform; m, reife Form.

Interessanterweise erfolgte jedoch keine Reifung von MrpL32 in *m*-AAA-Protease-defizienten Mitochondrien ($\Delta yta10$ und $\Delta yta12$). Dies lag jedoch nicht an einem gestörten Import, da die nicht-prozessierte Form in diesen Mitochondrien auch vor PK geschützt in der Matrix vorlag. Die *m*-AAA-Protease spielt somit für die Prozessierung von MrpL32 in Mitochondrien eine wichtige Rolle.

3.3.2 MrpL32 ist in Eubakterien und eukaryontischen Mitochondrien konserviert

MrpL32 ist eine Komponente der großen mitochondrialen Ribosomenuntereinheit. Ein Sequenzvergleich der homologen Proteine aus Eubakterien (*E. coli*) und aus eukaryontischen Mitochondrien von Mensch und Maus zeigt eine hohe Konservierung (Abb. 11). Insgesamt gibt es 145 homologe MrpL32-Proteine in 140 Arten (von Mering *et al.*, 2005). Im Vergleich von MrpL32 aus Hefe mit dem menschlichen Homolog beträgt die Sequenzidentität 22% und die Sequenzähnlichkeit 47%. Die Bestimmung des aminoterminalen Endes von MrpL32 in *S. cerevisiae* mittels Edman-Sequenzierung identifizierte die Aminosäure Alanin an Position 72 als Amino-Terminus des reifen Proteins (Grohmann *et al.*, 1991). Der Vergleich von MrpL32 aus Eubakterien und Eukaryonten zeigt eine N- und C-terminale Verlängerung. Hierbei handelt es sich um eine generelle evolutive Entwicklung. Im Vergleich zu bakteriellen Ribosomen ist in mitochondrialen Ribosomen das Verhältnis von Protein zu rRNA invertiert. So beträgt das Verhältnis in bakteriellen Ribosomen 33% Proteine zu 67% rRNA und in mitochondrialen Ribosomen 69% Proteine zu 31% rRNA. Der Verlust der rRNA wird durch eine Erhöhung des Proteinanteils kompensiert, was sich in der Regel in einer Verlängerung der Proteine widerspiegelt (Suzuki *et al.*, 2001a; Suzuki *et al.*, 2001b; O'Brien, 2002).

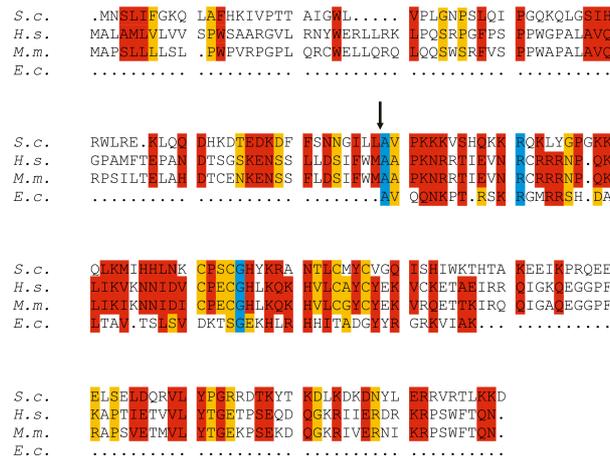


Abb. 11: Sequenzvergleich von MrpL32. S.c., *Saccharomyces cerevisiae*; H.s., *Homo sapiens*; M.m., *Mus musculus*; E.c., *Escherichia coli*. Der Vergleich wurde mit ClustalW erstellt. Die Farben bedeuten: blau, alle Aminosäuren der Spalte sind identisch; rot, die Hälfte der Aminosäuren in einer Spalte sind identisch oder gehören einer Gruppe mit hoher Ähnlichkeit an; gelb, mehr als die Hälfte der Aminosäuren in einer Spalte gehören einer Gruppe mit geringer Ähnlichkeit an. Der Pfeil zeigt die Reifungsstelle von MrpL32 an.

3.3.3 *m*-AAA-Protease-abhängige Prozessierung von MrpL32 *in vivo*

Das Import-Experiment hat eine *m*-AAA-Protease-abhängige Reifung von MrpL32 *in vitro* gezeigt. Zur Überprüfung, ob diese Reifung auch *in vivo* in Hefezellen stattfindet, wurden zwei polyklonale Antikörper gegen MrpL32 hergestellt. Ein Peptid-Antikörper war spezifisch gegen die Vorstufenform gerichtet, da das zur Antikörper-Herstellung verwendete Peptid den Aminosäuren 45-59 von MrpL32 entsprach. Des Weiteren wurde auch noch ein Peptidantikörper gegen die Aminosäuren 131-145 hergestellt. Dieser Antikörper sollte sowohl die Vorstufenform als auch die reife Form erkennen. Überraschenderweise erkannte er aber nur die reife Form. Mit Hilfe dieser beiden Antikörper wurde die Reifung von MrpL32 in verschiedenen Hefestämmen untersucht (Abb. 12). Es stellte sich auch hier heraus, dass MrpL32 in Wildtyp (WT)-Mitochondrien prozessiert wird, jedoch nicht in *m*-AAA-Protease-defizienten Mitochondrien ($\Delta yta10$, $\Delta yta12$). Es muss allerdings erwähnt werden, dass bei langen Expositionen sehr geringe Mengen von prozessiertem MrpL32 nachgewiesen werden konnten (Abb. 12), was darauf hinweist, dass MrpL32 möglicherweise sehr ineffizient von einer anderen Protease prozessiert werden kann. Die proteolytische Inaktivierung einer Untereinheit der *m*-AAA-Protease ($yta10^{EQ}$ oder $yta12^{EQ}$) führte zu keiner Beeinträchtigung der Reifung, da diese Mutanten noch eine proteolytisch aktive Untereinheit besitzen. Es wurde bereits gezeigt, dass weder die Assemblierung noch die Atmungskompetenz dieser Mutanten gestört ist (Arlt *et al.*,

1998). Im Gegensatz dazu findet keine Reifung statt, wenn beide Untereinheiten inaktiviert sind ($yta10^{EQ}yta12^{EQ}$). Somit konnte gezeigt werden, dass MrpL32 auch *in vivo* durch die *m*-AAA-Protease prozessiert wird und dass diese Prozessierung abhängig von der proteolytischen Aktivität der *m*-AAA-Protease ist. Hierbei handelt es sich um eine N-terminale Reifung, da die gereifte Form nicht mehr von dem Präsequenz-spezifischen Antikörper erkannt wurde.

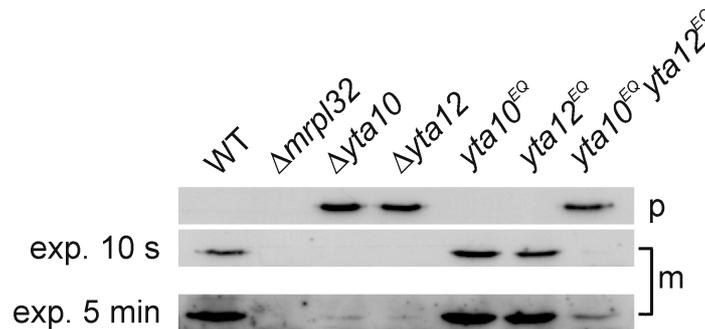


Abb. 12: N-terminale Reifung von MrpL32 *in vivo*. Die Reifung von MrpL32 *in vivo* wurde in isolierten Mitochondrien (je 30 μ g) untersucht. Zum Nachweis von MrpL32 wurden ein Präsequenz-spezifischer und ein gegen das reife Protein gerichteter Antikörper verwendet. WT, Wildtyp; $\Delta mrpL32$; $\Delta yta10$; $\Delta yta12$; $yta10^{EQ}$, $\Delta yta10$ -Zellen mit Expression von Yta10^{E559Q}; $yta12^{EQ}$, $\Delta yta12$ -Zellen mit Expression von Yta12^{E614Q}; $yta10^{EQ} yta12^{EQ}$, $\Delta yta10\Delta yta12$ -Zellen mit Expression von Yta10^{E559Q} und Yta12^{E614Q}. exp., Exposition; p, Vorstufenform; m, reife Form von MrpL32.

3.3.4 C-Terminale Prozessierung von MrpL32

Im vorangegangenen Experiment wurde eine von der *m*-AAA-Protease abhängige N-terminale Reifung von MrpL32 gezeigt. Dieses Experiment schließt jedoch eine weitere C-terminale Reifung nicht aus. Aus diesem Grunde wurde auf genomischer Ebene mit Hilfe der homologen Rekombination MrpL32 am 3' Ende mit der Information für ein dreifaches Hämagglutinin-Epitop (HA) versehen. Diese Markierung wurde sowohl in Wildtyp (*MRPL32HA3*)- als auch in $\Delta yta10$ (*MRPL32HA3/\Delta yta10*)-Zellen durchgeführt. Die Überprüfung der erfolgreichen Integration der Markierung im Genom wurde mittels PCR durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der *MRPL32HA3* Mitochondrien mit einem HA-spezifischen Antikörper zeigte jedoch kein Signal (Abb. 13). Im Gegensatz dazu konnte eine HA-spezifische Bande in *MRPL32HA3/\Delta yta10*-Mitochondrien nachgewiesen werden. Die Größe der Bande korreliert mit der Größe der Vorstufenform. Hierbei handelte es sich um ein spezifisches Signal, da eine entsprechende Bande in WT-Mitochondrien ohne eine HA-Markierung nicht nachgewiesen werden konnte. Das Ergebnis legt die

Vermutung nahe, dass MrpL32 auch C-terminal von der *m*-AAA-Protease gereift wird und deshalb keine reife MrpL32 Bande in den *MRPL32HA3*-Mitochondrien nachgewiesen werden konnte. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass lediglich nur das HA-Epitop abgespalten wird.

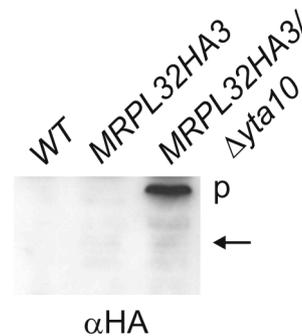


Abb. 13: C-terminale Reifung von MrpL32 *in vivo*. Die C-terminale Reifung von MrpL32 *in vivo* wurde in Wildtyp (WT)-, *MRPL32HA3*- und *MRPL32HA3/Δyta10*-Mitochondrien (je 30 µg) untersucht. HA-markiertes MrpL32 wurde mit einem HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Pfeil markiert die erwartete Größe des reifen MrpL32 Proteins. p, Vorstufenform.

Es stellt sich nun die Frage, ob diese C-terminale Reifung für die Funktion des Proteins essentiell ist. Da es sich bei der HA-Markierung um ein kleines Epitop (27 Aminosäuren) handelt, was im Fall von MrpL32 zu keiner Beeinträchtigung der Proteinfunktion führte (Daten nicht gezeigt), wurde im folgenden Versuch MrpL32 mit einem großen GFP-Epitop (27 kDa) versehen. Es sollte untersucht werden, ob die Markierung mittels eines GFP-Epitops die C-terminale Reifung stört und welche Auswirkungen dies auf die Funktion des Proteins hat. In der Tat führte die Markierung von MrpL32 mit einem GFP-Epitop zum Verlust der C-terminalen Reifung (Abb. 14A), da im Wildtyp (WT)-Hintergrund keine prozessierte GFP-Domäne nachgewiesen werden konnte. Jedoch zeigte der Vergleich mit *Δyta12/MRPL32GFP*-Mitochondrien, dass die N-terminale Reifung nicht beeinträchtigt war, da die reife Form im WT ca. 8 kDa kleiner war als die Vorläuferform. Dieser Unterschied kann nur durch die Prozessierung der ersten 71 Aminosäuren hervorgerufen werden. In systematischen Deletionsanalysen von Hefegenen konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *MRPL32*, wie der Verlust von *YTA10* oder *YTA12* (Tauer *et al.*, 1994; Tzagoloff *et al.*, 1994; Guélin *et al.*, 1996), zur Beeinträchtigung der Atmungskompetenz führt (Steinmetz *et al.*, 2002). Diese Hefestämme sind nicht in der Lage, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. Interessanterweise führte jedoch die gestörte C-terminale Reifung von MrpL32 zu keinem Funktionsverlust, da

der Hefestamm *MRPL32GFP* atmungskompetent ist (Abb. 14B). Zusammenfassend wird MrpL32 neben der schon gezeigten N-terminalen Prozessierung vermutlich auch C-terminal gereift, wobei diese Reifung nicht essentiell für die Funktion des Proteins ist.

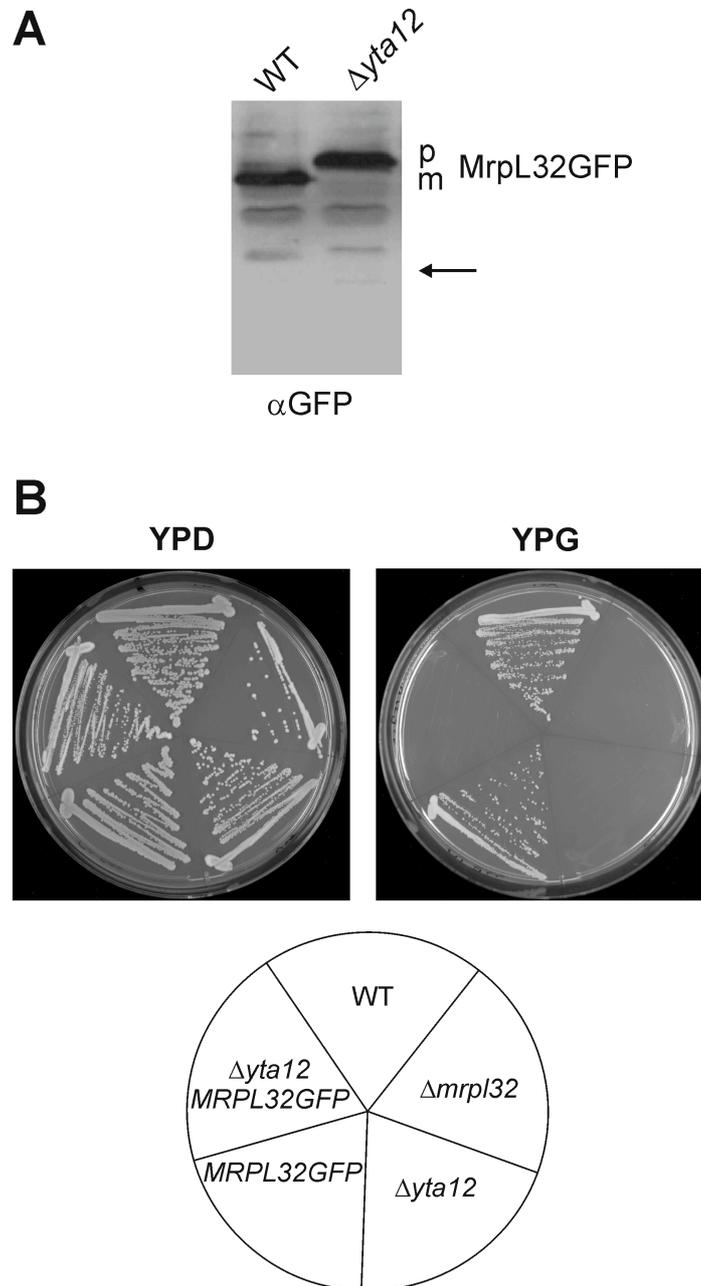


Abb. 14: C-terminale Prozessierung von MrpL32 *in vivo*. (A) Die C-terminale Reifung von MrpL32 *in vivo* wurde in isolierten *MRPL32GFP*- und Δ yta12/*MRPL32GFP*-Mitochondrien (je 30 μ g) untersucht. Durch GFP-markiertes MrpL32 wurde mit einem GFP-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Pfeil markiert die erwartete Position der GFP-Bande. p, Vorstufenform; m, reife Form. (B) Wildtyp (WT)-, Δ mrp132-, Δ yta12-, *MRPL32GFP*- und Δ yta12/*MRPL32GFP*-Zellen wurden auf YPD- und YPG-Medium ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

3.4 Die ersten 77 Aminosäuren von MrpL32 sind notwendig für den Import in Mitochondrien

Die Translokation von mitochondrialen Matrixproteinen hängt meistens von einem spezifischen Signalpeptid ab, welches sich am aminoterminalen Ende des Vorläuferproteins befindet. Nach dem Import wird diese Sequenz in der mitochondrialen Matrix von einer Signalpeptidase (MPP, mitochondriale Prozessierungspeptidase) entfernt (Böhni *et al.*, 1983; Hawlitschek *et al.*, 1988). Das Signalpeptid bildet in der Regel eine amphipatische α -Helix aus, in der positiv geladene Reste auf einer Seite der Helix positioniert sind, während hydrophobe Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Seite angeordnet sind. Die Präsequenz von MrpL32 (1-71) zeichnet sich nicht durch eine solche charakteristische mitochondriale Signalsequenz aus. Dennoch führt die Deletion der Präsequenz zu einem völligen Verlust der Importkompetenz (Abb. 15A). Somit enthält die Präsequenz notwendige Elemente für den mitochondrialen Import.

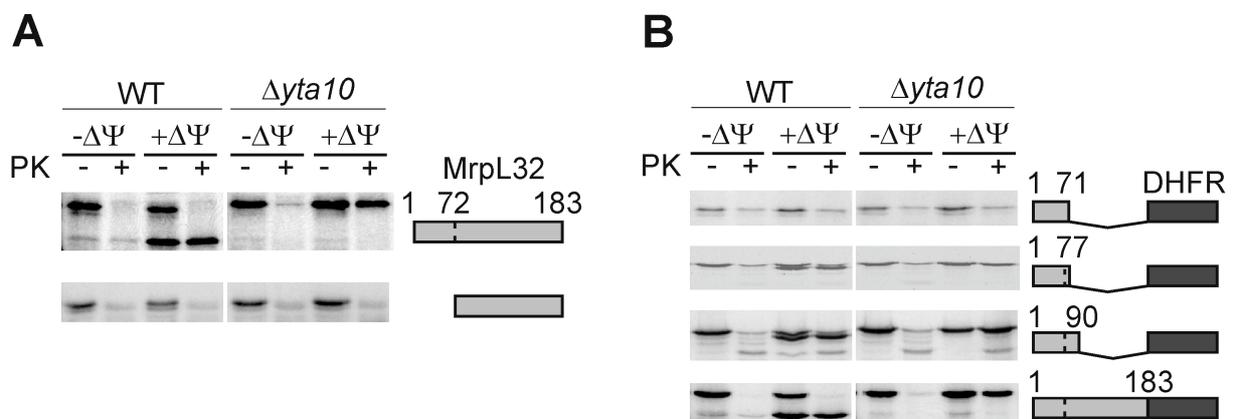


Abb. 15: Die ersten 77 Aminosäuren sind für den mitochondrialen Import von MrpL32 notwendig. ³⁵S-markiertes (A) MrpL32 (1-183) und MrpL32 (72-183), oder (B) MrpL32 (1-71)-DHFR, MrpL32 (1-77)-DHFR, MrpL32 (1-90)-DHFR und MrpL32 (1-183)-DHFR wurden in Wildtyp (WT)- und in $\Delta yta10$ -Mitochondrien, wie in Abb. 10 beschrieben, importiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Ob die Präsequenz ausreicht, um ein heterologes Protein in Mitochondrien zu importieren, sollte der folgende Versuch klären. Dazu wurden MrpL32 und MrpL32-Fragmente verschiedener Längen mit dem Reporterprotein Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus fusioniert. DHFR selbst enthält keine mitochondriale Signalsequenz und wird nicht in Mitochondrien importiert. Das Hybridprotein MrpL32 (1-183)-DHFR wird jedoch importiert, da die Volllängeform von MrpL32 die potentielle

mitochondriale Signalsequenz enthält (Abb. 15B). Im Gegensatz dazu reicht die Präsequenz von MrpL32 alleine nicht aus, um das Hybridprotein MrpL32 (1-71)-DHFR in Mitochondrien zu importieren. Fusioniert man dagegen mindestens die ersten 77 Aminosäuren von MrpL32 mit DHFR, werden diese Konstrukte effizient importiert. Diese zusätzlichen sechs Aminosäuren (72-77) sind zusammen mit der Präsequenz (1-71) entscheidend für den Import. In der Sequenz von MrpL32 ist zu erkennen, dass das C-terminale Ende der Präsequenz reich an negativ geladenen Aminosäuren ist, wobei die zusätzlichen sechs Aminosäuren überwiegend positiv geladen sind (Abb. 11). Es ist denkbar, dass beide Segmente miteinander interagieren, eine Haarnadelstruktur ausbilden und somit den Import ermöglichen. Ein solcher Mechanismus wurde schon für den Import von Bcs1 postuliert (Folsch *et al.*, 1996).

3.5 Die Prozessierung ist essentiell für die Funktion von MrpL32

1.1.1 Die Expression von reifem MrpL32 rettet den $\Delta mrp132$ -Phänotyp

Es konnte gezeigt werden, dass MrpL32 sowohl am N- als auch am C-Terminus proteolytisch gespalten wird, wobei die C-terminale Prozessierung nicht essentiell für die Funktion von MrpL32 ist. Des Weiteren können die ersten 77 Aminosäuren als Signalsequenz dienen. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die Präsequenz und die N-terminale Reifung für die Funktion von MrpL32 notwendig sind. Dazu wurde die Präsequenz (1-71) von MrpL32 gegen die Präsequenz (1-69) der Untereinheit 9 der mitochondrialen F_1F_0 -ATPase von *N. crassa* ausgetauscht. Diese Sequenz erlaubt auch in *S. cerevisiae* einen mitochondrialen Import. Während des Imports wird die Signalsequenz an zwei Stellen, nach den Aminosäuren 35 und 66, durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) hydrolytisch gespalten (Schmidt *et al.*, 1984; Ungermann *et al.*, 1994). Das Hybridprotein Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) sollte somit eine mitochondriale Lokalisierung und eine von der *m*-AAA-Protease unabhängige Reifung von MrpL32 ermöglichen. Der diploide Hefestamm $\Delta mrp132/MrpL32$ wurde mit diesem Konstrukt und zur Kontrolle mit Wildtyp-MrpL32 transformiert. Nach Sporulation und Tetradenanalyse wurden Sporen isoliert, die die Plasmide und die genomische Deletion von *MRPL32* enthielten. In diesem Fall war es notwendig, den diploiden Stamm und die Tetraden-

analyse zu verwenden, da der Verlust der mitochondrialen DNA aufgrund defekter mitochondrialer Translation ausgeschlossen werden sollte (Myers *et al.*, 1985; Contamine und Picard, 2000). Die Sporen wurden anschließend auf ihre Atmungskompetenz untersucht. Wie schon beschrieben, sind $\Delta mrp132$ -Hefezellen nicht in der Lage, auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen (Steinmetz *et al.*, 2002). Sowohl die Expression von MrpL32 als auch die von Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) konnte die Atmungskompetenz wiederherstellen (Abb. 16A). Die Reifung von MrpL32 ist somit wichtig für die Funktion des Proteins und die Atmungskompetenz der Zelle.

Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) konnte den Defekt nur komplementieren, wenn es von einem 2 μ -Plasmid überexprimiert wurde. Dies spiegelt sich aber nicht in den Proteinmengen wider, da im Vergleich zum Wildtyp in diesen Mitochondrien die Menge an reifem MrpL32 sogar verringert ist (Abb. 16B). Möglicherweise ist die Präsequenz von MrpL32 für eine effiziente Reifung bzw. für eine richtige Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran notwendig. Der Austausch bewirkt somit eine gestörte Faltung bzw. Lokalisation und in Folge dessen den Abbau von MrpL32.

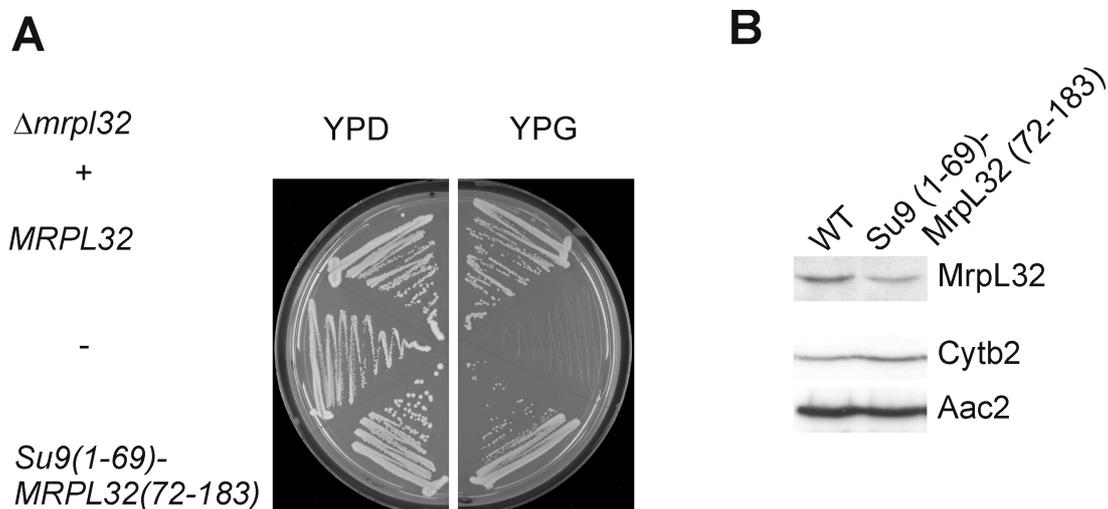


Abb. 16: Die Expression von Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) komplementiert den $\Delta mrp132$ -Phänotyp. (A) Wachstumsanalyse von $\Delta mrp132$ -, $\Delta mrp132$ -Sporen mit Expression von MrpL32 oder Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) auf einer fermentierbaren (YPD) und einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle (YPG) bei 30°C. **(B)** Proteinmenge an reifem MrpL32 in isolierten Mitochondrien (30 μ g) von Wildtyp (WT) und $\Delta mrp132$ mit Expression von Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) Zellen. Der Nachweis von Cytochrom *b*2 (Cytb2) und dem ADP-ATP Transporter Aac2 diente als Ladekontrolle.

3.5.2 Reifes MrpL32 komplementiert den Atmungsdefekt von *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen

Der Verlust der *m*-AAA-Protease führt wie die Deletion von MrpL32 zu einem Atmungsdefekt (Tauer *et al.*, 1994; Tzagoloff *et al.*, 1994; Guélin *et al.*, 1996; Steinmetz *et al.*, 2002). Es ist denkbar, dass der Atmungsdefekt durch die fehlende Prozessierung von MrpL32 verursacht wird. Um dies zu untersuchen, wurde das Konstrukt Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) in $\Delta yta10$ - und $\Delta yta10/\Delta mrp132$ -Hefezellen exprimiert. In der Tat konnte die Expression des Hybridproteins den Atmungsdefekt der $\Delta yta10$ -Hefezellen partiell retten (Abb. 17A). Die partielle Komplementation könnte auf verringerten MrpL32-Mengen beruhen (Abb. 17B). Weitere Experimente sollen nun zeigen, ob eine Erhöhung der Proteinmengen an reifem MrpL32 eine vollständige Komplementation ermöglicht, oder ob die gestörte Proteolyse anderer Substrate den partiellen Effekt bewirkt. Dessen ungeachtet zeigt dieses Experiment, dass die Prozessierung von MrpL32 eine der wichtigsten Aufgaben der *m*-AAA-Protease im Mitochondrium ist, da die Expression von reifem MrpL32 den Atmungsdefekt von *m*-AAA-Protease-defizienten Hefezellen retten kann.

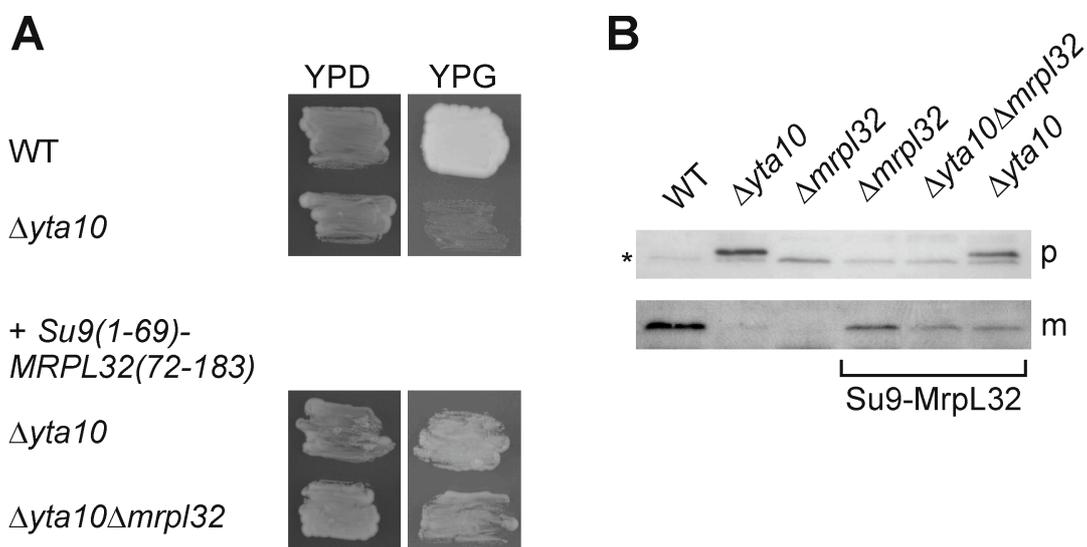


Abb. 17: Die Expression von Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) kann den Atmungsdefekt von *m*-AAA-Protease-defizienten Hefezellen komplementieren. (A) Wachstumsanalyse von Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10$ -, $\Delta yta10$ - und $\Delta yta10\Delta mrp132$ -Hefezellen mit Expression von Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) auf einer fermentierbaren (YPD) und einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle (YPG) nach einer Inkubation von drei Tagen, im Falle von den komplementierten Stämmen von sieben Tagen. **(B)** Proteinmenge der Vorstufenform und von reifem MrpL32 in isolierten Mitochondrien (30 μ g) von Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10$ -, $\Delta mrp132$ -, und $\Delta mrp132$ -, $\Delta yta10\Delta mrp132$ -, $\Delta yta10$ -Zellen mit Expression von Su9 (1-69)- (72-183). p, Vorstufenform; m, reife Form.

3.5.3 Die Reifung des Hybridproteins Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) ist MPP abhängig

Da MPP essentiell für das Zellwachstum ist (Yaffe und Schatz, 1984; Yaffe *et al.*, 1985; Witte *et al.*, 1988), konnte mit dem vorangegangenen Versuchsansatz nicht gezeigt werden, dass die Komplementation des $\Delta mrpL32$ -Atmungsdefektes mit Hilfe des Konstruktes Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) von der Prozessierung durch MPP abhängig ist. Mit Hilfe der Temperatur-sensitiven *MAS2*-Mutante (*mas2^{ts}*), welche eine Mutation in der α -Untereinheit von MPP enthält, konnte gezeigt werden, dass das Hybridprotein Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) in der Tat MPP-abhängig prozessiert wird. Dazu wurde Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) und als Kontrolle Su9 (1-69)-DHFR (Stan *et al.*, 2000) in Wildtyp (WT)- und in *mas2^{ts}* (*mas2*)-Mitochondrien importiert. Beide Proteine wurden abhängig von Membranpotential ($+\Delta\Psi$) importiert und prozessiert (Abb. 18A). Wurden diese Proteine in *mas2^{ts}*-Mitochondrien importiert, die vor dem Import zur Induktion des Temperatur-sensitiven Phänotyps für 30 min bei 39°C inkubiert worden waren, so war diese Prozessierung gestört. Hierbei handelt es sich nicht um einen vollständigen Prozessierungsdefekt, da Temperatur-sensitive Mutationen in der Regel zu keinem vollständigen Funktionsverlust des Proteins führen. Der beobachtete Effekt ist vergleichbar mit schon publizierten Daten für andere mitochondriale Vorstufenproteine (Yaffe und Schatz, 1984).

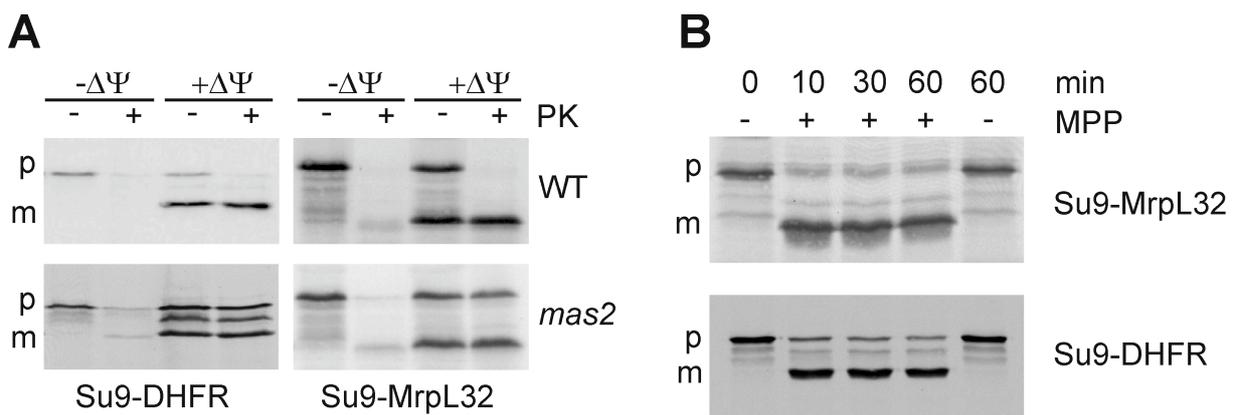


Abb. 18. MPP-abhängige Prozessierung von Su9 (1-69)-DHFR und Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183). (A) ^{35}S -Methionin markiertes Su9 (1-69)-DHFR und Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) wurden post-translational für 30 min bei 25°C in isolierte Wildtyp (WT)- und *mas2^{ts}* (*mas2*)-Mitochondrien importiert. Vor dem Import wurden die Mitochondrien zur Induktion der Temperatur-Sensitivität für 30 min bei 39°C inkubiert. Das Membranpotential wurde durch die Zugabe von Valinomycin zerstört ($-\Delta\Psi$). Nicht importiertes Material wurde durch die Zugabe von Proteinase K (PK; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 30 min bei 4°C abgebaut. (B) ^{35}S -Methionin markiertes Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) und Su9 (1-69)-DHFR wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit und ohne gereinigtem MPP inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. p, Vorstufenform; m, reife Form.

In einem weiteren Experiment wurden ^{35}S -markiertes Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) und wieder als Kontrolle Su9 (1-69)-DHFR mit gereinigtem MPP inkubiert (Abb. 18B). Eine Inkubationszeit von 10 min reichte aus, um die Hybridproteine *in vitro* zu ~90 % zu prozessieren. Beide Experimente zeigen, dass die Prozessierung von Su9 (1-69)-MrpL32 (72-183) MPP-abhängig ist, wie es schon für das Konstrukt Su9 (1-69)-DHFR gezeigt werden konnte (Stan *et al.*, 2000).

3.6 Der Verlust der m-AAA-Protease führt zu einer defekten mitochondrialen Translation

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass MrpL32 durch die *m*-AAA-Protease prozessiert wird und die Expression von reifem MrpL32 den Atmungsdefekt von *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen partiell retten kann. Zur Untersuchung, ob die Prozessierung von MrpL32 eine Auswirkung auf die mitochondriale Translation hat, wurde *in vivo* die Translation in Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10$ - und $\Delta yta12$ - und als Kontrolle in $\Delta mrp132$ - und $\Delta yme1$ -Zellen untersucht. Die Markierung der mitochondrialen Translationsprodukte erfolgte durch Inkubation der Hefen für 10 min bei 30°C in Minimalmedium, das ^{35}S -Methionin enthielt. Die cytosolische Translation wurde vor und während der Markierung durch Zugabe von Cycloheximid inhibiert. Anschließend wurden die Hefen mit Hilfe einer alkalischen Lyse aufgeschlossen. Die mitochondrialen Translationsprodukte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Autoradiographie analysiert. Die Quantifizierung der gesamten Radioaktivität erfolgte mit einem Szintillationszähler. In der Hefe werden acht Proteine vom mitochondrialen Genom kodiert (Tzagoloff *et al.*, 1979; Tzagoloff und Myers, 1986; Foury *et al.*, 1998). Die acht Translationsprodukte (Var1, CoxI, CoxII, CoxIII, Cytb, ATPase6, 8 und 9) konnten in Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 19A). Der Vergleich mit *m*-AAA-Protease-defizienten Stämmen wie $\Delta yta10$ oder $\Delta yta12$ zeigte jedoch, dass in diesen Stämmen die Translationseffizienz um ca. 90% verringert ist (Abb. 19B). Die Deletion von *MRPL32* führte zu einem kompletten Verlust der mitochondrialen Translation, da die Proteinsynthese von der Integrität der mitochondrialen DNA (mtDNA) abhängt (Myers *et al.*, 1985; Contamine und Picard, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *MRPL32* zum partiellen Verlust der mtDNA führt (ρ^- , Daten nicht gezeigt). Die reduzierten mitochondrialen Translationseffizienzen in $\Delta yta10$ - oder $\Delta yta12$ -Zellen legten nahe, dass die *m*-AAA-

Protease-abhängige Prozessierung von MrpL32 wichtig für die mitochondriale Translation ist. Mit diesem Ergebnis können nun auch frühere Beobachtungen erklärt werden. So verlieren 10-20% von *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen in der stationären Phase ihre mtDNA (Rep und Grivell, 1996). Der unvollständige Verlust der mtDNA kann damit erklärt werden, dass in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease sehr geringe Mengen an MrpL32 von einer anderen Peptidase prozessiert werden können (Abb. 12). Diese Menge reicht wahrscheinlich aus, um die 10%ige Translationseffizienz aufrechtzuerhalten und die mtDNA zu stabilisieren.

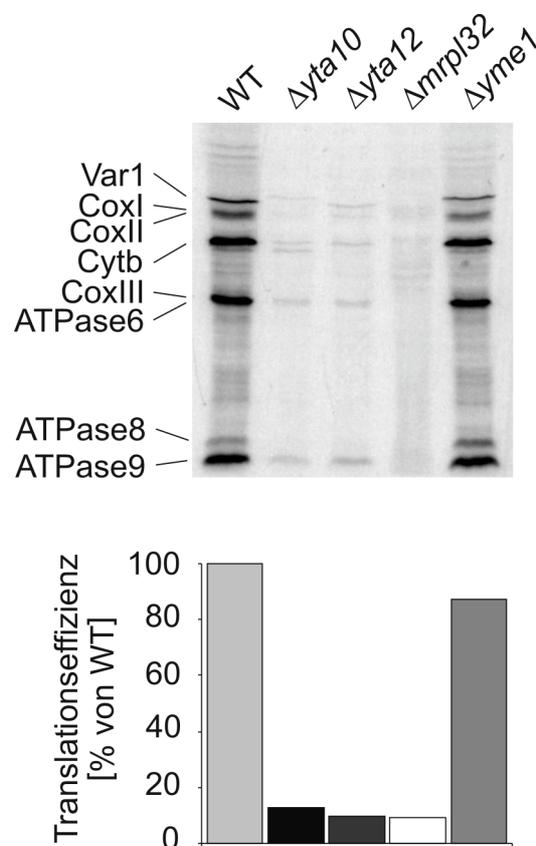


Abb. 19: Der Verlust der *m*-AAA-Protease führt zu einem Translationsdefekt. Mitochondriale Translationsprodukte wurden *in vivo* in Hefe-Zellen (Wildtyp (WT), $\Delta yta10$, $\Delta yta12$, $\Delta mrp132$, $\Delta yme1$) in Gegenwart von ^{35}S -Methionin und Cycloheximid radioaktiv markiert. Die Zellen wurden mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Die Analyse der Translationsprodukte (Var1, CoxI, CoxII, CoxIII, Cytb, ATPase6, 8 und 9) erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie. Im unteren Teil der Abbildung ist der Mittelwert der gesamten Radioaktivität der Translationsprodukte von drei unabhängigen Versuchen wiedergegeben.

3.7 Assemblierung mitochondrialer Ribosomen in Abwesenheit der m-AAA-Protease

Die Beeinträchtigung der MrpL32-Prozessierung führt in *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen zu einem Translationsdefekt, der auf verschiedenen Gründe beruhen kann: Eine gestörte MrpL32-Prozessierung könnte die Assemblierung der Ribosomen stören und zum Abbau ribosomaler Proteine durch die PIM1-Protease führen (Suzuki *et al.*, 1997). Die Deletion von *YTA10*, *YTA12* oder die Inaktivierung des proteolytischen Zentrums der *m*-AAA-Protease-Untereinheiten (*yta10^{EQ}*, *yta12^{EQ}*, *yta10^{EQ}yta12^{EQ}*) bewirkte jedoch keine Veränderung der Proteinmengen von Komponenten der großen Untereinheit (Mrp7, Mrp20 und Mrp49) oder der kleinen Untereinheit (Mrp13) (Abb. 20).

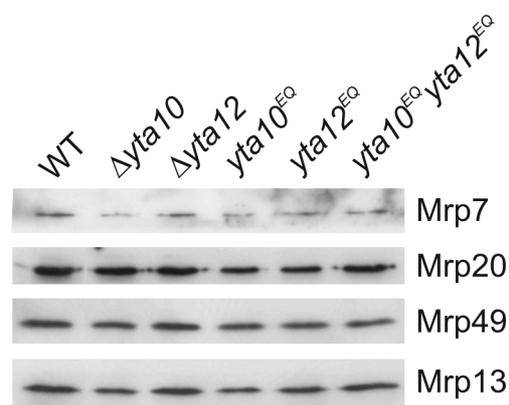


Abb. 20: Die Inaktivierung der *m*-AAA-Protease führt zu keinem Verlust von ribosomalen Proteinen. Proteinmengen von Komponenten der großen Untereinheit (Mrp7, Mrp20, Mrp49) und der kleinen Untereinheit (Mrp13) in isolierten Mitochondrien (je 30 µg) von Wildtyp (WT)-, Δ*yta10*-, Δ*yta12*-, *yta10^{EQ}*-, *yta12^{EQ}*- und *yta10^{EQ}yta12^{EQ}*-Zellen. Der Nachweis erfolgte mit polyklonalen Antikörpern.

Die gestörte MrpL32-Prozessierung in Zellen, denen die *m*-AAA-Protease fehlt, führt zu keinem Verlust von ribosomalen Proteinen. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Assemblierung der Ribosomen in diesen Stämmen nicht gestört ist, oder dass der Assemblierungsdefekt erst zu einem späteren Zeitpunkt auftritt und somit die ribosomalen Proteine vor Proteolyse geschützt sind. Der folgende Versuch sollte helfen, zwischen den beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können. Dazu wurde die Assemblierung der Ribosomen mit Hilfe der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation analysiert. Diese Methode ermöglicht es, die kleine Untereinheit (37S), die große Untereinheit (54S) und das assemblierte Ribosom (70S) aufgrund ihrer

unterschiedlichen Dichten voneinander zu trennen (Nieuwenhuysen und Slegers, 1978). Mitochondriale Extrakte von Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10$ -, $\Delta yta12$ - und $\Delta mrp132$ -Zellen wurden auf einen 23-40%igen Saccharosegradienten aufgetragen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde die Verteilung der rRNA im Gradienten entweder mittels UV-Messung bei 254 nm (Abb. 21A) oder durch Fraktionierung, SDS-PAGE und Western-Blot die Position von ribosomalen Proteinen im Gradienten bestimmt (Abb. 21B).

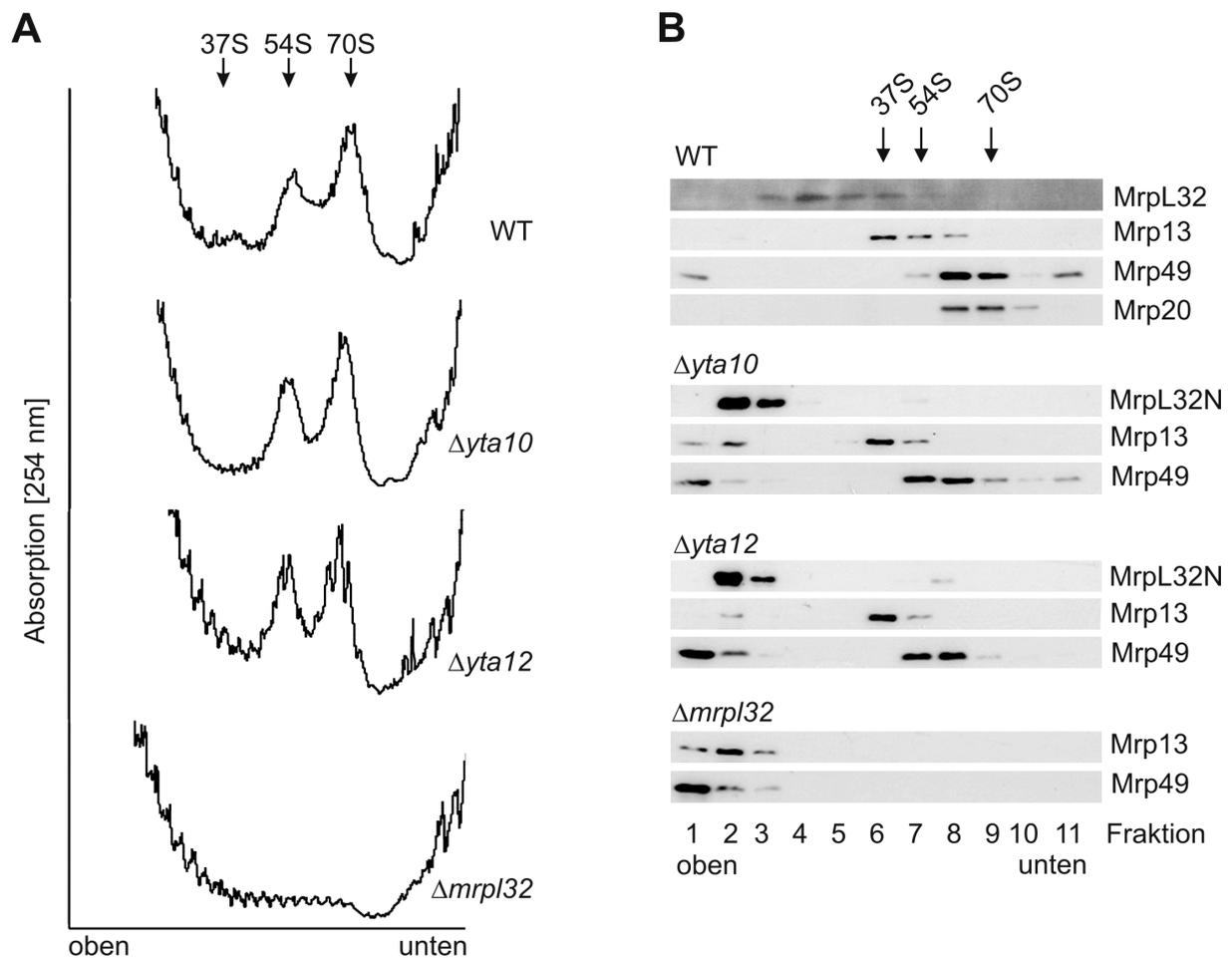


Abb. 21: Analyse der Assemblierung von mitochondrialen Ribosomen. Mitochondriale Extrakte von Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10$ -, $\Delta yta12$ - und $\Delta mrp132$ -Zellen wurden mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (23-40%) aufgetrennt. Ribosomale Untereinheiten wurden entweder durch **(A)** Messung der Absorption der rRNA bei 254 nm oder durch **(B)** Fraktionierung der Gradienten und anschließender Nachweis von ribosomalen Proteinen mittels Western-Blot und polyklonalen Antikörpern identifiziert.

Im UV-Profil von Wildtyp-Extrakten waren deutlich die Absorptionsmaxima der kleinen Untereinheit (37S), der großen Untereinheit (54S) und des assemblierten Ribosoms (70S) zu erkennen. Die mittels UV-Messung bestimmte Lage der Ribo-

somenpartikel im Gradienten stimmte auch mit den Ergebnissen der Fraktionierung überein. Die Deletion von *YTA10* und *YTA12* führte jedoch zu keiner Beeinträchtigung der Assemblierung. Dies war sowohl im UV-Profil als auch in der Fraktionierung erkennbar. Im Gegensatz dazu führte die Deletion von *MRPL32* zu einem vollständigen Verlust der assemblierten Ribosomen, da die Integrität der mitochondrialen DNA und somit auch der darauf kodierten rRNA von der Proteinsynthese abhängt (Myers *et al.*, 1985; Contamine und Picard, 2000). Die sehr geringen Mengen an reifem MrpL32 in $\Delta yta10$ - bzw. $\Delta yta12$ -Hefestämmen (Abb. 12) reichen sehr wahrscheinlich aus, um eine 10%ige Translationseffizienz aufrechtzuerhalten und damit dem Verlust von mtDNA entgegen zu wirken.

Interessanterweise führt der Verlust der *m*-AAA-Protease zu keinem Defekt in der Assemblierung der 54S-Untereinheit und des 70S-Ribosoms. Die Vorläuferform von MrpL32 ist jedoch nicht in diesen Komplexen enthalten und befindet sich im Gradienten in Fraktion 2. Die reife Form von MrpL32 ist dagegen in diesen Komplexen enthalten, wenn auch nur zu einem kleinen Prozentsatz. Der größte Teil befindet sich in einem kleinen Komplex, der kleiner als die 37S Untereinheit ist (Fraktion 4-5). Dieses Experiment zeigt, dass die Prozessierung von MrpL32 nicht für die Assemblierung der 54S-Untereinheit und des 70S-Ribosoms erforderlich ist, jedoch essentiell ist für die Integration von MrpL32 in diese Komplexe. Da die generelle Assemblierung nicht gestört ist, besteht die hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Integration von MrpL32 in die 54S-Untereinheit einer der letzten Schritte während der Assemblierung ist.

3.8 Die Insertion von MrpL32 ins Ribosom findet an der inneren Mitochondrienmembran statt

Mit Ausnahme der ribosomalen Untereinheit Var1 handelt es sich bei den mitochondrialen Translationsprodukten um hydrophobe Proteine der Atmungskettenkomplexe, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Elektronen-Mikroskopie-Aufnahmen haben gezeigt, dass in Hefe die mitochondrialen Ribosomen mit der inneren Membran assoziiert sind (Linnane *et al.*, 1973). Weitere Arbeiten konnten nachweisen, dass die Interaktion zwischen der inneren Mitochondrienmembran und den Ribosomen Salz-abhängig ist (Obbink *et al.*, 1977; Spithill *et al.*, 1978; Van der Klei *et al.*, 1994; Liu und Spremulli, 2000b). Die

Wechselwirkung beruht offenbar auf elektrostatischen Kräften zwischen der polaren Membranoberfläche und den geladenen Gruppen der Ribosomen. Jedoch können auch in Gegenwart von Triton X-100 nicht alle Ribosomen von der Membran abgelöst werden. Vermutlich wird diese Assoziation über Interaktionen mit großen Komplexen, wie zum Beispiel mit Oxa1, in der Membran vermittelt (Liu und Spremulli, 2000b; Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003). Im folgenden Versuch wurde eine mögliche Assoziation von MrpL32 mit der inneren Mitochondrienmembran untersucht. Dazu wurden Wildtyp (WT)- und $\Delta yta10$ -Mitochondrien in Anwesenheit von ansteigenden Salzkonzentrationen mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach einer Ultrazentrifugation befinden sich lösliche Matrixproteine im Überstand und Fragmente der äußeren und inneren Membran mit assoziierten Proteinen im Pellet. Mit ansteigenden Salz-Konzentrationen werden Komponenten der kleinen Untereinheit (Mrp13) und der großen Untereinheit (Mrp49), inklusive der Vorläuferform von MrpL32 (p), von der Membran abgelöst (Abb. 22A, B). Im Unterschied dazu kann reifes MrpL32 selbst mit 300 mM KCl oder in Anwesenheit von 2 M Harnstoff (Daten nicht gezeigt) nicht von der Membran abgelöst werden (Abb. 22A). Dieses Experiment lässt vermuten, dass es sich bei MrpL32 um ein Membranprotein handelt und es eine Transmembrandomäne besitzt. Jedoch konnte unter Verwendung von verschiedenen Vorhersage-Programmen (PSort, PRED-TMR, ...) keine Transmembrandomäne identifiziert werden.

Die defekte Prozessierung von MrpL32 in einem *m*-AAA-Protease-defizienten Hefestamm hat keine Auswirkung auf die Assemblierung der Ribosomen. Es ist denkbar, dass es sich bei MrpL32 um einen Ribosomen-Akzeptor handelt. Die Integration von MrpL32 in die 54S-Untereinheit wäre in diesem Falle für die Assoziation der Ribosomen mit der inneren Mitochondrienmembran notwendig. Dies konnte nicht bestätigt werden, da in $\Delta yta10$ -Mitochondrien die Assoziation der kleinen und großen Untereinheit mit der inneren Mitochondrienmembran dieselbe Salz-Abhängigkeit zeigt wie in WT-Mitochondrien (Abb. 22A, B). Wie schon erwähnt wird vermutet, dass Ribosomen mit anderen größeren Komplexen in der Membran interagieren können. So konnte bereits gezeigt werden, dass das Protein Oxa1, welches für die Insertion von Proteinen in die innere Mitochondrienmembran wichtig ist, mit mitochondrialen Ribosomen interagiert (Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003). Diese Interaktion könnte möglicherweise eine gestörte Assoziation aufgrund der defekten Prozessierung von MrpL32 kompensieren. Aber die Deletion von *OXA1* im $\Delta yta10$ -

Hintergrund zeigte keine Auswirkung auf die Assoziation der Ribosomen mit der inneren Mitochondrienmembran (Daten nicht gezeigt).

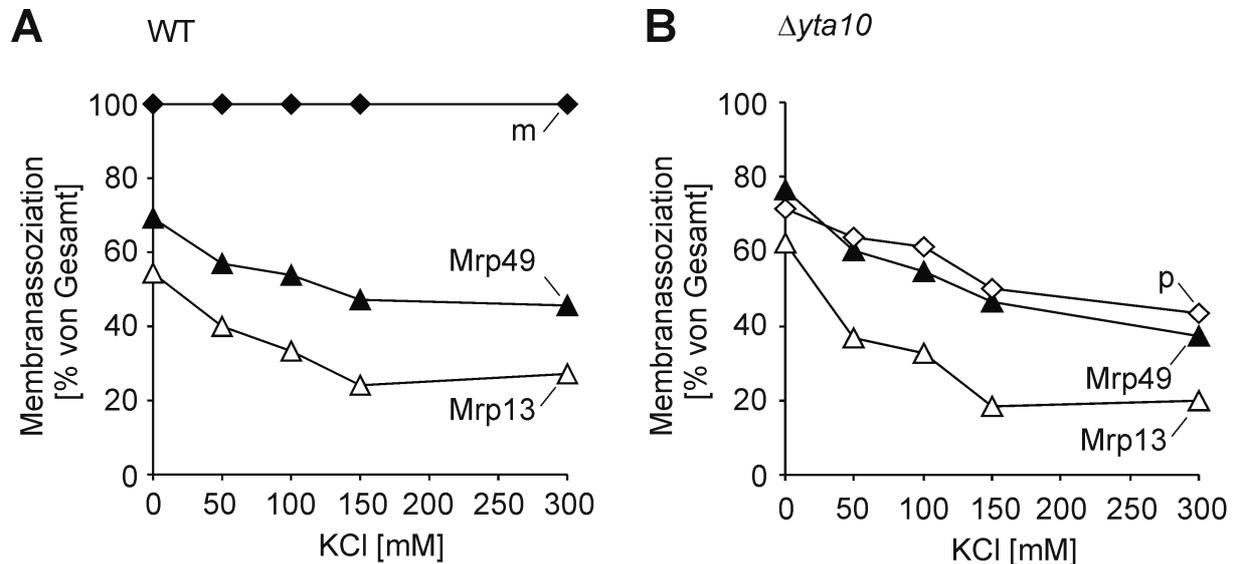


Abb. 22: Assoziation von MrpL32 mit der inneren Mitochondrienmembran. Mittels Ultraschall wurden Mitochondrien von (A) Wildtyp (WT)- und (B) $\Delta yta10$ -Zellen in Gegenwart von ansteigenden KCl-Konzentrationen aufgeschlossen. Membranproteine und mit der inneren Mitochondrienmembran assoziierte Proteine wurden durch Zentrifugation von löslichen Proteinen getrennt. Zum Nachweis von MrpL32, Mrp49 und Mrp13 wurden polyklonale Antiseren verwendet. p, Vorstufenform; m, reife Form von MrpL32.

Zur Untersuchung der Membraninsertion von MrpL32 in der inneren Mitochondrienmembran wurden zusätzlich eine Triton X-114-Extraktion (Abb. 23A) und eine Natriumcarbonat-Extraktion (Abb. 23B) durchgeführt. Bei der Triton X-114-Extraktion wurden die Mitochondrien in dem Detergens bei 4°C solubilisiert und anschließend einer Phasentrennung bei Raumtemperatur unterzogen. Daraufhin befinden sich Membranproteine in der Detergens-, lösliche Proteine in der wässrigen Phase (Bordier, 1981; Knittler *et al.*, 1998). Das genaue Prinzip der Natriumcarbonat-Extraktion ist noch ungeklärt. Die Extraktion bewirkt, dass geschlossene Membranvesikel in offene Membranblätter überführt werden (Fujiki *et al.*, 1982). Nach einem Zentrifugationsschritt befinden sich Membranproteine im Pellet, lösliche und mit der Membran assoziierte Proteine im Überstand (Fujiki *et al.*, 1982). Mit Hilfe beider Methoden konnte das Ergebnis der Ultraschallanalyse verifiziert werden. Bei beiden Extraktions-Methoden befand sich die prozessierte Form von MrpL32 in der Membranfraktion; die Vorläuferform und andere ribosomale Proteine in der löslichen

Fraktion. Es bleibt jedoch unklar, welcher Teil von MrpL32 die Membraninsertion des reifen Proteins bewirkt.

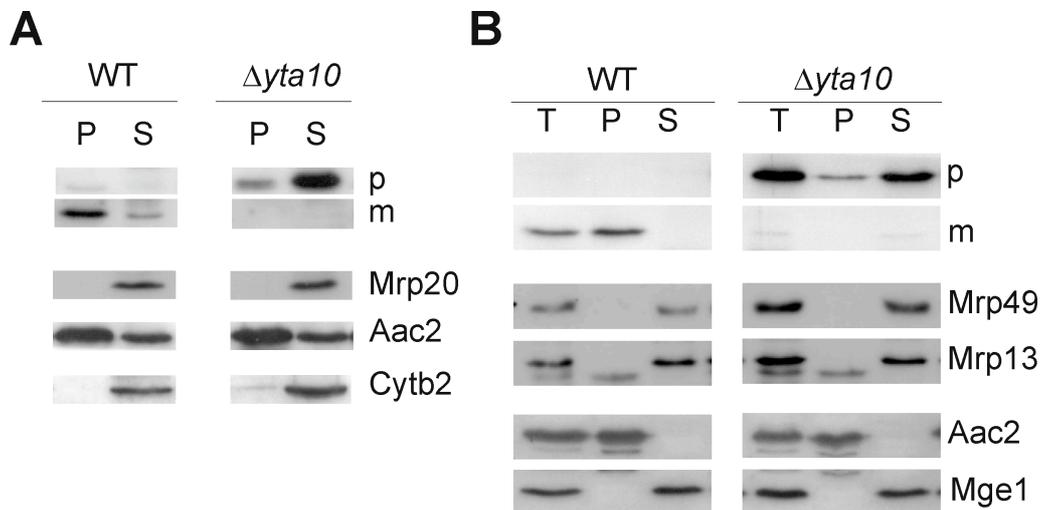


Abb. 23: Reifes MrpL32 kann mit mitochondrialen Membranen extrahiert werden. Mitochondriale Membranen von Wildtyp (WT)- und $\Delta yta10$ -Zellen wurden entweder mittels **(A)** Triton X-114 oder mittels **(B)** Natriumcarbonat extrahiert. Membranproteine (P) wurden nach der Lyse durch Zentrifugation von löslichen Proteinen (S) getrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern. Aac2 diente als Markerprotein für integrale Membranproteine, Cytb2 und Mge1 als Markerprotein für lösliche Proteine. T, Total; p, Vorstufenform; m, reife Form von MrpL32.

Die Experimente haben gezeigt, dass sich die Lokalisierung der reifen Form von MrpL32 von der des Vorläuferproteins unterscheidet. Es ist denkbar, dass die Reifung von MrpL32 durch die *m*-AAA-Protease eine Konformationsänderung hervorruft. Diese Konformationsänderung könnte bewirken, dass reifes MrpL32 in unmittelbarer Nähe zur inneren Mitochondrienmembran in die membranassoziierten Ribosomen (Obbink *et al.*, 1977; Spithill *et al.*, 1978; Van der Klei *et al.*, 1994; Liu und Spremulli, 2000b) integriert werden kann. Diese Theorie wird durch das Ergebnis der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 21) gestützt. Im Gegensatz zur Vorläuferform liegt die reife Form von MrpL32, welche mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist (Abb. 23), in einem hochmolekularen Komplex vor und assembliert auch zu einem geringen Prozentsatz mit den Ribosomen. Die Größe des Komplexes konnte mittels Superose 6-Gelfiltrationen auf ca. 1 MDa bestimmt werden (Abb. 24A). Überraschenderweise assembliert MrpL32 nur zu einem geringen Prozentsatz mit den Ribosomen. Entweder ist die Wechselwirkung mit dem Ribosom so gering, dass sie während der Reinigung zerstört wird, oder MrpL32 ist Teil eines kleineren Komplexes, der zur vollständigen Assemblierung in die Ribosomen

integriert wird. Es ist auch denkbar, dass MrpL32 von der *m*-AAA-Protease, die Chaperonaktivität besitzt (Arlt *et al.*, 1996), nach der Prozessierung an der Membran gehalten wird. Es konnte in der Tat eine partielle Koelution von MrpL32 mit der *m*-AAA-Protease in den Superose 6-Gelfiltrationen beobachtet werden (Abb. 24A). Des Weiteren kofraktioniert reifes MrpL32 in Saccharose-Dichtegradienten mit der *m*-AAA-Protease (Abb. 24B).

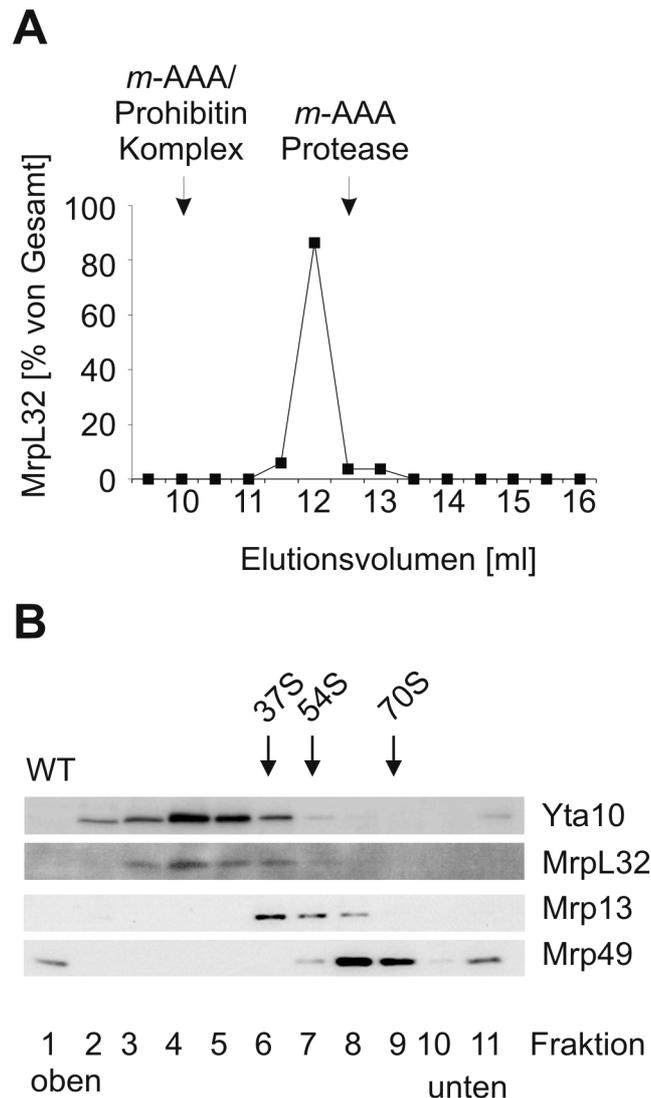


Abb. 24: MrpL32 bildet einen ca. 1 MDa großen Komplex. Zur Analyse des MrpL32-Komplexes wurde eine mögliche Koelution von MrpL32 mit der *m*-AAA-Protease in Superose 6-Gelfiltrationen und Saccharose-Dichtegradienten untersucht. **(A)** Wildtyp-Mitochondrien wurden mit Digitonin lysiert und mit Hilfe einer Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Nach einer SDS-PAGE erfolgte der Nachweis von MrpL32 und der *m*-AAA-Protease (Yta10) mittels polyklonaler Antikörper. In der Abbildung ist der prozentuale Anteil von MrpL32 in den jeweiligen Fraktionen bezogen auf die Gesamtmenge wiedergegeben. Die Lage des *m*-AAA-Protease- und des *m*-AAA-Protease/Prohibitin Komplexes sind mit Pfeilen markiert. **(B)** Wildtyp-Mitochondrien wurden mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (23-40%) aufgetrennt. Nach anschließender Fraktionierung und SDS-PAGE wurden ribosomale Untereinheiten und Yta10 mittels polyklonaler Antikörper nachgewiesen.

Diese Ergebnisse legen eine Interaktion zwischen der *m*-AAA-Protease und der reifen Form von MrpL32 nahe. Zum Nachweis einer direkten Wechselwirkung wurden Co-Immundefällungen durchgeführt. Dazu wurden mitochondriale Extrakte von Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10$ - und $yta10^{E559Q}yta12^{E614Q}$ -Zellen mit einem polyklonalen anti-Yta10 Antikörper inkubiert. In WT-Extrakten konnte nicht nur Yta10 gefällt werden, sondern auch der Prohibitin-Komplex, bestehend aus Phb1 und Phb2 (Abb. 25A) (Steglich *et al.*, 1999). Es konnte keine Interaktion mit der reifen Form von MrpL32 gezeigt werden (Abb. 25A), jedoch wurde eine direkte Interaktion zwischen der proteolytisch inaktiven Variante der *m*-AAA-Protease ($yta10^{E559Q}yta12^{E614Q}$) und der Vorläuferform von MrpL32 nachgewiesen (Abb. 25B). Zusammenfassend zeigen die Interaktionsstudien, dass MrpL32 nach der Prozessierung von der *m*-AAA-Protease freigesetzt wird und einen ca. 1 MDa großen Komplex ausbildet. In weiteren Experimenten sollen möglichen Interaktionspartner von MrpL32 in diesem Komplex identifiziert werden.

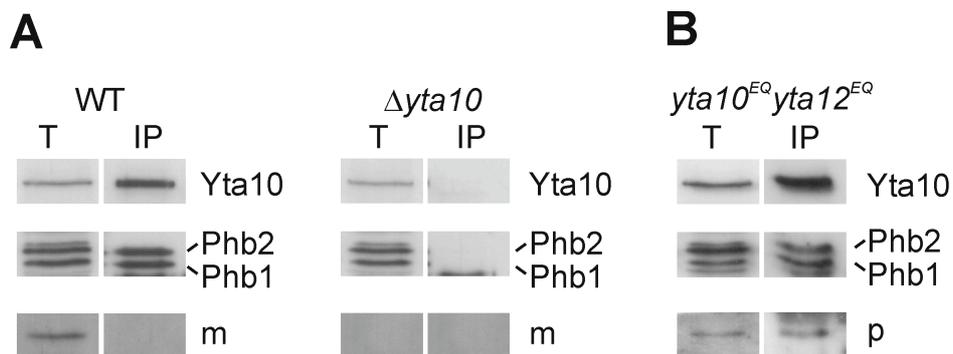


Abb. 25: Reifes MrpL32 interagiert nicht mit der *m*-AAA-Protease. Mitochondriale Extrakte von (A) Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10$ - und (B) $yta10^{EQ}yta12^{EQ}$ ($yta10^{E559Q}yta12^{E614Q}$)-Zellen wurden mit einem polyklonalen anti-Yta10 Antikörper inkubiert. Das Immunpräzipitat (IP) wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blots analysiert. Dazu wurden polyklonale Antikörper gegen Yta10, Phb1, Phb2 und MrpL32 verwendet. Als Kontrolle wurden jeweils 10% des Überstandes nach der Solubilisierung aufgetragen (T). p, Vorstufenform; m, reife Form von MrpL32.

3.9 *m*-AAA-Protease-abhängige Prozessierung von MrpL32 in Mitochondrien in der Maus

Neben MrpL32 sind auch die Untereinheiten der *m*-AAA-Protease in höheren, multizellulären Organismen stark konserviert (Juhola *et al.*, 2000). Daher ist es möglich, dass die Prozessierung von MrpL32 auch in höheren Eukaryonten konserviert ist. Es konnte schon früher gezeigt werden, dass die menschliche *m*-AAA-

Protease aus den homologen Untereinheiten Afg3l2 und Paraplegin besteht (Atorino *et al.*, 2003). Beide Proteine bilden in der Hefe einen hochmolekularen Komplex und sind in der Lage, den Atmungsdefekt von $\Delta yta10\Delta yta12$ -Zellen zu komplementieren (Atorino *et al.*, 2003). Zur Charakterisierung der *m*-AAA-Protease und deren Einfluss auf die Prozessierung von MrpL32 in der Maus wurden die Untereinheiten der murinen *m*-AAA-Protease, bestehend aus Afg3l2 und Paraplegin, heterolog in einem $\Delta yta10\Delta yta12$ -Hefestamm exprimiert. Entsprechend den menschlichen Daten konnte die Expression der Maus-Homologe die Atmungskompetenz von $\Delta yta10\Delta yta12$ -Zellen wiederherstellen (Nolden *et al.*, 2005b). Wie im Kapitel 3.5.2 gezeigt worden ist, beruht der Atmungsdefekt in *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen auf der defekten MrpL32-Prozessierung (Abb. 17). Die Komplementation des Atmungsdefekts durch die Expression von murinem Afg3l2 und Paraplegin in $\Delta yta10\Delta yta12$ -Zellen legt die Vermutung nahe, dass in diesen Zellen MrpL32 prozessiert wird. In der Tat konnte in isolierten Mitochondrien dieses Hefestammes prozessiertes MrpL32 nachgewiesen werden (Abb. 26).

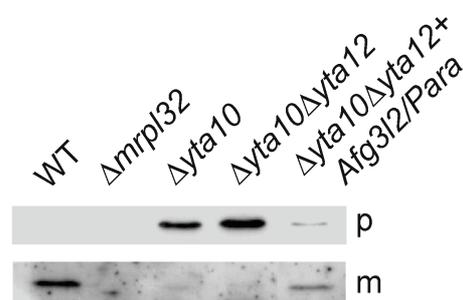


Abb. 26: Hefe-MrpL32 wird von der murinen *m*-AAA-Protease prozessiert. Die *in vivo* Reifung von Hefe-MrpL32 wurde in isolierten Hefe-Mitochondrien (je 30 μ g) untersucht. Zum Nachweis von MrpL32 wurden ein Präsequenz-spezifischer und ein gegen das reife Protein gerichteter Antikörper verwendet. WT, Wildtyp-; $\Delta mrpL32$ -; $\Delta yta10$ -; $\Delta yta10\Delta yta12$ -; $\Delta yta10\Delta yta12$ -Zellen mit Expression von Afg3l2 und Paraplegin. p, Vorstufenform; m, reife Form von MrpL32.

Die heterologe Expression der murinen *m*-AAA-Protease in der Hefe *S. cerevisiae* ermöglichte die Untersuchung der *m*-AAA-Protease-abhängigen Prozessierung von murinem MrpL32. Dazu wurde murines MrpL32 in einem zellfreien System in Gegenwart von 35 S-Methionin synthetisiert und posttranslational in isolierte Hefe-Wildtyp (WT)-Mitochondrien importiert (Abb. 27A). Analog zu Hefe-MrpL32 wurde murines MrpL32 Membranpotential-abhängig importiert und von der *m*-AAA-Protease der Hefe prozessiert. Der Verlust der *m*-AAA-Protease ($\Delta yta10\Delta yta12$) führte auch in diesem Fall zu einem vollständigen Prozessierungsdefekt von MrpL32. Dieser Defekt

konnte fast vollständig komplementiert werden, wenn in diesem Stamm Afg3l2 und Paraplegin exprimiert wurden (Abb. 27A, B). Dieses Experiment zeigt, dass murines MrpL32 in Hefe-Mitochondrien von der murinen *m*-AAA-Protease, bestehend aus Afg3l2 und Paraplegin, prozessiert wird.

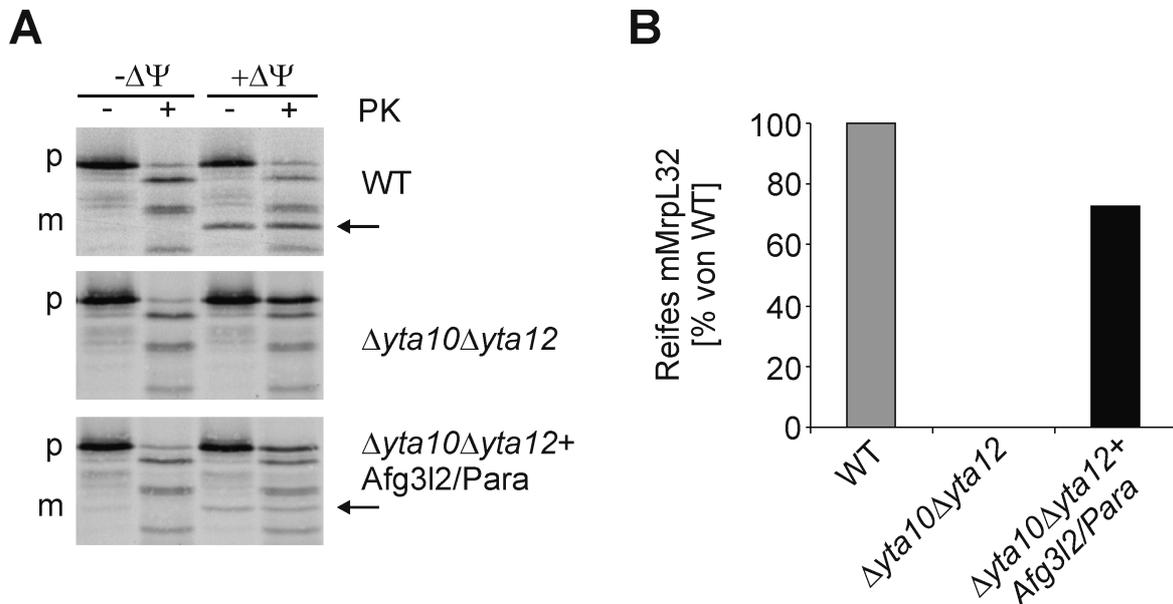


Abb. 27: Murines MrpL32 wird von der murinen *m*-AAA-Protease in Hefemitochondrien prozessiert. (A) Radioaktiv markiertes murines MrpL32 wurde posttranslational für 30 min bei 25°C in isolierte Wildtyp (WT)-, $\Delta yta10\Delta yta12$ - und $\Delta yta10\Delta yta12$ +Afg3l2+Paraplegin-Mitochondrien importiert. Das Membranpotential wurde durch die Zugabe von Valinomycin zerstört (- $\Delta\Psi$). Nicht importiertes Material wurde durch die Zugabe von Proteinase K (PK; 50 $\mu\text{g/ml}$) für 30 min bei 4°C abgebaut. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Der Pfeil markiert zusätzlich die reife MrpL32-Bande. p, Vorstufenform; m, reife Form von mMrpL32. **(B)** Quantifizierung des prozessierten MrpL32.

Im folgenden Versuch wurde der Prozessierungsdefekt von murinem MrpL32 *in vivo* betrachtet. Dazu wurde ein polyklonaler Peptid-Antikörper verwendet, der gegen die reife Form von murinem MrpL32 gerichtet war (Aminosäuren 83-98). Die Prozessierung wurde in isolierten Lebermitochondrien von 11 Monate alten Wildtyp (WT)- und homozygoten Knock-out *Paraplegin* (-/-)-Mäusen analysiert (Abb. 28). Es konnte auch hier ein Prozessierungsdefekt festgestellt werden. In Paraplegin-defizienten Mitochondrien war im Vergleich zum Wildtyp die Menge an reifem MrpL32 signifikant reduziert. Zusätzlich konnte in diesen Mitochondrien auch die Vorläuferform nachgewiesen werden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass der Nachweis der Vorläuferform von der Präparation der Mitochondrien abhängig war und nicht in allen isolierten Paraplegin-defizienten Mitochondrien nachgewiesen werden konnte. Der

partielle Prozessierungsdefekt könnte daran liegen, dass in der Maus noch ein weiteres zu Paraplegin und Afg3L2 homologes Protein mit dem Namen Afg3L1 nachgewiesen wurde (Kremmidiotis *et al.*, 2001), welches möglicherweise die Rolle von Paraplegin übernehmen kann.

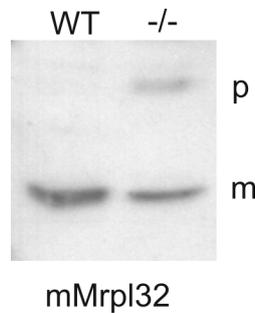


Abb. 28: *In vivo* Prozessierungsdefekt von murinem MrpL32 in homozygoten *Paraplegin*^{-/-} Lebermitochondrien. Die Prozessierung von murinem MrpL32 (mMrpL32) wurde in isolierten Wildtyp (WT)- und *Paraplegin*^{-/-} (-/-)-Lebermitochondrien untersucht. Zum Nachweis wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der gegen die Aminosäuren 83-98 gerichtet war. p, Vorstufenform; m, reife Form von mMrpL32.

Übereinstimmend mit den in der Hefe durchgeführten Experimenten führt auch der Verlust einer Untereinheit der murinen *m*-AAA-Protease zu einem Defekt in der mitochondrialen Translation. Mitochondriale Translationsprodukte wurden in Gegenwart von ³⁵S-Methionin in isolierten Wildtyp- und homozygoten *Paraplegin*^{-/-}-Lebermitochondrien markiert. Anschließend wurde die Kinetik und die Effizienz der Proteinsynthese bestimmt. Im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien führt der Verlust von Paraplegin zu einer 50%igen Reduktion der Translationseffizienz (Nolden *et al.*, 2005b). Dieser Defekt beruht nicht auf einem Verlust der mitochondrialen DNA, da in Southern-Blot-Experimenten ein mitochondrialer DNA-Verlust nicht nachgewiesen werden konnte (Nolden *et al.*, 2005b). Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass auch in der Maus die Reifung von MrpL32 und die mitochondriale Proteinsynthese abhängig von der *m*-AAA-Protease sind.

4 Diskussion

4.1 Die Stabilität des mitochondrialen Proteoms

Der Abbau von nicht nativen mitochondrialen Proteinen und die Regulation von wichtigen Schritten während der Organellbiogenese gehören zu den wichtigsten Aufgaben der ATP-abhängigen Proteasen im Mitochondrium. Der Verlust der ATP-abhängigen *m*-AAA-Protease führt sowohl in Hefe als auch im Menschen zu schweren Defekten, jedoch können die beobachteten Defekte nicht mit einer defekten Proteolyse der bekannten Substrate erklärt werden. Des Weiteren konnte bisher keine Akkumulation von nicht-nativen Polypeptiden in diesen Zellen beobachtet werden, die möglicherweise die mitochondrialen Aufgaben stören und so zu den Phänotypen führen. Diese Beobachtungen lassen auf einen gestörten Abbau von kurzlebigen Regulatorproteinen, die wichtige Aufgaben während der Organellbiogenese erfüllen, schließen. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit solche kurzlebigen Regulatorproteine identifiziert und charakterisiert werden. In einem ersten Ansatz wurden die mitochondrialen Proteome von Wildtyp und *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese miteinander verglichen. Mögliche Substrate sollten in Abwesenheit der Protease nicht abgebaut werden und somit im Mitochondrium akkumulieren. Die Abwesenheit der *m*-AAA-Protease führt jedoch zu keiner Akkumulation von Substraten. Ein Grund für diese Beobachtung könnte eine überlappende Substratspezifität der *m*-AAA-Protease mit der *i*-AAA-Protease (Leonhard *et al.*, 2000) und mit der PIM1-Protease (Savel'ev *et al.*, 1998) sein. Ausserdem könnte eine hohe Stabilität des mitochondrialen Proteoms vorliegen. Dies würde bedeuten, dass in logarithmisch wachsenden Hefezellen nur wenige mitochondriale Proteine abgebaut werden und diese Abbaurate ist zu gering, als dass dies zu einer signifikanten, in 2D-Gelen detektierbaren Akkumulation führen würde. Die Stabilität des mitochondrialen Proteoms konnte in der Tat bestätigt werden, da selbst eine kurze Inkubation von Mitochondrien für 30 min bei 37°C keinen signifikanten Abbau eines einzelnen Proteins nach sich zog. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Stabilität von cytosolischen Proteinen in Fibroblasten, da hier nur 1-2% aller Proteine pro Stunde abgebaut werden (Gronostajski *et al.*, 1985). Auch neu synthetisierte und neu in die Mitochondrien importierte Proteine zeigten während einer Inkubation für 30 min bei 37°C dieselbe Stabilität. Mit Hilfe von Peptidexport-Experimenten konnte eine

Umsatzrate von ca. 6% der neu synthetisierten und neu importierten Proteine bestimmt werden. Damit weist die mitochondriale Biogenese eine höhere Effizienz als die cytosolische Synthese auf, bei der ca. 30% der neu synthetisierten Proteine nicht ihre native Faltung erreichen (Schubert *et al.*, 2000). Dennoch ist in einer logarithmisch wachsenden Hefezelle ein konstanter, wenn auch sehr geringer Abbau von mitochondrialen Proteinen zu verzeichnen (Augustin *et al.*, 2005). Der Abbau dieser Proteine wird sehr wahrscheinlich auf Grund einer beeinträchtigten Protein-Lokalisierung, Protein-Faltung und/oder durch einen beeinträchtigten Assemblierungsschritt verursacht.

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese lassen sich komplexe Proteingemische auftrennen. Allerdings besitzt diese Methode auch Nachteile, so können zum Beispiel kleine Veränderungen in den Proteinmengen, wie in diesem Fall von nur 6%, auf Grund der geringen Reproduzierbarkeit nicht analysiert werden. Des Weiteren sind Proteine mit extremen Eigenschaften, wie Membranproteine, sehr große, sehr kleine, stark saure und stark basische Proteine unterrepräsentiert (Gygi und Aebersold, 2000). Deshalb konnte in den Proteom-Analysen MrpL32 nicht als Substrat der *m*-AAA-Protease identifiziert werden, da es sich hierbei um ein kleines (14 kDa) und stark basisches (pI 10,65) Protein handelt. Es ist bekannt, dass fast alle mitochondrialen ribosomalen Proteine in *S. cerevisiae* prozessiert werden (Graack und Wittmann-Liebold, 1998), jedoch ist für eine Vielzahl dieser Proteine noch nicht gezeigt worden, welche Peptidasen für die Prozessierungen verantwortlich sind. So ist es durchaus möglich, dass es noch andere ribosomale Proteine gibt, die von der *m*-AAA-Protease prozessiert werden. Verbesserte 2D-Gel-Techniken ermöglichen die Analyse der Proteome von isolierten Ribosomen (Geyl *et al.*, 1981). Zur Identifizierung möglicher weiterer Substrate der *m*-AAA-Protease sollen daher in weiteren Experimenten die ribosomalen Proteome von Wildtyp- und $\Delta yta10$ -Mitochondrien miteinander verglichen werden.

4.2 Prozessierung von MrpL32

MrpL32 konnte in dieser Arbeit als ein Substrat der *m*-AAA-Protease identifiziert werden. Im Gegensatz zu den bekannten Substraten, die im Rahmen der Qualitätskontrolle von der *m*-AAA-Protease abgebaut werden, wird MrpL32 nicht vollständig, sondern nur partiell abgebaut bzw. prozessiert. Dies ist erst das zweite Beispiel,

neben der Reifung von Ccp1 (Esser *et al.*, 2002; McQuibban *et al.*, 2003; Michaelis *et al.*, 2005), für eine regulierte Prozessierung durch die *m*-AAA-Protease. Der molekulare Mechanismus dieser regulierten Prozessierung ist bislang ungeklärt. Im Falle von MrpL32 ist es allerdings denkbar, dass eine Interaktion der negativ geladenen Aminosäuren mit den überwiegend positiv geladenen Aminosäuren, die sich jeweils vor bzw. nach der Schnittstelle befinden, zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur führt. Diese Haarnadelstruktur wird dann, vergleichbar mit der Prozessierung von NF- κ B durch das Proteasom (Chen, 2005), von der *m*-AAA-Protease erkannt und abgebaut. Der vollständige Abbau von MrpL32 wird durch eine sehr starke Faltung verhindert, die auf einem konservierten Zink-binde-Motiv und der Koordinierung eines Zink-Ions beruht (siehe dazu auch 4.4). Ein Hinweis auf diesen Mechanismus ergab sich aus den Import-Analysen der DHFR-Fusionskonstrukte. Die Zugabe von Proteinase K zu den Lysaten, die mindestens die ersten 120 Aminosäuren von MrpL32 besaßen, führte zur Generierung einer Bande, die selbst in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease fast exakt die gleiche Größe hatte wie prozessiertes MrpL32 (Daten nicht gezeigt). Die ersten 120 Aminosäuren beinhalten dieses konservierte Zink-binde-Motiv, welches vermutlich die starke Faltung vermittelt und somit den Abbau der gefalteten Domäne durch Proteinase K verhindert (Daten nicht gezeigt). Die Prozessierung von MrpL32 ist das erste Beispiel dafür, dass die *m*-AAA-Protease nicht nur eine wichtige Rolle für die Qualitätssicherung spielt, sondern auch einen wichtigen Schritt während der mitochondrialen Biogenese reguliert.

4.3 Der Einfluss der *m*-AAA-Protease auf die mitochondriale Translation

Die Biogenese der Atmungskettenkomplexe und der F₁F₀-ATP-Synthase in der inneren Mitochondrienmembran ist abhängig von der gleichzeitigen Assemblierung von kern- und mitochondrial kodierten Untereinheiten. Diese Assemblierung setzt wahrscheinlich eine koordinierte Expression beider Genome voraus. Es ist bereits bekannt, dass die mitochondriale Translation mit Hilfe von spezifischen membran-gebundenen Translationsaktivatoren reguliert wird (Costanzo und Fox, 1988; Brown *et al.*, 1994; Manthey und McEwen, 1995; Fox, 1996). In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die mitochondriale Translation sowohl in der Hefe

als auch in der Maus unter der Kontrolle der ATP-abhängigen *m*-AAA-Protease steht (Abb. 29). Neu importiertes MrpL32, eine Komponente der großen Ribosomenuntereinheit, wird von der *m*-AAA-Protease an der inneren Mitochondrienmembran prozessiert. Die Prozessierung führt dazu, dass reifes MrpL32, im Gegensatz zur Vorläuferform, stark mit der Membran interagiert und Teil eines ca. 1 MDa großen Komplexes wird. Die Rekrutierung des fast vollständigen 54S-Partikels an die Membran und die Insertion von MrpL32 in den Selbigen könnte der letzte Schritt der Ribosomen-Assemblierung sein und damit eine effiziente Translation ermöglichen.

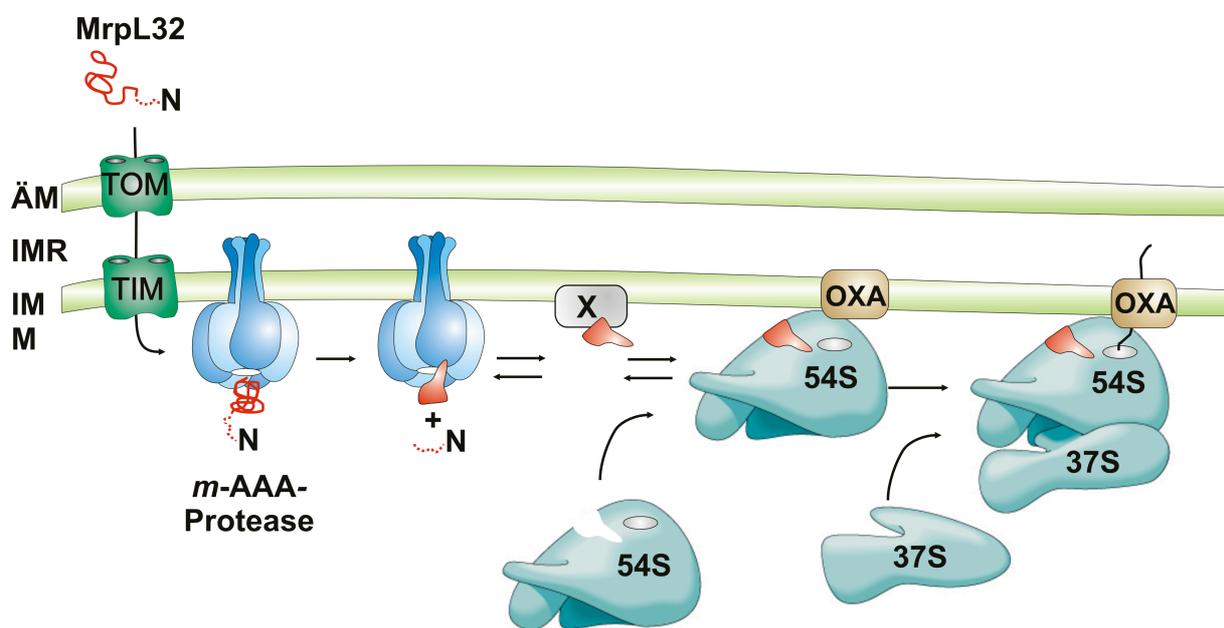


Abb. 29: Die proteolytische Kontrolle der mitochondrialen Translation durch die *m*-AAA-Protease. Erklärung siehe Text. ÄM, äußere Mitochondrienmembran; IMR, Intermembranraum; IM, innere Mitochondrienmembran; M, Matrix; TOM, Translokase der äußeren Mitochondrienmembran; TIM, Translokase der inneren Mitochondrienmembran, N, N-Terminus von MrpL32; X, mögliche Interaktionspartner von reifem MrpL32, OXA, Oxa1-Exportmaschinerie; 37S, 54S, kleine und große Ribosomenuntereinheit.

Schon 1994 wurde in einer Publikation vermerkt, dass *yta10*-Mutanten denselben Phänotypen zeigen wie *pet*-Stämme, die keine mitochondriale Translation besitzen (Tzagoloff *et al.*, 1990; Tzagoloff *et al.*, 1994). Die inhibierte Prozessierung von MrpL32 und in Folge dessen die gestörte mitochondriale Translation reichen aus, um alle bisher beobachteten Phänotypen von *m*-AAA-Protease-defizienten Stämmen zu erklären. Die gestörte Translation der mitochondrial kodierten Untereinheiten CoxI, CoxII, CoxIII, Cytb, ATPase6, 8 und 9 führen zu einem Assemblierungsdefekt der Atmungskettenkomplexe und der F_1F_0 -ATP-Synthase (Paul und Tzagoloff, 1995; Arlt

et al., 1998; Galluhn und Langer, 2004), da die Expression und Insertion von CoxI, CoxII und CoxIII sowie von ATPase6, 8 und 9 in die innere Mitochondrienmembran die initialen Schritte bei der Assemblierung dieser Komplexe sind. Die gestörte Expression von *COXI* und *CYTB* wird dabei zusätzlich zum generellen Translationsdefekt durch einen gestörten Spleißvorgang beeinträchtigt (Arlt *et al.*, 1998). Das Spleißen von vielen mitochondrialen Introns ist von mRNA-Maturasen abhängig, welche im selben Intron kodiert werden (Grivell und Schweyen, 1989; Costanzo und Fox, 1990; Pel und Grivell, 1993). Eine gestörte Translation führt somit zu einem Verlust von mRNA-Maturasen und infolgedessen zu unreifen mRNAs. Die Verwendung von *m*-AAA-Protease-defizienten Stämmen, die keine Introns im mitochondrialen Genom besitzen, zeigte einen partiellen Anstieg der CoxI- und Cytb-Synthese (Arlt *et al.*, 1998), da in diesem Falle die partielle Expression nicht von der mRNA-Reifung abhängig war.

Die direkte Abhängigkeit der Prozessierung von MrpL32 durch die *m*-AAA-Protease für die Funktion der Mitochondrien konnte in einem Komplementierungsexperiment gezeigt werden. So konnte der Atmungsdefekt von $\Delta yta10$ -Zellen gerettet werden, indem die reife Form von MrpL32 in diesen Zellen exprimiert wurde. Dies wurde dadurch erreicht, dass MrpL32 mit Hilfe einer heterologen Präsequenz in die Mitochondrien importiert und nach dem Import von MPP entfernt wurde. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die beobachteten Defekte von *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen weniger auf einem gestörten Abbau von missgefalteten Proteinen, sondern mehr auf einer Beeinträchtigung der proteolytischen Kontrolle von regulatorischen Prozessen beruhen. Die Rolle der *m*-AAA-Protease sowohl beim Abbau von missgefalteten Proteinen als auch bei der Assemblierung von mitochondrialen Ribosomen deutet darauf hin, dass eventuell die Translation über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert wird. Missgefaltete Proteine konkurrieren mit MrpL32 um die *m*-AAA-Protease und beeinträchtigen in Folge dessen die Prozessierung von MrpL32 sowie die mitochondriale Translation. Fehlgefaltete Proteine könnten zum Beispiel durch ein Ungleichgewicht der mitochondrialen bzw. kernkodierten Genexpression entstehen, was zu einem Überfluss von mitochondrialen bzw. kernkodierten Proteinen führen würde.

4.4 Die membrangebundene Translation in Mitochondrien

Die Prozessierung von MrpL32 führt zu einer erhöhten Affinität der Bindung von MrpL32 an die innere Mitochondrienmembran und zur Integration ins Ribosom. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist dies einer der letzten Schritte während der Ribosomenassemblierung. Die Kristallstruktur der großen Ribosomenuntereinheit aus *Deinococcus radiodurans* (Harms *et al.*, 2001) unterstützt dieses Modell (Abb. 30). MrpL32 ist größtenteils an der Oberfläche des Ribosoms exponiert, wobei der N-Terminus (violett) tief in das Ribosom hineinragt. Auffällig ist auch die Anordnung von vier hoch konservierten Cystein-Resten in dem Kristall (Abb. 30 gelb).

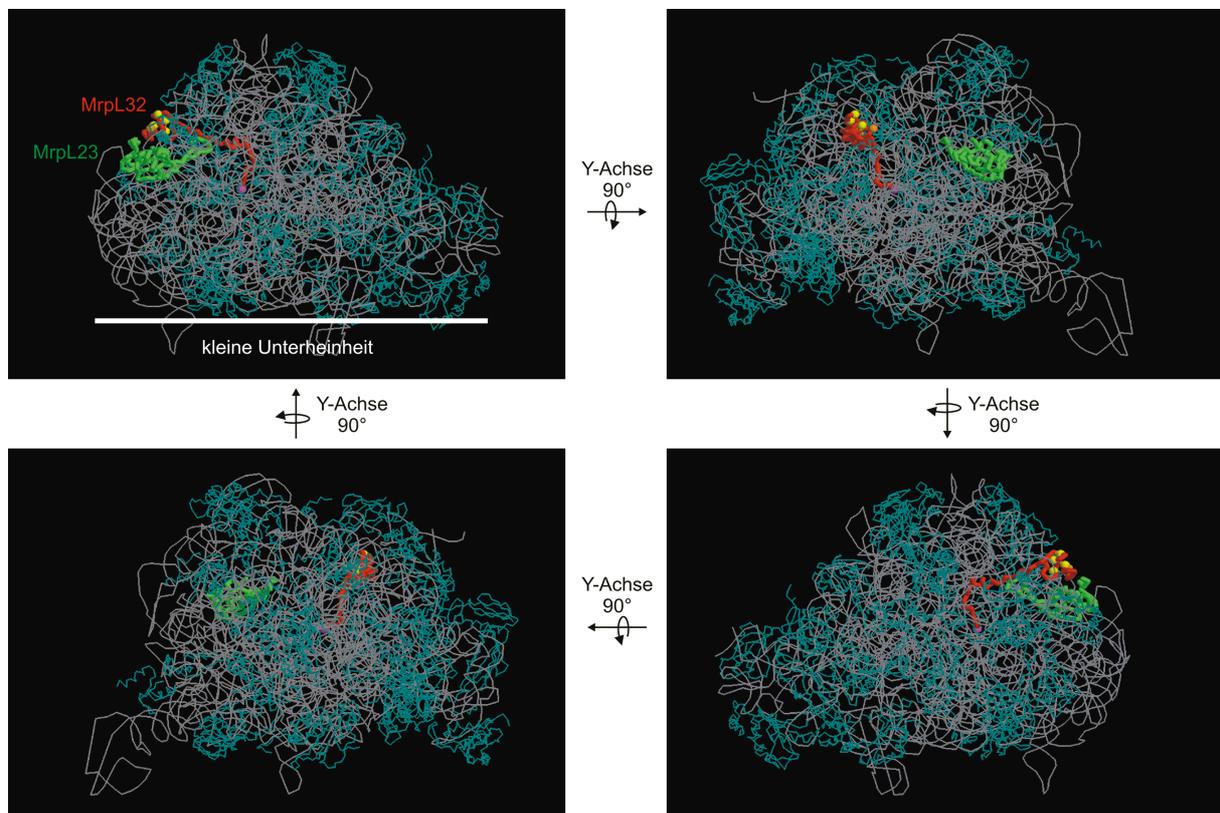


Abb. 30: Kristallstruktur der großen ribosomalen Untereinheit aus *Deinococcus radiodurans*. Ribosomale Proteine wurden in cyan, die rRNA in grau dargestellt. Der N-Terminus von MrpL32 (rot) wurde mit violett und der C-Terminus mit orange markiert. Die konservierten Cysteine wurden mit gelb gekennzeichnet. MrpL22, welches sich in direkter Nachbarschaft zum Peptid-Ausgangs-Tunnel befindet, wurde in grün hervorgehoben. Die Lage der kleinen Untereinheit wurde in der ersten Abbildung eingezeichnet. Die Bilder wurden erzeugt, indem der Kristall (PDB: 1NKW) jeweils um 90° um die Y-Achse gedreht wurden.

MrpL32 zählt zu der C⁺-Klasse unter den ribosomalen Proteinen, die sich durch zwei Paare von konservierten Cysteinen (CxxCx₁₁₋₁₅CxxC) auszeichnen, die vermutlich in der Lage sind, ein Zink-Ion zu koordinieren (Makarova *et al.*, 2001). Es ist unklar,

welchen Einfluss diese Cysteine bzw. die Koordinierung des Zink-Ions auf die Funktion von MrpL32 haben. Möglicherweise bewirkt die Bindung des Zink-Ions eine stabile Faltung, die für die Prozessierung notwendig ist (siehe auch 4.1). Mit Hilfe von Punktmutations-Analysen soll die Funktion der Cysteine während der Prozessierung oder während der Assemblierung von MrpL32 geklärt werden. Es ist bekannt, dass MrpL32 zusammen mit MrpL22 eine Pinzetten-ähnliche Struktur ausbilden kann, die einen Teil der 23S-rRNA bindet (Harms *et al.*, 2001). Beide Proteine interagieren umfassend mit MrpL17, was zu einer sehr starken Stabilisation dieser Region führt (Harms *et al.*, 2001). Eventuell bilden die beiden Proteine MrpL17 und MrpL22 zusammen mit MrpL32 den ca. 1 MDa großen Komplex, der sowohl in den Saccharosegradienten als auch in der Superose 6-Gelfiltration beobachtet werden konnte.

Die starke Assoziation von MrpL32 mit der Membran und die Exposition an der Oberfläche des Ribosoms lassen die Vermutung zu, dass wahrscheinlich die vollständige Assemblierung der Ribosomen in direkter Nähe zur Membran stattfindet und nur membrangebundene Ribosomen zur Translation befähigt sind. Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass die mitochondriale Translation in unmittelbarer Nähe zur inneren Mitochondrienmembran erfolgt (Spithill *et al.*, 1978; Van der Klei *et al.*, 1994; Liu und Spremulli, 2000b). Weitere Arbeiten unterstützen dieses Modell. So handelt es sich bei der Mehrzahl der mitochondrialen Translationsprodukte um hydrophobe Komponenten der Atmungskettenkomplexe, deren Insertion vermutlich kotranslational an der inneren Mitochondrienmembran stattfindet. Die Translation ist wiederum von verschiedenen mRNA-spezifischen Translationsaktivatoren abhängig, die in der Membran verankert sind (Abb. 31) (Michaelis *et al.*, 1991; McMullin und Fox, 1993; Naithani *et al.*, 2003; Krause-Buchholz *et al.*, 2004). Außerdem konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass selbst Var1, das einzige lösliche mitochondrial-kodierte Protein in *S. cerevisiae*, auch an der inneren Mitochondrienmembran synthetisiert wird (Fiori *et al.*, 2003).

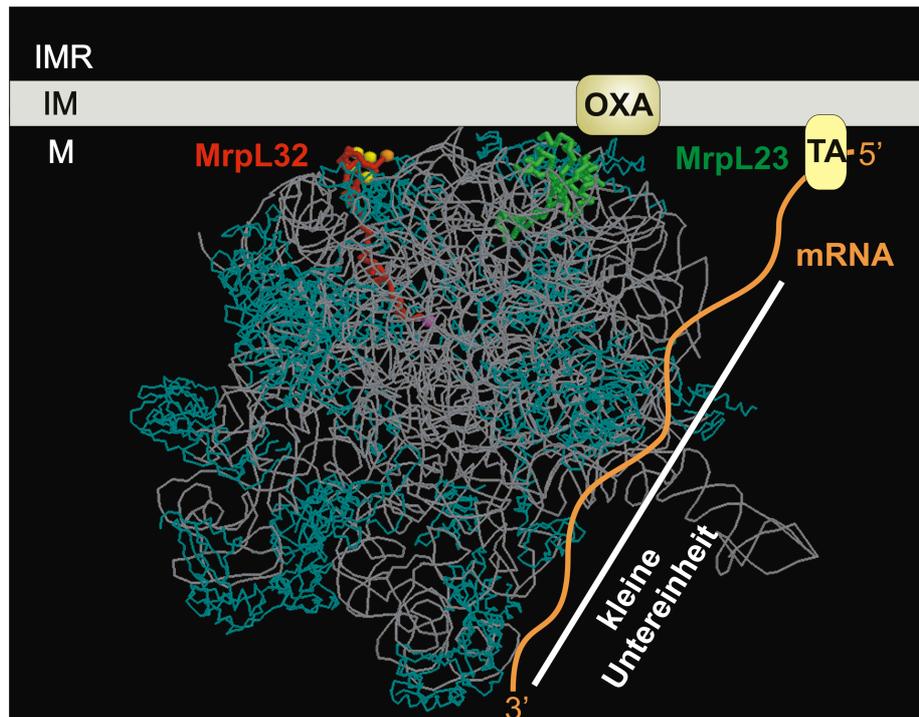


Abb. 31: Modell der membrangebundenen Translation. Erklärung siehe Text. Farbencode des Ribosoms siehe Abb. 30. IMR, Intermembranraum; IM, innere Mitochondrienmembran; M, Matrix; OXA, Oxa1-Exportmaschinerie; TA, Translationsaktivatoren.

Der Vorgang der kotranslationalen Insertion von hydrophoben Proteinen in die innere Mitochondrienmembran ist bislang nur unvollständig verstanden. Es ist bekannt, dass die Exportmaschinerie Oxa1, die eine Insertion von mitochondrial- und kern-kodierten Proteinen in die innere Mitochondrienmembran ermöglicht (Herrmann und Bonnefoy, 2004), als Ribosomen-Akzeptor fungiert und direkt mit MrpL23 interagiert (Abb. 31) (Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003). Hierbei handelt es sich um eine Komponente der großen Untereinheit, die sich in direkter Nachbarschaft zum Peptid-Ausgangs-Tunnel befindet. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass die Überexpression von Oxa1 partiell den Atmungsdefekt von *m*-AAA-Protease-defizienten Stämmen retten kann (Rep *et al.*, 1996). Dies kann damit erklärt werden, dass die gesteigerte Menge an Oxa1 die lokale Konzentration von Ribosomen an der inneren Mitochondrienmembran erhöht. Diese lokale Konzentrationsteigerung an vorassemblierten 54S-Partikeln ermöglicht dann eine effizientere Integration der sehr geringen Mengen an reifem MrpL32 in das Ribosom, die selbst in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease gebildet werden.

4.5 Die Prozessierung von MrpL32 ist ein konservierter Prozess

Nicht nur die Proteine selbst, sondern auch die Prozessierung von MrpL32 durch die *m*-AAA-Protease sind hoch konserviert. Dies zeigt sich daran, dass sowohl murines MrpL32 durch die *m*-AAA-Protease aus *S. cerevisiae* als auch MrpL32 aus Hefe durch die murine *m*-AAA-Protease, bestehend aus den Untereinheiten Afg3l2 und Paraplegin, in isolierten Hefe-Mitochondrien prozessiert werden kann. Des Weiteren wurde auch murines MrpL32 in Hefe-Mitochondrien, die die Afg3l2- und Paraplegin-Untereinheiten der murinen *m*-AAA-Protease enthielten, prozessiert. Dies war der direkte Beweis, dass auch in der Maus MrpL32 ein Substrat der *m*-AAA-Protease ist. Übereinstimmend mit den in der Hefe gewonnenen Daten bewirkte ein Verlust von Paraplegin in der Maus einen partiellen Prozessierungs- und Translationsdefekt.

Der Verlust von Paraplegin im Menschen führt zur hereditären spastischen Paraplegie (HSP), die sich durch eine axonale Degeneration von motorischen und sensorischen Neuronen auszeichnet. Sowohl in Fibroblasten von HSP-Patienten als auch von Paraplegin-defizienten Mäusen konnten mitochondriale Defekte nachgewiesen werden (Atorino *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004). Es ist denkbar, dass die hereditäre spastische Paraplegie auf einer gestörten Proteinsynthese basiert. Der schleichende Fortgang der Krankheit beruht möglicherweise auf der altersbedingten Akkumulation von missgefalteten Proteinen, die zum Beispiel auf Grund von oxidativen Stress entstanden sind. Diese Akkumulation führt dann im Alter zu einer gestörten Prozessierung von MrpL32. Überraschend ist jedoch die Gewebespezifität der Krankheit, da in der Regel nur Neuronen des corticospinalen Traktes (Pyramidenbahn) und des Fasciculus gracilis (Gollischer Strang) betroffen sind (McDermott *et al.*, 2000). Daher ist es auf den ersten Blick schwierig, diese Gewebespezifität mit einem generellen Defekt in der mitochondrialen Translation in Verbindung zu bringen. Jedoch führen auch Mutationen in der mitochondrialen DNA, welche die mitochondriale Translation beeinträchtigen, zu einem breiten Spektrum von klinischen Erscheinungsbildern mit mitochondrialen Defekten in verschiedenen Geweben (DiMauro und Schon, 2003; Jacobs und Turnbull, 2005; Taylor und Turnbull, 2005). Die Gewebespezifität könnte damit erklärt werden, dass im Menschen noch andere Peptidasen gewebespezifisch exprimiert werden, die MrpL32 selbst beim Verlust von Paraplegin prozessieren können. Dies würde auch erklären, warum der Prozessierungs- und Translationsdefekt in Paraplegin-defizienten Lebermitochondrien nur partiell war. In der inneren Mitochondrienmembran von Mäusen

sind bis jetzt drei homologe AAA-Protease-Untereinheiten (Afg3l1, Afg3l2 und Paraplegin) identifiziert worden (Casari *et al.*, 1998; Banfi *et al.*, 1999; Kremmidiotis *et al.*, 2001). In dem Falle, dass alle Untereinheiten miteinander interagieren und funktionsfähige Komplexe bilden können, erlaubt dies eine Vielzahl von verschiedenen Komplexen mit den unterschiedlichsten Zusammensetzungen. Ein weiterer Grund für die Gewebespezifität könnte eine unterschiedliche Sensitivität der Gewebe gegenüber einem Translationsdefekt sein. Erst wenn ein Schwellenwert unterschritten wird, führt dies zu einer phänotypischen Auswirkung (Rossignol *et al.*, 2003). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass bis zu 40% der mitochondrialen DNA deletiert werden kann, bevor die Translation der Atmungskettenkomponenten inhibiert wird (Hayashi *et al.*, 1991). Es ist vorstellbar, dass die prozessierte Menge von MrpL32 in den übrigen Geweben ausreicht, um die mitochondriale Funktion aufrechtzuerhalten, jedoch in Geweben wie Gehirn, Muskel und Herz, die einen hohen oxidativen Metabolismus besitzen, nicht mehr ausreichend ist. Weitere Studien sind notwendig, um den pathogenen Mechanismus auf molekularer Ebene zu erklären. Dabei könnte die Verbindung zwischen der *m*-AAA-Protease und der Ribosomenassemblierung bzw. der mitochondrialen Translation ein erster Anfang sein.

5 Zusammenfassung

Proteolytische Prozesse spielen bei der Qualitätskontrolle mitochondrialer Proteine und der Biogenese von Mitochondrien eine wichtige Rolle. So führt eine Inaktivierung der ATP-abhängigen *m*-AAA-Protease in verschiedenen Organismen zu einer gestörten Atmung, einer veränderten mitochondrialen Morphologie und zur axonalen Degeneration bei hereditären spastischen Paraplegien des Menschen. Um den molekularen Mechanismus dieser Defekte zu verstehen, sollten in dieser Arbeit Substratproteine, die möglicherweise regulatorische Funktionen ausüben, identifiziert werden. In einem ersten Ansatz sollte mit Hilfe von zweidimensionalen Gelanalysen eine mögliche Akkumulation von potentiellen Substratproteinen in *m*-AAA-Protease-defizienten Hefe-Mitochondrien nachgewiesen werden. Es war mit dieser Methode jedoch nicht möglich, kurzlebige Proteine zu identifizieren. Vielmehr zeigten diese Analysen eine hohe Stabilität des mitochondrialen Proteoms auf.

Unter Verwendung einer proteolytisch inaktiven Variante der *m*-AAA-Protease sollten in einem zweiten Ansatz mögliche interagierende Substrate über eine Affinitätschromatographie gereinigt werden. Mit diesem Ansatz konnte MrpL32, eine Komponente der großen Untereinheit mitochondrialer Ribosomen, als ein Substrat der *m*-AAA-Protease identifiziert werden. MrpL32 wird in Abhängigkeit von der *m*-AAA-Protease sowohl am N- als auch am C-Terminus prozessiert. Die N-terminale Reifung führt dazu, dass MrpL32 in direkter Nachbarschaft zur inneren Mitochondrienmembran in fast vollständig assemblierte Ribosomen integriert werden kann. Die Translation der mitochondrial kodierten Proteine erfolgt entsprechend in direkter Nähe zur inneren Mitochondrienmembran. Der Ausfall der Prozessierung von MrpL32 in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease führt zum Verlust der Atmungskompetenz. Da die Expression der reifen Form von MrpL32 in *m*-AAA-Protease-defizienten Zellen den Atmungsdefekt komplementieren kann, stellt die Reifung von MrpL32 offenbar eine zentrale Aufgabe der *m*-AAA-Protease während der mitochondrialen Biogenese dar. Dabei handelt es sich um einen konservierten Prozess. Der Verlust von Paraplegin, einer Untereinheit der murinen *m*-AAA-Protease, führt in Mitochondrien der Maus sowohl zu einem MrpL32-Prozessierungs- als auch zu einem Translationsdefekt. Die Verbindung zwischen der *m*-AAA-Protease und der Assemblierung der Ribosomen bzw. der mitochondrialen Translation könnte helfen, die zellulären Grundlagen der hereditären spastischen Paraplegie beim Menschen zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

- Adam, Z. (2000). Chloroplast proteases: possible regulators of gene expression. *Biochimie* 82, 647-654.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H., and Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133-140.
- Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W., and Langer, T. (1996). The YTA10-12-complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell* 85, 875-885.
- Arlt, H., Steglich, G., Perryman, R., Guiard, B., Neupert, W., and Langer, T. (1998). The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the *m*-AAA protease. *EMBO J.* 17, 4837-4847.
- Artal-Sanz, M., Tsang, W. Y., Willems, E. M., Grivell, L. A., Lemire, B. D., van der Spek, H., Nijtmans, L. G., and Sanz, M. A. (2003). The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 278, 32091-32099.
- Atorino, L., Silvestri, L., Koppen, M., Cassina, L., Ballabio, A., Marconi, R., Langer, T., and Casari, G. (2003). Loss of *m*-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J. Cell. Biol.* 163, 777-787.
- Attardi, G., and Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4, 289-333.
- Augustin, S., Nolden, M., Müller, S., Hardt, O., Arnold, I., and Langer, T. (2005). Characterization of peptides released from mitochondria: evidence for constant proteolysis and peptide efflux. *J. Biol. Chem.* 280, 2691-2699.
- Banfi, S., Bassi, M. T., Andolfi, G., Marchitello, A., Zanotta, S., Ballabio, A., Casari, G., and Franco, B. (1999). Identification and characterization of AFG3L2, a novel paraplegin-related gene. *Genomics* 59, 51-58.
- Barrientos, A., Korr, D., Barwell, K. J., Sjulsen, C., Gajewski, C. D., Manfredi, G., Ackerman, S., and Tzagoloff, A. (2003). *MTG1* codes for a conserved protein required for mitochondrial translation. *Mol. Biol. Cell.* 14, 2292-2302.
- Barros, M. H., Carlson, C. G., Glerum, D. M., and Tzagoloff, A. (2001). Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *FEBS Lett.* 492, 133-138.
- Barros, M. H., Nobrega, F. G., and Tzagoloff, A. (2002). Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 9997-10002.
- Baumeister, W., and Lupas, A. (1997). The proteasome. *Curr. Op. Struct. Biol.* 7, 273-282.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.
- Beers, J., Glerum, D. M., and Tzagoloff, A. (1997). Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J. Biol. Chem.* 272, 33191-33196.
- Beyer, A. (1997). Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.* 6, 2043-2058.
- Black, P. N., Faergeman, N. J., and DiRusso, C. C. (2000). Long-chain acyl-CoA-dependent regulation of gene expression in bacteria, yeast and mammals. *J. Nutr.* 130, 305S-309S.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., and Huber, R. (1997). Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 6070-6074.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C., and Huber, R. (1999). The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 295-317.
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H. K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., and Huber, R. (2000). The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature* 403, 800-805.

- Böhni, P. C., Daum, G., and Schatz, G. (1983). Import of proteins into mitochondria. Partial purification of a matrix-located protease involved in cleavage of mitochondrial precursor polypeptides. *J. Biol. Chem.* **258**, 4937-4943. Order.
- Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Groudinsky, O., Minet, M., Slonimski, P. P., and Dujardin, G. (1994). *OXA1*, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J. Mol. Biol.* **239**, 201-212.
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**, 1604-1607.
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Tropea, J. E., Khalatova, A. G., Rasulova, F., Dauter, Z., Maurizi, M. R., Rotanova, T. V., Wlodawer, A., and Gustchina, A. (2004). The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. *J. Biol. Chem.* **279**, 8140-8148.
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Kozlov, S., Makhovskaya, O. V., Tropea, J. E., Gustchina, A., Rotanova, T. V., and Wlodawer, A. (2005). Atomic-resolution crystal structure of the proteolytic domain of *Archaeoglobus fulgidus* Lon reveals the conformational variability in the active sites of Lon proteases. *J. Mol. Biol.* **351**, 144-157.
- Bross, P., Rugarli, E. I., Casari, G., and Langer, T. (2004). Protein quality control in mitochondria and neurodegeneration in hereditary spastic paraplegia. *Curr. Topics. Gen.* **8**, 97-121.
- Brown, N. G., Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1994). Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1045-1053.
- Burger, G., Gray, M. W., and Lang, B. F. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* **19**, 709-716.
- Campbell, C. L., Tanaka, N., White, K. H., and Thorsness, P. E. (1994). Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by *yme1* are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol. Biol. Cell* **5**, 899-905.
- Carr, H. S., and Winge, D. R. (2003). Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc. Chem. Res.* **36**, 309-316.
- Casari, G., De-Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., DeMichele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., *et al.* (1998). Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* **93**, 973-983.
- Casari, G., and Rugarli, E. (2001). Molecular basis of inherited spastic paraplegias. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 336-342.
- Charette, M. F., Henderson, G. W., Doane, L. L., and Markovitz, A. (1984). DNA-stimulated ATPase activity on the lon (CapR) protein. *J. Bacteriol.* **158**, 195-201.
- Chen, Z. J., Parent, L., and Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* **84**, 853-862.
- Chen, Z. J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat. Cell Biol.* **7**, 758-765.
- Chiba, S., Akiyama, Y., Mori, H., Matsuo, E., and Ito, K. (2000). Length recognition at the N-terminal tail for the initiation of FtsH-mediated proteolysis. *EMBO Rep.* **1**, 47-52.
- Christianson, T., and Rabinowitz, M. (1983). Identification of multiple transcriptional initiation sites on the yeast mitochondrial genome by *in vitro* capping with guanylyltransferase. *J. Biol. Chem.* **258**, 14025-14033.
- Chung, C. H., and Goldberg, A. L. (1982). DNA stimulates ATP-dependent proteolysis and protein-dependent ATPase activity of protease La from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 795-799.
- Church, C., Goehring, B., Forsha, D., Wazny, P., and Poyton, R. O. (2005). A role for Pet100p in the assembly of yeast cytochrome c oxidase: interaction with a subassembly that accumulates in a pet100 mutant. *J. Biol. Chem.* **280**, 1854-1863.
- Ciechanover, A. (1994). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *Cell* **79**, 13-21.

- Coates, P. J., Jamieson, D. J., Smart, K., Prescott, A. R., and Hall, P. A. (1997). The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr. Biol.* *7*, 607-610.
- Confalonieri, F., and Duguet, M. (1995). A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *BioEssays* *17*, 639-650.
- Contamine, V., and Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 281-315.
- Corydon, T. J., Bross, P., Holst, H. U., Neve, S., Kristiansen, K., Gregersen, N., and Bolund, L. (1998). A human homologue of *Escherichia coli* ClpP caseinolytic protease: recombinant expression, intracellular processing and subcellular localization. *Biochem. J.* *331*, 309-316.
- Corydon, T. J., Wilsbech, M., Jespersgaard, C., Andresen, B. S., Borglum, A. D., Pederson, S., Bolund, L., Gregersen, N., and Bross, P. (2000). Human and mouse mitochondrial orthologs of bacterial clpX. *Mamm. Genome* *11*, 899-905.
- Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1988). Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *85*, 2677-2681.
- Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1990). Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Genet.* *24*, 91-113.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann. Rev. Biochem.* *65*, 801-847.
- Dalsgaard, N. J. (2002). Prion diseases. An overview. *Apmis* *110*, 3-13.
- Deluca, G. C., Ebers, G. C., and Esiri, M. M. (2004). The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *30*, 576-584.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. (2000). Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* *103*, 351-361.
- Dieckmann, C. L., and Staples, R. R. (1994). Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. Rev. Cytol.* *152*, 145-181.
- DiMauro, S., and Schon, E. A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* *348*, 2656-2668.
- DiMauro, S. (2004). Mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* *1658*, 80-88.
- Dobson, C. M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* *15*, 3-16.
- Edwards, S. L., Kraut, J., and Poulos, T. L. (1988). Crystal structure of nitric oxide inhibited cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* *27*, 8074-8081.
- Esser, K., Tursun, B., Ingenhoven, M., Michaelis, G., and Pratje, E. (2002). A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the *m*-AAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J. Mol. Biol.* *323*, 835-843.
- Ferreirinha, F., Quattrini, A., Priozi, M., Valsecchi, V., Dina, G., Broccoli, V., Auricchio, A., Piemonte, F., Tozzi, G., Gaeta, L., *et al.* (2004). Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J. Clin. Invest.* *113*, 231-242.
- Fink, J. K. (1997). Advances in hereditary spastic paraplegia. *Curr. Opin. Neurol.* *10*, 313-318.
- Fiori, A., Mason, T. L., and Fox, T. D. (2003). Evidence that synthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrially encoded ribosomal protein Var1p may be membrane localized. *Eukaryot. Cell* *2*, 651-653.
- Folsch, H., Guiard, B., Neupert, W., and Stuart, R. A. (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *Embo J.* *15*, 479-487.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *440*, 325-331.
- Fox, T. D. (1996). Genetics of mitochondrial translation (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Press).

- Frazier, A. E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., *et al.* (2004). Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 226-233.
- Freeman, K. B. (1970). Inhibition of mitochondrial and bacterial protein synthesis by chloramphenicol. *Can. J. Biochem.* *48*, 479-485.
- Frickey, T., and Lupas, A. N. (2004). Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J. Struct. Biol.* *146*, 2-10.
- Fu, G. K., Smith, M. J., and Markovitz, D. M. (1997). Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* *272*, 534-538.
- Fu, G. K., and Markovitz, D. M. (1998). The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry* *37*, 1905-1909.
- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., and Lazarow, P. B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* *93*, 97-102.
- Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* *1592*, 63-77.
- Galluhn, D., and Langer, T. (2004). Reversible assembly of the ATP-binding cassette transporter Mdl1 with the F₁F₀-ATP synthase in mitochondria. *J. Biol. Chem.* *279*, 38338-38345.
- Gasser, S. M., Ohashi, A., Daum, G., Bohni, P. C., Gibson, J., Reid, G. A., Yonetani, T., and Schatz, G. (1982). Imported mitochondrial proteins cytochrome *b2* and cytochrome *c1* are processed in two steps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *79*, 267-271.
- Germaniuk, A., Liberek, K., and Marszalek, J. (2002). A chaperone (Hsp70-Hsp78) system restores mitochondrial DNA synthesis following thermal inactivation of Mip1p polymerase. *J. Biol. Chem.* *277*, 27801-27808.
- Geyl, D., Bock, A., and Isono, K. (1981). An improved method for two-dimensional gel-electrophoresis: analysis of mutationally altered ribosomal proteins of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* *181*, 309-312.
- Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* *82*, 373-428.
- Glickman, M. H., and Raveh, D. (2005). Proteasome plasticity. *FEBS Lett.* *579*, 3214-3223.
- Glover, J. R., and Tkach, J. M. (2001). Crowbars and ratchets: hsp100 chaperones as tools in reversing protein aggregation. *Biochem. Cell. Biol.* *79*, 557-668.
- Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *15*, 1541-1553.
- Gorg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A., and Weiss, W. (1995). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* *16*, 1079-1086.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* *21*, 1037-1053.
- Gottesman, S., Clark, W. P., and Maurizi, M. R. (1990). The ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence of ClpA and identification of a Clp-specific substrate. *J. Biol. Chem.* *265*, 7886-7893.
- Gottesman, S., Maurizi, M. R., and Wickner, S. (1997). Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell* *91*, 435-438.
- Gottesman, S. (1999). Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *2*, 142-147.
- Graack, H. R., and Wittmann-Liebold, B. (1998). Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *Biochem. J.* *329 (Pt 3)*, 433-448.
- Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* *2*, REVIEWS1018.

- Green-Willms, N. S., Fox, T. D., and Costanzo, M. C. (1998). Functional interactions between yeast mitochondrial ribosomes and mRNA 5' untranslated leaders. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 1826-1834.
- Grivell, L. A., and Schweyen, R. J. (1989). RNA splicing in yeast mitochondria: taking out the twists. *Trends Genet.* *5*, 39-41.
- Grivell, L. A. (1995). Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *30*, 121-164.
- Grivell, L. A., Artal-Sanz, M., Hakkaart, G., de Jong, L., Nijtmans, L. G., van Oosterum, K., Siep, M., and van der Spek, H. (1999). Mitochondrial assembly in yeast. *FEBS Lett.* *452*, 57-60.
- Grohmann, L., Graack, H. R., Kruff, V., Choli, T., Goldschmidt-Reisin, S., and Kitakawa, M. (1991). Extended N-terminal sequencing of proteins of the large ribosomal subunit from yeast mitochondria. *FEBS Lett.* *284*, 51-56.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* *386*, 463-471.
- Gronostajski, R. M., Pardee, A. B., and Goldberg, A. L. (1985). The ATP dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *260*, 3344-3349.
- Guélin, E., Rep, M., and Grivell, L. A. (1994). Sequence of the *AFG3* gene encoding a new member of the FtsH/Yme1/Tma subfamily of the AAA-protein family. *Yeast* *10*, 1389-1394.
- Guélin, E., Rep, M., and Grivell, L. A. (1996). Afg3p, a mitochondrial ATP-dependent metalloprotease, is involved in the degradation of mitochondrially-encoded Cox1, Cox3, Cob, Su6, Su8 and Su9 subunits of the inner membrane complexes III, IV and V. *FEBS Lett.* *381*, 42-46.
- Guenther, B., Onrust, R., Sali, A., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the delta' subunit of the clamp-loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* *91*, 335-345.
- Gygi, S. P., and Aebersold, R. (2000). Mass spectrometry and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *4*, 489-494.
- Haffter, P., McMullin, T. W., and Fox, T. D. (1991). Functional interactions among two yeast mitochondrial ribosomal proteins and an mRNA-specific translational activator. *Genetics* *127*, 319-326.
- Haffter, P., and Fox, T. D. (1992). Suppression of carboxy-terminal truncations of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator PET122 by mutations in two new genes, *MRP17* and *PET127*. *Mol. Gen. Genet.* *235*, 64-73.
- Halperin, T., Zheng, B., Itzhaki, H., Clarke, A. K., and Adam, Z. (2001). Plant mitochondria contain proteolytic and regulatory subunits of the ATP-dependent Clp protease. *Plant Mol. Biol.* *45*, 461-468.
- Harding, A. E. (1981). Genetic aspects of autosomal dominant late onset cerebellar ataxia. *J. Med. Genet.* *18*, 436-441.
- Harding, A. E. (1984). Hereditary "pure" spastic paraplegia, In *The hereditary ataxias and related disorders* (New York: Churchill Livingstone), pp. 174-191.
- Harms, J., Schlutzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* *107*, 679-688.
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., and Gordon, C. (2003). Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 26-31.
- Hartmann-Petersen, R., and Gordon, C. (2004). Protein degradation: recognition of ubiquitinated substrates. *Curr. Biol.* *14*, R754-756.
- Hawlotschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F. U., and Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* *53*, 795-806.

- Hayashi, J., Ohta, S., Kikuchi, A., Takemitsu, M., Goto, Y., and Nonaka, I. (1991). Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 10614-106418.
- He, S., and Fox, T. D. (1997). Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 1449-1460.
- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W., and Stuart, R. A. (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2250-2255.
- Hell, K., Tzagoloff, A., Neupert, W., and Stuart, R. A. (2000). Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 4571-4578. Order.
- Hell, K., Neupert, W., and Stuart, R. A. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* **20**, 1281-1288.
- Herrmann, J. M., and Neupert, W. (2003). Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* **55**, 219-225.
- Herrmann, J. M., and Bonnefoy, N. (2004). Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase. *J. Biol. Chem.* **279**, 2507-2512.
- Herrmann, J. M., and Funes, S. (2005). Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* **354**, 43-52.
- Hilt, W., and Wolf, D. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 96-102.
- Hooper, N. M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1-6.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D., and Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**, 577-586.
- Horan, S., Bourges, I., Taanman, J. W., and Meunier, B. (2005). Analysis of COX2 mutants reveals cytochrome oxidase subassemblies in yeast. *Biochem. J.* **390**, 703-708.
- Horng, Y. C., Cobine, P. A., Maxfield, A. B., Carr, H. S., and Winge, D. R. (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J. Biol. Chem.* **279**, 35334-35340.
- Horwich, A. L., Weber-Ban, E. U., and Finley, D. (1999). Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 11033-11040.
- Hoving, S., Voshol, H., and van Oostrum, J. (2000). Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels. *Electrophoresis* **21**, 2617-2621.
- Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* **146**, 11-31.
- Jacobs, H. T., and Turnbull, D. M. (2005). Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease. *Trends Genet.* **21**, 312-314.
- Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K., and Stuart, R. A. (2003). Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J.* **22**, 6438-6447.
- Juhola, M. K., Shah, Z. H., Grivell, L. A., and Jacobs, H. T. (2000). The mitochondrial inner membrane AAA metalloprotease family in metazoans. *FEBS Lett.* **481**, 91-95.
- Kambacheld, M., Augustin, S., Tatsuta, T., Müller, S., and Langer, T. (2005). Role of the novel metalloprotease MOP112 and saccharolysin for the complete degradation of proteins residing in different subcompartments of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 20132-20139.
- Kang, S. G., Ortega, J., Singh, S. K., Wang, N., Huang, N. N., Steven, A. C., and Maurizi, M. R. (2002). Functional proteolytic complexes of the human mitochondrial ATP-dependent protease, hClpXP. *J. Biol. Chem.* **277**, 21095-21102.
- Kaput, J., Goltz, S., and Blobel, G. (1982). Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor. Functional implications of the pre sequence for protein transport into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 15054-15058.

- Kaput, J., Brandriss, M. C., and Prussak-Wiechowska, T. (1989). In vitro import of cytochrome c peroxidase into the intermembrane space: release of the processed form by intact mitochondria. *J. Cell Biol.* 109, 101-112.
- Karata, K., Inagawa, T., Wilkinson, A. J., Tatsuta, T., and Ogura, T. (1999). Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. *J. Biol. Chem.* 274, 26225-26232.
- Karata, K., Verma, C. S., Wilkinson, A. J., and Ogura, T. (2001). Probing the mechanism of ATP hydrolysis and substrate translocation in the AAA protease FtsH by modelling and mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 39, 890-903.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621-663.
- Käser, M., Kambacheld, M., Kisters-Woike, B., and Langer, T. (2003). Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the *m*-AAA protease. *J. Biol. Chem.* 278, 46414-46423.
- Kenmochi, N., Suzuki, T., Uechi, T., Magoori, M., Kuniba, M., Higa, S., Watanabe, K., and Tanaka, T. (2001). The human mitochondrial ribosomal protein genes: mapping of 54 genes to the chromosomes and implications for human disorders. *Genomics* 77, 65-70.
- Kenniston, J. A., Baker, T. A., Fernandez, J. M., and Sauer, R. T. (2003). Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine. *Cell* 114, 511-520.
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1996). A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J.* 15, 6122-6131.
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1998). Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA. *J. Mol. Biol.* 279, 175-188.
- Kisselev, A. F., Akopian, T. N., and Goldberg, A. L. (1998). Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* 273, 1982-1989.
- Klanner, C., Prokisch, H., and Langer, T. (2001). MAP-1 and IAP-1, two novel AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces in the mitochondrial inner membrane of *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* 12, 2858-2869.
- Knittler, M. R., Gulow, K., Seelig, A., and Howard, J. C. (1998). MHC class I molecules compete in the endoplasmic reticulum for access to transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 161, 5967-5977.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-644.
- Koehler, C. M. (2004). New developments in mitochondrial assembly. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 309-335.
- Korbel, D., Wurth, S., Kaser, M., and Langer, T. (2004). Membrane protein turnover by the *m*-AAA protease in mitochondria depends on the transmembrane domains of its subunits. *EMBO Rep.* 5, 698-703.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15, 8125-8148.
- Kozany, C., Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W., and Hell, K. (2004). The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 234-241.
- Krause-Buchholz, U., Barth, K., Dombrowski, C., and Rodel, G. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. *Curr. Genet.* 46, 20-28.

- Krause, K., Lopes de Souza, R., Roberts, D. G., and Dieckmann, C. L. (2004). The mitochondrial message-specific mRNA protectors Cbp1 and Pet309 are associated in a high-molecular weight complex. *Mol. Biol. Cell.* *15*, 2674-2683.
- Kremmidiotis, G., Gardner, A. E., Settasatian, C., Savoia, A., Sutherland, G. R., and Callen, D. F. (2001). Molecular and functional analyses of the human and mouse genes encoding AFG3L1, a mitochondrial metalloprotease homologous to the human spastic paraplegia protein. *Genomics* *76*, 58-65.
- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., and Dalbey, R. E. (2003). The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell. Biol.* *13*, 510-516.
- Kurland, C. G., and Andersson, S. G. (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 786-820.
- Kuzela, S., and Goldberg, A. L. (1994). Mitochondrial ATP-dependent protease from rat liver and yeast. *Methods Enzymol.* *244*, 376-383.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Langer, T. (2000). AAA proteases - cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 207-256.
- Leary, S. C., Kaufman, B. A., Pellicchia, G., Guercin, G. H., Mattman, A., Jaksch, M., and Shoubridge, E. A. (2004). Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1839-1848.
- Lemaire, C., Hamel, P., Velours, J., and Dujardin, G. (2000). Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F₀-ATPase subunit accumulation in an *oxa1* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 23471-23475.
- Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W., and Weis, W. I. (1998). Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* *94*, 525-536.
- Leonhard, K., Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Mannhaupt, G., Neupert, W., and Langer, T. (1996). AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J.* *15*, 4218-4229.
- Leonhard, K., Stiegler, A., Neupert, W., and Langer, T. (1999). Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature* *398*, 348-351.
- Leonhard, K., Guiard, B., Pellicchia, G., Tzagoloff, A., Neupert, W., and Langer, T. (2000). Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol. Cell* *5*, 629-638.
- Leonhardt, S. A., Fearon, K., Danese, P. N., and Mason, T. L. (1993). Hsp78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 6304-6313.
- Li, Q., and Verma, I. M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 725-734.
- Lin, L., and Ghosh, S. (1996). A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2248-2254.
- Lin, L., and Kobayashi, M. (2003). Stability of the Rel homology domain is critical for generation of NF-kappa B p50 subunit. *J. Biol. Chem.* *278*, 31479-31485.
- Linnane, A., Ward, K., Forrester, I., Haslam, J., and Plummer, D. (1973). in *Yeast, Mold and Plant Protoplasts* (New York: Academic Press).
- Liu, J., Smith, C. L., DeRyckere, D., DeAngelis, K., Martin, G. S., and Berger, J. M. (2000a). Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol. Cell* *6*, 637-648.
- Liu, M., and Spremulli, L. (2000b). Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J. Biol. Chem.* *275*, 29400-29406.

- Longtine, M. S., McKenzie III, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1995). Crystal Structure of the 20 S Proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å Resolution. *Science* 268, 533-539.
- Lu, B., Liu, T., Crosby, J. A., Thomas-Wohlever, J., Lee, I., and Suzuki, C. K. (2003). The ATP-dependent Lon protease of *Mus musculus* is a DNA-binding protein that is functionally conserved between yeast and mammals. *Gene* 306, 45-55.
- Lupas, A., Flanagan, J. M., Tamura, T., and Baumeister, W. (1997). Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22, 399-404.
- Lupas, A. N., and Martin, J. (2002). AAA proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 746-753.
- Maccacchini, M. L., Rudin, Y., and Schatz, G. (1979). Transport of proteins across the mitochondrial outer membrane. A precursor form of the cytoplasmically made intermembrane enzyme cytochrome c peroxidase. *J. Biol. Chem.* 254, 7468-7471.
- Makarova, K. S., Ponomarev, V. A., and Koonin, E. V. (2001). Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. *Genome Biol.* 2, RESEARCH 0033.
- Manthey, G. M., and McEwen, J. E. (1995). The product of the nuclear gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 4031-4043.
- Martin, C. E., Oh, C. S., Kandasamy, P., Chellapa, R., and Vemula, M. (2002). Yeast desaturases. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1080-1082.
- Matthews, D. E., Hessler, R. A., Denslow, N. D., Edwards, J. S., and O'Brien, T. W. (1982). Protein composition of the bovine mitochondrial ribosome. *J. Biol. Chem.* 257, 8788-8794.
- Maurizi, M. R. (1992). Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* 48, 178-201.
- Maurizi, M. R., and Li, C. C. (2001). AAA proteins: in search of a common molecular basis. *International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins. EMBO Rep.* 2, 980-985.
- McDermott, C., White, K., Bushby, K., and Shaw, P. (2000). Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 69, 150-160.
- McMullin, T. W., Haffter, P., and Fox, T. D. (1990). A novel small-subunit ribosomal protein of yeast mitochondria that interacts functionally with an mRNA-specific translational activator. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4590-4595.
- McMullin, T. W., and Fox, T. D. (1993). *COX3* mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 11737-11741.
- McQuibban, G. A., S., S., and Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423, 537-541.
- Michaelis, G., Esser, K., Tursun, B., Stohn, J. P., Hanson, S., and Pratje, E. (2005). Mitochondrial signal peptidases of yeast: The rhomboid peptidase Pcp1 and its substrate cytochrome c peroxidase. *Gene* 354, 58-63.
- Michaelis, U., Korte, A., and Rodel, G. (1991). Association of cytochrome b translational activator proteins with the mitochondrial membrane: implications for cytochrome b expression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 230, 177-185.
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2004). Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J. Biol. Chem.* 279, 22781-22785.
- Miller, C., Saada, A., Shaul, N., Shabtai, N., Ben-Shalom, E., Shaag, A., HersHKovitz, E., and Elpeleg, O. (2004). Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann. Neurol.* 56, 734-738.

- Miller, J., and Gordon, C. (2005). The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett.* **579**, 3224-3230.
- Mock, W. L., and Stanford, D. J. (1996). Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry* **35**, 7369-7377.
- Mulero, J. J., and Fox, T. D. (1993a). Alteration of the *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111. *Mol Biol Cell* **4**, 1327-1335.
- Mulero, J. J., and Fox, T. D. (1993b). *PET111* acts in the 5'-leader of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial COX2 mRNA to promote its translation. *Genetics* **133**, 509-516.
- Myers, A. M., Pape, L. K., and Tzagoloff, A. (1985). Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **4**, 2087-2092.
- Naithani, S., Saracco, S. A., Butler, C. A., and Fox, T. D. (2003). Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 324-333.
- Nakai, T., Mera, Y., Yasuhara, T., and Ohashi, A. (1994). Divalent metal ion-dependent mitochondrial degradation of unassembled subunits 2 and 3 of cytochrome c oxidase. *J. Biochem. (Tokyo)* **116**, 752-758.
- Nakai, T., Yasuhara, T., Fujiki, Y., and Ohashi, A. (1995). Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for the degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4441-4452.
- Nargang, F. E., Preuss, M., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2002). The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **277**, 12846-12853.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Pardowitz, I., Arold, N., Ehrhardt, W., and Taube, D. (1990). Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis* **11**, 101-117.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* **66**, 863-917.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**, 27-43.
- Neuwald, A. F. (2005). Evolutionary clues to eukaryotic DNA clamp-loading mechanisms: analysis of the functional constraints imposed on replication factor C AAA+ ATPases. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3614-3628.
- Nieuwenhuysen, P., and Slegers, H. (1978). Purification of eukaryotic ribosomes by isopycnic centrifugation in sucrose. *Anal. Biochem.* **89**, 472-480.
- Nijtmans, L. G. J., de Jong, L., Sanz, M. A., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., Van der Speck, H., and Grivell, L. A. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* **19**, 2444-2451.
- Nolden, M., Kisters-Woike, B., Langer, T., and Graef, M. (2005a). Quality control of proteins in the mitochondrion. *Curr. Topics Gen.*, in press.
- Nolden, M., Ehses, S., Koppen, M., Bernacchia, A., Rugarli, E. I., and Langer, T. (2005b). The *m*-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell*, in press.
- O'Brien, T. W. (2002). Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease. *Gene* **286**, 73-79.
- O'Brien, T. W. (2003). Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life* **55**, 505-513.

- Obbink, D. J., Spithill, T. W., Maxwell, R. J., and Linnane, A. W. (1977). Biogenesis of mitochondria 48: mikamycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*--a mitochondrial mutation conferring resistance to an antimycin A-like contaminant in mikamycin. *Mol. Gen. Genet.* *151*, 127-136.
- Ogura, T., and Wilkinson, A. J. (2001). AAA+ superfamily of ATPases: common structure-diverse function. *Genes to Cells* *6*, 575-597.
- Ogura, T., Whiteheart, S. W., and Wilkinson, A. J. (2004). Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* *146*, 106-112.
- Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (2000). Reversing neurodegeneration: a promise unfolds. *Cell* *101*, 1-4.
- Pajic, A., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W., and Langer, T. (1994). Yta10p is required for the ATP-dependent degradation of polypeptides in the inner membrane of mitochondria. *FEBS Lett.* *353*, 201-206.
- Patel, S., and Latterich, M. (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* *8*, 65-71.
- Patel, V. B., Cunningham, C. C., and Hantgan, R. R. (2001). Physicochemical properties of rat liver mitochondrial ribosomes. *J. Biol. Chem.* *276*, 6739-6746.
- Paul, M. F., and Tzagoloff, A. (1995). Mutations in *RCA1* and *AFG3* inhibit F₁-ATPase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *373*, 66-70.
- Pearce, D. A., and Sherman, F. (1995). Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome *c* and suppression of the degradation by mutation of *yme1*. *J. Biol. Chem.* *270*, 1-4.
- Pel, H. J., and Grivell, L. A. (1993). The biology of yeast mitochondrial introns. *Mol. Biol. Rep.* *18*, 1-13.
- Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., and Fox, T. D. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* *22*, 5951-5961.
- Pines, J., and Lindon, C. (2005). Proteolysis: anytime, any place, anywhere? *Nat. Cell Biol.* *7*, 731-735.
- Polo, J. M., Calleja, J., Combarros, O., and Berciano, J. (1993). Hereditary "pure" spastic paraplegia: a study of nine families. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* *56*, 175-181.
- Porankiewicz, J., Wang, J., and Clarke, A. K. (1999). New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol. Microbiol.* *32*, 449-458.
- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., and Jentsch, S. (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* *107*, 667-677.
- Rape, M., and Jentsch, S. (2004). Productive RUPTure: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim. Biophys. Acta.* *1695*, 209-213.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* *248*, 183-228.
- Rehling, P., Brandner, K., and Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 519-530.
- Reichert, A. S., and Neupert, W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet.* *20*, 555-562.
- Reid, E. (1997). Pure hereditary spastic paraplegia. *J. Med. Genet.* *34*, 499-503.
- Rep, M., and Grivell, L. A. (1996). The role of protein degradation in mitochondrial function and biogenesis. *Curr. Genet.* *30*, 367-380.
- Rep, M., Nooy, J., Guélin, E., and Grivell, L. A. (1996). Three genes for mitochondrial proteins suppress null-mutations in both *AFG3* and *RCA1* when overexpressed. *Curr. Genet.* *30*, 206-211.
- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J. P., and Letellier, T. (2003). Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* *370*, 751-762.

- Rotanova, T. V., Melnikov, E. E., Khalatova, A. G., Makhovskaya, O. V., Botos, I., Wlodawer, A., and Gustchina, A. (2004). Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur. J. Biochem.* *271*, 4865-4871.
- Rothstein, R. J., and Sherman, F. (1980). Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics* *94*, 871-889.
- Rottgers, K., Zufall, N., Guiard, B., and Voos, W. (2002). The ClpB homolog Hsp78 is required for the efficient degradation of proteins in the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* *277*, 45829-45837.
- Rowe, T., and Balch, W. E. (1997). Membrane fusion. Bridging the gap by AAA ATPases. *Nature* *388*, 20-21.
- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N., and Baumeister, W. (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* *407*, 508-513.
- Saikawa, N., Akiyama, Y., and Ito, K. (2004). FtsH exists as an exceptionally large complex containing HflKC in the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* *146*, 123-129.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sauer, R. T., Bolon, D. N., Burton, B. M., Burton, R. E., Flynn, J. M., Grant, R. A., Hersch, G. L., Joshi, S. A., Kenniston, J. A., Levchenko, I., *et al.* (2004). Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* *119*, 9-18.
- Savel'ev, A. S., Novikova, L. A., Kovaleva, I. E., Luzikov, V. N., Neupert, W., and Langer, T. (1998). ATP-dependent proteolysis in mitochondria: *m*-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70-system. *J. Biol. Chem.* *273*, 20596-20602.
- Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A., and Lindquist, S. (1996). Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 289-296.
- Schmidt, B., Wachter, E., Sebald, W., and Neupert, W. (1984). Processing peptidase of *Neurospora* mitochondria. Two-step cleavage of imported ATPase subunit 9. *Eur. J. Biochem.* *144*, 581-588.
- Schmidt, M., Lupas, A. N., and Finley, D. (1999). Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *3*, 584-591.
- Schmitt, M., Neupert, W., and Langer, T. (1996). The molecular chaperone Hsp78 confers compartment-specific thermotolerance to mitochondria. *J. Cell Biol.* *134*, 1375-1386.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* *404*, 770-774.
- Schwarz, G. A., and Liu, C. N. (1956). Hereditary (familial) spastic paraplegia: further clinical and pathological observations. *Arch. Neurol. Psychiatry* *75*, 144-162.
- Selkoe, D. J. (2001). Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *98*, 11039-11041.
- Shah, Z. H., Migliosi, V., Miller, S. C., Wang, A., Friedman, T. B., and Jacobs, H. T. (1998). Chromosomal locations of three human nuclear genes (RPSM12, TUFM, and AFG3L1) specifying putative components of the mitochondrial gene expression apparatus. *Genomics* *48*, 384-388.
- Shah, Z. H., Hakkaart, G. A. J., Arku, B., DeJong, L., Van der Speck, H., Grivell, L., and Jacobs, H. T. (2000). The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast *yme1* disruptant. *FEBS Lett.* *478*, 267-270.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* *350*, 3-41.
- Shotland, Y., Teff, D., Koby, S., Kobilier, O., and Oppenheim, A. B. (2000). Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *299*, 953-964.

- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., *et al.* (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 13207-13212.
- Song, H. K., and Eck, M. J. (2003). Structural basis of degradation signal recognition by SspB, a specificity-enhancing factor for the ClpXP proteolytic machine. *Mol. Cell* *12*, 75-86.
- Sousa, M. C., Trame, C. B., Tsuruta, H., Wilbanks, S. M., Reddy, V. S., and McKay, D. B. (2000). Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell* *103*, 633-643.
- Spithill, T. W., Trembath, M. K., Lukins, H. B., and Linnane, A. W. (1978). Mutations of the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae* which affect the interaction between mitochondrial ribosomes and the inner mitochondrial membrane. *Mol. Gen. Genet.* *164*, 155-162.
- Stahlberg, H., Kutejova, E., Suda, K., Wolpensinger, B., Lustig, A., Schatz, G., Engel, A., and Suzuki, C. K. (1999). Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 6787-6790.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Kunkele, K. P., Nussberger, S., Neupert, W., and Rapaport, D. (2000). Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J* *19*, 4895-4902.
- Steglich, G., Neupert, W., and Langer, T. (1999). Prohibitins regulate membrane protein degradation by the *m*-AAA protease in mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3435-3442.
- Steinmetz, L. M., Scharfe, C., Deutschbauer, A. M., Mokranjac, D., Herman, Z. S., Jones, T., Chu, A. M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P. J., and Davis, R. W. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat. Genet.* *31*, 400-404.
- Stuart, R. (2002). Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex. *Biochim. Biophys. Acta.* *1592*, 79-87.
- Subramani, S. (1998). Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol. Rev.* *78*, 171-188.
- Suzuki, C. K., Suda, K., Wang, N., and Schatz, G. (1994). Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* *264*, 273-276.
- Suzuki, C. K., Rep, M., Van Dijl, J. M., Suda, K., Grivell, L. A., and Schatz, G. (1997). ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 118-123.
- Suzuki, T., Terasaki, M., Takemoto-Hori, C., Hanada, T., Ueda, T., Wada, A., and Watanabe, K. (2001a). Structural compensation for the deficit of rRNA with proteins in the mammalian mitochondrial ribosome. Systematic analysis of protein components of the large ribosomal subunit from mammalian mitochondria. *J. Biol. Chem.* *276*, 21724-21736.
- Suzuki, T., Terasaki, M., Takemoto-Hori, C., Hanada, T., Ueda, T., Wada, A., and Watanabe, K. (2001b). Proteomic analysis of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of protein components in the 28 S small subunit. *J. Biol. Chem.* *276*, 33181-33195.
- Swaminathan, S., Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (1999). The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol. Biol. Cell.* *10*, 2583-2594.
- Sylvester, J. E., Fischel-Ghodsian, N., Mougey, E. B., and O'Brien, T. W. (2004). Mitochondrial ribosomal proteins: candidate genes for mitochondrial disease. *Genet. Med.* *6*, 73-80.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* *22*, 6448-6457.
- Tatsuta, T., Model, K., and Langer, T. (2005a). Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol. Biol. Cell* *16*, 248-259.

- Tatsuta, T., and Langer, T. (2005b). Studying proteolysis within mitochondria. *Curr. Topics Gen.*, in press.
- Tauer, R., Mannhaupt, G., Schnall, R., Pajic, A., Langer, T., and Feldmann, H. (1994). Yta10p, a member of a novel ATPase family in yeast, is essential for mitochondrial function. *FEBS Lett.* 353, 197-200.
- Taylor, J. P., Hardy, J., and Fischbeck, K. H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296, 1991-1995.
- Taylor, R. W., and Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genetics* 6, 389-402.
- Thorsness, P. E., and Fox, T. D. (1993a). Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. *Genetics* 134, 21-28.
- Thorsness, P. E., White, K. H., and Fox, T. D. (1993b). Inactivation of *YME1*, a member of the ftsH-SEC18-PAS1-CDC48 family of putative ATPase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5418-5426.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76, 4350-4354.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136-1144.
- Tzagoloff, A., Macino, G., and Sebald, W. (1979). Mitochondrial genes and translation products. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 419-441.
- Tzagoloff, A., and Myers, A. M. (1986). Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 249-285.
- Tzagoloff, A., Gatti, D., and Gampel, A. (1990). Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 39, 129-158.
- Tzagoloff, A., Yue, J., Jang, J., and Paul, M. F. (1994). A new member of a family of ATPases is essential for assembly of mitochondrial respiratory chain and ATP synthetase complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 26144-26151.
- Uchiyama, K., and Kondo, H. (2005). p97/p47-Mediated biogenesis of Golgi and ER. *J. Biochem. (Tokyo)* 137, 115-119.
- Ungermann, C., Neupert, W., and Cyr, D. M. (1994). The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* 266, 1250-1253.
- Vallee, B. L., and Auld, D. S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29, 5647-5659.
- Van der Klei, I., Veenhuis, M., and Neupert, W. (1994). A morphological view on mitochondrial protein targeting. *Microsc. Res. Tech.* 27, 284-293.
- Van Dijl, J. M., Kutejova, E., Suda, K., Perecko, D., Schatz, G., and Suzuki, C. K. (1998). The ATPase and protease domains of yeast mitochondrial Lon: roles in proteolysis and respiration-dependent growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10584-10589.
- Van Dyck, L., Pearce, D. A., and Sherman, F. (1994). *PIM1* encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 238-242.
- Van Dyck, L., Neupert, W., and Langer, T. (1998). The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.* 12, 1515-1524.
- Van Dyck, L., Dembowski, M., Neupert, W., and Langer, T. (1998a). Mcx1p, a ClpX homologue in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 438, 250-254.
- Van Dyck, L., and Langer, T. (1999b). ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 825-842.
- Varshavsky, A. (1997). The ubiquitin system. *TIBS* 22, 383-387.
- Vestweber, D., and Schatz, G. (1988). Point mutations destabilizing a precursor protein enhance its post-translational import into mitochondria. *EMBO J.* 7, 1147-1151.

- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., and Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and I kappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 43-52.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015-1068.
- von Mering, C., Jensen, L. J., Snel, B., Hooper, S. D., Krupp, M., Foglierini, M., Jouffre, N., Huynen, M. A., and Bork, P. (2005). STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* **33**, D433-437.
- Waizenegger, T., Habib, S. J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S. A., Hell, K., Neupert, W., and Rapaport, D. (2004). Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep.* **5**, 704-709.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-951.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., and Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351.
- Wang, J., Hartling, J. A., and Flanagan, J. M. (1997). The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**, 447-456.
- Wang, J., Song, J. J., Franklin, M. C., Kamtekar, S., Im, Y. J., Rho, S. H., Seong, I. S., Lee, C. S., Chung, C. H., and Eom, S. H. (2001). Crystal structures of the HslIVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism. *Structure (Camb)* **9**, 177-184.
- Wang, N., Gottesman, S., Willingham, M. C., Gottesman, S., and Maurizi, M. R. (1993). A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11247-11251.
- Wang, N., Maurizi, M. R., Emmert, B. L., and Gottesman, S. (1994). Synthesis, processing, and localization of human Lon protease. *J. Biol. Chem.* **269**, 29308-29313.
- Weber-Ban, E. U., Reid, B., Miranker, A. D., and Horwich, A. L. (1999). Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* **401**, 90-93.
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H., and Rothman, J. E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772.
- Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 169-178.
- Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., and Baumeister, W. (1994). Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.* **349**, 205-209.
- Westermann, B., and Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 1421-1427.
- Wickner, S., Gottesman, S., Skowyra, D., Hoskins, J., McKenney, K., and Maurizi, M. R. (1994). A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12218-12222.
- Wickner, S., Maurizi, M. R., and Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., and Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 14473-14476.
- Witte, C., Jensen, R. E., Yaffe, M. P., and Schatz, G. (1988). MAS1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease. *EMBO J.* **7**, 1439-1447.
- Yaffe, M. P., and Schatz, G. (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4819-4823.

- Yaffe, M. P., Ohta, S., and Schatz, G. (1985). A yeast mutant temperature-sensitive for mitochondrial assembly is deficient in a mitochondrial protease activity that cleaves imported precursor polypeptides. *EMBO J.* *4*, 2069-2074.
- Yamada, K., Ariyoshi, M., and Morikawa, K. (2004). Three-dimensional structural views of branch migration and resolution in DNA homologous recombination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 130-137.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J., and Woese, C. R. (1985). Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *82*, 4443-4447.
- Young, L., Leonhard, K., Tatsuta, T., Trowsdale, J., and Langer, T. (2001). Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* *291*, 2135-2138.
- Yu, R. C., Hanson, P. I., Jahn, R., and Brünger, A. T. (1998). Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 803-811.
- Zehnbauser, B. A., Foley, E. C., Henderson, G. W., and Markovitz, A. (1981). Identification and purification of the Lon+ (capR+) gene product, a DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *78*, 2043-2047.
- Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., *et al.* (2000). Structure of the AAA ATPase p97. *Mol. Cell* *6*, 1473-1484.
- Zhu, Z., Yao, J., Johns, T., Fu, K., De Bie, I., Macmillan, C., Cuthbert, A. P., Newbold, R. F., Wang, J., Chevrette, M., *et al.* (1998). SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.* *20*, 337-343.
- Zwickl, P., Baumeister, W., and Steven, A. (2000). Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 242-250.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AAA	“ATPases associated with a variety of cellular activities“
AAC	ADP/ATP-Carrier
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCP	Cytochrom-c-Peroxidase
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GFP	“green fluorescent protein“
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin (-Epitop)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonat
HSP	hereditäre spastische Paraplegie
IgG	Immunglobulin G
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
MgAc	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonat
mRNA	”messenger“ RNA
Myc	c-Myc (-Epitop)
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offenes Leseraster („open reading frame“)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	„presequence translocase-associated motor“
Para	Paraplegin
PAS	Protein A-Sepharose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
Phe	Phenylalanin
pmol	Picomol pro Liter
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAM	„sorting and assembly machinery in the outer membrane“
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SRH	„second region of homology“
TCA	Trichloressigsäure
t_d	Verdopplungszeit
TIM	„translocase of the inner membrane“
TOM	„translocase of the outer membrane“
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
ts	temperatursensitiv
U	Unit(s)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	zentrales Nervensystem

8 Anhang

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Nolden, M., Ehses, S., Koppen, M., Bernacchia, A., Rugarli, E. I., and Langer, T. (2005)

„The *m*-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria.“

Cell, in press.

Abstract:

AAA proteases comprise a conserved family of membrane-bound ATP-dependent proteases which ensures the quality control of mitochondrial inner membrane proteins. Inactivation of AAA proteases causes pleiotropic phenotypes in various organisms including respiratory deficiencies, mitochondrial morphology defects and axonal degeneration in hereditary spastic paraplegia (HSP). The molecular basis of these defects, however, remained unclear. Here, we describe a regulatory role of an AAA protease for mitochondrial protein synthesis in yeast. The mitochondrial ribosomal protein MrpL32 is processed by the *m*-AAA protease allowing its association with preassembled ribosomal particles and completion of ribosome assembly in close proximity to the inner membrane. Maturation of MrpL32 and mitochondrial protein synthesis are also impaired in a HSP mouse model lacking the *m*-AAA protease subunit paraplegin, demonstrating functional conservation. Our findings therefore rationalize mitochondrial defects associated with *m*-AAA protease mutants in yeast and shed new light on the mechanism of axonal degeneration in HSP.

Nolden, M., Kisters-Woike, B., Langer, T., and Graef, M. (2005)

„Quality control of proteins in the mitochondrion.“

Curr. Topics Gen., in press.

Abstract:

The quality control of proteins within mitochondria is ensured by conserved and ubiquitous ATP-dependent molecular chaperones and proteases, present in various subcompartments of the organelle. Hsp70 chaperones drive protein import and facilitate folding of newly imported preproteins, but are also required for proteolysis of misfolded polypeptides by ATP-dependent proteases. Energy dependent proteases in mitochondria include Lon and Clp proteases in the matrix space and two AAA proteases in the inner membrane, all of them compartmental proteases of the AAA⁺ family with chaperone-like properties. Studies in yeast identify essential regulatory roles of these proteases for mitochondrial genome integrity, gene expression, the assembly of the respiratory chain, and mitochondrial morphology. An impaired proteolytic system in mitochondria has been identified as the cause for neurodegeneration in human. The present review summarizes the current understanding of the protein quality system in mitochondria and discusses the molecular action of protein machineries involved.

Augustin, S., Nolden, M., Müller, S., Hardt, O., Arnold, I., and Langer, T. (2005)

„Characterization of peptides released from mitochondria: evidence for constant proteolysis and peptide efflux.“

J. Biol. Chem. 280, 2691-2699

Abstract:

Mitochondria contain conserved ATP-dependent proteases which ensure the quality control of mitochondrial proteins and control essential steps in mitochondrial biogenesis. Recent studies demonstrated that non-assembled mitochondrially encoded proteins are degraded to peptides and amino acids which are released from mitochondria. Here, we have characterised peptides extruded from mitochondria by mass spectrometry and identified 270 peptides which are exported in an ATP- and temperature-dependent manner. The peptides originate from 51 mitochondrially and nuclearly encoded proteins localised mainly in the matrix and inner membrane indicating that peptides generated by the activity of all known mitochondrial ATP-dependent proteases can be released from the organelle. Pulse labeling experiments in logarithmically growing yeast cells revealed that ~6-12% of preexisting and newly imported proteins are degraded and contribute to this peptide pool. Under respiring conditions, we observe an increased proteolysis of newly imported proteins which suggests a higher turnover rate of respiratory chain components and thereby rationalises the predominant appearance of representatives of this functional class in the detected peptide pool. These results demonstrate an ongoing efflux of peptides from mitochondria and provide new insight into the stability of the mitochondrial proteome and the efficiency of mitochondrial biogenesis.

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Genetik bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Mein Dank gilt insbesondere:

Professor Dr. Thomas Langer für die Bereitstellung des Themas, das stetige und anhaltende Interesse an meinen Projekten und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Professor Dr. R. Jürgen Dohmen für die Übernahme des Zweitgutachtens, für sein Mitwirken am "Thesis Committee" und für seine fortwährende Bereitschaft, Hefespezifische Fragen zu beantworten.

Professor Dr. J. Höfeld für die Übernahme des Drittgutachtens.

Dr. Brigitte Kisters-Woike, Susanne Scheffler, Tina Chiaradia und Dr. Mattias Cramer für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Problemen des Institutsalltags, bei den Bestellungen und für die Betreuung der Kaninchen.

Dr. Gerrit Praefcke und Dr. Michael Knittler für die freundliche Aufnahme im Schreibraum und für die vielen Gespräche, fachlicher oder privater Natur.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeiter(innen), Praktikanten und Studenten der Arbeitsgruppe Langer für das gute Arbeitsklima und ihre Unterstützung bedanken, allen voran bei:

Dr. Isabel Arnold, Steffen Augustin, Sascha Dargazanli, Tanja Engmann, Dr. Mafalda Escobar-Henriques Dias, Dr. Dominik Galluhn, Martin Graef, "Betreuer" Christof Ossi/Günther, Dr. Melanie Kambacheld, Joanna Majczak, Carsten Merkwirth, Metodi Dimitrov Metodiev, Ines Raschke, Dr. Georgeta Seewald, Dr. Takashi Tatsuta, Daniela Tils, Claudia Wilmes und Stephanie Wurth für die "unzähligen" Espresso-Runden, Diskussionen, Wein-Abende, Bierchen, ... Es war eine: Super Jeile Zick!!!

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Mirko Koppen und Gudrun Zimmer, die über vier Jahre das Labor mit mir geteilt und mich immer unterstützt haben und bei Sarah Ehses, ohne sie wäre das Paper so nie zustande gekommen.

Danken möchte ich insbesondere meinen Eltern und meiner Familie, ohne deren Unterstützung mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Eyline, danke für Alles.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Thomas Langer betreut worden.

Mark Nolden

Köln im September 2005

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Nolden, M., Ehses, S., Koppen, M., Bernacchia, A., Rugarli, E. I., and Langer, T. (2005). The *m*-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell*, in press.

Nolden, M., Kisters-Woike, B., Langer, T., and Graef, M. (2005). Quality control of proteins in the mitochondrion. *Curr. Topics Gen.*, in press.

Augustin, S., **Nolden, M.**, Müller, S., Hardt, O., Arnold, I., and Langer, T. (2005). Characterization of peptides released from mitochondria: evidence for constant proteolysis and peptide efflux. *J. Biol. Chem.* *280*, 2691-2699.

Lebenslauf

Vor- und Zuname: Mark Nolden
Geburtstag: 19.07.1976
Geburtsort: Euskirchen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Zingsheim
1987 – 1993 Hauptschule Nettersheim
1993 – 1996 St. Michael-Gymnasium Bad Münstereifel
Juli 1996 Abitur

Hochschulbildung

Okt. 1996 – Juli 2001 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie bei Prof. Dr. K.-D. Entian mit dem Thema:
„Untersuchungen zur Interaktion zwischen Transkriptionsaktivatoren und Transkriptionsapparat in *Saccharomyces cerevisiae*“
Juli 2001 Abschluss als Diplom-Biologe
seit Sep. 2001 Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. Thomas Langer am Institut für Genetik der Universität zu Köln; Dissertation zum Thema:
„Funktion der *m*-AAA-Protease bei der Regulation mitochondrialer Translation“