

**Genetische und biochemische Charakterisierung
der *m*-AAA-Proteasefunktion in Mitochondrien von
*Saccharomyces cerevisiae***

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stephanie Wurth

aus Mülheim an der Ruhr

Köln, 2006

Berichtersteller:

Prof. Dr. Thomas Langer

Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2006

Abstract

ATP-dependent AAA proteases ensure protein quality control and the assembly of respiratory chain complexes in the mitochondrial innermembrane. Inactivation of the *m*- or *i*-AAA proteases in *S. cerevisiae* causes respiratory deficiencies, whereas yeast cells lacking both AAA proteases are not viable.

To characterize the genetic interaction of both proteases the conditional lethal yeast strain, *yta10^{ts}Δyme1*, was generated. Five components of PKC-MAPKinase signaling pathway and the co-chaperone Mge1 were isolated in a multicopy suppressor screen. Their overexpression allows growth of *yta10^{ts}Δyme1* under non-permissive temperature. Inactivation of AAA proteases causes an aberrant mitochondrial morphology and affects the cell integrity leading to lysis of AAA-deficient yeast cells. Cell cycle defects cause caffeine hypersensitivity and the formation of enlarged cells. Moreover, granulae-like structures accumulated in these cells. These analyses revealed mitochondrial dysfunction caused by inactivation of the *m*- and *i*-AAA proteases impaires cell integrity.

In further experiments the role of membrane-spanning domains of the *m*-AAA protease during proteolysis was analyzed. Deletion of the transmembrane domain of one subunit did not inactivate the heterooligomeric *m*-AAA protease as indicated by the processing of cytochrome *c* peroxidase and the degradation of the peripheral membrane protein Atp7 by the mutant *m*-AAA protease. Consistently, respiratory growth of cells harbouring the mutant *m*-AAA protease was not impaired. However, proteolysis of integral membrane proteins was inhibited in the absence of the transmembrane domain of one *m*-AAA protease subunit. These results suggest an essential function of the transmembrane domains of the *m*-AAA protease subunits for the dislocation of integral membrane proteins from the membrane. Possibly a pore-like assembly of transmembrane domains prerequisites for their degradation and facilitates substrate extraction from the membrane and transport into the catalytic centre of the *m*-AAA protease.

<u>ABSTRACT</u>	
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>1.1 Mitochondrien in <i>S. cerevisiae</i>: Ihr Aufbau und ihre Bedeutung für die gesamte Zelle</u>	1
<u>1.2 Der posttranslationale Import von Proteinen in Mitochondrien</u>	2
<u>1.3 Die mitochondriale Proteolyse</u>	4
<u>1.4 ATP-abhängige Proteasen</u>	4
<u>1.4.1 Die mitochondriale Lon-Protease</u>	7
<u>1.4.2 Die mitochondriale Clp-Protease</u>	7
<u>1.4.3 Die AAA-Proteasen der inneren Mitochondrienmembran</u>	8
<u>1.5 Die Bedeutung der AAA-Proteasen in der inneren Mitochondrienmembran</u>	11
<u>1.5.1 Prozessierung mitochondrialer Proteine durch die <i>m</i>-AAA-Protease</u>	13
<u>1.5.2 Die Proteinqualitätskontrolle</u>	14
<u>1.6 Die MAPKinase Signalkaskaden in <i>S. cerevisiae</i></u>	15
<u>1.6.1 Morphologie und Phänotypen von Zellen mit beeinträchtigter Zellintegrität</u>	17
<u>1.6.2 Die Aktivierung der PKC-MAPKinase Signalkaskade</u>	18
<u>1.6.3 Die Sensoren und die ersten Schritte in der Signalkaskade</u>	19
<u>1.6.4 Die PKC-MAPKinase Signalkaskade und ihre Hauptkomponente PKC1 in <i>S. cerevisiae</i></u>	19
<u>1.6.5 Transkriptionsaktivierung</u>	21
<u>1.6.6 Der Einfluss der PKC-MAPKinase Signalkaskade auf die gesamte Zelle</u>	22
<u>Zielsetzung dieser Arbeit</u>	24
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	25
<u>2.1 Klonierungen</u>	25
<u>2.1.1 <i>In vitro</i> Transkription-/Translations-Plasmid pGEM4-<i>ATP7</i></u>	25
<u>2.1.2 Expressionsplasmide</u>	25
<u>2.1.3 Die Disruption von <i>YTA12</i> bzw. <i>YME1</i></u>	26
<u>2.1.4 „QuikChange® Site-Directed“ Mutagenese</u>	26
<u>2.1.5 Verwendete Plasmidkonstrukte</u>	27
<u>2.2 Hefegenetische Methoden</u>	28
<u>2.2.1 Transformation von Hefezellen mit Lithiumacetat (Gietz <i>et al.</i>, 1995)</u>	28
<u>2.2.2 Isolierung autonomer Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> (Robzyk und Kassir, 1992)</u>	29
<u>2.2.3 Medien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen</u>	30
<u>2.2.4 Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i></u>	32
<u>2.3 Proteinbiochemische Methoden</u>	34
<u>2.3.1 Alkalische Extraktion von mitochondrialen Proteinen</u>	34
<u>2.3.2 Präzipitierung von Proteinen mit Trichloressigsäure</u>	35
<u>2.4 Zellbiologische Methoden</u>	35
<u>2.4.1 Induzierung von Apoptose in Hefezellen</u>	35
<u>2.4.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Apoptose und Zell-Lyse in <i>S. cerevisiae</i></u>	36
<u>2.4.3 Färbung der Mitochondrien von <i>S. cerevisiae</i> mit dem grünfluoreszierenden Farbstoff MitoTracker® green FM</u>	36
<u>2.5 Weitere Methoden</u>	37

3. ERGEBNISSE	38
3.1 Charakterisierung des temperatursensitiven Allels <i>yta10^{fs}</i>	38
3.1.1 Überprüfung des Hefestammes <i>yta10^{fs}</i> auf zusätzliche Temperatursensitivität verursachende Mutationen	40
3.2 Phänotypische Analyse der Doppelmutante <i>yta10^{fs}Δyme1</i>	43
3.3 Apoptose oder Nekrose? Was verursacht den Zelltod der Hefemutanten <i>yta10^{fs}</i> und <i>yta10^{fs}Δyme1</i>?	46
3.4 Suche nach Suppressoren der konditional letalen Doppelmutation <i>yta10^{fs}Δyme1</i>	48
3.4.1 Identifikation von Genen, die für die Suppression des konditional letalen Phänotyps von <i>yta10^{fs}Δyme1</i> verantwortlich sind	49
3.4.2 Die Überexpression von <i>MID2</i> supprimiert die Mutationen <i>yta10^{fs}Δyme1</i> und <i>yta10^{fs}</i>	51
3.5 Die temperatursensitiven Proteasemutanten in <i>S. cerevisiae</i> besitzen charakteristische Merkmale von PKC-Mutanten	53
3.5.1 Die Hefemutante <i>yta10^{fs}Δyme1</i> ist gegen Koffein hypersensitiv	54
3.5.2 Gestörte Zellintegrität der proteolytisch defizienten Hefemutanten	57
3.5.3 <i>Petite</i> Mutationen haben keinen generellen Einfluss auf die Zellintegrität	59
3.6 Mikroskopische Untersuchungen der Zell- und Mitochondrienmorphologie	61
3.6.1 Einflüsse der <i>m</i> - und <i>i</i> -AAA-Protease auf den Zellzyklus und die Stabilität der Zellwand	61
3.6.2 Mutationen der <i>m</i> - und <i>i</i> -AAA-Protease verursachen eine Fragmentierung der Mitochondrien	64
3.6.3 Hypoosmotische Bedingungen induzieren die Fragmentierung von Mitochondrien der <i>m</i> - und <i>i</i> -AAA-Protease Mutanten	68
3.6.4 Die Fragmentierung von Mitochondrien ist kein weiteres phänotypisches Charakteristikum von <i>petite</i> Mutanten	69
3.7 Die Bedeutung der Transmembrandomänen für die Funktion der <i>m</i>-AAA-Protease	71
3.7.1 Die Überexpression der entsprechenden Matrixdomäne komplementiert den <i>petite</i> Phänotyp der Deletionsmutante von <i>YTA10</i> bzw. <i>YTA12</i>	73
3.7.2 Assemblierung der mutierten <i>m</i> -AAA-Proteaseuntereinheit <i>Yta10ΔTM</i> mit dem Volllängenprotein <i>Yta12</i>	75
3.7.3 Zur Aufrechterhaltung der vollen Atmungskompetenz müssen beide Untereinheiten der <i>m</i> -AAA-Protease katalytisch intakt sein	77
3.7.4 Die ATPase-Aktivität der Transmembrandomänen-deletierten <i>m</i> -AAA-Protease vermittelt die Atmungsfähigkeit der Zellen	78
3.7.5 Die Transmembrandomänen der <i>m</i> -AAA-Proteasen gewährleisten einen korrekten Abbau von fehlgefalteten Membranproteinen	80
3.7.6 Die Transmembrandomäne einer <i>m</i> -AAA-Protease Untereinheit ist nicht für die Prozessierung von Cytochrom <i>c</i> Peroxidase notwendig	84
3.7.7 Nachweis partieller Proteolyse von <i>Atp7</i> , einem peripheren Membranprotein, durch die mutanten <i>m</i> -AAA-Proteasen <i>yta10ΔTM</i> und <i>yta12ΔTM</i>	86
4. DISKUSSION	90
4.1 Phänotypische Charakterisierung der konditional letalen Mutante <i>yta10^{fs}Δyme1</i>	90
4.1.1 Einfluss einer Punktmutation in <i>YTA10</i> auf die respiratorische Kompetenz	90
4.1.2 Zellen der Doppelmutante <i>yta10^{fs}Δyme1</i> sterben nicht durch Apoptose	92
4.1.3 Die Überexpression von Komponenten des PKC-MAPKinase Signalweges ermöglicht ein Wachstum von <i>yta10^{fs}Δyme1</i> Zellen	93
4.1.4 Mutationen der <i>m</i> - und <i>i</i> -AAA-Protease verursachen Störungen der Zellintegrität und verhindern einen intakten Zellwandaufbau	95
4.1.5 AAA-proteasedefiziente Hefezellen besitzen abnormale Mitochondrienstrukturen	98
4.1.6 Funktionelle Zusammenhänge zwischen mitochondrialen AAA-Proteasen und Zellintegrität	101

<u>4.2 Die Rolle der Transmembrandomänen innerhalb der <i>m</i>-AAA-Protease</u>	104
4.2.1 Das Entfernen von Transmembrandomänen aus dem Komplex der <i>m</i> -AAA-Protease und die Folgen für die Atmungskompetenz der Zelle.....	105
4.2.2 Zur Aufrechterhaltung der Atmungskompetenz muß mindestens eine Untereinheit der <i>m</i> -AAA-Protease proteolytisch intakt sein.....	106
4.2.3 Die Oligomerisierung der <i>m</i> -AAA-Protease mit nur einer Transmembrandomäne.....	107
4.2.4 Bedeutung der SRH-Region für die Assemblierung und Aktivität der <i>m</i> -AAA-Protease.....	107
4.2.5 Der Einfluss von Transmembrandomänen der <i>m</i> -AAA-Protease auf die Proteolyse von Substratproteinen und die Prozessierung von Präproteinen.....	108
4.2.6 Die Funktionen der Transmembrandomänen innerhalb des <i>m</i> -AAA-Proteasekomplexes.....	109
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	111
<u>6. LITERATUR</u>	112
<u>7. ANHANG</u>	131
7.1 Suppressionsfähige Vektoren der „multicopy“ Genbank in YEp13.....	131
7.2 Verwendete Oligonukleotide.....	136
7.3 Abkürzungsverzeichnis.....	139
<u>Teilpublikation im Rahmen dieser Arbeit</u>	142
<u>Danksagung</u>	143
<u>Eidesstattliche Erklärung</u>	144
<u>Lebenslauf</u>	145

1. Einleitung

1.1 Mitochondrien in *S. cerevisiae*: Ihr Aufbau und ihre Bedeutung für die gesamte Zelle

Mitochondrien sind Organellen von essentieller Bedeutung für Zellen. Sie nehmen eine zentrale Position im zellulären Metabolismus und in energiegewinnenden Prozessen ein, die die Zelle zum Wachstum, zur Differenzierung bzw. zur Biogenese von Organellen benötigt. Die dazu notwendige Energie wird hierbei über den Citratzyklus, Elektronentransport, die oxidative Phosphorylierung und schließlich durch die ATP-Synthese geliefert. Des Weiteren finden in Mitochondrien auch anabole Prozesse, wie z.B. Lipidbiosynthese, Häm-Biosynthese und die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Komplexen statt (Reichert und Neupert, 2004).

Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte konnten immer mehr Hinweise geliefert werden, dass Mitochondrien aus einer Symbiose von α -Proteobakterien mit einer proeukaryontischen Zelle hervorgegangen sind (Endosymbiontentheorie) (Yang *et al.*, 1985; Andersson *et al.*, 1998). Die anfänglich unabhängigen Organismen stimmten ihren Metabolismus aufeinander ab und sind mittlerweile voneinander abhängig (Gray, 1989; Sogin, 1991). Jedoch besitzen Mitochondrien bis heute immer noch ein eigenes Genom. Von den über ca. 1000 mitochondrial-lokalisierten Proteinen sind aber nur noch 8-15 Proteine, rRNAs und tRNAs mitochondrial-kodiert (Gray, 1989; Burger *et al.*, 2003; Sickmann *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003). Proteine, die im Nukleus kodiert sind, müssen dagegen nach ihrer Synthese im Cytoplasma posttranslational in die Mitochondrien importiert werden (Prokisch *et al.*, 2004; Rehling *et al.*, 2004; Reichert und Neupert, 2004).

Mitochondrien, die von einer inneren und einer äußeren Membran umgeben sind, besitzen eine dynamische, netzwerkartige Struktur mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1 μm (Bereiter-Hahn, 1990; Nunnari *et al.*, 1997; Jacobs, 2003). Dabei können diese Organellen ihre Anzahl, Form und Proteinkomposition auf unterschiedlichste metabolische und Differenzierungsstadien einstellen (Shaw und Nunnari, 2002; Yaffe, 2003). Solche morphologischen Veränderungen sind ein Resultat aus Fusionen und Teilungen mitochondrialer Tubuli (Yaffe, 1999; Yaffe, 1999). An Zellen von *S. cerevisiae* konnte beobachtet werden, dass ein Wechsel aus der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase das mitochondriale Netzwerk fragmentieren ließ. Dagegen konnten stationäre Zellen in frischem Medium wieder ihr exponentielles Wachstum aufnehmen und bildeten auch wieder ein tubuläres Netzwerk an Mitochondrien aus. Unter zur Hilfenahme spezifischer Fusions- und Teilungsproteine können

Hefezellen ihre dynamische mitochondriale Morphologie im Laufe des Zellzyklus verändern (Yaffe, 2003). Im Fall einer Organellschädigung oder unter Stickstoffmangel werden bei Bedarf auch Mitochondrien in Vakuolen durch Autophagozytose abgebaut, um der Zelle fehlende Aminosäuren wieder zur Verfügung zu stellen (Takeshige *et al.*, 1992; Abeliovich und Klionsky, 2001; Huang und Klionsky, 2002; Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2004).

1.2 Der posttranslationale Import von Proteinen in Mitochondrien

Im Gegensatz zu mitochondrial-kodierten Proteinen werden kern-kodierte Proteine im Cytoplasma als Vorläuferproteine durch dort vorliegende Ribosomen synthetisiert. Translokasen, die in den mitochondrialen Membranen lokalisiert sind, übernehmen hierbei den Import dieser Vorläuferproteine in Mitochondrien (Rehling *et al.*, 2004). Nach erfolgtem Import falten sich die Vorläuferproteine und können damit ihre Funktion übernehmen (Paschen und Neupert, 2001; Truscott *et al.*, 2003; Rehling *et al.*, 2004).

Rezeptoren an der generellen Importpore TOM („translocase of the outer membrane“) erkennen Vorläuferproteine aus dem Cytosol und transportieren diese durch die äußere Mitochondrienmembran. Müssen dagegen Proteine weiter in die Matrix transferiert werden, interagiert der Importkomplex TOM mit der Translokase TIM23 („translocase of the innner membrane“). Tim50, eine Komponente der Translokase TIM23, bindet die zu importierenden Vorläuferproteine und schleust diese durch den TIM17/23 Kanal in der inneren Mitochondrienmembran. Dieser Transport ist vom Membranpotential ($\Delta\Psi$) über die innere Membran abhängig (Neupert, 1997; Rehling *et al.*, 2004). Der sogenannte PAM („presequence translocase associated motor“) Komplex übernimmt den Proteinimport in die Matrix. Dieser Komplex setzt sich aus der zentralen Komponente der Proteinimportmaschinerie Hsp70 (Craig, 1989; Kang *et al.*, 1990; Neupert und Brunner, 2002) und weiteren kontrollierenden Faktoren wie Pam16, Pam18, Tim44 und Mge1 zusammen (Wiedemann *et al.*, 2004). Während des Imports interagiert Hsp70 mit Tim44, einer peripheren Komponente der Proteintranslokase in der inneren Membran (TIM Komplex) (Schneider *et al.*, 1994). Das Co-Chaperon Tim14 (Pam18) in der inneren Membran erleichtert die Assoziation von Hsp70 mit importierten Proteinen und stimuliert dabei die ATPase-Aktivität von Hsp70 (Mokranjac *et al.*, 2003; Frazier *et al.*, 2004; Kozany *et al.*, 2004). Daneben moduliert Tim16 (Pam16) die Interaktion von Tim14 und Hsp70 (Frazier *et al.*, 2004; Kozany *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004). Das Co-Chaperon Mge1, ein Homolog von GrpE in Bakterien, vermittelt die Freisetzung der importierten Proteine aus dem

Importkomplex und bereitet unter ADP/ATP-Austausch so den nächsten Import vor (Ikeda *et al.*, 1994; Laloraya *et al.*, 1994; Nakai *et al.*, 1994). Im Anschluss vermittelt Hsp70 auch die Faltung der importierten Proteine (Craig, 1989; Craig *et al.*, 1989; Kang *et al.*, 1990). Während dieser Prozesse ist aber Hsp70 nicht dauerhaft an das importierte Protein gebunden, sondern ATP-Hydrolyse liefert ausreichend Energie zum Assoziieren und Dissoziieren des Chaperons und des Proteins (Neupert, 1997; Koehler, 2004; Rehling *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2004).

Viele Proteine, die über mehrere Transmembrandomänen verfügen, werden dagegen über den TIM22-Kanal in die mitochondriale Membran inseriert. Hierzu binden im Intermembranraum Tim9-Tim10-Komplexe an die hydrophoben Domänen des zu importierenden Proteins. Anschließend werden diese Proteine membranpotentialabhängig durch die TIM22 Pore transportiert (Koehler, 2004; Rehling *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2004).

Daneben konnte mittlerweile in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden, dass die zentrale Importkomponente Hsp70 (Ssc1) auch am Abbau fehlgefalteter Proteine innerhalb der Matrix beteiligt ist (Wagner *et al.*, 1994). Diese proteolytische Funktion wird spezifisch durch einen Komplex aus Komponenten von mtHsp70, Mge1 und einem weiteren Co-Chaperon Mdj1 (Rowley *et al.*, 1994; Laloraya *et al.*, 1995) vermittelt. Im Gegensatz zum Import bindet dieser Komplex so lange an fehlgefaltete Proteine, bis diese erfolgreich abgebaut werden konnten. Während proteolytischer Vorgänge interagiert die mitochondriale Hsp70 Maschinerie sowohl mit PIM1, einer matrixlokalisierten ATP-abhängigen Protease, als auch mit der membranintegrierten *m*-AAA-Protease (Wagner *et al.*, 1994; Savel'ev *et al.*, 1998). Auch Studien an cytosolischen Vertretern der Hsp Familie zeigten, dass Hsp-Chaperone den Abbau fehlgefalteter Proteine vermitteln können (Hohfeld *et al.*, 2001; Fröhlich, 2005).

Als ein weiteres Chaperon konnte Hsp78 in der Matrix von Mitochondrien detektiert werden. Die Überexpression dieses ClpB/Hsp100 Proteins kann in Mitochondrien mit mutiertem *SSC1* das Aggregieren von Proteinen zwar inhibieren, jedoch ließ sich nicht die Proteolyse von fehlgefalteten Proteinen komplementieren (Schmitt *et al.*, 1995). Dagegen wird Hsp78 offenbar zum Abbau von löslichen fehlgefalteten Proteinen durch die ATP-abhängige Protease PIM1 benötigt (Rottgers *et al.*, 2002). So konnte der Abbau von fehlgefaltetem Ilv5 durch Hsp78 in der Matrix verfolgt werden (Bateman *et al.*, 2002). Hsp78 hat offenbar mit Hsp70 in Mitochondrien überlappende Funktionen und kooperiert mit weiteren Chaperonen, um den Abbau von fehl-assemblierten Proteinen bzw. unlöslichen hitzedenaturierten Proteinen zu gewährleisten (Krzewska *et al.*, 2001; Germaniuk *et al.*, 2002) Es ist denkbar,

dass Hsp78 die Konformation löslicher Substrate verändert, die erst daraufhin durch Pim1 abgebaut werden können.

1.3 Die mitochondriale Proteolyse

Für die Zelle ist es von essentieller Wichtigkeit, dass neusynthetisierte kern- und mitochondrial-kodierte Proteine ihre korrekte Konformation erlangen und eine funktionsfähige Assemblierung durchführen können. Jedoch können extrazelluläre Veränderungen, wie z.B. durch Hitze oder oxidativen Stress, aber auch mutationsbedingte intrazelluläre Schädigungen zur Abwesenheit eines Bindungspartners oder zu einer Akkumulation von fehlgefalteten bzw. nicht assemblierten Proteinen führen. Ein hochkonserviertes Proteinqualitätskontrollsystem schützt kontinuierlich die Zelle vor möglichen Schäden. Dieses System besteht aus Prozessierungspeptidasen, Oligopeptidasen und ATP-abhängigen Proteasen, die in allen Organismen ubiquitär vorhandenen sind. Fehlgefaltete bzw. nicht assemblierte Proteine können so bis auf die Größe kurzer Peptidketten bzw. auf einzelne Aminosäuren proteolytisch abgebaut werden und stehen somit zur Synthese von neuen Proteinen zur Verfügung (Desautels und Goldberg, 1982; Desautels und Goldberg, 1982).

1.4 ATP-abhängige Proteasen

Energieabhängige Proteasen sind stark konserviert und bilden eine reichverzweigte Proteinfamilie, deren Mitglieder in prokaryontischen Zellen, aber auch im Cytosol, Mitochondrien oder Chloroplasten eukaryontischer Zellen, anzutreffen sind. Aufgrund ihrer Sequenzhomologien sind ATP-abhängige Proteasen in vier Klassen unterteilt worden: Die Lon-, die Clp-artige, die AAA-Proteasen und die Proteasen des 26S Proteasoms (Ogura und Wilkinson, 2001; Frickey und Lupas, 2004). Diese Proteasen sind in den unterschiedlichsten Bereichen einer Zelle zu finden. Während das 26S Proteasom seine proteolytische Funktion im Cytosol und auch im Nukleus übernimmt (Goldberg, 2003; Pickart und Cohen, 2004), sind die Lon- und Clp-Proteasen in der mitochondrialen Matrix und die AAA-Proteasen in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert worden (Abb. 1).

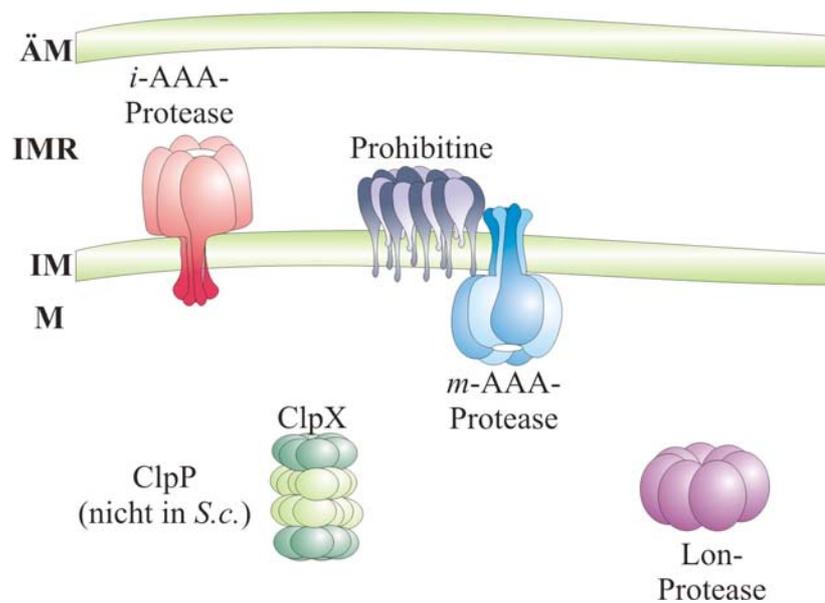


Abb. 1: Die mitochondriale Qualitätskontrolle ist durch fünf unterschiedliche Proteasen definiert. In der mitochondrialen Matrix (M) sind die ubiquitär vorhandene Lon- und die ClpP-Protease, die nicht in *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) lokalisiert werden konnte, zum Abbau von löslichen Proteinen verantwortlich. Dagegen können die *m*- und *i*-AAA-Protease den Abbau von integralen Proteinen in der inneren Mitochondrienmembran (IM) vornehmen. Zur Negativ-Regulation ist die *m*-AAA-Protease mit einem Prohibitinkomplex in einem Superkomplex assoziiert. ÄM, äußere Mitochondrienmembran; IMR, Intermembranraum.

Die Abbildung wurde aus dem Übersichtsartikel von Nolden *et al.*, 2006 übernommen (Nolden *et al.*, 2006).

Diese vier Klassen gehören zu einer Superfamilie von AAA⁺ („ATPases associated with a variety of cellular activities“) Proteinen, die an unterschiedlichsten Aufgaben in der Zelle beteiligt sind, wie z.B. Biogenese von Organellen, Membranfusion, Transkription, Replikation und Rekombination, Vesikeltransport, Signaltransduktion und Zellzyklus (Ogura und Wilkinson, 2001). Energieabhängige AAA⁺-Proteasen können dagegen als Antwort auf unterschiedlichste zelluläre Bedingungen und Veränderung an der extrazellulären Umwelt das zelluläre Proteom durch selektiven Abbau von Proteinen verändern (Sauer *et al.*, 2004), 2004). Eine Inaktivierung dieser Proteasen verursacht pleiotrope Phänotypen in unterschiedlichen Organismen. Dies zeigt, wie essentiell die regulatorischen Funktionen von AAA⁺ Proteasen für die Zellen sind.

ATP-abhängige Proteasen sind prokaryontischen AAA⁺-Proteinen sehr ähnlich und besitzen auch eine konservierte AAA⁺-Domäne des Walker Typs, die aus charakteristischen 200 bis 250 Aminosäuren aufgebaut ist (Neuwald *et al.*, 1999; Ogura und Wilkinson, 2001; Lupas und Martin, 2002; Frickey und Lupas, 2004; Iyer *et al.*, 2004). Diese AAA⁺-ATPase-Domäne übt neben der Hydrolyse von ATP noch chaperonähnliche Funktionen aus (Leonhard *et al.*, 1999)

Im Gegensatz zu den anderen drei Vertretern der AAA⁺-Proteasen besitzen die AAA-Proteasen der inneren Mitochondrienmembran in ihrer AAA-Domäne ein weiteres hochkonserviertes Motiv, die SRH-Region („second region of homology“) (Confalonieri und Duguet, 1995; Neuwald *et al.*, 1999; Ogura und Wilkinson, 2001; Lupas und Martin, 2002; Frickey und Lupas, 2004; Iyer *et al.*, 2004). Obwohl die Sequenz der SRH-Region nicht in allen Vertretern von AAA⁺-Proteinen konserviert ist, ließen sich vergleichbare strukturelle Merkmale in diesem Motiv ausmachen (Hanson und Whiteheart, 2005). So konnte das Sensor 1-Motiv am N-Terminus der SRH-Region lokalisiert werden. Polare Aminosäuren dieser Sequenz können während der Nukleotid-Hydrolyse mit Elementen des Walker B-Motivs und mit γ -Phosphaten von gebundenen ATPs kooperieren (Karata *et al.*, 1999; Steel *et al.*, 2000; Hattendorf und Lindquist, 2002; Hanson und Whiteheart, 2005). Mit Hilfe von Röntgenkristallstrukturanalysen konnte an der bakteriellen AAA-Protease, FtsH, gezeigt werden, dass in der SRH Domäne zwei hochkonservierte Argininreste intermolekulare katalytische Funktionen übernehmen, bei der sie durch eine Konformationsänderung in die Nachbaruntereinheit greifen können und dabei deren ATPase-Aktivität stimulieren (Karata *et al.*, 1999; Karata *et al.*, 2001; Ogura und Wilkinson, 2001). Die ATP Hydrolyse liefert dabei der Protease ausreichend Energie, um Substrate zu binden und zu entfalten, die anschließend ATP-unabhängig proteolytisch abgebaut werden können (Neuwald *et al.*, 1999; Ogura und Wilkinson, 2001; Lupas und Martin, 2002; Frickey und Lupas, 2004; Iyer *et al.*, 2004). Mit weiteren unterschiedlichen Mutationsanalysen konnten Ogura *et al.* später nachweisen, dass ein Aminosäureaustausch der Arginine generell die Nukleotidhydrolyse beeinträchtigte und sogar in einigen Fällen die nachfolgende Konformationsänderung verhinderte (Ogura *et al.*, 2004).

Des Weiteren besitzen AAA⁺-Proteasen eine katalytische Domäne mit Metallo- bzw. Serinpeptidase-Aktivität, die für den proteolytischen Abbau verantwortlich ist. An mehreren Mitgliedern der AAA⁺-Superfamilie ließ sich mittels Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass AAA⁺-Proteasen als oligomere, ringförmige Proteinkomplexe assembliert sind (Liu *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Ogura und Wilkinson, 2001; Wang *et al.*, 2001). In dieser assemblierten Form ist das katalytische Zentrum im Inneren dieses Ringkomplexes lokalisiert. So findet z.B. die Proteolyse durch die Protease ClpP in einer abgeschirmten Reaktionskammer statt (Lupas *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997).

1.4.1 Die mitochondriale Lon-Protease

Die Lon-Protease ist eine zentrale Komponente der Qualitätskontrolle in Mitochondrien, die den Abbau von fehlgefalteten Polypeptiden in der Matrix übernimmt. Bereits vor über zwei Jahrzehnten konnte Lon als erste energieabhängige Protease in vielen Bakterien, in der Matrix eukaryontischer Mitochondrien und in Chloroplasten identifiziert werden (Desautels und Goldberg, 1982; Van Dyck *et al.*, 1994; Adam *et al.*, 2001).

Diese hochkonservierte Serinprotease formt homooligomere Komplexe mit einem Molekulargewicht von ungefähr 800 kDa, die wahrscheinlich aus sieben Untereinheiten aufgebaut sind (Stahlberg *et al.*, 1999; Botos *et al.*, 2004; Rotanova *et al.*, 2004). Ihre Untereinheiten mit einer molekularen Größe von ~ 120 kDa besitzen sowohl eine AAA⁺- als auch eine am C-Terminus lokalisierte katalytische Domäne mit Serinpeptidase-Aktivität und eine nur wenig konservierte N-terminale Domäne, die nicht im bakteriellen Homolog detektierbar ist, vermittelt die Substratspezifität der Lon-Protease (Van Dijn *et al.*, 1998; Botos *et al.*, 2004). In Untersuchungen an der Lon-Protease in *S. cerevisiae*, PIM1, konnte die Protease in einem Komplex von ~1600 kDa isoliert werden (Wagner *et al.*, 1997). In diesem Komplex kooperieren die Proteaseuntereinheiten zum Abbau fehlgefalteter Proteine mit den Chaperonen Hsp70 und Hsp78 (Wagner *et al.*, 1994; Rottgers *et al.*, 2002).

Ein Funktionsausfall der PIM1 Protease führt zu einer Schädigung der Atmungskompetenz, die auf eine defekte Biogenese zurückzuführen ist. Daneben ist PIM1 auch für die Aufrechterhaltung mitochondrialer DNA-Integrität verantwortlich (Suzuki *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.*, 1994). Obwohl gezeigt werden konnte, dass Lon in *E. coli* und Mäusezellen GT-reiche mitochondriale DNA-Sequenzen bzw. GU-reiche RNA-Sequenzen *in vitro* binden konnte (Fu *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2003), ist die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung bislang nicht verstanden. Auch ist PIM1 im Nukleoid menschlicher Mitochondrien lokalisiert und bindet dort die DNA Polymerase γ und die mitochondriale DNA Helikase Twinkle (Garrido *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004). Zusätzlich machten Untersuchungen der mitochondrialen Genexpression deutlich, dass das Spleißen und die Reifung von *COX1* (Cytochromoxidase 1) und *COB* (Cytochromoxidase *b*) Transkripten von der Aktivität von PIM1 abhängig ist (Van Dyck *et al.*, 1998).

1.4.2 Die mitochondriale Clp-Protease

In Mitochondrien konnte Clp („caseino lytic protease“) als eine weitere ATP-abhängige Serinprotease identifiziert werden (Maurizi, 1992). Diese Protease ist ein heterooligomerer

Komplex, in dessen Zentrum das proteolytisch aktive ClpP steht (Horwich *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2002; Sauer *et al.*, 2004). Von oben und unten wird ClpP durch regulatorische AAA⁺ ATPase-Komponenten (ClpX) umschlossen (Corydon *et al.*, 1998; Van Dyck *et al.*, 1998; Halperin *et al.*, 2001), die die Substraterkennung und -entfaltung übernehmen (Weber-Ban *et al.*, 1999).

Im proteolytischen Zentrum bilden vierzehn identische ClpP-Untereinheiten zwei heptamere Ringe (Bochtler *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). Durch diesen Komplex entsteht ein geschlossenes Mikrokompartment, eine sogenannte Abbau-Kammer, in der Substrate proteolytisch abgebaut werden können (Wang *et al.*, 1997; Sauer *et al.*, 2004). Von außen binden hexamere Ringe der regulatorischen AAA⁺ATPase-Untereinheiten an den Komplex und kontrollieren über die Ausformung einer Pore die Substratspezifität (Ortega *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002; Sauer *et al.*, 2004).

Obwohl ClpX ähnliche ATPase-Untereinheiten ubiquitinär in eukaryontischen Mitochondrien lokalisiert wurden (Corydon *et al.*, 1998; Van Dyck *et al.*, 1998; Halperin *et al.*, 2001), sind ClpP-Proteasen dies nicht. So konnten nur ClpB- und ClpX-Untereinheiten, jedoch keine ClpP ähnlichen Proteine in Mitochondrien von *S. cerevisiae* detektiert werden (Leonhardt *et al.*, 1993; Van Dyck *et al.*, 1998; Käser und Langer, 2000).

1.4.3 Die AAA-Proteasen der inneren Mitochondrienmembran

Zur Qualitätskontrolle konnten zwei ATP- und Zink-abhängige Metalloproteasen in der inneren Mitochondrienmembran detektiert werden. Diese hochkonservierten AAA-Proteasen, die schon in den Thylakoidmembranen von Chloroplasten und in der Plasmamembran von Eubakterien entdeckt werden konnten, sind homolog zum bakteriellen FtsH. Jedoch ließen sich keine Orthologe in Archaeobakterien detektieren (Rawlings und Barrett, 1995; Langer *et al.*, 2001).

Die AAA-Proteasen können anhand ihrer Topologie des katalytischen Zentrums unterschieden werden: Die *m*-AAA-Protease, die ihr katalytisches Zentrum in den Matrixraum exponiert und die *i*-AAA-Protease, deren katalytisches Zentrum im Intermembranraum lokalisiert ist (Leonhardt *et al.*, 1996). Neben der Topologie unterscheiden sich die beiden AAA-Proteasen auch in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten. In *S. cerevisiae* bzw. in menschlichen Zellen ist die *i*-AAA-Protease aus Untereinheiten von Yme1 bzw. Yme111 Proteinen aufgebaut (Leonhardt *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 2000). Dagegen besteht der oligomere Komplex der *m*-AAA-Protease in Zellen von *N. crassa* sehr wahrscheinlich aus Untereinheiten von Map1 (Klanner *et al.*, 2001), in Hefe aus Untereinheiten von Yta10 (Afg3) und

Yta12 (Rca1) (Arlt *et al.*, 1996) und in menschlichen Zellen aus Afg312 und Paraplegin (Atorino *et al.*, 2003). In Mitochondrien aus Mäusezellen konnte zu Afg312 und Paraplegin noch eine dritte potentielle Untereinheit aus Afg311 identifiziert werden (Casari *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 1998; Banfi *et al.*, 1999; Kremmidiotis *et al.*, 2001).

Die Untereinheiten der *m*- und *i*-AAA-Proteasen besitzen die charakteristische AAA Domäne, die das Walker A- (auch P-Loop genannt; GXXGXGGKS/T) und Walker B-Motiv (vier hydrophobe Aminosäuren vor der Aminosäuresequenz DDEA/PTSALD) enthalten (Walker *et al.*, 1982; Lupas *et al.*, 1997). Diese beiden Motive sind essentiell für die Nukleotidbindung und Hydrolyse von ATP (Walker *et al.*, 1982; Lupas *et al.*, 1997). Zwischen diesen beiden Motiven ist ein konserviertes „Loop“-Motiv aus drei charakteristischen Aminosäuren (aromatisch-hydrophobisch-Glycerin/YVG) zu finden (Graef, 2006). Kristallstruktur-Untersuchungen an verschiedenen Vertretern der AAA⁺-Superfamilie, die oligomere Ringstrukturen ausbilden, konnten bereits zeigen, dass dieser „Loop“ in der zentralen Pore dieses Ringkomplexes exponiert ist (Wang *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Krzywda *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2002; Kim und Kim, 2003; Lee *et al.*, 2003). In Untersuchungen an FtsH in *E. coli* führte eine Fehlfunktion des Poren-Motiv zu einer stark verminderten ATP-Hydrolyse und reduzierten Substratproteolyse (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003). Auch Untersuchungen an einer Untereinheit des AAA-Protease-homolog in *S. cerevisiae*, Yme1, wiesen darauf hin, dass unter ATP-Verbrauch in der zentralen Pore Substrate entfaltet werden und sich dem eine Translokation in das katalytische Zentrum anschließt (Graef, 2006). Dagegen ist die Funktion des Poren-Motives der Clp-Protease weitaus besser verstanden. Mutationsanalysen und biochemische Quervernetzungsexperimente an Clp-Proteasen deuten darauf hin, dass Substrate in der Pore binden können und entfaltet werden, um anschließend durch einen geformten Kanal in das katalytische Zentrum geschleust zu werden (Schlieker *et al.*, 2004; Siddiqui *et al.*, 2004; Weibezahn *et al.*, 2004; Hanson und Whiteheart, 2005; Hinnerwisch *et al.*, 2005; Parker und Feil, 2005). Des weiteren ist auch die bereits erwähnte SRH-Region innerhalb der AAA-Domäne lokalisiert.

Die katalytische Aktivität der AAA-Proteasen wird über die proteolytische Domäne mit der charakteristischen HEXGH Sequenz vermittelt (Arlt *et al.*, 1996; Guélin *et al.*, 1996). Hierbei bindet ein Zinkion über Histidinreste an die dort lokalisierte, konservierte Metallbindestelle (Rawlings und Barrett, 1995; Arlt *et al.*, 1998), während der Glutaminsäurerest ein Wassermolekül aktiviert und so einen nukleophilen Angriff auf eine Peptidbindung ermöglicht (Vallee und Auld, 1990; Hooper, 1994; Mock und Stanford, 1996).

Am N-Terminus konnten Transmembrandomänen detektiert werden, die die AAA-Proteasen über ein bzw. zwei Membransegmente in der inneren Mitochondrienmembran verankern. Dadurch kann die ATPase-Domäne und die katalytische Domäne in die mitochondriale Matrix bzw. in den Intermembranraum oder in das Cytoplasma exponiert werden (Langer, 2000; Ogura und Wilkinson, 2001). Die Untereinheiten der *m*- und *i*-AAA-Protease unterscheiden sich aber in der Anzahl ihrer Transmembrandomänen. Während die Untereinheiten der *m*-AAA-Protease, Yta10 und Yta12, über zwei Transmembrandomänen in der inneren Mitochondrienmembran verankert sind, besitzen Yme1 Proteine der *i*-AAA-Protease nur eine Transmembrandomäne (Pajic *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1996). Am C-Terminus ist eine helikale „coiled-coil“ Region gefunden worden, die als ein Strukturelement in Form eines „Leucin-Zippers“ zumindest für die Funktion von FtsH essentiell ist (Shotland *et al.*, 2000) (Abb. 2).

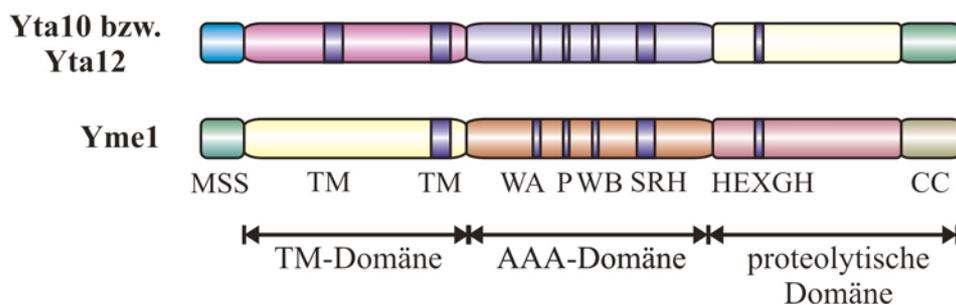


Abb. 2: Die Domänenstruktur der *m*-AAA-Proteaseuntereinheiten (Yta10 bzw. Yta12) und der *i*-AAA-Proteaseuntereinheit (Yme1). MSS, mitochondriales Sortierungssignal; TM, Transmembran; AAA, ATPase-Domäne; WA, Walker A-Motiv; P, Pore; WB, Walker B-Motiv; SRH, „second region of homology“; HEXGH, konservierte Metallbindestelle; CC, „coiled-coil“-Region.

Obwohl geklärt werden konnte, aus welchen Untereinheiten sich AAA-Proteasekomplexe zusammensetzen, konnte bislang die Stöchiometrie dieses Aufbaus nicht geklärt werden. Aber es gibt Hinweise aus Röntgenkristallstrukturen anderer AAA-Proteasen, dass die *m*- und *i*-AAA-Protease auch als hexamerer Ring vorzufinden sein müsste (Lenzen *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Bieniossek *et al.*, 2006). Jedoch ließ sich für die AAA-Proteasen der inneren Mitochondrienmembran bisher nur nachweisen, dass mehrere identische bzw. nah verwandte Untereinheiten zu einem großen Komplex mit einem Molekulargewicht von ungefähr 1 MDa assemblieren können (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1996). Die AAA-Protease der Prokaryonten, FtsH, ist ein homooligomerer Komplex, dessen katalytisches Zentrum im Cytoplasma zu finden ist (Shotland *et al.*, 1997;

Karata *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte die *m*-AAA-Protease der Hefe *S. cerevisiae* in einem 2 MDa großen Superkomplex mit vielfachen Kopien von Prohibitin 1 und Prohibitin 2, zwei homologen Proteinen, detektiert werden (Steglich *et al.*, 1999). Isolierte Prohibitine selbst konnten in einem großen Proteinkomplex eine molekulare Masse von ungefähr 1,2 MDa erreichen (Steglich *et al.*, 1999; Nijtmans *et al.*, 2000; Artal-Sanz *et al.*, 2003). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sie zu einem ringähnlichen Komplex assemblierten (Tatsuta *et al.*, 2005). Auch das bakterielle Homolog FtsH bildet ein Holoenzym, das aus mehreren FtsH Untereinheiten und dem HflKC-Komplex besteht. Dabei sind HflK und HflC zu den Prohibitinen 1 und 2 homolog (Kihara *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 1998; Saikawa *et al.*, 2004). Bislang ist die physiologische Funktion von Prohibitinen kaum verstanden. Obwohl sie in einem Superkomplex mit der *m*-AAA-Protease assoziieren, sind sie nicht am Abbau von fehlgefalteten Proteinen beteiligt. Sie übernehmen dort vermutlich regulatorische Aufgaben, indem sie die Aktivität der *m*-AAA-Protease hemmen (Steglich *et al.*, 1999; Tatsuta und Langer, 2005; Tatsuta *et al.*, 2005). Ihre Ringkonformation könnte auch die Organisation und Integrität der inneren Mitochondrienmembran unterstützen (Tatsuta *et al.*, 2005). Auch ist vorstellbar, dass Prohibitine als Chaperone mit nicht assemblierten Atmungskettenuntereinheiten während der Biogenese interagieren (Nijtmans *et al.*, 2000).

1.5 Die Bedeutung der AAA-Proteasen in der inneren Mitochondrienmembran

Ein Funktionsausfall der mitochondrialen *m*- bzw. *i*-AAA-Protease in *S. cerevisiae* ruft pleiotrope Phänotypen hervor (Thorsness *et al.*, 1993; Guélin *et al.*, 1994; Tzagoloff *et al.*, 1994). Zusätzlich ist ein gemeinsamer Funktionsausfall beider AAA-Proteasen sogar für Zellen von *S. cerevisiae* synthetisch letal (Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000). Erklärbar wird dies durch die Tatsache, dass beide AAA-Proteasen über eine breite Spezifität verfügen und unterschiedlichste Proteine der inneren Mitochondrienmembran als ihre Substrate erkennen (Nakai *et al.*, 1994; Pajic *et al.*, 1994; Nakai *et al.*, 1995; Pearce und Sherman, 1995; Arlt *et al.*, 1996; Guélin *et al.*, 1996). Dabei besitzen sie noch eine teilweise überlappende Substratspezifität (Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000). Bislang konnte jedoch keine Akkumulation von fehlgefalteten bzw. nicht assemblierten Polypeptiden in Mitochondrien, die über keine intakte Proteinqualitätskontrolle in der inneren Mitochondrienmembran verfügten, nachgewiesen werden (Leonhard *et al.*, 2000). Ein Defekt beider Proteasen könnte

Schädigungen im Mitochondrium angehäuft haben, die in einem additiven Effekt synthetische Letalität verursacht hat.

Daneben spielen AAA-Proteasen auch eine bedeutende Rolle in der Biogenese von Atmungskettenkomplexen und in der Assemblierung der F_1F_0 -ATP Synthase (Paul und Tzagoloff, 1995; Arlt *et al.*, 1998; Galluhn und Langer, 2004). Zellen von *S. cerevisiae*, die über keine proteolytisch intakte *m*-AAA-Protease verfügen, sind atmungsdefizient und 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). Vor kurzem konnte MrpL32, eine Komponente des ribosomalen Translationsapparates in Mitochondrien, als ein Substrat der *m*-AAA-Protease in *S. cerevisiae* und Mauszellen detektiert werden. Hierbei kontrolliert die *m*-AAA-Protease die Prozessierung des Vorläuferproteins zum reifen MrpL32 (Nolden *et al.*, 2005). Ein Funktionsausfall der *m*-AAA-Protease hat primär eine Inhibierung der mitochondrialen Translationsmaschinerie und dementsprechend auch sekundär Störungen in der Biogenese der Atmungskette zur Folge. Mit dieser Feststellung lassen sich alle beobachteten Defekte eines Funktionsausfalls der *m*-AAA-Protease erklären.

In Mäusen führte der Verlust der *m*-AAA-Proteasenuntereinheit Paraplegin zu einer distalen Axonopathie der spinalen und peripheren Axone, die zunächst zu einer auffälligen Vergrößerung der Mitochondrien in synaptischen Enden, dann zu einem Anschwellen der Axone und letztendlich zum Abbau der Axone führte (Ferreirinha *et al.*, 2004). Ein Verlust des humanen Paraplegin beeinträchtigt offenbar soweit die mitochondriale Funktion, dass es schließlich zu einer autosomal rezessiven Form der spastischen Paraplegie HSP (Hereditary Spastic Paraplegia) führt (Casari *et al.*, 1998; Casari und Rugarli, 2001). Im Verlauf dieser Erkrankung degenerieren im corticospinalen Trakt die Axone neuronaler und sensorischer Neuronen, die längs des zentralen Nervensystems verlaufen (Schwarz und Liu, 1956; Harding, 1984; Deluca *et al.*, 2004). Dabei ist eine zunehmende Schwäche und Spastizität der unteren Extremitäten zu beobachten (Harding, 1981; Fink, 1997; Reid, 1997). Diese sehr genetisch heterogene Krankheit tritt mit einer Häufigkeit von 1:10 000 in der westlichen Bevölkerung auf (Polo *et al.*, 1993). So ließen sich bislang 20 verschiedene Gene identifizieren, die HSP hervorrufen können. Während der überwiegende Teil dieser Loci Komponenten des zellulären Transports kodiert, sind zwei für die mitochondriale Proteinqualitätskontrolle verantwortlich (Bross *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass in Zellen von HSP-Patienten der anterograde axonale Transport beeinträchtigt ist, was zu einer Akkumulation von Organellen und Neurofilamenten in den Axonen führt und eine axonale Schwellung induziert. Aufgrund der fehlenden *m*-AAA-Protease besitzen Mitochondrien

dieser Patienten keinen intakten Complex I der Atmungskette. Auch sind Fibroblasten von HSP-Patienten gegenüber oxidativem Stress hypersensitiv (Atorino *et al.*, 2003).

Die Untereinheit der *i*-AAA-Protease Yme1 (yeast mitochondriale DNA escape) wurde in einem genetischen „Screen“ für Hefemutanten detektiert, die sich durch eine erhöhte Rate an DNA Transfer aus Mitochondrien in den Nukleus auszeichnen (Thorsness und Fox, 1993). Ferner ist die *i*-AAA-Protease für ein respiratorisches Wachstum von Hefezellen bei höheren und bei niedrigen Temperaturen verantwortlich (Thorsness *et al.*, 1993). Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass eine Deletion von *YME1* zu einer Akkumulation von fragmentierten Mitochondrien führt (Campbell *et al.*, 1994). Dies konnte sogar einen Abbau der Mitochondrien durch Autophagozytose mit Verbindungen zu apoptotischen Prozessen induzieren (Campbell und Thorsness, 1998; Gozuacik und Kimchi, 2004). Nach der Deaktivierung der *i*-AAA-Proteasenuntereinheit IAP-1 ließ sich auch in *N. crassa* ein Atmungsdefekt bei höheren Temperaturen beobachten (Klanner *et al.*, 2001). Jedoch induzierte die Fehlfunktion der *i*-AAA-Protease hier nicht eine Veränderung der mitochondrialen Morphologie (Klanner *et al.*, 2001). Dagegen ist die *i*-AAA-Protease aufgrund der Lokalisation ihres katalytischen Zentrums wahrscheinlich an diesem Prozess nicht beteiligt. Bislang konnten nur nicht-native Modellsubstrate, wie z.B. CoxII (Cytochrom *c* oxidase 2) (Nakai *et al.*, 1994; Nakai *et al.*, 1995; Pearce und Sherman, 1995), Yme2 (Leonhard *et al.*, 2000), Phb1 (Kambacheld *et al.*, 2005) und die NADH-Dehydrogenase Nde1 (Augustin *et al.*, 2005) detektiert werden. Trotz der extensiven Charakterisierung von Phänotypen, die durch einen Funktionsausfall der *i*-AAA-Protease verursacht werden, können die Vorgänge auf molekularer Ebene bislang nicht erklärt werden. Da keine Aggregate von Proteinen in AAA-proteasedefizienten Zellen detektierbar sind, ist möglich, dass auch hier der Abbau bzw. die Prozessierung von Regulatorproteinen, wie im Fall der *m*-AAA-Proteasen, spezifisch übernommen wird, um so die Biogenese von Mitochondrien zu gewährleisten.

1.5.1 Prozessierung mitochondrialer Proteine durch die *m*-AAA-Protease

Die proteolytische Funktion der AAA-Proteasen in der inneren Mitochondrienmembran definiert die Proteinqualitätskontrolle, durch die nicht-native Proteine auf die Größe von kurzen Peptidketten abgebaut werden können (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1996). Es war sehr erstaunlich, dass die *m*-AAA-Protease auch in der Lage ist, spezifische Einzelschnitte durchzuführen. So konnte gezeigt werden, dass die *m*-AAA-Protease an der Prozessierung des löslichen Hämproteins aus dem Intermembranraum von Mitochondrien, Ccp1

(Cytochrom c Peroxidase 1), beteiligt ist (Kaput *et al.*, 1989; Esser *et al.*, 2002). Hierbei wird das Vorläuferprotein von Ccp1, das noch in der Membran verankert ist, durch die *m*-AAA-Protease zu seiner Intermediärform prozessiert, die dann wiederum in einem zweiten Prozessierungsschritt durch die Rhomboidprotease Pcp1 ihre reife Form erlangt und als lösliches Protein in den Intermembranraum freigegeben wird (Esser *et al.*, 2002; McQuibban *et al.*, 2003; Michaelis *et al.*, 2005). In seiner reifen Form entfernt es für die Zelle schädigende Sauerstoffradikale, indem es die Peroxid-abhängige Oxidation von Cytochrom *c* katalysiert (Edwards *et al.*, 1988).

Vor kurzem konnte ein weiteres Protein detektiert werden, dass durch die *m*-AAA-Protease prozessiert wird. Hierbei handelt es sich um das bereits erwähnte MrpL32, eine Komponente des mitochondrialen Translationsapparates (Nolden *et al.*, 2005).

1.5.2 Die Proteinqualitätskontrolle

Die *m*- und *i*-AAA-Proteasen besitzen ihre jeweiligen katalytischen Zentren auf entgegengesetzter Seite der inneren Mitochondrienmembran. Dies führte zur Vermutung, dass die Topologie von Substraten eine essentielle Rolle zum proteolytischen Abbau spielt. AAA-Proteasen erkennen ihre Substrate anhand von Proteindomänen, die sich auf der selben Seite ihrer katalytischen Zentren befinden. In Studien an der *i*-AAA-Protease konnte gezeigt werden, dass N-terminale Helices der AAA-Domäne von Yme1 die abzubauenen Substrate binden. Dabei liegen diese Helices in der Nähe der inneren Mitochondrienmembran, die entfaltete Substratdomänen mit einer Minimallänge von 20 Aminosäuren bereits erkennen und abbauen können (Leonhard *et al.*, 1999; Leonhard *et al.*, 2000; Niwa *et al.*, 2002). Jedoch kann ein Substrat nur abgebaut werden, wenn es auf beiden Seiten der Membran entfaltet ist (Leonhard *et al.*, 2000). Bislang ist kaum verstanden, wie membranintegrierte Substrate aus der hydrophoben Lipiddoppelschicht an das katalytische Zentrum der AAA-Proteasen gelangen können (Langer, 2000). Im ER werden z.B. Kanäle aufgebaut, durch die dann Proteine unter ATP Verbrauch aus ihrer hydrophoben Membran an das katalytische Zentrum des 26S Proteasoms im Cytosol gelangen können (Hampton, 2002). Es stellt sich die Frage, ob auch die AAA-Proteasen der inneren Mitochondrienmembran zur Dislokation membranständiger Substrate mit Translokasen kooperieren. Jedoch ließ sich keine Interaktion der *m*-AAA-Protease mit bekannten Translokasekomplexen, wie z.B. Tim17/Tim23, Tim22/Tim54 und Oxa1 nachweisen (Käser, 2001; Nargang *et al.*, 2002; Neupert und Brunner, 2002). Auch konnten *in vitro* Experimente an FtsH keinerlei Hinweis erbringen, dass weitere Hilfsfaktoren an der Extraktion von abzubauenen Substraten beteiligt sind

(Akiyama und Ito, 2003). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AAA-Proteasen die Aufgabe selbst übernehmen, membraninserierte Proteine aus der Lipiddoppelschicht zu extrahieren und in das katalytische Zentrum zu transportieren. Hierbei ist vorstellbar, dass die Untereinheiten der *m*-AAA-Protease im assoziierten Komplex eine hydrophile Pore ausbilden, durch die membraninserierte Proteine transferieren, um an das katalytische Zentrum der Protease zu gelangen (Langer, 2000). Die Tatsache, dass Substrate in räumlicher Nähe zum N-Terminus von der AAA-Domäne gebunden werden (Leonhard *et al.*, 1999), unterstützt die Vermutung, dass eine hydrophile Pore Substrate in die Nähe des katalytischen Zentrums bringen könnte. Durch einen solchen Kanal könnten Proteine aus der hydrophoben Membran in das katalytische Zentrum transportiert werden (Abb. 3).

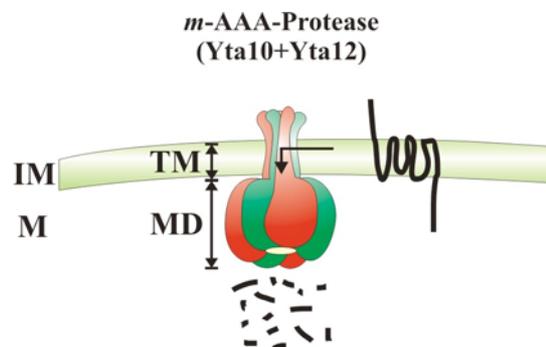


Abb. 3: Modell zur Extraktion von membraninserierten Substraten der m-AAA-Protease.

Nicht-native Proteine aus der mitochondrialen Innenmembran (IM) könnten mit Hilfe der eigenen hydrophilen Pore, die aus Transmembrandomänen (TM) der Untereinheiten Yta10 und Yta12 gebildet werden, aus der hydrophoben Lipiddoppelschicht extrahiert werden und anschließend in das katalytische Zentrum (MD) in der Matrix (M) transferieren.

1.6 Die MAPKinase Signalkaskaden in *S. cerevisiae*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Funktionsausfall des mitochondrialen AAA-Proteasesystems Auswirkungen auf die Zellintegrität und damit auf die gesamte Zelle hat. Im folgenden Abschnitt soll daher ein Überblick über den Zellintegrität-erhaltenden Mechanismus der PKC-MAPKinase Signalkaskade gegeben werden.

Die äußeren Begrenzungen, wie z.B. Zellwand oder Plasmamembran, schützen eine Zelle vor schädlichen Einflüssen aus ihrer Umgebung. Der Aufbau von Zellwänden ist von komplexer Struktur und definiert nicht nur die Form des Organismus, sondern gewährleistet auch die Integrität der gesamten Zelle, die Nährstoffaufnahme und Schutz bei osmotischen Stress-situationen (Heinisch *et al.*, 1999). Vier Polysaccharidpolymere bilden eine komplexe Einheit

um die Zelle. In einem fibrillären Netzwerk aus β -1,3-Glucan und Chitin verankern sich Mannoproteine und β -1,6-Glucane ineinander. Eine intakte Zellwand besteht aus 50-60% β -1,3- und β -1,6-Glucanen, 40-50% Mannoproteinen und bis zu 2% Chitin (Green *et al.*, 2003). Verschiedene Signaltransduktionswege konnten in *S. cerevisiae* detektiert werden, die für dynamische Prozesse, wie z.B. vegetative Knospenausbildung, Paarungsprozesse und Sporulationen von essentieller Wichtigkeit sind und der Zelle ermöglichen, sich auf Veränderungen in ihrer Umgebung bzw. auf Stress einzustellen (Banuett, 1998; Heinisch *et al.*, 1999; Schwartz und Madhani, 2004). Prinzipiell besitzen diese Signalkaskaden einen gemeinsamen Aufbau: Sogenannte Mechanosensoren führen nach erfolgter Reizaufnahme eine Konformationsänderung durch und leiten das extrazelluläre Signal an Komponenten einer Signalkaskade weiter. Hierbei übernehmen MAPKinasen („Mitogen Activating Protein“) eine zentrale Rolle in Phosphorylierungskaskaden, die abschließend im Zellkern enden und dort die Transkription mehrerer Gene modifizieren können (Banuett, 1998).

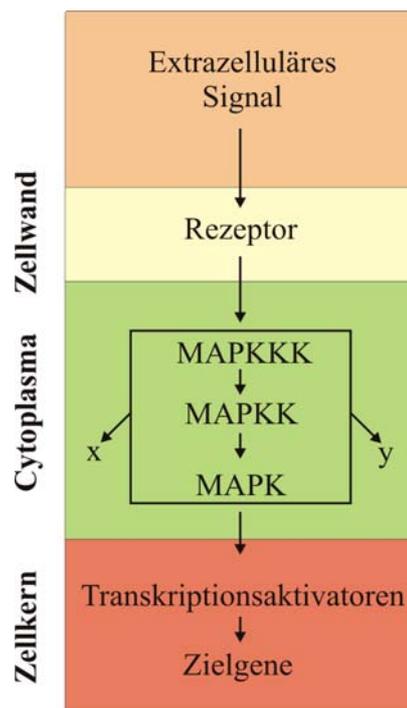


Abb. 4: MAPKinase Modul. Ein integraler Rezeptor in der Zellwand registriert extrazelluläre Reize und Signale. Über eine Konformationsänderung wird das extrazelluläre Signal in das Cytoplasma weitergeleitet. Dort werden über eine Phosphorylierungskaskade die MAPKinasen MAPKKK, MAPKK und MAPK (MAPKinase Kinase Kinase, MAPKinase Kinase und MAPKinase) aktiviert. Das so aktivierte MAPKinase Modul stimuliert im Zellkern die Transkription bestimmter Zielgene oder modifiziert zelluläre Systeme, wie z.B. Metabolismus, Cytoskelett, polarisiertes Wachstum (x, y). Diese Abbildung wurde aus dem Übersichtsartikel von Banuett, 1998 übernommen (Banuett, 1998).

Trotz dieses gemeinsamen Ablaufs existieren fünf verschiedene Signalkaskaden in der Zelle, die eine spezifische Zellantwort auf Veränderungen in ihrer Umgebung ermöglichen. Die „Pheromone response MAPKinase“ Signalkaskade vermittelt die Zell-Zell Interaktion während der Paarung zweier Zellen (Pryciak und Huntress, 1998). Meiotische Prozesse und Sporulation werden durch die Aktivierung homologer Komponenten der „Pheromone response MAPKinase“ Signalkaskade in Gang gesetzt (Herskowitz, 1995). Dagegen wird unter Stickstoffmangel das Wachstum von Pseudohyphen von diploiden a/α Zellen durch die Aktivierung des „Pseudohyphal pathway“ angeregt (Madhani *et al.*, 1997). In Zellen von *S. cerevisiae* konnten zwei Signaltransduktionswege detektiert werden, die durch extrazellulären Stress von zu hoher bzw. zu niedriger Osmolarität stimuliert werden. Hohe Osmolarität aktiviert so über MAPKinasen die HOG („high osmolarity glycerol“) Signalkaskade, während niedrige Osmolarität die PKC („Proteinkinase C“) Signalkaskade anschaltet (de Nadal *et al.*, 2002; O'Rourke *et al.*, 2002; Schwartz und Madhani, 2004). Zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität unter hypoosmotischen Wachstumsbedingungen und damit folglich auch zur Aufrechterhaltung der Zellwand ist hauptsächlich der Transduktionsweg über die PKC-MAPKinase Signalkaskade verantwortlich (Heinisch *et al.*, 1999).

1.6.1 Morphologie und Phänotypen von Zellen mit beeinträchtigter Zellintegrität

Die essentielle Bedeutung der PKC-MAPKinase Signaltransduktionskette wird insbesondere in menschlichen Zellen deutlich. So kann ein Funktionsausfall durch defekte Isoenzyme dieser Signalkette zu unterschiedlichen Krankheitsformen wie z.B. Krebs (Kikkawa *et al.*, 1983), vaskuläre Komplikationen im Verlauf von Diabetes mellitus (Ishii *et al.*, 1998), Unterdrückung von Apoptose während Brustkrebs (Akkaraju und Basu, 2000) und Alzheimer's Erkrankung (Checler und Vincent, 2002; Garrido *et al.*, 2002) führen. In Zellen von *S. cerevisiae* konnte dagegen gezeigt werden, dass defekte Komponenten in der PKC-MAPKinase Signalkaskade den Zellwandaufbau, Zellzyklus und als Folge auch die Zellviabilität beeinträchtigten.

Lussier *et al.* konnten 1997 zeigen, dass in Zellen mit beeinträchtigter PKC-MAPKinase Signalkaskade der Kohlenhydratgehalt in der Zellwand verändert war (Lussier *et al.*, 1997). Hefezellen, die durch diese Defekte keine intakten Zellwände aufbauen können, zeigten sich gegenüber den Farbstoffen Calcofluor Weiß und Kongo Rot, das speziell β -1-3-Glucane anfärbt (Kopecka und Gabriel, 1992) hypersensitiv (Lussier *et al.*, 1997). Daneben sind Zellen

mit beeinträchtiger Zellintegrität auch gegenüber erhöhter Temperatur von 37°C sensitiv, was auf eine defekte Zellwandarchitektur schließen ließ (Lee und Levin, 1992; Levin und Bartlett-Heubusch, 1992). Hierbei beschleunigen hypoosmotische Konditionen das Absterben der Zelle. Dagegen kann der lethale Phänotyp unter hyperosmotischen, d.h. osmotisch stabilisierenden, Wachstumsbedingungen unterdrückt werden (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992; Levin und Errede, 1995; Heinisch *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000).

Morphologische Untersuchungen an PKC-MAPKinase-inaktiven Zellen zeigten zudem, dass Defekte innerhalb dieser Signalkaskade zu einer veränderten Zellmorphologie führten. Unter restriktiven Wachstumsbedingungen, wie z.B. erhöhter Temperatur von 37°C, formen sich die Hefemutanten häufig zu abnormal großen, runden Zellen. Auch wurden kaum bzw. nur kleine Knospen ausgebildet (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992). Diese offensichtlich reduzierte Zellteilung ist vermutlich die Folge einer Arretierung des Zellzyklus während der Transition von der G1- auf die S-Phase (Gray *et al.*, 1997). Unter restriktiven Bedingungen führt dies nach zwei bis drei Zellteilungen zu einem Wachstumsstop, bei dem diese Zellen auch ihre Proteinbiosynthese einstellen und schließlich lysieren (Levin *et al.*, 1990; Levin und Bartlett-Heubusch, 1992; Mazzoni *et al.*, 1993; Levin *et al.*, 1994; Errede *et al.*, 1995; Levin und Errede, 1995; Buehrer und Errede, 1997; Green *et al.*, 2003; Mazzoni *et al.*, 2005). Damit wird deutlich, dass die PKC-MAPKinase Signalkaskade eine essentielle Aufgabe bei der Erhaltung der Zellviabilität übernimmt.

1.6.2 Die Aktivierung der PKC-MAPKinase Signalkaskade

Mehrere Studien konnten zeigen, dass sowohl extra- als auch intrazelluläre Stimuli die Signalkaskade der PKC-MAPKinase induzieren können. So führen Störungen an der Zelloberfläche zu einer Aktivierung der PKC-MAPKinase Signalkaskade. Neben Hitzestress konnten noch weitere extrazelluläre Stimuli, wie z.B. hypoosmotischer Schock, Zellkontakt mit Paarungspheromonen und den zellschädigenden Substanzen Chlorpromazin, Koffein, Vanadate und Zymolyase die Signalkaskade induzieren (Davenport *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1995; Jacoby *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2001; Krause und Gray, 2002). In Zellen, die unter hohen extrazellulären Kalziumkonzentrationen inkubiert wurden, war die PKC-MAPKinase Signalkaskade ebenfalls aktiviert (Mizunuma *et al.*, 1998). Die Signalkaskade wird aber auch intrazellulär im Laufe des Zellzyklus während der Transition von der G1- in die S-Phase aktiviert (Davenport *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1997). In dieser Phase findet insbesondere polarisiertes Wachstum, Zellwandbiosynthese und Aktindepolymerisation statt.

1.6.3 Die Sensoren und die ersten Schritte in der Signalkaskade

Damit Zellen Störungen bzw. Signale aus ihrer näheren Umgebung registrieren können, sind Sensoren in der Zellwand eingelagert, die nach Kontakt mit den oben genannten Stimuli das MAPKinase Modul aktivieren. Als solche Sensoren konnten die Glykoproteine Mid2 („mating induced death“) und die Mitglieder der Proteinfamilie Wsc (Wsc1-Wsc4; „cell wall integrity and stress response component“) identifiziert werden (Jacoby *et al.*, 1998; de Bettignies *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999). Diese werden durch Kontakt mit Paarungspheromonen, osmotischen Stress und anderen Zellwandschädigungen aktiviert (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998; Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999; Sekiya-Kawasaki *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2003). Jedoch nur Mid2 reagiert auf hohe Kalziumkonzentration in der Umgebung und garantiert damit zusätzlich die Kalziumhomöostase (Ono *et al.*, 1994; Ozaki *et al.*, 1996). Diese Mechanosensoren, die in der Plasmamembran verankert sind, durchspannen die Zellwand und registrieren über ihren extrazellulären N-Terminus Veränderungen in ihrer Umgebung. Der kurze C-Terminus der Mechanosensoren Mid2 bzw. Wsc1 bindet als Folge im Cytoplasma die Guanin-nukleotidaustauschfaktoren Rom1 und Rom2 („RHO multicopy suppressor“) (Philip und Levin, 2001). Insbesondere Rom2 ist für die Aktivierung und damit auch für die Regulation der kleinen GTPase Rho1 (ras homologue) verantwortlich. Nachdem Rom2 durch Tor2 („target of rapamycin“), einem Homolog von Phosphatidylinositolkinasen aus Säugerzellen, aktiviert wurde, kann es Rho1 in den GTP gebundenen Zustand überführen und aktiviert damit die Signalkaskade (Gray *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998; de Bettignies *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999; Philip und Levin, 2001). Während Rom2 die Signalkaskade stimuliert, reduzieren die GTPase-aktivierenden Proteine Sac7 und Bem2 die Aktivität der Phosphorylierungskaskade (Ozaki *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2000).

1.6.4 Die PKC-MAPKinase Signalkaskade und ihre Hauptkomponente PKC1 in *S. cerevisiae*

Im Zentrum dieser Signalkaskade stehen fünf MAPKinasen, die über Protein-Phosphorylierungsschritte Signale aus dem Cytoplasma an den Kern übermitteln. Nachdem erfolgreich GTP an Rho1 binden und eine Phosphatgruppe abspalten konnte, wird das Signal in einer Kaskade im Cytoplasma an mehrere Komponenten weitergereicht. Hierbei wird als erstes Pkc1 durch eine Phosphorylierung aktiviert (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996). Daneben konnte auch festgestellt werden, dass auch Rho1 selbst an Pkc1 binden kann

(Nonaka *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 2001). Pkc1 ist eine MAPKKKK, das einzige Säugerzellen-Homolog in *S. cerevisiae*, und phosphoryliert spezifisch die MAPKKK Bck1 („bypass of C kinase“) (Levin *et al.*, 1990; Costigan *et al.*, 1992; Lee und Levin, 1992; Kamada *et al.*, 1995). Pkc1 besitzt Serin/Threoninkinase-Aktivität, die es ermöglichen, ATP in ihrer Kinasedomäne und ihr Substratprotein Bck1 sequenzspezifisch zu binden (Parekh *et al.*, 2000). Der Effektor Bck1 phosphoryliert anschließend seine redundanten Nachbarkomponenten Mkk1 („map kinase kinase1“) und Mkk2 („map kinase kinase2“) (Irie *et al.*, 1993). Diese beiden Kinase-Kinasen phosphorylieren die Aminosäurereste Threonin und Tyrosin der MAPKinase Slt2 („suppressor of ly t2“) (Lee *et al.*, 1993). Slt2 steht am Ende dieser Phosphorylierungskaskade und gibt das Signal aus dem Cytoplasma in den Zellkern weiter (Abb. 5).

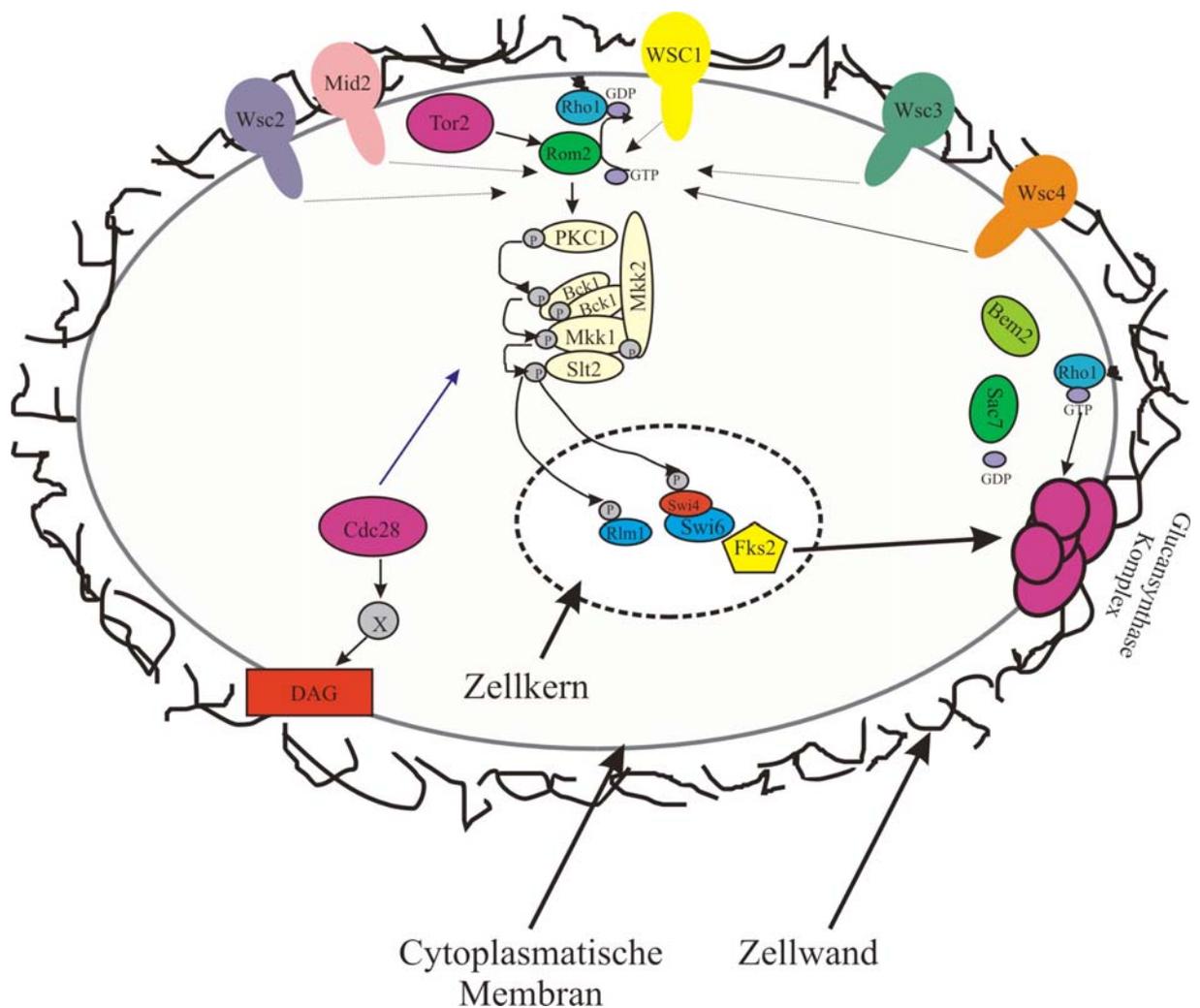


Abb. 5: Das Modell zur PKC-MAPKinase Signalkaskade.

Der Ablauf der Signalkaskade und die einzelnen Komponenten sind im Text näher erläutert. Diese Abbildung wurde aus dem Übersichtsartikel von Heinisch *et al.*, 1999 übernommen (Heinisch *et al.*, 1999).

1.6.5 Transkriptionsaktivierung

Verschiedene Experimente konnten mittlerweile zeigen, dass das cytoplasmatische Slt2 sein Phosphorylierungssignal in den Zellkern weiterleitet. Dort aktiviert es Transkriptionsfaktoren und Faktoren, die zur Synthese von Zellwandkomponenten und zur Energiegewinnung benötigt werden. Microarray-Studien konnten zeigen, dass eine Zellwandschädigung und damit eine Aktivierung der PKC-MAPKinase Signalkaskade die Expression von bis zu 100-130 Genen induziert (Garcia *et al.*, 2004):

Die größte Gruppe dieser induzierten Gene kodieren Komponenten der Zellwandbiosynthese und Zellwandorganisation. So sind neben *FKS1* und seinem Homolog *FKS2*, die Untereinheiten der β -1-3-Glucansynthase kodieren, auch die α -1,3-Mannosyltransferase *MNN1* und die Chitinsynthase *CSD2* von Slt2 abhängig (Igual *et al.*, 1996).

Auch der Transkriptionsaktivator Rlm1 konnte als direkter Bindungspartner von Slt2 identifiziert werden (Watanabe *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1995), der durch ein Phosphorylierungssignal aus dem Cytoplasma kommend im Kern induziert wird und als Antwort die Transkription von 20 Zellwandkomponenten aktiviert (Dodou und Treisman, 1997; Heinisch *et al.*, 1999; Jung und Levin, 1999). Rlm1 reguliert auf diesem Weg die Expression von GPI-Proteinen (Glycosyl-Phosphatidylinositol), von β -1-3-Glucan-Zellwandproteine der Pir Familie und vieler weiterer Zellwandkomponenten (Jung und Levin, 1999; Garcia *et al.*, 2004).

Als ein weiteres Phosphorylierungsziel von Slt2 konnte der Transkriptionsfaktor SBF, ein Heterodimer aus Swi4 und Swi6, identifiziert werden (Gray *et al.*, 1997; Madden *et al.*, 1997). SBF induziert während des Überganges der G1- in die S-Phase im Laufe des Zellzyklus speziell die Transkription der Cycline *CLN1*, *CLN2*, *PCL1* und *PCL2*. Cln1 und Cln2 bilden mit der Zellzykluskinase Cdc28 einen Komplex. Cdc28 ist ein Regulator des Zellzyklus und aktiviert die PKC-MAPKinase Signalkaskade (Gray *et al.*, 1997). Zusätzlich stimuliert dies auch die Synthese des Phospholipids DAG (Diacylglycerol), das zur Synthese von neuen Membranen genutzt werden kann (Mazzoni *et al.*, 1993; Marini *et al.*, 1996). Damit beeinflusst die PKC-MAPKinase Signalkaskade auch den Zellzyklus und polarisiertes Wachstum.

Es ist nicht verwunderlich, dass eine Aktivierung der PKC-MAPKinase Signalkaskade auch zu einer Transkription einer großen Gruppe an Genen, die am Kohlenhydrat-, Aminosäuren-, und Sphingolipidmetabolismus beteiligt sind, führen. Dies muss der Zelle die notwendige Energie zur Synthese der Zellwand und der Plasmamembran liefern (Lagorce *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004).

1.6.6 Der Einfluss der PKC-MAPKinase Signalkaskade auf die gesamte Zelle

Dadurch dass die PKC-MAPKinase Signalkaskade eine Schlüsselrolle in der Erhaltung der Zellintegrität in eukaryontischen Zellen spielt, muss dieses Signalsystem auf unterschiedlichste Prozesse in der Zelle einwirken können. Mehrere Studien konnten belegen, dass die PKC-MAPKinase Signalkaskade morphologische Veränderungen im Verlauf des Zellwachstums, der Paarung, der Knospung und die Regulation des Zellzyklus kontrolliert.

Defekte innerhalb der PKC-MAPKinase Signalkaskade beeinträchtigen dadurch auch eine intakte Aktinorganisation in *S. cerevisiae* (Helliwell *et al.*, 1998). In weiteren Untersuchungen zum Aufbau des Cytoskeletts ließ sich zeigen, dass Komponenten der PKC-MAPKinase Signalkaskade als Multiproteinkomplex mit Aktin vorlagen (Sheu *et al.*, 1998). In diesem Komplex wurden auch Spa2, Pea2 und Bni1 detektiert, deren Funktionen im korrekten Ablauf von Paarung und Knospung, d.h. während des polarisierten Wachstums für ein funktionelles Cytoskelett, liegen (Sheu *et al.*, 1998).

Daneben kann die Überexpression von *MID2* auch den Phänotyp einer Profilindeletionsmutante unterdrücken (Marcoux *et al.*, 1998). Profilin ist ein Phosphatidylinositolbisphosphat-Bindeprotein, das die Aktin-Polymerisierung reguliert. Ebenfalls ist Tor 2, das den GTP/GDP Austauschfaktor Rom2 aktiviert, ein Phosphotidylkinasenhomolog in Säugerzellen. D.h. die PKC-MAPKinase Signalkaskade ist offenbar nicht nur an dynamischen Prozessen des Cytoskeletts in der Zelle, sondern auch am Phospholipidmetabolismus und damit am Aufbau von Membranen beteiligt (Heinisch *et al.*, 1999).

Auch konnte beobachtet werden, dass Zellen mit einer defekten PKC-MAPKinase Signalkaskade vermehrt sekretorische Vesikel bei 37°C (Mazzoni *et al.*, 1993) akkumulierten. Diese sogenannten sekretorischen Vesikel werden im Regelfall vom ER und dem Golgiapparat zur Biosynthese von Plasmamembranen produziert. Hierbei wird die Integrität der Plasmamembran durch Pkc1 über die Transkription ribosomaler Gene zur Herstellung neuer Plasmamembranvesikel kontrolliert (Nierras und Warner, 1999; Li *et al.*, 2000).

Möglicherweise führen in Zellen mit beeinträchtigter Zellintegrität die Defekte im Aufbau eines intakten Cytoskeletts, im Phospholipidmetabolismus (Sreenivas *et al.*, 2001) und während sekretorischer Prozesse zu Schädigungen in der Zellwand. Damit wären die Zellwanddefekte vermutlich nur ein sekundärer Phänotyp von PKC-MAPKinase Signalkaskaden Mutanten und möglicherweise unterschiedlichen Ursprungs (Heinisch *et al.*, 1999).

Pkc1 übernimmt ebenfalls eine zentrale Rolle im Kohlenstoffmetabolismus in *S. cerevisiae*. Zellen, denen Pkc1 fehlt, können kein Glykogen akkumulieren und sind unfähig, auf der nicht

fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin zu wachsen (Costigan und Snyder, 1994; Heinisch *et al.*, 1999; Salgado *et al.*, 2002). In diesen Zellen ist die Glycerolkinase *GUT1* nicht mehr dereprimierbar. Die Tatsache, dass aber durch den Ausfall von MAPKinase-Kaskadekomponenten, die nach der Aktivierung von Pkc1 ihre Funktion erfüllen, wie z.B. Bck1, trotzdem die Derepression von *GUT1* durchgeführt werden kann, zeigt, dass nicht alle Komponenten der Kaskade in dem Glycerolmetabolismus involviert sind (Gomes *et al.*, 2005). Neben der Regulation der *N*-Glycolysierung wird auch die Oligosaccharyl-Transferase Aktivität durch die PKC-MAPKinase Kaskade beeinflusst (Park und Lennarz, 2000).

Zielsetzung dieser Arbeit

Die ATP-abhängigen *m*- und *i*-AAA-Proteasen in der inneren Mitochondrienmembran regulieren die mitochondriale Biogenese und übernehmen die Qualitätskontrolle von Proteinen der Innenmembran. Ein Funktionsausfall beider Proteasen wirkt synthetisch letal, was auf essentielle, zumindest zum Teil redundante Funktionen beider AAA-Proteasen hinweist.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten diese Aufgaben näher charakterisiert, und der Einfluss der *m*- und *i*-AAA-Proteasen in der inneren Mitochondrienmembran auf weitere zelluläre Systeme und Vorgänge untersucht werden. Hierzu sollte zunächst eine konditional letale Hefemutante erzeugt werden, die eine Deletion im Gen *YME1* aufwies und gleichzeitig eine temperatursensitive Mutation im Gen *YTA10* besaß. Phänotypische Untersuchungen dieser Zellen sollten die Konsequenzen eines Funktionsausfalls beider AAA-Proteasen aufzeigen. Daneben sollten in einem genetischen Ansatz Suppressoren des letalen Phänotyps dieser Hefemutante identifiziert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Wirkungsweise von AAA-Proteasen während des Abbaus von membranständigen Proteinen molekular näher charakterisiert werden. Dazu wurde der Frage nachgegangen, wie Substrate aus der hydrophoben Lipiddoppelschicht dem proteolytischen System zugeführt werden können. Um zu klären, ob die Transmembrandomänen der *m*-AAA-Protease essentielle Aufgaben während der Proteolyse übernehmen, sollten Varianten der *m*-AAA-Proteasenuntereinheiten Yta10 und Yta12, denen Transmembrandomänen fehlten, erzeugt und funktionell charakterisiert werden. Dies sollte klären, ob Transmembrandomänen ausschließlich zur Verankerung der Protease in der Mitochondrienmembran dienen, oder ob diese Domäne eine aktive Funktion während des Abbaus von Membranproteinen durch die *m*-AAA-Protease ausüben.

2. Material und Methoden

2.1 Klonierungen

2.1.1 *In vitro* Transkription-/Translations-Plasmid pGEM4-ATP7

Um das Gen *ATP7* unter der Kontrolle des Sp6-Promotors *in vitro* exprimieren zu können, wurde über eine präparative PCR (Polymerase chain reaction) mit den Primern TL1111/TL1112 (siehe Anhang: Primerliste) auf der Basis von genomischer DNA aus WT-W303-1A Hefezellen *ATP7* amplifiziert (Saiki *et al.*, 1988). Das PCR-Fragment wurde in die *KpnI*- und *XbaI*-Schnittstellen des Vektors pGEM4 kloniert. Zusätzlich war über den 5'-Primer von *ATP7* eine Kozak-Konsensussequenz eingefügt worden, die die Translationseffizienz steigerte (Kozak, 1987).

2.1.2 Expressionsplasmide

Zur Klonierung des temperatursensitiven Allels *yta10^{ts}* wurde die genomische DNA aus Hefezellen von *yta10^{ts}* E35 (Prof. Dr. A. Tzagoloff, New York) mit den Oligonukleotiden TL600 und TL601 (siehe Anhang: 7.2 Primerliste) amplifiziert. Diese Oligonukleotide fügten zusätzlich Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *HindIII* an das 5'- und 3'-Ende des PCR-Produktes ein. Die amplifizierte Sequenz wurde über die Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* in das Plasmid YCpLac111-ADH_{Promotor} inseriert. Unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *SpeI* und *HindIII* wurde das temperatursensitive Allel *yta10^{ts}* aus dem Vektor YCpLac111-ADH_{Promotor} extrahiert und über die Schnittstellen *SpeI* und *HindIII* in das Plasmid YCpLac22-ADH_{Promotor} kloniert.

Ebenfalls wurde auf der Basis von genomischer DNA aus WT-W303-1A Hefezellen und unter Verwendung der Oligonukleotide TL600 und TL601 die kodierende Sequenz von *YTA10* in den Vektor YCpLac111-ADH_{Promotor} kloniert.

Über eine präparative PCR wurden DNA-Fragmente erzeugt, die die kodierende Sequenz von *MGE1*, *MID2*, *MKK1*, *ROM2*, *SYPI* bzw. *WSC1* enthielten. Als DNA-Matrize diente genomische DNA aus WT-W303-1A Hefezellen. Die hier verwendeten Oligonukleotide enthielten zusätzlich Erkennungssequenzen für Endonukleasen (siehe Anhang: 7.2 Primerliste). Die PCR-Produkte wurden mit den Endonukleasen *XhoI* und *BamHI* enzymatisch geschnitten und in das Expressionsplasmid pVTU100 kloniert. Des Weiteren wurden *MGE1* (TL1991/TL1992) und *MKK1* (TL1995/TL1996) amplifiziert und in die

EcoRI- und *XbaI*-Schnittstellen des Vektorfragments pJDcex2 (aus pJDcex2-FLAG -FZO1) kloniert. Zusätzlich wurden Produkte einer präparativen PCR von *ROM2* (TL2007/TL2008), bzw. *WSC1* (TL2354/TL2355) mit den Restriktionsendonukleasen *SmaI* bzw. *XbaI* und *SmaI* enzymatisch geschnitten und in den Vektor pJDcex2 kloniert.

2.1.3 Die Disruption von *YTA12* bzw. *YME1*

In dieser Arbeit wurden die beiden Hefestämme $\Delta yta12$ (YSW1) und $yta10^{ts}\Delta yme1$ (YSW2) mittels homologer Rekombination einer Genkassette in das Genom von WT W303-1A bzw. $yta10^{ts}$ (YSW8) hergestellt (Longtine *et al.*, 1998).

Die hier verwendeten Rekombinationskassetten wurden mit den Hybrid-Primern TL178/TL179 bzw. TL852/TL853 (siehe Anhang: 7.2 Primerliste) und dem Matrizen-Plasmid pFA6a-GFP-*kanMX*, das zusätzlich für ein Kanamycinrestistenz-vermittelndes Gen kodiert, mittels PCR amplifiziert. Die 3'-Enden der Oligonukleotide entsprachen der Sequenz des Matrizen-Plasmids. Dagegen konnten die 5'-Enden komplementär an 45-50 Basenpaare des Zielgens binden, in das die Kassette eingefügt werden sollte. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in Lithiumacetat-kompetente Hefezellen transformiert.

Die korrekte Disruption der Gene *YTA12* bzw. *YME1* konnte durch einen PCR-Test überprüft werden. Hierzu wurden die Primer-Paare TL178/TL732 bzw. TL854/TL855 (siehe Anhang: 7.2 Primerliste) verwendet.

2.1.4 „QuikChange® Site-Directed“ Mutagenese

Die „QuikChange® Site-Directed“ Mutagenese (Stratagene) wurde hier verwendet, um gezielt eine Punktmutation in die kodierende Sequenz von $yta10\Delta TM$, die in das Hefe-expressionsplasmid YEpLac181 kloniert worden ist, einzufügen. Diese Punktmutation führte zu einem Austausch von Arginin- zu Alanin-kodierenden Aminosäuren an der Position 447 bzw. 450 ($yta10^{R447A}\Delta TM$ und $yta10^{R450A}\Delta TM$).

Die Primer (siehe Anhang: 7.2 Primerliste TL985, TL986, TL1144 und TL1145) konnten zum einen komplementär an das Plasmid mit der zu mutierenden DNA-Sequenz $yta10\Delta TM$ binden. Hierzu besaßen sie auf beiden Seiten 18 Basen der zu amplifizierenden Matrizen-Sequenz. Zum anderen enthielten die Primer die gewünschte Mutation, die im Laufe der „QuikChange® Site-Directed“ Mutagenese in die amplifizierte Plasmid-DNA eingefügt werden konnte. Ein Reaktionsansatz von 50 μ l enthielt 10 ng Plasmid-DNA, 125 ng jedes

Primers, 0,2 mM dNTPs, 2,5 U *PfuTurbo* DNA-Polymerase in dem vom Hersteller beigefügten Reaktionspuffer. Für die „QuikChange®Site-Directed“ Mutagenese wurde ein modifiziertes PCR-Programm verwendet: Die Mutagenese startete mit 5 min bei 95°C, in denen die *PfuTurbo* DNA-Polymerase nachträglich zu dem Reaktionsansatz beigefügt wurde. Es folgten 18 Zyklen von je 50 sek bei 95°C, 50 sek bei 60°C und 16 min bei 68°C. Die Synthese wurde mit 8 min 68°C beendet. Im Anschluss wurde der Ansatz mit der Endonuklease *DpnI* für 2 h bei 37°C inkubiert. Diese Restriktionsendonuklease erkennt methylierte und hemimethylierte DNA und baut spezifisch die nicht mutierte Matrizen-DNA ab. Die aufgereinigte DNA wurde in kompetente *E. coli* Zellen (XL1-blue, Stratagene) transformiert, die die noch linearisierten Plasmide enzymatisch schlossen. Die Plasmide YEpLac181-*yta10*^{R447A}Δ*TM* und -*yta10*^{R450A}Δ*TM* wurden in Lithiumacetat-kompetente Zellen des Hefestamms Δ*yta10* transformiert.

2.1.5 Verwendete Plasmidkonstrukte

Plasmid	Referenz
YCpLac111-ADH _{Promotor} - <i>yta10</i> ^{fs}	diese Arbeit
YCpLac22-ADH _{Promotor} - <i>yta10</i> ^{fs}	diese Arbeit
YCpLac111-ADH _{Promotor} - <i>YTA10</i>	diese Arbeit
YCpLac22-ADH _{Promotor} - <i>YTA10</i>	(Arlt <i>et al.</i> , 1996)
YEp13	Prof. Dr. J. Dohmen
pJDcex2	Prof. Dr. J. Dohmen
pJDcex2-FLAG- <i>FZO1</i>	Dr. M. Escobar-Henriques
pVTU100- <i>MGE1</i>	diese Arbeit
pJDcex2- <i>MGE1</i>	diese Arbeit
pVTU100- <i>MID2</i>	diese Arbeit
pVTU100- <i>MKK1</i>	diese Arbeit
pJDcex2- <i>MKK1</i>	diese Arbeit
pVTU100- <i>ROM2</i>	diese Arbeit
pJDcex2- <i>ROM2</i>	diese Arbeit

pVTU100- <i>SYP1</i>	diese Arbeit
pVTU100- <i>WSC1</i>	diese Arbeit
pJDcex2- <i>WSC1</i>	diese Arbeit
pYX142-mtGFP	(Westermann und Neupert, 2000)
pFA6a-GFP-kanMX6	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)
YEplac181-ADH _{Promotor} - <i>yta10ΔTM</i>	(Korbel <i>et al.</i> , 2004)
YEplac112-ADH _{Promotor} - <i>yta10ΔTM</i>	(Korbel <i>et al.</i> , 2004)
YCplac111- <i>yta10ΔTM</i>	(Korbel <i>et al.</i> , 2004)
YEplac112-ADH _{Promotor} - <i>yta12ΔTM</i>	(Korbel <i>et al.</i> , 2004)
YEplac112- <i>yta10^{E559Q}ΔTM</i>	(Korbel <i>et al.</i> , 2004)
YCplac111- <i>yta10^{E559Q}</i>	(Arlt <i>et al.</i> , 1996)
YCplac111- <i>yta12^{EQ}</i>	(Arlt <i>et al.</i> , 1996)
YEplac181-ADH _{Promotor} - <i>yta10^{R447A}ΔTM</i>	diese Arbeit
YEplac181-ADH _{Promotor} - <i>yta10^{R450A}ΔTM</i>	diese Arbeit
pGEM3- <i>yme2^{F114S}ΔC15+1</i>	M. Graef
pGEM4- <i>oxa1^{ts}</i>	(Bauer <i>et al.</i> , 1994)
pGEM4- <i>ATP7</i>	(Korbel <i>et al.</i> , 2004)

2.2 Hefegenetische Methoden

2.2.1 Transformation von Hefezellen mit Lithiumacetat (Gietz *et al.*, 1995)

Mit einer Einzelkolonie wurde eine 5 ml Hefekultur angeimpft und über Nacht schüttelnd kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurde eine neue Kultur aus 50 ml Hefemedium mit OD₆₀₀ 0,2 angeimpft und bis OD₆₀₀ 0,7-1,0 unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden bei 3000 g (Heraeus, Biofuge Stratos) 5 min bei Raumtemperatur pelletiert und mit 10 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem die pelletierten Zellen in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert wurden, folgte bei Raumtemperatur eine Zentrifugation für 1 min bei 2300 g (Eppendorf-Tischzentrifuge). Die so gewaschenen Zellen wurden in 1 ml frisch präpariertem 1x TE/LiAc (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, pH 7,5) aufgenommen und erneut 1 min bei 2300 g zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Anschließend wurden die zu transformierenden Zellen in 200 µl 1x TE/LiAc resuspendiert, in

50 µl Aliquots aufgeteilt und vorsichtig mit 200 µg DNA und 50 µg durch 95°C Hitzeschock denaturierter Heringssperma-DNA gemischt. 300 µl frisch präparierte TE/LiAc/PEG Lösung (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, pH 7,5, 40% PEG 4000) wurden auf den Transformationsansatz pipettiert

Schüttelnd inkubierten die Zellen für 30 min bei 30°C bzw. für temperatursensitive Hefezellen bei 24°C. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min. Durch die Zugabe von 1 ml sterilem Wasser wurde der Hitzeschock beendet. Der Transformationsansatz wurde bei 16 000 g (Eppendorf-Tischzentrifuge) kurz pelletiert, direkt danach in 1 ml YPD Flüssigmedium resuspendiert und anschließend für 1 Stunde bei 30°C bzw. bei 24°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden bei 16 000 g (Eppendorf-Tischzentrifuge) 10 sek sedimentiert und in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert.

Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf SC-Selektivplatten gemäß ihrer Auxotrophiemarker ausgestrichen und für 3-5 Tage inkubiert.

Für den genomischen Screen wurde 1 µg DNA der „multicopy“ Genbank, die im Hefexpressionsplasmid YEp13 inseriert ist, in die konditional lethale Hefemutante *yta10^{ts}Δyme1* transformiert. Mit 1 µg DNA konnten so 16 000 bis 20 000 Zellen transformiert werden. Damit war das Genom von *S. cerevisiae* zwei- bis dreifach abgedeckt.

2.2.2 Isolierung autonomer Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* (Robzyk und Kassir, 1992)

Eine Einzelkolonie wurde in 2 ml selektivem Hefemedium inokkuliert und über Nacht schüttelnd kultiviert. Bei maximaler Umdrehung (16 000 g) wurde die gesamte Zellkultur 1 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 100 µl STET (8% Sucrose; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 5% Triton X 100) resuspendiert. Nach Zugabe von $\frac{1}{3}$ Volumen von 0,45 mm Glaskugeln wurden die Hefezellen 5 min unter Verwendung eines Vibrax mechanisch aufgeschlossen. Zu dem Ansatz wurden zusätzliche 100 µl STET gegeben und 5 min bei 95°C erhitzt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden kurz auf Eis gekühlt und bei 4°C für 10 min bei 18 000 rpm (Heraeus Stratos Biofuge) zentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß transferiert, das 75 µl Ammoniumacetat [7,5 M] enthielt. Der Ansatz wurde 1 h bei -20°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 18 000 g (Heraeus Stratos Biofuge) wurde 200 µl Überstand mit 400 µl eiskaltem Ethanol gemischt und die darin enthal-

tene DNA 20 min bei -20°C gefällt. Aus dem Ansatz wurde mittels Zentrifugation (20 min, 14 000 rpm, bei 4°C , Heraeus Stratos Biofuge) die DNA isoliert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die Proben wurden 10 min im Exikator getrocknet und in jeweils 20 μl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert. Zur Anreicherung der Plasmid-DNA wurden 5 μl des Ansatzes in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (XL1-blue) transformiert und abschließend aus den Zellen via Midi- bzw. Minipräparation (gemäß Firmenprotokoll von Macherey & Nagel) isoliert.

2.2.3 Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae* Stämmen

Hefezellen wurden unter Verwendung von YP-Medium bei 24°C , 30°C bzw. 37° kultiviert. In synthetischen Selektivmedien (SC) wurden ausschließlich Zellen mit Expressionsplasmiden kultiviert.

Alle hier verwendeten Medien enthielten 2% (m/v) Glucose, 2% (m/v) Galaktose, 3% (v/v) Glycerin bzw. 0,5% (v/v) Lactat als Kohlenstoffquelle.

Um Kulturen für die Lagerung bei -70°C herzustellen, wurden Hefezellen nach Kultivierung auf Festmedium, wie z.B. YPD, mit einer Impföse in 15% (m/v) Glycerin überführt und bei -70°C gelagert.

Vollmedium YP: 1% (m/v) Bacto-Hefeextrakt
2% (m/v) Bacto-Pepton
2% (m/v) Glucose (YPD) bzw. 3% (v/v) Glycerin (YPG)
Zugabe von HCl für einen pH von 5
gegebenenfalls 10 mM sterilfiltrierte Koffeinelösung

Hyperosmotisches Vollmedium YP-Sorbitol (Ketela *et al.*, 1999; Lorberg *et al.*, 2001):

YP-Vollmedium
2% (m/v) Glucose bzw. 3% (v/v) Glycerin
1M Sorbitol

Methylenblau- Vitalfärbung (Santos und Snyder, 2000): Hyperosmotisches Vollmedium

YP-Sorbitol / Vollmedium YP
2% (m/v) Glucose bzw. 3% (v/v) Glycerin
0,001% Methylenblau

YP/Gal/Lac/Glu: 1% (m/v) Bacto-Hefeextrakt
2% (m/v) Bacto-Pepton
2% (m/v) Galaktose
0,5% (v/v) Lactat
0,02% (m/v) Glucose
Zugabe von KOH für einen pH von 5,5

Synthetisches Selektivmedium (SC): 0,67% (m/v) Hefestickstoffbasis (YNB; inklusive Ammoniumsulfat)
1,5% (m/v) Drop-out
2% (m/v) Glucose bzw. 3% (v/v) Glycerin
Zugabe von NaOH für einen pH von 5,5

Zusammensetzung des Drop-out:

Alanin (20 µg/ml), Arginin (90 µg/ml), Asparagin (90 µg/ml), Asparaginsäure (90 µg/ml), Cystein (90 µg/ml), Glutamin (90 µg/ml), Glutaminsäure, Glycin, Inositol, Isoleucin, Methionin, para-Aminobenzoesäure (9 µg/ml), Phenylalanin (90 µg/ml), Prolin (90 µg/ml), Serin (90 µg/ml), Threonin(90 µg/ml), Tyrosin (90 µg/ml) und Valin (90 µg/ml).

Zur Selektion von Plasmid-transformierten Hefezellen bzw. Hefezellen, die über homologe Rekombination Auxotrophiemarkergene im Genom integriert hatten, konnten die folgenden Aminosäuren dazugegeben bzw. weggelassen werden:

Adenin (40 µg/ml), Histidin (20 µg/ml), Leucin (60 µg/ml), Lysin (30 µg/ml), Tryptophan (40 µg/ml) und Uracil (20 µg/ml).

Sporulationsmedium, Präsporulationsmedium und Minimalsporulationsmedium wurden gemäß den Angaben „Getting started with Yeast“ (Sherman, 1991) hergestellt.

Feste Medien enthielten zusätzlich 2% (m/v) Bacto-Agar.

Herstellung des Koffeingradienten (verändertes Protokoll nach De Bettignies *et al.*, 1999):

In einem Winkel von ca. 35° wurde als Gradientenunterlage in quadratische Petrischalen YP-Vollmedium (50°C-60°C) gegossen und drei Stunden auspolymerisiert. Die Petrischalen wurden ohne Neigungswinkel in ihre Horizontale gebracht. Das schräg gegossene YP-Medium wurde abschließend mit YP-Koffein (YP-Vollmedium + 10 mM sterilfiltriertem Koffein) planar überschichtet und weitere 3 h auspolymerisiert.

2.2.4 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Stamm	Genotyp
W303 (Rothstein und Sherman, 1980)	MATa/α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i>
W303-1A (Rothstein und Sherman, 1980)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i>
Δ <i>yta10</i> [YGS101] (Arlt <i>et al.</i> , 1998)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10::HIS3MX6</i>
Δ <i>yta12</i> [YGS202] (Steglich <i>et al.</i> , 1999)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta12::URA3</i>
Δ <i>yta12</i> [YSW1] (Nolden <i>et al.</i> , 2005)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta12::KANMX6</i>
Δ <i>yme1</i> [YCK10] (Klanner <i>et al.</i> , 2001)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yme1::HIS3</i>
Δ <i>yta10</i> Δ <i>yta12</i> [YHA301] (A. Tzagoloff)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10::URA3 yta12::HIS3</i>
<i>yta10^{fs}</i> E35 (A. Tzagoloff)	MATα <i>met6</i> (Stammhintergrund D273-10B) <i>yta10^{fs}</i>
<i>yta10^{fs}</i> [YSW8] (diese Arbeit)	MATa <i>leu2-3,112 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10^{fs}</i>
Δ <i>yta10</i> + <i>yta10^{fs}</i> [YSW11] (diese Arbeit)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yta10::HIS3</i> YCpLac111-ADH_{Promotor}-<i>yta10^{fs}</i>

<i>yta10^{ts}Δyme1</i> [YSW3] (diese Arbeit)	MATa <i>leu2-3,112 ura3-52 can1-100</i> <i>yta10^{ts} yme1::KANMX6</i>
<i>Δmid2</i> (Euroscarf)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>mid2::KANMX6</i>
<i>Δbck1</i> (Euroscarf)	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>bck1::KANMX6</i>
<i>ΔcoxIV</i>	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>can1-100</i> <i>coxIV::KANMX6</i>
<i>Δpim1</i>	MATα <i>ade2-101 his3-Δ200 leu2Δ1 trp1Δ63 ura3-52</i> <i>lys2-801 can1-100</i> <i>pim1::HIS3</i>
<i>yta10ΔTM^C</i> [YDK1] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta10::HIS3</i> YCplac111-<i>yta10ΔTM</i> (LEU2)
<i>yta10ΔTM</i> [YDK2] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta10::HIS3</i> YEplac181-<i>yta10ΔTM</i> (LEU2)
<i>yta10ΔTM</i> [YDK3] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta10::HIS3</i> YEplac112-<i>yta10ΔTM</i> (TRP1)
<i>yta10^{E559Q}ΔTM</i> [YDK4] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta10::HIS3</i> YEplac112-<i>yta10^{E559Q}ΔTM</i> (TRP1)
<i>Δyta10 + yta12ΔTM</i> [YDK5] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta10::HIS3</i> YEplac112-<i>yta12ΔTM</i> (TRP1)
<i>yta10^{R447A}ΔTM</i> [YSW3] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta10::HIS3</i> YEplac181-<i>yta10ΔTM</i> (LEU2)
<i>yta10^{R450A}ΔTM</i> [YSW5] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta10::HIS3</i> YEplac181-<i>yta10ΔTM</i> (LEU2)
<i>yta12ΔTM</i> [YDK8] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta12::URA3</i> YEplac112-<i>yta12ΔTM</i> (TRP1)
<i>yta12^{E614Q}</i> [YHA203] (Arlt <i>et al.</i> , 1998)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta12::HIS3</i> YCplac111-<i>yta12^{E614Q}</i> (LEU2)
<i>Δyta12 + yta10ΔTM</i> [YDK9] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta12::URA3</i> YEplac112-<i>yta10ΔTM</i> (TRP1)
<i>Δyta10Δyta12 + yta10ΔTM</i> [YDK11] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100 yta10::URA3 yta12::HIS3</i> YEplac112-<i>yta10ΔTM</i> (TRP1)

$\Delta yta10\Delta yta12 + yta12\Delta TM$ [YDK12] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yta10::URA3 yta12::HIS3</i> YEplac112-<i>yta12</i>ΔTM (TRP1)
$\Delta yta10\Delta yta12 + yta10\Delta TM + yta12\Delta TM$ [YDK13] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yta10::URA3 yta12::HIS3</i> YEplac181-<i>yta10</i>ΔTM (LEU2) YEplac112-<i>yta12</i>ΔTM (TRP1)
$\Delta yta10\Delta yta12 + yta10\Delta TM + yta12^{E614Q}$ [YDK14] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yta10::URA3 yta12::HIS3</i> YEplac112-<i>yta10</i>ΔTM (TRP1) YCplac111-<i>yta12</i>^{E614Q} (LEU2)
$\Delta yta10\Delta yta12 + yta10^{E559Q}\Delta TM + yta12^{E614Q}$ [YDK15] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yta10::URA3 yta12::HIS3</i> YEplac112-<i>yta10</i>^{E559Q}ΔTM (TRP1) YCplac111-<i>yta12</i>^{E614Q} (LEU2)
$\Delta yta10\Delta yta12 + yta10^{E559Q} + yta12\Delta TM$ [YDK16] (Korbel <i>et al.</i> , 2004)	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yta10::URA3 yta12::HIS3</i> YCplac111-<i>yta10</i>^{E559Q} (LEU2) YEplac112-<i>yta12</i>ΔTM (TRP1)

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Alkalische Extraktion von mitochondrialen Proteinen

Um die Lokalisierung von Atp7 zu untersuchen, wurden mitochondriale Membranen in einem Natriumcarbonat-Puffer alkalisch extrahiert (Fujiki *et al.*, 1982). Eine abschließende Zentrifugation ermöglicht es, integrale Membranproteine von löslichen und an der Membran peripher assoziierten Proteinen zu trennen. Hierbei enthält die Pelletfraktion die integralen Membranproteine, dagegen sind im Überstand die löslichen und peripher assoziierten Membranproteine enthalten.

50 μg isolierter Mitochondrien wurden bei 16000 g für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert. Die pelletierten Mitochondrien wurden in 1 ml 0,1 M Na_2CO_3 (pH 11,5) 30 min auf Eis alkalisch aufgeschlossen. Im Anschluss an die Inkubation wurden die freien löslichen Mitochondrienbestandteile von der Membranfraktion durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 45000 rpm und 4°C getrennt. Das Pellet wurde in 500 μl Na_2CO_3 (pH 11,5) aufgenommen und die darin enthaltenen integralen Membranproteine mit 72 %igem TCA gefällt. Ebenso wurden die frei löslichen Proteine aus dem Überstand mit TCA isoliert. Die isolierten Proteine konnten in einem SDS-PAGE (Laemmli *et al.*, 1970) gelelektrophoretisch getrennt und nach einem Westernblot (Towbin *et al.*, 1979) immunologisch untersucht werden. Zur Kontrolle der Auftrennung von integralen Membranproteinen und frei löslichen Proteinen

wurden Antiseren gegen den Membran-integrierten ADP/ATP Carrier (Aac2) und das lösliche Matrix-Protein Mge1 verwendet.

2.3.2 Präzipitierung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Durch die Zugabe von 72%iger Trichloressigsäure (TCA; auf eine Endkonzentration von 20% (m/v)) konnten gelöste Proteine nach einer Inkubation von 60 min bei -20°C gefällt werden. Im Anschluss wurden die gefällten Proteine 20 min bei 16.200 g und 4°C pelletiert. Nach zweimaligem Waschen der Proben mit eiskaltem Aceton (100%) wurden die Proteine 10 min bei 56°C getrocknet und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Durch 10 minütiges kräftiges Schütteln waren die Proteine im SDS-Probenpuffer resuspendiert. Zum Denaturieren der Proteinstruktur wurden die Proben 3 min bei 95°C aufgekocht und konnten dann auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen werden.

SDS-Probenpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 6,8
1% (v/v) β -Mercaptoethanol
2% (m/v) SDS
0,01% (m/v) Bromphenolblau
10% Glycerin

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Induzierung von Apoptose in Hefezellen

(modifiziertes Protokoll nach Schwienhorst, 2001 und Pozniakovsky *et al.*, 2005)

Um apoptotische Prozesse in *S. cerevisiae* verfolgen zu können, wurden Hefezellen vom Paarungstyp α mit einem Überschuss des Paarungspheromons α -Faktor behandelt. Dies induzierte einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase. Haploide Hefezellen, denen zum Paaren die Partnerzelle vom Paarungstyp α fehlt, induzieren bei überhöhter Konzentration von α -Faktor zusätzlich apoptotische Prozesse:

Eine Flüssigkultur von *S. cerevisiae* ($2,1 - 3 \times 10^7$ Zellen) wurde mit Natriumcitrat auf pH 4,5 (Endkonzentration 0,1 M) angesäuert. Durch die Zugabe von Natriumcitrat konnte die Bindung des Paarungspheromons α -Faktor an die Hefezellen stabilisiert und proteolytische Prozesse gehemmt werden. Zur Apoptoseinduktion wurde 0,1 mg/ml α -Faktor zu der ange-

säuerten Zellkultur gegeben. Die Zellen wurden bei 30°C für ungefähr drei bis vier Stunden induziert. Apoptotische Zellen konnten mittels Annexin V Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Apoptose und Zell-Lyse in *S. cerevisiae*

modifiziert nach Firmenprotokoll von BD ApoAlert™ Annexin V-FITC Apoptosis Kit; (Madeo *et al.*, 1997)

Über Nacht gewachsene Hefezellen wurden von einer YPD Platte abgenommen, gewaschen und in Sorbitolpuffer (1,2 M Sorbitol, 0,5 mM MgCl₂, 35 mM Kaliumphosphat pH 6.8) resuspendiert.

Um die Zellen aufzuschließen, wurden die Zellwände mit 5,5 % Glucoronidase und 15U/ml Lyticase entfernt. Der Zellwandabbau war nach zwei Stunden bei 28°C beendet. Die vorliegenden Sphäroplasten wurden einmal mit 200 µl Bindungspuffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 M Sorbitol) gewaschen und anschließend in 38 µl Bindungspuffer vorsichtig resuspendiert. Zum Apoptosenachweis wurde zu der Zellsuspension 40 ng Annexin V FITC und zum Zell-Lysisnachweis 100 ng Propidiumjodid gegeben. Die Zellen wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Ungebundenes Annexin V FITC und Propidiumjodid konnten ausgewaschen und die angefärbten Zellen in 40 µl Bindungspuffer resuspendiert werden. 1,5 µl der Zellsuspension wurde auf einen Objektträger gebracht. Die Fluoreszenz wurde bei Bestrahlung mit einer Quecksilberlampe (HB100, Zeiss) unter Verwendung geeigneter Einlass- und Emissionsfilter sichtbar gemacht. Die Präparate konnten mit dem Mikroskop Zeiss Axioplan2 bei 1000-facher Vergrößerung betrachtet werden. Photographisch ließen sie sich mit der digitalen Quantix-Kamera (Photometrix) dokumentieren. Die Auswertung erfolgte mit dem Metamorph Imaging System (Metamorph 5).

2.4.3 Färbung der Mitochondrien von *S. cerevisiae* mit dem grünfluoreszierenden Farbstoff MitoTracker® green FM

Das grünfluoreszierende MitoTracker green FM (invitrogen™) diffundiert passiv durch die Zellwände und Plasmamembranen, um im Cytoplasma zu oxidieren. In diesem wässrigen Milieu bleibt der Farbstoff weiterhin nichtfluoreszierend. MitoTracker® green FM akkumuliert schließlich in den Mitochondrien. Innerhalb der Mitochondrien werden Thiol-

proteinen bzw. Thiolpeptide gebunden. Das Lipidmilieu der Mitochondrien lässt MitoTracker[®] green FM fluoreszieren. Dieses spezifische Fluoreszenzverhalten erlaubt so die Lokalisation und Morphologieuntersuchung von Mitochondrien.

MitoTracker[®] green FM wurde vor Gebrauch in DMSO auf eine Konzentration von 1mM verdünnt und konnte so bei -20°C und im Dunkeln gelagert werden. Zum Gebrauch wurde frisch eine 3 µM Mitotrackerlösung aus der Stocklösung in PBS hergestellt.

Hefezellen, die über Nacht auf einem festen Vollmedium gewachsen sind, wurden in 500 µl PBS vorsichtig resuspendiert und eine Minute bei 6600 rpm und bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 425 µl PBS resuspendiert. 75 µl MitoTrackerlösung wurden vorsichtig dazugemischt (500 nM Endkonzentration von MitoTracker[®] green FM) und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 75 µl PBS resuspendiert und 1,5 µl dieser Verdünnung auf einen Objektträger aufgetragen.

Die Morphologie von Mitochondrien konnte fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung eines FITC Fluoreszenzfilters analysiert werden.

2.5 Weitere Methoden

Im Verlauf dieser Studie wurden Methoden aus bereits veröffentlichten Arbeiten verwendet: Klonierungen (Sambrook und Russell, 2001), Hefemedien, Kreuzen von haploiden Hefezellen und die anschließende Tetradenanalyse (Sherman, 2002), SDS-PAGE (Laemmli *et al.*, 1970), Western Blot (Towbin *et al.*, 1979), Import und Proteolyse von radioaktiv markierten Vorläuferproteinen (Käser *et al.*, 2003).

3. Ergebnisse

Die *m*- und die *i*-AAA-Protease erfüllen innerhalb von Mitochondrien eine Reihe von Aufgaben, beispielsweise Proteinqualitätskontrolle, Erhaltung der Atmungskompetenz und der mitochondrialen Morphologie (Langer, 2000; Ogura und Wilkinson, 2001; Nolden *et al.*, 2005).

Durch mehrere Arbeiten war bereits bekannt, dass eine gleichzeitige Deletion der Gene *YTA10* und *YME1* und damit der gemeinsame Funktionsausfall der *m*- und *i*-AAA-Protease für Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* synthetisch letal sind (Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000). Zur Untersuchung der Ursache dieses letalen Phänotyps wurden in dieser Arbeit Hefen mit der konditional letalen Doppelmutation *yta10^{ts}Δyme1* hergestellt und ihr Phänotyp charakterisiert. Darüber hinaus wurde diese AAA-defiziente Hefemutante in einem „multicopy“ Screen verwendet, um mögliche Suppressionsfaktoren der *m*- und *i*-AAA-Proteasen zu isolieren. Diese Suppressoren sollten Aufschluss über essentielle Funktionen mitochondrialer AAA-Proteasen geben.

3.1 Charakterisierung des temperatursensitiven Allels *yta10^{ts}*

Im Verlauf eines Mutagenese Screens konnte im Labor von Prof. A. Tzagoloff (New York) der Hefestamm *yta10^{ts}* isoliert werden. Phänotypische Untersuchungen machten deutlich, dass diese temperatursensitive Mutante atmungsinkompetent ist und folglich nicht bei 37°C auf Medien mit nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen, wie z.B. Glycerin (YPG) wachsen kann. Jedoch war bislang nicht untersucht worden, wodurch die temperatursensitive Atmungsinkompetenz in dieser Hefemutante verursacht wurde. Hierzu wurde in der hier vorliegenden Arbeit das temperatursensitive Allel *yta10^{ts}* auf DNA- und Proteinebene charakterisiert:

In der genomischen Sequenz von *yta10^{ts}* wurde ein Basenaustausch an der Position 1087 von Guanin zu Adenin identifiziert. Diese Punktmutation liegt im Porenmotiv der AAA-Domäne und führt zum Austausch von Glycin 363 zu Glutamin (Abb. 6).

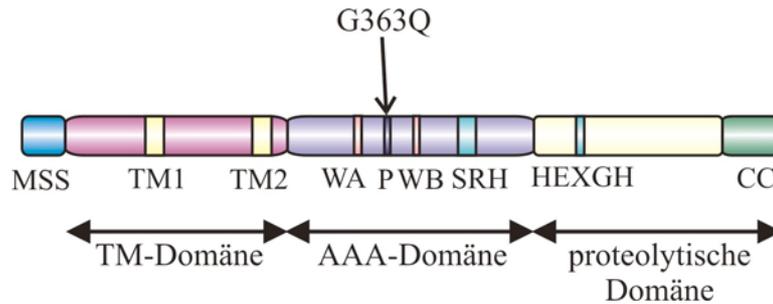


Abb. 6: Im Porenmotiv der AAA-Domäne ist eine Punktmutation im temperatursensitiven Protein Yta10^{ts} lokalisiert.

Eine Punktmutation von Guanin zu Adenin an der Position 1087 bp ist für die Temperatursensitivität des Hefestammes *yta10^{ts}* verantwortlich. Zwischen der Walker A (WA)- und Walker B (WB)-Domäne ist im Porenmotiv (P) bei diesem Stamm die 363. Aminosäure Glycin (G) gegen Glutamin (Q) ausgetauscht. Eine weitere Mutation in der kodierenden Sequenz von *YTA10* wurde nicht entdeckt.

Yta10^{ts} besteht wie das wildtypische Protein aus den Domänen mitochondriale Signalsequenz (MSS), Transmembrandomäne 1 und 2 (TM1 und TM2), Walker A- und B-Domäne (WA und WB), Pore (P), zweite homologe Region (SRH), Metallbindestelle (HEXGH) und „coiled coil“ Domäne (CC).

Auch wurden die Auswirkungen des temperatursensitiven Allels *yta10^{ts}* auf die Proteinlokalisierung und -expression genauer untersucht: In einer Subfraktionierung von Zellen des Stammes *yta10^{ts}* fand sich das temperatursensitive Protein Yta10^{ts} trotz seiner Mutation in der Fraktion von mitochondrialen Membranen (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls wurde in dieser immunologischen Untersuchung deutlich, dass die Expression des temperatursensitiven Allels *yta10^{ts}* im Vergleich mit der Expression des wildtypischen *YTA10* Allels nicht reduziert war. Dies weist darauf hin, dass Yta10^{ts} weiterhin in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert ist, und die Temperatursensitivität nicht durch ein verändertes Expressionsniveau oder eine Proteinstabilisierung verursacht wird.

Für einen genomischen Screen mit der „multicopy“ Genbank in YEp13 zur Identifizierung von Suppressoren der *m*- und *i*-AAA-Protease konnte der Ausgangsstamm *yta10^{ts}* nicht direkt verwendet werden, da er keine Leucinauxotrophie aufwies. Zur Herstellung eines Leucinauxotrophen Hefestammes wurde der Ausgangsstamm *yta10^{ts}* mit dem Wildtypstamm W303-1A zurückgekreuzt. Der aus dieser Rückkreuzung entstandene Stamm *yta10^{ts}* (YSW8) enthält das temperatursensitive Allel *yta10^{ts}*, d.h. ebenfalls die Punktmutation an der Position 1087, die zu dem Aminosäureaustausch im Motiv der AAA-Domäne führt. Zusätzlich ist *yta10^{ts}* (YSW8) auf die Selektionsmarker Leucin und Uracil selektierbar. Im weiteren Verlauf dieser Studie wurde dieser temperatursensitive Hefestamm verwendet.

3.1.1 Überprüfung des Hefestammes *yta10^{ts}* auf zusätzliche Temperatursensitivität verursachende Mutationen

Nachfolgend sollte gezeigt werden, dass die Temperatursensitivität von *yta10^{ts}* auf das Allel *yta10^{ts}* zurückzuführen ist. In diesem Fall sollte sich nach einer Rückkreuzung mit einem Wildtypstamm der temperatursensitive und wildtypische Wachstumsphänotyp im Verhältnis 1:1 aufteilen. Sollte nur ein Gen mutiert sein, so wären demnach zwei der vier haploiden Zellen aus der entstandenen Tetrade weiterhin temperatursensitiv.

Hierzu wurde der Stamm *yta10^{ts}* mit dem Wildtypstamm W303-1A gekreuzt. Nach der Trennung der Tetraden in ihre vier haploiden Sporen wurden die haploiden Zellen auf ihre Atmungskompetenz bei 37°C auf YPG Medium hin untersucht (Abb. 7). Durch die Rückkreuzung mit dem Wildtyp war es nun zwei der jeweils vier Sporen möglich, auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle zu wachsen. Sie trugen das Wildtyp-Allel *YTA10*. Die anderen beiden Sporen trugen das temperatursensitive *yta10^{ts}* Allel und zeigten weiterhin auf YPG Medium bei 37°C respiratorische Inkompetenz.

Dementsprechend kann nur das Allel *yta10^{ts}* oder eine zweite Mutation in einem benachbarten Gen auf dem Chromosom von *YTA10* für die temperaturabhängige Atmungsinkompetenz des Hefestammes *yta10^{ts}* verantwortlich sein. Jedoch ließ sich mit dieser Kontrolle nicht ausschließen, dass sich weitere Mutationen im Genom von *yta10^{ts}* befinden.

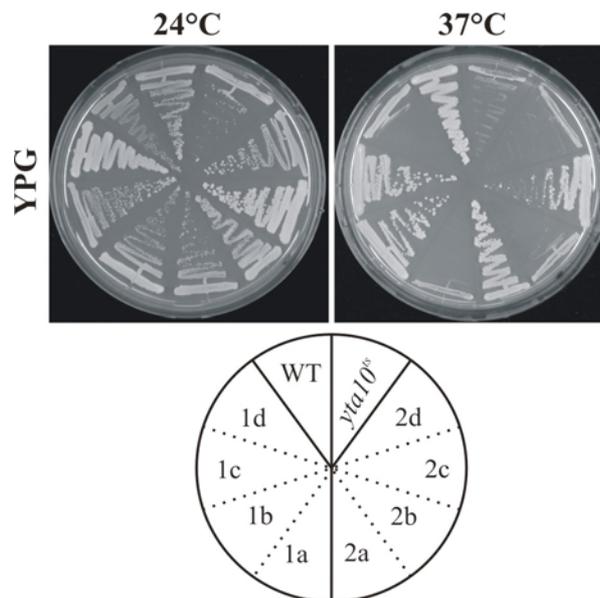


Abb. 7: Respiratorisches Wachstum haploider Sporen bei 37°C nach der Rückkreuzung von *yta10^{ts}* mit WT W303-1A. Fortsetzung auf der nächsten Seite

Haploide Sporen der Tetraden, die aus der Rückkreuzung von *yta10^{ts}* mit WT W303-1A Zellen entstanden waren, wurden auf ihre Atmungskompetenz hin untersucht. Als Positivkontrolle wurde WT W303-1A und als Negativkontrolle *yta10^{ts}* (YSW8) verwendet.

Zur Überprüfung, ob weitere Mutationen für die Temperatursensitivität verantwortlich sind, wurde die temperatursensitive Hefemutante *yta10^{ts}* auf Komplementation getestet. Dazu wurde in Zellen von *yta10^{ts}* das Wildtypallel *YTA10* über den Promotor der Alkoholdehydrogenase (YCpLac111-ADH_p bzw. YCpLac22-ADH_p) heterolog überexprimiert. Der resultierende Stamm war erneut in der Lage, auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle bei nicht permissiver Temperatur von 37°C zu wachsen. Die Negativkontrolle ohne Komplementationsplasmid konnte die nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle bei 37°C nicht veratmen. Das heißt, die heterologe Expression von *YTA10* konnte die respiratorische Kompetenz wieder vollständig herstellen (Abb. 8).

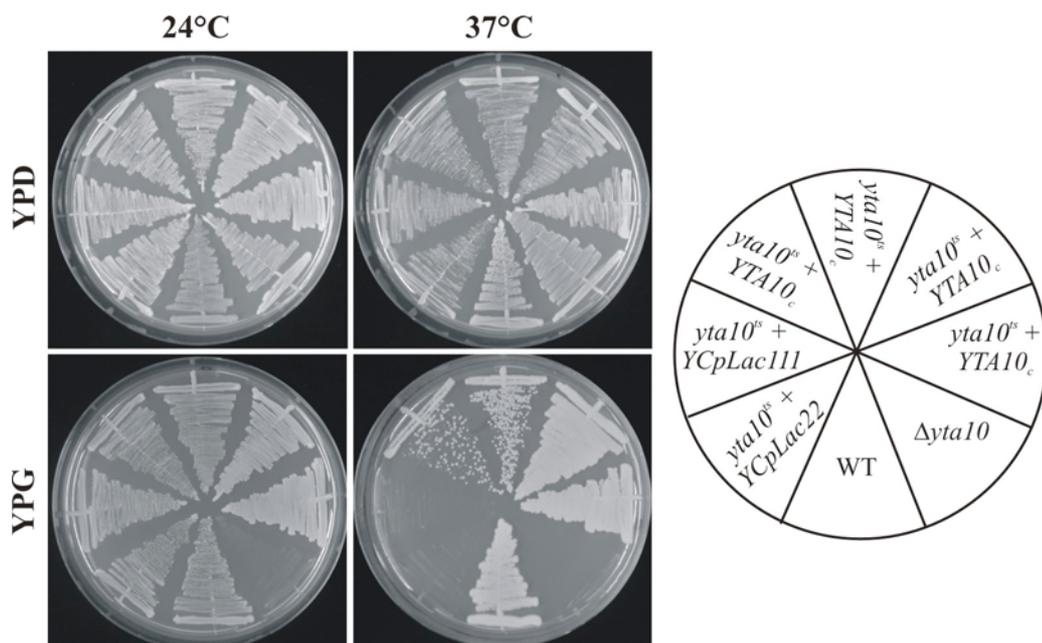


Abb. 8: Die Expression von *YTA10* kann den temperatursensitiven *petite* Phänotyp der Hefemutante *yta10^{ts}* komplementieren.

Die Zellen des genomisch mutierten Hefestammes *yta10^{ts}* wurden mit den Konstrukten YCpLac111-ADH_{Promotor} - bzw. YCpLac22-ADH_{Promotor} -*YTA10* (*yta10^{ts}* + *YTA10_c*) transformiert und fünf Tage auf synthetischem Selektionsmedium kultiviert. Um zu überprüfen, ob eine heterologe Überexpression von *YTA10* in den Zellen von *yta10^{ts}* wieder eine vollständige Atmungskompetenz herstellt, wurden transformierte Zellen auf YPD- und YPG-Medium bei 24°C bzw. 37°C fünf Tage inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen, die mit den Vektoren YCpLac111-ADH_{Promotor} (YCpLac111) bzw. YCpLac22-ADH_{Promotor} (YCpLac22) transformiert waren,

bzw. Zellen der Deletionsmutante $\Delta yta10$ verwendet. Zur Wachstumskontrolle wurden Wildtypzellen W303-1A ausgestrichen.

In einem weiteren Komplementationexperiment sollte geklärt werden, ob der temperatursensitive, respiratorisch inkompetente Phänotyp ausschließlich auf die Punktmutation in $yta10^{fs}$ zurückzuführen ist. Dazu wurde in dem Deletionshefestamm $\Delta yta10$ das temperatursensitive Allel $yta10^{fs}$ transient exprimiert. Auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle bei 37°C konnte dieser Hefestamm ($\Delta yta10 + yta10^{fs}$; YSW11) nicht wachsen, da er durch das temperatursensitive Allel $yta10^{fs}$ respiratorisch inkompetent war. Eine zusätzliche Expression des Wildtypallels $YTA10$ in dieser temperatursensitiven Mutante ($\Delta yta10 + yta10^{fs} + YTA10$) konnte die respiratorische Kompetenz auf YPG bei 37°C wieder vollständig herstellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Sensitivität von $yta10^{fs}$ gegenüber Temperaturerhöhung ausschließlich durch die Punktmutation an der Position 1087 bp in $YTA10$ verursacht wird (Abb. 9).

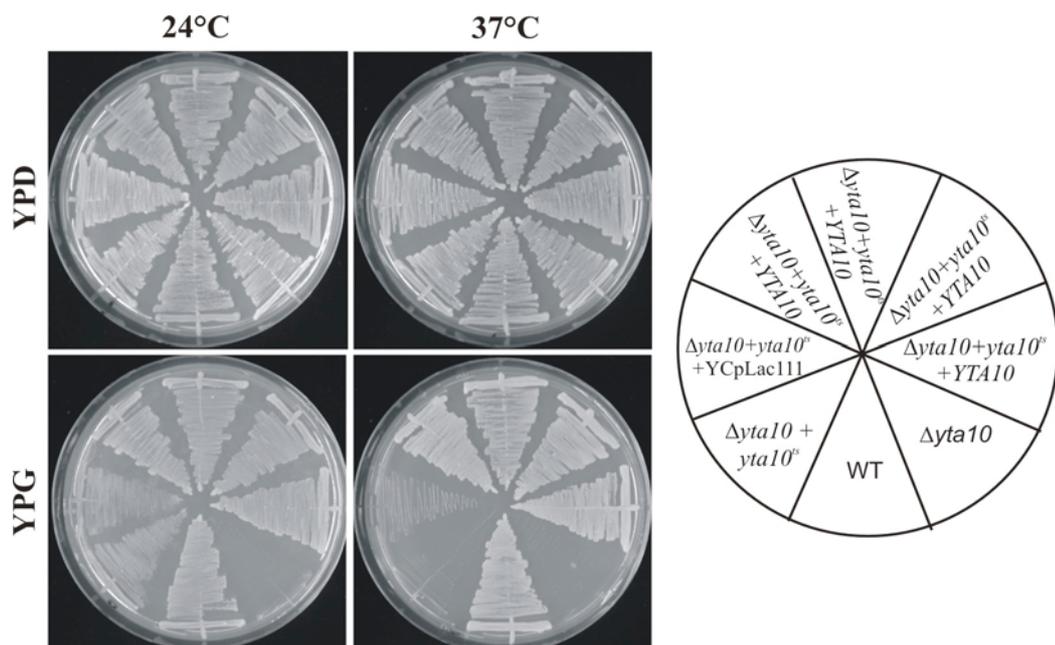


Abb. 9: Die heterologe Expression des Allels $yta10^{fs}$ ruft Atmungsinkompetenz in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur hervor.

$\Delta yta10$ Hefezellen wurden mit $YCpLac22-ADH_{Promotor} -yta10^{fs}$ transformiert ($\Delta yta10 + yta10^{fs}$; YSW11) bzw. mit $YCpLac111-ADH_{Promotor} -YTA10$ kotransformiert ($\Delta yta10 + yta10^{fs} + YTA10$). Der leere Vektor $YCpLac111-ADH_{Promotor}$ ($YCpLac111$) in YSW11 bzw. in $\Delta yta10$ Hefezellen diente als Negativkontrolle. Die transformierten Zellen wurden fünf Tage auf selektivem synthetischem Medium bei 24°C inkubiert. Danach wurden sie auf YPD und YPG transferiert und ihre Atmungskompetenz bei 24°C bzw. 37°C überprüft; die heterologe Expression von $YTA10$ konnte den temperatursensitiven Phänotyp von YSW11 komplementieren.

Die drei Kontrollexperimente Rückkreuzung und die beiden Komplementationen führen zu der Schlussfolgerung, dass die temperaturabhängige Atmungsinkompetenz durch das mutierte Allel *yta10^{fs}* hervorgerufen wurde. Zum anderen ließ sich durch die Komplementationsexperimente ausschließen, dass eine weitere Mutation im Genom von *yta10^{fs}* vorzufinden ist.

3.2 Phänotypische Analyse der Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1*

Ein gleichzeitiger Ausfall der *m*- und *i*-AAA-Protease wirkt sich für Zellen von *S. cerevisiae* synthetisch letal aus (Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000). Dies machte es bislang unmöglich, die Auswirkungen und Phänotypen eines gleichzeitigen Funktionsausfalls beider AAA-Proteasen zu analysieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Suppressoren identifiziert werden, die die gemeinsamen AAA-Proteasendefekte unterdrücken konnten. Ziel dieser Experimente war es, Einblicke in die essentiellen Funktionen der AAA-Proteasen in der Zelle zu gewinnen. Für diese Arbeit wurde die konditional letale Hefemutante *yta10^{ts}Δyme1* verwendet. Für ihre Herstellung wurde mittels homologer Rekombination das Gen *YME1* im Genom von *yta10^{ts}* (YSW8) deletiert. Die Phänotypen von verschiedenen AAA-proteasedefizienten Hefen wurden untersucht (Abb. 10).

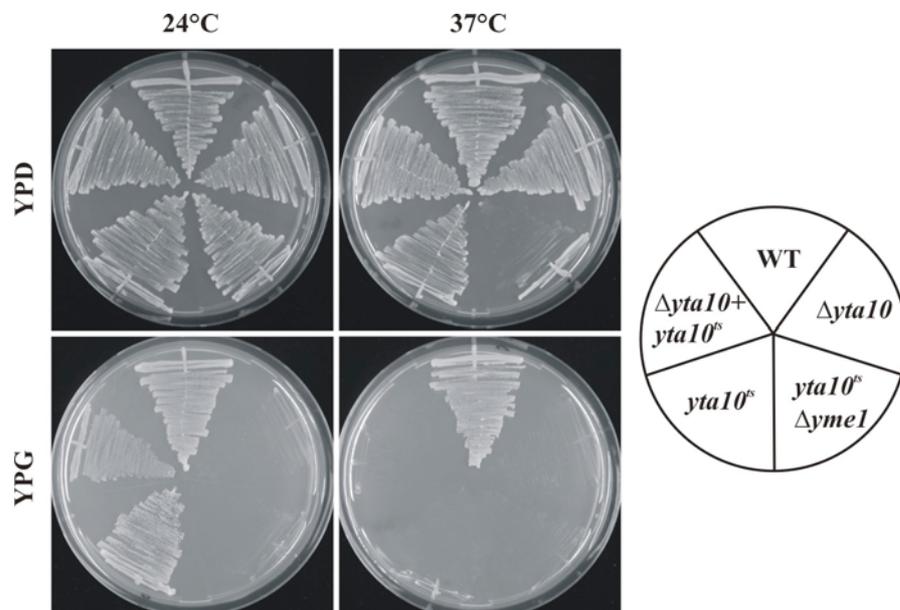


Abb. 10: Mutationen der mitochondrialen AAA-Proteasen führen in *S. cerevisiae* zu Atmungsinkompetenz. Fortsetzung auf der nächsten Seite

Zellen der Hefestämme WT W303-1A, $\Delta yta10$, $yta10^{fs}$, $\Delta yta10+yta10^{fs}$ und $yta10^{fs}\Delta yme1$ wurden auf YPD- bzw. YPG-Medium aufgetragen. Das Wachstum der Zellen wurde sowohl bei permissiver Temperatur von 24°C als auch bei nicht permissiven Bedingungen von 37°C verglichen.

Die Deletion von *YTA10* im Genom von *S. cerevisiae* führt zu einem Atmungsdefekt, der ein Wachstum auf Medien mit der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin (YPG) verhindert (Tauer *et al.*, 1994; Rep *et al.*, 1996; Steinmetz *et al.*, 2002). In der Hefemutante $\Delta yme1$ macht sich dagegen erst bei 37°C ein Atmungsdefekt bemerkbar (Thorsness und Fox, 1993; Thorsness *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1994).

Die respiratorischen Defekte werden in den Hefemutanten $yta10^{fs}$ und $\Delta yta10 + yta10^{fs}$ erst bei erhöhter Temperatur (37°C) auf YPG-Medium deutlich.

In der Doppelmutante $yta10^{fs}\Delta yme1$ macht sich ein synthetisch letaler Effekt bemerkbar, der unabhängig von der Kohlenstoffquelle war. $yta10^{fs}\Delta yme1$ zeigte sowohl auf YPD bei 37°C als auch auf YPG bei 24°C und 37°C kein Wachstum. Offenbar verursacht die gleichzeitige Mutation der AAA-Proteasenuntereinheiten Yta10 und Yme1 nicht nur eine Atmungsinkompetenz der Zellen, sondern hat eine generelle Temperaturhypersensitivität zur Folge.

Medium	YPD		YPG	
	24°C	37°C	24°C	37°C
WT	•	✓	✓	✓
$\Delta yta10$	•	•	-	-
$\Delta yme1$	•	•	•	-
$yta10^{fs}$ (YSW8)	•	•	•	-
$\Delta yta10 + yta10^{fs}$ (YSW11)	✓	✓	✓	-
$yta10^{fs}\Delta yme1$	•	-	-	-

Tab. 1: Wachstumsdefekte AAA-proteasedefizienter Hefestämme.

Hefezellen der Stämme WT W303-1A, $\Delta yta10$, $\Delta yme1$, $yta10^{fs}$ (YSW8), $\Delta yta10 + yta10^{fs}$ (YSW11) und $yta10^{fs}\Delta yme1$ wurden auf den festen Medien YPD bzw. YPG bei 24°C oder 37°C inkubiert und ihr Wachstum nach 5 Tagen dokumentiert.

- : Wachstum ist festzustellen; - : kein Wachstum detektierbar

Wurden jedoch Zellen des temperatursensitiven Stammes *yta10^{ts}Δyme1* in Flüssigkulturen angezogen, konnte kein Unterschied in der Verdoppelungsrate zwischen permissiv und nicht permissiv temperierten Flüssigkulturen detektiert werden.

Dagegen ließ sich die Temperatursensitivität wieder beobachten, nachdem die Zellen der Stämme *yta10^{ts}Δyme1* bzw. *yta10^{ts}* im Laufe ihrer logarithmischen Wachstumsphase aus den YPD-Flüssigkulturen auf YPD-Platten transferiert und bei 24°C oder 37°C inkubiert wurden (Abb. 11). Die Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* stellte ihr Wachstum bei 37°C komplett ein, während nur die Hälfte der ausgebrachten Zellen der Einfachmutante *yta10^{ts}* (YSW8) noch auf dem Festmedium bei 37°C wachsen konnte. Es machte keinerlei Unterschied, ob die Zellen aus Flüssigmedium stammten, das auf 24°C oder auf 37°C temperiert war.

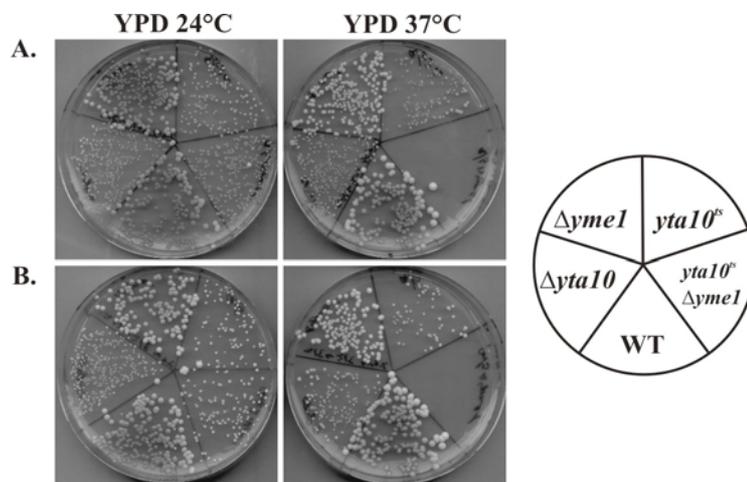


Abb. 11: Die Temperatursensitivität lässt sich nach dem Transfer der Zellen aus dem Flüssigmedium auf Festmedium wieder beobachten.

Es wurden Kulturen der Stämme WT W303-1A, *Δyta10*, *Δyme1*, *yta10^{ts}* und *yta10^{ts}Δyme1* in YPD Flüssigmedium bei 24°C (A.) und bei 37°C (B.) angezogen. Nach photometrischer Analyse bei OD₆₀₀ zur Ermittlung der Zellzahl wurden jeweils 200 Zellen aus den Kulturen auf YPD-Platten transferiert und ein Wachstumstest bei 24°C oder 37°C für 4 Tage durchgeführt.

Offensichtlich hatte die Umgebung der Zellen einen direkten Einfluss auf die Phänotypen AAA-proteasedefizienter Stämme. Zellen, die durch die Flüssigkultur osmotisch stabilisierter waren, unterdrückten ihre Hypersensitivität gegenüber der Temperatur. Wurden aber Zellen derselben Kultur auf Festmedium, d.h. in hypoosmotischer Umgebung, kultiviert, ließ sich der temperatursensitive Phänotyp wieder feststellen.

3.3 Apoptose oder Nekrose? Was verursacht den Zelltod der Hefemutanten *yta10^{ts}* und *yta10^{ts}Δyme1*?

Durch verschiedene Studien konnte beobachtet werden, dass Mitochondrien an Prozessen des programmierten Zelltods maßgeblich beteiligt sind (Skulachev, 2002; Madeo *et al.*, 2004). Zur weiteren Charakterisierung der konditional letalen Hefemutanten *yta10^{ts}* und *yta10^{ts}Δyme1* wurde daher untersucht, ob AAA-proteasedefiziente Zellen unter restriktiven Bedingungen durch Apoptose oder durch nekrotische Prozesse sterben. Hierzu wurden Zellen der temperatursensitiven Stämme mit dem Apoptosemarker Annexin V, der spezifisch Phosphatidylserin an der äußeren Seite der cytoplasmatischen Membran apoptotischer Zellen bindet, gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Madeo *et al.*, 1997). Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Zell-Lyseindikator Propidiumjodid behandelt, das aufgebrochene Protoplasten nachweist (Abb. 12). Zum Nachweis apoptotischer Prozesse wurden Wildtypzellen vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert (Pozniakovsky *et al.*, 2005). Diese Pheromonbehandlung aktiviert spezifisch Apoptose, jedoch nicht lytische Prozesse.

Die temperatursensitiven Hefen *yta10^{ts}* und *yta10^{ts}Δyme1* waren unter nicht permissiven Wachstumsbedingungen nicht durch Annexin V anfärbbar. Jedoch zeigten sie eine geringe, aber feststellbare Aufnahme von fluoreszierendem Propidiumjodid bei einem Wechsel von YPD auf YPG. Hingegen waren Zellen beider Stämme bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C mit Propidiumjodid intensiv angefärbt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die respiratorische Inkompetenz und synthetische Letalität in den temperatursensitiven AAA-Protease Mutanten keine Apoptose hervorruft, die Zellen jedoch lysieren.

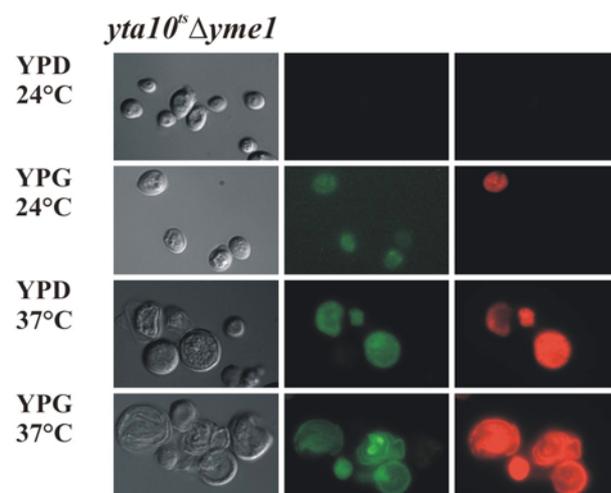
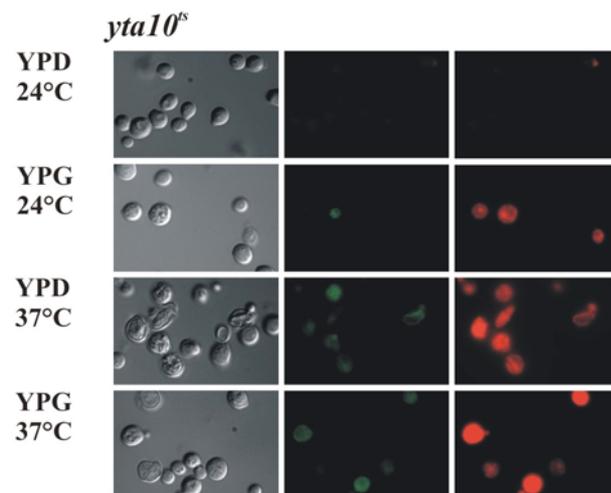
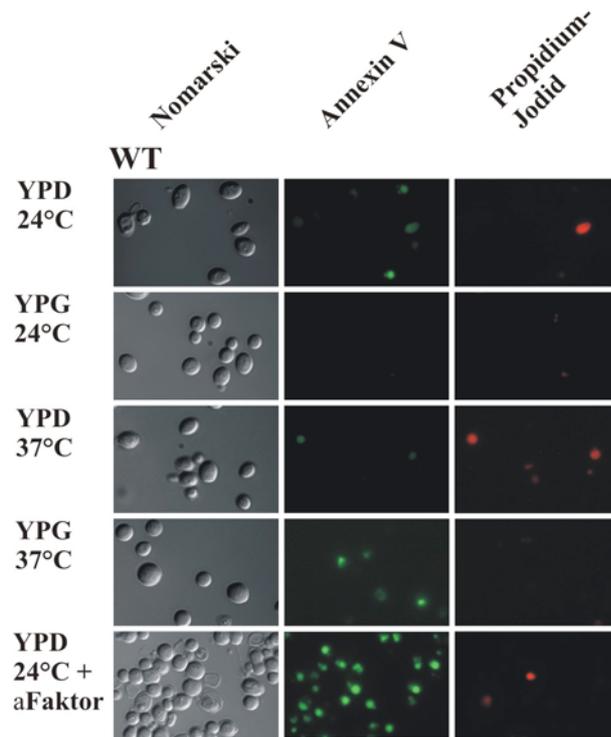


Abb. 12: Temperaturinduzierte Defekte der *m*- und *i*-AAA-Protease führen zu Nekrose.

Zellen der temperatursensitiven Stämme *yta10^{ts}* und *yta10^{ts}Δyme1* wurden auf YPD- bzw. YPG-Platten aufgebracht und über Nacht bei permissiver bzw. restriktiver Temperatur inkubiert. Die Zellen waren noch in der Lage, ein bis zwei Zellteilungen durchzuführen, stellten dann aber ihr Wachstum ein. Nach Färbung mit Annexin V und Propidiumjodid wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Apoptose-Positivkontrolle wurden Wildtypzellen W303-1A durch Zugabe des Paarungspheromons α -Faktor in ihrem Zellzyklus unterbrochen und dadurch apoptotische Vorgänge induziert (Schwienhorst, 2001; Pozniakovsky *et al.*, 2005).

3.4 Suche nach Suppressoren der konditional letalen Doppelmutation *yta10^{ts}Δyme1*

In vorherigen Studien sind bereits Suppressoren der Atmungsinkompetenz, die durch eine Deletion von *YTA10* verursacht wurde, in *S. cerevisiae* identifiziert worden. So konnten PIM1, eine in der Matrix lokalisierte ATP-abhängige Serin-Protease (Suzuki *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994) sowie Oxa1, das ein Teil der Insertionsmaschinerie für mitochondriale Atmungskomplexe ist (Kermorgant *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 1998; Lemaire *et al.*, 2000; Hell *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2001; Nargang *et al.*, 2002) und Mba1, das unabhängig von Oxa1 als Rezeptor zur Insertion von mitochondrialen Proteinen in der inneren Mitochondrienmembran dient (Preuss *et al.*, 2001), als Suppressoren von $\Delta yta10$ identifiziert werden (Rep *et al.*, 1996). 2004 entdeckte C. Lemaire mit Oms1 einen weiteren Suppressor von $\Delta yta10$ (Lemaire *et al.*, 2004). Oms1 supprimiert sowohl Oxa1 als auch Yta10. Dieses Protein ist als Methyltransferase-ähnliches Protein in der mitochondrialen Membran lokalisiert.

Eine Hauptfragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob eine Überexpression von bestimmten Faktoren die Letalität, die durch die Doppelmutation *yta10^{ts}Δyme1* verursacht wurde, in *S. cerevisiae* unter restriktiven Bedingungen supprimieren konnte. Diejenigen Proteine, die unter diesen Bedingungen den Funktionsausfall der beiden AAA-Proteasen kompensieren könnten, sollten identifiziert werden. Dies sollte weitere Informationen über die Funktionen der AAA-Proteasenuntereinheiten Yta10 und Yme1 liefern und auch den primären Defekt von *yta10^{ts}* und $\Delta yme1$ weiter charakterisieren.

Zur Suppressorensuche wurde eine genomische „multicopy“ Genbank verwendet, die in das Hefeexpressions-Plasmid YEp13 inseriert war. 1 μ g dieser Genbank wurde in den Hefestamm *yta10^{ts}Δyme1* transformiert. Damit waren theoretisch 16 000 bis 20 000 Zellen dieser

Hefemutante mit dieser Genbank transformiert, d.h. die hier verwendete Genbank deckte das Genom von *S. cerevisiae* prinzipiell zwei- bis dreifach ab.

Nach einer Inkubationszeit von einer Woche auf YPD-Medium ließen sich 90 Hefekolonien isolieren, die unter restriktiven Wachstumsbedingungen bei 37°C lebensfähig waren. Aus diesen Zellen wurden die suppressionsfähigen Vektoren der „multicopy“ Genbank isoliert und die Insertionen der isolierten Plasmide sequenziert. Mittels PCR Analyse konnten bereits vor der Sequenzanalyse 9 Kandidaten aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden, da sie die kodierende Sequenz von *YTA10* über YEp13 exprimierten.

Die übrigen 81 Suppressionskandidaten exprimierten 16 Loci von unterschiedlicher Größe. Nach einer erneuten Transformation der isolierten Plasmide in *yta10^{ts}Δyme1* und Überprüfung des Wachstums der Zellen bei 37°C konnten so zwei weitere Kandidaten ausgeschlossen werden.

Die Auswertung der Sequenzdaten der verbleibenden 14 Kandidaten ergab vorwiegend Faktoren aus der Zellwandorganisation, -biosynthese, -integrität und der PKC-MAPKinase Signalkaskade (siehe Anhang: 7.1).

3.4.1 Identifikation von Genen, die für die Suppression des konditional letalen Phänotyps von *yta10^{ts}Δyme1* verantwortlich sind

Um zu untersuchen, welche Gene in den 14 isolierten Plasmidgruppen für die Suppression von *yta10^{ts}Δyme1* verantwortlich waren, wurde jedes dieser Gene auf seine Suppressionsfähigkeit überprüft. Dazu wurden die einzelnen Gene der 14 Plasmidgruppen über die Hefeexpressionsvektoren pJDcex2 (mit einem kupferinduzierten Promotor) bzw. pVTU100 (mit dem Promotor der Alkoholdehydrogenase ADHp) in der konditional letalen Hefemutante *yta10^{ts}Δyme1* exprimiert und unter restriktiven Wachstumsbedingungen auf ihre Suppressionsfähigkeit untersucht. Während die Vektorkontrollen (*yta10^{ts}Δyme1* + YEp13, *yta10^{ts}Δyme1* + pJDcex2 bzw. *yta10^{ts}Δyme1* + pVTU100) kein Wachstum bei 37°C zeigten, konnte die Expression von *SYP1*, *MID2*, *MKK1*, *ROM2*, *WSC1* und *MGE1* das Wachstum bei nicht permissiver Temperatur auf YPD-Medium wiederherstellen und damit die synthetische Letalität von *yta10^{ts}Δyme1* supprimieren (Abb. 13). Hierbei war die Komplementationseffizienz der identifizierten Suppressoren in *yta10^{ts}Δyme1* mit dem Wachstum von Wildtypzellen, die die Gene *SYP1*, *MID2*, *MKK1*, *ROM2*, *WSC1* bzw. *MGE1* exprimierten, vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Die externen Zellwandsensoren Mid2 und Wsc1 (Jacoby *et al.*, 1998; de Bettignies *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999), der GDP/GTP Austauschfaktor Rom2 (Gray *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998; Philip und Levin, 2001) und die MAPKinasekinase Mkk1 (Irie *et al.*, 1993) sind Komponenten der PKC-MAPKinase Signalkaskade. Diese Signalkaskade reguliert über die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren die Synthese von Zellwandkomponenten und ist damit an der Aufrechterhaltung der Zellintegrität beteiligt (Heinisch *et al.*, 1999). Syp1 wurde ebenfalls in einem genomischen Suppressorscreen identifiziert. Die Überexpression dieses Proteins ermöglicht es der Zelle, spezifische Phänotypen von PKC-MAPKinase Mutationen zu unterdrücken (Marcoux *et al.*, 1998).

Neben Komponenten der PKC-MAPKinase Signalkaskade konnte auch die Expression von *MGE1*, das ein matrixlokalisiertes Co-Chaperon kodiert (Westermann *et al.*, 1995), den synthetisch letalen Effekt von *yta10^{Δs}Δyme1* bei 37°C supprimieren.

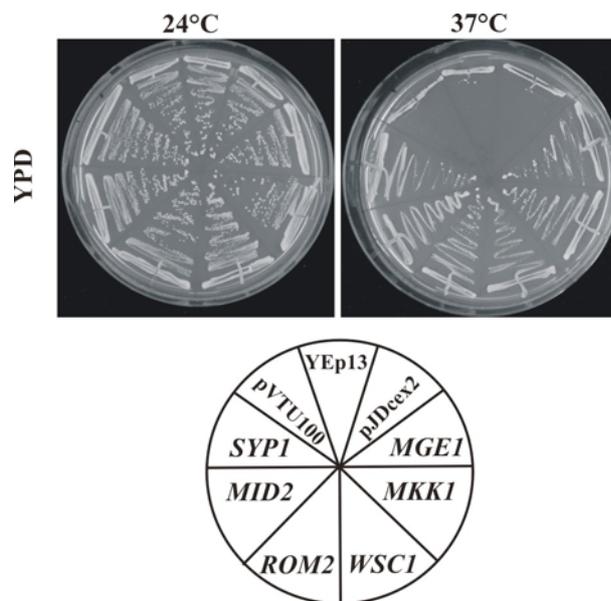


Abb. 13: Suppressoren von *yta10^{Δs}Δyme1* im Überblick.

Nach Transformation der möglichen Suppressorkandidaten in *yta10^{Δs}Δyme1* und Selektion auf synthetischem Medium wurden Einzelkolonien auf Vollmedium YPD transferiert und 1 Woche bei 24°C und 37°C inkubiert. Hierbei supprimierte die Expression von fünf Komponenten der PKC-MAPKinase Signalkaskade (*SYPI*, *MID2*, *MKK1*, *ROM2*, *WSC1*) und von *MGE1*, einem Co-Chaperon aus der mitochondrialen Matrix, die Temperatursensitivität von *yta10^{Δs}Δyme1* Zellen bei 37°C. Als Negativkontrolle wurden *yta10^{Δs}Δyme1* Zellen mit leerem Vektor (pVTU100, YEpl3, pJDcex2) transformiert.

<i>Gen</i>	<i>detektiert</i>	<i>Funktion/ Suppression führt zu</i>	<i>lokalisiert</i>
<i>SYP1</i>	7x	Suppressor der Profilindeletion in Hefe (Suppressor of <u>Y</u> east <u>P</u> rofilin deletion); Überexpression führt zu abnormer Zellwanddicke	Cytoplasma
<i>MID2</i>	19x	Zelloberflächensensor; Zellintegrität; involviert in MAPKinase Signalkaskade; Signalweiterleitung an Rom2; Überexpression führt zu abnormer Zellwanddicke	Plasma- membran; integral
<i>ROM2</i>	1x	Guanin Nukleotid Austauschfaktor zur Stimulation der GTP Bindung von Rho1; Zellintegrität; PKC-MAPKinase Signalkaskade; interagiert mit Mid2	Plasma- membran; peripher
<i>WSC1</i>	1x	Transmembranrezeptor Aktivität; aktiviert Rho1; Zellwandorganisation, -biosynthese; Antwort auf Hitze und osmotischen Stress	Plasma- membran; integral
<i>MKK1</i>	1x	MAPKinasekinase; zentrale Komponente in der Siganltransduktion in der PKC-Signalkaskade	Cytoplasma
<i>MGE1</i>	1x	Co-Chaperon	mitochondriale Matrix

Tab. 2: Die gefundenen Suppressoren von *yta10^{ts}Δyme1*.

3.4.2 Die Überexpression von *MID2* supprimiert die Mutationen *yta10^{ts}Δyme1* und *yta10^{ts}*

Zur Klärung der Frage, ob die gefundenen Suppressoren der *yta10^{ts}Δyme1* Mutante ebenfalls die Auswirkungen der Einzelmutationen in *YTA10* bzw. *YME1* unterdrücken können, wurden die gefundenen Kandidaten *SYP2*, *MID2*, *MKK1*, *ROM2*, *WSC1* und *MGE1* sowie die entsprechenden Vektorkontrollen in die drei Hefestämme *yta10^{ts}*, *Δyta10* und *Δyme1* transformiert und auf ihre Suppressionsfähigkeit untersucht. Jedoch ließen sich die Atmungsdefekte der beiden Deletionsmutanten *Δyta10* bzw. *Δyme1* nicht durch Überexpression der Gene *SYP2*, *MID2*, *MKK1*, *ROM2*, *WSC1* und *MGE1* komplementieren (Abb. 14; 15). Hingegen führte die Überexpression von *MID2*, nicht aber die der Gene *ROM2*, *MKK1*, *WSC1* und *MGE1*, zu einer Unterdrückung des *petite* Phänotyps von *yta10^{ts}* auf YPG-Medium bei 37°C (Abb. 16).

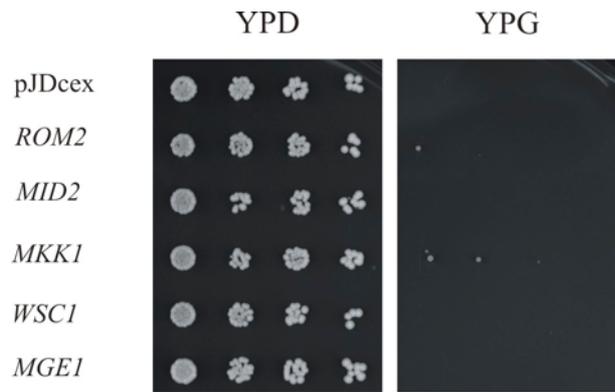


Abb. 14: Die Überexpression von *ROM2*, *MID2*, *MKK1*, *WSC1* und *MGE1* konnte den *petite* Phänotyp des Hefestammes *Δyta10* nicht komplementieren.

Zellen der Deletionsmutante *Δyta10* wurden mit den Überexpressionskonstrukten von *ROM2*-, *MID2*-, *MKK1*-, *WSC1*- und *MGE1*-pJDcex transformiert und zur Selektion auf dem synthetischen Medium SC-leu bei 30°C angezogen. Um die transformierten Zellen auf Suppression zu überprüfen, wurden jeweils 3×10^4 , 6×10^3 , 3×10^3 und 6×10^2 Zellen auf YPD- und YPG-Medium aufgetropft und für 7 Tage bei 30°C inkubiert.

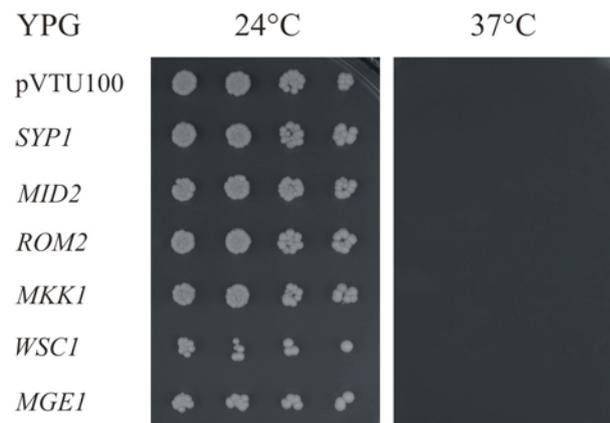


Abb. 15: Die Überexpression von *SYP1*, *MID2*, *MKK1*, *ROM2*, *WSC1* oder *MGE1* konnte kein Wachstum von *Δyme1* auf YPG-Medium bei 37°C induzieren.

Die Suppressorkandidaten *SYP1*, *MID2*, *MKK1*, *ROM2*, *WSC1* und *MGE1* wurden über den Expressionsvektor pVTU100 in der Deletionsmutante *Δyme1* exprimiert und zur Selektion auf dem synthetischem Medium SC-ura bei 30°C angezogen. Als Negativkontrolle wurde der leere Vektor pVTU100 verwendet. Zum Suppressionstest wurden jeweils 3×10^4 , 6×10^3 , 3×10^3 und 6×10^2 Zellen in einer Verdünnungsreihe auf YPG-Medium aufgetropft und für 4 Tage bei 24°C bzw. 37°C inkubiert.

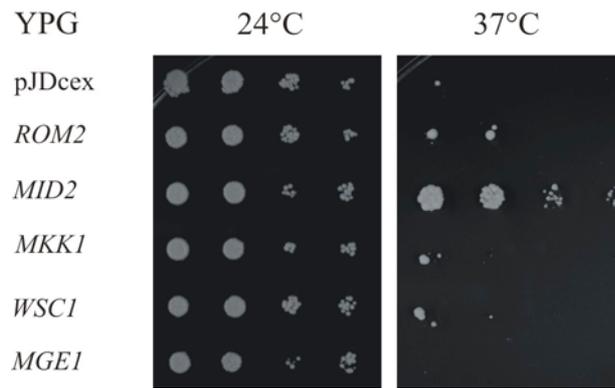


Abb. 16: Eine Suppression von *yta10^Δ* kann durch die Überexpression von *MID2* erreicht werden.

In Zellen des temperaturdefizienten Hefestammes *yta10^Δ* wurden *ROM2*, *MID2*, *MKK1*, *WSC1* und *MGE1* über den Vektor pJDcex exprimiert. Um die transformierten Zellen auf Suppression zu überprüfen, wurden, wie bereits in der Legende von 4.4.3b erläutert, Verdünnungsreihen auf YPG-Medium aufgetragen und für 7 Tage bei 24°C bzw. 37°C inkubiert.

Die hier vorliegenden Ergebnisse (siehe auch Kapitel 3.4.1) zeigen, dass nur die Temperatursensitivität einer Doppelmutante der *m*- und *i*-AAA-Protease durch die Expression der PKC-Signalkaskadenfaktoren und durch *MGE1* supprimierbar ist. Dagegen konnte keine Überexpression der hier identifizierten Kandidaten die Atmungsinkompetenz der Deletionsmutanten $\Delta yta10$ bzw. $\Delta yme1$ komplementieren. Nur die Expression des externen Zellwandsensors Mid2 ließ eine Suppression der Atmungsinkompetenz des *yta10^Δ* Stammes zu.

3.5 Die temperatursensitiven Proteasemutanten in *S. cerevisiae* besitzen charakteristische Merkmale von PKC-Mutanten

Die Überexpression verschiedener Komponenten des PKC-MAPKinase Systems supprimiert die synthetische Letalität der Doppelmutation von *yta10^Δ* $\Delta yme1$ in *S. cerevisiae*. Damit stellt sich die Frage, ob AAA-proteasedefiziente Zellen vergleichbare charakteristische Phänotypen von PKC-MAPKinase Signalkaskade-Mutanten zeigen.

Mutanten der PKC-MAPKinase Signalkaskade besitzen eine beeinträchtigte Zellintegrität, Defekte im Zellzyklus und Beeinträchtigungen in ihrem Zellwandaufbau (Heinisch *et al.*, 1999). Dadurch sind sie gegenüber bestimmten Stressfaktoren wie z.B. Temperaturerhöhung oder Koffein hypersensitiv (Gray *et al.*, 1997; de Bettignies *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999; Lorberg *et al.*, 2001). Diese Stressfaktoren verursachen verstärkt Nekrose, die durch eine Vitalfärbung mit Methylenblau nachweisbar ist (Lommel *et al.*, 2004). Ebenfalls ist durch

Zugabe von 1 M Sorbitol, einem osmotischen Stabilisator, die charakteristische Temperatursensitivität und erhöhte Letalität dieser Mutanten supprimierbar (Ketela *et al.*, 1999).

In den folgenden Experimenten wurde die Zellintegrität, Zellzyklus und Zellwandaufbau AAA-proteasedefizienter Zellen überprüft.

3.5.1 Die Hefemutante *yta10^{fs}Δyme1* ist gegen Koffein hypersensitiv

Zellen mit beeinträchtiger Zellwandintegrität, die durch ein defektes PKC-MAPKinase System verursacht werden, sind gegenüber dem Purinanalogs Koffein hypersensitiv (Gray *et al.*, 1997; de Bettignies *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999; Nierras und Warner, 1999). Bislang konnte jedoch nicht die Wirkung von Koffein auf Zellen mit beeinträchtiger Zellintegrität eindeutig geklärt werden (Schmitz *et al.*, 2001).

Hingegen ist aus Untersuchungen an Säugerzellen bekannt, dass Koffein die Aktivität von Atm (Ataxia Telongiectasia Mutated; homolog zu *TELI* in *S. cerevisiae*)- und Atr (ATM & Rad3 related; homolog zu *MEC1* in *S. cerevisiae*)-Kinasen hemmt. Atm und Atr regulieren Kontrollpunkte im Zellzyklus zwischen der G1 und S Phase, so dass im Falle einer Schädigung die Reparatur von DNA vor ihrer Replikation möglich wird. Koffein zeigt eine hierzu entgegengesetzte Wirkung: Durch Koffein werden innerhalb des Zellzyklus DNA-Replikation und -Reparatur entkoppelt (Hall-Jackson *et al.*, 1999; Sarkaria *et al.*, 1999).

Zellen mit Störungen innerhalb der PKC-MAPKinase Signalkaskade sind in ihrem Zellzyklus beeinträchtigt (Gray *et al.*, 1997). Vermutlich verstärkt Koffein die Störungen im Ablauf des Zellzyklus in Zellen, deren Zellintegrität bereits geschädigt ist.

Sollten die mitochondrialen Proteolysemutanten ebenfalls stark sensitiv auf die Zugabe von Koffein reagieren, wäre dies ein Indiz, dass auch AAA-proteasedefiziente Zellen in ihrer Zellintegrität gestört sind (Abb. 17). Hierzu wurden das Wachstum AAA-protease-defizienter Zellen in Anwesenheit von Koffein in einem Konzentrationsanstieg von 0 mM auf 10 mM getestet.

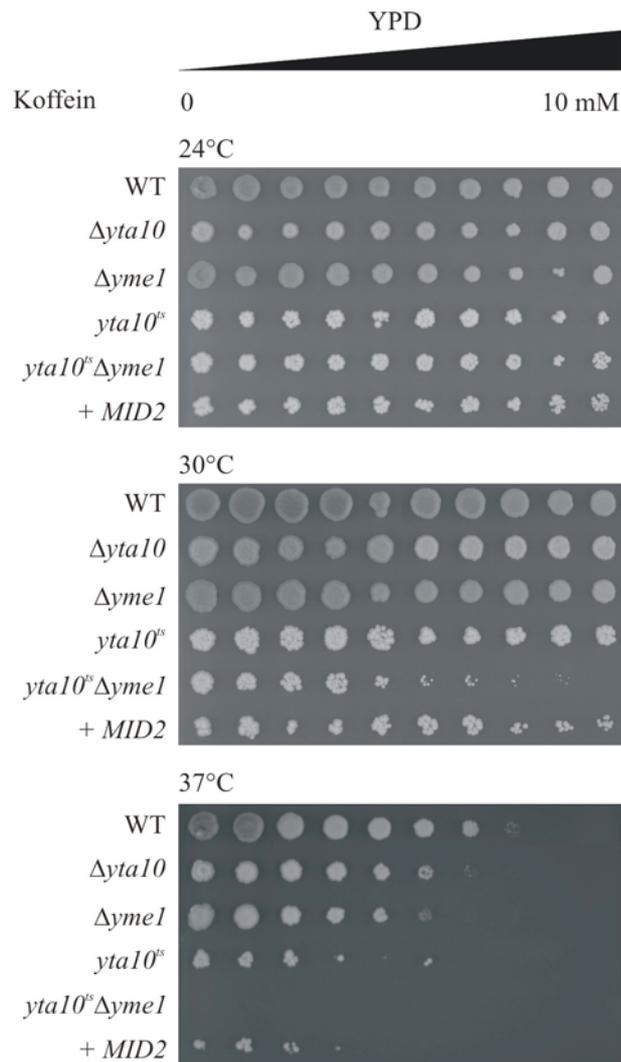


Abb. 17: Koffein verstärkt die synthetische Letalität von $yta10^{ts}\Delta yme1$; diese kann aber mit einer zusätzlichen Expression des PKC-MAPKinase Zellwandsensors *MID2* supprimiert werden.

Jeweils 3×10^4 Zellen der Hefestämme Wildtyp W303-1A, $\Delta yta10$, $\Delta yme1$, $yta10^{ts}$ (YSW8), $yta10^{ts}\Delta yme1$ und $yta10^{ts}\Delta yme1$ mit zusätzlich exprimiertem *MID2* (+*MID2*) wurden auf YPD-Medium aufgebracht. Dieses Vollmedium enthielt zusätzlich einen Koffeingradienten, der von 0 mM auf 10 mM anstieg. Die Zellen wurden für 5 Tage bei 24°C, 30°C und 37°C inkubiert.

Ansteigende Koffeinkonzentrationen lösten bei Hefen mit eingeschränkter Proteolyse auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle bei permissiver Temperatur von 24°C keine erkennbaren Änderungen des Wachstumsphänotyps aus. Wurde die Temperatur jedoch auf 30°C erhöht, verursachte die steigende Koffeinkonzentration in $yta10^{ts}\Delta yme1$ Letalität. Die gleichzeitige Überexpression von *MID2* ließ diese Mutante jedoch unter sonst gleichen Bedingungen gegenüber Koffein resistent werden. Koffein hatte unter diesen Wachstumsbedingungen keinen erkennbaren Einfluss auf das Wachstum der Einzelmutanten $yta10^{ts}$, $\Delta yta10$ und $\Delta yme1$. Wurde die Temperatur aber auf 37°C erhöht, zeigten $yta10^{ts}$ und sogar die

Deletionsstämme $\Delta yta10$ und $\Delta yme1$ ein temperatursensitives Wachstum. Die Überexpression von *MID2* im Hefestamm $yta10^{fs}\Delta yme1$ konnte das Wachstum in Gegenwart von Koffein partiell wiederherstellen. Des weiteren wurden die proteolytisch defekten Stämme auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle auf ihre Koffeinsensitivität hin untersucht (Abb. 18).

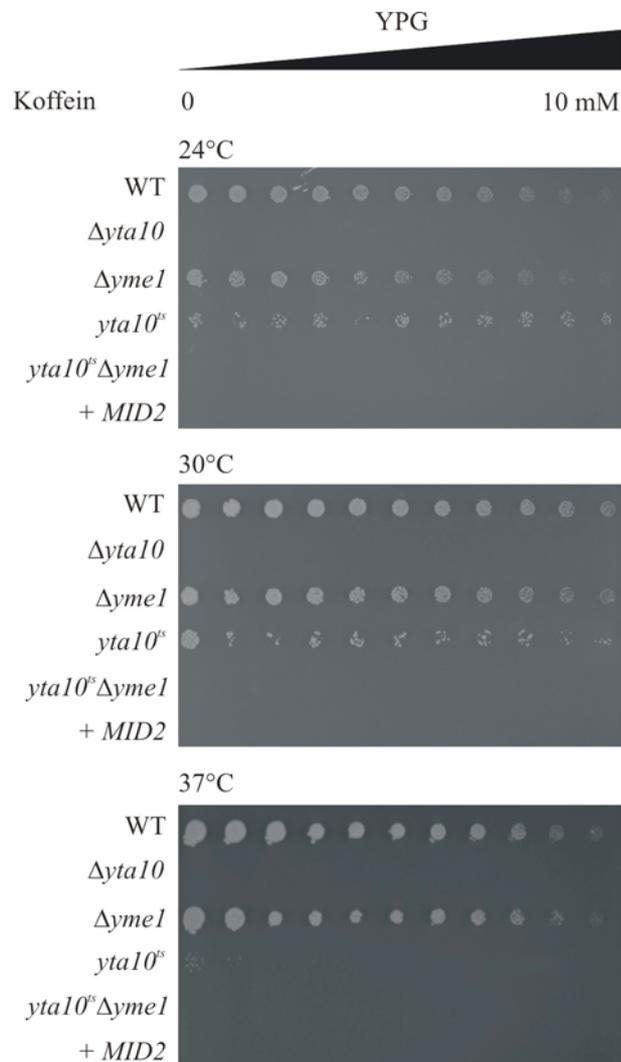


Abb. 18: Die Einzelmutante $yta10^{fs}$ reagiert bereits bei nichtrestriktiver Temperatur von 30°C stark sensitiv auf Koffein.

Wie in 4.5.1.a beschrieben wurden die Zellen der Hefestämme Wildtyp W303-1A, $\Delta yta10$, $\Delta yme1$, $yta10^{fs}$, $yta10^{fs}\Delta yme1$ und $yta10^{fs}\Delta yme1$ mit zusätzlich exprimiertem Mid2 (+*MID2*) ebenfalls auf nicht fermentierbarem YPG-Medium mit ansteigender Koffeinkonzentration auf ihr Wachstum hin untersucht. Die Zellen wurden für 7 Tage bei 24°C, 30°C und 37°C inkubiert.

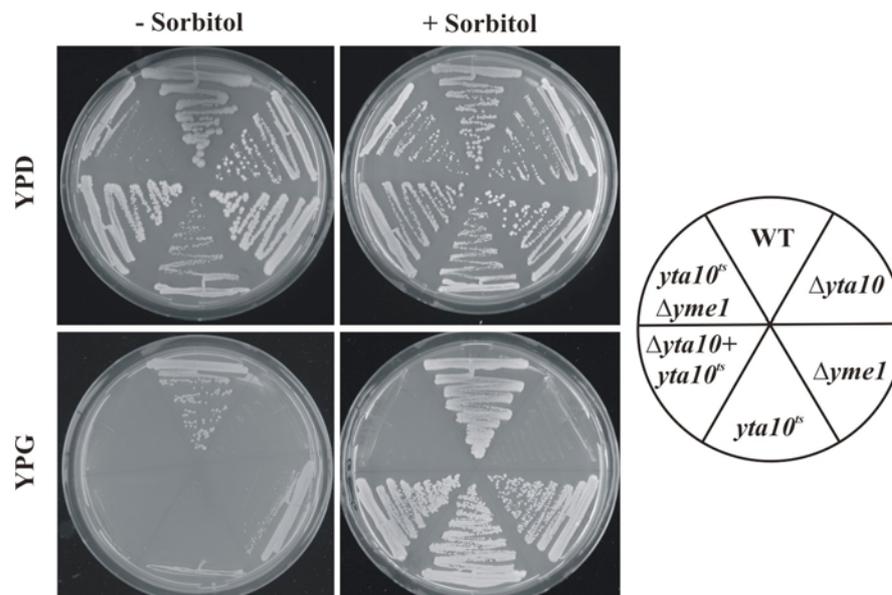
Auf dem Hefemedium YPG zeigte $\Delta yme1$ keine temperaturabhängige Hypersensitivität gegenüber Koffein. Aufgrund der fehlenden Atmungsfähigkeit konnte die Negativkontrolle $\Delta yta10$ nicht auf YPG-Medium mit der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin

wachsen und dementsprechend nicht auf Koffeinsensibilisierung überprüft werden. Die temperaturabhängige *m*-AAA-Proteasenmutante *yta10^{ts}* war sensitiv gegenüber Koffein auf YPG-Medium bei einer Temperatur von 30°C.

Die Tatsache, dass zum einen AAA-proteasedefiziente Hefestämme gegenüber Koffein hypersensitiv waren und zum anderen, dass diese Hypersensitivität von *yta10^{ts}Δyme1* durch die Überexpression einer PKC-Komponente partiell unterdrückt werden konnte, war ein weiteres Indiz für eine Verbindung zwischen mitochondrialer Proteinqualitätskontrolle und Zellintegrität. Ebenfalls ließ sich nach einer verlängerten Inkubationszeit die Temperatursensitivität von *Δyme1* auf der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle (Thorsness und Fox, 1993; Thorsness *et al.*, 1993) nicht mehr beobachten. Offenbar waren die Zellen an die höheren Temperaturen adaptiert.

3.5.2 Gestörte Zellintegrität der proteolytisch defizienten Hefemutanten

Das Zellwachstum verschiedener *S. cerevisiae* Mutanten mit defekter Zellintegrität und defektem Zellwandaufbau war unter hyperosmotischen Bedingungen verbessert (Ketela *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2004). Sollte die verminderte Temperaturtoleranz der *yta10^{ts}* Mutanten auf eine beeinträchtigte Zellintegrität zurückzuführen sein, dann müsste durch die Zugabe eines osmotischen Stabilisators, wie z.B. Sorbitol, das Wachstum bei restriktiven Wachstumsbedingungen wiederhergestellt werden können (Abb. 19).



Abbildungslegende auf der nächsten Seite

Abb. 19: Wachstumsvergleich AAA-proteasedefizienter Zellen in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von Sorbitol.

Zellen der Stämme WT W303-1A, *yta10^{ts}*, $\Delta yta10 + yta10^{ts}$, *yta10^{ts}Δyme1*, $\Delta yta10$ und $\Delta yme1$ wurden auf YPD +/- 1M Sorbitol bzw. YPG +/- 1M Sorbitol ausgestrichen und 4 Tage bei 37°C inkubiert.

Wie aus Abb. 19 ersichtlich, konnte die Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* bei einer Temperatur von 37°C wachsen, wenn 1 M Sorbitol zum Medium YPD zugegeben worden war. Sorbitol hatte ebenfalls einen stabilisierenden Effekt auf die Mutanten $\Delta yta10 + yta10^{ts}$, *yta10^{ts}* und $\Delta yme1$. Nach Zugabe des osmotischen Stabilisators wuchsen die respiratorisch defizienten Stämme auf dem nicht fermentierbaren Medium YPG. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen hatte Sorbitol keinen Effekt auf das Wachstum der Deletionsmutante $\Delta yta10$. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich nur bestimmte Defekte der AAA-Proteasen durch Sorbitol reprimieren ließen.

Defekte in der Zellintegrität sind häufig Ursache für eine erhöhte Rate an Zell-Lyse. Zum Nachweis wurden die verwendeten Hefestämme auf YPD Platten aufgetragen und nach 24 Stunden von 24°C auf 37°C transferiert. Lysierende Zellen können nach einer solchen Temperaturinduktion mit einer Vitalfärbung durch Methyleneblau *in vivo* nachgewiesen werden (Santos und Snyder, 2000; Young *et al.*, 2002). Während bei restriktiver Temperatur der Stamm *yta10^{ts}* kaum Blaufärbung und damit keine zell-lytischen Prozesse aufwies, war eine deutliche Lyse der Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* detektierbar. Wurde jedoch der externe Zellwandsensor des PKC Weges, *MID2*, zusätzlich in *yta10^{ts}Δyme1* exprimiert, fand keine Zell-Lyse statt (Abb. 20). Zur Kontrolle wurden Deletionsmutanten der PKC-MAPKinase Signalkaskade $\Delta mid2$ und $\Delta bck1$ verwendet. Diese Zellen besitzen eine stark eingeschränkte Zellintegrität und lysieren bei erhöhter Temperatur. Nach Hitzeschock wurde dies durch eine Blaufärbung der Zellen sichtbar (Abb. 20). Die Zugabe von 1 M Sorbitol konnte dagegen lytische Prozesse bei 37°C verhindern. Sowohl die PKC-Mutanten $\Delta mid2$ und $\Delta bck1$ als auch die AAA-Protease Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* zeigten unter diesen Bedingungen keine temperaturabhängige Zell-Lyse.

Diese Untersuchungen zeigen, dass in Abwesenheit der AAA-Proteasen Zellen in ihrer Integrität gestört sind. Dass Zellen mit deletiertem *YTA10* sich im Gegensatz zu Zellen mit deletiertem *YME1* und Zellen mit temperatursensitivem *YTA10* Allel durch Sorbitolzugabe in ihrem Wachstum nicht beeinflussen lassen, lässt zwei Schlussfolgerungen zu: Zum einen könnte je nach Mutation ein definiertes Set mitochondrialer Funktionen ausfallen, die teilweise durch Sorbitol reprimierbar sind. Zum anderen könnte je nach Mutation die Stärke

des Defektes unterschiedlich ausfallen. Die Deletionsmutante $\Delta yta10$ müsste auf Grund der Ergebnisse am stärksten betroffen sein und konnte deshalb nicht durch die Zugabe von 1 M Sorbitol stabilisiert werden.

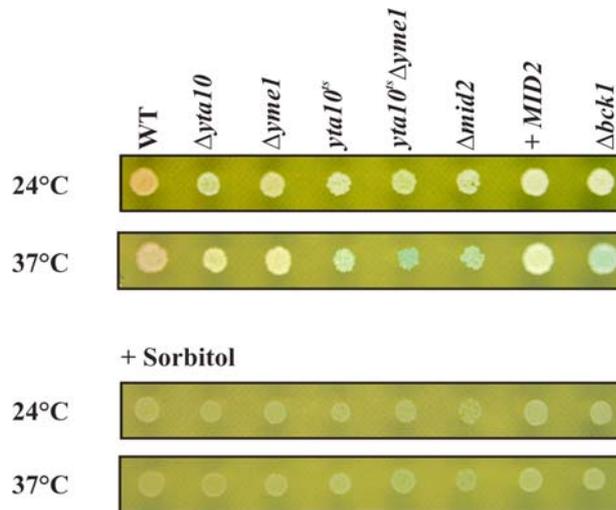


Abb. 20: Durch die Zugabe von Sorbitol können zell-lytische Prozesse in der temperatursensitiven Doppelmutante $yta10^{ts}\Delta yme1$ verhindert werden; eine Überexpression des externen Zellwandsensors des PKC Weges, *MID2*, verhindert bereits ohne diesen osmotischen Stabilisator nekrotischen Zelltod.

3×10^4 Zellen des Wildtyps W303-1A, $\Delta yta10$, $\Delta yme1$, $yta10^{ts}$, $yta10^{ts}\Delta yme1$, $\Delta mid2$, $\Delta yta10$, $yta10^{ts}\Delta yme1$ + *MID2* (+*MID2*) und $\Delta bck1$ wurden in aufeinanderfolgenden 1:5 Verdünnungsschritten auf YPD-Methylenblau (0,001 %) bzw. auf YPD-Methylenblau (0,001 %)- Sorbitol (1M) aufgetragen. Der Zell-Lyse Nachweis fand 4 Tage bei 24°C bzw. 37°C statt.

3.5.3 *Petite* Mutationen haben keinen generellen Einfluss auf die Zellintegrität

Die hier untersuchten Stämme $yta10^{ts}\Delta yme1$, $\Delta yta10 + yta10^{ts}$, $yta10^{ts}$ und $\Delta yme1$ besitzen charakteristische Züge einer PKC-MAPKinase Mutante. Daneben zeigen sie bis auf $\Delta yme1$ bei 37°C einen *petite* Phänotyp und können die nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle Glycerin als Energiequelle nicht nutzen. Darüber hinaus zeigen sie auf fermentierbarem Medium ein beeinträchtigtes Zellwachstum. Auch ließ sich beobachten, dass die Kolonien der Stämme $yta10^{ts}\Delta yme1$, $\Delta yta10 + yta10^{ts}$ und $yta10^{ts}$ verkleinert waren.

Zur Klärung der Frage, ob *petite* Mutationen generell einen Einfluss auf die Zellintegrität haben, wurde exemplarisch am Beispiel von zwei *petite* Mutanten ($\Delta cox4$, $\Delta pim1$) überprüft,

ob die Zugabe von 1 M Sorbitol zum YPG-Medium nach fünf Tagen einen stabilisierenden Effekt hatte.

Die *petite* Mutanten zeigten kein übereinstimmendes Ergebnis (Abb. 21). Während die Mutante *yta10^{ts}* sich durch Sorbitol wieder stabilisieren ließ, hatte der osmotische Stabilisator keinen positiven Einfluss auf das Wachstum der Mutanten Δcox4 und Δpim1 . Defekte in der Zellintegrität können folglich nicht als ein charakteristisches Merkmal des *petite* Phänotyps gewertet werden.

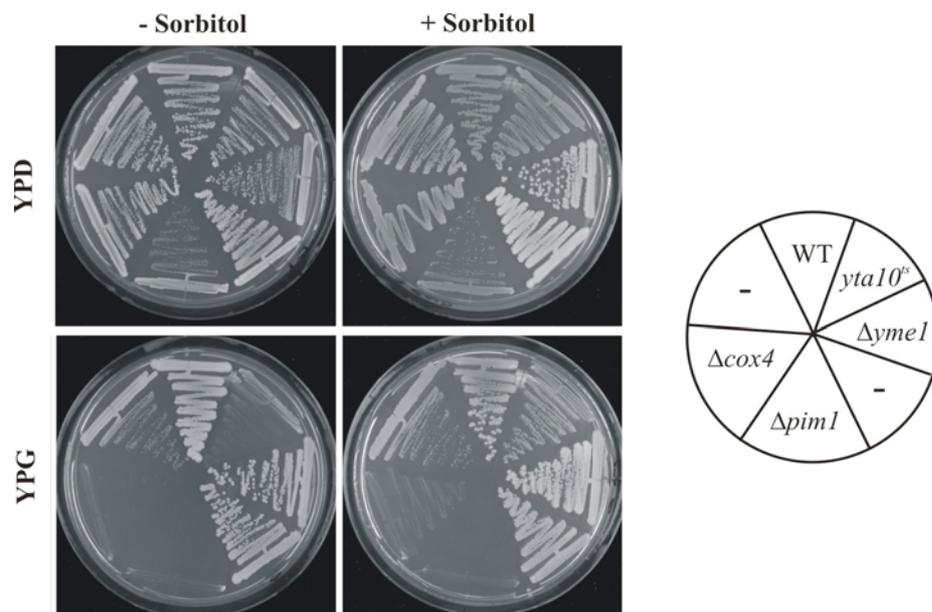


Abb. 21: *Petite* Mutanten sind nicht generell in ihrer Zellintegrität eingeschränkt.

Die Phänotypen der *petite* Mutanten (Δcox4 , Δpim1 , *yta10^{ts}*) und die der negativen *petite* Mutante Δyme1 , wurden mit dem WT W303-1A Wachstum verglichen. Dazu wurden die oben genannten Stämme auf YPD, YPD + 1M Sorbitol, YPG und YPG + 1M Sorbitol ausgestrichen und 1 Woche bei 37°C inkubiert.

3.6 Mikroskopische Untersuchungen der Zell- und Mitochondrienmorphologie

3.6.1 Einflüsse der *m*- und *i*-AAA-Protease auf den Zellzyklus und die Stabilität der Zellwand

Es stellte sich die Frage, ob sich Mutationen der *m*- und der *i*-AAA-Protease auf die Morphologie der gesamten Zelle auswirken können. Zur Überprüfung der Morphologien wurden sowohl die Stämme der Deletionsmutanten $\Delta yta10$, $\Delta yme1$ als auch deren konditional letale Mutanten $yta10^{fs}$, $\Delta yta10 + yta10^{fs}$ und $yta10^{fs}\Delta yme1$ lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 22).

Im Vergleich mit Wildtypzellen konnten deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie AAA-proteasedefizienter Zellen dokumentiert werden. Zellen der Mutationsstämme $\Delta yta10$ und $\Delta yme1$ besaßen stark vergrößerte Vakuolen. Diese Zellen hatten auch vermehrt granuläre Strukturen angehäuft. Dies ließ sich an 20 bis 30 % der hier untersuchten Zellen beobachten. Im Gegensatz zu $\Delta yta10$ wurde in $\Delta yme1$ der Effekt um so deutlicher, je restriktiver die Wachstumsbedingungen gewählt wurden und die Zellen auf ihre Atmungsfähigkeit angewiesen waren. Der veränderte Phänotyp zeigte sich auch bei permissiven Wachstumsbedingungen. Auch führte die Abwesenheit der *m*-AAA-Protease in 7 bis 9 % der lichtmikroskopisch untersuchten $\Delta yta10$ Hefezellen zu einer Vergrößerung ihrer Zellkörper.

Die konditional letalen Stämme $yta10^{fs}$ (YSW8), $\Delta yta10 + yta10^{fs}$ (YSW11) und deren Doppelmutante $yta10^{fs}\Delta yme1$ wurden in gleicher Weise lichtmikroskopisch untersucht. Sowohl eine Temperaturerhöhung von 24°C auf 37°C als auch der Wechsel von YPD- auf YPG-Medium hatten Auswirkungen auf die Zellmorphologie. Die Anzahl an Zellen mit granulären Strukturen stieg unter restriktiven Wachstumsbedingungen massiv an. Während bis zu 64 % Zellen der Einzelmutation $yta10^{fs}$ und $\Delta yta10 + yta10^{fs}$ vermehrt granuläre Strukturen und vergrößerte Vakuolen besaßen, so waren in der Doppelmutante $yta10^{fs}\Delta yme1$ 93 % von diesem Phänotyp betroffen.

Insbesondere wurden zwei weitere phänotypische Anomalien deutlich: Das Volumen von Zellen der Hefemutante $yta10^{fs}\Delta yme1$ war im Vergleich zum Wildtyp um das Vierfache vergrößert. Auch ließ sich beobachten, dass die Zellwände aufbrachen und damit die stark vergrößerten Zellen schließlich lytisch starben. Beide Effekte stiegen im Vergleich zu Wildtyphefen auf das 25- bis 30-fache an. Eine Destabilisierung der Zellwände wurde insbesondere während der Knospung sichtbar. Diese geänderte Zellmorphologie ist von Zellen mit Mutationen im PKC-MAPKinase-System bekannt. Sie arretieren im Verlauf des

Zellzyklus zwischen der G1 und S Phase, zeigen einen stark vergrößerten Zellkörper und besitzen eine destabilisierte Zellwand. Diese Defekte im Zellwandaufbau lassen sich während der Abtrennung der Tochterzellen von der Mutterzelle beobachten (Gray *et al.*, 1997; Nierras und Warner, 1999; Mazzoni *et al.*, 2005).

Damit unterstützen die lichtmikroskopischen Untersuchungen AAA-proteasedefizienter Zellen die Vorstellung, dass mitochondriale Proteasen an der Aufrechterhaltung der Zellintegrität beteiligt und damit für die Stabilität der Zellwand verantwortlich sind.

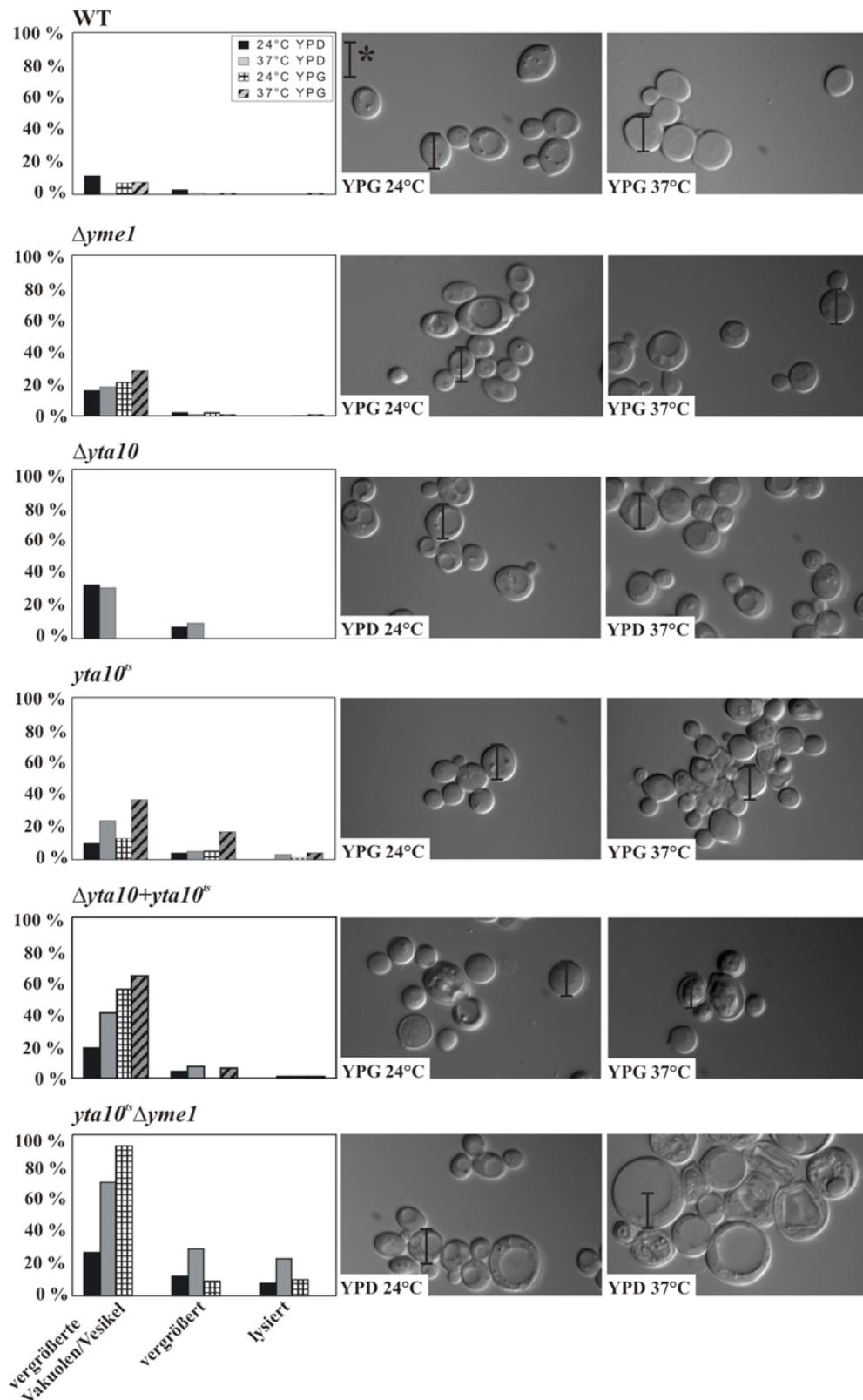


Abb. 22: Die *m*- und *i*-AAA-Proteasen beeinflussen die Zellwandstabilität, Zellgröße und vermutlich damit auch den Zellzyklus.

Zellen von *S. cerevisiae* (Wildtyp W303-1A, $\Delta yta10$, $\Delta yme1$, $yta10^s$ und $\Delta yta10 + yta10^s$ und $yta10^s\Delta yme1$) wurden über Nacht auf YPD- bzw. YPG-Medium bei 24°C oder 37°C inkubiert und lichtmikroskopisch untersucht. Zellen der Stämme $\Delta yta10$, $\Delta yme1$, $yta10^s$ und $\Delta yta10 + yta10^s$ und $yta10^s\Delta yme1$ konnten unter

restriktiven Wachstumsbedingungen nur noch ein bis zwei Teilungen vornehmen, bis sie ihr Wachstum vollständig einstellten.

Charakteristische Veränderungen wie z.B. Anhäufung von granulären Strukturen (vergrößerte Vakuolen/Vesikel), Zellvergrößerung und Aufbrechen der Zellwand (lysiert) wurden statistisch analysiert (n=200).

*: Relative Größeneinheit der Zellen bei 1000-facher Vergrößerung

3.6.2 Mutationen der *m*- und *i*-AAA-Protease verursachen eine Fragmentierung der Mitochondrien

Da die Mutationen der *m*- und *i*-AAA-Protease einen gravierenden Effekt auf die Zellmorphologie hatten, stellte sich die Frage, inwieweit die mitochondriale Morphologie durch diese Mutationen betroffen war.

Um die Organellmorphologie zu untersuchen, wurde in den hier verwendeten Stämmen ein mitochondrial-lokalisiertes grünfluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert (Westermann und Neupert, 2000), und die Zellen anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 23).

Unter den Wachstumsbedingungen YPD-Medium 24°C, 37°C und YPG-Medium 24°C formten Wildtypzellen die typischen netzwerkartigen Strukturen von Mitochondrien aus (Abb. 23). Statistische und morphologische Auswertung belegte dies für fast 90 % der Zellen. Auf YPG-Medium bei 37°C erreichten die Zellen wesentlich früher ihre stationäre Phase, die durch fragmentierte Mitochondrien charakterisiert ist. Entsprechend zeigten über 76 % der Zellen Fragmentierung (Campbell *et al.*, 1994; Yaffe, 2003).

1994 wurde bereits von Campbell *et al.* über die veränderte Morphologie der Hefemutante $\Delta yme1$ unter restriktiven Wachstumsbedingungen berichtet (Campbell *et al.*, 1994). $\Delta yme1$ zeichnet sich darin aus, dass diese Deletion zu einer temperaturabhängigen respiratorischen Inkompetenz und zu fragmentierten Mitochondrien bei 37°C führt. Dies konnte in der hier vorliegenden Arbeit verifiziert werden. Unter permissiven Wachstumsbedingungen (YPD- bzw. YPG-Medium bei 24°C) konnten 49 bzw. 71 % der ausgezählten Zellen ein mitochondriales Netzwerk ausbilden. Wurde die Wachstumstemperatur auf 37°C erhöht, veränderte sich deutlich die Morphologie, bevor die Zellen ihr Wachstum einstellten. Nahezu 76 % der analysierten Zellen waren nicht mehr in der Lage, ein mitochondriales Netzwerk zu bilden. Stattdessen fragmentierten die entsprechenden Mitochondrien. Mitochondriale Lyse fand jedoch nur zu einem geringen Anteil statt (max. 8 %).

Der Stamm $\Delta yta10$ erlaubte aufgrund seines *petite* Phänotyps nur eine morphologische Untersuchung nach Wachstum auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Sowohl bei 24°C als

auch bei 37°C auf YPD-Medium waren *S. cerevisiae* Zellen des Stammes $\Delta yta10$ zum Ausformen von tubulären, mitochondrialen Netzwerken nicht in der Lage. Dies wurde bislang nicht in anderen Arbeiten wie z.B. zur Suche von Hefemutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie nachgewiesen (Altmann und Westermann, 2005). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in über 89 % der hier analysierten Zellen die Mitochondrien fragmentiert waren.

Des weiteren sollte geklärt werden, welche Morphologien in den temperatursensitiven Stämmen vorzufinden waren. Es wurde sowohl der Stamm $yta10^{ts}$ als auch $\Delta yta10 + yta10^{ts}$ fluoreszenzmikroskopisch untersucht und deren Phänotypen statistisch verifiziert. In beiden Stämmen zeigte sich folgende übereinstimmende Tendenz: Während bei 24°C auf dem Vollmedium YPD mit der fermentierbaren Glucose die Zellen noch zu einem hohen Prozentsatz in der Lage waren, ein tubuläres Netzwerk an Mitochondrien auszubilden ($yta10^{ts}$: 41 % und $\Delta yta10 + yta10^{ts}$: >53 %), erhöhte sich die Tendenz zur Fragmentierung, sobald restriktivere Wachstumsbedingungen gewählt wurden. Zum einen fragmentierten die Mitochondrien bei einem Temperaturwechsel auf 37°C ($yta10^{ts}$: 72 % und $\Delta yta10 + yta10^{ts}$: 80 %) und zum anderen fanden sich zu 18 bis 29 % lysierte Mitochondrien. Der Effekt trat sowohl bei 24°C als auch bei 37°C auf der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle YPG deutlicher hervor. In über 90 % der Zellen beider Stämme neigten die Mitochondrien zur Fragmentierung, während in den restlichen 10 % der Zellen Lyse der Mitochondrien stattfand. Die Doppelmutante $yta10^{ts} \Delta yme1$ machte die mitochondriale Anomalie von Mitochondrien unter restriktiven Wachstumsbedingungen noch deutlicher. Während unter permissiver Temperatur auf YPD-Medium über 30 % der Zellen mit tubulärem Netzwerk vorzufinden waren, neigten fast 51 % der ausgezählten Zellen zum Fragmentieren der Mitochondrien. Die verbleibenden 12 % besaßen keine Mitochondrien mehr. Ein Wechsel auf die nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle Glycerin hatte nur geringfügige Veränderungen in der Phänotypenbildung zur Folge. Über 40 % besaßen fragmentierte Mitochondrien, mehr als 58 % hingegen lysierten ihre Mitochondrien. Wurde jedoch die Temperatur auf 37°C erhöht, veränderte sich die Morphologie auf YPD-Medium dramatisch. Es war keine Zelle mehr mit intaktem Netzwerk vorzufinden. In fast allen Zellen waren die Mitochondrien komplett lysiert.

Zusammenfassend ergibt sich folgender Ablauf im Entstehen der hier vorgefundenen Phänotypen: Unter permissiven Wachstumsbedingungen sind die Mutanten der *m*- und *i*-AAA-Protease in der Lage, ein tubuläres Mitochondriennetzwerk auszubilden. Diese Zellen mit eingeschränkter Atmungsfähigkeit akkumulieren jedoch fragmentierte Mitochondrien

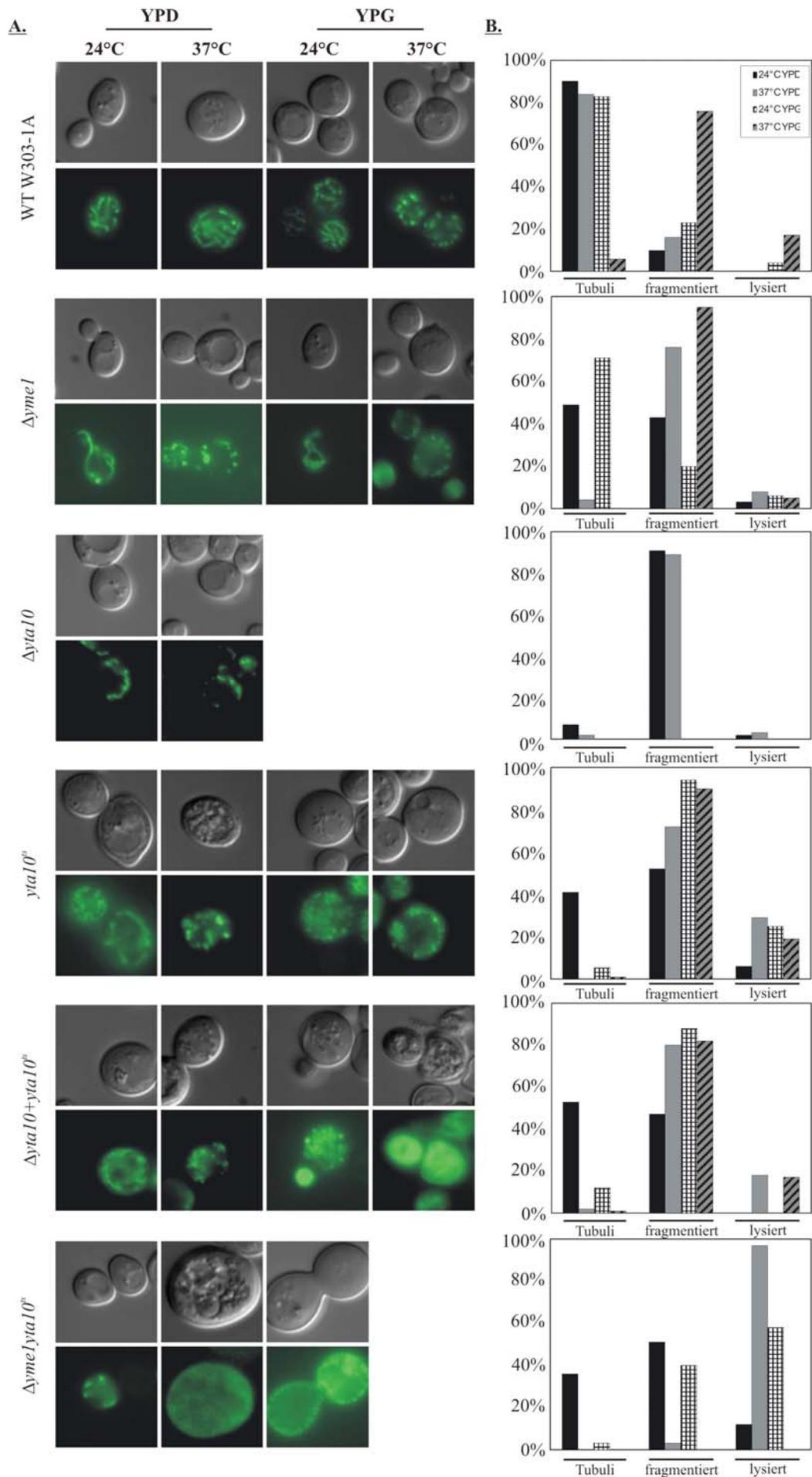
unter restriktiven Wachstumsbedingungen. Wird der Selektionsdruck weiter erhöht, sind sie nicht mehr in der Lage, ihre mitochondriale Morphologie beizubehalten. Unter diesen restriktiven Wachstumsbedingungen kommt es schließlich nach ein bis zwei Zellteilungen zur Nekrose (siehe Kapitel 3.3).

Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Morphologie nach Inkubation unter restriktiven und nicht restriktiven Wachstumsbedingungen.

Um die mitochondriale Morphologie genauer untersuchen zu können, wurden Zellen von *S. cerevisiae* (Wildtyp W303-1A, $\Delta yta10$, $\Delta yme1$, $yta10^{ts}$ (YSW8) und $\Delta yta10 + yta10^{ts}$ (YSW11) und $yta10^{ts}\Delta yme1$) mit dem Konstrukt pYX142 mtGFP transformiert, so dass sie das mitochondrial-lokalisierte, grünfluoreszierende Protein (GFP) exprimierten. Diese Zellen wurden für 12 Stunden auf YPD- bzw. YPG-Medium bei 24°C oder 37°C inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Charakteristische mitochondriale Morphologie, wie z.B. tubuläres Netzwerk, Fragmentierung oder Lyse wurden statistisch ausgewertet (n=100).

Abbildung 23 siehe nächste Seite



3.6.3 Hypoosmotische Bedingungen induzieren die Fragmentierung von Mitochondrien der *m*- und *i*-AAA-Protease Mutanten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Gegenwart von Sorbitol die Atmungskompetenz von *yta10^{ts}*, $\Delta yta10 + yta10^{ts}$ und *yta10^{ts} $\Delta yme1$* aufrecht erhalten wird. Eine zusätzliche Vitalfärbung mit Methyleneblau hatte gezeigt, dass durch die Zugabe von Sorbitol nekrotische Prozesse in *yta10^{ts} $\Delta yme1$* Zellen gestoppt werden können (siehe Kapitel 3.5.2).

Um zu untersuchen, ob Sorbitol auch die mitochondriale Morphologie in diesen Zellen beeinflussen konnte, wurden bei 37°C Zellen der Stämme $\Delta yme1$, *yta10^{ts}* und $\Delta yta10 + yta10^{ts}$ auf YPG-Medium und *yta10^{ts} $\Delta yme1$* auf YPD-Medium entweder in Gegenwart oder in Abwesenheit von Sorbitol angezogen.

Zur mikroskopischen Analyse von Mitochondrien wurden die angezogenen Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker green FM[®] (invitrogen[™]) behandelt. Nach Anfärben der Mitochondrien mit diesem Fluoreszenzfarbstoff wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 24). Thiolproteine bzw. Thiolpeptide in den mitochondrialen Membranen können durch den Farbstoff, der im Cytoplasma oxidiert wurde, gebunden werden und fluoreszieren. Dieser Fluoreszenzfarbstoff färbt hierbei Mitochondrien unabhängig von ihrem Membranpotential an.

Auch unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Mitotracker green zeigten Zellen der Stämme $\Delta yme1$, *yta10^{ts}* und $\Delta yta10 + yta10^{ts}$ Zellen, die auf YPD-Medium bei 37°C angezogen worden waren, fragmentierte Mitochondrien. Ebenso konnte der lytische Phänotyp von *yta10^{ts} $\Delta yme1$* auf YPD-Medium bei 37°C wieder beobachtet werden.

Auch die Färbung mit dem fluoreszierenden Mitotracker green zeigte, dass Sorbitol die Morphologie von $\Delta yme1$, *yta10^{ts}* und $\Delta yta10 + yta10^{ts}$ auf YPG-Medium und *yta10^{ts} $\Delta yme1$* auf YPD-Medium bei 37°C partiell wieder herstellen konnte. In allen Mutantenstämmen konnten sich wieder tubuläre Mitochondriennetzwerke ausbilden.

Durch den positiven Einfluss von Sorbitol auf die äußere Zellwand konnte offenbar auch der Abbau von Mitochondrien verhindert werden. Sorbitol konnte indirekt Mutationen der *m*- und *i*-AAA-Protease supprimieren, indem zell-lytische Prozesse inhibiert wurden.

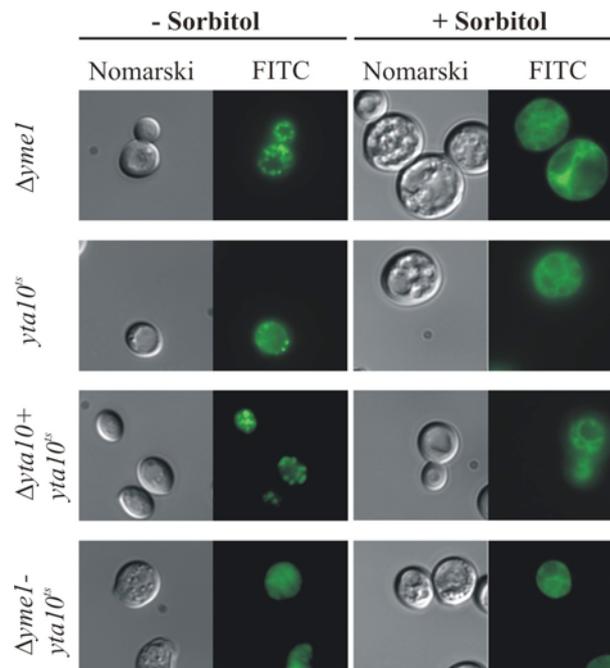


Abb. 24: Einfluss von Sorbitol auf die Fragmentierung von Mitochondrien der *m*- und *i*-AAA-Proteasemutanten unter restriktiven Wachstumsbedingungen.

Um die mitochondriale Morphologie fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können, wurden Zellen von *S. cerevisiae* ($\Delta yme1$, $yta10^{\Delta s}$, $\Delta yta10 + yta10^{\Delta s}$ und $yta10^{\Delta s} \Delta yme1$) mit dem mitochondrial-lokalisierten, membranpotential unabhängigen Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker green (500 nM) für 15 Minuten angefärbt, nachdem die Zellen 7 Tage unter restriktiven Wachstumsbedingungen in An- bzw. Abwesenheit von 1 M Sorbitol angezogen worden waren.

3.6.4 Die Fragmentierung von Mitochondrien ist kein weiteres phänotypisches Charakteristikum von *petite* Mutanten

In den oben beschriebenen mikroskopischen Studien deutete einiges darauf hin, dass Mutationen der *m*- und *i*-AAA-Proteasen unter bestimmten Wachstumsbedingungen charakteristische Morphologieveränderungen innerhalb der Zelle, aber auch innerhalb der Mitochondrienstruktur verursachen. Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob die Fragmentierung von Mitochondrien ein spezifisches Mutationsmerkmal AAA-proteasedefizienter Zellen oder ein Charakteristikum von *petite* Mutanten ist. Dazu wurden die mitochondrialen Strukturen der *petite* Mutanten $\Delta cox4$, $\Delta pim1$ und $\Delta yta12$ mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker green angefärbt, mikroskopisch untersucht und mit der Struktur von $\Delta yta10$ Mitochondrien verglichen (Abb. 25).

Nach Wachstum auf YPD-Medium bei 24°C bildeten die hier untersuchten *petite* Mutanten $\Delta cox4$, $\Delta pim1$ und $\Delta yta12$ tubuläre Netzwerke von Mitochondrien aus. Im Unterschied dazu

fragmentierten GFP-fluoreszierende Mitochondrien von $\Delta yta10$ schon unter dieser Wachstumsbedingung. Wurde die Wachstumstemperatur jedoch auf 37°C erhöht, trat in einigen *petite* Mutanten ein Temperatureffekt zum Vorschein: Die Mitotracker green gefärbten Mitochondrien der Stämme $\Delta cox4$ und $\Delta yta12$ waren wie die GFP-fluoreszierenden Mitochondrien von $\Delta yta10$ fragmentiert. Zellen der *petite* Mutante $\Delta pim1$ waren jedoch bei höheren Temperaturen noch in der Lage, tubuläre Mitochondrien auszubilden. Damit ließ sich nachweisen, dass *petite* Mutationen nicht generell zu einer veränderten Morphologie führen.

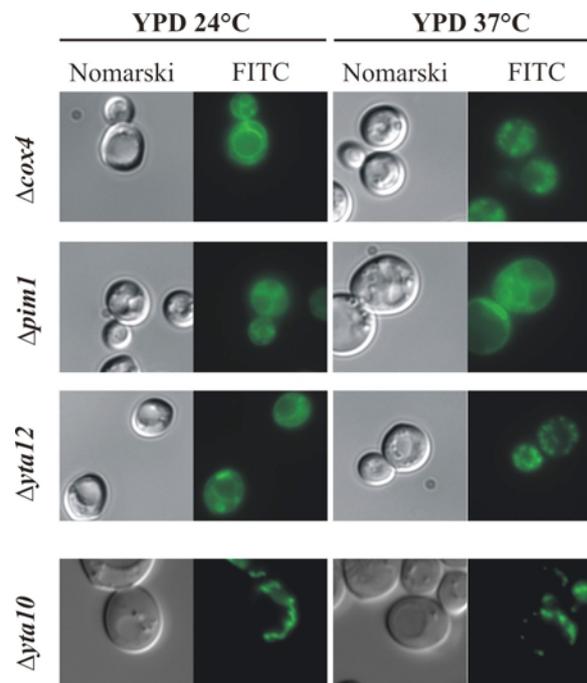


Abb. 25: Charakterisierung der mitochondrialen Morphologie von *petite* Mutanten $\Delta cox4$, $\Delta pim1$, $\Delta yta12$ und $\Delta yta10$.

Nach einer 12-stündigen Inkubationszeit auf YPD-Medium bei 24°C und 37°C wurden die Mitochondrien der Stämme $\Delta cox4$, $\Delta pim1$ und $\Delta yta12$ mit dem grünfluoreszierendem Farbstoff Mitotracker green FM[®] angefärbt; es erfolgte anschließend die mitochondriale Morphologieanalyse. Zellen der Mutante $\Delta yta10$ waren in der Lage bereits ohne Färbung mitochondrial zu fluoreszieren, da sie mit dem Konstrukt pYX142 mtGFP transformiert worden waren. Diese Zellen wurden ebenfalls für 12 Stunden auf YPD bei 24°C bzw. 37°C inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3.7 Die Bedeutung der Transmembrandomänen für die Funktion der *m*-AAA-Protease

Die *m*-AAA-Protease in der inneren Mitochondrienmembran übt zwei unterschiedliche Funktionen aus. Zum einen ist sie für die Proteinqualitätskontrolle verantwortlich, in der fehlgefaltete Proteine abgebaut werden (Leonhard *et al.*, 2000), und zum anderen besitzt sie eine regulatorische Aufgabe im Bereich der mitochondrialen Translation (Nolden *et al.*, 2005). Sie prozessiert das Vorläuferprotein MrpL32, das eine Komponente der großen ribosomalen Untereinheit darstellt und übt damit Einfluss auf die Biogenese von Atmungskettenkomplexen aus (Nolden *et al.*, 2005). Verschiedene Kristallstrukturanalysen belegen, dass Vertreter der AAA⁺-Superfamilie oligomere, häufig hexamere ringförmige Komplexe ausbilden (Liu *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). In einer solchen assemblierten Form entstehen Mikrokompimente, die eine abgeschirmte Proteolyse ermöglichen (Lupas *et al.*, 1997; Sauer *et al.*, 2004). Obwohl dies bereits an der Protease ClpP (Wang *et al.*, 1997) und dem 20S Proteasom (Löwe *et al.*, 1995; Coux *et al.*, 1996) gezeigt werden konnte, ließ sich dies bislang nicht an den AAA-Proteasen der inneren Mitochondrienmembran zeigen. Bislang ließ sich nur indirekt nachweisen, dass auch die Untereinheiten der *m*-AAA-Protease Yta10 und Yta12 zu einem hexameren Oligokomplex assoziiert sind und demzufolge auch eine von der Umwelt abgeschirmte Proteolyse ermöglichen. Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welche Rolle die Transmembrandomänen von Untereinheiten der *m*-AAA-Protease während der Proteolyse ausüben. Um darüber Aufschluss zu erhalten, wurden Transmembrandomänen der *m*-AAA-Proteaseuntereinheiten deletiert (Abb. 26AB), und anschließend die noch vorhandenen Matrixdomänen auf ihre Funktionalität innerhalb der Zellen untersucht. Auch wurde überprüft, welchen Effekt die Deletion auf die Biogenese der Atmungskettenkomplexe und damit auf die respiratorische Kompetenz hatte. Diesen Experimenten folgten Untersuchungen an der N-terminal verkürzten Matrixdomäne, d.h. der Komplexbildung der *m*-AAA-Proteaseuntereinheiten, ATPase-Aktivität und katalytische Aktivität.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob das Fehlen der Transmembrandomäne einer *m*-AAA-Proteaseuntereinheit die proteolytischen Fähigkeiten beeinträchtigte. Dabei wurde spezifisch der Abbau von integralen, frei löslichen und peripher assoziierten Proteinen innerhalb der mutierten Mitochondrien verfolgt, um über die Funktion der Transmembrandomäne weitere Informationen zu erhalten.

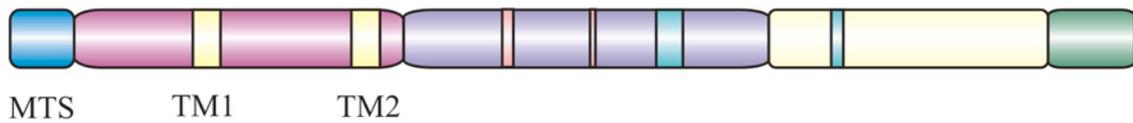
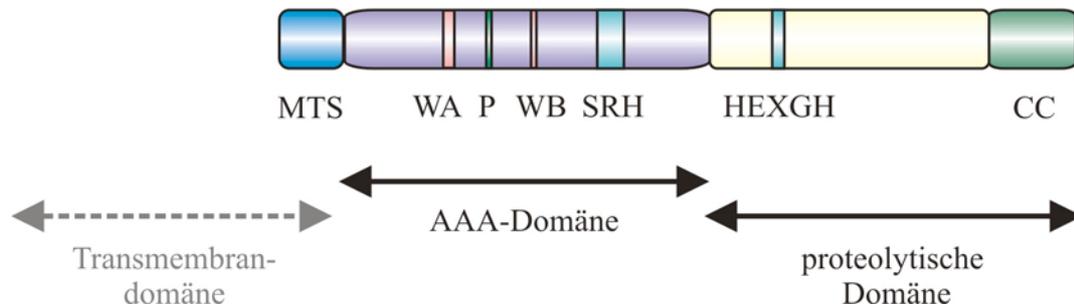
Yta10 bzw. Yta12:**Yta10 Δ TM bzw. Yta12 Δ TM:**

Abb. 26A: Domänenstruktur der Wildtypproteine Yta10 bzw. Yta12 (oben) und der N-terminal verkürzten Proteine Yta10 Δ TM bzw. Yta12 Δ TM, die über keine eigene Transmembrandomäne verfügen (unten).

MSS, mitochondriales Sortierungssignal, TM, Transmembran; AAA, ATPase-Domäne; WA, Walker A-Motiv; P, Pore; WB, Walker B-Motiv; SRH, „second region of homology“; HEXGH, konservierte Metallbindestelle; CC, „coiled-coil“-Region.

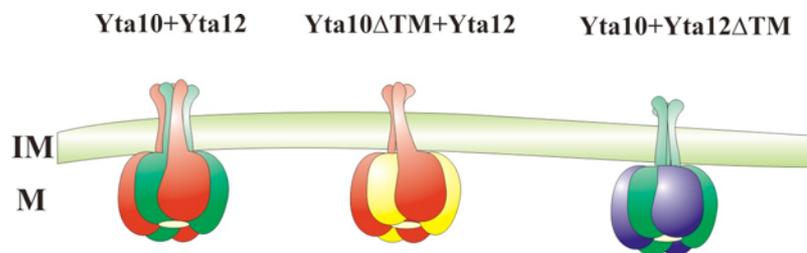


Abb. 26B: Grafische Darstellung der Wildtyp *m*-AAA-Protease (Yta10+Yta12) und der hier verwendeten Varianten, deren Untereinheit Yta10 bzw. Yta12 über keine eigene Transmembrandomäne verfügen (Yta10 Δ TM+Yta12 bzw. Yta10+ Yta12 Δ TM).

IM, innere Mitochondrienmembran; M, Matrix.

3.7.1 Die Überexpression der entsprechenden Matrixdomäne komplementiert den *petite* Phänotyp der Deletionsmutante von *YTA10* bzw. *YTA12*

Um die Rolle der Transmembrandomäne zu charakterisieren, wurden am N-Terminus die Sequenz der beiden Transmembrandomänen von Yta10 deletiert. Dieses Deletionskonstrukt konnte entweder über den Centromer basierenden Vektor YCpLac111 mit endogenem *YTA10* Promotor (*yta10 Δ TM^c*) oder über das 2 μ -Überexpressionsplasmid YEpLac181 mit dem Promotor der Alkoholdehydrogenase (ADH1) (*yta10 Δ TM*) in Δ *yta10* Hefezellen exprimiert werden (Korbel *et al.*, 2004).

Zellen des Hefestammes Δ *yta10* zeigten erwartungsgemäß nach Transformation der Vektoren YCpLac111 bzw. YEpLac181 (Negativkontrollen) kein Wachstum auf der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle YPG (Abb. 27).

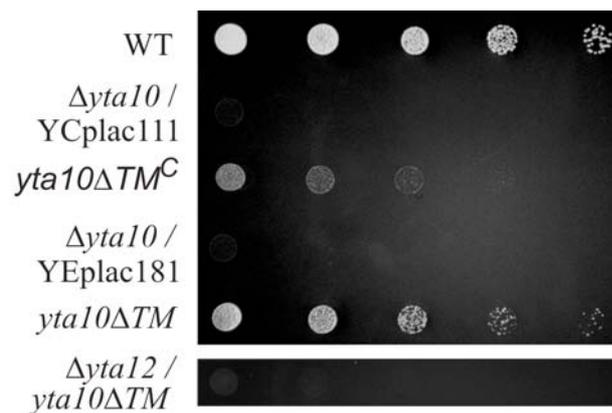


Abb. 27: Die Expression der Matrixdomäne von Yta10 kann den *petite* Phänotyp von Δ *yta10* Zellen supprimieren.

In den Zellen der Hefemutante Δ *yta10* wurde die Matrixdomäne von Yta10 exprimiert (*yta10 Δ TM^c*) bzw. überexprimiert (*yta10 Δ TM*). Deren Komplementationsfähigkeit in Δ *yta10* wurde auf YPG bei 30°C mit dem Phänotyp von Wildtyp W303-1A Hefen und Δ *yta10* mit dem Vektor (YCpLac111 bzw. YEpLac181) verglichen. Ebenso wurde die Matrixdomäne von Yta10 (*yta10 Δ TM*) in Δ *yta12* Zellen überexprimiert und auf Suppression getestet. Dazu wurden 5×10^4 Zellen in einer 1:5 Verdünnungsreihe auf YPG-Medium aufgetragen (Korbel *et al.*, 2004).

Hingegen konnte die Expression der Matrix-lokalisierten Domäne von Yta10 über das Plasmid YCpLac111 den *petite* Phänotyp von Δ *yta10* partiell komplementieren. Wurde aber *yta10 Δ TM* überexprimiert, führte dies zu einem dem Wildtyp ähnlichen Wachstum. Die Überexpression der katalytischen Domäne konnte in Δ *yta10* Hefen die Atmungsaktivität

wieder vollständig herstellen. Im Gegensatz dazu konnte eine zusätzliche Überexpression der Matrix-lokalisierten Domäne von Yta10 in den Zellen von $\Delta yta12$ ($yta10\Delta TM$) zu keinem Wachstum auf YPG-Medium führen. Diese Zellen waren weiterhin in ihrer Atmungsfähigkeit defekt.

Ebenfalls wurden die beiden Transmembrandomänen von Yta12 deletiert. Die verbleibende Matrixdomäne wurde über das 2 μ Expressionsplasmid YEpLac112 mit dem Promotor der Alkoholdehydrogenase (ADH1) in $\Delta yta12$ Hefezellen ($yta12\Delta TM$) überexprimiert. Damit konnte das Wachstum in Anwesenheit des nicht fermentierbaren Glycerins wiederhergestellt werden (Abb. 28).

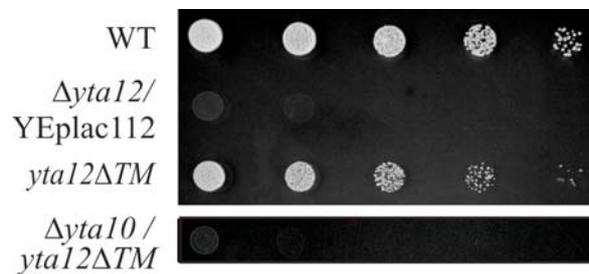


Abb. 28: Der *petite* Phänotyp von $\Delta yta12$ Zellen ist durch Expression der Matrixdomäne von Yta12 komplementierbar.

Die Matrixdomäne von Yta10 wurde in Zellen der Hefemutante $\Delta yta12$ überexprimiert ($yta12\Delta TM$). Deren Komplementationsfähigkeit wurde auf YPG-Medium bei 30°C mit dem Phänotyp von Wildtyp W303-1A Hefen und $\Delta yta12$ mit leerem Vektor (YEpLac112) verglichen. Auch hier wurden $\Delta yta10$ Zellen getestet, ob eine zusätzliche Überexpression der Matrixdomäne von YTA12 ($yta12\Delta TM$) die Atmungsdefekte supprimieren konnte. Dazu wurden 5×10^4 Zellen in einer 1:5 Verdünnungsreihe auf YPG-Medium aufgetragen (Korbel *et al.*, 2004).

Auch hier war eine Komplementation des *petite* Phänotyps von $\Delta yta10$ Zellen durch Überexpression von $yta12\Delta TM$ nicht möglich.

Als Negativkontrolle wurden $\Delta yta12$ Zellen mit dem Vektor YEpLac112 transformiert. Hefezellen, denen eine Untereinheit der *m*-AAA-Protease ($\Delta yta10$ und $\Delta yta12$) fehlte, konnten ihre Atmungskompetenz durch eine Überexpression der entsprechenden Matrixdomäne wiedererlangen; d.h. um eine intakte Biogenese der mitochondrialen Atmungskette zu gewährleisten, müssen nicht unbedingt beide Untereinheiten eine Transmembrandomäne besitzen.

Folglich stellte sich die Frage, ob die Transmembrandomänen der *m*-AAA-Protease essentiell für die Atmungsfähigkeit der Zellen sind. Sollte dies der Fall sein, so könnte eine

Überexpression der Matrixdomänen beider Untereinheiten den *petite* Phänotyp der *m*-AAA-Protease Mutante ($\Delta yta10\Delta yta12$) supprimieren (Abb. 29).



Abb. 29: Die Atmungskompetenz hängt von der Anwesenheit mindestens einer Transmembrandomäne einer *m*-AAA-Proteasenuntereinheit ab.

Die Doppeldeletionsmutante $\Delta yta10\Delta yta12$ wurde nach Überexpression von Yta10 Δ TM oder Yta12 Δ TM bzw. von beiden gemeinsam (Yta10 Δ TM Yta12 Δ TM) auf Atmungsfähigkeit überprüft. Als Wachstumskontrolle wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen von WT W303-1A auf YPG Platte aufgetropft und mit den Matrixdomänen überexprimierenden $\Delta yta10\Delta yta12$ Zellen nach 4 tägiger Inkubation bei 30°C phänotypisch untersucht.

Jedoch konnte in der Doppeldeletionsmutante $\Delta yta10\Delta yta12$ weder die Überexpression von Yta10 Δ TM oder Yta12 Δ TM noch von beiden gemeinsam (Yta10 Δ TM Yta12 Δ TM) zu dem gewünschten Komplementationeffekt führen. In allen Fällen konnten die Matrix-überexprimierenden Zellen mit dem Stammhintergrund $\Delta yta10\Delta yta12$ nicht auf YPG-Medium wachsen.

Dieses Ergebnis macht deutlich, dass mindestens eine Transmembrandomäne der *m*-AAA-Protease zur Vermittlung von Atmungskompetenz in Hefezellen nötig ist.

3.7.2 Assemblierung der mutierten *m*-AAA-Proteaseuntereinheit Yta10 Δ TM mit dem Volllängenprotein Yta12

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass ein hochmolekularer Komplex der überexprimierten Matrixdomäne (Yta10 Δ TM) mit dem Volllängenprotein der Partneruntereinheit der *m*-AAA-Protease entstanden ist. Da bereits gezeigt wurde, dass eine Assemblierung der *m*-AAA-Proteaseuntereinheiten zur proteolytischen Aktivität und damit zur Atmungskompetenz nötig

ist (Arlt *et al.*, 1996), wurde ein direkter Nachweis zur Komplexbildung von Yta10 Δ TM mit dem Volllängenprotein Yta12 mittels einer Co-Immunfällung erbracht (Korbel *et al.*, 2004).

Um die Affinität von Yta10 Δ TM zu Yta12 testen zu können, wurden Mitochondrien der Stämme Wildtyp W303-1A, Δ yta10 und yta10 Δ TM mit dem milden Detergenz Digitonin solubilisiert und die gewonnenen Präzipitate mit einem spezifischen C-terminalen Yta10 polyklonalen Antikörper inkubiert. Die Komplexanalyse erfolgte anschließend durch Immunoblotting mit einem Yta12 spezifischen Antiserum (Abb. 30).

Yta12 konnte spezifisch in Mitochondrien von yta10 Δ TM nachgewiesen werden; somit lag eine direkte Interaktion von Yta10 Δ TM mit dem Volllängenprotein Yta12 vor. Vergleiche mit der Assemblierungseffizienz von unmutiertem Yta10 und Yta12 in WT zeigten aber auch, dass in mutierten Zellen die Transmembrandomäne verkürzter *m*-AAA-Proteaseuntereinheiten (Yta10 Δ TM) wesentlich schlechter an das Volllängenprotein Yta12 binden konnte.

Dieses Experiment ließ zwei Schlussfolgerungen zu: Zum einen ist die Transmembrandomäne für die Komplexbildung der *m*-AAA-Proteaseuntereinheiten nicht essentiell. Zum anderen wurde auch durch die reduzierte Assemblierungseffizienz von Yta12 zu einem Transmembrandomäne verkürzten Partnerprotein Yta10 Δ TM erklärbar, warum eine Komplementation des *petite* Phänotypes in Δ yta10 Mitochondrien nur durch eine Überexpression der Matrixdomäne von Yta10 möglich war.

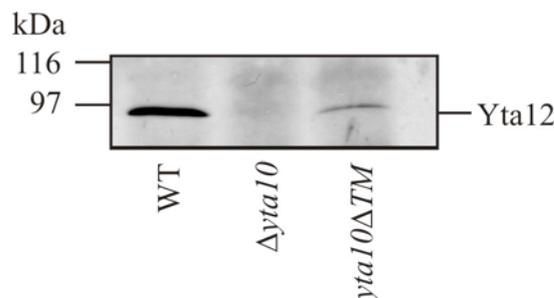


Abb. 30: Co-Immunofällung von Yta12 mit der überexprimierten Matrixdomäne von Yta10 (Yta10 Δ TM).

Nach erfolgter Solubilisierung der Mitochondrien aus Wildtyp W303-1A, Δ yta10 und yta10 Δ TM mit 1 % Digitonin wurden deren Präzipitate mit Yta10 spezifischem C- terminalen Antikörper inkubiert. Die Assemblierung wurde mit SDS-PAGE und Immunoblot mit einem gegen Yta12 gerichteten Antikörper analysiert (Korbel *et al.*, 2004).

3.7.3 Zur Aufrechterhaltung der vollen Atmungskompetenz müssen beide Untereinheiten der *m*-AAA-Protease katalytisch intakt sein

Um zu untersuchen, inwieweit die proteolytische Aktivität der *m*-AAA-Protease den Zellen von *S. cerevisiae* Atmungskompetenz vermittelt, wurde in der Metallbindestelle (HEAGH) die katalytisch aktive Aminosäure Glutaminsäure gegen ein inaktives Glutamin ausgetauscht. Nach Deaktivierung einer Untereinheit konnte die noch intakte Untereinheit die proteolytische Funktion übernehmen; die Aktivität der verbleibenden Untereinheit reichte für ein Wachstum auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle YPG aus. Wurden jedoch beide Untereinheiten katalytisch deaktiviert, führte dies zu einer synthetischen Letalität auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (Arlt *et al.*, 1998).

Da die Atmungskompetenz durch die Deletion der Transmembrandomäne einer Untereinheit nicht eingeschränkt war, stellte sich die Frage, welche Auswirkungen dies auf die proteolytische Aktivität der mutierten *m*-AAA-Protease hatte. Um darüber Aufschluss zu erhalten, wurde neben der Deletion der Transmembrandomäne zusätzlich die katalytisch aktive Glutaminsäure im Zentrum des Metallbinde-Motivs der Untereinheit Yta10 der *m*-AAA-Protease durch einen Austausch mit einem inaktiven Glutamin deaktiviert (Yta10 Δ TM^{E559Q}). Zellen mit intaktem Yta12 und einem Transmembrandomäne-verkürzten und proteolytisch deaktivierten Yta10 (Δ yta10/Yta10 Δ TM^{E559Q}) konnten Glycerin noch fermentieren. Dies bedeutete, dass die Komplementation des *petite* Phänotyps nicht von der Proteolyseaktivität der Transmembrandomäne-verkürzten Untereinheit vermittelt sein konnte (Abb. 31A).

Um zu klären, ob die proteolytische Aktivität der Vollängenuntereinheit Yta12 für die Komplementation des *petite* Phänotyps in yta10 Δ TM Zellen verantwortlich war, wurde auch in der Vollängenuntereinheit Yta12 das Proteolysezentrum ausgeschaltet.

Zellen, die eine Transmembrandomäne-verkürzte Yta10 Untereinheit und ein proteolytisch inaktives Yta12 besaßen (Δ yta10 Δ yta12/yta10 Δ TM yta12^{E614Q}), zeigten kein Wachstum auf YPG bei 30°C. Ebenso konnten Zellen mit einer Transmembrandomäne-verkürzten und proteolytisch inaktiven Yta10-Untereinheit und einem proteolytisch inaktiven Yta12 (Δ yta10 Δ yta12/yta10 Δ TM^{E559Q} yta12^{E614Q}) keine Atmung auf Glycerin durchführen (Abb. 31B).

Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass die Atmungskompetenz durch die proteolytisch aktive Vollängenuntereinheit Yta12 erhalten wurde.

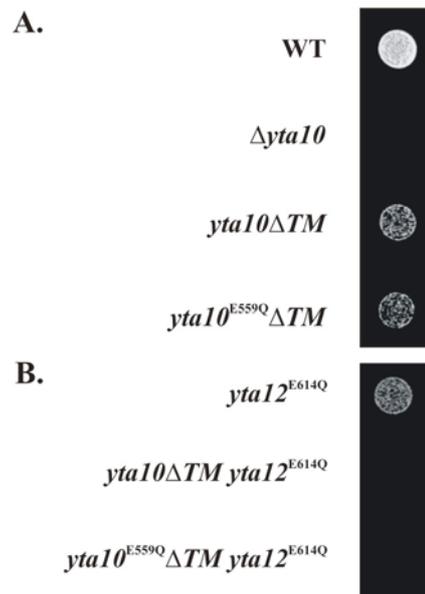


Abb. 31: Die Komplementation des *petite* Phänotyps in $yta10\Delta TM$ Zellen wird durch die proteolytisch aktive Vollängenversion Yta12 erhalten.

A. Um die Atmungskompetenz in $yta10\Delta TM$ Zellen aufrecht zu halten, muss $Yta10\Delta TM$ nicht proteolytisch aktiv sein. Phänotypische Wachstumsanalyse nach Expression von $yta10\Delta TM$ bzw. $yta10\Delta TM^{E559Q}$ in $\Delta yta10$ ($\Delta yta10/yta10\Delta TM$ bzw. $\Delta yta10/yta10\Delta TM^{E559Q}$).

B. Yta12 Vollängenversion muss funktionell intakt sein, um Atmungskompetenz in $yta10\Delta TM$ Zellen zu vermitteln. Nach der Expression von $Yta10\Delta TM Yta12^{E614Q}$ ($\Delta yta10\Delta yta12/yta10\Delta TM yta12^{E614Q}$) und $Yta10\Delta TM^{E559Q} Yta12^{E614Q}$ ($\Delta yta10\Delta yta12/yta10\Delta TM^{E559Q} yta12^{E614Q}$) in $\Delta yta10\Delta yta12$ Zellen wurde das Wachstum auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle überprüft.

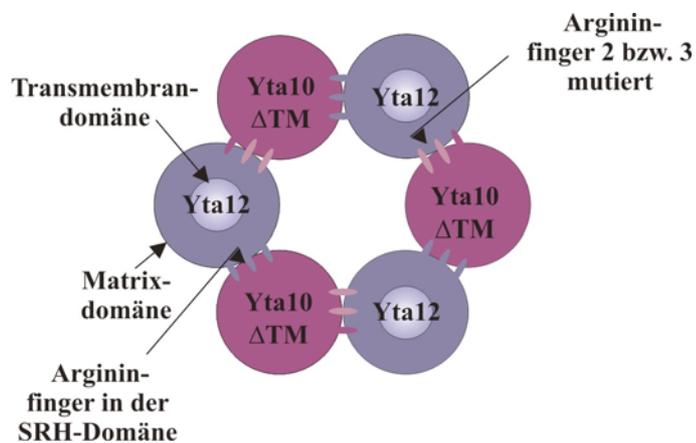
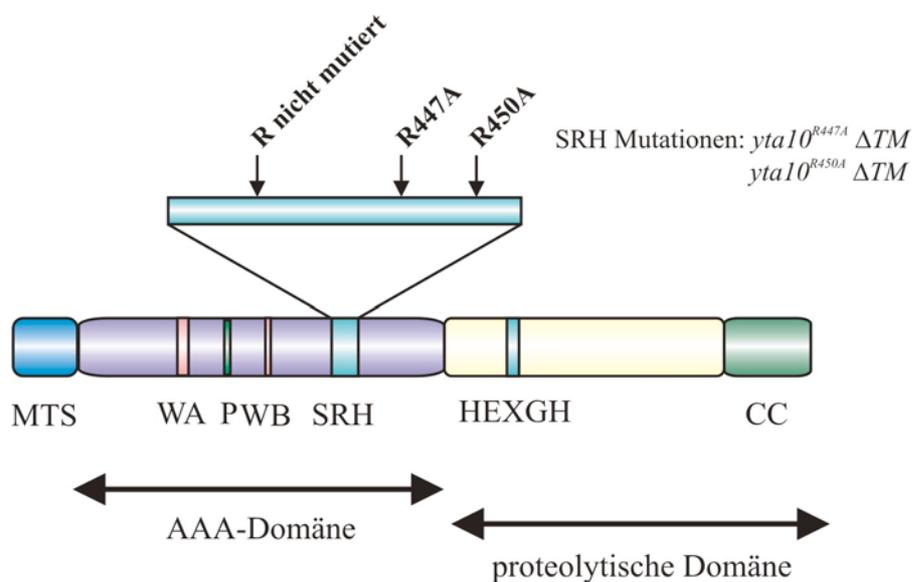
3×10^4 transformierte Zellen wurden auf nicht fermentierbarem YPG getüpfelt und 4 Tage bei 30°C inkubiert.

3.7.4 Die ATPase-Aktivität der Transmembrandomänen-deletierten *m*-AAA-Protease vermittelt die Atmungsfähigkeit der Zellen

AAA-Proteine werden häufig als oligomere Ringstrukturen vorgefunden (Stahlberg *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2004). Argininfinger in der SRH Region greifen nach erfolgter ATP Hydrolyse hierbei in die katalytische Seite ihrer Nachbaruntereinheit. Im assemblierten Oligomerisierungszustand kann damit volle ATPase-Aktivität erreicht werden (Akiyama und Ito, 2000; Ogura und Wilkinson, 2001). An FtsH, der Plasmamembran-lokalisierten AAA-Protease in *E. coli*, wurde bereits gezeigt, dass Argininfinger in der konservierten SRH-Region die ATPase-Aktivität in ihrer Nachbaruntereinheit stimulieren (Karata *et al.*, 1999).

Obwohl die Transmembrandomänen-deletierte Untereinheit einer *m*-AAA-Protease selbst nicht mehr proteolytisch aktiv war, konnte sie die proteolytische Aktivität ihrer intakten Nachbaruntereinheit stimulieren und damit der mutanten Zelle die Atmungsfähigkeit erhalten. Möglicherweise vermittelten in der mutierten *m*-AAA-Protease ebenfalls Argininfinger im SRH-Motiv nach einer Heterooligomerisierung der Transmembrandomänen-deletierten Untereinheit mit der intakten Nachbaruntereinheit die ATPase-Aktivität und damit Atmungskompetenz.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden neben der Deletion der Transmembrandomäne noch zusätzlich die konservierten Arginine im AAA-Motiv gegen die neutrale Aminosäure Alanin ausgetauscht. Im Gen von *YTA10* befinden sich drei Arginin-kodierende Aminosäuren, die in der SRH Region zum Ausbilden von Fingerdomänen in der Lage sein könnten. Die beiden hochkonservierten Arginine an den Positionen 447 bzw. 450 wurden gegen Alanine ausgetauscht (Abb. 32).



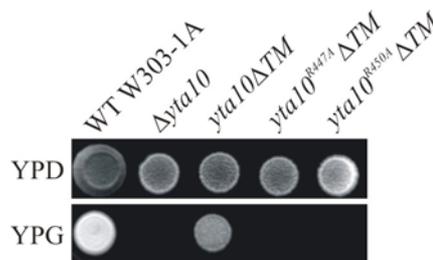
Abbildungslegende auf der nächsten Seite

Abb. 32: Grafische Darstellungen von $yta10^{R447A}\Delta TM$ - und $yta10^{R450A}\Delta TM$.

Im SRH („Second Region of Homology“) –Motiv des Transmembrandomäne-deletierten *YTA10* wurden zwei von drei Arginin-kodierenden Sequenzen an den Positionen 447 und 450 gegen Alanin-kodierende Sequenzen ausgetauscht ($yta10^{R447A}\Delta TM$ - und $yta10^{R450A}\Delta TM$).

Zellen mit deletierter Transmembrandomäne der Yta10 Untereinheit konnten nach einem Austausch einer ihrer konservierten Arginine gegen Alanin nicht mehr die Atmungsfähigkeit von $\Delta yta10$ Mutanten auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle YPG komplementieren (Abb. 33).

Die wiederhergestellte Atmungsfähigkeit, die durch die Überexpression der Matrixdomäne einer *m*-AAA-Proteasenuntereinheit vermittelt worden war, beruhte demnach nicht auf deren proteolytischer Aktivität, sondern auf ihrer ATPase-Aktivität.

**Abb. 33: Die Überexpression der Matrixdomäne von Yta10, die zusätzlich Argininfingermutationen in der SRH Domäne besitzt, kann den *petite* Phänotyp von $\Delta yta10$ Mutanten nicht mehr komplementieren.**

Wachstumsvergleich von WT W303-1A, $\Delta yta10$ und $\Delta yta10$ Varianten mit zusätzlich überexprimiertem $Yta10\Delta TM$ ($yta10\Delta TM$), $Yta10^{R447A}\Delta TM$ ($yta10^{R447A}\Delta TM$) bzw. $Yta10^{R450A}\Delta TM$ ($yta10^{R450A}\Delta TM$) auf YPD oder YPG. Jeweils 3×10^4 Zellen wurden 6 Tage bei 30°C inkubiert.

3.7.5 Die Transmembrandomänen der *m*-AAA-Proteasen gewährleisten einen korrekten Abbau von fehlgefalteten Membranproteinen

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass eine Komplexbildung aus einer intakten Untereinheit der *m*-AAA-Protease mit einer Matrixdomäne der Partneruntereinheit ausreicht, um die Atmungsfähigkeit der Hefezellen zu erhalten (Korbel *et al.*, 2004). Inwieweit dieser Komplex noch proteolytisch aktiv ist, sollte in den folgenden Experimenten überprüft werden. Es stellte sich die Frage, ob die Deletion der Transmembrandomäne einer der beiden *m*-AAA-Proteaseuntereinheiten den Abbau von integralen nicht-nativen Membranproteinen

beeinträchtigte. In isolierten Mitochondrien der Hefemutanten *yta10ΔTM* bzw. *yta12ΔTM* wurde die Stabilität der fehlgefalteten Proteine Oxa1^{ts} und Yme2ΔC *in vitro* überprüft.

Oxa1, ein polytopisches Innenmembranprotein, ist Teil der Insertionsmaschinerie für mitochondrial- und kern-kodierte Membranproteine (Bonney *et al.*, 1994). Damit spielt es auch eine große Rolle für den Aufbau des ATPase-Komplexes und der Cytochrom *c*-Oxidase in der inneren Mitochondrienmembran (Kermorgant *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 1998; Lemaire *et al.*, 2000; Hell *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2001; Nargang *et al.*, 2002; Stuart, 2002; Herrmann und Neupert, 2003). Die temperatursensitive Mutante *oxa1^{ts}* (Bauer *et al.*, 1994) ist nicht in der Lage, sich bei restriktiver Temperatur von 37°C korrekt zu falten und wurde in Wildtyp-Mitochondrien durch die *m*-AAA-Protease abgebaut (Käser, 2001; Käser *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Substratspezifität wurde Oxa1^{ts} als Modellsubstrat verwendet, um die Funktion der Transmembrandomäne im Laufe der Proteolyse zu untersuchen.

Oxa1^{ts} wurde während seiner *in vitro* Synthese mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Anschließend fand bei 25°C der posttranslationale Import in die isolierten Mitochondrien der Hefestämme von WT W303-1A, *Δyta10*, *yta10ΔTM*, *Δyta12* und *yta12ΔTM* statt. Die Fehlfaltung des Vorstufenproteins Oxa1^{ts} konnte durch eine Temperaturerhöhung auf 37°C induziert werden. Der Abbau wurde nach Auftrennung der mitochondrialen Proteine über SDS-PAGE anhand der Autoradiographie und Phosphorimaging-Systems analysiert (Abb. 34AB).

Unter nicht permissiven Bedingungen wurde das fehlgefaltete Oxa1^{ts} im Wildtyp innerhalb von 45 Minuten fast vollständig von der *m*-AAA-Protease abgebaut. Es besaß eine Halbwertszeit von 4 Minuten. Mitochondrien mit deletierter Yta10 bzw. Yta12 Untereinheit konnten nach 45 Minuten nur maximal 40 % des fehlgefalteten Oxa1^{ts} abbauen. Da Oxa1^{ts} hauptsächlich von der *m*-AAA-Protease abgebaut wird, kam es in den Stämmen *Δyta10* und *Δyta12* zu einer Stabilisierung des fehlgefalteten Proteins. Eine zusätzliche Überexpression der Matrixdomäne der fehlenden *m*-AAA-Proteaseuntereinheit (*yta10ΔTM* und *yta12ΔTM*) führte zu keiner Proteolysesteigerung von Oxa1^{ts}.

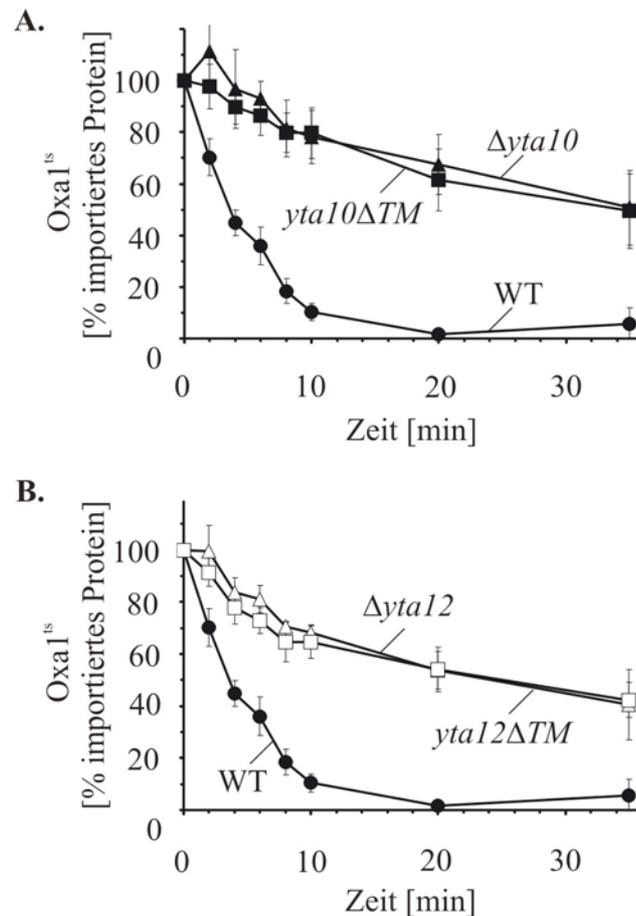


Abb. 34: Stabilität des Modellsubstrates Oxal^{ts}.

[³⁵S]-Methionin markiertes Oxal^{ts} wurde bei 25°C in isolierte Mitochondrien importiert; der Abbau ließ sich durch eine Temperaturerhöhung auf 37°C für maximal 45 Minuten induzieren. Die Proben konnten nach SDS-PAGE und Autoradiographie mittels Phosphorimaging-Systems auf Abbau quantifiziert werden. Jeder Mitochondrienstamm wurde mindestens drei Mal in unabhängigen Experimenten auf Abbau von Oxal^{ts} überprüft und gemittelt (die Standardabweichungen wurden über n=3 ermittelt und sind als Fehlerbalken ersichtlich).

A. Quantifizierung des Abbaus von Oxal^{ts} in den isolierten Mitochondrien WT W303-1A, $\Delta yta10$ und $yta10\Delta TM$.

B. Die Stabilität von Oxal^{ts} wurde ebenfalls nach Temperaturinduzierung in den isolierten Mitochondrien WT W303-1A, $\Delta yta12$ und $yta12\Delta TM$ quantifiziert.

Im Verlauf dieser Studie wurde Yme2 als ein zweites Modellsubstrat der *m*-AAA-Protease auf Stabilität in mutanten *m*-AAA-Proteasen untersucht. Yme2 ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und besitzt eine Transmembrandomäne. In den Matrixraum reicht eine kleine N-terminale Domäne, während im Intermembranraum eine große C-terminale Domäne zu finden ist (Hanekamp und Thorsness, 1996; Hanekamp und Thorsness, 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass das mutante Yme2 Derivat mit deletierter

Intermembranraum-Domäne von der *m*-AAA-Protease abgebaut werden kann (Leonhard *et al.*, 2000).

Deshalb sollte der Abbau des C-terminal verkürzten Innenmembranproteins Yme2^{F114S}ΔC15+1 (Yme2ΔC) durch *m*-AAA-Proteasevarianten, deren Untereinheit Yta10 bzw. Yta12 über keine eigene Transmembrandomäne verfügen, verfolgt werden.

Das Vorstufenprotein von Yme2ΔC, das nur 16 Aminosäuren der Intermembranraumdomäne exprimierte, wurde in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin *in vitro* synthetisiert. Dieses radioaktiv markierte Protein wurde bei 25°C postranslational in isolierte Mitochondrien der Zellen WT W303-1A, Δ*yta10*, *yta10*Δ*TM*, Δ*yta12* und *yta12*Δ*TM* importiert. Nicht importiertes Yme2ΔC wurde durch eine Proteasebehandlung mit Trypsin aus dem Importansatz entfernt. Die Proben wurden mit 37°C induziert und nach erfolgter SDS-PAGE über Autoradiographie und Phosphorimaging-System analysiert.

Während neu importiertes Yme2ΔC mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2}$ 10 Minuten zügig abgebaut wurde, war es weitgehend stabil in den Mitochondrien der Deletionsmutante Δ*yta10* vorzufinden. Nach 45 Minuten waren noch 80 % des neuimportierten Proteins nachweisbar. Ebenfalls konnte der Abbau von Yme2ΔC nicht durch eine Überexpression der fehlenden Yta10-Matrixdomäne in der Mutante Δ*yta10* wiederhergestellt werden (Abb. 35A).

Auch konnte gezeigt werden, dass sowohl die Deletion der Yta12 Untereinheit der *m*-AAA-Protease (Δ*yta12*) als auch eine zusätzliche Überexpression der fehlenden Matrixdomäne (*yta12*Δ*TM*) den Abbau fehlgefalteter Proteine nicht mehr übernehmen konnte. Die mutierten Proteasen konnten maximal 20 % des importierten Yme2ΔC abbauen (Abb. 35B).

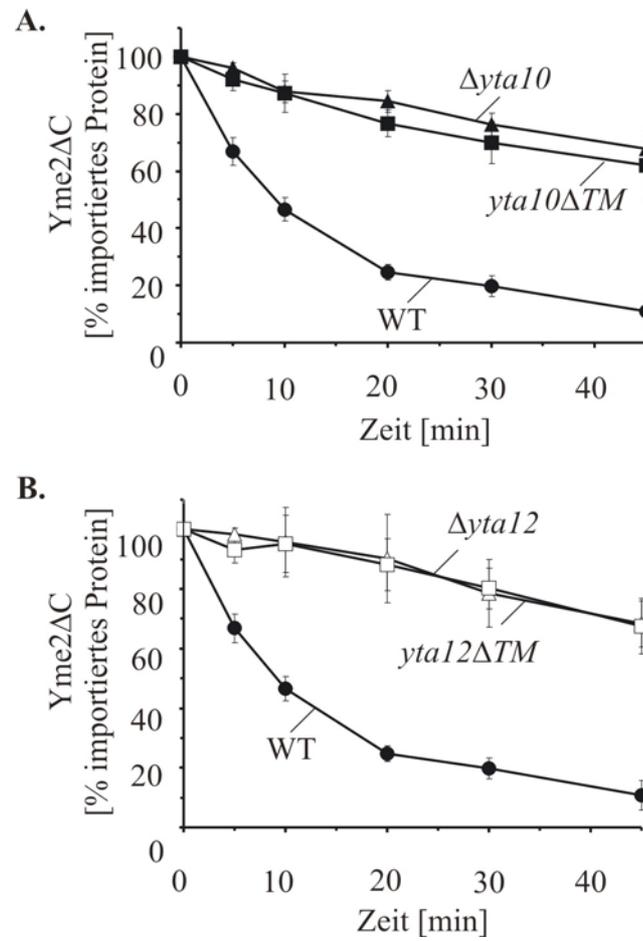


Abb. 35: Stabilität des Modellsubstrates Yme2ΔC.

Radioaktiv markiertes Yme2ΔC Vorstufenprotein wurde in isolierte Mitochondrien bei 25°C importiert. Der Abbau der fehlgefalteten Proteine bei 37°C ließ sich nach SDS-PAGE über einen Phosphorimager auswerten.

A. Beeinträchtigung der Proteolyse in $yta10\Delta TM$ und $\Delta yta10$ Mitochondrien im Vergleich mit Wildtyp W303-1A Mitochondrien.

B. Transmembrandomänen verkürzte Yta12 Untereinheiten der *m*-AAA-Protease ($yta12\Delta TM$) können wie ihre Deletionsmutante ($\Delta yta12$) das Innenmembranprotein Yme2ΔC nicht abbauen.

3.7.6 Die Transmembrandomäne einer *m*-AAA-Protease Untereinheit ist nicht für die Prozessierung von Cytochrom *c* Peroxidase notwendig

Cytochrom *c* Peroxidase (Ccp1) ist ein kernkodiertes Häm-bindendes Protein, das posttranslational als Vorstufenprotein mit einer zweiteiligen Sortierungssequenz in Mitochondrien importiert wird (Kaput *et al.*, 1982; Kaput *et al.*, 1989) (Abb 36). In der Matrix schneidet die *m*-AAA-Protease eine Kette von 7 Alaninresten in der Sequenz von Ccp1 (Friedrichs, 2004). und entfernt hier die erste N-terminale Sortierungssequenz. Während des Reifungsprozesses schneidet anschließend die Rhomboidpeptidase Pcp („processing of cytochrom *c* peroxidase“;

YGR101W) dem Intermediärprotein die zweite Sortierungssequenz ab und wird dann in den Intermembranraum als lösliches Protein freigegeben (Esser *et al.*, 2002; McQuibban *et al.*, 2003; Michaelis *et al.*, 2005). Das fertig prozessierte Ccp1 ist für die Entfernung von freien Sauerstoffradikalen und toxischem Peroxid verantwortlich, indem es die Peroxid-abhängige Oxidation von Cytochrom *c* katalysiert (Edwards *et al.*, 1988).

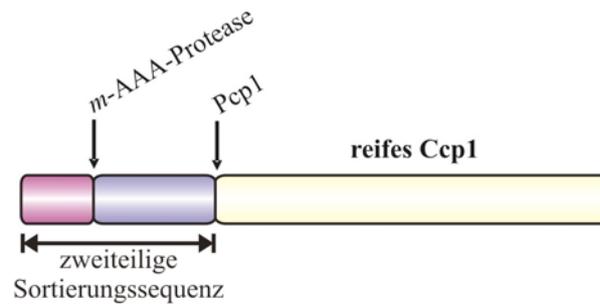


Abb. 36: Prozessierungsschnittstellen der Cytochrom *c* Peroxidase (Ccp1).

Ccp1 besitzt eine zweiteilige Sortierungssequenz. Während des Reifungsprozesses entfernt zunächst die *m*-AAA-Protease in der Matrix den N-terminalen Abschnitt des Vorstufenproteins; im zweiten Schritt prozessiert das Intermediärprotein durch die Pcp1 Aktivität im Intermembranraum zur reifen Form Ccp1.

Hefestämmen, denen eine Untereinheit der *m*-AAA-Protease fehlt ($\Delta yta10$ und $\Delta yta12$) sind zum ersten Prozessierungsschritt von Ccp1 nicht in der Lage. Es findet sich dort nur Ccp1 als Vorläuferprotein (Esser *et al.*, 2002). Hier sollte überprüft werden, ob das Entfernen einer Transmembrandomäne einer *m*-AAA-Proteaseuntereinheit die Prozessierung von Ccp1 beeinträchtigen würde. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden isolierte Mitochondrien des Wildtyp W303-1A-, $\Delta yta10$ -, $yta10\Delta TM$ -, $\Delta yta12$ - und $yta12\Delta TM$ -Stammes nach einer SDS-PAGE mit Immunoblotanalyse untersucht. Hierfür wurde ein Ccp1-spezifischer Antikörper verwendet (Abb. 37). Während in WT W303-1A Mitochondrien Ccp1 als vollprozessiertes Protein zu finden war, fand sich in Mitochondrien mit deletierter Yta10 bzw. Yta12 Untereinheit Ccp1 nur als Vorläuferprotein. Mitochondrien, die eine Transmembrandomäne-verkürzte Untereinheit der *m*-AAA-Protease besaßen ($yta10\Delta TM$ und $yta12\Delta TM$) konnten Ccp1 prozessieren. Jedoch war die Prozessierung von Ccp1 in $yta10\Delta TM$ -Mitochondrien nur partiell möglich.

Diese Ergebnisse ließen die Schlußfolgerung zu, dass die Transmembrandomänen der Yta10 und Yta12 Untereinheiten nicht für die Prozessierung von löslichen Proteinen nötig ist.

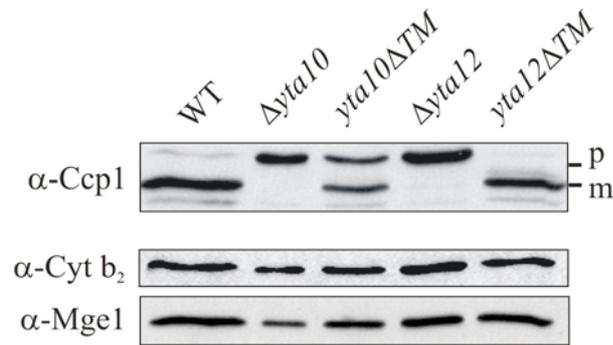


Abb. 37: Die Prozessierung von Cytochrom *c* Peroxidase war nach der Deletion der Transmembrandomäne einer Untereinheit der *m*-AAA-Protease nur partiell beeinträchtigt.

Für eine Immunoblotanalyse wurden 30µg isolierter Mitochondrien der Hefen Wildtyp W303-1A, *Δyta10*, *yta10ΔTM*, *Δyta12* und *yta12ΔTM* über SDS-PAGE fraktioniert. Ccp1-Prozessierung konnte mit einem spezifischen polyklonalen Ccp1 Antiserum (α-Ccp1) nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle diente die Immunoblotdekoration mit den Antiseren gegen das Matrix-lokalisierte Co-Chaperon Mge1 (α-Mge1) und dem integralen Membranprotein Cytochrom *b*₂ (α-Cyt *b*₂). Folgende Abkürzungen wurden verwendet: p, Vorläuferprotein von Ccp1; m, prozessiertes reifes Ccp1.

3.7.7 Nachweis partieller Proteolyse von Atp7, einem peripheren Membranprotein, durch die mutanten *m*-AAA-Proteasen *yta10ΔTM* und *yta12ΔTM*

In den vorhergehenden Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass der Abbau fehlgefalteter integraler Membranproteine fast gänzlich zum Erliegen kam, sobald dem *m*-AAA-Proteasenkomples eine Transmembrandomäne der Untereinheit Yta10 oder Yta12 fehlte. Untersuchungen zur Prozessierung des löslichen Intermembranproteins Ccp1 brachten aber zum Vorschein, dass diese Varianten der *m*-AAA-Protease (*yta10ΔTM* und *yta12ΔTM*) noch einzelne Schnittprozesse während posttranslationaler Reifung von Ccp1 durchführen konnten. Die Vermutung lag nahe, dass in Mitochondrien der Mutanten *yta10ΔTM* und *yta12ΔTM* noch einzelne proteolytische Schnitte möglich sind, jedoch der Abbau von Polypeptiden nicht mehr durchgeführt werden konnte. Möglicherweise ist aber eine korrekte Membraninsertion der *m*-AAA-Protease eine Grundvoraussetzung zum erfolgreichen Abbau membranintegrierter Polypeptide. Um dieser Frage genauer nachzugehen, sollte der Abbau eines peripheren Membranproteins von mutierten *m*-AAA-Proteasen verfolgt werden. Hierzu wurde Atp7 als zu untersuchendes Abbauprodukt gewählt, das eine assoziierte Untereinheit der ATP-Synthase ist (Devenish *et al.*, 2000).

Aufgrund der Lokalisation von Atp7 an der Peripherie zur inneren Mitochondrienmembran sollte zunächst geklärt werden, inwieweit es als lösliches oder membranintegriertes Protein zu sehen ist. Um darüber Aufschluss zu erhalten, sollte die Lokalisierung von Atp7 innerhalb der Mitochondrien geklärt werden. Radioaktiv markiertes Atp7 wurde in isolierte WT W303-1A Mitochondrien importiert. Eine Natriumcarbonat Extraktion im Anschluss an diesen Import machte deutlich, dass Atp7 sich im Matrixraum von Mitochondrien befinden muss, wo es in löslicher Form anzutreffen ist. Dies Ergebnis bestätigte, Atp7 ist ein peripher assoziiertes Membranprotein (Abb. 38).

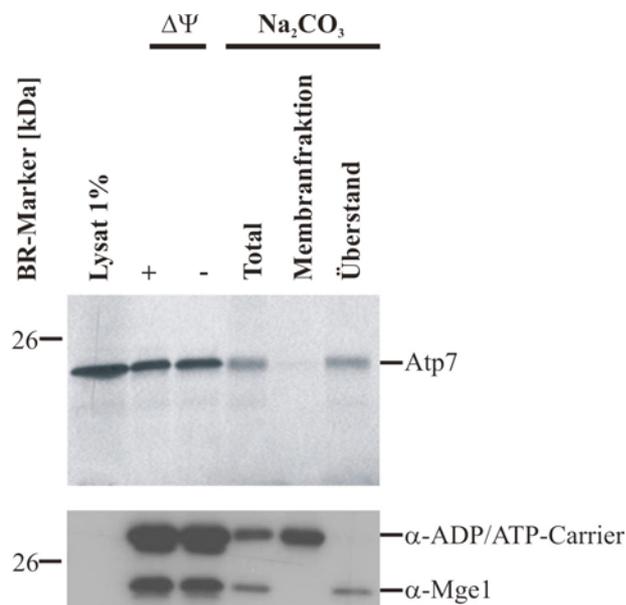


Abb. 38: Die Lokalisierung von Atp7 innerhalb von Mitochondrien.

Atp7 wurde in einem zellfreien System in Anwesenheit von [^{35}S]-Methionin exprimiert. Dessen radioaktiv markiertes Vorstufenprotein (Lysat) wurde bei 15°C für 10 min in WT W303-1A Mitochondrien importiert. Nach einer Importkontrolle (+ bzw. - $\Delta\Psi$) wurde mit einer Natriumcarbonat Extraktion die Lokalisation von Atp7 ermittelt. Diese machte deutlich, dass Atp7 kein integrales Membranprotein (Membranfraktion), sondern ein lösliches Matrixprotein (Überstand) ist. Das Co-Chaperon Mge1 der mitochondrialen Matrix und der ADP/ATP-Carrier der inneren Mitochondrienmembran wurden als Kontrollen verwendet.

[^{35}S]-Methionin markiertes Atp7 wurde bei 15°C posttranslational in isolierte Mitochondrien der Hefestämme WT W303-1A, $\Delta yta10$, $yta10\Delta TM$, $\Delta yta12$ und $yta12\Delta TM$ importiert. Der Atp7-Abbau wurde mit einer Temperaturerhöhung auf 37°C induziert. Inwieweit Atp7 in mutierten Mitochondrien stabilisiert war, konnte nach Auftrennung der mitochondrialen Proteine über ein SDS-PAGE anhand der Autoradiographie und anschließender Phosphorimaging-Auswertung analysiert werden (Abb. 39AB).

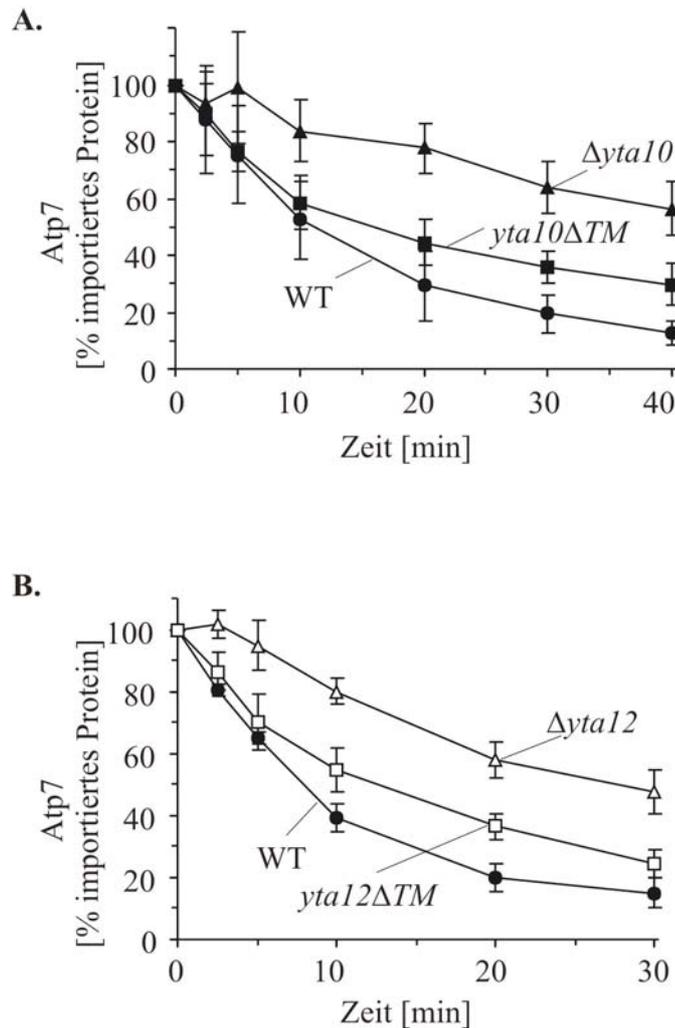


Abb. 39AB: Abbau von Atp7 durch *m*-AAA-Proteasen mit Transmembrandomäne-deletierter Domäne.

Nach Import von radioaktivem Atp7 in isolierte WT W303-1A, $\Delta yta10$, $yta10\Delta TM$, $\Delta yta12$ und $yta12\Delta TM$ Mitochondrien wurde in jeweils 4 unabhängigen Experimenten der Abbau von Atp7 nach einer Temperaturinduktion von 37°C verfolgt (mit n=4 wurde die Standardabweichung ermittelt. Sie ist als Fehlerbalken ersichtlich).

Nach einer Temperaturinduktion konnte innerhalb von 10 Minuten Atp7 in Wildtyp-Mitochondrien zur Hälfte abgebaut werden; nach 30 Minuten waren nur noch maximal 20 % des importierten Proteins im Probenansatz nachweisbar. Fehlte jedoch eine Untereinheit der *m*-AAA-Protease ($\Delta yta10$ oder $\Delta yta12$), konnte Atp7 nur eingeschränkt abgebaut werden. Nach 40 Minuten fand sich in $\Delta yta10$ Proben 70 % des importierten Proteins und in $\Delta yta12$ waren noch fast 50 % von Atp7 nach 30 Minuten detektierbar.

m-AAA-Proteasen, denen eine Transmembrandomäne einer Untereinheit von Yta10 oder Yta12 deletiert worden war ($yta10\Delta TM$ und $yta12\Delta TM$), konnten zwar nicht wie intakte

m-AAA-Proteasen das fehlgefaltete Atp7 abbauen, jedoch war ein beschleunigter Abbau im Vergleich mit $\Delta yta10$ oder $\Delta yta12$ Mitochondrien möglich.

Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass Atp7 ein bislang unbekanntes Substrat der *m*-AAA-Protease ist. Aber es ist auch deutlich geworden, dass zum Abbau von peripheren Membranproteinen die Transmembrandomäne nur partiell benötigt wird.

4. Diskussion

4.1 Phänotypische Charakterisierung der konditional letalen Mutante *yta10^{ts}Δyme1*

Die *m*- und *i*-AAA-Protease übernehmen essentielle Funktionen innerhalb der Zellen von *S. cerevisiae*. So wirkt sich ein gemeinsamer Funktionsausfall des *m*- und *i*-AAA-Protease-systems für die gesamte Zelle synthetisch letal aus (Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000). Dies machte es bislang unmöglich, die gemeinsamen Auswirkungen von Mutationen der mitochondrialen *m*- und *i*-AAA-Protease zu charakterisieren. Hierzu wurde ein konditional letaler Hefestamm hergestellt, der das temperatursensitive Allel *yta10^{ts}* exprimiert und dem die *i*-AAA-Protease durch eine Deletion von *YME1* fehlt. Unter Verwendung dieses temperatursensitiven Stammes konnten in einem „multicopy Screen“ Faktoren isoliert werden, die die ausgefallenen AAA-Proteasen in ihrer Funktion komplementierten. Des Weiteren wurden die Phänotypen von temperatursensitiven AAA-proteasedefizienten Zellen charakterisiert.

4.1.1 Einfluss einer Punktmutation in *YTA10* auf die respiratorische Kompetenz

In einem früheren Mutagenese „Screen“ konnte Prof. A. Tzagoloff (New York) bereits mehrere temperatursensitive Mutanten von *S. cerevisiae* isolieren, die Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz der Untereinheiten der *m*- bzw. *i*-AAA-Protease trugen.

Aus diesen temperatursensitiven Stämmen wurde in dieser Studie die konditional letale Hefemutante *yta10^{ts}* ausgewählt, die eine Punktmutation an der Position 1078 in der kodierenden Sequenz von *YTA10* trägt. Dies führte zu einem Austausch der 363. Aminosäure von Glycin zu Glutamin. Diese Punktmutation fand sich innerhalb der AAA-Domäne im Bereich des Porenmotivs von *YTA10* und verursachte eine Beeinträchtigung der Atmungskompetenz bei höheren Temperaturen, die kein Wachstum auf Medien mit nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle (YPG) zuließ. Wurde zusätzlich die *i*-AAA-Protease in der konditional letalen Mutante *yta10^{ts}* funktional ausgeschaltet (*yta10^{ts}Δyme1*), führte dies zu einem weiteren Phänotyp. Die Zellen des Stammes *yta10^{ts}Δyme1* waren nicht mehr nur respiratorisch defizient, sondern zeigten ein bei höheren Temperaturen gehemmtes

Wachstum. Offenbar hatte der gemeinsame Funktionsausfall beider mitochondrialer AAA-Proteasen zu einer Verstärkung der Defekte innerhalb der Zellen geführt.

Es stellt sich die Frage, welche Folgen die Punktmutation innerhalb der AAA-Domäne von *yta10^{fs}* für das proteolytische System der *m*- und *i*-AAA-Proteasen hat. Ein gemeinsames Charakteristikum ATP-abhängiger Proteasen ist eine oligomere, meist hexamere Ringstruktur mit einer zentralen Pore (De Mot *et al.*, 1999; Zwickl *et al.*, 2000; Bieniossek *et al.*, 2006). Eine konservierte Proteinschleife aus aromatischem Phenylalanin, hydrophobem Valin und Glycin ist zwischen dem Walker A- und Walker B-Motiv zu finden und zur Pore hin exponiert (Wang *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Krzywda *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2002; Yamada-Inagawa *et al.*, 2003; Graef, 2006). Substrate können hier entfaltet und anschließend durch diesen Kanal transportiert werden, um an das katalytische Zentrum zu gelangen (Lee *et al.*, 2001; Ogura und Wilkinson, 2001; Sauer *et al.*, 2004; Hanson und Whiteheart, 2005). Mittlerweile konnten mehrere Hinweise gefunden werden, dass die beiden Vorgänge Substratentfaltung und Translokation ATP abhängig sind und durch das Poren-Motiv vermittelt werden (Lee *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2001; Yamada-Inagawa *et al.*, 2003; Graef, 2006). Möglicherweise führte in Zellen der temperatursensitiven Mutante *yta10^{fs}* der Austausch des Aminosäurerestes von Glycin zu Glutamin zu einer Konformationsänderung bzw. Verkleinerung des Porenkanals. Bei einer höheren Temperatur könnte dies dazu geführt haben, dass die voluminösere Aminosäure soweit in die Pore hineinragte, dass gebundene Substratproteine nicht mehr durch den Transportkanal gezogen werden konnten, um im katalytischen Zentrum der *m*-AAA-Protease abgebaut zu werden.

Da jedoch bislang keine Röntgenkristallstruktur der *m*-AAA-Protease vorhanden ist, bleibt zu klären, welche Funktion im konditional letalen Stamm *yta10^{fs}* durch die Punktmutation beeinträchtigt ist.

Im Hinblick auf die Funktion der *m*-AAA-Protease wäre es sinnvoll, den Einfluss der Punktmutation auf die Proteolyse von fehlgefalteten Substratproteinen und auf die Prozessierung von Vorläuferproteinen zu überprüfen. Studien an FtsH konnten bereits zeigen, dass die Pore zur Proteolyse von Substraten benötigt wird und diese auch an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003). Dies wurde auch durch Arbeiten an der mitochondrialen *i*-AAA-Protease bestätigt. Mutationen im Poren-Motiv von *YME1* beeinträchtigten die Proteolyse von nicht-nativen Proteinen, da diese nicht mehr in Abhängigkeit von ATP durch die *i*-AAA-Protease entfaltet werden konnten (Graef, 2006). Insbesondere scheint die Aminosäure Glycin an diesen beiden Prozessen beteiligt zu sein. Dementsprechend sollte auch überprüft werden, ob die hier detektierte Punktmutation von

Glycin zu Glutamin zu einem Verlust der ATP Hydrolyse führt. Dies könnte sich auf die Bindungseffizienz und Translokation von Substratproteinen bemerkbar gemacht haben, da vermutet wird, dass nach erfolgter ATP-Hydrolyse sich die Konformation der Porenregion ändert, die eine Substrattranslokation erleichtert (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003). Durch den Funktionsausfall der AAA-Domäne könnten abzubauen Proteine nicht erkannt bzw. nicht mehr gebunden werden. Dieser Defekt könnte auch zu einer schädigenden Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen innerhalb der Mitochondrien geführt haben.

4.1.2 Zellen der Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* sterben nicht durch Apoptose

Mehrere Studien an *S. cerevisiae* konnten mittlerweile belegen, dass auch einzellige eukaryontische Organismen einem programmierten Zelltod unterliegen können (Skulachev, 2002; Madeo *et al.*, 2004). Das Absterben einzelner Zellen schützt hierbei die Zellgemeinschaft vor schädigenden Auswirkungen (Madeo *et al.*, 2004). Auch wird durch die Eliminierung von schwachen, kranken oder geschädigten Zellen sichergestellt, dass den gesunden Zellen ausreichendes Nahrungsangebot zur Verfügung steht (Madeo *et al.*, 1997). Wie auch in mehrzelligen Organismen sind die Mitochondrien von *S. cerevisiae* am Ablauf der Apoptose beteiligt (Skulachev, 2002; Madeo *et al.*, 2004). In verschiedenen Studien ließen sich in Hefezellen spezifische apoptotische Merkmale identifizieren, z.B. werden reaktive Sauerstoffverbindungen, ROS („reactive oxygen species“), aus Mitochondrien in das Cytosol freigesetzt (Madeo *et al.*, 1997; Laun *et al.*, 2001; Severin und Hyman, 2002). Auch ließen sich Procaspasen, die ein Teil der Signalkaskade im programmierten Zelltod sind, in Mitochondrien von *S. cerevisiae* nachweisen (Madeo *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde auch eine Ausschüttung des apoptoseinduzierenden Cytochrom *c* aus den Mitochondrien in das Cytosol von *S. cerevisiae* beobachtet (Madeo *et al.*, 1997; Ludovico *et al.*, 2002). Auch ließ sich zeigen, dass beeinträchtigte und defekte Mitochondrien durch Autophagozytose abgebaut werden. Dieser selektive Abbau ist dabei an apoptotische Prozesse gekoppelt (Gozuacik und Kimchi, 2004).

Möglicherweise könnte auch eine mitochondriale Dysfunktion, die durch einen Funktionsausfall der *m*- und *i*-AAA-Proteasen verursacht wurde, apoptotische Prozesse induzieren. Daher sollte überprüft werden, ob die synthetische Letalität AAA-proteasedefizienter Zellen durch Apoptose oder durch nekrotische Prozesse verursacht wird.

Unter restriktiven Wachstumsbedingungen wurden die konditional letalen AAA-proteasedefizienten Zellen *yta10^{ts}* und *yta10^{ts}Δyme1* induziert und mit dem Apoptose markierenden Fluoreszenzfarbstoff Annexin V und dem Zell-Lyseindikator Propidiumjodid angefärbt. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte, dass sowohl der temperaturinduzierte Funktionsausfall von *yta10^{ts}* als auch der Ausfall beider AAA-Proteasen in Zellen der Hefemutante *yta10^{ts}Δyme1* unter restriktiven Wachstumsbedingungen Zell-lytische Prozesse induzierte. Obwohl eine mitochondriale Dysfunktion vorliegt, sind in AAA-proteasedefizienten Zellen keine apoptotischen Vorgänge nachweisbar. Offenbar führt der Funktionsausfall beider AAA-Proteasen in den Mitochondrien in Zellen von *S. cerevisiae* zu nekrotischen Prozessen.

4.1.3 Die Überexpression von Komponenten des PKC-MAPKinase Signalweges ermöglicht ein Wachstum von *yta10^{ts}Δyme1* Zellen

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob der letale Phänotyp eines Funktionsausfalls beider AAA-Proteasen sich durch Überaktivierung anderer zellulärer Wege unterdrücken lässt. In dem hier durchgeführten „Screen“ konnten mit einer „multicopy“ Genbank mehrere Faktoren der PKC-MAPKinase Signalkaskade isoliert werden, die unter restriktiven Bedingungen die synthetische Letalität der Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* aufhoben. So wurden die beiden Glykoproteine Mid2 und Wsc1 als Suppressoren identifiziert, die als Mechanosensoren in der Plasmamembran verankert sind und durch unterschiedliche extrazelluläre Stressfaktoren, wie z.B. Hitze, Kalzium, hypoosmotischen Bedingungen aktiviert werden und ihrerseits die Signalkaskade zum Erhalt der Zellintegrität aktivieren (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998; Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). Ebenfalls konnte der cytoplasmatische GDP/GTP Austauschfaktor Rom2 („RHO multicopy suppressor“) (Ozaki *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2000) als Suppressionskandidat von *yta10^{ts}Δyme1* detektiert werden. Schließlich war auch Mkk1, das im Zentrum der MAPKinase Signalkaskade steht (Irie *et al.*, 1993), in der Lage, den konditional letalen Phänotyp von *yta10^{ts}Δyme1* zu unterdrücken. Des weiteren ließ sich Syp1 in diesem genomischen „Screen“ als Suppressor identifizieren. Syp1 wurde bereits neben Mid2 und Wsc1 als Suppressor der Deletion von Profilin, einer Zellwandkomponente, identifiziert. Nach ihrer Überexpression bauen Zellen eine anormal dicke Zellwand auf (Marcoux *et al.*, 1998).

Es ist nicht unmittelbar verständlich, warum eine Überexpression von Komponenten der MAPKinase Signalkette den synthetisch letalen Phänotyp der Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* komplementieren kann. Durch die PKC-MAPKinase Signalkaskade ist es eukaryontischen Zellen möglich, auf externe Umgebungsveränderungen zu reagieren und sich anzupassen. Nach erfolgter Signalaufnahme wird das MAPKinase Modul im Cytoplasma aktiviert, die Signale werden an den Zellkern weitergeleitet und führen zu Veränderungen in der Genexpression, die die Aufrechterhaltung der Zellintegrität gewährleisten (Errede *et al.*, 1995; Buehrer und Errede, 1997). Möglicherweise hatte der gemeinsame Funktionsausfall der *m*- und *i*-AAA-Protease nicht nur Störungen innerhalb von Mitochondrien verursacht. Da die Defekte der Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* durch eine Stimulierung der MAPKinase Signalkette komplementiert werden konnten, ist zu vermuten, dass vielmehr die gesamte Zelle und damit die Zellintegrität durch diese mitochondriale Dysfunktion betroffen ist.

Mitochondrien sind von essentieller Bedeutung für die gesamte Zelle. In diesen Organellen finden Energiegewinnung, wie z.B. Citratzyklus, oxidative Phosphorylierung und ATP-Synthese, aber auch Synthesen von Lipiden, Hämproteinen und Eisen-Schwefel-Komplexen statt (Reichert und Neupert, 2004). Eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion hat möglicherweise Auswirkungen auf die gesamte Zelle. Bislang konnte noch nicht gezeigt werden, inwieweit AAA-Proteasen an der Aufrechterhaltung der Zellintegrität beteiligt sind. In Arbeiten anderer Arbeitsgruppen konnten bereits mehrere Kandidaten identifiziert werden, die die Deletion von *YTA10* bzw. *YTA12* supprimieren konnten. So ließ sich der respiratorische Defekt *m*-AAA-proteasedefizienter Hefezellen ($\Delta yta10$ bzw. $\Delta yta12$) durch die Überexpression der Matrix lokalisierten Serinprotease *PIMI/LON* (Wagner *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.*, 1998), durch Teile der Insertionsmaschinerie in der inneren Mitochondrienmembran *OXA1* (Altamura *et al.*, 1996; Rep *et al.*, 1996; Herrmann *et al.*, 1997; Preuss *et al.*, 2001; Lemaire *et al.*, 2004) bzw. *MBA1*, das an der Assemblierung von Atmungskettenkomplexen und am Proteinexport aus der Matrix beteiligt ist (Rep und Grivell, 1996; Preuss *et al.*, 2001) und durch *OMS1*, ein Methyltransferase ähnliches Protein (Lemaire *et al.*, 2004), unterdrücken. Erklärbar wurden einige Suppressionseffekte durch die Tatsache, dass die *m*-AAA-Protease die Prozessierung des Vorläuferproteins *MRPL32*, einer Komponente der großen ribosomalen Untereinheit übernimmt (Nolden *et al.*, 2005). Über die mitochondriale Translation werden mitochondrial-kodierte Proteine synthetisiert und stehen zur Assemblierung mit kernkodierten Atmungskettenuntereinheiten und F₁F₀-ATP-Synthasekomplexen zur Verfügung. Ein Funktionsausfall der *m*-AAA-Protease hat demnach eine beeinträchtigte Biogenese der Atmungskette und ATP-Synthase zur Folge und führt zur

beobachteten Atmungsinkompetenz (Paul *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1998; Galluhn und Langer, 2004), die durch diese Suppressoren kompensiert werden konnte. Auch ließ sich mittlerweile zeigen, dass neben der Membraninsertion von mitochondrial- und kernkodierten Proteinen aus der Matrix Oxa1 ebenfalls an der Verankerung von Ribosomen an der inneren Mitochondrienmembran beteiligt ist (Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003). Möglicherweise führt eine Überexpression von *OXA1* zu einer Anreicherung von Ribosomen an der mitochondrialen Membran, die in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease gebildet werden konnten und so Atmungsinkompetenz verhindern (Nolden *et al.*, 2005).

Jedoch ließen sich in dieser Arbeit diese Suppressoren nicht detektieren. Umgekehrt konnten die Phänotypen von Zellen mit deletierter bzw. mutierter AAA-Proteaseneinheit (*yta10^{ts}*, Δ *yta10* und Δ *yme1*) nicht durch die Überexpression von Komponenten des PKC-MAPKinase Weges unterdrückt werden. Nur die Überexpression des Mechanosensors Mid2 konnte die Atmungsinkompetenz von *yta10^{ts}* Zellen supprimieren. Dies ließ vermuten, dass die gleichzeitige Mutation von *yta10^{ts}* und Deletion von *YME1* andere Defekte und damit andere phänotypische Veränderungen verursacht, die nicht mit den Phänotypen von Zellen mit defekter *m*- bzw. *i*-AAA-Protease (Δ *yta10* und Δ *yme1*) vergleichbar sind. Auch könnte sich der gemeinsame Funktionsausfall der *m*- und *i*-AAA-Protease additiv auf den Phänotyp auswirken. Nur hätte dann auch die Überexpression der hier gefundenen Komponenten den Funktionsausfall einer Protease supprimieren müssen.

4.1.4 Mutationen der *m*- und *i*-AAA-Protease verursachen Störungen der Zellintegrität und verhindern einen intakten Zellwandaufbau

Die PKC-MAPKinase Signalkaskade ist durch unterschiedliche extrazelluläre Stressfaktoren induzierbar (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992; Davenport *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1997). Dies führt zu einer Aktivierung der Transkription von Zellwandkomponenten und gewährleistet die Aufrechterhaltung der Zellintegrität (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini und Friedli, 1996; Gray *et al.*, 1997; Madden *et al.*, 1997). Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass auch der Zellzyklus mittels Transkriptionsaktivierung von *CDC28* über diese Signalkaskade reguliert wird (Mazzoni *et al.*, 1993; Marini *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass sich der temperatursensitive Phänotyp des konditional letalen Hefestammes *yta10^{ts}* Δ *yme1* in einem genomischen „Screen“ durch eine Überexpression von Komponenten der PKC-MAPKinase Signalkaskade

unterdrücken ließ, führte zur Annahme, dass der Verlust der AAA-Proteasen in den Mitochondrien die Integrität der gesamten Zelle beeinträchtigen könnte.

Zur Untersuchung AAA-proteasedefizienter Hefemutanten wurden daher mehrere typische Charakteristika von Zellen mit einer defekten PKC-MAPKinase Signalkaskade in dieser Arbeit als Vergleichskriterien verwendet: Zellen mit Beeinträchtigung in ihrer Zellintegrität sind nicht mehr in der Lage, eine intakte Zellwand aufzubauen (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992) und sind gegenüber dem Purinanalogon Koffein hypersensitiv, was auf Störungen innerhalb des Zellzyklus hinweist (Gray *et al.*, 1997; de Bettignies *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999; Nierras und Warner, 1999). Auch ließ sich nachweisen, dass Zellen mit Beeinträchtigungen in ihrer Zellintegrität durch nekrotische Prozesse sterben (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992; Errede *et al.*, 1995; Buehrer und Errede, 1997; de Bettignies *et al.*, 1999; Mazzoni *et al.*, 2005).

Zunächst wurde durch die Vitalfärbung mit Methylenblau nachgewiesen, dass AAA-proteasedefiziente Zellen keine intakten Zellwände mehr aufbauen konnten. Jedoch ließ sich der Wachstumsdefekt unter hyperosmotischen Bedingungen unterdrücken. Ebenfalls waren die Defekte in osmotisch stabilisierender Umgebung, wie z.B. in Flüssigkultur, supprimierbar. Möglicherweise konnten unter hypoosmotischen Bedingungen in AAA-proteasedefizienten Zellen die destabilisierten Zellwände dem Stress nicht standhalten. Auch wurde beobachtet, dass der gleichzeitige Funktionsausfall des temperatursensitiven Allels von *yta10^{ts}* und die Deletion des Allels *YME1* nicht nur unter Hitzestress, sondern auch in Anwesenheit von Koffein für Zellen von *S. cerevisiae* synthetisch letal wirkte. Damit müsste auch wie in Zellen mit beeinträchtigter Zellintegrität der Zellzyklus gestört sein. Ferner ließen sich auch mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumjodid Zell-Lyse sowohl in Zellen der Hefemutanten *yta10^{ts}* als auch in *yta10^{ts}Δyme1* nachweisen. Dies zeigte, dass dieses Charakteristikum für eine defekte Zellintegrität auch in AAA-proteasedefizienten Zellen anzutreffen ist.

Es ist bekannt, dass die PKC-MAPKinase Signalkaskade im Cytoplasma lokalisiert ist und durch ihre Aktivierung mehrere Zellkompartimente, wie z.B. Zellwand, Cytoplasma, Zellkern sowie der Sekretionsapparat aus Golgi und endoplasmatischem Retikulum reguliert werden (Heinisch *et al.*, 1999; Schmitz und Heinisch, 2003). Im allgemeinen werden somit neue Zellwandkomponenten und die notwendigen Lipide zur Synthese neuer Membranen zur Verfügung gestellt. Bisher ist nicht bekannt, welche Rolle Mitochondrien für die Zellintegrität bzw. für den Zellwandaufbau spielen. Jedoch weist die Analyse der konditional letalen Hefemutante *yta10^{ts}Δyme1* darauf hin, dass die Zellintegrität durch einen gleichzeitigen Funktionsausfall der *m*- und *i*-AAA-Protease betroffen sein muss.

Ebenfalls wurden Zellen mit deletierter Untereinheit der AAA-Protease ($\Delta yta10$ und $\Delta yme1$) auf charakteristische Merkmale von Zellen mit einer defekten PKC-MAPKinase Signalkaskade überprüft. Jedoch ließ sich hier keine Destabilisierung der Zellwände nachweisen. Auch konnte keine Koffeinsensitivität, die vergleichbar mit der von $yta10^{fs}\Delta yme1$ ist, beobachtet werden. Offenbar beeinträchtigen die in diesen Zellen auftretenden mitochondrialen Defekte nicht die Integrität der Zelle. Da die *m*- und *i*-AAA-Protease überlappende Substratspezifität besitzen, ist vorstellbar, dass nur ein gleichzeitiger Funktionsausfall beider AAA-Proteasen zu einer schädigenden Anhäufung fehlgefalteter bzw. nicht assemblierter Proteine führte, die auch die Zellintegrität beeinträchtigte. Währenddessen könnte in Mitochondrien nach einem Funktionsausfall nur einer AAA-Protease die verbleibende Protease noch genügend Restaktivität besitzen, um die fehlende zu ersetzen und damit eine intakte Zellwand und Zellintegrität aufrecht zu halten.

Morphologische Untersuchungen sollten Aufschluss geben, ob bzw. inwieweit die Mutationen des mitochondrialen proteolytischen Systems die gesamte Zellstruktur beeinflussen können. Zellen mit deletierter bzw. punktmutierter Untereinheit der *m*- bzw. *i*-AAA-Proteasenuntereinheit hatten verstärkt granuläre Strukturen angehäuft. Untersuchungen an der konditional letalen Doppelmutante $yta10^{fs}\Delta yme1$ zeigten, dass auch hier vermehrt granuläre Strukturen gebildet wurden. Zudem hatte sich der Zellkörper von $yta10^{fs}\Delta yme1$ um das 4- bis 5-fache im Vergleich zu einer Wildtypzelle vergrößert, was häufig letztlich zur Lyse der Zelle führte.

Auch in Zellen mit einer defekte Zellintegrität häufen sich vermehrt aggregierte Vesikel und granuläre Strukturen an. Es wird vermutet, dass diese durch Mängel im Sekretionsweg zur Synthese von neuen Plasmamembranen verursacht werden (Nierras und Warner, 1999). Ebenfalls führt eine reduzierte Zellteilung, die durch einen defekten Zellzyklus verursacht wird, zu großen und runden Zellkörpern. Auch konnten diese Zellen kaum Knospen ausbilden (Gray *et al.*, 1997).

Die auffällige Zellvergrößerung ist auch ein Hinweis, dass der Zellzyklus durch den Defekt der *m*- und *i*-AAA-Protease betroffen sein könnte. Zellen mit beeinträchtigter Zellintegrität arretieren unter restriktiven Bedingungen ihren Zellzyklus zwischen der G1 und S Phase. Dadurch ist deren Zellkörper stark vergrößert und die Zellwand destabilisiert (Madden *et al.*, 1997). Mutationen im PKC-MAPKinase-System beeinträchtigen den Zellzyklus in so weitem Maß, dass sich Zellen mit defekter Zellintegrität ebenso verhalten wie die Zellzyklusmutanten *cdc 28* oder *swi4* (Gray *et al.*, 1997; Mazzoni *et al.*, 2005). Auch diese Mutanten sind nicht

mehr in der Lage, sich korrekt zu teilen und dabei intakte Knospen abzutrennen. Ebenfalls ist ihr Zellkörper aufgrund der fehlenden Teilungsprozesse stark vergrößert.

Die Wachstumsdefekte der konditional letalen Hefemutante *yta10^{ts}Δyme1* lassen sich nicht nur durch die Aktivierung der PKC-MAPKinase Signalkaskade unterdrücken. Diese analytischen Studien konnten zusätzlich zeigen, dass die AAA-proteasedefiziente Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* die gleichen Phänotypen von Zellen mit beeinträchtigter Zellintegrität besitzt. Auch Zellen, die weder über eine intakte *m*- noch *i*-AAA-Protease verfügen, können wie PKC-Mutanten keine intakte Zellwand synthetisieren und sterben durch Zell-lytische Prozesse. Defekte im Zellzyklus machen diese konditional letalen Zellen gegenüber dem Purinanalogen Koffein hypersensitiv und führen offensichtlich auch zu Mängeln im Sekretionsweg zur Synthese von neuen Plasmamembranen, die zu einer Akkumulation von granulären Strukturen führt.

Die Vergrößerung des Zellkörpers ließ sich aber nicht an Zellen der Einzelmutanten der *m*- bzw. *i*-AAA-Protease ($\Delta yta10$, *yta10^{ts}* bzw. $\Delta yme1$) beobachten. Dass nur der gemeinsame Ausfall der *m*- bzw. *i*-AAA-Protease in der konditional letalen Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* spezifisch die Zellintegrität und möglicherweise auch den Zellzyklus beeinträchtigt, liefert einen weiteren Hinweis für die überlappenden Funktionen der *m*- und *i*-AAA-Protease.

4.1.5 AAA-proteasedefiziente Hefezellen besitzen abnormale Mitochondrienstrukturen

Bereits 1994 konnte beobachtet werden, dass eine Deletion der *i*-AAA-Proteasenuntereinheit Yme1 in Zellen von *S. cerevisiae* zu Veränderungen der mitochondrialen Morphologie führte. Diese Zellen waren nicht mehr in der Lage, ein tubuläres Netzwerk von Mitochondrien auszubilden. Stattdessen fragmentierten sie bei 37°C auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (Campbell *et al.*, 1994). Es sollte daher überprüft werden, ob der gleichzeitige Funktionsausfall der *m*- und *i*-AAA-Proteasen die morphologischen Veränderungen des Organells verstärken kann. Bislang konnten zahlreiche Proteine mit Bedeutung für die Aufrechterhaltung mitochondrialer Morphologie und für die DNA-Weitergabe von Mitochondrien detektiert werden (Dimmer *et al.*, 2002). Insbesondere trifft dies auf *MDM* („mitochondrial distribution & morphology“) Gene zu (Jensen, 2005). In einer umfassenden Durchmusterung morphologieverändernder Faktoren fiel jedoch nicht auf, dass auch ein Defekt der *m*-AAA-Protease zum Fragmentieren von Mitochondrien führt (Dimmer *et al.*, 2002). Die mikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit offenbarten jedoch, dass auch ein

Funktionsausfall der *m*-AAA-Protease morphologische Veränderungen verursachen kann. So hat eine Deletion der *m*-AAA-Proteasenuntereinheit *YTA10* zur Folge, dass diese Zellen anstelle eines intakten mitochondrialen Netzwerks im allgemeinen fragmentierte Mitochondrien besitzen. Dagegen können Zellen der temperatursensitiven Mutante *yta10^{ts}* unter permissiven Bedingungen teilweise noch ein mitochondriales Netzwerk ausbilden. Wird aber die Temperatur auf 37°C erhöht bzw. die Zellen auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle inkubiert, führt dies zu einem Fragmentieren des Organells in *yta10^{ts}*. In Hefezellen von *yta10^{ts}Δyme1* führten die Defekte der *m*- und der *i*-AAA-Protease bereits unter permissiven Bedingungen zu einem Fragmentieren der Mitochondrien. Der vollständige Funktionsausfall beider AAA-Proteasen induzierte unter restriktiven Bedingungen schließlich ein Lysieren der Mitochondrien.

Im allgemeinen neigen Mitochondrien zum Fragmentieren, wenn die Zelle in der stationären Phase auf ihre Atmungsfähigkeit angewiesen ist. Diese Fragmentierung führt zu einer Oberflächenvergrößerung der Mitochondrien und ermöglicht so eine höhere Energiegewinnung für die gesamte Zelle (Campbell *et al.*, 1994; Yaffe, 2003). Möglicherweise versuchen *petite* Hefezellen mit Defekten in ihrer Atmungsfähigkeit ihre Oberfläche durch Fragmentieren der Mitochondrien ebenfalls zu vergrößern, um Defekte in der Atmungskompetenz auszubalancieren. Demnach würden Zellen mit defekten *m*- oder *i*-AAA-Proteasen unter nicht permissiven Wachstumsbedingungen versuchen, diesen Defekt durch Fragmentieren auszugleichen, um die Restaktivität der noch vorhandenen Protease zu erhöhen. Ein gemeinsamer Funktionsausfall beider AAA-Proteasen schränkt jedoch in Zellen von *yta10^{ts}Δyme1* nicht nur die Atmungsaktivität, sondern auch die Zellintegrität ein. Interessanterweise kann ein defekter Membranaufbau, der durch Beeinträchtigungen in der Zellintegrität verursacht wird (Nierras und Warner, 1999), zu einem Aufbrechen der Membranen führen. So konnte hier beobachtet werden, dass nicht nur Plasmamembranen aufbrachen, sondern auch mitochondriale Membranen lysierten. Dies wäre eine Erklärung für das Absterben der kompletten Zelle von *yta10^{ts}Δyme1*.

Zellen können keine Mitochondrien neu synthetisieren, vielmehr vereinigen sich die Mitochondrien zu einem Netzwerk („fusion“) und trennen sich im Laufe des Zellzyklus wieder („fission“). Diese sehr dynamische Struktur wird dabei von Proteinen bestimmt, die in diesen Prozessen involviert sind. Zwischen diesen beiden Vorgängen herrscht ein streng kontrolliertes Gleichgewicht. Der Funktionsausfall eines der Fusionsproteine führt zu einer erhöhten Rate an mitochondrialer Fragmentierung (Jensen *et al.*, 2000; Neutzner und Youle, 2005). Die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte GTPase Fzo1 (Hermann *et al.*,

1998; Rapaport *et al.*, 1998), das äußere Mitochondrienmembranprotein Ugo1 (Sesaki und Jensen, 2001) oder Mgm1, das in der Intermembran lokalisiert ist (Wong *et al.*, 2000), sind zentrale Bestandteile des Fusionsapparates. Fällt wiederum der Teilungsschritt aus, fusionieren die Mitochondrien in erhöhter Rate, so dass sie schließlich als mitochondriale Aggregate vorzufinden sind. Zum Beispiel führt ein Funktionsausfall der mit Dynamin verwandten GTPase Dnm1 (Otsuga *et al.*, 1998), des Adapterproteins Mdv1 (Cervený *et al.*, 2001; Tieu *et al.*, 2002; Cervený und Jensen, 2003) oder des äußeren Mitochondrienmembranprotein Fis1 (Cervený *et al.*, 2001; Tieu *et al.*, 2002; Cervený und Jensen, 2003) zu einer Akkumulierung von Mitochondrienaggregaten in der Zelle. Da in AAA-proteasedefizienten Zellen vermehrt fragmentierte Mitochondrien vorzufinden sind, lag die Vermutung nahe, dass AAA-Proteasen in Mitochondrien ebenfalls die Prozessierung von Fission- und Fusionproteinen übernehmen. Eventuell liegt in AAA-proteasedefizienten Zellen ein Fusionsprotein in nicht prozessierter, inaktiver bzw. nicht assemblierter Form vor. Da erst durch den Funktionsausfall beider AAA-Proteasen dieser Phänotyp zu beobachten war, müsste dieses Fusionsprotein ein gemeinsames Substrat der *m*- und *i*-AAA-Protease sein, das in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Auch ist vorstellbar, dass andere essentielle Proteine durch die Mutationen in den AAA-Proteasen nicht prozessiert werden konnten und so den Aufbau von intakten Mitochondrien verhinderten. Ein solches Substrat müsste in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sein, um sowohl von der *m*- als auch von der *i*-AAA-Protease erkannt zu werden. Jedoch ist bislang kein Substrat der AAA-Proteasen bekannt, das den Phänotyp dieser abnormalen Morphologie verursachen kann.

Eine weitere mögliche Erklärung der Fragmentierung von Mitochondrien ist, dass ein proteolytischer Ausfall der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle zu einer Anhäufung von fehlgefalteten und defekten Proteine bzw. von nicht mehr benötigten Regulatorproteinen in Mitochondrien geführt hat. Möglicherweise versucht die Zelle, diese mit nicht-nativen und fehlassemblierten Proteinen überfüllten Mitochondrien durch Autophagozytose abzubauen, um die gesamte Zelle vor schädigenden Einflüssen zu schützen.

Auch wurde untersucht, ob Sorbitol, ein hyperosmotischer Zellwandstabilisator, die mitochondriale Morphologie beeinflussen konnte. AAA-proteasedefiziente Stämme $\Delta yme1$, $yta10^{ts}$, $\Delta yta10/yta10^{ts}$ und $yta10^{ts} \Delta yme1$, die unter hyperosmotischen Bedingungen wachsen konnten, formten wieder ein tubuläres Netzwerk aus Mitochondrien. Bislang war nur bekannt, dass Sorbitol die Zellwand stabilisieren konnte (Nierras und Warner, 1999; Harrison *et al.*, 2004). Möglicherweise kann Sorbitol den Turgor innerhalb der Zelle soweit reduzieren, so dass Membranen mitochondrialer Netzwerke trotz der Mutationen der *m*- und *i*-AAA-

Protease auch stabilisiert werden. Des Weiteren führen diese Ergebnisse zu der Vermutung, dass offenbar ein kausaler Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Morphologie und der mitochondrialen Atmungsfähigkeit existieren muss.

4.1.6 Funktionelle Zusammenhänge zwischen mitochondrialen AAA-Proteasen und Zellintegrität

Zur Aufrechthaltung einer intakten mitochondrialen Funktion übernehmen in der inneren Mitochondrienmembran die *m*- und *i*-AAA Proteasen die Prozessierung von Vorläuferproteinen und die Proteinqualitätskontrolle (Pajic *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1996; Guélin *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1996; Arlt *et al.*, 1998; Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000; Nolden *et al.*, 2005). Mit dieser Studie konnten mehrere Hinweise geliefert werden, dass eine Dysfunktion dieser essentiellen Organellen die Zellintegrität beeinträchtigt. AAA-Proteasen gewährleisten nicht nur die Funktionen innerhalb von Mitochondrien, sondern beeinflussen offenbar auch die Biosynthese der Zellwand bzw. die Lipidbiosynthese zur Herstellung neuer Membranen.

Die Überexpression von Komponenten der PKC-MAPKinase Signalkaskade konnte unter restriktiven Bedingungen die synthetische Letalität der mitochondrialen Doppelmutante *yta10^{ts}Δyme1* supprimieren. Voraussichtlich führte in diesen Zellen die Aktivierung dieser Signalkaskade zu einer Transkriptionsaktivierung spezifischer Proteine, die an der Synthese von Zellwandkomponenten beteiligt sind und damit zu einer Hochregulierung der Zellwandbiosynthese führen. Dadurch konnte der durch die mitochondriale Dysfunktion verursachte Zellwanddefekt ausgeglichen werden.

Um die Integrität der Zelle zu gewährleisten, müssen unterschiedlichste Kompartimente aktiviert werden. Neben den bereits erwähnten Zellwandkomponenten, Cytoplasma und Zellkern, ist auch der Sekretionsapparat, der Golgi Apparat und das endoplasmatische Retikulum beteiligt. Sie stellen die notwendigen Komponenten zur Synthese neuer Membranen zur Verfügung (Daum *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999; Schmitz und Heinisch, 2003).

In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die AAA-Protease FtsH die Biosynthese von Lipopolysacchariden reguliert. Da die Lipid A-Biosynthese im Gleichgewicht mit der Synthese von Phospholipiden, der Hauptkomponente von Plasmamembranen, reguliert wird, wird auch die bakterielle Membransynthese von der AAA-Protease FtsH sekundär reguliert (Ogura *et al.*, 1999). In eukaryontischen Zellen findet die Phospholipidbiosynthese sowohl in

Mitochondrien, als auch im endoplasmatischen Retikulum statt. Es ist vorstellbar, dass diese Synthese im Gleichgewicht zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Mitochondrium steht. Ein Beispiel wäre das Phospholipid DAG (Diacylglycerol), das in der mitochondrialen Matrix synthetisiert wird (Daum *et al.*, 1998). Theoretisch könnten mitochondriale AAA-Proteasen diese Biosynthese direkt oder indirekt regulieren. Ein Ausfall des mitochondrialen AAA-Proteasesystems würde dem zu Folge die DAG-Synthese beeinträchtigen und schließlich würde nur in reduziertem Maß DAG der Zelle zur Membransynthese zur Verfügung stehen. Damit wäre die Zelle nicht mehr in der Lage, eine intakte Zellwand aufzubauen und die Integrität der Zelle zu gewährleisten. Ein Funktionsausfall mitochondrialer AAA-Proteasen könnte neben der Synthese von Plasmamembranen auch die von mitochondrialen Membranen beeinträchtigt haben, der zu den hier beschriebenen morphologischen Anomalien geführt hat. Um zu testen, ob die Lipidbiosynthese in konditional letalen Zellen der Mutante *yta10^{ts}Δyme1* gestört ist, könnte der Lipidgehalt der hier untersuchten Stämme bestimmt und miteinander verglichen werden. Jedoch ist über einen direkten Einfluss der mitochondrialen AAA-Proteasen auf die Synthese von Zellwandmembrankomponenten oder Phospholipiden bislang nichts publiziert worden. Ein Gegenargument ist, dass in Mitochondrien von *S. cerevisiae* nur die Phospholipidsynthese aber keine Lipid A-Biosynthese stattfindet. Da in *E. coli* FtsH primär die Lipid A-Biosynthese und nur als Folge auch die Phospholipidsynthese reguliert (Ogura *et al.*, 1999), bleibt fraglich, ob in eukaryontischen Zellen die Phospholipidsynthese direkt durch die AAA-Proteasen in Mitochondrien reguliert werden kann.

Auch ist eine weiteres Szenario vorstellbar: Möglicherweise hatte die Induktion der PKC-MAPKinase Signalkaskade zur Folge, dass nicht nur die Transkription spezifischer Zellwandkomponenten, wie z.B. die Untereinheiten der β -1-3-Glucansynthase Fks1 und Fks2, die α -1,3-Mannosyltransferase Mnn1 und die Chitinsynthase Csd2, aktiviert wurden (Igual *et al.*, 1996), sondern auch vermehrt andere mitochondriale Chaperone und Proteasen, wie z.B. der bekannte Suppressor PIM1 der Deletionsmutante Δ *yta10* bzw. Δ *yta12* (Rep *et al.*, 1996), exprimiert wurden. Diese generelle Überexpression könnte so über einen sekundären Weg die synthetische Letalität nach dem Funktionsausfall der beiden AAA-Proteasen ausbalancieren. Auch die Isolation des Co-Chaperons/Nukleotidaustauschfaktors Mge1 als Suppressor von *yta10^{ts}Δyme1* legt die Vermutung nahe, dass die synthetische Letalität über einen indirekten Weg unterdrückt werden könnte. Hsp70 ist nicht nur in der Lage, den Import bzw. die Faltung von Proteinen zu übernehmen, sondern es kann auch den Abbau fehlgefalteter Proteine induzieren. Die proteolytische Aktivität wird von einem Komplex aus den Komponenten

mtHsp70, Mge1 und einem weiteren Co-Chaperon Mdj1 (Rowley *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; Laloraya *et al.*, 1995) stimuliert. Dabei kooperiert die Hsp70 Maschinerie mit der Protease PIM1, um fehlgefaltete, matrixlokalisierte Proteine abzubauen bzw. zur Proteolyse membraninsertierter Proteine interagiert der Hsp70 Komplex mit der *m*-AAA-Protease (Wagner *et al.*, 1994; Savel'ev *et al.*, 1998). Möglicherweise stimuliert eine Überexpression von *MGE1* die mitochondriale Hsp70 Maschinerie. Jedoch müßte durch den Funktionsausfall des AAA-Proteasesystems in Zellen von *yta10^{fs}Δyme1* ein weiteres proteolytisches System durch den Hsp70 Komplex aktiviert werden, um die Funktion der ausgefallenen *m*- und *i*-AAA-Protease zu übernehmen.

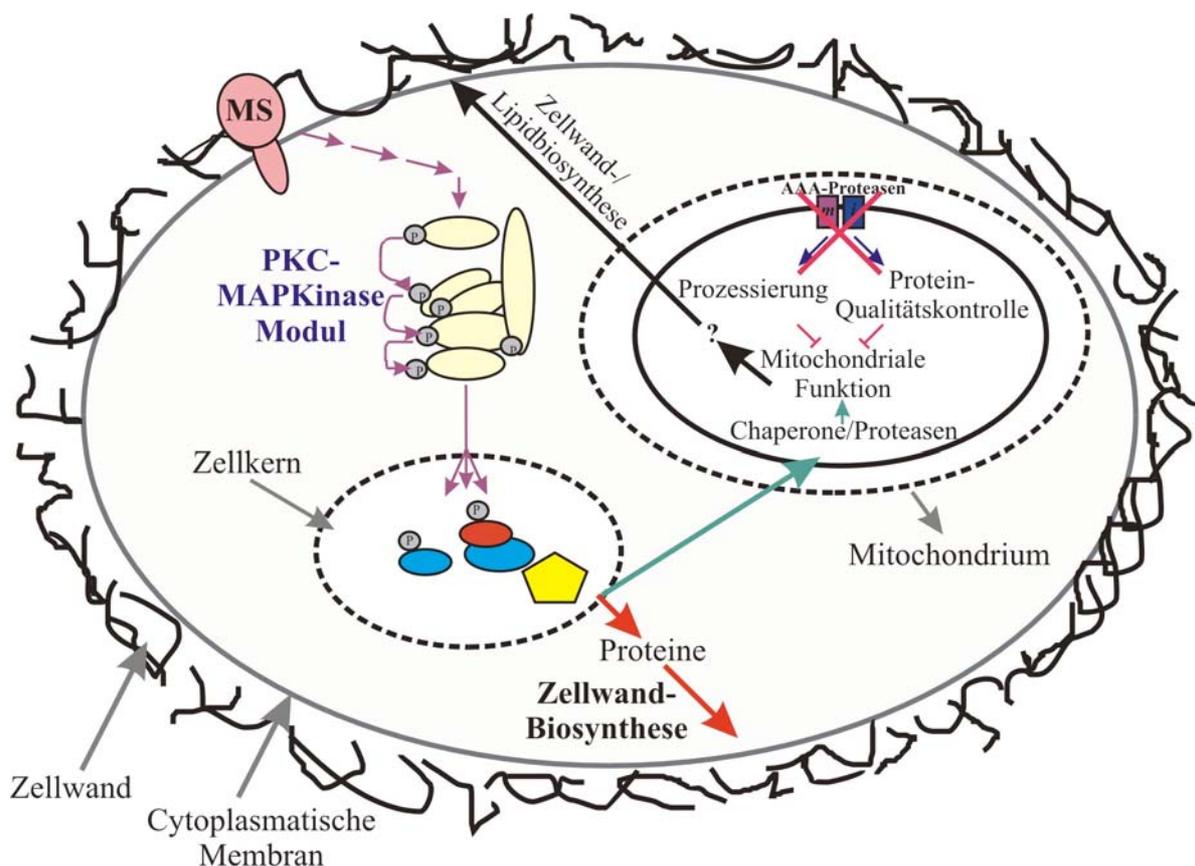


Abb. 40: Die Suppression der synthetischen Letalität von AAA-proteasedefizienten Zellen, wie z.B. *yta10^{fs}Δyme1* kann durch verschiedene Modelle erklärt werden.

Durch den Funktionsausfall der *m*- und *i*-AAA-Protease können in Mitochondrien keine Prozessierung und Proteinqualitätskontrolle durchgeführt werden. Die daraus resultierende Hemmung der mitochondrialen Funktion führt zu Beeinträchtigungen in der Zellwand- und Lipidbiosynthese. Durch Aktivierung von Mechanosensoren (MS) bzw. über direkte Aktivierung des PKC-MAPKinase Moduls wird im Zellkern die Transkription von Komponenten zur Zellwandbiosynthese induziert (roter Pfeil). Ebenfalls könnte die Aktivierung der PKC-MAPKinase Signalkaskade zu einer Expression von weiteren mitochondrialen Chaperonen

oder Proteasen führen, über die die mitochondriale Funktion und damit auch die Zellintegrität wiederhergestellt werden könnte (grüner Pfeil).

4.2 Die Rolle der Transmembrandomänen innerhalb der *m*-AAA-Protease

Die *m*-AAA-Protease ist über die Transmembrandomänen ihrer Untereinheiten Yta10 und Yta12 in der inneren Mitochondrienmembran verankert (Arlt *et al.*, 1996). Das katalytische Zentrum der *m*-AAA-Protease liegt jedoch nicht in der hydrophoben Mitochondrienmembran, sondern in der hydrophilen Umgebung der Matrix (Arlt *et al.*, 1996). Membraninserierte Substrate der *m*-AAA-Protease, die auf beiden Seiten der inneren Mitochondrienmembran hydrophile Domänen exponieren, werden im Falle einer Fehlfaltung auf der Matrixseite durch die *m*-AAA-Protease erkannt und proteolytisch abgebaut (Leonhard *et al.*, 2000). Domänen, die in den Intermembranraum exponieren, müssen aber durch die hydrophobe Membrandoppelschicht einen Weg finden, um an das katalytische Zentrum der *m*-AAA-Protease zu gelangen. Es sind zwei Möglichkeiten vorstellbar, wie hydrophile Substratdomänen durch die hydrophobe Membran an das Proteolysezentrum der AAA-Protease gelangen könnten:

Ein Modell entspricht dem Abbau von integralen Membranproteinen im endoplasmatischen Retikulum. Dort bildet Sec61 einen membraninserierten Porenkomplex, durch den Substratproteine aus dem ER in das Cytosol transportiert werden (Wiertz *et al.*, 1996; Plemper *et al.*, 1997; Zhou und Schekman, 1999). Im Cytosol angekommen, werden diese Substrate durch das 26S Proteasom anschließend proteolytisch abgebaut (Mayer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2001; Jarosch *et al.*, 2003). Bisher konnte nicht bewiesen werden, dass mitochondriale Translokasen, wie z.B. Tim17/Tim23, Tim22/Tim54 und Oxa1 an der Dislokation von Substratproteinen aus der inneren Mitochondrienmembran an das katalytische Zentrum der AAA-Proteasen beteiligt sind (Käser, 2001; Nargang *et al.*, 2002; Neupert und Brunner, 2002). Wäre dies der Fall, so würden Transmembrandomänen nur zur Verankerung des Oligokomplexes in der Membran dienen und die AAA-Proteasen nur in die räumliche Nähe ihrer abzubauenen Substrate bringen.

Untersuchungen an FtsH, dem *m*-AAA-Protease Homolog in *E. coli* zeigten, dass Transmembrandomäne essentiell für proteolytische Vorgänge ist (Makino *et al.*, 1999; Akiyama und Ito, 2000). So kam die Proteolyse membranständiger Substrate, wie z.B. YccA in bakteriellen Proteasen ohne eigene Membranverankerung nahezu zum Erliegen. Dagegen konnten Substrate von einer FtsH Variante aus eigener cytoplasmatischer Domäne und einer Transmembrandomäne eines anderen Proteins wieder abgebaut werden (Kihara *et al.*, 1999).

Auffällig war auch, dass Transmembransegmente nicht nur zur Membranverankerung beitragen, sondern auch die Oligomerisierung, die ATPase-Aktivität und die Proteaseaktivität beeinflussen können (Makino *et al.*, 1999; Akiyama und Ito, 2000; Akiyama und Ito, 2001). Alle diese Ergebnisse lieferte den ersten Hinweis, dass AAA-Proteasen selbst die Aufgabe übernehmen, Substratproteine aus der hydrophoben Umgebung an ihr hydrophiles Proteolysezentrum zu transportieren. Möglicherweise bilden die Transmembrandomänen von Yta10 und Yta12 eine hydrophile Pore, durch die Substratproteine aus dem hydrophoben Membramilieu an das Katalysezentrum gelangen können. Verschiedene Experimente sollten klären, welche Rolle die Transmembrandomänen innerhalb der *m*-AAA-Protease übernehmen. Dazu wurden Transmembrandomänen deletiert und die Auswirkungen auf die Atmungskompetenz der Zelle und Aktivität der *m*-AAA-Protease untersucht. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die Transmembrandomänen der *m*-AAA-Protease ausschließlich der Verankerung der katalytischen Domänen in der mitochondrialen Innenmembran dienen, oder ob sie unmittelbar am Abbau von Substratproteinen beteiligt sind.

4.2.1 Das Entfernen von Transmembrandomänen aus dem Komplex der *m*-AAA-Protease und die Folgen für die Atmungskompetenz der Zelle

Hefezellen mit einer inaktiven *m*-AAA-Protease können die nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle Glycerin nicht zur Energiegewinnung nutzen. Diese Zellen sind nicht in der Lage, aus kern- und mitochondrial-kodierten Untereinheiten eine intakte Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen. Diese Atmungsinkompetenz ließ sich auch an AAA-Protease defizienten Zellen beobachten, denen durch Mutationen in der Metallbindestelle oder durch Deletionen der *m*-AAA-Proteaseuntereinheit Yta10 und Yta12 die proteolytische Aktivität fehlte (Guélin *et al.*, 1994; Tauer *et al.*, 1994; Tzagoloff *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1998). Die Wachstumsfähigkeit auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle erlaubte daher, Rückschlüsse auf die proteolytische Aktivität der *m*-AAA-Protease ziehen zu können.

Die *m*-AAA-Protease, der die Membranverankerung über die Transmembrandomänen von Yta10 und Yta12 fehlte, war proteolytisch inaktiv. Diese Zellen zeigten den *petite* Phänotyp und konnten nicht die Kohlenstoffquelle Glycerin veratmen (Korbel *et al.*, 2004). Fehlte jedoch die Transmembrandomäne nur einer Untereinheit des *m*-AAA-Proteasekomplexes aus Yta10 und Yta12, führte dies nicht zu Atmungsdefizienz (Korbel *et al.*, 2004).

Um Zellen von *S. cerevisiae* die respiratorische Kompetenz zu erhalten, mussten die katalytischen Domänen von Yta10 und Yta12 über mindestens eine Transmembrandomäne in der inneren Mitochondrienmembran verankert sein. Es spielte dabei keine Rolle, welche der beiden Untereinheiten über eine eigene Transmembrandomäne verfügte.

4.2.2 Zur Aufrechterhaltung der Atmungskompetenz muß mindestens eine Untereinheit der m-AAA-Protease proteolytisch intakt sein

Frühere Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass eine Mutation in der Metallbindestelle einer der beiden Untereinheiten der *m*-AAA-Protease die Atmungsfähigkeit von Hefezellen nicht schädigte (Arlt *et al.*, 1996; Arlt *et al.*, 1998). Offenbar ist die proteolytische Aktivität einer Untereinheit ausreichend, um der Zelle ihre Atmungskompetenz zu erhalten.

Wurde in einer Untereinheit der *m*-AAA-Protease, die über keine eigene Transmembrandomäne verfügte, zusätzlich mit Hilfe einer Punktmutation in ihrer Metallbindestelle das katalytische Zentrum deaktiviert, hatte das ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die Atmungskompetenz der Zellen. Dagegen führte eine Mutation des proteolytischen Zentrums im Vollängenprotein Yta10 oder Yta12 zum *petite* Phänotyp, wenn der Partneruntereinheit der *m*-AAA-Protease zusätzlich die Transmembrandomäne fehlte (Korbel *et al.*, 2004).

Daraus lässt sich schließen, dass eine Untereinheit, die selbst keine eigene Transmembrandomäne besitzt, nicht proteolytisch aktiv ist, und dementsprechend die noch vorhandene Transmembrandomäne die mitochondriale Atmungskompetenz aufrecht hält. In einem solchen Komplex übernimmt offenbar die Vollängenuntereinheit die proteolytische Aktivität. Eine intakte Biogenese der Atmungskette ist nur dann möglich, wenn mindestens eine der beiden Untereinheiten der *m*-AAA-Protease sowohl proteolytisch aktiv ist, als auch eine eigene Transmembrandomäne besitzt. Des weiteren kann die Atmungsaktivität aber nur dann gewährleistet werden, wenn diese Vollängenuntereinheit noch mit mindestens einer katalytischen Domäne der Partneruntereinheit assembliert ist. Es stellte sich die Frage, welche Funktion eine transmembranverkürzte Untereinheit in der *m*-AAA-Protease noch übernehmen kann.

4.2.3 Die Oligomerisierung der *m*-AAA-Protease mit nur einer Transmembrandomäne

Die *m*-AAA-Protease ist nur im assemblierten Komplex proteolytisch aktiv (Arlt *et al.*, 1996). Des Weiteren konnten auch Untersuchungen am FtsH Komplex in *E. coli* zeigen, dass das zweite Segment der Transmembrandomäne an der Assemblierung von FtsH beteiligt ist (Makino *et al.*, 1999). Weiterführende Experimente an FtsH machten deutlich, dass die Transmembrandomänen zur Komplexassemblierung der Atmungskettenkomplexe essentiell sind (Akiyama und Ito, 2000).

Biochemische Untersuchungen sollten klären, inwieweit transmembranverkürzte Untereinheiten mit den Volllängenproteinen der Partneruntereinheit interagieren können bzw. im Komplex vorzufinden sind. Zunächst zeigten Gelfiltrationsanalysen, dass die Entfernung der Transmembrandomäne einer Untereinheit die Multimerisierung mit der intakten Partneruntereinheit negativ beeinträchtigte. Die *m*-AAA-Proteasenuntereinheiten konnten nicht in assemblierter Form vorgefunden werden (Korbel, 2002). Jedoch konnte durch Koimmunfällung ein assembliertes Heterooligomer aus einer Matrixdomäne von Yta10 (Yta10 Δ TM) und der Volllängenuntereinheit von Yta12 detektiert werden (Korbel *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass sich ein assemblierter Komplex nur unter milderen Versuchsbedingungen nachweisen ließ, zeigt die reduzierte Komplexstabilität. Trotzdem reicht diese reduzierte Assemblierungseffizienz der Matrixdomäne mit dem Volllängenprotein der Partneruntereinheit aus, um den *petite* Phänotyp zu unterdrücken. Dementsprechend müssten auch die Transmembrandomänen an der Assemblierung der *m*-AAA-Protease beteiligt sein. Dabei scheint die Transmembrandomäne die Lokalisation der AAA-Proteaseuntereinheiten innerhalb der inneren Mitochondrienmembran vorzugeben, die die Wahrscheinlichkeit zum Assemblieren der Untereinheiten maßgeblich erhöht. Dies würde erklären, warum eine niedrigere Expressionsrate der Matrixdomäne nicht für die Komplementation des *petite* Phänotypes und zur Assemblierung zum Heterooligomerkomplex ausreichend war. Erst eine Überexpression der Matrixdomäne konnte den Defekt, der durch die fehlende Transmembrandomäne verursacht wurde, kompensieren.

4.2.4 Bedeutung der SRH-Region für die Assemblierung und Aktivität der *m*-AAA-Protease

Analysen zu Mutationen in der Metallbindestelle des katalytischen Zentrums hatten gezeigt, dass eine Untereinheit ohne eigene Transmembrandomäne im Komplex der *m*-AAA-Protease

selbst nicht an proteolytischen Prozessen beteiligt ist. Bislang konnte nur gezeigt werden, dass die Assemblierung der Untereinheiten Yta10 und Yta12 in der *m*-AAA-Protease von essentieller Wichtigkeit ist (Arlt *et al.*, 1996). Es stellte sich die Frage, ob eine Untereinheit, die selbst keine eigene Transmembrandomäne besitzt, nur als Assemblierungspartner dient oder übt sie eine weitere essentielle Funktion im Komplex der AAA-Protease aus?

Das bakterielle *m*-AAA-Protease Homolog FtsH besitzt im Proteolysezentrum der Walkerdomäne eine hochkonservierte SRH-Region („SecRegHomology“). Studien konnten belegen, dass hochkonservierte Argininreste der SRH-Region ihre Konformation innerhalb des Komplexes ändern und in die Nachbaruntereinheit greifen. Dieser Kontakt wiederum induziert die ATPase-Aktivität der kontaktierten Nachbaruntereinheit von FtsH (Karata *et al.*, 1999; Karata *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2004). Um die ATPase-Funktion genauer zu untersuchen, wurden in der konservierten SRH-Region der transmembrandomänenmutierten *m*-AAA-Protease zwei Argininreste gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Dieser Aminosäureaustausch hatte zur Folge, dass AAA-proteasedefiziente Zellen durch die zusätzliche Expression einer Matrixdomäne den *petite* Phänotyp nicht mehr komplementieren konnten. Das heißt, obwohl die verkürzte Matrixdomäne durch ihre fehlende Membranverankerung proteolytisch inaktiv ist, wird aber ihre SRH Region zur ATPase-Aktivierung ihrer proteolytisch intakten Nachbaruntereinheit benötigt. Es wäre hilfreich, die ATPase-Aktivität AAA-defizienter Zellen zu messen und dies mit Wildtypzellen zu vergleichen. Somit ließe sich dieses Modell detaillierter verifizieren.

4.2.5 Der Einfluss von Transmembrandomänen der *m*-AAA-Protease auf die Proteolyse von Substratproteinen und die Prozessierung von Präproteinen

Um die Rolle der Transmembrandomänen der *m*-AAA-Protease während der Proteolyse weiter zu charakterisieren, wurde der Abbau verschiedener Substrate durch die mutierte *m*-AAA-Protease untersucht.

m-AAA-Proteasen, denen die Transmembrandomäne einer ihrer Untereinheiten fehlte (*Yta10* Δ *TM* bzw. *Yta12* Δ *TM*), konnten die hier überprüften integralen Substratproteine Oxa1^{ts} und Yme2 Δ C nicht abbauen. Ebenso wurden diese Substratproteine nicht in den Deletionsstämmen Δ *Yta10* bzw. Δ *Yta12* abgebaut (Korbel *et al.*, 2004). Daneben war auch ein Abbau von mitochondrialen Translationsprodukten nicht möglich (Korbel, 2002).

Während Transmembrandomänen für den Abbau von integralen Membranproteinen unentbehrlich sind, war der Abbau eines peripher assoziierten Substratproteins nur bedingt durch die fehlenden Transmembrandomänen betroffen. Das hier untersuchte Substrat Atp7 konnte in Mitochondrien der Deletionsstämme $\Delta yta10$ bzw. $\Delta yta12$ nicht abgebaut werden. Jedoch wies dieses Substrat eine signifikant geringere Stabilität in Mitochondrien der Stämme $yta10\Delta TM$ bzw. $yta12\Delta TM$ auf. Auch konnte die Prozessierung von Vorläuferproteinen, wie z.B. Ccp1, trotz der Deletion von Transmembransegmenten zumindest noch partiell durchgeführt werden. Die proteolytische Aktivität war offenbar gegenüber peripheren Membranproteinen und löslichen Proteinen durch die Entfernung der Transmembranregion kaum beeinträchtigt. Diese Substrate können anscheinend direkt an das katalytische Zentrum in der Matrix gelangen, um dort abgebaut bzw. prozessiert zu werden.

Am AAA-Protease Homolog FtsH in *E. coli* konnte gezeigt werden, wie maßgeblich die Funktion der Transmembrandomäne die proteolytische Aktivität des Enzymkomplexes beeinflusst (Akiyama und Ito, 2000). Eine Überexpression der cytoplasmatischen katalytischen Domäne von *FTSH* konnte den proteolytischen Defekt einer Deletionsmutante von $\Delta ftsH$ in *E. coli* nicht komplementieren. Erst die zusätzliche Expression einer Transmembrandomäne eines Hefeproteins ermöglichte es, die proteolytische Aktivität wieder herzustellen.

Diese Befunde belegen, dass Transmembrandomänen der AAA-Proteasen während der Proteolyse mehr Funktionen übernehmen, als nur das katalytische Zentrum in die räumliche Nähe der Substrate zu bringen bzw. die Protease in der Membran zu verankern.

4.2.6 Die Funktionen der Transmembrandomänen innerhalb des m-AAA-Proteasekomplexes

Auf den ersten Blick erschien es überraschend, dass Zellen von *S. cerevisiae*, die nur eine Untereinheit der *m*-AAA-Protease besaßen, nach Überexpression der fehlenden Matrixdomäne in ihrer Atmungskompetenz nicht mehr eingeschränkt waren, obwohl keine integralen Membranproteine abgebaut werden konnten (Korbel *et al.*, 2004). Dies steht jedoch in Einklang mit jüngeren Befunden, nach denen die Biogenese der Atmungskette nicht vom Abbau von integralen Membranproteinen abhängt. Nolden *et al.* konnten zeigen, dass die Atmungsdefizienz von Zellen in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease durch eine defekte Prozessierung des lokalen ribosomalen Proteins MrpL32 erklärt werden kann (Nolden *et al.*, 2005). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der heterolog exprimierte

AAA-Proteasekomplex aus einer Vollängenuntereinheit und einer Matrixdomäne einzelne proteolytische Schnitte, wie z.B. während der Prozessierung von Vorläuferproteinen, noch durchführen konnte. Somit konnte offensichtlich neben Ccp1 auch endogenes MrpL32 prozessiert werden, und die Biogenese der mitochondrialen Atmungskette war nicht weiter beeinträchtigt (Nolden *et al.*, 2005). Es ist denkbar, dass nur die Funktion der Matrixdomäne benötigt wird, um Prozessierungsschritte von Vorläuferproteinen durchzuführen. Transmembrandomänen der *m*-AAA-Proteaseuntereinheit spielen anscheinend hierbei nur eine untergeordnete Rolle und werden nur als eine Mindestverankerung in der inneren Mitochondrienmembran benötigt.

Dagegen scheinen Transmembrandomänen innerhalb des AAA-Proteasekomplexes essentiell zu sein, um die Proteinqualitätskontrolle und damit den Abbau von integralen Substratproteinen zu gewährleisten. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die Stabilisierung von Membranproteinen nur durch eine mangelhafte Verankerung der *m*-AAA-Protease in der inneren Mitochondrienmembran verursacht wurde. Untereinheiten von AAA-Proteasen assemblieren vermutlich zu einem ringförmigen Komplex (Zhang *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2004). Möglicherweise wird diese Assemblierung und damit die Aktivierung der Protease auch durch die Transmembrandomänen der einzelnen Untereinheiten gefördert (Makino *et al.*, 1999; Akiyama und Ito, 2001). Dadurch könnte folglich eine porenähnliche Struktur innerhalb der Membran entstehen. Durch diesen Kanal könnten integrale Membranproteine transferieren, um an das katalytische Zentrum der *m*-AAA-Protease zu gelangen. Fehlte dieser postulierte Kanal, konnten integrale Substrate nicht aus der Membran extrahiert und deshalb nicht von der *m*-AAA-Protease abgebaut werden. Dagegen scheinen Vorläuferproteine und peripher assoziierte Substrate nicht auf die Funktion der Transmembransegmente angewiesen zu sein und können so an das katalytische Zentrum der AAA-Protease gelangen.

Es sind weitere Untersuchungen nötig, ob integrale Membranproteine von der *m*-AAA-Protease mit einer fehlenden Transmembrandomäne überhaupt erkannt und damit an den Komplex gebunden werden können. Dies würde weitere Informationen zur Funktion der Transmembrandomäne liefern. Möglicherweise ist auch ein Zwischenschritt zwischen Substraterkennung und Proteolyse, d.h. die Translokation und Extraktion des abzubauenen Substrates aus der Membran, unterbrochen.

5. Zusammenfassung

ATP-abhängige AAA-Proteasen in der inneren Mitochondrienmembran spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Qualitätskontrolle und während der Biogenese der Atmungskettenkomplexe. Ein Funktionsausfall der *m*- bzw. *i*-AAA-Protease in *S. cerevisiae* führt zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung und des Zellwachstums auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Eine gleichzeitige Inaktivierung beider AAA-Proteasen wirkt für Hefezellen synthetisch letal.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Ursache dieser genetischen Wechselwirkung beider AAA-Proteasen anhand des konditional letalen Hefestammes *yta10^{ts}Δyme1* näher charakterisiert werden. Dieser Stamm trägt ein temperatursensitives Allel von *YTA10* und verfügt durch eine Deletion von *YME1* über keine *i*-AAA-Protease. In einem genetischen „Screen“ konnten fünf Komponenten der PKC-MAPKinase Signalkaskade und das Co-Chaperon Mge1 als Suppressoren identifiziert werden, deren Überexpression die synthetische Letalität von *yta10^{ts}Δyme1* Zellen unterdrückt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Inaktivierung beider AAA-Proteasen Auswirkungen sowohl auf die mitochondriale Morphologie als auch auf die Integrität der gesamten Zelle hat. So führt eine Destabilisierung der Zellwände zur Nekrose AAA-proteasedefizienter Zellen. Zellzyklusdefekte führen zu einer Hypersensitivität gegenüber Koffein und zu einer auffälligen Vergrößerung dieser Zellen. Daneben häufen sich auch vermehrt granuläre Strukturen an, was auf einen gestörten Sekretionsapparat hinweist. So ließ sich zeigen, dass eine mitochondriale Dysfunktion, verursacht durch einen Funktionsausfall der *m*- und *i*-AAA-Proteasen, offensichtlich die Zellintegrität beeinträchtigt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der Transmembrandomänen von Untereinheiten der *m*-AAA-Protease während der Proteolyse untersucht. Es konnte am Beispiel der Cytochrom *c* Peroxidase gezeigt werden, dass die Deletion der Transmembrandomäne einer Untereinheit der *m*-AAA-Protease nicht zum vollständigen Verlust der proteolytischen Aktivität führt. Entsprechend war in diesen Zellen die Biogenese von Atmungskettenkomplexen und damit die Atmungskompetenz dieser Hefezellen nicht eingeschränkt. Dagegen führte das Fehlen der Transmembrandomäne einer Untereinheit zur Hemmung des Abbaus von membranintegrierten Proteinen bzw. konnte der Abbau von peripheren Membranproteinen nur partiell durchgeführt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Transmembrandomänen der *m*-AAA-Protease an der Dislokation von integralen Proteinen aus der Membran beteiligt sind und eine Voraussetzung für deren Abbau durch die *m*-AAA-Protease sind.

6. Literatur

- Abeliovich, H., and Klionsky, D. J. (2001). Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 463-479.
- Adam, Z., Adamska, I., Nakabayashi, K., Ostersetzer, O., Haussuhl, K., Manuell, A., Zheng, B., Vallon, O., Rodermel, S. R., Shinozaki, K., and Clarke, A. K. (2001). Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis*. A proposed nomenclature. *Plant Physiol* 125, 1912-1918.
- Akiyama, Y., and Ito, K. (2000). Roles of multimerization and membrane association in the proteolytic functions of FtsH (HflB). *EMBO J* 19, 3888-3895.
- Akiyama, Y., and Ito, K. (2001). Roles of homooligomerization and membrane association in ATPase and proteolytic activities of FtsH in vitro. *Biochemistry* 40, 7687-7693.
- Akiyama, Y., and Ito, K. (2003). Reconstitution of membrane proteolysis by FtsH. *J Biol Chem* 278, 18146-18153.
- Akkaraju, G. R., and Basu, A. (2000). Overexpression of protein kinase C- η attenuates caspase activation and tumor necrosis factor- α -induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 103-107.
- Altamura, N., Capitano, N., Bonnefoy, N., Papa, S., and Dujardin, G. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of the cytochrome *c* oxidase and the oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett* 382, 111-115.
- Altmann, K., and Westermann, B. (2005). Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16, 5410-5417.
- 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.
- 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.
- Banuett, F. (1998). Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 249-274.

- Bateman, J. M., Iacovino, M., Perlman, P. S., and Butow, R. A. (2002). Mitochondrial DNA instability mutants of the bifunctional protein Ilv5p have altered organization in mitochondria and are targeted for degradation by Hsp78 and the Pim1p protease. *J Biol Chem* 277, 47946-47953.
- Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Miachelis, G., and Pratje, E. (1994). *PET1402*, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol Gen Genet* 245, 272-278.
- Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* 122, 1-63.
- Bieniossek, C., Schalch, T., Bumann, M., Meister, M., Meier, R., and Baumann, U. (2006). The molecular architecture of the metalloprotease FtsH. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 in press*.
- Buehrer, B. M., and Errede, B. (1997). Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 6517-6525.
- 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.
- Campbell, C. L., and Thorsness, P. E. (1998). Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in *yme1* yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J Cell Sci* 111, 2455-2464.
- 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.
- Cervený, K. L., McCaffery, J. M., and Jensen, R. E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol Biol Cell* 12, 309-321.
- Cervený, K. L., and Jensen, R. E. (2003). The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol Biol Cell* 14, 4126-4139.
- Checler, F., and Vincent, B. (2002). Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends Neurosci* 25, 616-620.
- Confalonieri, F., and Duguët, M. (1995). A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *BioEssays* 17, 639-650.
- 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.
- Costigan, C., Gehrung, S., and Snyder, M. (1992). A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol Cell Biol* 12, 1162-1178.
- Costigan, C., and Snyder, M. (1994). SLK1, a yeast homolog of MAP kinase activators, has a RAS/cAMP-independent role in nutrient sensing. *Mol Gen Genet* 243, 286-296.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann Rev Biochem* 65, 801-847.
- Craig, E. A. (1989). Essential roles of 70kDa heat inducible proteins. *Bioessays* 11, 48-52.
- Craig, E. A., Kramer, J., Shilling, J., Werner-Washburne, M., Holmes, S., Kusic-Smithers, J., and Nicolet, C. M. (1989). *SSCI*, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol Cell Biol* 9, 3000-3008.
- Daum, G., Lees, N. D., Bard, M., and Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1471-1510.
- Davenport, K. R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D. E., and Gustin, M. C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem* 270, 30157-30161.
- de Bettignies, G., Barthe, C., Morel, C., Peypouquet, M. F., Doignon, F., and Crouzet, M. (1999). RGD1 genetically interacts with MID2 and SLG1, encoding two putative sensors for cell integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1719-1731.
- De Mot, R., Nagy, I., Walz, J., and Baumeister, W. (1999). Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. *Trends Microbiol* 7, 88-92.
- de Nadal, E., Alepuz, P. M., and Posas, F. (2002). Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* 3, 735-740.
- 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.
- Desautels, M., and Goldberg, A. L. (1982). Demonstration of an ATP-dependent, vanadate-sensitive endoprotease in the matrix of rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 257, 11673-11679.
- Desautels, M., and Goldberg, A. L. (1982). Liver mitochondria contain an ATP-dependent, vanadate-sensitive pathway for the degradation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 1869-1873.
- Devenish, R. J., Prescott, M., Roucou, X., and Nagley, P. (2000). Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim Biophys Acta* 1458, 428-442.
- Dimmer, K. S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., and Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 847-853.
- Dodou, E., and Treisman, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 17, 1848-1859.
- Edwards, S. L., Kraut, J., and Poulos, T. L. (1988). Crystal structure of nitric oxide inhibited cytochrome *c* peroxidase. *Biochemistry* 27, 8074-8081.
- Errede, B., Cade, R. M., Yashar, B. M., Kamada, Y., Levin, D. E., Irie, K., and Matsumoto, K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev* 42, 477-485.
- 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.
- 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.
- Frickey, T., and Lupas, A. N. (2004). Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol* 146, 2-10.
- Friedrichs, B. (2004) Untersuchungen zur Prozessierung des Proteins Cytochrom *c*-Peroxidase aus *S. cerevisiae*, Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Fröhlich, M. (2005) Funktionen molekularer Chaperone in der Qualitätskontrolle zytosolischer Proteine, Dissertation, Universität zu Köln.
- 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.
- 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.
- 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.
- Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Pena, J. M., Francois, J., Nombela, C., and Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* 279, 15183-15195.
- Garrido, G. E., Furuie, S. S., Buchpiguel, C. A., Bottino, C. M., Almeida, O. P., Cid, C. G., Camargo, C. H., Castro, C. C., Glabus, M. F., and Busatto, G. F. (2002). Relation between medial temporal atrophy and functional brain activity during memory processing in Alzheimer's disease: a combined MRI and SPECT study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 508-516.
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Bliek, A. M., and Spelbrink, J. N. (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell* 14, 1583-1596.
- 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.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355-360.
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-899.
- Gomes, K. N., Freitas, S. M., Pais, T. M., Fietto, J. L., Totola, A. H., Arantes, R. M., Martins, A., Lucas, C., Schuller, D., Casal, M., *et al.* (2005). Deficiency of Pkc1 activity affects glycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 5, 767-776.
- Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891-2906.
- Graef, M. a. L., T. (2006). Substrate specific consequences of central pore mutations in the *i*-AAA protease Yme1 on substrate engagement. in press.

- Gray, J. V., Ogas, J. P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D. E., and Herskowitz, I. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *Embo J* 16, 4924-4937.
- Gray, M. W. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet* 5, 294-299.
- Green, R., Lesage, G., Sdicu, A. M., Menard, P., and Bussey, H. (2003). A synthetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* stress sensor Mid2p, and identification of a Mid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Microbiology* 149, 2487-2499.
- 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.
- Guo, F., Maurizi, M. R., Esser, L., and Xia, D. (2002). Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease. *J Biol Chem* 277, 46743-46752.
- Hall-Jackson, C. A., Cross, D. A., Morrice, N., and Smythe, C. (1999). ATR is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK. *Oncogene* 18, 6707-6713.
- 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.
- Hampton, R. Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* 14, 476-482.
- Hanekamp, T., and Thorsness, P. E. (1996). Inactivation of *YME2/RNA12*, which encodes an integral inner mitochondrial membrane protein, causes increased escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 2764-2771.
- Hanekamp, T., and Thorsness, P. E. (1999). *YNT20*, a bypass suppressor of *yme1 yme2*, encodes a putative 3'-5' exonuclease localized in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 34, 438-448.
- Hanson, P. I., and Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 519-529.
- 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.
- Harrison, J. C., Bardes, E. S., Ohya, Y., and Lew, D. J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol* 3, 417-420.
- Harrison, J. C., Zyla, T. R., Bardes, E. S., and Lew, D. J. (2004). Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J Biol Chem* 279, 2616-2622.
- Hattendorf, D. A., and Lindquist, S. L. (2002). Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *Embo J* 21, 12-21.
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P., and Jacoby, J. J. (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 32, 671-680.
- 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., 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.
- Helliwell, S. B., Howald, I., Barbet, N., and Hall, M. N. (1998). TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 99-112.
- Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J., and Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143, 359-373.
- Herrmann, J. M., Neupert, W., and Stuart, R. A. (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J* 16, 2217-2226.
- Herrmann, J. M., and Neupert, W. (2003). Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* 55, 219-225.
- Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80, 187-197.
- Hinnerwisch, J., Fenton, W. A., Furtak, K. J., Farr, G. W., and Horwich, A. L. (2005). Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation. *Cell* 121, 1029-1041.
- Hohfeld, J., Cyr, D. M., and Patterson, C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep* 2, 885-890.
- Hooper, N. M. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* 354, 1-6.
- 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.
- Huang, W. P., and Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct* 27, 409-420.
- Igual, J. C., Johnson, A. L., and Johnston, L. H. (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *Embo J* 15, 5001-5013.
- Ikeda, E., Yoshida, S., Mitsuzawa, H., Uno, I., and Toh-e, A. (1994). YGE1 is a yeast homolog of *Escherichia coli* grpE and is required for maintenance of mitochondrial functions. *FEBS Lett* 339, 265-268.
- Irie, K., Takase, M., Lee, K. S., Levin, D. E., Araki, H., Matsumoto, K., and Oshima, Y. (1993). MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 13, 3076-3083.
- Ishii, H., Koya, D., and King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 76, 21-31.
- 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. (2003). Disorders of mitochondrial protein synthesis. *Hum Mol Genet* 12, R293-301.
- Jacoby, J. J., Nilus, S. M., and Heinisch, J. J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol Gen Genet* 258, 148-155.
- Jarosch, E., Lenk, U., and Sommer, T. (2003). Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int Rev Cytol* 223, 39-81.
- Jensen, R. E., Hobbs, A. E., Cerveny, K. L., and Sesaki, H. (2000). Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc Res Tech* 51, 573-583.
- Jensen, R. E. (2005). Control of mitochondrial shape. *Curr Opin Cell Biol* 17, 384-388.
- 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.

- Jung, U. S., and Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* 34, 1049-1057.
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J., and Levin, D. E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* 9, 1559-1571.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C. P., Anraku, Y., Ohya, Y., and Levin, D. E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem* 271, 9193-9196.
- Kambacheld, M., Augustin, S., Tatsuta, T., Müller, S., and Langer, T. (2005). Role of the novel metallopeptidase MOP112 and saccharolysin for the complete degradation of proteins residing in different subcompartments of mitochondria. *J Biol Chem* 280, 20132-20139.
- Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A., and Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348, 137-143.
- 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.
- Käser, M., and Langer, T. (2000). Protein degradation in mitochondria. *Sem Cell Dev Biol* 11, 181-190.
- Käser, M. (2001) Untersuchungen proteolytischer Prozesse in der Innen- und Außenmembran von Mitochondrien, Dissertation, Institut für Physiologische Chemie, Universität München.
- 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.
- Kermorgant, M., Bonnefoy, N., and Dujardin, G. (1997). Oxa1p, which is required for cytochrome *c* oxidase and ATP synthase complex formation, is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Curr Genet* 31, 302-307.
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* 181, 3330-3340.
- 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.

- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1999). Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J* 18, 2970-2981.
- Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R., and Nishizuka, Y. (1983). Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 258, 11442-11445.
- Kim, D. Y., and Kim, K. K. (2003). Crystal structure of ClpX molecular chaperone from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 278, 50664-50670.
- 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.
- Koehler, C. M. (2004). New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 309-335.
- Kopecka, M., and Gabriel, M. (1992). The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 158, 115-126.
- Korbel, D. (2002) Die Proteolyse von Membranproteinen: Untersuchungen zur Rolle der Transmembrandomänen der *m*-AAA-Protease in Mitochondrien, Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- 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., Sichtung, 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, S. A., and Gray, J. V. (2002). The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 12, 588-593.
- 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.
- Krzewska, J., Langer, T., and Liberek, K. (2001). Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in *Saccharomyces cerevisiae*, cooperates with Hsp70 in protein refolding. *FEBS Lett* 489, 92-96.
- Krzywda, S., Brzozowski, A. M., Verma, C., Karata, K., Ogura, T., and Wilkinson, A. J. (2002). The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5Å resolution. *Structure* 10, 1073-1083.
- Laemmli, U. K., Beguin, F., and Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47, 69-85.
- Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D., and Francois, J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 20345-20357.
- Laloraya, S., Gambill, B. D., and Craig, E. (1994). A role for a eukaryotic GrpE-related protein, Mge1p, in protein translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6481-6485.
- Laloraya, S., Dekker, P. J. T., Voos, W., Craig, E. A., and Pfanner, N. (1995). Mitochondrial GrpE modulates the function of matrix Hsp70 in translocation and maturation of preproteins. *Mol Cell Biol* 15, 7098-7105.
- Langer, T. (2000). AAA proteases - cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 25, 207-256.

- Langer, T., Käser, M., Klanner, C., and Leonhard, K. (2001). AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochemical Society Transactions* 29, 431-436.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K. U., and Breitenbach, M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol Microbiol* 39, 1166-1173.
- Lee, C., Schwartz, M. P., Prakash, S., Iwakura, M., and Matouschek, A. (2001). ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol Cell* 7, 627-637.
- Lee, K. S., and Levin, D. E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol* 12, 172-182.
- Lee, K. S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K., and Levin, D. E. (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 13, 3067-3075.
- Lee, S., Sowa, M. E., Watanabe, Y. H., Sigler, P. B., Chiu, W., Yoshida, M., and Tsai, F. T. (2003). The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* 115, 229-240.
- 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.
- Lemaire, C., Guibet-Grandmougin, F., Angles, D., Dujardin, G., and Bonnefoy, N. (2004). A yeast mitochondrial membrane methyltransferase-like protein can compensate for *oxa1* mutations. *J Biol Chem* 279, 47464-47472.
- 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., Pellechia, 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.
- Levin, D. E., Fields, F. O., Kunisawa, R., Bishop, J. M., and Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* 62, 213-224.
- Levin, D. E., and Bartlett-Heubusch, E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol* 116, 1221-1229.
- Levin, D. E., Bowers, B., Chen, C. Y., Kamada, Y., and Watanabe, M. (1994). Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* 40, 229-239.
- Levin, D. E., and Errede, B. (1995). The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 7, 197-202.

- Li, Y., Moir, R. D., Sethy-Coraci, I. K., Warner, J. R., and Willis, I. M. (2000). Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. *Mol Cell Biol* 20, 3843-3851.
- Li, Y., Dudek, J., Guiard, B., Pfanner, N., Rehling, P., and Voos, W. (2004). The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18. *J Biol Chem* 279, 38047-38054.
- Liu, J., Smith, C. L., DeRyckere, D., DeAngelis, K., Martin, G. S., and Berger, J. M. (2000). Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol Cell* 6, 637-648.
- Liu, T., Lu, B., Lee, I., Ondrovicova, G., Kutejova, E., and Suzuki, C. K. (2004). DNA and RNA binding by the mitochondrial Lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *J Biol Chem* 279, 13902-13910.
- Lommel, M., Bagnat, M., and Strahl, S. (2004). Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-mannosylation mutants. *Mol Cell Biol* 24, 46-57.
- 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.
- Lorberg, A., Schmitz, H. P., Jacoby, J. J., and Heinisch, J. J. (2001). Lrg1p functions as a putative GTPase-activating protein in the Pkc1p-mediated cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 266, 514-526.
- 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.
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M. T., Barrientos, A., and Corte-Real, M. (2002). Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 2598-2606.
- 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.
- Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S. B., Horenstein, C. I., Chen-Weiner, J., Ram, A. F., Kapteyn, J. C., *et al.* (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147, 435-450.
- Madden, K., Sheu, Y. J., Baetz, K., Andrews, B., and Snyder, M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* 275, 1781-1784.
- Madeo, F., Fröhlich, E., and Fröhlich, K.-U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* 139, 729-734.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S., and Fröhlich, K.-U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9, 911-917.
- Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T., and Fröhlich, K. U. (2004). Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 7, 655-660.
- Madhani, H. D., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1997). MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* 91, 673-684.

- Makino, S., Makino, T., Abe, K., Hashimoto, J., Tatsuta, T., Kitagawa, M., Mori, H., Ogura, T., Fujii, T., Fushinobu, S., *et al.* (1999). Second transmembrane segment of FtsH plays a role in its proteolytic activity and homo-oligomerization. *FEBS Lett* 460, 554-558.
- Marcoux, N., Bourbonnais, Y., Charest, P. M., and Pallotta, D. (1998). Overexpression of MID2 suppresses the profilin-deficient phenotype of yeast cells. *Mol Microbiol* 29, 515-526.
- Marini, N. J., Meldrum, E., Buehrer, B., Hubberstey, A. V., Stone, D. E., Traynor-Kaplan, A., and Reed, S. I. (1996). A pathway in the yeast cell division cycle linking protein kinase C (Pkc1) to activation of Cdc28 at START. *Embo J* 15, 3040-3052.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 1511-1519.
- Maurizi, M. R. (1992). Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* 48, 178-201.
- Mayer, T. U., Braun, T., and Jentsch, S. (1998). Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *EMBO J* 17, 3251-3257.
- Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A., and Mann, C. (1993). The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 123, 1821-1833.
- Mazzoni, C., Herker, E., Palermo, V., Jungwirth, H., Eisenberg, T., Madeo, F., and Falcone, C. (2005). Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast. *EMBO Rep* 6, 1076-1081.
- 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.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T. (1998). Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* 392, 303-306.
- Mock, W. L., and Stanford, D. J. (1996). Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry* 35, 7369-7377.
- Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W., and Hell, K. (2003). Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *Embo J* 22, 4945-4956.
- 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 Oxal protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 277, 12846-12853.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Ann Rev Biochem* 66, 863-917.
- Neupert, W., and Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3, 555-565.

- Neutzner, A., and Youle, R. J. (2005). Instability of the mitofusin Fzo1 regulates mitochondrial morphology during the mating response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *280*, 18598-18603.
- 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.
- Nierras, C. R., and Warner, J. R. (1999). Protein kinase C enables the regulatory circuit that connects membrane synthesis to ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *274*, 13235-13241.
- 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.
- Niwa, H., Tsuchiya, D., Makyio, H., Yoshida, M., and Morikawa, K. (2002). Hexameric ring structure of the ATPase domain of the membrane-integrated metalloprotease FtsH from *Thermus thermophilus* HB8. *Structure (Camb)* *10*, 1415-1423.
- Nolden, M., Eheses, 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* *123*, 277-289.
- Nolden, M., Kisters-Woike, B., Langer, T., and Graef, M. (2006). Quality control of proteins in the mitochondrion., Vol in press).
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* *14*, 5931-5938.
- Nunnari, J., Marshall, W. F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W., and Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* *8*, 1233-1242.
- O'Rourke, S. M., Herskowitz, I., and O'Shea, E. K. (2002). Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet* *18*, 405-412.
- Ogura, T., Inoue, K., Tatsuta, T., Suzaki, T., Karata, K., Young, K., Su, L.-H., Fierke, C. A., Jackman, J. E., Raetz, C. R. H., *et al.* (1999). Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* *31*, 833-844.
- 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.
- Ono, T., Suzuki, T., Anraku, Y., and Iida, H. (1994). The MID2 gene encodes a putative integral membrane protein with a Ca(2+)-binding domain and shows mating pheromone-stimulated expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *151*, 203-208.
- Ortega, J., Singh, S. K., Ishikawa, T., Maurizi, M. R., and Steven, A. C. (2000). Visualization of substrate binding and translocation by the ATP-dependent protease, ClpXP. *Mol Cell* *6*, 1515-1521.
- Otsuga, D., Keegan, B. R., Brisch, E., Thatcher, J. W., Hermann, G. J., Bleazard, W., and Shaw, J. M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* *143*, 333-349.

- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., and Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 15, 2196-2207.
- 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.
- Paravicini, G., and Friedli, L. (1996). Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol Gen Genet* 251, 682-691.
- Parekh, D. B., Ziegler, W., and Parker, P. J. (2000). Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *Embo J* 19, 496-503.
- Park, H., and Lennarz, W. J. (2000). Evidence for interaction of yeast protein kinase C with several subunits of oligosaccharyl transferase. *Glycobiology* 10, 737-744.
- Parker, M. W., and Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88, 91-142.
- Paschen, S. A., and Neupert, W. (2001). Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* 52, 101-112.
- Paul, M. F., Ackermann, S., Yue, J., Arselin, G., Velours, J., and Tzagoloff, A. (1994). Cloning of the yeast ATP3 gene coding for the gamma-subunit of F1 and characterization of atp3 mutants. *J Biol Chem* 269, 26158-26164.
- 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.
- Philip, B., and Levin, D. E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* 21, 271-280.
- Pickart, C. M., and Cohen, R. E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 177-187.
- Plempner, R. K., Böhmler, S., J., B., Sommer, T., and Wolf, D. H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*, 891-895.
- 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.
- Pozniakovskiy, A. I., Knorre, D. A., Markova, O. V., Hyman, A. A., Skulachev, V. P., and Severin, F. F. (2005). Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* 168, 257-269.
- Preuss, M., Leonhard, K., Hell, K., Stuart, R. A., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2001). Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 153, 1085-1095.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D. G., 2nd, Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M. E., Moore, R. J., Gritsenko, M. A., Kozany, C., *et al.* (2004). Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol* 2, 795-804.
- Pryciak, P. M., and Huntress, F. A. (1998). Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev* 12, 2684-2697.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B. M., Errede, B., and Levin, D. E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 3969-3976.

- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., and Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 20150-20155.
- 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, B. G., Fenton, W. A., Horwich, A. L., and Weber-Ban, E. U. (2001). ClpA mediates directional translocation of substrate proteins into the ClpP protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3768-3772.
- Reid, E. (1997). Pure hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet* 34, 499-503.
- Rep, M., and Grivell, L. A. (1996). *MBA1* encodes a mitochondrial membrane-associated protein required for biogenesis of the respiratory chain. *FEBS Lett* 388, 185-188.
- 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.
- Robzyk, K., and Kassir, Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* 20, 3790.
- Rodriguez-Enriquez, S., He, L., and Lemasters, J. J. (2004). Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2463-2472.
- 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.
- Rowley, N., Prip, B. C., Westermann, B., Brown, C., Schwarz, E., Barrell, B., and Neupert, W. (1994). Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell* 77, 249-259.
- 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.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Salgado, A. P., Schuller, D., Casal, M., Leao, C., Leiper, F. C., Carling, D., Fietto, L. G., Tropia, M. J., Castro, I. M., and Brandao, R. L. (2002). Relationship between protein kinase C and derepression of different enzymes. *FEBS Lett* 532, 324-332.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santos, B., and Snyder, M. (2000). Sbe2p and sbe22p, two homologous Golgi proteins involved in yeast cell wall formation. *Mol Biol Cell* 11, 435-452.
- Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 59, 4375-4382.

- 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.
- Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J. W., Schultz, P. G., *et al.* (2004). Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat Struct Mol Biol* 607-615.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T., and Hall, M. N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88, 531-542.
- Schmitt, M., Neupert, W., and Langer, T. (1995). Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *EMBO J* 14, 3434-3444.
- Schmitz, H. P., Jockel, J., Block, C., and Heinisch, J. J. (2001). Domain shuffling as a tool for investigation of protein function: substitution of the cysteine-rich region of Raf kinase and PKC eta for that of yeast Pkc1p. *J Mol Biol* 311, 1-7.
- Schmitz, H. P., and Heinisch, J. J. (2003). Evolution, biochemistry and genetics of protein kinase C in fungi. *Curr Genet* 43, 245-254.
- Schneider, H. C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., and Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* 371, 768-774.
- Schwartz, M. A., and Madhani, H. D. (2004). Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 38, 725-748.
- Schwarz, G. A., and Liu, C. N. (1956). Hereditary (familial) spastic paraplegia: further clinical and pathological observations. *Arch Neurol Psychiatry* 75, 144-162.
- Schwienhorst, I. (2001) Konjugation und Dekonjugation des Ubiquitin-ähnlichen Proteins SUMO in *S. cerevisiae*, Dissertation, Universität zu Köln.
- Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M., Ishihara, S., Watanabe, T., and Ohya, Y. (2002). Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162, 663-676.
- Sesaki, H., and Jensen, R. E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 152, 1123-1134.
- Severin, F. F., and Hyman, A. A. (2002). Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 12, R233-235.
- 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.
- Shaw, J. M., and Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol* 12, 178-184.
- Sherman, F. (1991). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194, 3-21.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350, 3-41.

- Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C., and Snyder, M. (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 4053-4069.
- Shotland, Y., Koby, S., Teff, D., Mansur, N., Oren, D. A., Tatematsu, K., Tomoyasu, T., Kessel, M., Bukau, B., Ogura, T., and Oppenheim, A. B. (1997). Proteolysis of the phage λ CII regulatory protein by FtsH (HflB) of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 24, 1303-1310.
- Shotland, Y., Teff, D., Koby, S., Kobiler, 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.
- Siddiqui, S. M., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2004). Role of the processing pore of the ClpX AAA+ ATPase in the recognition and engagement of specific protein substrates. *Genes Dev* 18, 369-374.
- Skulachev, V. P. (2002). Programmed death in yeast as adaptation? *FEBS Lett* 528, 23-26.
- Sogin, M. L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes, Vol 1).
- 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.
- Sreenivas, A., Villa-Garcia, M. J., Henry, S. A., and Carman, G. M. (2001). Phosphorylation of the yeast phospholipid synthesis regulatory protein Opi1p by protein kinase C. *J Biol Chem* 276, 29915-29923.
- 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.
- Steel, G. J., Harley, C., Boyd, A., and Morgan, A. (2000). A screen for dominant negative mutants of SEC18 reveals a role for the AAA protein consensus sequence in ATP hydrolysis. *Mol Biol Cell* 11, 1345-1356.
- 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.
- 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.
- 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.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for induction. *J Cell Biol* 119, 301-311.
- Tatsuta, T., and Langer, T. (2005). Studying proteolysis within mitochondria. *Curr Topics Gen*, in press.
- Tatsuta, T., Model, K., and Langer, T. (2005). Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol Biol Cell* 16, 248-259.

- Tauer, R., Mannhaupt, G., Schnell, 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, S. W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G. M., Warnock, D. E., Wiley, S., Murphy, A. N., Gaucher, S. P., Capaldi, R. A., Gibson, B. W., and Ghosh, S. S. (2003). Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* 21, 281-286.
- Thorsness, P. E., and Fox, T. D. (1993). 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. (1993). 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.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K., and Nunnari, J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* 158, 445-452.
- 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.
- Truscott, K., Brandner, K., and Pfanner, N. (2003). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* 13, R326-337.
- 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.
- Vallee, B. L., and Auld, D. S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29, 5647-5659.
- 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., Dembowski, M., Neupert, W., and Langer, T. (1998). Mcx1p, a ClpX homologue in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 438, 250-254.
- 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.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., and Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13804-13809.
- Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T., and Neupert, W. (1994). Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J* 13, 5135-5145.
- Wagner, I., Van Dyck, L., Savel'ev, A., Neupert, W., and Langer, T. (1997). Autocatalytic processing of the ATP-dependent PIM1 protease: Crucial function of a pro-region for sorting to mitochondria. *EMBO J* 16, 7317-7325.
- 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, 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 HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism. *Structure (Camb)* *9*, 177-184.
- 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.
- Watanabe, M., Chen, C. Y., and Levin, D. E. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J Biol Chem* *269*, 16829-16836.
- Watanabe, Y., Irie, K., and Matsumoto, K. (1995). Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* *15*, 5740-5749.
- 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.
- Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E. U., Dougan, D., Tsai, F. T., *et al.* (2004). Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* *119*, 653-665.
- Westermann, B., Prip-Buus, C., Neupert, W., and Schwarz, E. (1995). The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *EMBO J* *14*, 3452-3460.
- 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.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., and Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* *279*, 14473-14476.
- Wiertz, E. J. H. J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., and Ploegh, H. L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* *384*, 432-438.
- Wong, E. D., Wagner, J. A., Gorsich, S. W., McCaffery, J. M., Shaw, J. M., and Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* *151*, 341-352.
- Yaffe, M. P. (1999). The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* *283*, 1493-1497.
- Yaffe, M. P. (1999). Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol* *1*, E149-150.
- Yaffe, M. P. (2003). The cutting edge of mitochondrial fusion. *Nat Cell Biol* *5*, 497-499.
- Yamada-Inagawa, T., Okuno, T., Karata, K., Yamanaka, K., and Ogura, T. (2003). Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis. *J Biol Chem* *278*, 50182-50187.
- 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.
- Ye, Y., Meyer, H. H., and Rapoport, T. A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* *414*, 652-656.
- Yen, M. R., Harley, K. T., Tseng, Y. H., and Saier, M. H. (2001). Phylogenetic and structural analyses of the oxal family of protein translocases. *FEMS Microbiol Lett* *204*, 223-231.
- Young, M. E., Karpova, T. S., Brugger, B., Moschenross, D. M., Wang, G. K., Schneiter, R., Wieland, F. T., and Cooper, J. A. (2002). The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol Cell Biol* *22*, 927-934.

- 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.
- Zhang, F., Hogue, D. L., Liu, L., Fisher, C. L., Hui, D., Childs, S., and Ling, V. (2000). M-ABC2, a new human mitochondrial ATP-binding cassette membrane protein. *FEBS Lett* 478, 89-94.
- 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.
- Zhou, M., and Schekman, R. (1999). The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol Cell* 4, 925-934.
- 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.

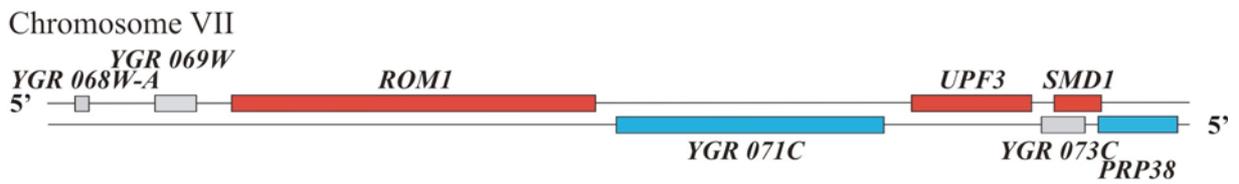
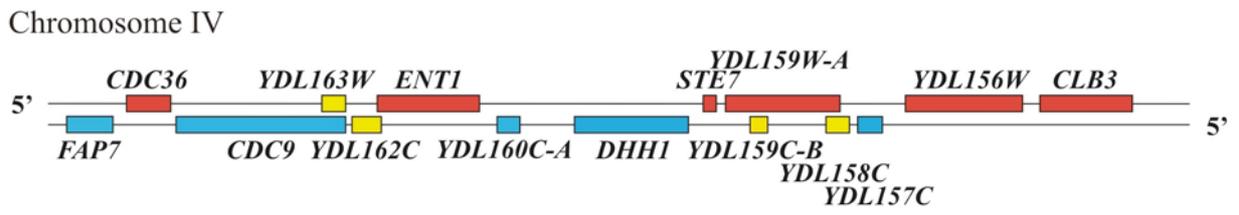
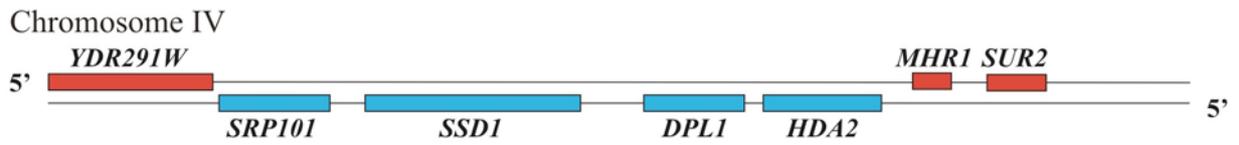
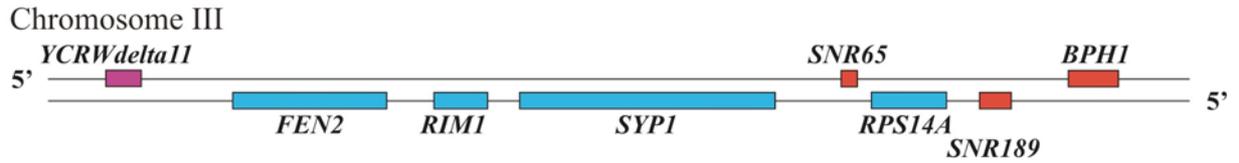
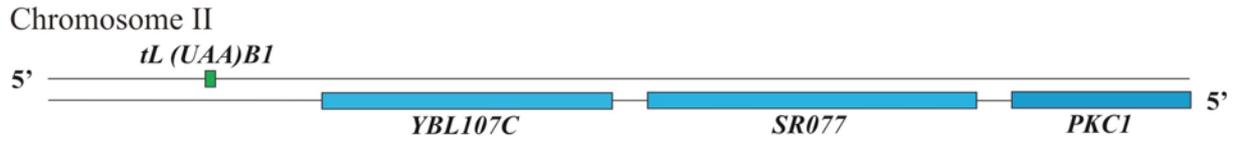
7. Anhang

7.1 Suppressionsfähige Vektoren der „multicopy“ Genbank in YEp13

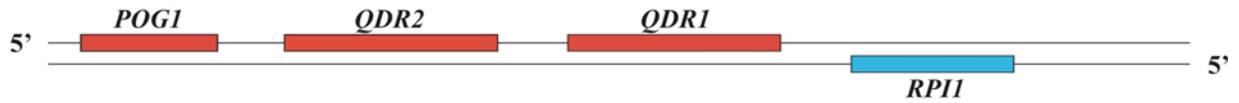
#	Sequenzbereich:	Gene:	Funktion:
1	Chromosom 2 10214bp-16924bp	<i>SR077</i>	Golgi zum Plasamtransportsystem/Exozytose
		<i>YBL107C</i>	unbekannte Funktion; bindet <i>in vitro</i> Phosphoinositol-3-Phosphat
2	Chromosom 3 171406bp-176626bp	<i>SYPI</i>	Suppressor der Hefe Profilin Deletion
		<i>RIM1</i>	Replikation in Mitochondrien; zur Erhaltung des mitochondrialen Genoms; bindet einzelsträngige DNA
3	Chromosom 4 1041948bp-1050622bp	<i>SRP101</i>	Signalerkennungspartikel zum Transport naszierender Sekretionsproteine zur ER Membran
		<i>SSD1</i>	RNA-Bindung; Zellwandintegrität
4	Chromosom 5 16892bp-174863bp	<i>YDL160C-A</i>	hypothetischer Orf
		<i>DHH1</i>	cytoplasmatischer mRNA Prozessierungskörperchen
		<i>STE7</i>	MAPKinase Aktivität
		<i>YDL159W-A</i>	hypothetischer Orf
		<i>YDL159C-B</i>	hypothetischer Orf
		<i>YDL158C</i>	hypothetischer Orf
5	Chromosom 7 628236bp-636068bp	<i>YDL157C</i>	unbekannte Funktion; Mitochondrion lokalisiert
		<i>YGR071C</i>	unbekannte Funktion
		<i>UPF3</i>	unbekannte Funktion; mRNA Metabolismus
		<i>SMD1</i>	mRNA Bindung; prä-mRNA Splicing Faktor Aktivität
		<i>YGR073C</i>	hypothetischer Orf
		6	Chromosom 9 133435bp-138331bp
<i>RPI1</i>	RAS Proteinsignal; Thiamin Biosynthese		
7	Chromosom 12 782279bp-795775bp	<i>MID2</i>	Zelloberflächensensor ; Zellintegrität; integrales Plasmamembranprotein;involviert in MAPKinase Signalkaskade; Signalweiterleitung an Rom2
		<i>JIP3</i>	Gerüstprotein für JNK mitogen aktivierende Proteinkinase Signalkaskade
8	Chromosom 12 84713bp-90368bp	<i>SNR40</i>	rRNA Modifikation
		<i>RFC3</i>	ATPase Aktivität; DNA Clamploader Aktivität; DNA Reperatur
		<i>PCL1</i>	Zellzyklus; Cyclin abhängiger Proteinkinase- Regulator
9	Chromosom 12 858487bp-868723bp	<i>SSQ1</i>	Chaperonaktivität der mitochondrialen Hsp70; DNA- abhängige Replikation; Interaktion mit Mge1
		<i>ARC18</i>	Aktinfilament Organisation; Arp2/3 Komplex; Bestandteil des Cytoskeletts
		<i>ROM2</i>	Guanin Nukleotid Austauschfaktor zur Stimulation der GTP-Bindung von Rho1; Zellintegrität; PKC-MAPKinase Signalkaskade; interagiert mit Mid2

#	Sequenzbereich:	Gene:	Funktion:
10	Chromosom 14 544168bp-550829bp	<i>YIP3</i>	ER-Golgi Transport
		<i>YNL043C</i>	unbekannte Funktion
		<i>YNL042W-B</i>	unbekannte Funktion
		<i>tP(UGG)N1</i>	Tripletcodon Aminosäureadaptor; translationale Elongation im Cytosol
		<i>YNLW sigma3</i>	Ty3 LTR
		<i>YNLW sigma2</i>	Ty3 LTR
		<i>BOP3</i>	potentielles Cdc28 Substrat im Cytoplasma und Nukleus
11	Chromosom 15 769663bp-776588bp	<i>WTM1</i>	Transkription Corepressor; Regulation der Meiose
		<i>MKK1</i>	MAPKinasekinase Aktivität; Signaltransduktion mit den Proteinkinasen Pkc1, Bck1 und Mpk1
		<i>YOR231C-A</i>	unbekannte Funktion
		<i>MGE1</i>	Cochaperon in der mitochondrialen Matrix, interagiert mit Ssq1 und Tim44
12	Chromosom 15 338837bp-343736bp	<i>SGT2</i>	unbekannte Funktion; Cytosol lokalisiert
		<i>tR(ACG)O</i>	Tripletcodon Aminosäureadaptor; translationale Elongation im Cytosol
		<i>YOLCdelta9</i>	Ty1 LTR
		<i>SLG</i>	Transmembranrezeptor; Rhoprotein Signaltransduktion; Zellwandorganisation und Biosynthese; Osmo- und Hitzestressantwort
		<i>YOR008C-A</i>	Diepoxybutan und Mitomycinresistenz vermittelnd
13	Chromosom 15 113132bp-119400bp	<i>YOL106W</i>	hypothetischer Orf
		<i>tT(AGU)01</i>	Tripletcodon Aminosäureadaptor; translationale Elongation im Cytosol
		<i>YOLCdelta3</i>	Ty1 LTR
		<i>WSC3</i>	Transmembranrezeptor; Rhoprotein Signaltransduktion; Zellwandorganisation und Biosynthese; Hitzestressantwort
		<i>NDJ1</i>	Telomer cDNA Bindung; Synapsis
14	Chromosom 16 48680bp-52084bp	<i>YPL260W</i>	unbekannte Funktion; lokalisiert im Cytoplasma und Nukleus
		<i>YPL261C</i>	hypothetischer Orf

Tabelle 3: Ein Überblick der isolierten Vektoren der YEp13 Genbank, die in dem genomischen „Screen“ zur Suche von Suppressoren von *yta10tsΔyme1* isoliert werden konnten.

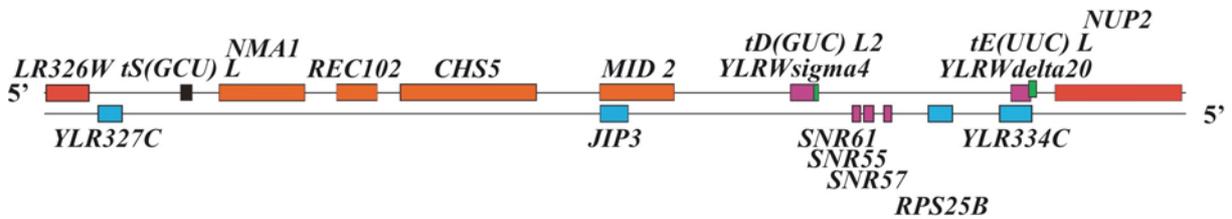


Chromosome IX



1-26

Chromosome XII



1-16

1-24/1-17

1-18

1-23/1-25/1-27/1-31/1-35

1-7/1-57

1-10

1-12

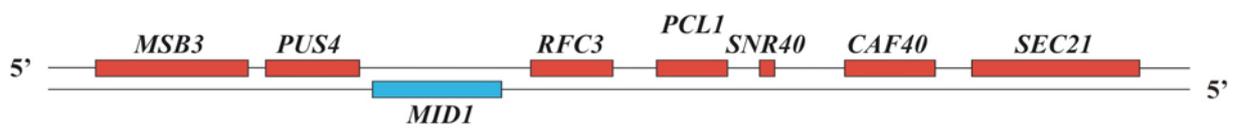
1-13

1-3

1-4

1-6/1-52/1-53

Chromosome XII



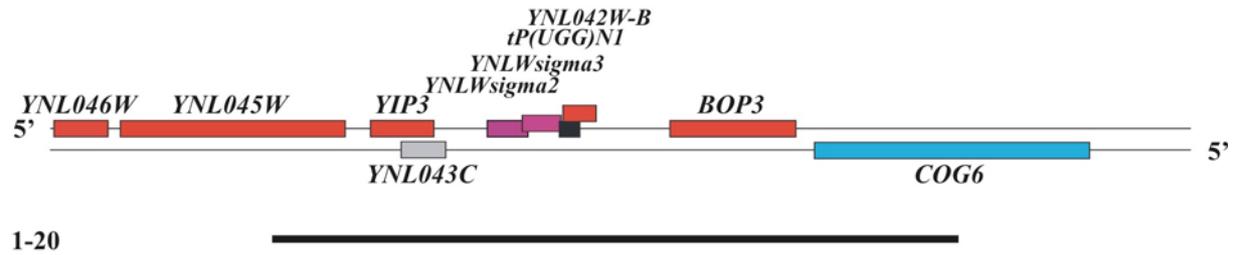
1-44

Chromosome XII

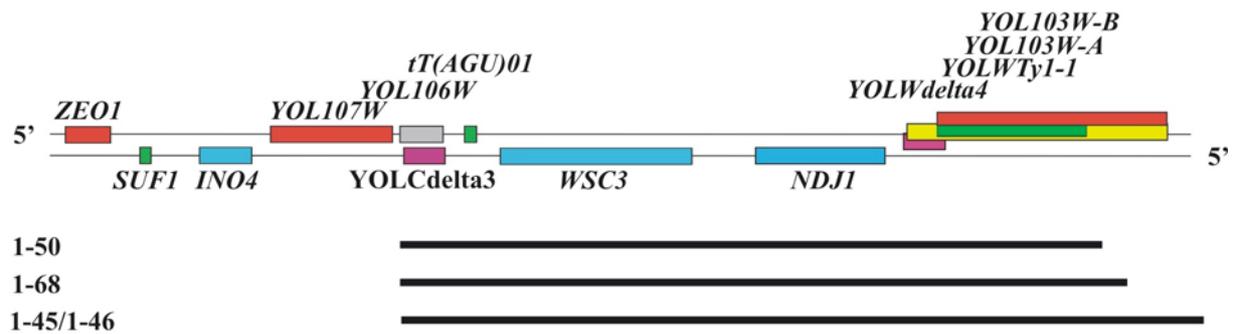


1-47

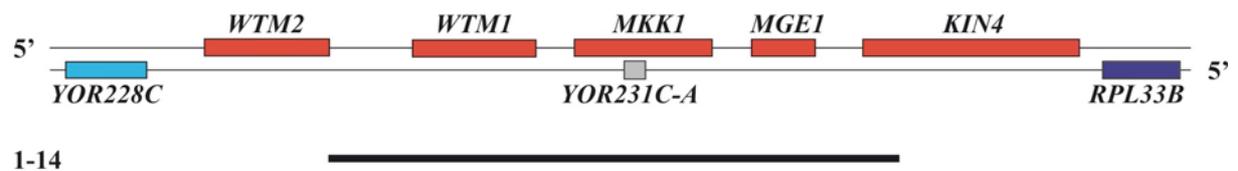
Chromosome XIV



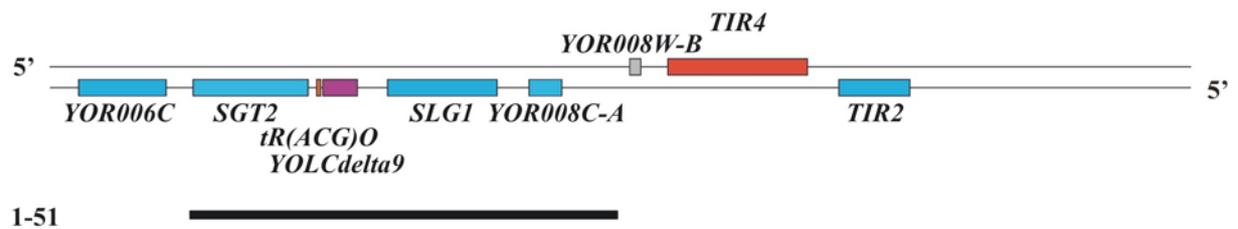
Chromosome XV



Chromosome XV



Chromosome XV



Chromosome XVI

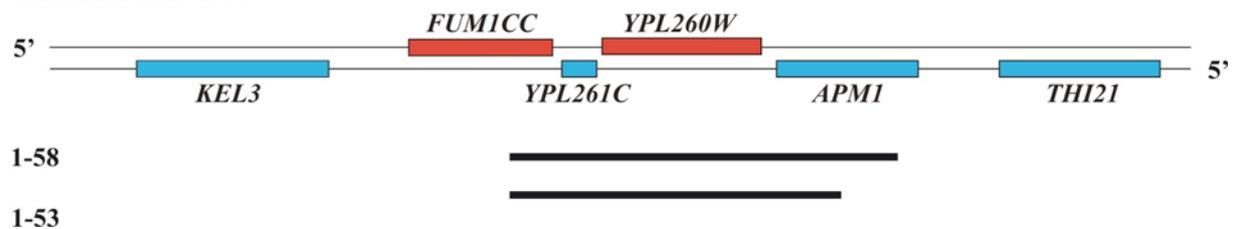


Abb. 41: Grafische Darstellung der hier isolierten „multicopy“ Genbankloki im Plasmid YEp13.

Die kodierenden Gensequenzen sind farbig auf dem Strang und Gegenstrang hinterlegt und namentlich genannt. Schwarze Balken zeigen die Größe des suppressionsfähigen Genlokus und verdeutlichen, wie häufig Loki in diesem genomischen „Screen“ isoliert wurden.

7.2 Verwendete Oligonukleotide:

Name	Sequenz	Beschreibung
TL600	5'-GGGTCTAGAATGATGATGTGGCAACGATATG-3'	5'-Primer für <i>yta10^{fs}</i> in YCpLac111-ADHp+ <i>XbaI</i> -Schnittstelle
TL601	5'-GGGAAGCTTTTAATTTGTTGCTGCAGGTGC-3'	3'-Primer für <i>yta10^{fs}</i> in YCpLac111-ADHp+ <i>HindIII</i> -Schnittstelle
TL852	5'-TTATTATACATTGTGGATAGAACGAAAACAGAGACGTGATAGATGCGTACGCGCAGGTCGAC-3'	S1-Primer zur Deletion von <i>YME1</i>
TL853	5'-TTGAGGTAGGTTCCCTTCATACGTTTAACTTCTAGATAAAAATCAATCGATGAATTCGAGCTCG-3'	S2-Primer zur Deletion von <i>YME1</i>
TL854	5'-CAGCTTAAAGGATAAACAGG-3'	A1-Testprimer zur Deletion von <i>YME1</i>
TL855	5'-GGTCTTGAGGTAGGTTCC-3'	A4-Testprimer zur Deletion von <i>YME1</i>
TL178	5'-TCACCAAGCTATCTGGTGTCAC-3'	S1-Primer zur Deletion von <i>YTA12</i>
TL179	5'-GCCTCACAGAAGCGCTTTGATC-3'	S2-Primer zur Deletion von <i>YTA12</i>
TL732	5'-CGGCGGGGACGAGGCAAG-3'	K2-Testprimer zur Deletion von <i>YTA12</i>
TL1111	5'-GGGGGTACCATGTCTTTGGCCAAATCCGC-3'	5'-Primer für <i>ATP7</i> in pGEM4 + <i>KpnI</i> -Schnittstelle
TL1112	5'-GGGTCTAGACTACATCACATTCAAATTGCC-3'	3'-Primer für <i>ATP7</i> in pGEM4 + <i>XbaI</i> -Schnittstelle
TL 985	5'-CTTTGATGAGACCGGGGCGTTCGATAGACATATC-3'	Quickchange forward <i>YTA10^{R450A}</i>
TL986	5'-GATATGTCTATCGAACGCTCCCGGTCTCATCAAA G-3'	Quickchange reverse <i>YTA10^{R450A}</i>
TL1144	5'-GATAATGCTTTGATGGCACCGGGAAGGTTTCGATA G-3'	Quickchange forward <i>YTA10^{R447A}</i>
TL1145	5'-CTATCGAACCTTCCCGGTGCCATCAAAGCATTATC-3'	Quickchange reverse <i>YTA10^{R447A}</i>

TL1991	5'-CCGGAATTCATGAGAAGAGCTTTTTTCAGCAG-3'	5'-Primer für <i>MGE1</i> in pJDcex2 + <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
TL1992	5'-CTAGTCTAGATTAGTTCTCTTCGCCCTTA-3'	3'-Primer für <i>MGE1</i> in pJDcex2 + <i>XbaI</i> -Schnittstelle
TL1995	5'-CCGGAATTCATGGCTTCACTGTTTCAG-3'	5'-Primer für <i>MKK1</i> in pJDcex2 + <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
TL1996	5'-CTAGTCTAGATTAATCTTTCCAGCACTTC-3'	3'-Primer für <i>MKK1</i> in pJDcex2 + <i>XbaI</i> -Schnittstelle
TL2007	5'-TCCCCCGGGATGAGCGAAACCAACGTTG-3'	5'-Primer für <i>ROM2</i> in pJDcex2 + <i>SmaI</i> -Schnittstelle
TL2008	5'-TCCCCCGGGTTAACCCAGAAATCTAAC-3'	3'-Primer für <i>ROM2</i> in pJDcex2 + <i>SmaI</i> -Schnittstelle
TL2259	5'-CCGCTCGAGATGACGGAACAAAGAACC-3'	5'-Primer für <i>SYP1</i> in pVTU100 + <i>XhoI</i> -Schnittstelle
TL2260	5'-CGCGGATCCTCAAGCGAGACCATGG-3'	3'-Primer für <i>SYP1</i> in pVTU100 + <i>BamHI</i> -Schnittstelle
TL2354	5'-CTAGTCTAGAATGAGACCGAACAAAACAAG-3'	5'-Primer für <i>WSC1</i> in pJDcex2 + <i>XbaI</i> -Schnittstelle
TL2355	5'-TCCCCCGGGTCAATCAGCTTCGTCTGGA-3'	3'-Primer für <i>WSC1</i> in pJDcex2 + <i>SmaI</i> -Schnittstelle
TL2469	5'-CCGCTCGAGATGAGAGCTTTTTTCAGCAGC-3'	5'-Primer für <i>MGE1</i> in pVTU100 + <i>XhoI</i> -Schnittstelle
TL2470	5'-CGCGGATCCTTAGTTCTCTTCGCCCTTAAC-3'	3'-Primer für <i>MGE1</i> in pVTU100 + <i>BamHI</i> -Schnittstelle
TL2471	5'-CCGCTCGAGATGGCTTCACTGTTTCAGAC-3'	5'-Primer für <i>MKK1</i> in pVTU100 + <i>XhoI</i> -Schnittstelle
TL2472	5'-CGCGGATCCTTAATCTTTCCAGCACTTCC-3'	3'-Primer für <i>MKK1</i> in pVTU100 + <i>BamHI</i> -Schnittstelle

		Schnittstelle
TL2473	5'-CCGCTCGAGATGAGCGAAACCAACGTTG-3'	5'-Primer für <i>ROM2</i> in pVTU100 + <i>XhoI</i> - Schnittstelle
TL2474	5'-CGCGGATCCTTAACCCAGAAATCTAACG-3'	3'-Primer für <i>ROM2</i> in pVTU100 + <i>BamHI</i> - Schnittstelle
TL2475	5'-CCGCTCGAGATGAGACCGAACAAAACAAG-3'	5'-Primer für <i>WSC1</i> in pVTU100 + <i>XhoI</i> - Schnittstelle
TL2476	5'-CGCGGATCCTCAATCAGCTTCGTCTGGA-3'	3'-Primer für <i>WSC1</i> in pVTU100 + <i>BamHI</i> - Schnittstelle
TL2507	5'-CCGCTCGAGATGTTGTCTTTCACAACC-3'	5'-Primer für <i>MID2</i> in pVTU100 + <i>XhoI</i> - Schnittstelle
TL2508	5'-CGCGGATCCTTAATAATTCGTGGTG-3'	3'-Primer für <i>MID2</i> in pVTU100 + <i>BamHI</i> - Schnittstelle

Zur Sequenzierung der eingefügten Bibliotheksequenzen in YEp13:

Name	Sequenz	Beschreibung
TL1042 /JD172	5'-ATGCGTCCGGCGTAG-3'	bindet YEp13 direkt hinter <i>BamHI</i> - Schnittstelle
TL1043 /JD173	5'-CACTATCGACTACGCGATCA-3'	bindet YEp13 direkt vor <i>BamHI</i> - Schnittstelle

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AAA	„ <u>A</u> TPases <u>a</u> ssociated with a variety of cellular <u>a</u> ctivities“
AAC ₂	ADP/ATP-Carrier
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ÄM	äußere Mitochondrienmembran
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	ATP-hydrolysierendes Enzym
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CC	„coiled-coil“
Ccp1	<i>Cytochrom c-Peroxidase</i>
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FtsH	„ <u>f</u> ilamentation <u>t</u> emperature <u>s</u> ensitive protein <u>H</u> “
g	gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
GFP	„ <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein“
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfat

<i>i</i> -AAA Protease	AAA Protease des mitochondrialen Intermembranraums
IgG	Immunglobulin G
IM	mitochondriale Innenmembran
IMR	Intermembranraum
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Bakterienvollmedium nach Luria Bertani
LEU	Auxotrophiemarker Leucin
μ	Mikro
m	Mili
M	Matrix
M	Molar
<i>m</i> -AAA Protease	AAA Protease des mitochondrialen Matrix
MgAc	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA
MSS	mitochondriale Sortierungssequenz
m/v	Masse pro Volumen
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	nanometer
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	„open reading frame“
p.A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Phe	Phenylalanin
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Q</i>	Glutamin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SC	synthetisches Vollmedium
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sek	Sekunden
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRH	„second region of homology“
TAE	Tris Essigsäure EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TRP	Tryptophan
ts	temperatursensitiv
U	Unit (funktionelle Enzymeinheit)
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
<i>YME1</i>	<i>yeast mitochondrial DNA escape</i>
YPD	Hefevollmedium aus Hefeextrakt, Pepton und Glucose
YPG	Hefevollmedium aus Hefeextrakt, Pepton und Glycerin
<i>YTA</i>	<i>yeast Tat-binding analogue</i>
z.B.	zum Beispiel

Teilpublikation im Rahmen dieser Arbeit**Korbel, D.* , Wurth, S.* , Käser, M. und Langer, T. (2004).**

Membrane protein turnover by the *m*-AAA protease in mitochondria depends on the transmembrane domains of its subunits.

EMBO reports 5, 698-703.

* gleichberechtigte Erstautoren

Abstract:

AAA proteases are membrane-bound ATP-dependent proteases that are present in eubacteria, mitochondria and chloroplasts and that can degrade membrane proteins. Recent evidence suggests dislocation of membrane-embedded substrates for proteolysis to occur in a hydrophilic environment; however, next to nothing is known about the mechanism of this process. Here, we have analysed the role of the membrane-spanning domains of Yta10 and Yta12, which are conserved subunits of the hetero-oligomeric *m*-AAA protease in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. We demonstrate that the *m*-AAA protease retains proteolytic activity after deletion of the transmembrane segments of either Yta10 or Yta12. Although the mutant *m*-AAA protease is still capable of processing cytochrome *c* peroxidase and degrading a peripheral membrane protein, proteolysis of integral membrane proteins is impaired. We therefore propose that transmembrane segments of *m*-AAA protease subunits have a direct role in the dislocation of membrane-embedded substrates.

Danksagung

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Langer für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Die wertvollen Anregungen und fruchtbaren Diskussionen im Laufe der letzten Jahre ermöglichten erst diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen danke ich auch ganz besonders für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine Beteiligung am „Thesis Committee“. Danke, dass Sie immer ein offenes Ohr für meine vielen Hefe-spezifischen Fragen hatten und diese stets bereitwillig beantworteten.

Ein weiterer Dank auch Herrn Dr. Gerrit Praefcke für sein Mitwirken am „Thesis Committee“ und seine wertvollen Anregungen zum Thema der PKC-MAPKinase Signalkaskade.

Herrn Prof. Dr. Alex Tzagoloff danke ich für die Überlassung der Hefemutante *yta10^{ts} E35* und nicht zu vergessen Daniel Korbel. Ohne seine Diplomarbeit wäre die Veröffentlichung zur Rolle der Transmembrandomänen nie zustande gekommen.

Ebenso Danke an Frau Dr. Kisters-Woike für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Problemen des Institutsalltags und bei Computerproblemen jeglicher Natur.

Tausend Dank auch an Susanne Scheffler für ihre aufmunternde und hilfsbereite Art, mit der sie die vielen „kleinen“ organisatorischen Dinge im Laboralltag übernimmt und für uns regelt.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Frau Dr. Mafalda Escobar-Henriques Dias, die mir immer hilfsbereit bei technischen und experimentellen Problemen zur Seite stand.

Danke an alle Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Langer für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und intensiven Diskussionen zu dieser Arbeit. Insbesondere gilt mein Dank aber Dr. Isabel Arnold, Björn Friedrichs, Sascha Dargazanli, Dr. Georgeta Seewald und Claudia Wilmes für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und ihren Humor, der das Leben in unserem Labor so bereichert hat. Vielen Dank für alles!

Ein großer Dank geht an Markus London und Mark Nolden für ihr geduldiges und phantastisches Korrekturlesen dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und im Besonderen bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt haben.

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 angegebener Teilpublikation- 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.

Stephanie Wurth

Köln, März 2006

Teilpublikation im Rahmen dieser Arbeit:

Korbel, D. *, Wurth, S. *, Käser, M. und Langer, T. (2004). Membrane protein turnover by the *m*-AAA protease in mitochondria depends on the transmembrane domains of its subunits. EMBO reports 5, 698-703.

* gleichberechtigte Erstautoren

Lebenslauf

Vor- und Zuname: Stephanie Wurth
geboren: 07.11.1973
Geburtsort: Mülheim an der Ruhr
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1980-1984: kath. Grundschule Körnerstraße, Gummersbach
1984-1993: städt. Gymnasium Moltkestraße, Gummersbach
1990: mittlere Reife
1993: Abitur

Hochschulausbildung: Biologie auf Diplom
Wintersemester 1993/1994: Westfälische Wilhelm Universität,
Münster
1994-2001: Universität zu Köln

Diplom: Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln
Abteilung: Prof. Dr. Heinz Saedler
Arbeitsgruppe: Dr. Peter Huijser
08. März 2001

Thema der Diplomarbeit: Funktion und Regulation von photoperiodisch regulierten Genen
in *Arabidopsis thaliana*

Doktorarbeit: Universität zu Köln
Institut für Genetik
Seit dem 09. Juli 2001
Betreut von Prof. Dr. Thomas Langer

Dissertation zum Thema: „Genetische und biochemische Charakterisierung der *m*-AAA-
Proteasefunktion in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae*“