

**Mechanismen der Substraterkennung der
mitochondrialen AAA-Protease Yme1 aus
*Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Martin Graef

aus Köln

Köln, 2006

Berichtersteller:

Professor Dr. Thomas Langer

Professor Dr. Jürgen Dohmen

Professor Dr. Martin Scheffner

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2006

Abstract

ATP-dependent proteases of the AAA⁺ protein family mediate the energy-dependent proteolysis of cellular proteins. Two highly conserved AAA proteases anchored to the inner membrane of mitochondria exert crucial functions for mitochondrial protein quality control and biogenesis. However, molecular mechanisms for substrate recognition by AAA proteases are barely understood. In order to define initial steps of substrate engagement by AAA protease the *i*-AAA protease Yme1 from *S. cerevisiae* was examined.

This study led to the identification of two substrate binding regions. They formed, based on the crystal structure of a homologous AAA protease, a lattice-like structure on the surface of the hexameric ring complex. Substitution of conserved negatively charged residues present in a mainly α -helical region at the C-terminal end of the AAA domain (NH-region) caused an impaired substrate binding to this region and led to a complete loss of proteolytic activity. A second region was identified by a domain swapping approach based on Yme1 and the orthologous AAA protease IAP-1 from *N. crassa*. This region was composed of conserved C-terminal helices within the proteolytic domain (CH-region). Its involvement in proteolysis depended on the folding and membrane insertion of substrates as well as a substrate specific factor.

Furthermore, a conserved YVG-motif has been located to the central pore of other hexameric AAA⁺ ring complexes. Therefore, its role for proteolysis of membrane-bound proteins by Yme1 has been examined by mutational analysis. Hydrophilic substitution of Y354 led to substrate-specific defects on substrate engagement. Consistently, the presence of hydrophobic residues at this position was required for proteolytic and *in vivo* activity of the protease.

Taken together, the mutational analysis suggests alternative pathways for substrate engagement. Misfolded proteins can interact sequentially with surface-exposed binding sites before they are translocated through the central pore into a proteolytic chamber formed by AAA proteases. The identification of substrate binding sites will allow defining molecular determinants of substrate recognition by AAA proteases.

Inhaltsverzeichnis

Abstract

1. Einleitung	7
1.1. AAA ⁺ -Proteine	7
1.1.1. Molekulare Funktionsmechanismen der AAA ⁺ -Domänen	8
1.2. ATP-abhängige Proteasen	10
1.2.1. Das Prinzip der proteolytischen Kammer	10
1.2.2. Entfaltung und Translokation von Substratproteinen	13
1.2.3. Die Substraterkennung durch prokaryotische ATP-abhängige Proteasen	16
1.3. Herausforderungen an das proteolytische System in Mitochondrien	20
1.4. Das proteolytische System der inneren Mitochondrienmembran	22
1.5. Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	29
2.1. Verwendete Konstrukte	29
2.1.1. Expressionsplasmide	29
2.1.2. <i>In vitro</i> -Transkriptionsplasmide	30
2.2. Verwendete Hefestämme	33
2.3. Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE)	36
2.4. Superose-6-Gelfiltration	37
2.5. Schnelle Präparation zellulärer Membranen aus <i>S. cerevisiae</i>	38
2.6. Alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen	38
2.7. <i>In vitro</i> -Synthese von ³⁵ S-markiertem Vorläuferprotein	39
2.8. Stabilität von radioaktiv markierten Proteinen nach Import in isolierte Mitochondrien	40
2.9. Stabilität von neu synthetisierten mitochondrial kodierten Proteinen in isolierten Mitochondrien	40
2.10. Koimmunfällungen	41
2.11. Autoradiographie und Phosphoreszenzanalyse radioaktiv markierter	42
2.12. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)	42
2.13. Verschiedene Materialien und Methoden	43

3. Ergebnisse	44
3.1. Die Rolle des YVG-Motivs für die Funktion von Yme1	44
3.1.1. Die <i>in vivo</i> -Aktivität von Yme1 korreliert mit der Hydrophobizität von Y354X	45
3.1.2. Der Abbau von Cox2 wird durch Y354 beeinflusst	47
3.1.3. Yme1 ^{Y354S} weist substratspezifische Bindungsdefekte auf	50
3.1.4. ATPase-defiziente Yme1-Mutanten zeigen Yme1 ^{Y354S} -ähnliche Defekte der Substratinteraktion	52
3.1.5. Thermische Destabilisierung von Cox2 reduziert den initialen Bindungsdefekt von Yme1 ^{Y354S} und ATPase-defizientem Yme1	55
3.2. Charakterisierung der NH-Region der AAA-Domäne als Substratbindestelle	56
3.2.1. Negativ geladene Aminosäurereste der NH-Region sind für die <i>in vivo</i> -Aktivität von Yme1 notwendig	58
3.2.2. Eine intakte NH-Region ist für den Abbau von Membranproteinen essentiell	60
3.2.3. Die Substitution negativ geladener Aminosäurereste erniedrigt die Substrataffinität der NH-Region	62
3.2.4. Mutationen in der NH-Region führen zur Substratakkumulation an Yme1	64
3.3. Die CH-Region ist eine neue Substratbinderegion von Yme1	65
3.3.1. <i>In vivo</i> -Aktivität der Yme1-IAP-1-Hybridproteine	65
3.3.2. Die Assemblierung der Yme1-IAP-1-Hybridproteine	67
3.3.3. Die proteolytische Aktivität der Yme1-IAP-1-Hybridproteine	69
3.3.4. CH-spezifische Substratinteraktion der Yme1-IAP-1-Hybridproteine	71
3.3.5. Direkte Substratinteraktion der CH-Region	73
3.3.6. Substrate mit geringer Faltungstabilität werden CH-spezifisch abgebaut	77
3.3.7. Die Membraninsertion eines Substratproteins beeinflusst die CH-Abhängigkeit des Abbaus	80
3.4. Analyse möglicher Wechselbeziehungen der verschiedenen Substratbinde-regionen der <i>i</i> -AAA-Protease Yme1	82
4. Diskussion	85
4.1. Die CH- und NH-Region - zwei oberflächenexponierte Substratbindestellen	85
4.1.1. Die CH-Region	87
4.1.2. Die NH-Region	90
4.2. Das YVG-Motiv der zentralen Pore	93

4.3.	Cox20 – ein Kofaktor für den Cox2-Abbau	95
4.4.	Modell für den Abbau von Substratproteinen durch die <i>i</i> -AAA-Protease	97
4.5.	Ausblick	100
5.	Zusammenfassung	102
6.	Literaturverzeichnis	103
7.	Abkürzungsverzeichnis	116
8.	Anhang	118
	Danksagung	120
	Eidstattliche Erklärung	121
	Lebenslauf	122

1. Einleitung

Das zelluläre Proteom wird einer ständigen Qualitätskontrolle unterzogen. Hierbei wird die Faltung von Proteinen in ihre native Struktur durch ein komplexes System von molekularen Chaperonen unterstützt, die auch an der Proteolyse von überschüssigen, fehlgefalteten oder aggregierten Proteinen durch ATP-abhängige Proteasen beteiligt sein können (Feldman und Frydman, 2000; Zwickl *et al.*, 2000; Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Esser *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2004; Spiess *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2004; Groll *et al.*, 2005; McClellan *et al.*, 2005). Die Bedeutung der Qualitätskontrolle für die Zelle wird durch eine Reihe von Krankheitsbildern im Menschen verdeutlicht, die mit einer Störung dieses Systems in Verbindung gebracht werden. Hierunter finden sich neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Erkrankung, das Parkinson-Syndrom, das Huntington-Syndrom und spongiforme Enzephalopathien wie die Kreuzfeld-Jakob-Erkrankung (de Vrij *et al.*, 2004; Dobson, 2004; Gandhi und Wood, 2005; Layfield *et al.*, 2005; Meriin und Sherman, 2005).

Neben dieser generellen Funktion bei der zellulären Qualitätskontrolle sind ATP-abhängige Proteasen an der spezifischen Regulation von komplexen zellulären Prozessen beteiligt. So werden zum Beispiel der Zellzyklus, die Zelldifferenzierung oder die zelluläre Stressantwort durch die Proteolyse von regulatorischen Proteinen bestimmt oder die biologische Aktivität von Proteinen durch die Prozessierung durch ATP-abhängige Proteasen verändert (Jenal und Hengge-Aronis, 2003; Rape und Jentsch, 2004; Ang und Wade Harper, 2005). Die Erfüllung dieser dualen Funktion ATP-abhängiger Proteasen setzt eine effiziente und spezifische Erkennung ihrer Substratproteine voraus.

1.1. AAA⁺-Proteine

Bisher gehören alle identifizierten ATP-abhängigen Proteasen zu der großen Proteinfamilie der AAA⁺-Proteine (*ATPases associated with a various cellular activities*). Neben der Proteolyse ist diese Familie an einer Vielzahl dynamischer zellulärer Prozesse wie Mitose, Meiose, Membranfusion und Transport, Rekonstitution des Endoplasmatischen Reticulums und des Golgi Apparats, Biogenese der Peroxisomen und Mitochondrien, DNA Replikation sowie Disaggregation und Faltung von Proteinen beteiligt (Ogura und Wilkinson, 2001). Kennzeichnend für diese Proteinfamilie ist die Anwesenheit mindestens einer so genannten AAA⁺-Domäne, eine hoch konservierte 200-250 Aminosäure große, ATPase-Domäne

(Neuwald *et al.*, 1999). An diese AAA⁺-Domäne angeschlossene Strukturen oder Adaptoren schaffen die strukturelle und funktionelle Diversität dieser Proteinfamilie, die zur Erfüllung der oben genannten Funktionen nötig ist. Das wahrscheinlich allen AAA⁺-Proteinen zugrunde liegende Wirkungsprinzip ist die energieabhängige Konformationsänderung von Substratproteinen.

1.1.1. Molekulare Funktionsmechanismen der AAA⁺-Domänen

Die AAA⁺-Domäne

Strukturell lassen sich zwei Subdomänen in der AAA⁺-Domäne unterscheiden (Ogura und Wilkinson, 2001). Die N-terminale α/β -Subdomäne weist eine klassische Rossman-Faltung auf. Der Kern der α/β -Subdomäne besteht aus einem parallelen β -Faltblatt, dessen Stränge von α -helikalen Strukturen verbunden werden. Deren Anzahl und Position sowie das gelegentliche Auftreten von größeren Insertionen zwischen den β -Strängen tragen zur strukturellen Diversität der AAA⁺-Domänen bei (Wang *et al.*, 2001; Hanson und Whiteheart, 2005). Am C-terminalen Ende der AAA⁺-Domänen befindet sich die α -Subdomäne, die von mehreren α -Helices aufgebaut wird (Ogura und Wilkinson, 2001; Hanson und Whiteheart, 2005).

In der AAA⁺-Domäne finden sich die klassischen Walker-A- und Walker-B-Motive der P-Loop-NTPase-Familie, die integraler Bestandteil der AAA⁺-ATP-Bindungsstelle sind (Neuwald *et al.*, 1999). Das Walker-A-Motiv ist für die ATP-Bindung essentiell und interagiert direkt mit den ATP-Phosphatresten. Ein hoch konservierter Lysinrest innerhalb der P-Loop-Konsensussequenz GXXXXGK(T/S) spielt hierfür eine wichtige Rolle. Das Walker-B-Motiv ist für die ATP-Hydrolyse entscheidend. Dessen hhhhDE-Sequenz, wobei h für eine beliebige hydrophobe Aminosäure steht, tritt ebenfalls in direkten Kontakt mit dem gebundenen Nukleotid. Der Aspartatrest koordiniert hier ein für die ATP-Hydrolyse essentielles Mg²⁺-Ion, während der Glutamatrest ein notwendiges Wassermolekül aktiviert (Iyer *et al.*, 2004; Hanson und Whiteheart, 2005).

Neben den klassischen Motiven der P-Loop-NTPasen finden sich in der AAA⁺-Domäne das so genannte Sensor-1- und Sensor-2-Motiv sowie Arginin-Finger, die ebenfalls zur ATP-Bindung und Hydrolyse beitragen (Karata *et al.*, 1999; Ogura *et al.*, 2004; Hanson und Whiteheart, 2005). Das Sensor-1-Motiv und die Arginin-Finger sind in einer Region lokalisiert, deren Sequenz in der AAA⁺-Subfamilie der AAA-Proteine hochkonserviert ist und

hier als zweite Homologieregion (*second region of homology*; SRH) bezeichnet wird (Lupas und Martin, 2002).

Die Ringstruktur der AAA⁺-Domänen

Die biologisch aktive Form von wahrscheinlich allen AAA⁺-Proteinen ist ein oligomerer, meist hexamerer Ringkomplex (Hanson und Whiteheart, 2005). Aufgrund der ringförmigen Anordnung der Untereinheiten kommt es zur Ausbildung einer zentralen Porenstruktur, die, wie weiter unten dargestellt wird, für den Funktionsmechanismus von AAA⁺-Proteinen von Bedeutung ist (Zhang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Kim und Kim, 2003; Ishikawa *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004). Erst durch diese Assemblierung wird die ATP-Bindungsstelle zwischen zwei benachbarten AAA⁺-Domänen gebildet und deren Arginin-Finger und Sensor-2-Motive können mit dem gebundenen Nukleotiden in Kontakt treten (Ogura *et al.*, 2004). Das heißt, dass jede AAA⁺-Domäne eines solchen hexameren Rings sowohl an der eigenen als auch an der Nukleotid-Bindung der benachbarten Untereinheit beteiligt ist. Ein solcher ringförmiger Aufbau der AAA⁺-Proteine ermöglicht prinzipiell einen koordinierten ATP-Hydrolyse-Zyklus. Für die koordinierte ATP-Hydrolyse werden ein synchronisiertes, sequentielles und ein Rotationsmodell diskutiert (Ogura und Wilkinson, 2001). Neuere Untersuchungen am prokaryotischen AAA⁺-Protein ClpX deuten allerdings auf einen probabilistischen Mechanismus, bei dem jede Untereinheit den ATP-Hydrolyse-Zyklus zufällig und unabhängig durchlaufen kann (Martin *et al.*, 2005).

Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen der AAA⁺-Domäne

Die bisher detaillierteste Analyse von Nukleotid-abhängigen Konformationsänderungen in der AAA⁺-Domäne wurde am prokaryotischen AAA⁺-Protein HslU durchgeführt (Wang *et al.*, 2001). In diesem Fall können die größten strukturellen Änderungen zwischen einem Nukleotid-freien und einem ADP-gebundenen Zustand der HslU-Kristallstrukturen beobachtet werden. Die α -Subdomäne der AAA⁺-Domäne rotiert nach ADP-Bindung relativ zur α/β -Subdomäne um einen Winkel von 21,5°, wobei die Rotationsachse im rechten Winkel zur sechsfachen Symmetrieachse des hexameren Ringkomplexes steht. Zusätzlich kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb der zentralen Porenstruktur, die als „offener“ oder „geschlossener“ Zustand beschrieben werden (Wang *et al.*, 2001). Interessanterweise unterscheiden sich die Kristallstrukturen von HslU mit gebundenem ADP oder ATP nur geringfügig. Offenbar ist nicht die ATP-Hydrolyse selbst sondern die ATP-Bindung und die

nachfolgende Nukleotid-Freisetzung die treibende Kraft für die strukturellen Änderungen von AAA⁺-Proteinen (Wang *et al.*, 2001).

1.2. ATP-abhängige Proteasen

AAA⁺-Domänen ATP-abhängiger Proteasen sind an der Substraterkennung, Entfaltung und Translokation von Substratproteinen in die assoziierten Peptidase-Komplexe beteiligt (Ogura und Wilkinson, 2001; Sauer *et al.*, 2004). In *Escherichia coli* finden sich mit ClpAP, ClpXP, HslUV, Lon und FtsH fünf ATP-abhängige Proteasen (Ogura und Wilkinson, 2001). Die AAA⁺-ATPase-Komponenten der ClpAP-, ClpXP- und HslUV-Protease stellen Mitglieder der Clp/Hsp100-Proteinfamilie dar, die eine (ClpX und HslU) oder zwei (ClpA) AAA⁺-Domänen besitzen (Schirmer *et al.*, 1996). Die AAA⁺-ATPase- und Peptidase-Domänen können sowohl auf einzelnen oder einer gemeinsamen Polypeptidkette kodiert sein (Ogura und Wilkinson, 2001). In eukaryotischen Zellen finden sich ATP-abhängige Proteasen in Form des 26S-Proteasoms und der mit prokaryotischen Proteasen verwandten mitochondrialen PIM1/Lon, ClpXP und AAA-Proteasen (Langer *et al.*, 2001; Glickman und Ciechanover, 2002; Wolf und Hilt, 2004; Kang *et al.*, 2005; Pines und Lindon, 2005; Nolden *et al.*, 2006).

Die gemeinsamen Wirkungsprinzipien ATP-abhängiger Proteasen soll in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben werden.

1.2.1. Das Prinzip der proteolytischen Kammer

ATP-abhängige Proteasen bilden in ihrer Quartärstruktur einen oligomeren Hohlzylinder aus, der in der Regel aus den proteolytischen Untereinheiten aufgebaut ist (Zwickl *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2004). Die katalytischen Zentren liegen dabei an der inneren Oberfläche dieses Zylinders, der somit ein proteolytisches Mikrokompartment darstellt. Die hohe lokale Konzentration von katalytischen Zentren im Inneren der Kammern gewährleistet einen effizienten und vollständigen Abbau der eingeführten Substratproteine. Der Zugang zu dieser proteolytischen Kammer ist nur für Substratproteine in einer weitgehend entfalteten Konformation über relativ enge axiale Poren möglich und wird durch die AAA⁺-Domänen der Proteasen vermittelt und reguliert (Schmidt *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2004). Dieser generelle

Aufbau verhindert die freie Zugänglichkeit und damit potentiell schädliche Interaktionen der proteolytischen Zentren mit den Proteinen der Zelle. Entsprechend kann die Proteolyse durch kontrollierten Zugang von Substratproteinen zu diesen proteolytischen Mikrokompartimenten reguliert werden. Nachfolgend soll das allgemeine Prinzip der proteolytischen Kammer von ATP-abhängigen Proteasen am Beispiel der prokaryotischen Proteasen FtsH und ClpP sowie des eukaryotischen 20S-Proteasoms verdeutlicht und die jeweils auftretenden Variationen beschrieben werden.

Die prokaryotische AAA-Protease FtsH

Die Kristallstruktur der cytoplasmatischen Domänen der prokaryotischen AAA-Protease FtsH aus *Thermotoga maritima* zeigt eine hexamere Quartärstruktur aus zwei eigenständigen Ringstrukturen, die jeweils aus den AAA- und proteolytischen Domänen aufgebaut sind. Die gesamte Struktur weist eine Höhe von ~ 65 Å und einen Durchmesser von ~ 100 Å auf (Bieniossek *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu allen bisher charakterisierten ATP-abhängigen Proteasen scheint hier die proteolytische Kammer nicht nur von den proteolytischen sondern auch von den AAA-Domänen aufgebaut zu werden. Die katalytischen Zentren dieser Metalloprotease, die aus den konservierten HEXXH-Motiven zur Zn^{2+} -Ionen-Koordinierung bestehen, liegen in einem Abstand von ~ 34 Å in der Peripherie der proteolytischen Kammer (Bieniossek *et al.*, 2006). Durch diesen Aufbau werden Substrate vermutlich direkt von den AAA-Domänen zu den proteolytischen Zentren geführt, ohne dass sie zuvor eine zu anderen ATP-abhängigen Proteasen vergleichbare Porenstruktur der proteolytischen Kammern passieren müssen. Die proteolytischen Domänen selbst formen an ihrer Oberfläche eine zentrale Pore mit einem Durchmesser von ~ 15 Å. (Bieniossek *et al.*, 2006).

Die prokaryotische Protease ClpP

Die caseinolytische Protease ClpP besitzt eine klassische katalytische Triade bestehend aus den Aminosäurereste S97, H122 und D171 und ist somit der Familie der Serin-Proteasen zuzurechnen (Wang *et al.*, 1997). In der Kristallstruktur formt ClpP aus zwei homoheptameren Ringen einen symmetrischen Zylinder mit einer molekularen Masse von 300 kDa sowie einer Höhe und einem Durchmesser von etwa 90 Å (Wang *et al.*, 1997). Die 14 katalytischen Zentren der Untereinheiten liegen dabei im Inneren einer kugelförmigen Kammer mit einem Durchmesser von etwa 51 Å. Aus diesen Daten ergibt sich eine lokale Konzentration proteolytischer Zentren von etwa 0,35 M (Wang *et al.*, 1997). Die beiden Ringkomplexe weisen axiale Poren auf, deren Durchmesser sich von der äußeren bis zur

inneren Oberfläche von ~ 17 auf ~ 10 Å verengen. Diese Poren können somit nur von Polypeptidketten passiert werden, die maximal eine α -Helix- oder β -Strang-Sekundärstruktur einnehmen (Wang *et al.*, 1997). Interessanterweise zeigen etwa 70% der inneren Oberfläche der proteolytischen Kammer hydrophobe Eigenschaften. Es wird vermutet, dass diese Flächen dazu beitragen, Substratproteine in der proteolytischen Kammer in einer entfalteten Konformation und damit abbaukompetent zu halten (Wang *et al.*, 1997).

Das eukaryotische 20S-Proteasom

Das eukaryotische 26S-Proteasom besteht aus einem 700 kDa großen proteolytischen Kernkomplex, dem so genannten 20S-Proteasom, und zwei 900 kDa großen regulatorischen 19S-Komplexen (Gorbea *et al.*, 1999; Heinemeyer *et al.*, 2004; Wolf und Hilt, 2004). Das 20S-Proteasom setzt sich aus insgesamt vier heptameren Ringen zusammen: zwei zentralen β -Ringen und zwei distalen α -Ringen. Die distalen Ringkomplexe bestehen aus je sieben verschiedenen, katalytisch inaktiven α -Untereinheiten ($\alpha 1-7$). Die zentralen β -Ringe andererseits beinhalten sieben verschiedene β -Untereinheiten ($\beta 1-7$ in *S. cerevisiae*) von denen nur drei proteolytisch aktiv sind (Baumeister *et al.*, 1998; Heinemeyer *et al.*, 2004). Die $\beta 1$ -Untereinheit ($\beta 1/Pre3$) weist Peptidylglutamyl-Peptid-hydrolysierende, die $\beta 2$ -Untereinheit ($\beta 2/Pup1$) eine Trypsin-ähnliche und die $\beta 5$ -Untereinheit ($\beta 5/Pre2$) eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität auf (Heinemeyer *et al.*, 1997; Baumeister *et al.*, 1998). Die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms gehören zur Familie der N-terminalen Nukleophil-Hydrolasen (Ntn-Hydrolasen) und das durch Prozessierung generierte N-terminale Threonin stellt sowohl das katalytische Nukleophil als auch den primären Protonenakzeptor dar (Chen und Hochstrasser, 1996; Arendt und Hochstrasser, 1997; Baumeister *et al.*, 1998). Das 20S-Proteasom besitzt eine zylindrische Form mit einer Länge von ~ 150 Å und einem Durchmesser von ~ 110 Å (Baumeister *et al.*, 1998). Die Struktur weist insgesamt drei Hohlräume auf, die durch die Stapelung der vier Ringkomplexe entstehen (Groll *et al.*, 1997). Die distalen α -Ringe und die zentralen β -Ringe formen zwei als Vorkammern bezeichnete Strukturen. Diese Vorkammern bilden ein internes Mikrokompartiment mit einem Volumen von ~ 59 nm³ (Pickart und Cohen, 2004). Die beiden zentralen β -Ringkomplexe bilden die zentrale proteolytische Kammer mit einem Volumen von ~ 84 nm³. Hier sind die katalytischen Zentren der aktiven β -Untereinheiten positioniert. Interessanterweise ähneln sich die räumlichen Verteilungen der katalytischen Zentren in dieser proteolytischen Kammer und der ClpP-Kammer sehr stark (Pickart und Cohen, 2004).

Die axialen Poren von freiem 20S-Proteasom werden durch die N-Termini der α -Untereinheiten verschlossen (Groll *et al.*, 2000). Erst durch die Assemblierung mit dem regulatorischen 19S-Komplex werden die Poren durch allosterische Wechselwirkungen geöffnet, die durch die 19S-Untereinheit Rpt2 vermittelt werden (Kohler *et al.*, 2001).

Welche Rolle die Vorkammern für den Abbauprozess spielen, ist bisher nicht geklärt. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass sich mehrere Substratproteine gleichzeitig in den Kammern des 20S-Proteasoms aufhalten können. Die Vorkammern könnten somit dazu beitragen, die Substratkapazität des Proteasoms zu erhöhen (Sharon *et al.*, 2006).

1.2.2. Entfaltung und Translokation von Substratproteinen

Der Zugang von Substratproteinen zu den verschiedenen proteolytischen Kammern wird prinzipiell von den assoziierten AAA^+ -Proteinen reguliert. Sie bestimmen durch die von ihnen vermittelte Substraterkennung, welche Proteine abgebaut werden, und wandeln die chemische Energie der ATP-Hydrolyse in die Mechanismen der Entfaltung und Translokation von gebundenen Substratproteinen um. Im Nachfolgenden sollen zunächst die Prinzipien der Substratentfaltung und -translokation beschrieben werden.

Die aktive Entfaltung von Substratproteinen - die „Unfoldase“-Aktivität

Die hexamere Ringstruktur von AAA^+ -Proteinen weist eine zentrale Pore auf, die sich an die axiale Pore des proteolytischen Komplexes anschließt (Wang *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Krzywda *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2002; Kim und Kim, 2003). Ein solcher Aufbau suggeriert, dass Substratproteine nach ihrer Entfaltung durch die zentrale und axiale Pore in die proteolytischen Kammer eingeführt werden. Die Fähigkeit von AAA^+ -Komponenten ATP-abhängiger Proteasen zur aktiven Proteinentfaltung wurde für die prokaryotischen Proteinen ClpX und ClpA am Beispiel einer markierten Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP-SsrA) nachgewiesen (Weber-Ban *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2000). Die Rate der Entfaltung des ansonsten sehr stabilen GFP-Proteins wurde hierbei um einen Faktor von 10^7 erhöht, was einer Erniedrigung der Aktivierungsenergie um $\sim 9,8$ kcal/mol entspricht (Kim *et al.*, 2000). Entsprechend wird den AAA^+ -Komponenten eine enzymatische „Unfoldase“-Aktivität zugesprochen. Konsistent mit einer aktiven Translokation konnte für die entsprechenden Proteasen ClpXP und ClpAP gezeigt werden, dass Substratproteine in

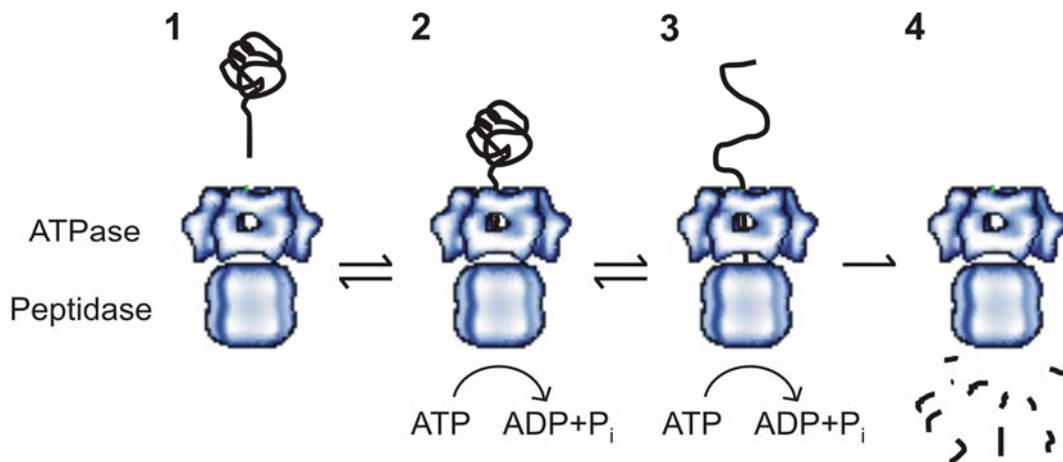


Abb. 1: Modell der translokationsgekoppelten Proteinentfaltung. Ein gefaltetes Substratprotein mit einer unstrukturierten terminalen Region kann von einer ATP-abhängigen Protease, die aus einem Ringkomplex von AAA⁺-ATPasen (ATPase) und einem proteolytischen Hohlzylinder (Peptidase) aufgebaut ist, erkannt werden (1). Unter ATP-Hydrolyse wird eine Zugkraft auf die unstrukturierte Region ausgeübt, die durch die sterische Hinderung der zentralen Pore des AAA⁺-Ringes zu einer Entfaltung des Proteins führen kann (2). Kommt es zu einer Denaturierung, wird das Substratprotein in die proteolytische Kammer transloziert (3). Das Substrat wird vollständig hydrolysiert und die Abbauprodukte von der Protease freigesetzt (4). Das Modell der ATP-abhängigen Protease wurde aus (Hanson und Whiteheart, 2005) entnommen.

elektronenmikroskopischen Aufnahmen zunächst am distalen Ende der AAA⁺-Ringe in axialer Verlängerung des Komplexes und nach induzierter Aktivität in den proteolytischen Kammern akkumulieren (Ortega *et al.*, 2000; Ishikawa *et al.*, 2001).

Basierend auf diesen Beobachtungen und den Strukturanalysen verschiedener Nukleotidzustände der prokaryotischen Protease HslUV wurde das Modell der „translokationsgekoppelten Proteinentfaltung“ entwickelt (Abb. 1) (Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). In diesem Modell werden unstrukturierten, häufig terminalen Sequenzen der Substratproteine in die zentrale Pore der AAA⁺-Komponenten eingeführt. Hier interagieren sie mit einem konservierten @XG-Motiv auf einer Schleifenstruktur, wie durch Mutationsanalysen und Quervernetzungsexperimente nahe gelegt wird (Song *et al.*, 2000; Yamada-Inagawa *et al.*, 2003; Schlieker *et al.*, 2004; Siddiqui *et al.*, 2004; Hinnerwisch *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Der ATP-Hydrolyse-Zyklus induziert Konformationsänderungen, die zu einer gerichteten Positionsänderung des aromatischen oder hydrophilen Aminosäurerestes (@) innerhalb der Pore führen und damit eine konstante Zugkraft auf die Substratsequenz bewirken (Wang *et al.*, 2001). Aufgrund der sterischen Hinderung durch die enge zentrale Pore entsteht ein lokaler Denaturierungseffekt auf die Substratstrukturen, die sich direkt an

die Erkennungssequenz anschließen (Huang *et al.*, 2005). Deren lokale Stabilität bestimmt aufgrund der Kooperativität der Proteinfaltung maßgeblich die Wahrscheinlichkeit einer Entfaltung (Ortega *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2001; Kenniston *et al.*, 2003; Kenniston *et al.*, 2004). Stabil gefaltete Substratproteine können im Falle von ClpXP offenbar nach mehreren Runden vergeblicher Entfaltungsversuche wieder von der Protease freigesetzt werden, um anschließend einen erneuten Zyklus von Substratbindung und versuchter Entfaltung zu durchlaufen (Kenniston *et al.*, 2005). Für jeden Zyklus können dabei etwa 15 bis 20 Moleküle ATP verbraucht werden (Kenniston *et al.*, 2005). Abhängig von der Faltungsstabilität eines Substrates kann entsprechend der durchschnittliche ATP-Verbrauch für die Denaturierung zwischen 12 und 500 ATP-Molekülen und die notwendige Zeit von wenigen Sekunden bis Minuten betragen (Kenniston *et al.*, 2003; Kenniston *et al.*, 2004). Kommt es zur Entfaltung einer Proteindomäne, kann das Substrat entsprechend durch die zentrale und axiale Pore transloziert und in der proteolytischen Kammer abgebaut werden. Untersuchungen an ClpXP zeigen, dass die Translokation für entfaltete Substratproteine proportional zu deren Länge mit einer Rate von ~ 400 Aminosäureresten min^{-1} verläuft (Kenniston *et al.*, 2005). Für diesen Prozess werden abhängig vom betrachteten Substrat etwa 30 bis 80 Moleküle ATP pro 100 Aminosäureresten gespalten (Kenniston *et al.*, 2003).

Offenbar können Substratproteine auch nach begonnener Hydrolyse von der Protease freigesetzt werden, wenn sie während des Translokationsprozesses auf eine stabil gefaltete Domäne trifft (Kenniston *et al.*, 2005). Eine solche Freisetzung von Proteinfragmenten nach dem Abbruch der Proteolyse spielt offenbar eine physiologisch relevante Rolle bei der regulierten Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Prozessierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- κ B (Rape und Jentsch, 2004; Tian *et al.*, 2005). Neben der Faltungsstabilität kann hier auch die Sequenzkomplexität der translozierenden Regionen die Unfoldase-Aktivität der Protease beeinflussen (Tian *et al.*, 2005).

Die Unfoldase-Aktivität der einzelnen ATP-abhängigen Proteasen kann sich deutlich voneinander unterscheiden. Hier lassen sich neben generellen auch spezifische Unterschiede für bestimmte Substrat-Protease-Kombinationen beobachten (Herman *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2004). Eine solche Spezialisierung auf die Entfaltung bestimmter Substrate könnte zur Entwicklung der verschiedenen ATP-abhängigen Proteasen in prokaryotischen Zellen beigetragen haben.

Das Modell der translokationsgekoppelten Proteinentfaltung erklärt aber offenbar nicht alle Entfaltungsprozesse ATP-abhängiger Proteasen. Im Falle des 26S-Proteasoms konnten einige interessante Abweichungen beobachtet werden. So kann sich die Substratdenaturierung hier

prinzipiell auch ohne einen Translokationsprozess vollziehen (Navon und Goldberg, 2001). Daneben kann der Proteinabbau von entfalteten zyklischen Substraten und von oxidativ geschädigten Proteinen allein durch das 20S-Proteasom ohne einen regulatorischen Komplex aus AAA⁺-ATPase-Komponenten vermittelt werden (Shringarpure *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Shringarpure *et al.*, 2003). Entfaltete Substratproteine können prinzipiell auch ohne ATP-Hydrolyse in die proteolytische Kammer des 26S-Proteasoms gelangen, wobei offenbar eine erleichterte Diffusion und der anschließende Abbauprozess alleine schon für eine gerichtete Translokation ausreichend sind (Smith *et al.*, 2005).

1.2.3. Die Substraterkennung durch prokaryotische ATP-abhängige Proteasen

Da ATP-abhängige Proteasen Proteine aktiv entfalten und in ihre proteolytischen Kammern translozieren können, ist die spezifische Erkennung ihrer Substrate für die Zelle von entscheidender Bedeutung. Im Cytosol und im Kern eukaryotischer Zellen wird der energieabhängige Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System vermittelt (Pines und Lindon, 2005). Die spezifische Substraterkennung des 26S-Proteasoms wird dabei bis auf wenige Ausnahmen über die Bindung von Polyubiquitin-Ketten gewährleistet (Miller und Gordon, 2005). Diese Ketten des hochkonservierten Proteins Ubiquitin werden über eine Enzymkaskade, die ein E1-Ubiquitin-aktivierendes und E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym sowie eine E3-Ubiquitin-Ligase umfasst, kovalent an die Substrate angefügt. Die eigentliche Substraterkennung erfolgt dabei durch die Spezifität der E3-Ubiquitin-Ligasen einer eukaryotischen Zelle (Weissman, 2001; Ardley und Robinson, 2005; Petroski und Deshaies, 2005). Das Ubiquitin-Proteasom-System kann in Mitochondrien und prokaryotischen Zellen nicht gefunden werden. Im Nachfolgenden sollen daher die Mechanismen der Substraterkennung prokaryotischer ATP-abhängiger Proteasen näher beschrieben werden.

Erkennungssignale von Substratproteinen

Substratproteine von prokaryotischen ATP-abhängigen Proteasen werden in der Regel an unstrukturierten terminalen Sequenzen erkannt. Die C-terminale SsrA-Markierung ist hierfür ein klassisches Beispiel. Kommt es zu einer Blockierung von Ribosomen während der Proteinsynthese, wird mit Hilfe einer tmRNA (SsrA) eine elf Aminosäure lange SsrA-Sequenz (AANDENYALAA) an die Polypeptidketten angefügt. Die reife SsrA-RNA weist eine Alanyl-tRNA-Funktion auf. Sie kann an die blockierten Ribosomen binden und das

Alanin auf die C-Termini der unvollständig synthetisierten Polypeptidketten übertragen. Zusätzlich kodiert die SsrA-RNA einen offenen Leseraster für eine Sequenz von zehn Aminosäuren, dessen anschließende Translation zur endgültigen SsrA-Markierung der Polypeptidketten führt (Keiler *et al.*, 1996). Solche SsrA-markierten Proteine werden *in vivo* und *in vitro* von den ATP-abhängigen Proteasen ClpAP, ClpXP und FtsH aus *E. coli* erkannt und proteolytisch entfernt (Gottesman *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 1998). Neben der SsrA-Sequenz konnten für die ClpXP-Protease anhand 50 identifizierter Substratproteine fünf verschiedene terminale Erkennungsmotive abgeleitet werden. Die zwei C-terminalen Motive zeigen ein SsrA-ähnliches LAA (C-Motiv-1) und ein MuA-ähnliches RRKKAI (C-Motiv-2) Motiv. Für die drei N-terminalen Motive konnten die Konsensussequenzen polar-T/ φ - φ -basisch- φ (N-Motiv-1), NH₂-Met-basisch- φ - φ - φ -X5- φ (N-Motiv-2), φ -X-polar-X-polar-X-basisch-polar (N-Motiv-3) ermittelt werden, wobei φ hier für eine beliebige hydrophobe Aminosäure steht (Flynn *et al.*, 2003). In ähnlicher Weise können die letzten fünf Aminosäuren des CII-Proteins des Phagen Lambda eine cis-aktivierte Proteolyse durch die AAA-Protease FtsH vermitteln (Kobiler *et al.*, 2002). Neben diesen primären terminalen Motiven existieren auch so genannte „kryptische“ oder latente Erkennungssequenzen. Der LexA-Repressor, zum Beispiel, führt eine autokatalytische Spaltung durch, die ein N- und C-terminales Proteinfragment generiert. Erst die daraus resultierenden neuen C- und N-terminalen Sequenzen werden durch ClpXP erkannt und ermöglichen eine vollständige Proteolyse (Neher *et al.*, 2003).

Neben diesen terminalen Erkennungssequenzen finden sich aber auch Beispiele, bei denen die Erkennung und der Abbau an internen Regionen stattfinden können. Für FtsH konnte gezeigt werden, dass nur eine entfaltete Apoflavodoxin Domäne, die in einem Fusionsprotein von stabil gefalteten GST- und GFP-Domänen flankiert wird, abgebaut wird (Okuno *et al.*, 2006). Interne Erkennungssequenzen können auch zur Bindung und zu einem effizienten Substratabbau durch ClpAP oder ClpXP beitragen (Hoskins *et al.*, 2002). Allerdings ist in diesen Fällen zusätzlich die Anwesenheit einer unstrukturierten C-terminalen Sequenz für die Proteolyse notwendig (Hoskins und Wickner, 2006).

Substratbinderegionen ATP-abhängiger Proteasen

Die bisher identifizierten Substratbinderegionen von prokaryotischen ATP-abhängigen Proteasen lassen sich prinzipiell in zwei Gruppen einteilen. Zum einen in akzessorische Domänen, die wie die N-Domänen von ClpX und ClpA oder die I-Domäne von HslU als zusätzliche Strukturen von AAA⁺-Proteinen auftreten können. Zum anderen in Regionen, die

wie das @XG-Motiv in der zentralen Pore oder die SSD-Domäne in der Kernstruktur von AAA⁺-Domänen zu finden sind.

Die akzessorische N-terminale (N) Domäne von ClpX ist eine Zn²⁺-bindende Domäne (ZBD), die in der hexameren ClpX-Struktur mit einer N-Domäne der benachbarten Untereinheit dimerisiert (Banecki *et al.*, 2001; Donaldson *et al.*, 2003; Wojtyra *et al.*, 2003). Die N-Domänen bilden somit eine trimere Struktur aus dimeren N-Domänen. Die Deletion der N-Domänen (ClpXΔN) führt zu einer gestörten Proteolyse der Substratproteine λO und MuA. Im Gegensatz dazu ist der Abbau von SsrA-markierten Proteinen (GFP-SsrA) nicht beeinträchtigt (Singh *et al.*, 2001; Wojtyra *et al.*, 2003). Eine reduzierte Affinität von ClpXΔN für λO und die spezifische Bindung isolierter N-Domänen an λO und MuA zeigen einen wichtigen Beitrag der N-Domäne für die direkte Substratbindung von ClpX (Singh *et al.*, 2001; Wojtyra *et al.*, 2003).

Auch die N-terminale (N) Domäne von ClpA besitzt ein Zn²⁺-Bindungsmotiv und kann die Entfaltung bzw. den Abbau bestimmter Substratproteine beeinflussen (Guo *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2004). So wird ein GFP-RepA-Fusionsprotein durch eine ClpAΔN-Variante nicht stabil gebunden oder entfaltet, gleichwohl die Prozessierung eines SsrA-markierten GFP-Proteins nicht beeinträchtigt ist (Hinnerwisch *et al.*, 2005). Quervernetzungsexperimente lassen eine direkte Bindung der N-Domäne an GFP-RepA wahrscheinlich erscheinen (Hinnerwisch *et al.*, 2005). Zusätzlich vermittelt die N-Domäne stabile Interaktionen von ClpA mit größeren SsrA-markierten Proteinen sowie mit unspezifischen Substratproteinen (Xia *et al.*, 2004; Hinnerwisch *et al.*, 2005).

Die intermediäre (I) Domäne von HslU stellt eine 133 Aminosäure große Insertion zwischen den Strängen β2 und β3 des zentralen β-Faltblattes der α/β-Subdomäne dar (Bochtler *et al.*, 2000). Sie formt eine lose gefaltete, überwiegend helikale Struktur und ragt auf die der HslV-Protease gegenüberliegenden Seite über den AAA⁺-Ringkomplex hinaus (Sousa *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Die Deletion der I-Domäne führt zu einem gestörten Abbau der gefalteten Substratproteine P22-Arc-Repressor oder Sula (Song *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2003). Die Proteolyse von unstrukturierten Proteinen wie Casein oder Peptiden sowie die ATPase-Aktivität und die Komplexassemblierung sind in solchen HslUΔI-Varianten nicht gestört (Song *et al.*, 2000). Inwieweit die I-Domäne direkt mit Substratproteinen interagiert ist noch nicht geklärt. In einem Zwei-Hybrid-System-Ansatz konnte nur eine geringe Interaktion der I-Domäne mit einem entsprechenden Substrat ermittelt werden (Lee *et al.*, 2003).

Die SSD (sensor and substrate discrimination)-Domäne entspricht strukturell der α-Subdomäne von AAA⁺-Domänen und stellt damit eine Substratbinderegion innerhalb der

AAA⁺-Kernstruktur dar (Smith *et al.*, 1999). Aufgrund von Sequenzverwandtschaften mit PDZ-Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen durch die Bindung von C-terminalen Sequenzen vermitteln können, wurde die SSD-Domäne ursprünglich auf mögliche Substratbindeigenschaften untersucht (Levchenko *et al.*, 1997). Die isolierte SSD-Domäne von ClpX interagiert dabei mit gleicher Effizienz und Spezifität mit Modells substraten wie ClpX selbst (Levchenko *et al.*, 1997). In ähnlicher Weise können auch für die isolierten SSD-Domänen von ClpA, HslU und Lon Bindungseigenschaften nachgewiesen werden, die den natürlichen Substratspezifitäten der entsprechenden Proteasen entsprechen (Smith *et al.*, 1999).

Eine direkte Interaktion des @XG-Motivs der zentralen Pore von AAA⁺-Proteinen mit Substratproteinen ist sehr wahrscheinlich (Wang *et al.*, 2001; Schlieker *et al.*, 2004; Hinnerwisch *et al.*, 2005). Neben einer prinzipiellen Rolle für die Substrattranslokation weisen einige Befunde zusätzlich auf eine Funktion bei der eigentlichen Substraterkennung hin. So werden SsrA-markierte Modells substrate durch ClpA mit einer einzigen hoch affinen Substratbindestelle gebunden und spezifisch an eine als D2 bezeichnete Schlaufenstruktur, die das @XG-Motiv enthält, quervernetzt (Hinnerwisch *et al.*, 2005; Piszczek *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte für das Porenmotiv von ClpX (FVG) eine V154F-Mutation identifiziert werden, die einen spezifischen Defekt bei der Bindung von Substraten mit dem SsrA-ähnlichen C-Motiv-1 verursacht (Siddiqui *et al.*, 2004). Möglicherweise wird die Substraterkennung und Bindungsspezifität in diesen Fällen direkt durch das @XG-Motiv der zentralen Pore vermittelt.

Kofaktoren der Substratbindung durch ATP-abhängige Proteasen

Die Erkennung von Substratproteinen durch prokaryotische ATP-abhängige Proteasen kann durch eine Reihe von Kofaktoren beeinflusst werden. So werden zwar SsrA-markierte Proteine sowohl von ClpX als auch von ClpA erkannt und abgebaut, deren Bindung aber durch die beiden Kofaktoren SspB und ClpS an die jeweilige Protease stark modifiziert. SspB ist ein mit Ribosomen assoziiertes Protein und bindet als Homodimer mit seiner N-terminalen Substratbindedomäne an SsrA-markierte Proteine (Levchenko *et al.*, 2000; Wah *et al.*, 2002). Durch eine C-terminale unstrukturierte Region interagiert SspB mit einer der drei Bindungsstellen in ClpX, die jeweils durch die dimeren N-Domänen gebildet werden, und stimuliert dabei dessen ATPase-Aktivität (Wah *et al.*, 2003; Bolon *et al.*, 2004). Durch diesen Prozess wird die Erkennung von SsrA-markierten Proteinen durch ClpX verstärkt (Levchenko *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu bindet ClpS an die N-Domänen von ClpA und inhibiert die

Proteolyse von SsrA-markierten Proteinen (Dougan *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2002; Zeth *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist die Funktion von ClpS für den Abbau von Proteinen durch ClpAP entsprechend der prokaryotischen N-Ende-Regel essentiell (Erbse *et al.*, 2006). ClpS bindet über seine Substratbindestelle, die distal zur ClpS-ClpA Kontaktfläche gelegen ist, direkt an die N-terminalen, destabilisierenden Aminosäurereste (Erbse *et al.*, 2006). Durch die Wirkungsweise dieser beiden Kofaktoren werden die Proteolyse von SsrA-markierten Substraten verstärkt durch ClpXP und der Abbau von Substraten der N-Ende-Regel durch ClpAP durchgeführt. Ein weiteres Beispiel solcher Kofaktoren ist RssB, das für die Proteolyse von σ^S durch ClpXP notwendig ist (Zhou *et al.*, 2001). Hier wird die N-terminale Region von σ^S erst nach der Bindung von RssB exponiert und kann dann als Bindungsstelle für ClpXP dienen (Studemann *et al.*, 2003). Neben diesen Kofaktoren können auch Chaperone den Abbau bestimmter Substratproteine erleichtern. So übt das DnaK/DnaJ/GrpE Chaperonsystem eine aktive Rolle beim Abbau von σ^{32} durch FtsH aus (Blaszczak *et al.*, 1999; Tatsuta *et al.*, 2000).

1.3. Herausforderungen an das proteolytische System in Mitochondrien

Mitochondrien besitzen ihr eigenes Qualitätskontrollsystem, das sich aus molekularen Chaperonen wie Hsp60, Hsp70 und Hsp78 sowie den ATP-abhängigen Proteasen PIM1/Lon und der *i*- und *m*-AAA-Protease zusammensetzt (Abb. 2)(Nolden *et al.*, 2006). Neben generellen Ereignissen wie Mutationen, Hitzestress oder oxidativem Stress wird dieses System durch die mitochondriale Besonderheit des Proteinimports von kernkodierten Proteinen und einer eigenen Biosynthese von mitochondrial kodierten Proteinen herausgefordert.

Das mitochondriale Proteom von *S. cerevisiae* besteht aus rund 800 verschiedenen Proteinen (Sickmann *et al.*, 2003; Ohlmeier *et al.*, 2004; Prokisch *et al.*, 2004). Etwa 99% dieser Proteine sind kernkodiert und werden nach ihrer Translation im Cytosol in die Mitochondrien importiert (Truscott *et al.*, 2003; Wiedemann *et al.*, 2004; Paschen *et al.*, 2005). Während des Imports befinden sich die Proteine in einer weitgehend entfalteten Konformation und nehmen ihre native Struktur *de novo* in den Mitochondrien an (Neupert und Brunner, 2002). Darüber hinaus besitzen Mitochondrien auf Grund ihres endosymbiontischen Ursprungs ein eigenes zirkuläres Genom und einen eigenen Transkriptions- und Translationsapparat (Yang *et al.*, 1985; Gray *et al.*, 2001; Burger *et al.*, 2003). Die meisten der mitochondrial kodierten

Proteine (Var1, Atp6, Atp8, Atp9, Cob, Cox1, Cox2 und Cox3 in *S. cerevisiae*) sind Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe und müssen nach ihrer Synthese an der inneren Mitochondrienmembran mit kernkodierten Untereinheiten assemblieren. Entsprechend müssen die cytosolischen und mitochondrialen Syntheseprozesse und die Assemblierung der Untereinheiten streng koordiniert bzw. überschüssige Untereinheiten durch ATP-abhängige Proteasen abgebaut werden, um eine potentiell schädliche Akkumulation von fehlgefalteten oder nicht assemblierten Proteinen zu verhindern. Die Herausforderungen an das Qualitätskontrollsystem und insbesondere an die ATP-abhängigen Proteasen von Mitochondrien durch diese komplexen Biogeneseprozesse soll im Nachfolgenden am Beispiel des Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplexes beschrieben werden.

Die Cytochrom-*c*-Oxidase (COX) ist in *S. cerevisiae* aus zwölf Untereinheiten aufgebaut (Herrmann und Funes, 2005). Die Translation der mRNA der mitochondrial kodierten Untereinheiten Cox1, Cox2 und Cox3, die den katalytischen Kern des Komplexes bilden, wird über spezifische Translationsaktivatoren (Cox1: Pet309 und Mss51; Cox2: Pet111; Cox3: Pet54, 122 und 494), die als Komplex an der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, reguliert (Costanzo und Fox, 1988; Mulero und Fox, 1993; Mulero und Fox, 1993; Brown *et al.*, 1994; Manthey und McEwen, 1995; Manthey *et al.*, 1998; Naithani *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2004). Die Ribosomen binden während der Translation an die Insertionsmaschinerie in der inneren Mitochondrienmembran durch Wechselwirkung von Mrp20/L23 und der C-terminalen Domäne von Oxa1 sowie mit Mba1 (Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003; Ott *et al.*, 2006). Cox1, Cox2 und Cox3 können so über Oxa1 kotranslational in die innere Mitochondrienmembran inseriert werden (He und Fox, 1997; Hell *et al.*, 1997; Kermorgant *et al.*, 1997; Nargang *et al.*, 2002). Für die Translokation der löslichen, C-terminalen Domäne von Cox2 ist neben Oxa1 zusätzlich ein Komplex aus Cox18/Oxa2, ein Homolog von Oxa1, Pnt1 und Mss2 notwendig (Souza *et al.*, 2000; Saracco und Fox, 2002; Funes *et al.*, 2004). Neu synthetisiertes Cox1 wird durch Mss51 und Cox14 gebunden (Perez-Martinez *et al.*, 2003; Barrientos *et al.*, 2004). Mss51 erfüllt somit eine duale Rolle für die Cox1-Biogenese. Zum einen initiiert es als Aktivator die Translation und zum anderen bindet es als Chaperon an neu synthetisiertes, nicht assembliertes Cox1. Entsprechend wird ein Rückkopplungsmechanismus für die Expressionskontrolle von Cox1 durch Mss51 vorgeschlagen (Perez-Martinez *et al.*, 2003; Barrientos *et al.*, 2004). Daneben sind eine Reihe weiterer Faktoren an der Biogenese von Cox1 beteiligt, die die Häm-A-Biosynthese (Cox10 und Cox15) und die Kupferionen-Insertion (Cox17 und Cox11)

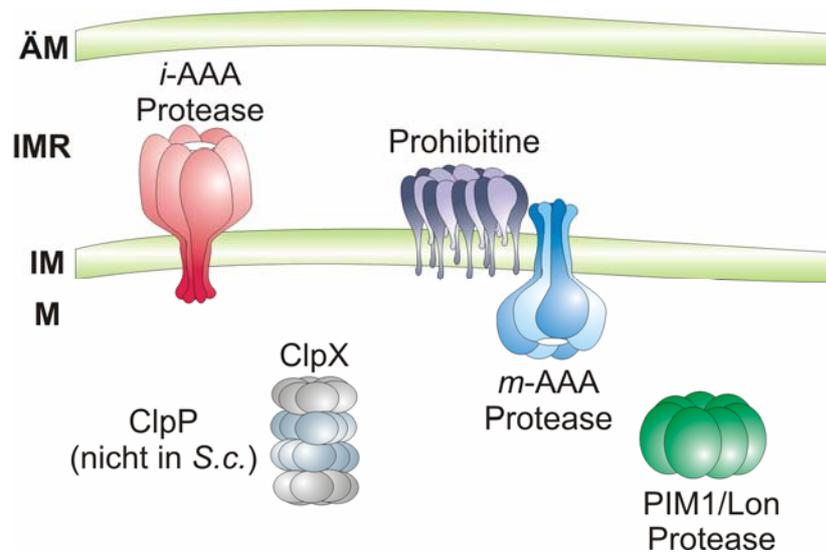


Abb. 2: ATP-abhängige Proteasen in Mitochondrien. Dargestellt sind die löslichen ATP-abhängigen Proteasen der Matrix PIM1/Lon und ClpXP. In *S. cerevisiae* konnte bisher kein ClpP-homologes Protein identifiziert werden. Die *i*-AAA-Protease und *m*-AAA-Protease, die im Komplex mit den Prohibitinen gezeigt ist, sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. ÄM: äußeren Mitochondrienmembran, IMR: Intermembranraum, IM: innere Mitochondrienmembran, M: Matrix. Die Abbildung wurde nach (Nolden *et al.*, 2006) modifiziert.

vermitteln (Herrmann und Funes, 2005). Cox2 wird nach seiner Insertion durch ein konserviertes Chaperon Cox20 gebunden und anschließend im Intermembranraum durch die Aktivität von Imp1 in einem Komplex mit Imp2 und Som1 N-terminal gereift (Hell *et al.*, 2000; Herrmann und Funes, 2005). An der Kupferionen-Insertion in Cox2 sind zudem die Faktoren Cox17, Sco1 und Sco2 beteiligt (Herrmann und Funes, 2005). Zur Assemblierung der COX-Untereinheiten interagiert Cox1 mit der kernkodierte Untereinheit Cox4 und bildet den so genannten S2-Subkomplex. Nach der Assoziation von Cox2 und Cox3 sowie anderer kernkodierter Untereinheiten formt sich der Subkomplex S3. Die Bindung von CoxVIa und CoxVIIa/b ergibt abschließend den vollständigen COX-Komplex (Nijtmans *et al.*, 1998).

1.4. Das proteolytische System der inneren Mitochondrienmembran

Eine zentrale Funktion für die Qualitätskontrolle der komplexen Biogeneseprozesse in der inneren Mitochondrienmembran üben zwei membrangebundene ATP-abhängige Proteasen aus. Diese AAA-Proteasen sind hoch konserviert, und verwandte Proteine können in der

cytoplasmatischen Membran von Bakterien, in der Thylakoidmembran von Plastiden und in der inneren Mitochondrienmembran von Pilzen, Säugern und Pflanzen gefunden werden (Kolodziejczak *et al.*, 2002; Ito und Akiyama, 2005; Urantowka *et al.*, 2005; Nolden *et al.*, 2006; Sakamoto, 2006). Die Untereinheiten der AAA-Proteasen weisen dabei eine gemeinsame Domänenstruktur auf (Abb. 3)(Ito und Akiyama, 2005; Nolden *et al.*, 2006). Am N-Terminus finden sich generell eine wenig konservierte Domäne und ein oder zwei Transmembrandomänen. Im Anschluss daran befindet sich die charakteristische, hoch konservierte AAA-Domäne, die die AAA-Proteasen der Proteinfamilie der AAA⁺-Proteine zuordnet, mit den für die ATP-Bindung und -Hydrolyse wichtigen Walker-A- und -B-Motiven und der zweiten Homologieregion (SRH) (Neuwald *et al.*, 1999; Ogura und Wilkinson, 2001; Lupas und Martin, 2002; Hanson und Whiteheart, 2005; Nolden *et al.*, 2006). Auf die AAA-Domäne folgt eine proteolytische Domäne, die ein für Metallopeptidasen typisches, konserviertes HEXXH-Motiv aufweist. In diesem katalytischen Zentrum wird ein Zink-Ion durch die zwei Histidin-Reste des Motivs und zusätzlich durch einen konservierten Aspartatrest koordiniert, was AAA-Proteasen der Klasse der Aspartat-Zinkine zuordnet (Bieniossek *et al.*, 2006). Der Glutamatrest des HEXXH-Motivs aktiviert ein Wasser-Molekül, das den nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung ausführt (Vallee und Auld, 1990; Rawlings und Barrett, 1995; Mock und Stanford, 1996). Am C-Terminus ist eine konservierte C-terminale Helixstruktur lokalisiert, die für die Aktivität der prokaryotischen AAA-Protease FtsH essentiell ist (Shotland *et al.*, 2000).

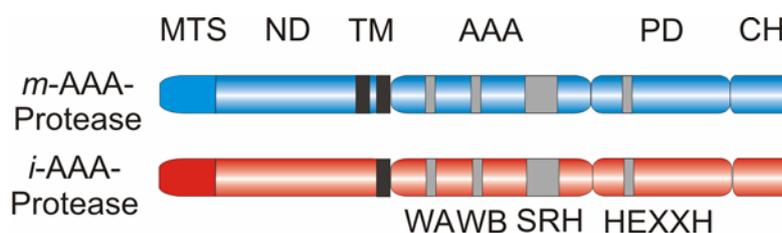


Abb. 3: Schematische Darstellung mitochondrialer AAA-Proteasen. Die lineare Proteinstruktur der Untereinheiten der *m*-AAA-Protease und der *i*-AAA-Protease. Innerhalb der AAA-Domänen (AAA) sind die Walker-A- und Walker-B-Motive (WA, WB) sowie die unter AAA-Proteinen hoch konservierte zweite Homologieregion (*second region of homology*, SRH). Das HEXXH-Motiv zur Metallionenkomplexierung ist in der proteolytischen Domäne (PD) eingezeichnet. MTS: mitochondriale Sortierungssequenz, ND: N-terminale Domäne, TM: Transmembrandomänen, AAA: AAA-Domäne, PD: proteolytische Domäne, CH: C-terminale Helices.

In der inneren Mitochondrienmembran von *S. cerevisiae* sind zwei AAA Proteasen lokalisiert, die *i*- und *m*-AAA-Protease, die ihre katalytischen Domänen in den Intermembranraum bzw. in die Matrix exponieren (Abb. 3) (Pajic *et al.*, 1994; Leonhard *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1996). Sie bilden hochmolekulare Komplexe von rund 1 MDa (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1996). Die *i*-AAA-Protease ist ein homooligomerer Komplex aus Yme1-Untereinheiten, während die *m*-AAA-Protease einen heterooligomeren Komplex aus Yta10 (Afg3)- und Yta12 (Rca1)-Untereinheiten darstellt (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1996). Die *m*-AAA-Protease interagiert mit einem 1,2 MDa großen Prohibitin-Komplex und formt einen rund 2 MDa großen Superkomplex (Steglich *et al.*, 1999). Der Prohibitin-Komplex bildet eine ringförmige Struktur von 270 x 200 Å bestehend aus einer alternierenden Abfolge von Phb1- und Phb2-Untereinheiten und übt eine negative Regulation auf die proteolytische Aktivität der *m*-AAA-Protease aus (Steglich *et al.*, 1999; Tatsuta *et al.*, 2005). Im Schlauchpilz *Neurospora crassa* wurden bisher je eine Untereinheit, IAP-1 und MAP-1, der *i*- bzw. *m*-AAA-Protease beschrieben (Klanner *et al.*, 2001). Die AAA-Proteasen des Menschen setzen sich aus Yme1L bzw. aus AFG3L2 und Paraplegin zusammen (Casari *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 2000; Atorino *et al.*, 2003). Interessanterweise konnte in der Maus zu den menschlichen Homologen eine dritte mögliche Untereinheit einer *m*-AAA-Protease identifiziert werden, AFG3L1 (Kremmidiotis *et al.*, 2001). Die genaue stöchiometrische Zusammensetzung der AAA-Protease-Komplexe ist bisher nicht bekannt. Basierend auf den Strukturanalysen der bakteriellen AAA-Protease FtsH wird aber von einer hexameren Ringstruktur ausgegangen (Krzywda *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2002; Bieniossek *et al.*, 2006).

Die AAA-Proteasen spielen eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Biogenese und ihre Deletion führt in *S. cerevisiae* zu pleiotropen Defekten (Langer *et al.*, 2001; Nolden *et al.*, 2006). So weisen Yme1-defiziente Stämme bei erhöhter Temperatur ein gestörtes respiratorisches und auf Glucose-haltigen Medien ein kältesensitives Wachstum auf (Thorsness *et al.*, 1993). Zudem zeigen solche Zellen einen *petite*-negativen Phänotyp, das heißt, sie können nicht ohne mitochondriale DNA wachsen (Thorsness und Fox, 1993). Die Abwesenheit von Yme1 führt zu einer veränderten Morphologie der Mitochondrien und durch einen erhöhten vakuolären Mitochondrienabbau zu einem verstärkten Transfer mitochondrialer DNA in den Zellkern (Thorsness und Fox, 1993; Campbell *et al.*, 1994; Campbell und Thorsness, 1998).

Die Deletion einer oder beider Untereinheiten der *m*-AAA-Protease bewirkt ein gestörtes Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen und damit einen *petite*-Phänotyp (Tauer *et al.*, 1994). Eine stark reduzierte Translation mitochondrialer Proteine ist sehr

wahrscheinlich ursächlich für diesen Phänotyp (Nolden *et al.*, 2005). Zudem wird der *m*-AAA-Protease eine Funktion für das Spleißen der *COX1*- und *COB*-mRNA und bei der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe sowie der ATP-Synthase zugesprochen (Tzagoloff *et al.*, 1994; Paul und Tzagoloff, 1995; Arlt *et al.*, 1998).

Die Deletion der *i*- und *m*-AAA-Protease führt zu einem synthetisch letalen Phänotyp (Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000). Aufgrund überlappender Substratspezifität der AAA-Proteasen wurde spekuliert, dass diese auf die toxische Akkumulation von Substratproteinen zurückzuführen sein könnte (Leonhard *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen legen allerdings nahe, dass dieser Phänotyp durch die Kombination einer gestörten Biogenese der Atmungskettenkomplexe sowie der ATP-Synthase aufgrund der *m*-AAA-Protease-Defizienz und dem *petite*-negativen Phänotypen der Yme1-Deletion hervorgerufen wird (Dunn *et al.*, 2006).

Im Menschen führen Mutationen in Paraplegin zu einer reduzierten Komplex-I-Aktivität und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress (Atorino *et al.*, 2003). Solche Paraplegin-Mutationen sind mit einer autosomal rezessiven Form der spastischen Paraplegie verbunden (Lindholm *et al.*, 2004; Elleuch *et al.*, 2006). Diese wird durch eine axonale Degeneration motorischer und sensorischer Neuronen des corticospinalen Traktes verursacht und zeichnet sich durch eine zunehmende Schwäche und Spastizität der unteren Gliedmaße aus (Harding, 1983; Fink, 1997; Reid, 1997; Casari *et al.*, 1998; Deluca *et al.*, 2004).

Substratproteine der mitochondrialen AAA-Proteasen

Die AAA-Proteasen der inneren Mitochondrienmembran üben offenbar eine duale Funktion aus. Zum einen bauen sie nicht assemblierte und fehlgefaltete Proteine im Rahmen der Qualitätskontrolle ab (Langer, 2000; Langer *et al.*, 2001; Nolden *et al.*, 2006). So werden die stark hydrophoben, mitochondrial kodierten Proteine Cox1, Cox3, Cob, Atp6, Atp8 und Atp9 durch die *m*-AAA Protease und Cox2 durch die *i*-AAA Protease abgebaut (Nakai *et al.*, 1995; Pearce und Sherman, 1995; Guélin *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1996). Daneben konnten das periphere Membranprotein Atp7 und eine temperatursensitive Form von Oxa1 als Substrate der *m*-AAA-Protease identifiziert werden (Käser *et al.*, 2003; Korbel *et al.*, 2004). Für den Abbau der nicht assemblierten Untereinheiten Phb1 und Phb2 des Prohibitin-Komplexes sowie der externen NADH-Dehydrogenase Nde1 konnte eine Beteiligung der *i*-AAA-Protease nachgewiesen werden (Augustin *et al.*, 2005; Kambacheld *et al.*, 2005). Yme2, das lösliche Domänen sowohl in den Intermembranraum als auch in die Matrix exponiert, kann von beiden AAA-Proteasen erkannt und abgebaut werden (Leonhard *et al.*, 2000).

Neben dieser Funktion bei der Qualitätskontrolle können AAA-Proteasen offenbar die mitochondriale Biogenese durch die spezifische Prozessierung von regulatorischen Proteinen beeinflussen (Nolden *et al.*, 2005). So konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Translation durch die Prozessierung des konservierten, ribosomalen Proteins MrpL32 durch die *m*-AAA-Protease reguliert wird (Nolden *et al.*, 2005). MrpL32 wird als Vorläuferprotein in Mitochondrien importiert und durch eine N-terminale Prozessierung der Präsequenz durch die *m*-AAA-Protease in die reife Form überführt. Durch diese Reifung kann MrpL32 an der Membran in vorassemblierte Ribosomenpartikel eingebaut werden (Nolden *et al.*, 2005). Die in *m*-AAA-Protease-defizienten Hefestämmen beobachtete starke Beeinträchtigung der mitochondrialen Translation lässt sich demnach auf eine defekte Prozessierung von MrpL32 zurückführen und stellt eine mögliche Erklärung für alle bisher beschriebenen Phänotypen in Hefe dar (Nolden *et al.*, 2005). Neben dieser wohl wichtigsten Prozessierungsfunktion konnte eine Beteiligung der *m*-AAA-Protease bei der Biogenese der Cytochrom-*c*-Peroxidase (Ccp1) beobachtet werden (Esser *et al.*, 2002). Die *m*-AAA-Protease wandelt die Vorläuferform von Ccp1 durch eine partielle Proteolyse in eine intermediäre Form um, die anschließend durch die membrangebundene Peptidase Pcp1 greift wird (Esser *et al.*, 2002).

Erkennung und Abbau von membrangebundenen Substratproteinen durch AAA-Proteasen

Die Substraterkennung von AAA-Proteasen ist bisher nur im Rahmen der Qualitätskontrolle in Grundzügen verstanden. Membranproteine können hier prinzipiell an entfalteten Domänen erkannt werden (Asahara *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000). Wird eine unstrukturierte Domäne, die mit mindestens 20 Aminosäuren aus der Membran herausragt, in die Matrix oder den Intermembranraum exponiert, kann diese durch die *m*- bzw. *i*-AAA-Protease gebunden werden (Leonhard *et al.*, 2000). In gleicher Weise benötigt die bakterielle AAA-Protease FtsH eine minimale Länge von 20 Aminosäuren, um den Abbau von Membranproteinen zu initiieren (Chiba *et al.*, 2000). Die Erkennung der entfalteten Domänen erfolgt wahrscheinlich über die AAA-Domänen, für die eine Chaperon-ähnliche Aktivität gezeigt werden konnte und deren N-terminale Region für die Bindung eines entfalteten Modellsubstrates ausreichend ist (Leonhard *et al.*, 1999). Übereinstimmend mit einer geringen Unfoldase-Aktivität von AAA-Proteasen kann die Proteolyse nur in Anwesenheit entfalteter Substratdomänen auch auf der gegenüberliegenden Membranseite stattfinden (Kihara *et al.*, 1999; Leonhard *et al.*, 2000; Herman *et al.*, 2003). Die Substratproteine werden dabei in einem prozessiven Abbaumechanismus, der prinzipiell sowohl in N- zu C-terminaler als auch in C- zu N-terminaler Richtung verlaufen kann, in einzelne Aminosäuren oder Peptide mit einer Länge

von 6-20 Aminosäureresten umgesetzt (Asahara *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001; Chiba *et al.*, 2002; Augustin *et al.*, 2005). Interessanterweise ist die Anwesenheit einer AAA-Protease für den Abbau des gesamten Substratproteins und damit auch von löslichen Domänen, die auf der gegenüberliegenden Membranseite lokalisiert sind, ausreichend (Kihara *et al.*, 1999; Leonhard *et al.*, 2000). Ein solcher Abbauprozess geht also mit einer Dislokation von hydrophilen Domänen über die Membran einher. Das Fehlen der Transmembrandomänen einer Untereinheit der *m*-AAA-Protease führt zu einem gestörten Abbau von Membranproteinen (Korbel *et al.*, 2004). Dies deutet daraufhin, dass AAA-Proteasen selbst eine Dislokationspore in der Membran formen und durch ATP-getriebene Konformationsänderung der AAA-Domänen Substratproteine aktiv aus der Membran extrahieren können (Korbel *et al.*, 2004). Damit übereinstimmend ist isoliertes FtsH nach seiner Rekonstitution für den Abbau von Membranproteinen ausreichend (Akiyama und Ito, 2003).

Auch polytopische Membranproteine können in einem prozessiven Abbaumechanismus durch AAA-Proteasen hydrolysiert werden (Kihara *et al.*, 1995; Kihara *et al.*, 1999; Käser *et al.*, 2003). Zum Beispiel wird eine destabilisierte Variante des Oxa1-Proteins, das fünf Transmembrandomänen aufweist, in der inneren Mitochondrienmembran von der *m*-AAA-Protease abgebaut (Käser *et al.*, 2003). Hierbei wird die Matrix-exponierte C-terminale Domäne abgespalten und nachfolgend die Transmembrandomänen prozessiv hydrolysiert (Käser *et al.*, 2003). Wahrscheinlich können AAA-Proteasen hier den Abbauprozess auch an internen Schlaufenstrukturen initiieren. Interessanterweise konnte Oxa1 in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease durch Oma1 und eine weitere nicht identifizierte Peptidase in einer ATP-unabhängigen Weise in definierte Peptidfragmente gespalten werden (Käser *et al.*, 2003). Inwieweit die Aktivität dieser Peptidasen die Substraterkennung, den Dislokationsprozess und damit den Abbauprozess durch die *m*-AAA-Protease erleichtern könnte, ist noch nicht geklärt. Prinzipiell ist aber der vollständige Abbau eines polytopischen Membranproteins allein durch AAA-Proteasen möglich (Akiyama und Ito, 2003).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Zwei hochkonservierte AAA-Proteasen sind in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Deren Inaktivierung führt in verschiedenen Organismen zu pleiotropen Phänotypen wie gestörter Atmung, veränderter mitochondrialer Morphologie oder axonaler Degeneration.

AAA-Proteasen sind zentrale Komponenten der mitochondrialen Qualitätskontrolle und entfernen spezifisch nicht assemblierte oder fehlgefaltete Membranproteine. Neuere Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass wichtige Schritte der mitochondrialen Biogenese über die Prozessierung regulatorischer Substratproteine durch AAA-Proteasen kontrolliert werden und dass die Störung solcher Prozesse die Grundlage für die beobachteten Phänotypen bilden kann. Die selektive Erkennung von entfaltenen Substraten und die spezifischen Bindung von regulatorischen Proteinen durch AAA-Proteasen sind allerdings bisher kaum verstanden. Zudem stellt die Membranverankerung von Substraten eine Besonderheit für den generellen Abbaumechanismus ATP-abhängiger Proteasen dar. Die Identifizierung von definierten Substratbindestellen ist daher von grundlegender Bedeutung, um die molekularen Mechanismen der Substraterkennung und der Proteolyse durch AAA-Proteasen zu verstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher zunächst zwei Regionen der *i*-AAA-Protease Yme1 aus *S. cerevisiae* durch Mutationsanalyse untersucht werden, die an der Substratinteraktion beteiligt sein könnten. Zum einen sollte eine mögliche Funktion des konservierten YVG-Motivs für die Bindung und den Abbau von membrangebundenen Substraten charakterisiert werden. Vergleichbare Motive sind in der zentralen Pore von Ringkomplexen verwandter AAA⁺-Proteine lokalisiert und spielen dort eine wichtige Rolle für die Translokation von Substraten während der Proteolyse. Eine Beteiligung dieses Motivs an der Proteolyse durch AAA-Proteasen könnte darauf hinweisen, dass Substrate auch hier durch die zentrale Pore des AAA-Rings transloziert werden. Zum anderen sollte ein möglicher Beitrag der N-terminalen Region der AAA-Domäne von Yme1 für den Bindungs- und Proteolyseprozess untersucht werden, da in vorangegangenen Studien die Bindung eines entfaltenen Modellsubstrates an diese Region gezeigt werden konnte (Leonhard *et al.*, 1999).

Einem dritten Ansatz lag die Beobachtung zugrunde, dass durch die Expression der orthologen *i*-AAA-Protease IAP-1 aus *N. crassa* nicht alle Wachstumsphänotypen eines $\Delta yme1$ -Hefestammes komplementiert werden können (Klanner *et al.*, 2001). Dies deutet auf funktionelle Unterschiede dieser AAA-Proteasen hin, die möglicherweise auf eine divergierende Substraterkennung zurückzuführen sind. Um Domänen zu ermitteln, die solche funktionellen Unterschiede bewirken könnten, sollten Yme1-IAP-1-Hybridproteine durch systematische Domänenaustausche hergestellt werden. Eine anschließende Untersuchung der Substratbindungseigenschaften dieser Hybridproteine könnte dann zu einer Identifizierung von Binderegionen mit einer divergierenden Substratspezifität führen.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Konstrukte

2.1.1. Expressionsplasmide

Zur Funktionsanalyse des YVG-Motivs von Yme1 wurde die Position Y354 eines pRS314-kodierten *YME1*-Gens unter der Kontrolle des endogenen Promotors durch positionsspezifische Mutagenese-Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der degenerierten Oligonukleotide TL1316 und 1317 entsprechend dem Protokoll „QuikChange mutagenesis kit“ (Stratagene) verändert. In gleicher Weise wurden die Varianten pRS314-*yme1*^{K327R} (TL1611 und 1612), pRS314-*yme1*^{E381Q} (TL1613 und 1614) sowie pRS314-*yme1*^{E541Q} (TL1376 und 1377) hergestellt.

Die Konstrukte zur Analyse der NH-Region von Yme1 durch eine Alanin-Mutagenese wurden ebenfalls basierend auf pRS314-*YME1* (K279A-Y306A; TL1333-1366) durch positionsspezifische PCR generiert. Zur weiteren Analyse der NH-Region wurden dann die entsprechenden Mutationen in das pYX122-*YME1* Konstrukt [A (pYX122-*yme1*^{E292A}; TL1347 und 1348), A2 (pYX122-*yme1*^{E292A, E294A}; TL1392 und 1393), A6 (pYX122-*yme1*^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A}; TL974 und 975), K6 (pYX122-*yme1*^{D287K, E288K, E292K, E294K, E295K, D298K}; TL1403 und 1404) und N/Q6 (pYX122-*yme1*^{D287N, E288Q, E292Q, E294Q, E295Q, D298N}; TL1405 und 1406)] oder in die C-terminal verkürzte Yme1-Variante YCpLac^{ADH1}-Yme1(1-313) (Leonhard *et al.*, 1999) [Yme1(1-313)^{A2} (YCplac111^{ADH1}-Yme1(1-313)^{E292A, E294A}; TL1392 und 1393) und Yme1(1-313)^{A6} (YCplac111^{ADH1}-Yme1(1-313)^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A}; TL974 und 975)] eingeführt. Das Konstrukt A6/Y354S (pYX122-*yme1*^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A, Y354S}) wurde durch Einführung der A6-Austausche (D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A; TL974 und 975) in pRS314-*yme1*^{Y354S} und anschließender Klonierung in pYX122 über *EcoRI* und *NcoI*-Schnittstellen hergestellt. Die eingeführten Mutationen wurden standardmäßig durch Sequenzierung identifiziert bzw. verifiziert.

Die hergestellten Yme1-IAP-1-Hybride basieren auf den Plasmiden pVT100U-*YME1* und pVT100U-*IAP-1* (Klanner *et al.*, 2001). Hierzu wurden die entsprechenden DNA-Sequenzabschnitte der einzuführenden Domänen mittels PCR amplifiziert und entsprechend der flankierenden Bereiche der Zielsequenz mit 40 bp langen homologen Abschnitten

versehen. Diese Homologieabschnitte dienen anschließend dem so genannten „gap repair“ durch homologe Rekombination. Hierbei wurde eine entsprechende pVT100U-kodierte Variante durch vorherige Behandlung mit passenden Restriktionsendonukleasen im auszutauschenden Sequenzbereich linearisiert und zusammen mit dem generierten PCR-Produkt in den $\Delta yme1$ -Hefestamm YCK10 transformiert. Die homologe Rekombination der Plasmid-DNA mit dem PCR-Produkt führte erneut zu einer zirkulären und damit in Hefe stabilen DNA-Form und konnte durch geeignete Auxotrophiemaker verfolgt werden. Die Plasmide wurden anschließend aus Hefe isoliert und durch Sequenzierung überprüft. Auf diese Weise wurden die folgenden Yme1-IAP-1-Hybride hergestellt: pVT100U-SNNN (Yme1 1-248; IAP-1 228-739); pVT100U-SNNS (Yme1 1-248; IAP-1 228-578; Yme1 604-748); pVT100U-SSNN (Yme1 1-495; IAP-1 470-739); pVT100U-SSNS (Yme1 1-495; IAP-1 470-578; Yme1 604-748); pVT100U-SNNS1 (Yme1 1-248; IAP-1 228-636; Yme1 662-748); pVT100U-SNNS2 (Yme1 1-248; IAP-1 228-636; Yme1 662-712; IAP-1 679-739) und pVT100U-SSSN1 (Yme1 1-661; IAP-1 637-678; Yme1 713-748).

Zur Herstellung der Konstrukte pVT100U-SSNN/A6 und pVT100U-SSNN/Y354S wurde jeweils ein *Clal-KpnI*-Fragment aus A6 (pYX122-*yme1*^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A}) bzw. pRS314-*yme1*^{Y354S} in pVT100U-SSNN eingeführt.

2.1.2. *In vitro*-Transkriptionsplasmide

Zur Herstellung des pGEM4-Yta10(1-161)-PHB1 Konstruktes wurde ein PHB1-Fragment (100-864 bp) mittels PCR mit pGEM4-PHB1 als Templat (Kambacheld *et al.*, 2005) und den Oligonukleotiden TL2451 und 2452 amplifiziert und mit *Bam*HI und *Nco*I-Schnittstellen versehen. Dieses Fragment ersetzte dann das *Bam*HI-*Nco*I-DHFR^{mut}-Fragment des pGEM4-Yta10(1-161)-DHFR^{mut}-Konstruktes (Leonhard *et al.*, 1999). pGEM4-Yta10(1-161) wurde durch Einführung von zwei Stoppkodons mittels positionsspezifische Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden TL1799 und 1800 in das pGEM4-Yta10(1-161)-DHFR^{mut}-Konstrukt (Leonhard *et al.*, 1999) generiert.

Tab. 1: Verwendete Expressions- und *in vitro*-Transkriptionsplasmide.

Plasmid	Referenz
pRS314-YME1	diese Arbeit
pRS314- <i>yme1</i> ^{Y354X} X: Y, C, S, T, N, K, R, A, V, L, I, F, W	diese Arbeit
pRS314- <i>yme1</i> ^{K327R}	diese Arbeit

pRS314-yme1 ^{E381Q}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{E541Q}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{K279A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{D281A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{D282A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{D287A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{E288A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{R290A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{E292A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{E294A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{E295A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{D298A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{F299A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{L300A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{K301A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{K305A}	diese Arbeit
pRS314-yme1 ^{Y306A}	diese Arbeit
pYX122-YME1	diese Arbeit
pYX122-yme1 ^{E292A} (A)	diese Arbeit
pYX122-yme1 ^{E292A, E294A} (A2)	diese Arbeit
pYX122-yme1 ^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A} (A6)	diese Arbeit
pYX122-yme1 ^{D287K, E288K, E292K, E294K, E295K, D298K} (K6)	diese Arbeit
pYX122-yme1 ^{D287N, E288Q, E292Q, E294Q, E295Q, D298N} (N/Q6)	diese Arbeit
YCplac111 ^{ADH1} -Yme1(1-313)	(Leonhard <i>et al.</i> , 1999)
YCplac111 ^{ADH1} -Yme1(1-313) ^{E292A, E294A}	diese Arbeit
YCplac111 ^{ADH1} -Yme1(1-313) ^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A}	diese Arbeit
YCplac111 ^{ADH1} -Yme1(1-267)	(Leonhard <i>et al.</i> , 1999)
pVT100U-YME1	diese Arbeit
pVT100U-IAP-1	(Klanner <i>et al.</i> , 2001)
pVT100U-SNNN (Yme1 1-248; IAP-1 228-739)	diese Arbeit
pVT100U-SNNS (Yme1 1-248; IAP-1 228-578; Yme1 604-748)	diese Arbeit
pVT100U-SSNN (Yme1 1-495; IAP-1 470-739)	diese Arbeit
pVT100U-SSNS (Yme1 1-495; IAP-1 470-578, Yme1 604-748)	diese Arbeit
pVT100U-SNNS1 (Yme1 1-248; IAP-1 228-636; Yme1 662-748)	diese Arbeit
pVT100U-SNNS2 (Yme1 1-248; IAP-1 228-636; Yme1 662-712; IAP-1 679-739)	diese Arbeit
pVT100U-SSSN1 (Yme1 1-661; IAP-1 637-678; Yme1 713-748)	diese Arbeit
pVT100U-SSNN/A6 (Yme1 1-495 ^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A} ; IAP-1 470-739)	diese Arbeit
pVT100U-SSNN/Y354S (Yme1 1-495 ^{Y354S} ; IAP-1 470-739)	diese Arbeit
pYX122-yme1 ^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A, Y354S} (A6/Y354S)	diese Arbeit
pGEM4-Yta10(1-161)-DHFR ^{mut}	(Leonhard <i>et al.</i> , 1999)
pGEM4-PHB1	(Kambacheld <i>et al.</i> , 2005)
pGEM4-Yta10(1-161)-PHB1	diese Arbeit
pGEM4-Yta10(1-161)	diese Arbeit
pGEM4	Promega
pFA6a-kanMX4	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)

Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Verwendung	Sequenz
TL974	A6	5'-GATGATGTCTGCGGTTGTGCTGCGGCCCGTGCGGCATTG GCAGCAATTGTTGCTTTCTGAAAGATCCAAC-3'
TL975	A6	5'-GTTGGATCTTTCAGGAAAGCAACAATTGCTGCCAATGCCG CACGGGCCGCAGCACAAACCGCAGACATCATC-3'
TL1316	Y354X	5'-GAATTTGATGAAGTTNNGTTCGGTGTGGTGC-3'
TL1316	Y354X	5'-GCACCAACACCGACNNAACTTCATCAAATTC-3'
TL1333	K279A	5'-GCTAAGACAAATGTTGCATTTGATGATGTCTGC-3'
TL1334	K279A	5'-GCAGACATCATCAAATGCAACATTTGTCTTAGC-3'
TL1337	D281A	5'-GACAAATGTAAATTTGCTGATGTCTGCGGTTGTG-3'
TL1338	D281A	5'-CACAAACCGCAGACATCAGCAAATTTAACATTTGTC-3'
TL1341	D287A	5'-GATGTCTGCGGTTGTGCTGAGGCCCGTGCGGAATTG-3'
TL1342	D287A	5'-CAATCCGCACGGGCCTCAGCACAAACCGCAGACATC-3'
TL1343	E288A	5'-GTCTGCGGTTGTGATGCGGCCCGTGCGGAATTG-3'
TL1344	E288A	5'-CAATCCGCACGGGCCGCATCACAAACCGCAGAC-3'
TL1345	R290A	5'-GGTTGTGATGAGGCCGCTGCGGAATTGGAAGAAATTG-3'
TL1346	R290A	5'-CAATTTCTTCCAATTCGCAGCGGCCCTCATCACAAACC-3'
TL1347	E292A	5'-GATGAGGCCCGTGCGGCATTGGAAGAAATTG-3'
TL1348	E292A	5'-CAATTTCTTCCAATGCCGCACGGGCCTCATC-3'
TL1349	E294A	5'-GCCCGTGCGGAATTGGCAGAAATTGTTGATTTCC-3'
TL1350	E294A	5'-GGAAATCAACAATTTCTGCCAATTCGCACGGGC-3'
TL1351	E295A	5'-CGTGCGGAATTGGAAGCAATTGTTGATTTCTG-3'
TL1352	E295A	5'-CAGGAAATCAACAATTGCTTCCAATTCGCACG-3'
TL1353	D298A	5'-GAATTGGAAGAAATTGTTGCTTTCTGAAAGATCCAAC-3'
TL1354	D298A	5'-GTTGGATCTTTCAGGAAAGCAACAATTTCTTCCAATTC-3'
TL1355	F299A	5'-GGAAGAAATTGTTGATGCCCTGAAAGATCCAATAAG-3'
TL1355	F299A	5'-CTTAGTTGGATCTTTCAGGGCATCAACAATTTCTTCC-3'
TL1357	L300A	5'-GAAGAAATTGTTGATTTCCGAAAGATCCAATAAGTAC-3'
TL1358	L300A	5'-GTACTTAGTTGGATCTTTCGCGAAATCAACAATTTCTTC-3'
TL1359	K301A	5'-GAAATTGTTGATTTCTGCGAGATCCAATAAGTACG-3'
TL1360	K301A	5'-CGTACTTAGTTGGATCTGCCAGGAAATCAACAATTTTC-3'
TL1363	K305A	5'-CCTGAAAGATCCAAGTACGAGTCTTGGGTGG-3'
TL1364	K305A	5'-CCACCCAAGGACTCGTACGCAGTTGGATCTTTCAGG-3'
TL1365	Y306A	5'-GAAAGATCCAATAAGGCCGAGTCTTGGGTGG-3'
TL1366	Y306A	5'-CCACCCAAGGACTCGGCCTTAGTTGGATCTTTC-3'
TL1376	E541Q	5'-GCCACTGCTTTCACCAGGCTGGACATGCCATTATG-3'
TL1377	E541Q	5'-CATAATGGCATGTCCAGCCTGGTGGAAAGCAGTGGC-3'
TL1392	A2	5'-GATGAGGCCCGTGCGGCATTGGCAGAAATTGTTGATTTCC-3'
TL1393	A2	5'-GAAATCAACAATTTCTGCCAATGCCGCACGGGCCTCATC-3'
TL1403	K6	5'-GATGATGTCTGCGGTTGTA AAAAAGCCCGTGCGAAATTGA AAAAAATTGTTAAATTCCTGAAAGATCCAAC-3'
TL1404	K6	5'-GTTGGATCTTTCAGGAATTTAACAATTTTTTTCAATTTGCGA CGGGCTTTTTTACAACCGCAGACATCATC-3'
TL1405	N/Q6	5'-GATGATGTCTGCGGTTGTAATCAGGCCCGTGCGCAATTG CAACAAATTGTTAATTTCTGAAAGATCCAAC-3'
TL1406	N/Q6	5'-GTTGGATCTTTCAGGAAATTAACAATTTGTTGCAATTGCGC ACGGGCCTGATTACAACCGCAGACATCATC-3'
TL1611	K327R	5'-CCTCCTGGTACAGGTAGAATTTGTTGGCTAGGGC-3'
TL1612	K327R	5'-GCCCTAGCCAACAAAGTTCTACCTGTACCAGGAGG-3'
TL1613	E381Q	5'-GCTATTATTTTTATTGATCAATTAGATGCCATCGGTGG-3'
TL1614	E381Q	5'-CCACCGATGGCATCTAATTGATCAATAAAAATAATAGC-3'
TL1799	Yta10(1-161)	5'-CAAATACCTGGAGAAGGGTATGATGTGATGAATGGTTCC ACCATTGAACTGC-3'
TL1800	Yta10(1-161)	5'-GCAGTTCAATGGTCGAACCATTCATCACATCATACCCTTCT CCAGGATTTTTG-3'

TL2451	YTA10 (1-161)- PHB1	5'-GGGGGATCCGGTGGTTCTCGTGGTG-3'
TL2452	YTA10 (1-161)- PHB1	5'-GCGCCATGGTTAACGGCCAATGGTC-3'
TL2553	Δ cox20	5'-ACAGCAGTGCGTAACGAGCAGCTCAACAGTTAATATAAA GCGTACGCTGCAGGTCCGAC-3'
TL2554	Δ cox20	5'-AAAGGCCCTGCTTCTACCTTCTGTTTCCCCCTCGTTCTTAT CGATGAATTCCGAGCTCG-3'

2.2. Verwendete Hefestämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme sind Derivate von W303. Zur Analysen der verschiedenen AAA-Protease-Varianten wurden diese mit den aufgeführten Expressionsplasmiden für Hefe in die beiden bereits beschriebenen Δ yme1-Hefestämme YCK10 (Klanner *et al.*, 2001) und Δ yme1 (Leonhard *et al.*, 1996) bzw. den Δ yme1 Δ cox20-Stamm durch die Lithiumacetat-Methode transformiert (Gietz *et al.*, 1995). Der Δ yme1 Δ cox20-Stamm (YMG108) wurde aus dem Hefestamm YCK10 durch die Deletion des gesamten Leserasters des *COX20*-Gens hergestellt. Hierzu wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden TL2553 und 2554 und dem Plasmid pFA6a-kanMX4 eine entsprechende kanMX4-Deletionskassette erzeugt und über homologe Rekombination in den *COX20*-Locus des YCK10-Hefegenoms inseriert (Longtine *et al.*, 1998). In gleicher Weise wurde der *NDE1*-Locus des YCK10-Stammes durch die Insertion einer 3xHA-kanMX6-Kassette, wie für YSA2 in (Augustin *et al.*, 2005) beschrieben, modifiziert (YMG127), um eine C-terminale Markierung von Nde1 mit einem Hämagglutinin-(Ha)-Epitope zu erzielen.

Tab. 2: Liste der verwendeten Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
W303-1A	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i>	(Rothstein und Sherman, 1980)
YKC10	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6</i>	(Klanner <i>et al.</i> , 2001)
Δ yme1	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3</i>	(Leonhard <i>et al.</i> , 1999)
YMG1	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-YME1</i>	diese Arbeit
YMG50-58; YMG85-87	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{Y354X} (X: S, T, A, V, L, I, N, K, R, C, F, W)</i>	diese Arbeit

YMG59	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{E541Q}</i>	diese Arbeit
YMG60	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{K279A}</i>	diese Arbeit
YMG61	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{D281A}</i>	diese Arbeit
YMG62	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{D282A}</i>	diese Arbeit
YMG63	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{D287A}</i>	diese Arbeit
YMG64	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{E288A}</i>	diese Arbeit
YMG65	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{R290A}</i>	diese Arbeit
YMG66	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{E292A}</i>	diese Arbeit
YMG67	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{E294A}</i>	diese Arbeit
YMG68	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{E295A}</i>	diese Arbeit
YMG69	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{D298A}</i>	diese Arbeit
YMG70	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{F299A}</i>	diese Arbeit
YMG71	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{L300A}</i>	diese Arbeit
YMG72	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{K301A}</i>	diese Arbeit
YMG73	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{K305A}</i>	diese Arbeit
YMG74	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{Y306A}</i>	diese Arbeit
YMG88	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{K327R}</i>	diese Arbeit
YMG89	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pRS314-yme1^{E381Q}</i>	diese Arbeit
YMG90	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pYX122-YME1</i>	diese Arbeit
YMG91	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pYX122-yme1^{E292A}</i>	diese Arbeit

YMG92	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::URA3 pYX122-yme1</i> ^{E292A, E294A}	diese Arbeit
YMG93	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::URA3</i> <i>pYX122-yme1</i> ^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A}	diese Arbeit
YMG94	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::URA3</i> <i>pYX122-yme1</i> ^{D287K, E288K, E292K, E294K, E295K, D298K}	diese Arbeit
YMG95	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::URA3</i> <i>pYX122-yme1</i> ^{D287N, E288Q, E292Q, E294Q, E295Q, D298N}	diese Arbeit
YMG96	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::URA3 YCplac111</i> ^{ADH1} - <i>Yme1(1-313)</i>	diese Arbeit
YMG97	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::URA3</i> <i>YCplac111</i> ^{ADH1} - <i>Yme1(1-313)</i> ^{E292A, E294A}	diese Arbeit
YMG98	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::URA3</i> <i>YCplac111</i> ^{ADH1} - <i>Yme1(1-313)</i> ^{D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A}	diese Arbeit
YMG99	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::URA3</i> <i>YCplac111</i> ^{ADH1} - <i>Yme1(1-267)</i>	diese Arbeit
YMG108	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::HIS3MX6 cox20::KANMX4</i>	diese Arbeit
YMG109	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::HIS3MX6 cox20::KANMX4</i> <i>pVT100U-YME1</i>	diese Arbeit
YMG110	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::HIS3MX6 cox20::KANMX4</i> <i>pVT100U-SSNN</i>	diese Arbeit
YMG111	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::HIS3MX6 cox20::KANMX4</i> <i>pVT100U-SSNS</i>	diese Arbeit
YMG112	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::HIS3MX6 pVT100U-YME1</i>	diese Arbeit
YMG113	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::HIS3MX6 pVT100U-IAP-1</i>	(Klanner <i>et al.</i> , 2001)
YMG114	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::HIS3MX6 pVT100U-SNNN</i>	diese Arbeit
YMG115	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i> <i>yme1::HIS3MX6 pVT100U-SNNS</i>	diese Arbeit
YMG116	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52</i> <i>can1-100</i>	diese Arbeit

	<i>yme1::HIS3MX6 pVT100U-SSNN</i>	
YMG117	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 pVT100U-SSNS</i>	diese Arbeit
YMG118	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 pVT100U-SNNS1</i>	diese Arbeit
YMG119	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 pVT100U-SNNS2</i>	diese Arbeit
YMG120	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 pVT100U-SSSN1</i>	diese Arbeit
YMG121	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 pVT100U-SSNN/A6</i>	diese Arbeit
YMG122	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 pVT100U-SSNN/Y354S</i>	diese Arbeit
YMG123	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3 pYX122-yme1</i> <small>D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A, Y354S</small>	diese Arbeit
YMG124	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 NDE1HA3 (KANMX6) pVT100U-YME1</i>	diese Arbeit
YMG125	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 NDE1HA3 (KANMX6) pVT100U-SSNN</i>	diese Arbeit
YMG126	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 NDE1HA3 (KANMX6) pVT100U-SSNS</i>	diese Arbeit
YMG127	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3MX6 NDE1HA3 (KANMX6)</i>	diese Arbeit

2.3. Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die Blaue Nativgelelektrophorese (Schägger und Jagow, 1991; Schägger, 2001) kann der Analyse mitochondrialer Membranprotein-Komplexe dienen. Die durch Detergenz solublisierten Membranproteine werden hierbei durch den Farbstoff Coomassie Blau G250 angefärbt und erhalten eine negative Nettoladung, die eine elektrophoretische Auftrennung in einem Acrylamidgradientengel erlaubt. Die Gradientengele setzen sich hier aus einem Trenngel mit einem Gradienten von 3-10% Polyacrylamid (3-10% (m/v) Acrylamid; 0,09-0,4% (m/v) Bisacrylamid; 0-20% (m/v) Glycerin; 0,5 M 6-Aminocapronsäure; 25 mM Imidazol/HCl pH 7,0; 0,1% (m/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED) und einem Sammelgel

(3% (m/v) Acrylamid; 0,09% (m/v) Bisacrylamid; 0,5 M 6-Aminocaprinsäure; 25 mM Imidazol/HCl pH 7,0; 0,1% (m/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED) zusammen. Zur Probenvorbereitung wurden isolierte Mitochondrien (100 µg) in 20 µl Solubilisierungspuffer B (1% (m/v) TritonX-100; 50 mM Imidazol/HCl pH 7,0; 50 mM NaCl; 5 mM 6-Aminocaprinsäure) 15 min unter Schütteln bei 1400 U/min und 4°C lysiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 125.000 g und 4°C wurde der Überstand mit 5% (v/v) Glycerin und 1 µl Probenpuffer (5% (m/v) Coomassie Blau G250 Suspension in 500 mM 6-Aminocaprinsäure) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in Mini-Protean-3-Gelkammern bei 4°C (Kathodenpuffer: 50 mM Tricin; 7,5 mM Imidazol; 0,02% (m/v) Serva Blau G; Anodenpuffer: 25 mM Imidazol/HCl pH 7,0) zunächst bei 50 V und 15 mA für 40 min und dann bei 300 V und 15 mA für 20 min. Danach wurde der Kathodenpuffer gegen einen 0,002% (m/v) Serva Blau G-haltigen Puffer mit ansonsten gleicher Zusammensetzung ausgetauscht und die Auftrennung bei 300 V und 15 mA fortgesetzt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine für 2 h bei 200 mA auf eine PVDF-Membran übertragen. Als molekularer Größenstandard wurden die Proteine Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa) und Alkoholdehydrogenase (150 kDa) eingesetzt.

2.4. Superose-6-Gelfiltration

Zur Analyse der Assemblierung der *i*-AAA-Protease-Komplexe wurden mit einem Äkta Purifier-LC-System (Amersham Bioscience) Superose-6-Gelfiltrationen (Größenausschlusschromatographie) durchgeführt. Dazu wurden isolierte Mitochondrien (600 µg) in 120 µl 0,4% (m/v) TritonX-100-haltigem Puffer S (150 mM Kaliumacetat pH 7,4; 4 mM Magnesiumacetat; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 1 mM PMSF) 15 min unter Schütteln (1400 U/min) bei 4°C solubilisiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 125.000 g und 4°C wurde der Überstand auf eine mit 0,05% (m/v) TritonX-100-haltigem Puffer S äquilibrierten Superose-6-Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences) geladen. Die Elution erfolgte mit einer Flußrate von 0,3 ml/min. Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt und diese nach TCA-Fällung, SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) immunochemisch analysiert. Die Größenabschätzung der Proteinkomplexe erfolgte relativ zu den Markerproteinen Hsp60 (840 kDa), Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), Cytochrom *b*₂ (212 kDa), Alkoholdehydrogenase, (150 kDa) und BSA (66 kDa).

2.5. Schnelle Präparation zellulärer Membranen aus *S. cerevisiae*

Zur schnellen Präparation zellulärer Membranfraktionen, einschließlich mitochondrialer Fraktionen, wurden 10 OD₆₀₀-Einheit einer Hefekultur für 5 min sedimentiert (3000 g, RT). Die Zellen wurden in 300 µl eiskaltem SHKCl-Puffer (0,6 M Sorbitol; 50 mM HEPES/KOH pH 7,4; 80 mM KCl; 1 mM PMSF) resuspendiert. Es wurden Glaskügelchen (Ø 0,5 mm), entsprechend einem Volumen von etwa 200 µl, zugegeben. Die Proben wurden viermal 30 s mit einem Vortex-Mixer gemischt und je 30 s auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 400 µl SHKCl-Puffer wurden die Glasperlen und nicht aufgeschlossene Zellen durch Zentrifugation für 3 min bei 3.000 g und 4°C abgetrennt. Die zelluläre Membranfraktion des löslichen Überstandes wurde anschließend für 10 min bei 16.000 g und 4°C sedimentiert. Die angereicherten zellulären Membranen wurden dann in 15 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 15 min bei RT geschüttelt (1400 U/min). Die Proben wurden nach SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) immunochemisch analysiert.

2.6. Alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen

Die Membraninsertion von mitochondrialen Proteinen kann mittels alkalischer Extraktion der Membranen in einem Natriumcarbonat-Puffer überprüft werden (Fujiki *et al.*, 1982). Durch diese Extraktion können integrale Membranproteine durch Zentrifugation von löslichen und mit mitochondrialen Membranen peripher assoziierten Proteinen abgetrennt werden. Dazu wurden 100 µg isolierte Mitochondrien nach Import der jeweiligen radioaktiv markierten Vorläuferproteine bei 16.000 g für 10 min bei 4°C sedimentiert und in 1 ml 0,1 M Na₂CO₃ (pH 10,5) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden lösliche und nicht extrahierbare Bestandteile der Membran durch Zentrifugation für 30 min bei 125.000 g und 4°C voneinander getrennt. Das Pellet wurde in 1 ml 0,1 M Na₂CO₃ (pH 10,5) resuspendiert und wie der Überstand mit TCA versetzt. Die gefällten Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) analysiert. Die Trennung von integralen Membranproteinen und löslichen Proteinen wurde durch immunochemischen Nachweis mit Antiseren gegen die Membranproteine Phb1 und Phb2 und das lösliche Matrixprotein Mge1 überprüft. Die Membraninsertion von radioaktiv markiertem Protein wurde durch Autoradiographie analysiert.

2.7. *In vitro*-Synthese von ³⁵S-markiertem Vorläuferprotein

Zur Herstellung radioaktiv markierter Vorläuferproteine für den Proteinimport in isolierte Mitochondrien wurden zunächst die kodierenden Sequenzen unter SP6-Promotorkontrolle *in vitro* transkribiert und die entsprechende mRNA anschließend in einem zellfreien Retikulozytenlysat aus Kaninchen in Gegenwart von ³⁵S-Methionin translatiert.

In vitro-Transkription

Zur *in vitro*-Synthese von mRNA wurden 20 µg Plasmid-DNA in einem 206 µl Gesamtansatz mit 120 µl Transkriptionspuffer (40 mM HEPES/KOH pH 7,4; 6 mM Magnesiumacetat; 2 mM Spermidin; 100 µg/ml BSA; 10 mM DTT; 100 µM GTP und je 500 µM ATP, CTP, UTP), 10 µl 2,5 mM 7-Methylguanosin triphosphat (m⁷G(5')ppp(5')G), 4,5 µl RNase-Inhibitor (RNasin) (40 U/µl) und 1,5 µl SP6-RNA-Polymerase (25 U/µl) versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl 10 M LiCl mit 600 µl kaltem Ethanol wurde die synthetisierte RNA für 30 min bei -80°C gefällt und danach durch Zentrifugation für 30 min bei 20.000 g und 4°C sedimentiert. Anschließend wurde mit 600 µl kaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 30 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Proben bei Raumtemperatur für 2 min getrocknet. Die RNA wurde in 50 µl sterilem Wasser mit 1 µl RNasin (40 U/µl) aufgenommen und in 16 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

In vitro-Translation

Zur *in vitro*-Translation von Vorläuferproteinen in zellfreiem Kaninchen-Retikulozytenlysat (Pelham und Jackson, 1976) wurden 70 µl Retikulozytenlysat, 2 µl RNase-Inhibitor (RNasin) (40 U/µl), 2 µl Aminosäuremix (1 mM jeder proteinogenen Aminosäure außer Methionin), 8 µl ³⁵S-Methionin (10 µCi/µl) und 16 µl mRNA für 60 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 8 µl unmarkiertes Methionin (0,2 M) und 20 µl Saccharose (1,5 M) hinzu gegeben und die Proben für weitere 5 min bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 125.000 g und 4°C wurde der Überstand aliquotiert bei -80°C gelagert.

2.8. Stabilität von radioaktiv markierten Proteinen nach Import in isolierte Mitochondrien

Zur Untersuchung der Stabilität von importierten, radioaktiv markierten Vorläuferproteinen wurden isolierte Mitochondrien (0,5 mg/ml) mit Importpuffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,2; 3% (m/v) BSA (fettsäurefrei); 0,5 M Sorbitol; 80 mM KCl; 10 mM Magnesiumacetat; 2 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM MnCl₂; 5 mM NADH; 2,5 mM ATP; 10 mM Creatinphosphat; 100 µg/ml Creatinkinase) für 3 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 3% (v/v) radioaktiv markiertem Vorläuferprotein in Retikulozytenlysat wurden die Proben für weitere 20 min bei 25°C inkubiert. Nicht importierte Proteine wurden anschließend durch Behandlung mit 25 µg/ml Trypsin für 20 min bei 4°C proteolytisch entfernt. Das Trypsin wurde dann durch die Zugabe von 1 mg/ml Trypsininhibitor aus Sojabohne (Sigma) abgestoppt. Zur Analyse der Substratstabilität wurden die Importreaktionen aliquotiert und bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden dann nach entsprechender Inkubationszeit auf Eis gekühlt und nach Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g und 4°C mit SHKCl-Puffer gewaschen. Die Analyse der Proben erfolgte nach SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) durch Autoradiographie. Radioaktiv markierte Substratproteine wurden durch Phosphoreszenzanalyse quantifiziert. Die Integrität der Mitochondrien wurde standardmäßig immunochemisch mit Antikörpern gegen das Intermembranraumprotein Ccp1 und das Matrixprotein Mge1 überprüft.

2.9. Stabilität von neu synthetisierten mitochondrial kodierten Proteinen in isolierten Mitochondrien

Zur Synthese von mitochondrial kodierten Proteinen wurden 16 µl isolierte Mitochondrien (10 mg/ml) mit 160 µl Translationspuffer (0,9 M Sorbitol; 22,5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 225 mM KCl; 19 mM MgSO₄; 6 mM ATP; 0,75 mM GTP; 2 mM NADH; 7,5 mM α-Ketoglutarat; 7,5 mM Phosphoenolpyruvat; 150 µM aller proteinogenen Aminosäuren ohne Methionin; 4,5 mg/ml fettsäurefreies BSA), 61 µl dH₂O und 1 µl Pyruvatkinase (10 mg/ml) versetzt und für 3 min bei 30°C inkubiert. Wenn angegeben, wurde während der Synthesereaktion die Aminosäure Arginin durch das Analogon Canavanin (12 µg/ml) ersetzt. Dann wurden 2 µl ³⁵S-Methionin (10 µCi/µl) hinzugefügt und für weitere 10 min bei 30°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde mit

60 µl unmarkiertem Methionin (0,2 M) und 3 µl Puromycin (5 mg/ml) gestoppt. Zur Analyse der Stabilität der neu synthetisierten mitochondrialen Proteine wurden die Proben dann aliquotiert und bei 37°C inkubiert. Wurde die Proteinstabilität bei 25°C untersucht, wurden sowohl die Translationsreaktion als auch die nachfolgende Inkubation entsprechend bei 25°C durchgeführt. Die Proben wurden zu entsprechenden Zeitpunkten auf Eis gekühlt und anschließend für 5 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert und mit SHKCI-Puffer gewaschen. Die Analyse bzw. Quantifizierung markierter Proteine erfolgte nach SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) durch Autoradiographie und Phosphoreszenzanalyse. Die Integrität der Mitochondrien wurde standardmäßig immunochemisch mit Antikörpern gegen das Intermembranraumprotein Ccp1 und das Matrixprotein Mge1 überprüft.

2.10. Koimmunfällungen

Um die Interaktion der verschiedenen Yme1-Varianten mit Substratproteinen zu untersuchen, wurden Koimmunfällungen durchgeführt. Hierbei werden die Yme1-Varianten und gegebenenfalls assoziierte, radioaktiv markierte Substratproteine aus mitochondrialen Lysaten über entsprechende Antikörperinteraktion angereichert. Die Menge an mitgereinigtem Substratprotein kann dann als Maß für die Substrataffinität der Yme1-Varianten genommen werden.

Zur Antikörperkopplung wurden 12,5 µl Antiserum des gegen die N-terminale Domäne von Yme1 gerichteten Antikörpers (Leonhard *et al.*, 1999) mit Protein-A-Sepharose-(PAS)-Partikeln, die zuvor mit 0,5% (m/v) Digitonin-haltigem Puffer S (150 mM Kaliumacetat; 4 mM Magnesiumacetat; 30 mM Tris/HCl pH 7,4 und 1 mM PMSF) äquilibriert worden waren, für 1-2 h bei 4°C unter Überkopffrotation inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 30 s bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert und die Antikörper-PAS-Partikel mit 0,5% (m/v) Digitonin-haltigem Puffer S gewaschen.

Zur Analyse der Substratinteraktion wurden wie zuvor beschrieben entweder radioaktiv markierte Vorläuferproteine in entsprechende isolierte Mitochondrien importiert oder mitochondriale Translationsprodukte radioaktiv markiert. 240 µg der reisolierten Mitochondrien wurden dann in 2% (m/v) Digitonin-haltigem Puffer S (0,5 mg/ml)

resuspendiert und zur Lyse für 15 min unter Schütteln (1400 U/min) bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 20.000 g und 4°C wurden die mitochondrialen Überstände mit den vorbereiteten Antikörper-Protein-A-Sepharose-Partikeln für 1 h bei 4°C unter Überkopfrotation inkubiert. Die Partikel wurden anschließend nach Zentrifugation für 30 s bei 16.000 g und 4°C zweimal mit 0,5% (m/v) Digitonin-haltigem Puffer S und einmal mit 10 mM Tris/HCl pH 7,4 gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und nach SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und Western-Blot (Towbin *et al.*, 1979) analysiert. Gebundene, radioaktiv markierte Substratproteine wurden mittels Phosphoreszenzanalyse quantifiziert. Üblicherweise wurden ~1-5% der Substratproteine mit Yme1, Yme1^{E541Q} bzw. Yme1(1-313) gefällt. Gleiche Fällung der Yme1-Varianten wurde immunochemisch überprüft.

2.11. Autoradiographie und Phosphoreszenzanalyse radioaktiv markierter Proteine

Radioaktiv markierte Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden mittels Autoradiographie durch Langzeitexposition (mehrere Stunden/Tage) eines Röntgenfilms in einer abgeschlossenen Kassette analysiert. Zur Quantifizierung wurde eine Phosphoreszenzplatte (Fuji) für mehrere Stunden aufgelegt und die angeregten Phosphoreszenzsignale in einem Lesegerät (Molecular Imager®, BioRad) detektiert und quantifiziert (QuantityOne, Bio-Rad).

2.12. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Membranen (Nitrozellulose oder PVDF) nach dem Proteintransfer bei RT für 30 min in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) geschwenkt. Es folgte eine 60 minütige Immundekoration mit einem spezifischen Antiserum (siehe Tab. 4), das je nach Titer zwischen 1:50 und 1:10.000 in TBS-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt war. Danach wurden die Membranen 10 min in TBS-Puffer, 10 min in 0,05% (v/v) TritonX-100 in TBS-Puffer und wieder 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen Immunglobulin G von Kaninchen bzw. Ratte gerichtete Antikörper verwendet, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Diese Antikörper wurden

1:10000 mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer verdünnt und die Membranen 60 min mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit TBS gewaschen und die gebundene Peroxidase mit 2 ml eines 1:1-Gemisches chemolumineszierender Reagenzien nachgewiesen (Lösung 1: 10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5, 1 ml Luminol (44 µg/ml in DMSO), 440 µl p-Coumarinsäure (15 µg/ml in DMSO), ad 100 ml H₂O; Lösung 2: 10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5, 60 µl 30% Wasserstoffperoxid, ad 100 ml H₂O). Die Membranen wurden für 1 min mit der Lumineszenz-Lösung inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

Tab. 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Epitop	Referenz
α-Ccp1	gesamtes Protein, Cytochrom c Peroxidase aus <i>S. cerevisiae</i>	
α-Hämagglutinin (Ha)	YPYDVPDYA	Roche
α-IAP-1	C-terminales Peptid (Aminosäure 675-686) von IAP-1 aus <i>N. crassa</i>	(Klanner <i>et al.</i> , 2001)
α-Mge1	C-terminal Peptid von Mge1 aus <i>S. cerevisiae</i>	(Schneider <i>et al.</i> , 1994)
α-Phb1	Intermembranraumdomäne (Aminosäure 27-287) von Phb1 aus <i>S. cerevisiae</i>	(Steglich <i>et al.</i> , 1999)
α-Phb2	Intermembranraumdomäne (Aminosäure 61-315) von Phb2 aus <i>S. cerevisiae</i>	(Steglich <i>et al.</i> , 1999)
α-Yme1	N-terminales Peptid (Aminosäure 55-65) von Yme1 aus <i>S. cerevisiae</i>	(Leonhard <i>et al.</i> , 1996)

2.13. Verschiedene Materialien und Methoden

Die folgenden verwendeten Materialien und Methoden wurden bereits beschrieben: Isolierung von Mitochondrien (Tatsuta und Langer, 2005), allgemeine molekularbiologische Arbeiten (Sambrook und Russell, 2001) und Hefemedien (Sherman, 2002).

3. Ergebnisse

3.1. Die Rolle des YVG-Motivs für die Funktion von Yme1

Nach dem Modell der translokationsgekoppelten Proteinentfaltung führen ATP-abhängige Konformationsänderungen der AAA⁺-Domänen zu einer gerichteten Translokation von Substratproteinen in die proteolytischen Kammern, wodurch es zu einer Entfaltung der Substrate kommt (Wang *et al.*, 2001). Im Falle von Clp-Proteasen spielt ein konserviertes @XG-Motiv (@: hydrophober Aminosäurerest, X: beliebiger Aminosäurerest, G: Glycin) innerhalb der zentralen Pore der oligomeren AAA⁺-Ringstrukturen eine entscheidende Rolle für diesen Prozess (Song *et al.*, 2000; Siddiqui *et al.*, 2004; Hinnerwisch *et al.*, 2005). Der hydrophobe Aminosäurerest dieses Motivs soll dabei direkt mit den Substratproteinen interagieren und durch ATP-abhängige konformative Bewegung den gerichteten Translokationsprozess bewirken (Wang *et al.*, 2001).

Da die molekularen Mechanismen des Abbaus von Membranproteinen durch AAA-Proteasen bisher kaum verstanden sind, sollte eine mögliche Funktion des entsprechenden @XG-Motivs für den Abbauprozess am Beispiel der *i*-AAA-Protease Yme1 untersucht werden. Die Röntgenstruktur der AAA-Domäne des verwandten AAA-Proteins p97/Cdc48 diente als Grundlage für die Modellierung der AAA-Domänenstruktur der *i*-AAA-Protease Yme1 (Abb. 4)(Nolden *et al.*, 2006). Die Darstellung der modellierten AAA-Domänen als hexamere Ringstruktur verdeutlicht, dass vermutlich auch das @XG-Motiv von Yme1 (YVG) in einer Schlaufenstruktur positioniert ist und Y354 in die zentrale Pore exponiert wird (Abb. 4B). Diese Lage wäre somit mit der postulierten Funktion dieses Motivs für die direkte Interaktion während des Translokationsprozesses von Substratproteinen durch die zentrale Pore und der damit einhergehenden Proteinentfaltung konsistent.

Um die Rolle von Y354 des YVG-Motivs für die Funktion von Yme1 zu charakterisieren, wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde eine randomisierte, positionsspezifische Mutagenese eines plasmidkodierten *YME1*-Gens mittels PCR mit einer Oligonukleotidmischung mit zufälliger Nukleotidsequenz an der Kodonposition Y354 angewandt. 13 verschiedene Yme1^{Y354X}-Varianten, die aromatische (Y, F, W), aliphatische (A, V, L, I), polare (S, T, C, N) und geladene (K, R) Aminosäurereste an Position 354 aufwiesen, konnten auf diese Weise hergestellt werden. Im Nachfolgenden sollten die Eigenschaften dieser Yme1^{Y354X}-Varianten in Bezug auf *in vivo*-Aktivität, proteolytische Aktivität und Substratbindung untersucht werden.

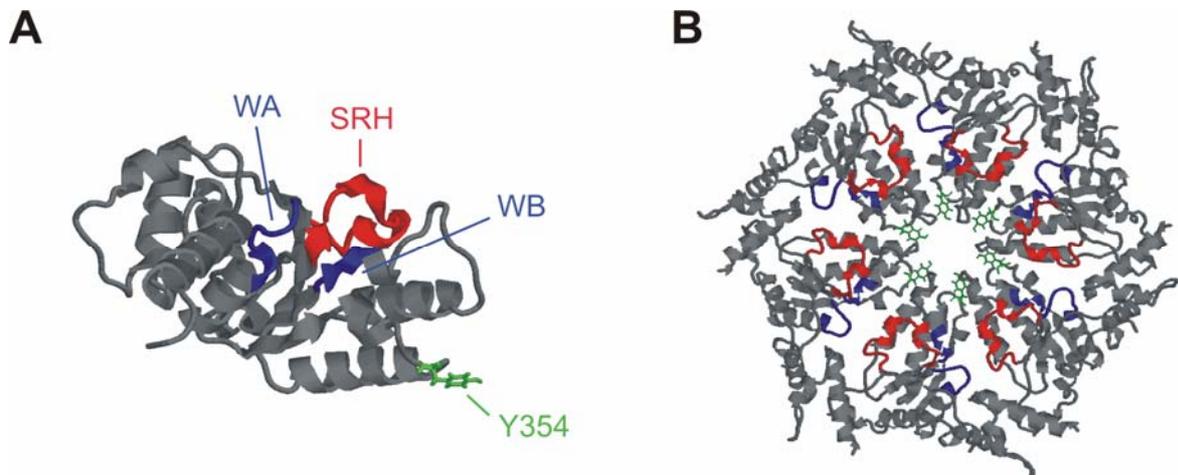


Abb. 4: Lokalisierung von Y354 des YVG-Motivs in der modellierten Struktur der AAA-Domäne von Yme1. Die gezeigte Struktur der AAA-Domäne des Yme1 Proteins wurde aus den kristallographischen Strukturdaten des verwandten AAA-Proteins p97/Cdc48 (Zhang *et al.*, 2000) abgeleitet (Nolden *et al.*, 2006). **(A)** Strukturmodell einer AAA-Domäne. **(B)** Darstellung der AAA-Domänen als wahrscheinliche hexamere Ringform. Der Tyrosinrest an Position 354 ist grün angefärbt. Zusätzlich sind die für die ATP-Hydrolyse wichtigen Walker-A- (WA) und -B-Motive (WB) (Blau) und die für AAA-Proteine charakteristische zweite Homologieregion (Rot) (*second region of homology* (SRH)) dargestellt.

3.1.1. Die *in vivo*-Aktivität von Yme1 korreliert mit der Hydrophobizität von Y354X

Das Fehlen der *i*-AAA-Protease Yme1 in *S. cerevisiae* verursacht ein stark eingeschränktes Zellwachstum auf Glucose-haltigen Medien bei niedrigen Temperaturen, bei Abwesenheit mitochondrialer DNA und auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen bei erhöhter Temperatur (Thorsness *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1995). Diese Phänotypen können durch die Expression von plasmidkodiertem Yme1 unter der Kontrolle des endogenen Promotors komplementiert werden (Abb. 5; Daten nicht gezeigt) (Weber *et al.*, 1996); nicht aber durch die Expression einer proteolytisch inaktiven Yme1-Variante mit einem Aminosäureaustausch im konservierten Metallbindemotiv HEXXH (E541Q) (Leonhard *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1996). Somit ist das eingeschränkte Wachstum auf die fehlende proteolytische Aktivität zurückzuführen. Das Wachstum der Hefen kann demnach als Maß für die *in vivo*-Aktivität der *i*-AAA-Protease unter diesen Bedingungen herangezogen werden.

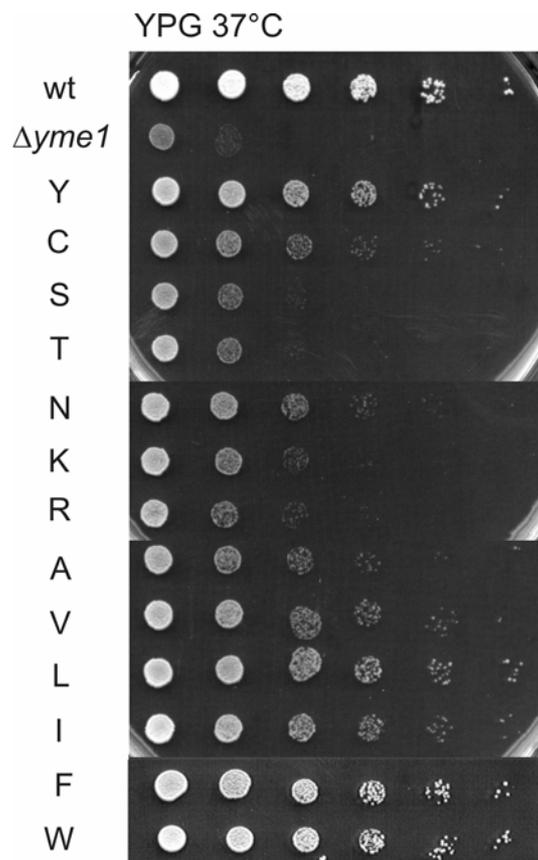


Abb. 5: Eine hohe Hydrophobizität des Aminosäurerestes an Position Y354 des YVG-Motivs ist für die *in vivo*-Aktivität von Yme1 entscheidend. Reihen von Fünffach-Verdünnungen von Wildtyp- (wt)-, $\Delta yme1$ - oder Yme1^{Y354X}-exprimierenden Hefestämmen wurden auf YP-Medium mit 3% (m/v) Glycerin (YPG) aufgetragen und für vier Tage bei 37°C inkubiert. Die Aminosäurereste an Position 354 der Yme1^{Y354X}-Mutanten sind im Ein-Buchstabenkode angegeben.

Um die *in vivo*-Aktivität von Yme1 nach Mutation von Y354 (Yme1^{Y354X}) zu untersuchen, wurden die Varianten plasmidkodiert unter der Kontrolle des endogenen *YME1*-Promotors in einem $\Delta yme1$ -Hefestamm exprimiert. Nachfolgend wurden die Wachstumseigenschaften dieser Hefestämme auf YP-Medium mit 3% (m/v) Glycerin (YPG) als einziger Kohlenstoffquelle bei erhöhter Temperatur (37°C) untersucht. Wie in Abbildung 5 dargestellt, erlaubte die Expression von Yme1^{Y354X} mit aromatischen Aminosäureresten (Y (Wildtyp), F, W) eine vollständige Komplementation des Wachstumsdefektes des $\Delta yme1$ -Hefestamms. Das Wachstum von *yme1*^{Y354X}-Zellen mit aliphatischen Aminosäureresten (A, V, L, I) an Position Y354 korrelierte interessanterweise mit steigender Hydrophobizität der Aminosäureseitenketten (Abb. 5). Die Variante mit der Aminosäure Alanin an Position 354, die eine

geringe Hydrophobizität aufweist, ermöglichte nur ein intermediäres Wachstum. Die Einführung von Leucin hingegen, einer Aminosäure mit hoher Hydrophobizität, erlaubte ein Wildtyp-ähnliches Wachstum (Abb. 5). Polare (C, S, T, N) oder geladene (K, R) Aminosäuresubstitutionen schienen dagegen die *in vivo*-Aktivität von Yme1 deutlich zu beeinträchtigen. Dies wird am klarsten durch die Serin-, Threonin-, Lysin- und Arginin-Varianten verdeutlicht (Abb. 5), deren Expression kaum zu verbesserten Wachstumseigenschaften der $\Delta yme1$ -Zellen führte.

Die Expressionslevel des plasmidkodierten Yme1 und der Yme1^{Y354X}-Mutanten zeigten innerhalb dieser Versuchsreihe keine signifikanten Abweichungen von dem des genomisch exprimierten Yme1 und können somit als Ursache für unterschiedliches Wachstum ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der YVG-Motiv-Mutanten zeigt, dass Y354 für die *in vivo*-Aktivität der *i*-AAA-Protease Yme1 von entscheidender Bedeutung ist und dass aromatische und aliphatische Aminosäuren mit hoher Hydrophobizität für die Funktion offenbar bevorzugt werden.

3.1.2. Der Abbau von Cox2 wird durch Y354 beeinflusst

Um einen möglichen Effekt der Y354X-Mutationen auf die Assemblierung der oligomeren *i*-AAA-Protease zu überprüfen, wurde die Komplexbildung mittels Blauer Nativgelelektrophorese (BN-PAGE) analysiert. Diese Methode erlaubt es, Komplexe von Membranproteinen nach der Solubilisierung mit Detergenz mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Blau in nativem Zustand anzufärben. Durch Bindung des Farbstoffes wird eine negative Nettoladung erzeugt, die eine elektrophoretische Größenauftrennung der Membranproteinkomplexe innerhalb eines Polyacrylamidgradientengels ermöglicht. Der *i*-AAA-Protease-Komplex (Y) zeigte Wanderungseigenschaften in der BN-PAGE, die einem Molekulargewicht von mehr als 1 MDa entsprachen (Abb. 6). Die untersuchten Yme1^{Y354X}-Mutanten wiesen ein gleiches Laufverhalten auf (Abb. 6). Die Komplexbildung der *i*-AAA-Protease Yme1 wird somit nicht durch die eingeführten Aminosäuresubstitutionen an Position Y354 beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen daher einen Effekt der Y354X-Mutationen auf die proteolytische Aktivität von Yme1 vermuten. Um einen möglichen Einfluss der Mutationen auf den Abbau von membranständigen Substratproteinen zu bestimmen, sollte die Stabilität

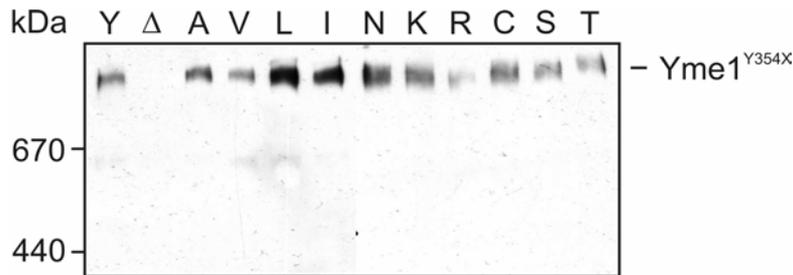


Abb. 6: Die Komplexbildung der *i*-AAA-Protease Yme1 wird durch Y354X-Mutationen nicht beeinflusst. Die Assemblierung der Yme1^{Y354X}-Mutanten wurde mittels Blauer Nativgelelektrophorese (BN-PAGE) untersucht. Proteine aus isolierten Mitochondrien (200 µg), die die entsprechenden Yme1^{Y354X}-Mutanten exprimierten, wurden mit 1% (m/v) TritonX-100-haltigem Puffer solubilisiert und in einem 3-10%-igen Polyacrylamidgradientengel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Molekulargewicht der als Größenstandards verwendeten Proteine Thyroglobulin (670 kDa) und Apoferritin (440 kDa) ist seitlich markiert. Die Yme1-Komplexe wurden immunochemisch mit α -Yme1-Antikörpern nachgewiesen. Die Aminosäurereste an Position 354 der Yme1^{Y354X}-Mutanten sind im Ein-Buchstabenkode angegeben.

von Cox2 (Cytochrom-*c*-Oxidase-Untereinheit 2) in Gegenwart der verschiedenen Yme1^{Y354X}-Mutanten in isolierten Mitochondrien untersucht werden. Cox2 ist durch zwei N-terminal gelegene Transmembrandomänen in der inneren Mitochondrienmembran verankert und exponiert eine 146 Aminosäuren große Domäne in den Intermembranraum. Es ist eines der acht mitochondrial kodierten Proteine in Hefe und stellt eine der drei Kernuntereinheiten des Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplexes (COX) der Atmungskette dar (Herrmann und Funes, 2005). Der COX-Komplex setzt sich aus mitochondrial und kernkodierten Untereinheiten zusammen. Kommt es zu einem Ungleichgewicht von mitochondrial und kernkodierten Untereinheiten, wie z. B. bei der Translation mitochondrial kodierter Proteine in isolierten Mitochondrien, werden überschüssige, nicht assemblierte Untereinheiten proteolytisch entfernt. Hierbei wird Cox2 in einem Yme1-abhängigen Prozess abgebaut (Nakai *et al.*, 1995; Pearce und Sherman, 1995; Weber *et al.*, 1996). Mitochondriale Translationsprodukte wurden in Gegenwart von ³⁵S-Methionin in isolierten Mitochondrien synthetisiert, die entweder kein Yme1 ($\Delta yme1$), Yme1 oder eine der Yme1^{Y354X}-Mutanten exprimierten. Die Stabilität des neu synthetisierten Cox2 bei 37°C wurde dann mittels SDS-PAGE und Phosphoreszenz analysiert. Die Anwesenheit der hydrophilen Aminosäurereste Serin und Threonin an Position Y354 verursachte eine Stabilisierung von Cox2; die proteolytische Aktivität von Yme1

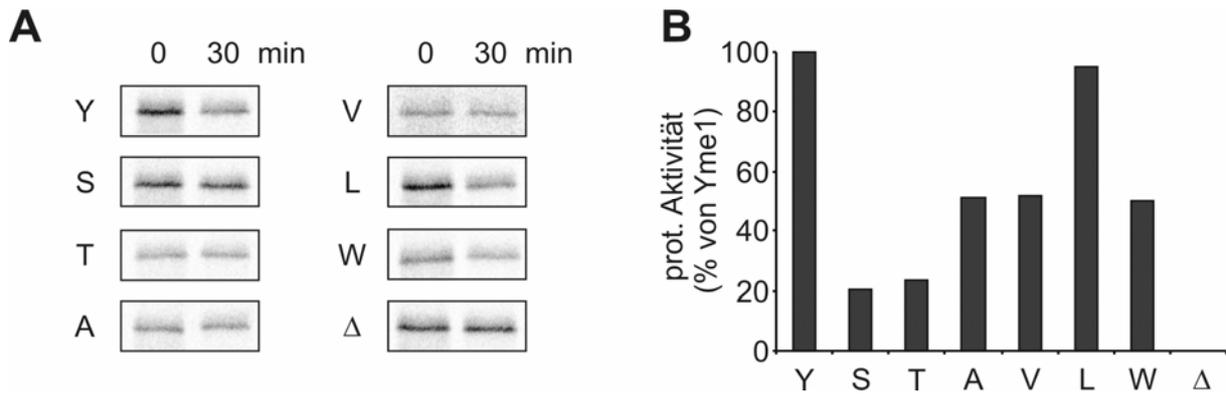


Abb. 7: Der Abbau des Membranproteins Cox2 wird durch Mutation von Y354 in Yme1 beeinflusst. Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität der Yme1^{Y354X}-Mutanten wurde die Stabilität von neu synthetisiertem Cox2 untersucht. Mitochondriale Translationsprodukte wurden in Gegenwart von ³⁵S-Methionin in isolierten Mitochondrien, die jeweils verschiedene Yme1^{Y354X}-Varianten exprimierten, für 10 min bei 30°C synthetisiert. Nach Abstoppen der Translationsreaktion wurden die Proben für 30 min bei 37°C inkubiert und der Cox2-Gehalt mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. **(A)** Der Cox2-Gehalt vor (0 min) und nach der Inkubation (30 min) ist für die einzelnen Yme1^{Y354X}-Mutanten dargestellt. **(B)** Relative proteolytische Aktivität der Yme1^{Y354X}-Mutanten. Die in (A) dargestellten Cox2-Level wurden durch Phosphoreszenzanalyse quantifiziert und deren Abnahme in Mitochondrien mit Yme1 (Y) im Vergleich zu Mitochondrien ohne Yme1 (Δ) wurde als 100% gesetzt. (A, B) Die Aminosäurereste an Position 354 der Yme1^{Y354X}-Mutanten sind im Einbuchstabenkode angegeben.

war auf etwa 20% reduziert (Abb. 7). Im Gegensatz dazu konnten für Yme1^{Y354A} und Yme1^{Y354V} etwa 50% der Aktivität von Yme1 beobachtet werden (Abb. 7). Yme1^{Y354L} zeigte dagegen Wildtyp-ähnliche Aktivität (Abb. 7). Interessanterweise war für Yme1^{Y354W} nur eine 50%-ige Aktivität im Vergleich zu Yme1 festzustellen (Abb. 7), obwohl dieses eine vollständige Komplementation des Wachstumsphänotyps der *Δyme1*-Zellen vermitteln konnte (Abb. 5).

Somit kann in guter Übereinstimmung mit der Wachstumsanalyse ein Einfluss des Tyrosinrestes an Position 354 auf den Abbau des Membranproteins Cox2 festgestellt werden. Hydrophile Aminosäurereste an dieser Position führen zu einer starken Beeinträchtigung der proteolytischen Aktivität der Protease. Aminosäuren mit einer hohen Hydrophobizität werden offenbar bevorzugt, gleichwohl sich hier eine weniger strenge Korrelation von Hydrophobizität und proteolytischer Aktivität feststellen lässt. Zudem können neben der Hydrophobizität auch andere Eigenschaften der Aminosäurereste an Position Y354 die proteolytische Aktivität von Yme1 beeinflussen. Das Beispiel der Tryptophan-Substitution könnte auf einen Einfluss der Seitenkettengröße hindeuten.

3.1.3. Yme1^{Y354S} weist substratspezifische Bindungsdefekte auf

Es stellt sich die Frage, wie der Abbauprozess von membrangebundenen Substratproteinen durch veränderte Eigenschaften des YVG-Motivs innerhalb der *i*-AAA-Protease Yme1 beeinflusst wird. Zum einen ist prinzipiell eine Beeinträchtigung der initialen Bindung oder Erkennung von Substraten vorstellbar. In gleicher Weise könnten Schritte gestört sein, die einer Substratbindung nachfolgen, wie zum Beispiel die Translokation und Entfaltung von Substratproteinen.

Die Interaktion membrangebundener Substratproteine mit verschiedenen Yme1-Varianten sollte daher mit Hilfe von Koimmunfällungsexperimenten charakterisiert werden. Hierzu wurden die Bindungseigenschaften von Yme1, proteolytisch inaktivem Yme1^{E541Q} und, stellvertretend für die YVG-Varianten, Yme1^{Y354S} verglichen. Als Substratprotein für diese Analysen wurde zunächst das Hybridprotein Yta10(1-161)-DHFR^{mut} untersucht (Leonhard *et al.*, 1999). Yta10(1-161)-DHFR^{mut} besteht aus den ersten 161 Aminosäuren des mitochondrialen Proteins Yta10 und einer durch Mutationen entfalteten Variante der Dihydrofolatreduktase (DHFR^{mut}). Die von Yta10 abgeleiteten Teile des Hybridproteins gewährleisten dessen Import in isolierte Mitochondrien und eine Verankerung des Proteins in der inneren Mitochondrienmembran. Die entfaltete DHFR^{mut}-Domäne des Hybridproteins wird in den mitochondrialen Intermembranraum exponiert. Aufgrund dieser Topologie wird das Hybridprotein in einem Yme1-abhängigen Prozess abgebaut (Leonhard *et al.*, 1999). Wie in Abbildung 8A gezeigt, konnte Yme1^{Y354S} auch den Abbau von Yta10(1-161)-DHFR^{mut} in isolierten Mitochondrien nicht vermitteln. Yme1^{Y354S} wies hier nur etwa 10% der Yme1-Aktivität auf (Abb. 8A).

Für Koimmunfällungsexperimente wurde ³⁵S-Methionin-markiertes Yta10(1-161)-DHFR^{mut} in isolierte Mitochondrien, die kein Yme1 ($\Delta yme1$), Yme1, Yme1^{E541Q} oder Yme1^{Y354S} exprimierten, importiert. Die Mitochondrien wurden anschließend in Digitonin-haltigem Puffer solubilisiert und mit α -Yme1-Antikörpern inkubiert. Nach der Immunfällung von Yme1 konnten nur geringe Mengen an Substratprotein im Eluat nachgewiesen werden (Abb. 8B). Möglicherweise wird Yta10(1-161)-DHFR^{mut} nach erfolgter Bindung an die Protease schnell umgesetzt, so dass nur geringe Mengen des Substrates im zeitlichen Durchschnitt an der Protease gebunden sind. Übereinstimmend mit dieser Erklärung konnte im Falle von proteolytisch inaktivem Yme1^{E541Q} rund dreimal mehr Substratprotein im Vergleich zu Yme1 kopräzipitiert werden (Abb. 8B). Interessanterweise wurde für die

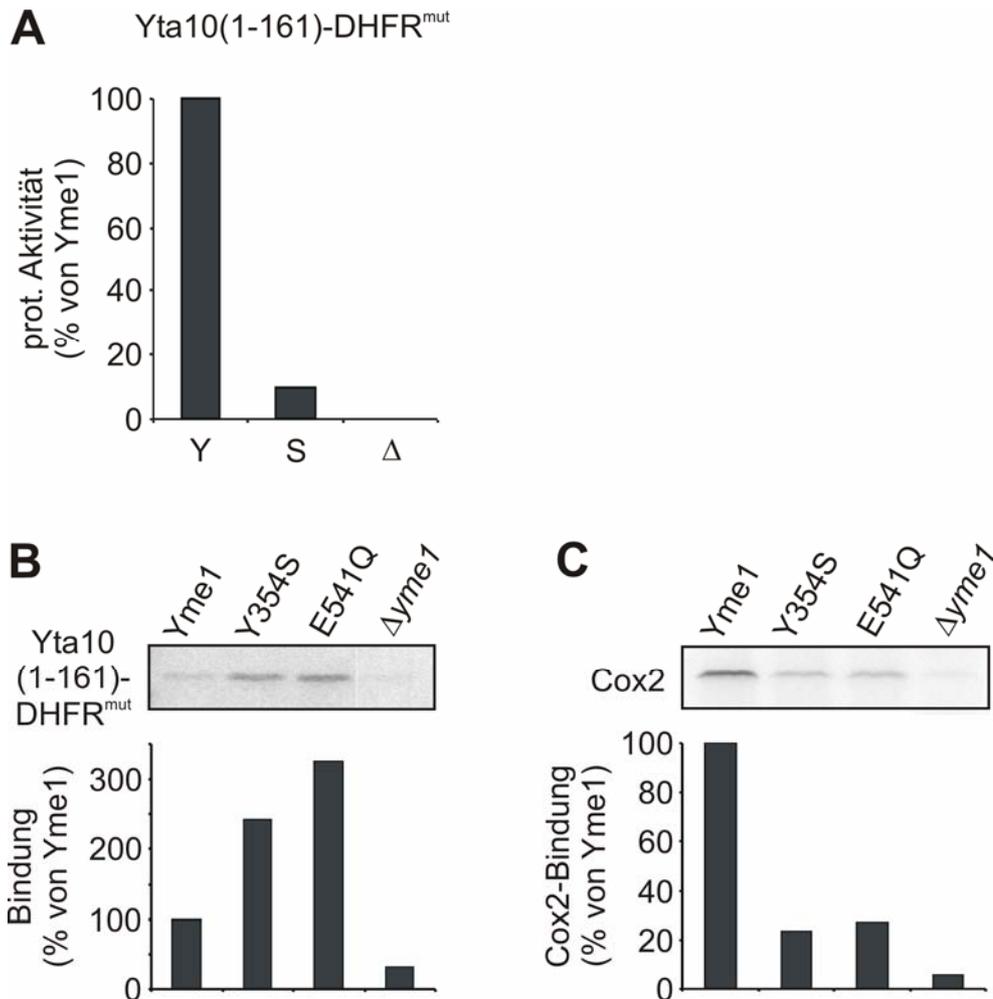


Abb. 8: Substratspezifische Effekte der Y354S-Mutation von Yme1 auf die Substratbindung.

(A) Yme1-abhängiger Abbau von radioaktiv markiertem Yta10(1-161)-DHFR^{mut} nach Import in isolierte Mitochondrien in der Anwesenheit von Yme1 (Y), Yme1^{Y354S} (S) oder ohne Yme1 (Δ) nach 30 min bei 37°C. Yta10(1-161)-DHFR^{mut}-Level wurden mittels SDS-PAGE analysiert und über Phosphoreszenzanalyse quantifiziert. Der Abbau von Yta10(1-161)-DHFR^{mut} in Mitochondrien mit Yme1 (Y) im Vergleich zu Δyme1-Mitochondrien wurde als 100% gesetzt. **(B, C)** Bindung von Substratproteinen an Yme1^{Y354S}. Das radioaktiv markierte Hybridprotein Yta10(1-161)-DHFR^{mut} wurde in isolierte Mitochondrien, die entweder Yme1, Yme1^{Y354S} (Y354S), Yme1^{E541Q} (E541Q) oder kein Yme1 (Δyme1) exprimierten, importiert (B) oder mitochondriale Translationsprodukte wurden in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin synthetisiert (C). Nach Solubilisierung wurden Koimmunfällungen mit α-Yme1-Antikörpern durchgeführt. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und durch Phosphoreszenzanalyse quantifiziert. Fällungseffizienzen von Substratproteinen mit Yme1 wurden als 100% gesetzt. (B) Bindung von Yta10(1-161)-DHFR^{mut}. (C) Bindung von neu synthetisiertem Cox2.

Mutante Yme1^{Y354S} ein mit Yme1^{E541Q} vergleichbarer Effekt beobachtet (Abb. 8B). Auch hier kam es zu einer Akkumulation des Substratproteins Yta10(1-161)-DHFR^{mut} an der Protease. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine initiale Bindung eines entfalteten Substratproteins an eine proteolytisch inaktive YVG-Motiv-Mutante von Yme1 möglich ist. Offenbar weist eine solche Mutante aber eine Störung von nachfolgenden Schritten auf, die den Abbau des gebundenen Substratproteins verhindert.

In gleicher Weise wurde die Interaktion der verschiedenen Yme1-Varianten mit dem Substratprotein Cox2 analysiert. Mitochondriale Translationsprodukte wurden in Gegenwart von ³⁵S-Methionin in den entsprechenden Mitochondrien synthetisiert. Nachfolgend wurden die Proben wie oben beschrieben behandelt und die Eluate auf die Anwesenheit von Cox2 überprüft. Im Gegensatz zum vorherigen Ansatz konnten bei der Fällung mit Yme1 signifikante Mengen an neu synthetisiertem Cox2 kopräzipitiert werden (Abb. 8C). Möglicherweise werden die beiden Substratproteine nach ihrer Bindung von der Protease unterschiedlich schnell umgesetzt. Die Untersuchung von Yme1^{Y354S} und Yme1^{E541Q} zeigte im Vergleich zu Yme1 jeweils eine um etwa 80% geringere Bindung von Cox2 (Abb. 8C). Im Gegensatz zu Yta10(1-161)-DHFR^{mut} bewirkt offenbar ein verändertes YVG-Motiv eine gestörte initiale oder stabile Bindung von Cox2 an Yme1.

Demnach können veränderte Eigenschaften des YVG-Motivs von Yme1 die Substratinteraktion an verschiedenen Schritten des Abbauprozesses beeinflussen. Abhängig vom Substratprotein führen sie zu einer Störung der initialen Substratbindung oder von nachfolgenden Prozessen.

3.1.4. ATPase-defiziente Yme1-Mutanten zeigen Yme1^{Y354S}-ähnliche Defekte der Substratinteraktion

Es stellt sich die Frage, welche Eigenschaften der verwendeten Substratproteine für die substratspezifischen Bindungsdefekte von Yme1^{Y354S} verantwortlich sind. Yta10(1-161)-DHFR^{mut} ist durch die Entfaltung der mutierten DHFR-Domäne gekennzeichnet (Vestweber und Schatz, 1988). Im Gegensatz dazu wird Cox2 nach seiner Synthese durch das Chaperon Cox20 gebunden und wahrscheinlich in seiner Faltung und Biogenese unterstützt (Hell *et al.*, 2000). Demnach unterscheiden sich wahrscheinlich die Faltungszustände beider Proteine. Ein solcher globaler Faltungsunterschied konnte durch unterschiedliche Sensitivität gegenüber

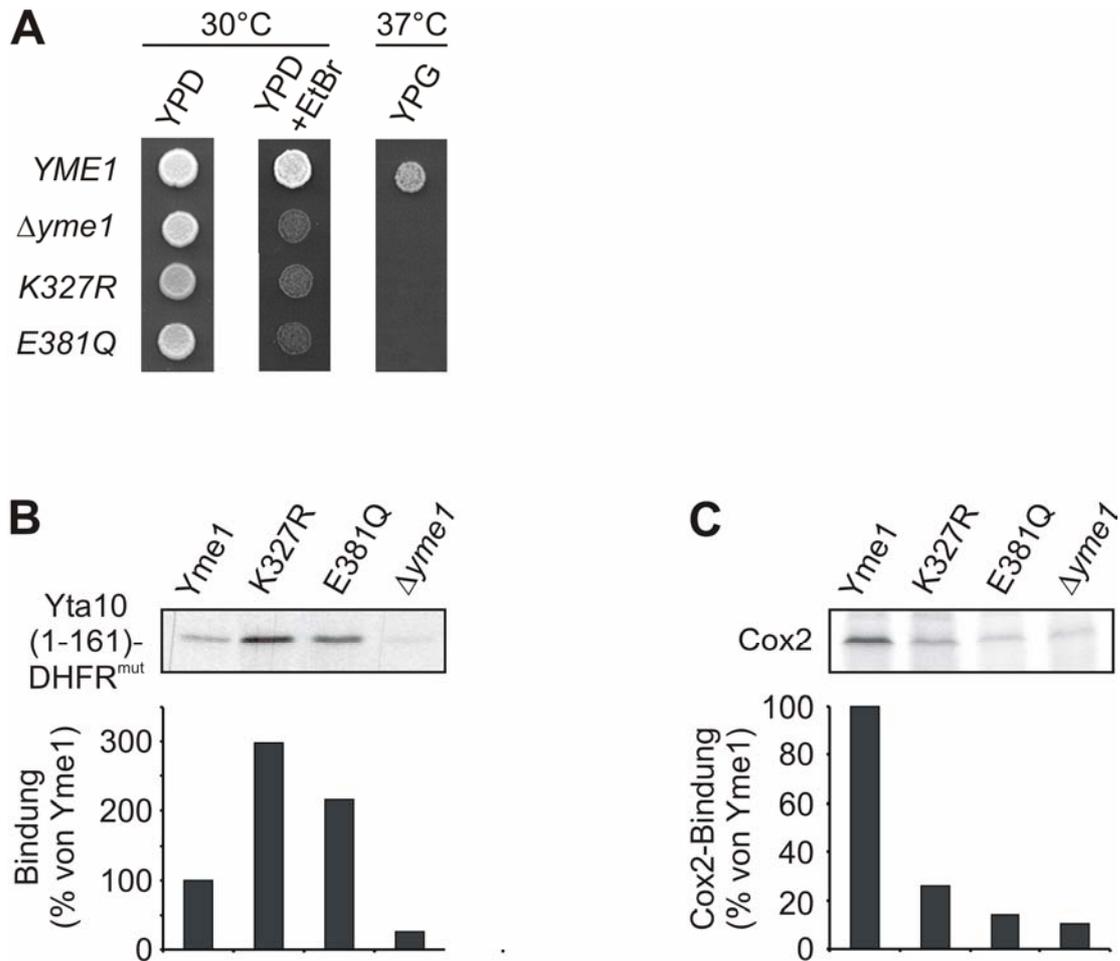


Abb. 9: In vivo-Aktivität und substratspezifische Defekte von ATPase-defizienten Yme1-Mutanten. (A) *In vivo*-Aktivität der ATPase-defizienten Mutanten Yme1^{K327R} und Yme1^{E381Q}. 0,2 OD₆₀₀-Einheiten der Δyme1-Stämme mit Yme1 (YME1), ohne Yme1 (Δyme1), der Yme1^{K327R}-Mutante (K327R) oder der Yme1^{E381Q}-Mutante (E381Q) wurden jeweils auf YP-Platten mit 2% (m/v) Glucose (YPD), mit 2% (m/v) Glucose und 25 μg/ml Ethidiumbromid (YPD-EtBr) oder mit 3% (m/v) Glycerin (YPG) bei angegebener Temperatur für zwei bis vier Tage wachsen gelassen. (B, C) Untersuchung der ATPase-defizienten Yme1-Mutanten Yme1^{K327R} und Yme1^{E381Q} auf die Bindung von Substratproteinen. Die Versuche wurden mit isolierten Mitochondrien, die entweder Yme1, Yme1^{K327R} (K327R), Yme1^{E381Q} (E381Q) oder kein Yme1 (Δyme1) exprimierten, wie für Abb. 8B und C beschrieben durchgeführt.

einer Trypsin-Behandlung nach osmotischer Disruption der äußeren Mitochondrienmembran experimentell belegt werden. Konsistent mit einer losen Faltung wurde die Intermembranraumdomäne von Yta10(1-161)-DHFR^{mut} vollständig hydrolysiert. Für die Intermembranraumdomäne von Cox2 konnte dagegen ein Trypsin-resistentes Fragment gefunden werden, was auf eine kompakte Faltung hinweist (Daten nicht gezeigt).

Entsprechend der postulierten Rolle von Y354 innerhalb des Modells der translokationsgekoppelten Proteinfaltung könnte eine ATP-abhängige Entfaltung von Cox2 und damit eine stabile Bindung in der Yme1^{Y354S}-Mutante gestört sein. Eine solche Abhängigkeit wäre für die Bindung eines entfalteten Proteins wie Yta10(1-161)-DHFR^{mut} nicht zu beobachten.

Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses der ATPase-Aktivität der Protease auf die Substratbindung wurden zwei Yme1-Mutanten untersucht, die Punktmutationen in den konservierten ATPase-Motiven trugen. Zum einen wurden die Auswirkungen eines K327R-Austausches innerhalb des Walker-A-Motivs von Yme1 analysiert. Ein solcher Austausch führte in verwandten AAA⁺-Proteinen zu einer gestörten ATP-Bindung (Hanson und Whiteheart, 2005). Zum anderen wurde ein E381Q-Austausch innerhalb des Walker-B-Motivs untersucht, der, wie für andere AAA⁺-Proteine beobachtet wurde, zwar die ATP-Bindung erlaubt, die ATP-Hydrolyse allerdings unterbindet (Hanson und Whiteheart, 2005). Entsprechend der zentralen Bedeutung der ATPase-Aktivität für die Funktion von ATP-abhängigen Proteasen führten beide Mutationen zu einem vollständigen Verlust des respiratorischen Wachstums und damit der *in vivo*-Aktivität der Protease (Abb. 9A). Die Substratinteraktion von Yme1 und den beiden ATPase-defizienten Mutanten Yme1^{K327R} und Yme1^{E381Q} wurde erneut in Koimmunfällungen mit den Substratproteinen Yta10(1-161)-DHFR^{mut} und Cox2 untersucht. Wie in Abbildung 9B dargestellt, konnte für Yme1^{K327R} und Yme1^{E381Q} eine im Vergleich zu Yme1 2-3fach erhöhte Bindung von Yta10(1-161)-DHFR^{mut} nachgewiesen werden. Für eine initiale Bindung eines entfalteten Substrates scheint daher eine intakte ATPase-Aktivität nicht notwendig zu sein, wohl aber für nachfolgende Schritte des Abbauprozesses. Im Gegensatz dazu war die Fällungseffizienz von Cox2 mit den ATPase-defizienten Mutanten um etwa 80% im Vergleich zu Yme1 reduziert (Abb. 9C). Offenbar ist eine intakte ATPase-Aktivität von Yme1 eine wichtige Voraussetzung für eine stabile Interaktion mit einem gefalteten Substrat wie Cox2. Somit führen Y354-Mutationen innerhalb des YVG-Motivs und Mutationen in ATPase-Motiven zu ähnlichen substratspezifischen Defekten bei der Substratinteraktion von Yme1.

3.1.5. Thermische Destabilisierung von Cox2 reduziert den initialen Bindungsdefekt von Yme1^{Y354S} und ATPase-defizientem Yme1

Um weitere Hinweise für den Einfluss des Faltungszustandes des Substrates auf eine ATP-abhängige Bindung zu erhalten, sollte die Cox2-Faltung nach der Synthese durch eine weitere zehnmünütige Inkubation bei 37°C destabilisiert werden. In der anschließenden Koimmunfällung wurde dann die Interaktion mit Yme1, der YVG-Motiv Mutante Yme1^{Y354S} und der ATPase-defizienten Mutante Yme1^{K327R} untersucht. Die thermische Destabilisierung von Cox2 führte dabei nicht zu einer reduzierten Fällungseffizienz mit Yme1 (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte durch die erhöhte Temperatur eine effizientere Cox2-Fällung mit den Mutanten Yme1^{Y354S} und Yme1^{K327R} im Vergleich zu Yme1 beobachtet werden (Abb. 10). Der zuvor beobachtete Bindungsdefekt reduzierte sich in beiden Fällen auf eine Fällungsdefizienz von etwa 25% (vergleiche Abb. 8C, 9C und 10). Diese Befunde stehen im Einklang mit einer defekten Substratbindung aufgrund einer beeinträchtigten ATP-abhängigen Entfaltung. Offenbar spielt Y354 für eine ATP-abhängige, stabile Bindung von gefalteten Substratproteinen an die Protease eine wichtige Rolle.

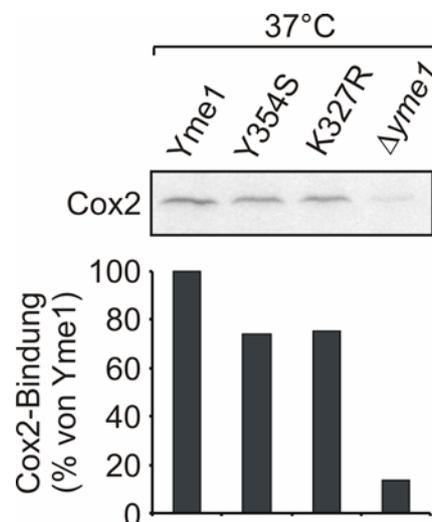


Abb. 10: Thermisch destabilisiertes Cox2 wird effizient von Yme1^{Y354S} und Yme1^{K327R} gebunden.

Der Versuch wurde, wie unter Abb. 8C beschrieben, mit isolierten Mitochondrien, die Yme1, Yme1^{Y354S} (Y354S), Yme1^{K327R} (K327R) oder kein Yme1 ($\Delta yme1$) exprimierten, durchgeführt. Nach der Translation von mitochondrial kodierten Proteinen wurden die Proben zusätzlich für 10 min bei 37°C inkubiert.

3.2. Charakterisierung der NH-Region der AAA-Domäne als Substratbindestelle

Die Ergebnisse in Kapitel 3.1. deuten auf die Existenz mindestens einer weiteren, Y354-unabhängigen Substratbindestelle innerhalb der *i*-AAA-Protease Yme1 hin. In vorangegangenen Arbeiten konnte eine Substratbindestelle innerhalb der AAA-Domäne von Yme1 identifiziert werden. Hierbei wurden C-terminal verkürzte Yme1-Varianten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Yta10(1-161)-DHFR^{mut} zu binden. Eine Region (Aminosäure 268-313) innerhalb der AAA-Domäne von Yme1 war für eine Bindung des Substrates entscheidend. Als Bestandteil eines GST-Fusionsproteins war sie ausreichend, das Substrat *in vitro* zu binden (Leonhard *et al.*, 1999).

Zur weiteren Analyse sollten die Eigenschaften dieser Substratbindestelle im Kontext des Vollängenproteins untersucht werden. Abbildung 11A zeigt einen Sequenzvergleich der in Yme1 identifizierten Substratbindestelle mit den entsprechenden Bereichen einer Auswahl verwandter AAA-Proteasen.

Um die Lage der Substratbindestelle in der Struktur der *i*-AAA-Protease Yme1 abzuschätzen, wurde die entsprechende homologe Region in der Kristallstruktur der cytoplasmatischen Domänen der AAA-Protease FtsH aus *T. maritima* untersucht (Abb. 11B und C) (Bieniossek *et al.*, 2006). Hier besteht die Region aus überwiegend helikalen Sekundärstrukturen und befindet sich an der äußeren, seitlichen Oberfläche des hexameren Ringkomplexes. Übereinstimmende Ergebnisse konnten für diese Region auch innerhalb der modellierten Struktur der Yme1-AAA-Domänen erhalten werden (s. auch Abb. 12B). Diese Lage stimmt somit mit den Erwartungen an eine initiale Substratbindestelle gut überein. Aufgrund der strukturellen Merkmale und der Positionierung am N-terminalen Ende der AAA-Domäne wird diese Region im nachfolgenden als NH-(N-terminale Helices)-Region bezeichnet.

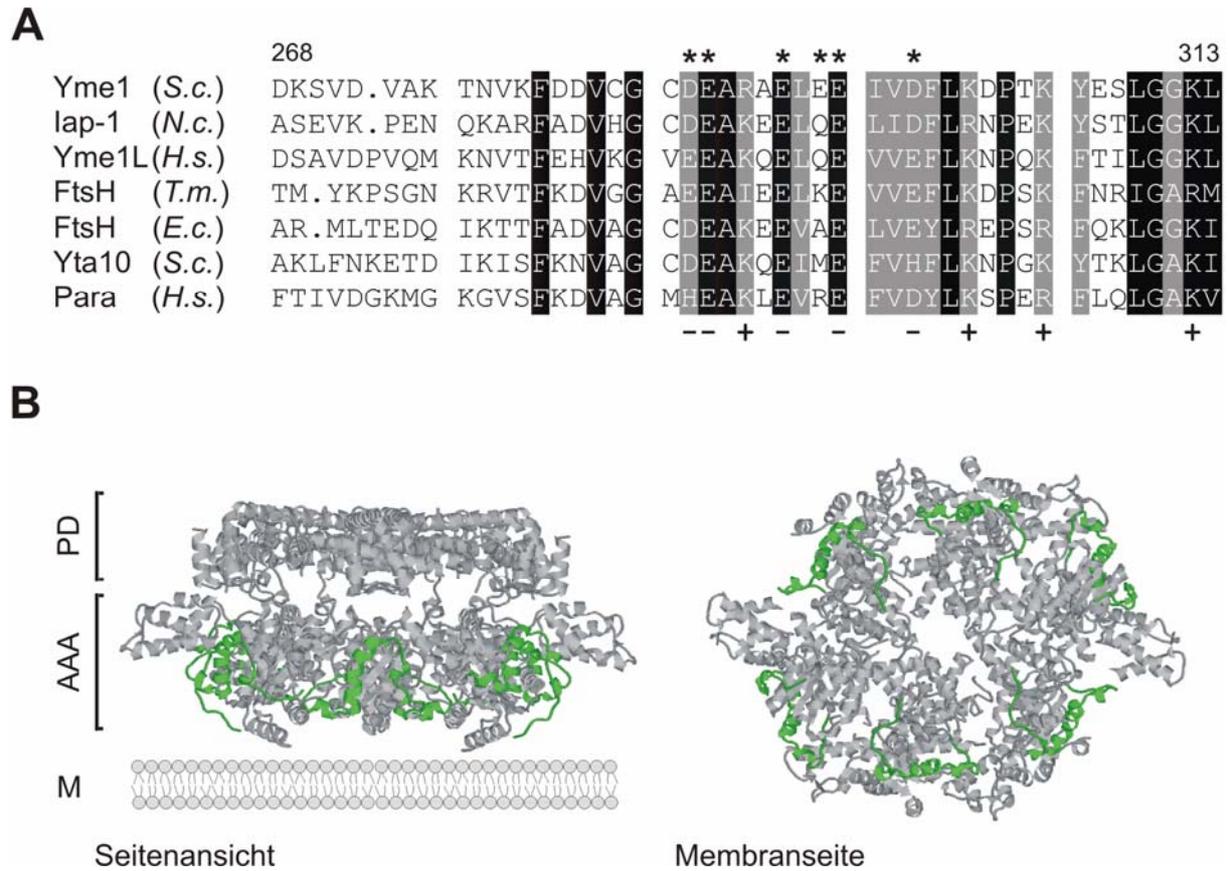


Abb. 11: Sequenzvergleich und strukturelle Lage der NH-Region von AAA-Proteasen. (A) Der Sequenzvergleich der NH-Region von *S. cerevisiae* Yme1 (Aminosäure 268-313) mit den homologen Regionen von *N. crassa* IAP-1 (Aminosäure 242-287), *H. sapiens* Yme1L (Aminosäure 268-314), *T. maritima* FtsH (Aminosäure 148-193), *E. coli* FtsH (Aminosäure 139-184), *S. cerevisiae* Yta10 (Aminosäure 274-320) und *H. sapiens* Paraplegin (Aminosäure 295-341) wurde durch Verwendung des ClustalW-Programms erstellt. Identische Aminosäurereste sind schwarz und homologe Aminosäurereste grau unterlegt. Minuszeichen markieren überwiegend negativ geladene und Pluszeichen überwiegend positiv geladene Aminosäurepositionen. Die mit Sternen versehenen negativ geladenen Aminosäurereste wurden in späteren Analysen substituiert. **(B)** Kristallstruktur der cytoplasmatischen Domänen von *T. maritima* FtsH (Bieniossek *et al.*, 2006). Der zur NH-Region von Yme1 (Aminosäure 268-313) homologe Bereich (Aminosäure 148-193) ist innerhalb der Kristallstruktur grün hervorgehoben. AAA: AAA-Domänen; PD: proteolytische Domänen; M: Membran.

3.2.1. Negativ geladene Aminosäurereste der NH-Region sind für die *in vivo*-Aktivität von Yme1 notwendig

Um die Eigenschaften der NH-Region in Vollängen-Yme1 zu untersuchen, wurde eine Alanin-Mutagenese durchgeführt. Hierzu wurde systematisch jeder oberflächenexponierte Aminosäurerest innerhalb der NH-Region von Position 279-306 gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Unter der Annahme, dass eine ausreichende Reduzierung der Substrataffinität dieser Region zu einer Inaktivierung der gesamten Protease führen sollte, wenn der NH-Region eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung zukommt, wurde die *in vivo*-Aktivität der verschiedenen Yme1-Mutanten auf Medium mit nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle bei erhöhter Temperatur getestet (Abb. 12A). Es zeigte sich, dass nur *yme1^{E292A}*-Zellen ein eingeschränktes Hefewachstum aufwiesen. Alle anderen getesteten *yme1*-Varianten zeigten unter diesen Bedingungen ein Wachstum ähnlich dem von Wildtypzellen (Abb. 12A). Die Expressionslevel der untersuchten Yme1-Mutanten entsprachen hierbei dem von genomisch kodiertem Yme1 (Daten nicht gezeigt). Der Sequenzvergleich und die modellierte Struktur der NH-Region zeigen, dass E292 Bestandteil einer konservierten, negativ geladenen Oberfläche einer größeren Helix innerhalb der NH-Region ist (Abb. 11A und 12B). Daher wurden im nachfolgenden Yme1-Mutanten untersucht, bei denen bis zu sechs negativ geladene Aminosäuren durch Alanin (Yme1^A, Yme1^{A2} und Yme1^{A6}), Lysin (Yme1^{K6}) oder durch die entsprechenden Amidformen Glutamin oder Asparagin (Yme1^{N/Q6}) ersetzt worden waren (Abb. 12C). Offenbar konnte schon der Austausch von E292A und E294A (Yme1^{A2}) zu einer vollständigen Inaktivierung der Protease in diesem Versuchsansatz führen (Abb. 12C). Der Wachstumsphänotyp der Yme1-Mutanten mit positiv geladenen Aminosäuren (K6) oder den jeweiligen Amidformen (N/Q6) verdeutlichte die wichtige Rolle von negativen Ladungen für die Funktionsfähigkeit von Yme1 (Abb. 12C).

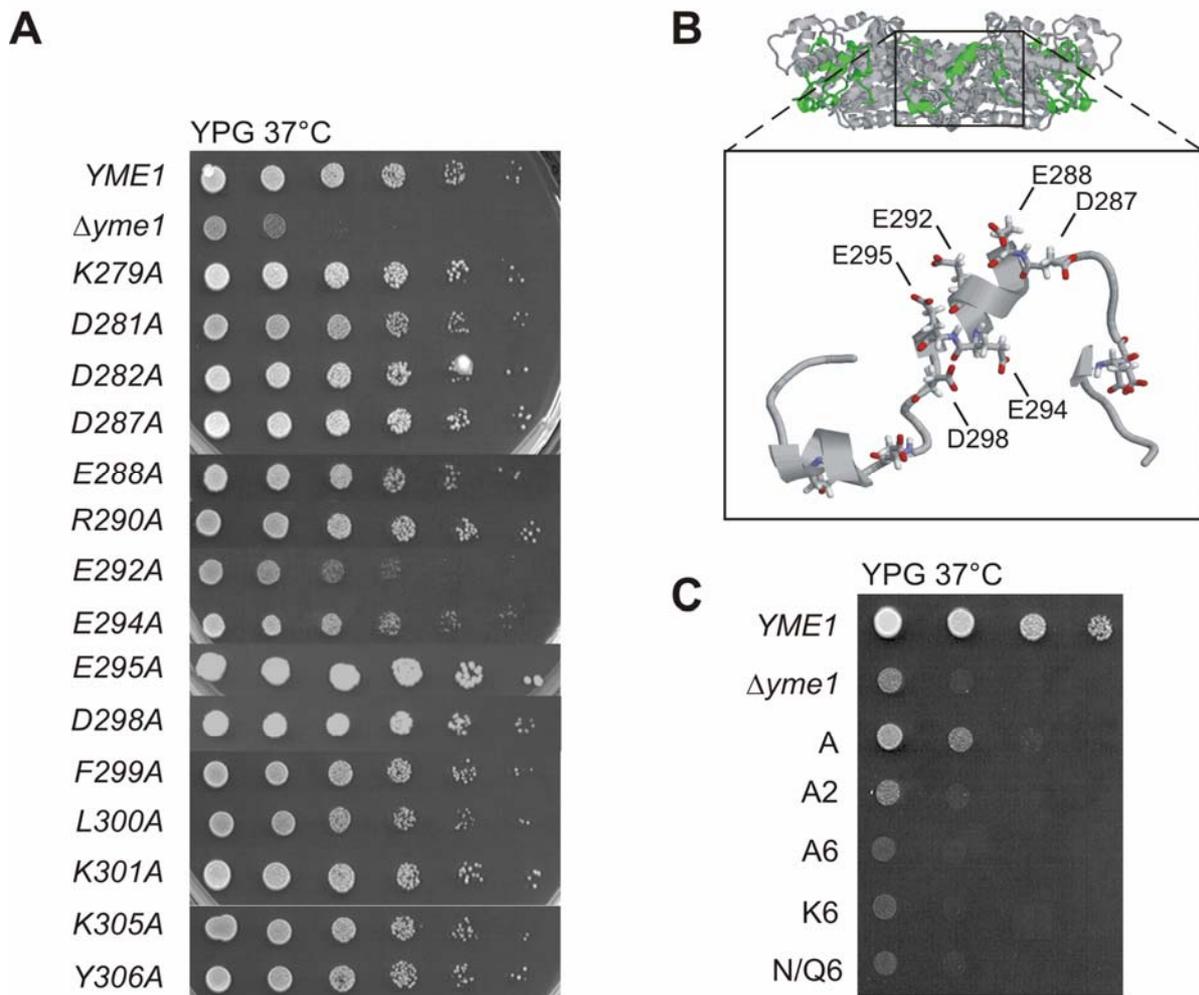


Abb. 12: In vivo-Aktivität von Yme1-Varianten mit mutierter NH-Region. Reihen von Fünffach-Verdünnungen von $\Delta yme1$ -Hefestämmen, die entsprechende plasmidkodierte Yme1-Varianten exprimierten. Die Hefen wurden auf YP-Medium mit 3% (m/v) Glycerin aufgetragen und für vier Tage bei 37°C inkubiert. **(A)** Wachstum von $\Delta yme1$ -Hefestämmen, die die durch Alanin-Mutagenese von einzelnen oberflächenexponierten Aminosäureresten der NH-Region hergestellten Yme1-Varianten exprimierten. **(B)** Die NH-Region weist eine konservierte negativ geladene Oberfläche auf. Die der NH-Region entsprechende Teilstruktur (Aminosäure 175-313) der modellierten AAA-Domäne von Yme1 (Nolden *et al.*, 2006) und darin enthaltene negativ geladene Aminosäurereste sind dargestellt. **(C)** Wachstum von $\Delta yme1$ -Hefestämmen, die Yme1-Varianten mit mutierten negativ geladenen Aminosäureresten in der NH-Region exprimierten. A: E292A; A2: E292A und E294A; A6: D287A, E288A, E292A, E294A, E295A und D298A; K6: D287K, E288K, E292K, E294K, E295K und D298K; N/Q6: D287N, E288Q, E292Q, E294Q, E295Q und D298N.

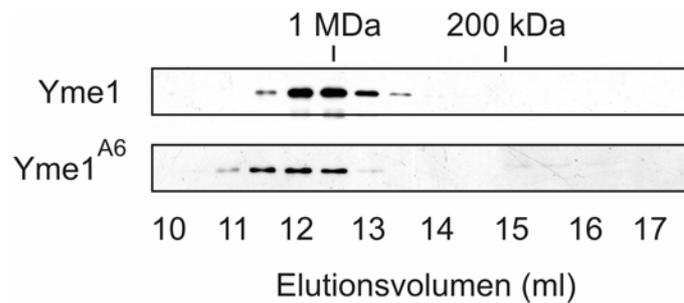


Abb. 13: Die Assemblierung von Yme1 in einen hochmolekularen *i*-AAA-Protease-Komplex ist durch Substitution von negativ geladenen Aminosäureresten in der NH-Region nicht gestört. Yme1 oder Yme1^{A6} exprimierende isolierte Mitochondrien (600 µg) wurden mit einem 0,4% (m/v) TritonX-100-haltigem Puffer (5 mg/ml mitochondriales Protein) solubilisiert und nach Zentrifugation durch Superose-6-Gelfiltration chromatographisch aufgetrennt. Die fraktionierten Eluate wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Yme1-Proteine wurden immunochemisch nachgewiesen. Die Größen der Yme1-Komplexe wurden anhand der molekularen Größenstandards Thyroglobulin (670 kDa), Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa) und Rinderserumalbumin (66 kDa) abgeleitet.

Wie in Abbildung 13 beispielhaft für Yme1^{A6} dargestellt, war die Assemblierung der hier untersuchten Yme1-Mutanten in einen hochmolekularen *i*-AAA-Protease-Komplex nicht beeinträchtigt (Abb.13 bzw. Daten nicht gezeigt). Demnach konnten Mutationen in der NH-Region identifiziert werden, die zu einem Verlust der *in vivo*-Aktivität führen, gleichzeitig die Assemblierung der Protease aber nicht störten. Offenbar sind negativ geladene Aminosäurereste in der NH-Region für die Aktivität von Yme1 entscheidend.

3.2.2. Eine intakte NH-Region ist für den Abbau von Membranproteinen essentiell

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass die Substitution von negativ geladenen Aminosäuren innerhalb der NH-Region die proteolytische Aktivität von Yme1 beeinträchtigt. Um die proteolytische Aktivität der NH-Region-Mutanten direkt zu messen, sollte die Stabilität der Substratproteine Cox2 und Phb1 in isolierten Mitochondrien in der Gegenwart von entsprechenden Yme1-Varianten untersucht werden. Hierfür wurden beispielhaft die beiden NH-Region-Mutanten Yme1^{A2} (E292A, E294A) und Yme1^{A6} (D287A, E288A, E292A, E294A, E295A, D298A) von Yme1 ausgewählt. Nach radioaktiver Markierung von mitochondrialen Translationsprodukten mit ³⁵S-Methionin wurde die Stabilität von Cox2 bei 37°C mittels SDS-PAGE verfolgt und mit Hilfe von Phosphoreszenzanalyse quantifiziert.

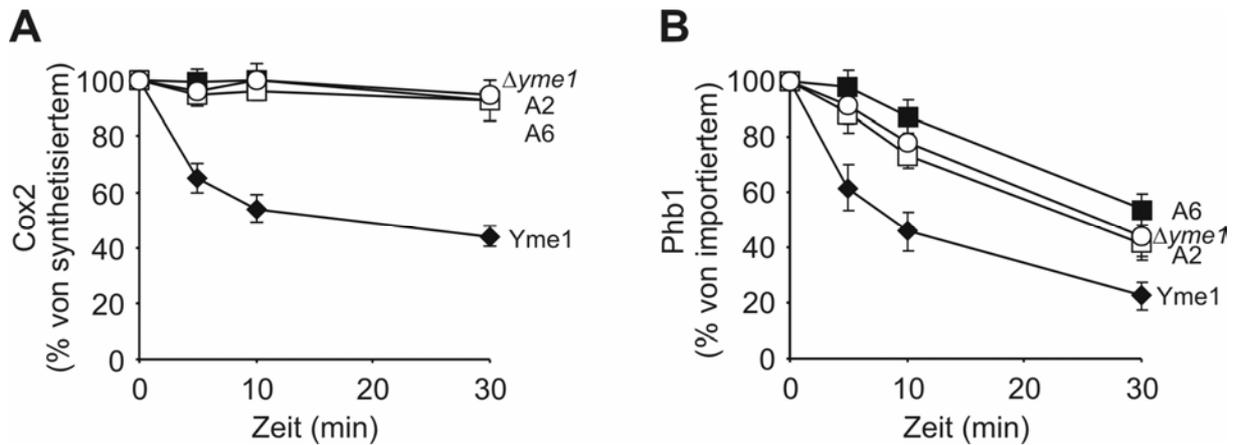


Abb. 14: Eine intakte NH-Region von Yme1 ist für den Abbau von Membranproteinen notwendig. Die Stabilität der Substratproteine Cox2 und Phb1 wurde in isolierten Mitochondrien, die Yme1 (◆), Yme1^{A2} (A2;■), Yme1^{A6} (A6;□) oder kein Yme1 (Δyme1;○) exprimierten, untersucht. **(A)** Mitochondriale Translationsprodukte wurden in Gegenwart von ³⁵S-Methionin für 10 min bei 30°C radioaktiv markiert. Nach Abstoppen der Translationsreaktion wurden die Proben bei 37°C inkubiert und Cox2-Level mittels SDS-PAGE verfolgt. **(B)** Radioaktiv markiertes Phb1 wurde bei 25°C für 20 min in isolierte Mitochondrien importiert. Nicht importiertes Phb1 wurde durch Trypsinbehandlung entfernt. Die Proben wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und die Stabilität von Phb1 mittels SDS-PAGE verfolgt. Die Quantifizierung der radioaktiven Signale erfolgte durch Phosphoreszenzanalyse.

Wie in Abbildung 14A dargestellt, war Cox2 über einen Zeitraum von 30 min in Gegenwart von Yme1^{A2} oder Yme1^{A6} vollständig stabil. Im Vergleich zu Δyme1-Mitochondrien zeigte sich keine signifikante proteolytische Aktivität dieser Mutanten (Abb. 14A). Als zweites Substrat wurde das mitochondriale Protein Phb1 untersucht. Phb1 ist eine Untereinheit des oligomeren Prohibitin-Komplexes der inneren Mitochondrienmembran (Steglich *et al.*, 1999; Nijtmans *et al.*, 2000; Tatsuta *et al.*, 2005). Nach Import in isolierte Mitochondrien kann Phb1 nicht in diesen Komplex assemblieren, weshalb es durch Yme1 und ein bisher nicht identifiziertes proteolytisches System abgebaut wird (Kambacheld *et al.*, 2005; Tatsuta *et al.*, 2005). Abbildung 14B verdeutlicht, dass radioaktiv markiertes Phb1 nach dem Import in isolierte Mitochondrien schnell bei 37°C abgebaut wurde. In der Abwesenheit von Yme1 (Δyme1) zeigte sich die Abbaukinetik dieses Proteins signifikant verlangsamt (Abb. 14B). In gleicher Weise konnte die Anwesenheit der beiden NH-Region-Mutanten Yme1^{A2} und Yme1^{A6} den Abbau nicht beschleunigen (Abb. 14B).

Offenbar ist der Abbau von membrangebundenen Substratproteinen durch die Substitution negativ geladener Aminosäurereste in der NH-Region gestört. Dieses Ergebnis entspricht somit den Erwartungen an eine initiale Substratbinderegion.

3.2.3. Die Substitution negativ geladener Aminosäurereste erniedrigt die Substrataffinität der NH-Region

Die bisher beschriebenen Ergebnisse sind zwar mit einer wichtigen Rolle der NH-Region für die Substraterkennung bzw. -bindung konsistent, schließen aber andere indirekte Effekte nicht aus. Um die Einflüsse der eingeführten Substitutionen negativ geladener Aminosäuren auf die Substrataffinität der NH-Region zu ermitteln, sollten die C-terminal verkürzten Yme1-Varianten Yme1(1-313) und Yme1(1-267) verwendet werden, die ursprünglich zur Identifizierung der NH-Region führten (Leonhard *et al.*, 1999). Dazu wurden in Yme1(1-313) die entsprechenden Austausch E292A, E294A (Yme1(1-313)^{A2}) und D287A, E288A,

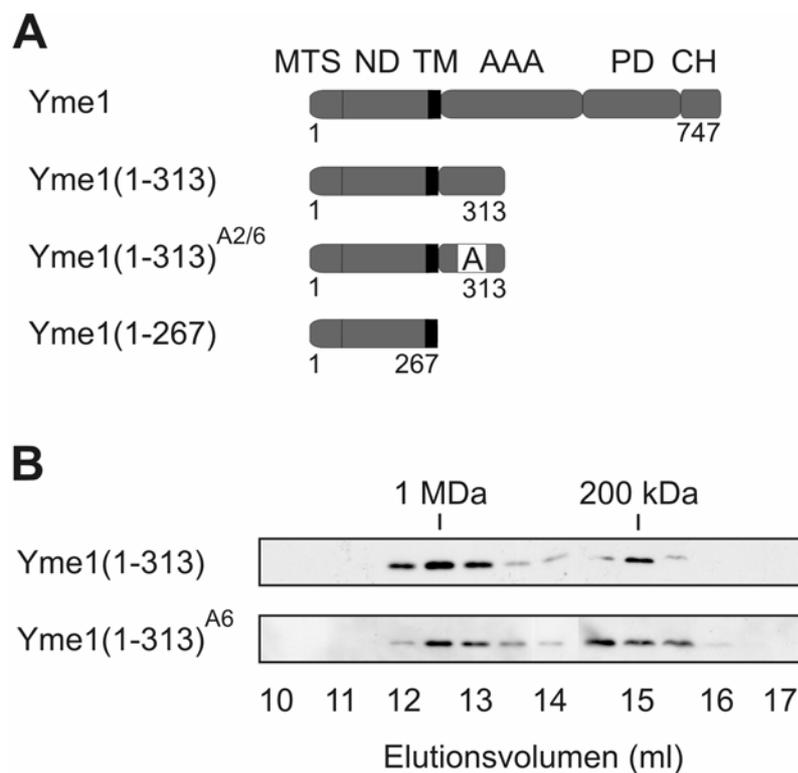


Abb. 15: Die Assemblierung von Yme1(1-313) wird durch die Substitution von negativ geladenen Aminosäureresten der NH-Region nicht verändert. (A) Schematische Darstellung der C-terminal trunkierten Yme1-Varianten. MTS: mitochondriale Sortierungssequenz; ND: N-terminale Domäne; TM: Transmembrandomäne; AAA: AAA-Domäne; PD: proteolytische Domäne; CH: C-terminale Helices; A: A2/A6. **(B)** Lysate von isolierten Mitochondrien, die Yme1(1-313) oder Yme1(1-313)^{A6} exprimierten, wurden, wie unter Abbildung 13 beschrieben, durch Superose-6-Gelfiltration analysiert.

E292A, E294A, E295A, D298A (Yme1(1-313)^{A6}) eingeführt (Abb. 15A). Die verschiedenen C-terminal verkürzten Yme1-Varianten wurden dann in einem $\Delta yme1$ -Hefestamm exprimiert. Wie in Abbildung 15B dargestellt, konnte mittels Gelfiltration von mitochondrialen Lysaten festgestellt werden, dass diese Mutationen das Assemblierungsverhalten der verkürzten Form Yme1(1-313) qualitativ nicht veränderten. Es ist demnach möglich, die relativen Substrataffinitäten dieser beiden Versionen zu vergleichen. Hierzu wurden erneut radioaktiv markierte mitochondriale Translationsprodukte hergestellt oder *in vitro* synthetisiertes Phb1 in isolierte Mitochondrien importiert, die die entsprechenden Yme1-Varianten exprimierten. Nach milder Solubilisierung mitochondrialer Membranproteine mit Digitonin-haltigem Puffer wurde die Substratbindung der Yme1-Varianten in Koimmunfällungsexperimenten untersucht.

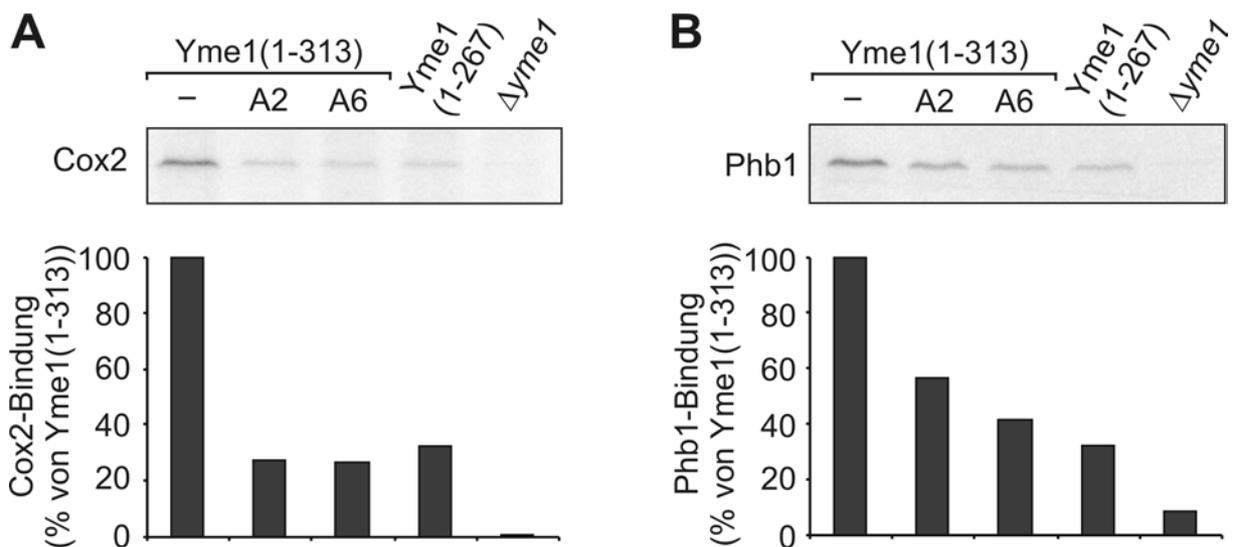


Abb. 16: Die Substitution von negativ geladenen Aminosäureresten erniedrigt die Substrataffinität der NH-Region von Yme1. Die Substratbindung von C-terminal verkürzten Yme1-Varianten wurde in Koimmunfällungsexperimenten untersucht. Die radioaktiv markierten Substratproteine Cox2 und Phb1 wurden in Mitochondrien synthetisiert bzw. importiert, die Yme1(1-313), Yme1(1-313)^{A2}, Yme1(1-313)^{A6}, Yme1(1-267) oder kein Yme1 ($\Delta yme1$) exprimierten. Nach Solubilisierung wurden die Proben mit α -Yme1-Antikörpern inkubiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die Menge an gefälltem Substratprotein über Phosphoreszenzanalyse quantifiziert. Die Fällungseffizienzen mit Yme1(1-313) wurden als 100% gesetzt. **(A)** Bindung von neu synthetisiertem Cox2. **(B)** Bindung von importiertem Phb1.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 16A und B dargestellt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Leonhard *et al.* (1999), konnte ein wichtiger Beitrag der NH-Region auch für die Bindung von Cox2 und Phb1 beobachtet werden. Die Fällungseffizienz war ohne die NH-Region in Yme1(1-267) für beide Substrate um etwa 70% verringert (Abb. 16A und B). Interessanterweise konnte auch für die Varianten Yme1(1-313)^{A2} und Yme1(1-313)^{A6} für Cox2 und für Phb1 eine deutliche Reduktion der Fällungseffizienz beobachtet werden (Abb. 16A und B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die eingeführten Mutationen die Substrataffinität der NH-Region fast vollständig eliminieren. Der Verlust der *in vivo*- und proteolytischen Aktivität der NH-Region-Mutanten Yme1^{A2} und Yme1^{A6} lässt sich somit durch eine gestörte, essentielle Bindung an die NH-Region von Yme1 erklären.

3.2.4. Mutationen in der NH-Region führen zur Substratakkumulation an Yme1

Die Mutationen in Yme1^{A2} und Yme1^{A6} erniedrigen die Substrataffinität der NH-Region. Sollte die NH-Region die alleinige initiale Substratbinderegion in Yme1 darstellen, ist auch im Volllängenprotein ein Substratbindungsdefekt zu erwarten. Um dies zu überprüfen, wurde die Substratbindung von Yme1^{A2} und Yme1^{A6} mit den Substraten Cox2 und Phb1 in Koimmunfällungsexperimenten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Yme1^{A2} als auch Yme1^{A6} die gleichen Cox2-Fällungseffizienzen aufwiesen wie Yme1 (Abb. 17A). Im Falle von Phb1 konnten mit Yme1 keine signifikanten Mengen an Substrat gefällt werden (Abb. 17B). Dies ist vermutlich wie bei Yta10(1-161)-DHFR^{mut} auf einen schnellen Umsatz des Substratproteins nach der Bindung an die Protease zurückzuführen. Dementsprechend konnte mit proteolytisch inaktivem Yme1^{E541Q} Phb1 effizient gefällt werden (Abb. 17B). Yme1^{A6} zeigte im Vergleich zu Yme1^{E541Q} zwar eine erniedrigte Fällungseffizienz, es erlaubte aber die Akkumulation von signifikanten Mengen von Phb1 im Vergleich zu Yme1. Demnach führt die Erniedrigung der Substrataffinität der NH-Region im Kontext des Volllängenproteins nicht zu einem vollständigen Verlust der Substratbindung an Yme1. Zwar spielt die Substratbindung an die NH-Region für die *in vivo*- und proteolytische Aktivität offenbar eine wichtige Rolle, aber sie stellt zumindest nicht die alleinige initiale Substratbinderegion innerhalb der *i*-AAA-Protease Yme1 dar.

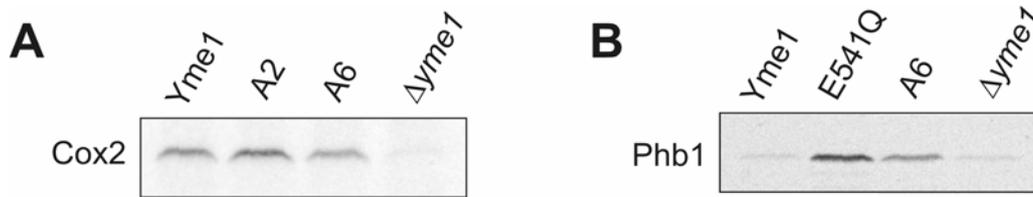


Abb. 17: Eine mutierte NH-Region erlaubt die Bindung von Substratproteinen an Yme1. Die Substratbindung von Cox2 und Phb1 an die verschiedenen Yme1-Varianten wurde in Koimmunfällungsexperimenten untersucht. Hierzu wurden isolierte Mitochondrien, die Yme1, Yme1^{A2} (A2), Yme1^{A6} (A6), Yme1^{E541Q} (E541Q) oder kein Yme1 ($\Delta yme1$) exprimierten, analysiert. Die Experimente wurden wie unter Abbildung 16 beschrieben durchgeführt.

3.3. Die CH-Region ist eine neue Substratbinderegion von Yme1

Einem weiteren Ansatz zur Identifizierung von Substratbinderegionen der *i*-AAA-Protease Yme1 wurde die folgende Beobachtung zugrunde gelegt. Die Expression des Yme1-Homologen IAP-1 aus *N. crassa* führt zu einer nur teilweisen Komplementation der verschiedenen Wachstumsphänotypen eines $\Delta yme1$ -Hefestammes (Abb. 18A) (Klanner *et al.*, 2001). Zwar ist die Expression von IAP-1 zur vollständigen Wiederherstellung des *petite*-positiv Phänotyps ausreichend, ein respiratorisches Wachstum ist aber unter diesen Bedingungen nicht möglich. Demnach weisen diese beiden AAA-Proteasen ungeachtet einer hohen Sequenzidentität (43%) und einer prinzipiellen Aktivität von IAP-1 in Hefe offenbar funktionelle Unterschiede auf. Möglicherweise ist dies auf Unterschiede in der Substrataffinität und damit der Substraterkennung zurückzuführen. Zur Identifizierung von Sequenzregionen, die solche funktionellen Unterschiede bewirken könnten, wurden systematisch verschiedene Hybridproteine aus Yme1 (S)- und IAP-1 (N)-Proteindomänen hergestellt, die in Abbildung 18B schematisch dargestellt sind. Nachfolgend wurden diese Hybridproteine auf ihre *in vivo*- und ihre proteolytische Aktivität sowie auf die Bindung bekannter Substratproteine von Yme1 untersucht.

3.3.1. *In vivo*-Aktivität der Yme1-IAP-1-Hybridproteine

Zur Analyse ihrer *in vivo*-Aktivität wurden die verschiedenen Yme1-IAP-1-Hybridproteine plasmidkodiert in einem $\Delta yme1$ -Hefestamm exprimiert. Die so hergestellten Hefestämme

wurden auf ihre Wachstumseigenschaften auf YP-Medien mit 2% (m/v) Glucose und 25 µg/ml Ethidiumbromid (YPD-EtBr) bei 30°C oder mit 3% (m/v) Glycerin (YPG) bei 37°C hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18C dargestellt. Die Hybridproteine mit der N-terminalen Domäne und der Transmembrandomäne von Yme1 (SNNN und SNNS) konnten kein verbessertes Wachstum auf YPG bei 37°C vermitteln. Ebenso zeigte das Hybridprotein SNNN keine *in vivo*-Aktivität auf YPD-EtBr. Interessanterweise führte die Anwesenheit der AAA-Domäne von Yme1 in den Hybriden SSNN und SSNS zu einer teilweisen Komplementation des Wachstumsphänotypen unter respiratorischen Bedingungen und zu einem fast wildtypischen Wachstum auf YPD-EtBr (Abb. 18C). Zusätzlich zeigten die beiden Hybridproteine (SNNS und SSNS), die konservierte C-terminale Helices (CH-Region) von Yme1 trugen, ein leicht verbessertes Wachstum auf YPD-EtBr gegenüber den

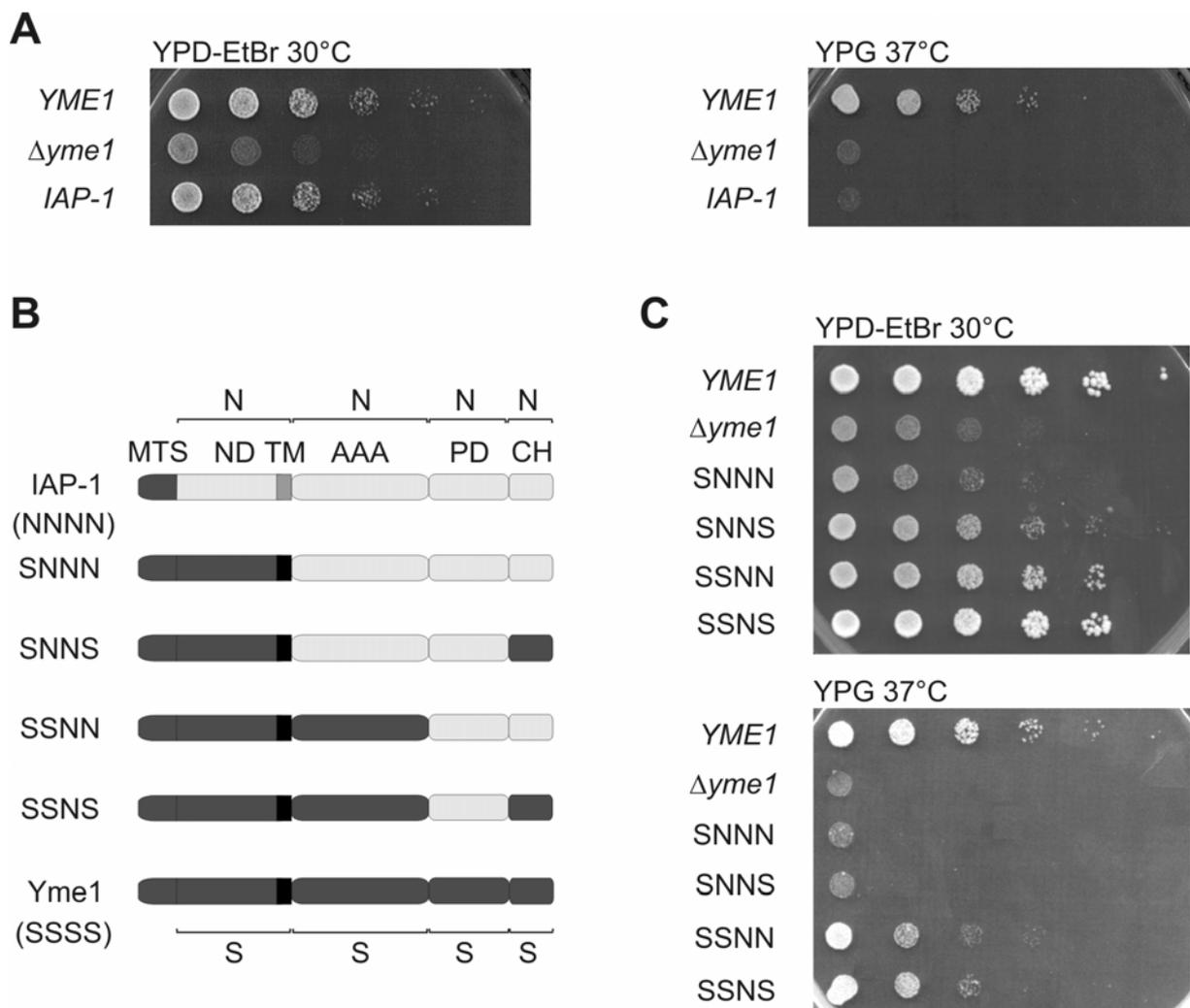


Abb. 18: Legende siehe nächste Seite.

Abb. 18: In vivo-Aktivität des Yme1-Homologen IAP-1 und der Yme1-IAP-1-Hybridproteine.

(A) *In vivo*-Aktivität des Yme1-Homologen IAP-1 aus *N. crassa* in einem $\Delta yme1$ -Hefestamm. **(B)** Schematische Darstellung von IAP-1, Yme1-IAP-1-Hybridproteinen und Yme1. Aus Yme1 stammende Domänen sind dunkelgrau (S), aus IAP-1 stammende Domänen hellgrau (N) markiert. Der Hybridname stellt die Zusammensetzung der vier Domänen, die ober- und unterhalb der schematischen Darstellung angedeutet sind, dar. MTS: mitochondriale Sortierungssequenz; ND: N-terminale Domäne; TM: Transmembrandomäne; AAA: AAA-Domäne; PD: proteolytische Domäne; CH: C-terminale Helices. **(C)** *In vivo*-Aktivität der Yme1-IAP-1-Hybridproteine in einem $\Delta yme1$ -Hefestamm. (A) und (C) Reihen von Fünffach-Verdünnungen der $\Delta yme1$ -Hefestämme, die *YME1*, *IAP-1* oder eines der angegebenen Hybride exprimierten, wurden auf YP-Medium mit 2% (m/v) Glucose und 25 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid (YPD-EtBr) oder mit 3% (m/v) Glycerin (YPG) aufgetragen und bei den angegebenen Temperaturen für drei bis vier Tage inkubiert.

jeweiligen Varianten (SNNN und SSNN) mit der CH-Region von IAP-1 (Abb. 18C).

Somit scheinen die funktionellen Unterschiede von Yme1 und IAP-1 zumindest in Teilen in Sequenzunterschieden in den AAA-Domänen beider Proteasen begründet zu sein. Augenscheinlich kann die CH-Region zu diesen Unterschieden unter bestimmten Bedingungen beitragen.

3.3.2. Die Assemblierung der Yme1-IAP-1-Hybridproteine

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Wachstumseigenschaften auf ein unterschiedliches Assemblierungsverhalten der verschiedenen Yme1-IAP-1-Hybridproteine in einen *i*-AAA-Proteasekomplex zurückzuführen sind, wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden isolierte Mitochondrien, die die entsprechenden Yme1-Varianten exprimierten, in TritonX-100-haltigem Puffer solubilisiert und das lösliche Material über Superose-6-Säulen gelchromatographisch aufgetrennt. Die immunochemische Analyse der fraktionierten Eluate ist in Abbildung 19 wiedergegeben. Yme1 war hier Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes von etwa 1 MDa (Abb. 19) (Leonhard *et al.*, 1996). In ähnlicher Weise formte IAP-1 einen Komplex gleicher Größe, allerdings ließ sich hier zusätzlich eine niedermolekulare Population (< 200 kDa) von IAP-1 Proteinen nachweisen (Abb. 19). Dies ist wahrscheinlich auf eine reduzierte Stabilität des IAP-1-Komplexes unter diesen Bedingungen zurückzuführen, wie anhand der Komplexanalyse von IAP-1 in *N. crassa*-Mitochondrien gezeigt werden konnte (Klanner *et al.*, 2001). Die Deletion der oben angeführten C-terminalen Helices (CH-Region) innerhalb der proteolytischen Domäne von Yme1 führte zu

einem drastischen Assemblierungsdefekt (Abb. 19). Der überwiegende Teil dieses verkürzten Proteins Yme1(1-652) (Δ CH) eluierte in Fraktionen, die einer molekularen Größe von etwa 200 kDa entsprachen. Die Anwesenheit einer CH-Region ist offenbar für die Assemblierung der *i*-AAA-Protease essentiell. Im Gegensatz dazu konnte für alle untersuchten Yme1-IAP-1-Hybridproteine ausschließlich ein hochmolekularer Komplex von 1 MDa nachgewiesen werden (Abb. 19). Die Hybridproteine weisen somit ein von Yme1 nicht zu unterscheidendes Assemblierungsverhalten auf. Demnach kann die CH-Region aus IAP-1 die Assemblierung der entsprechenden Hybridproteine vermitteln.

Diese Ergebnisse belegen, dass eine gestörte Komplexbildung für die beobachteten Wachstumsunterschiede nicht ursächlich sein kann.

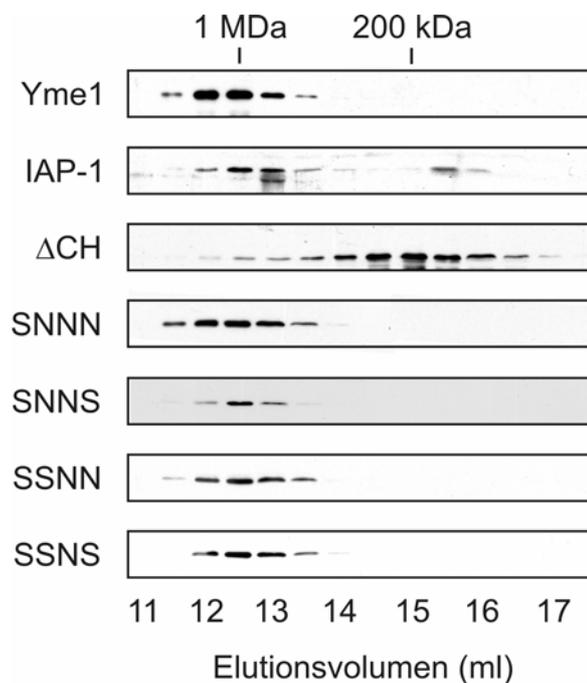


Abb. 19: Die Yme1-IAP-1-Hybridproteine assemblieren in einen hochmolekularen *i*-AAA-Protease-Komplex. Isolierte Mitochondrien (600 μ g), die Yme1, IAP-1, Yme1(1-652) (Δ CH) oder die entsprechenden Yme1-IAP-1-Hybridproteine exprimierten, wurden in 0,4% (m/v) TritonX-100-haltigem Puffer (5 mg/ml mitochondriales Protein) solubilisiert. Die lösliche Fraktion wurde nach Zentrifugation durch Superose-6-Säulen gelchromatographisch aufgetrennt. Die fraktionierten Eluate wurden nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulosemembranen mit α -Yme1- bzw. α -IAP-1-Antikörpern immunochemisch analysiert. Die Größen der Komplexe wurden anhand der molekularen Größenstandards Thyroglobulin (670 kDa), Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa) und Rinderserumalbumin (66 kDa) abgeleitet.

3.3.3. Die proteolytische Aktivität der Yme1-IAP-1-Hybridproteine

Die geschilderten Ergebnisse deuten darauf hin, dass einige Yme1-IAP-1-Hybridproteine proteolytische Aktivität besitzen. Um diese vermutete Aktivität direkt zu messen, wurde die Stabilität von bekannten Substratproteinen von Yme1 in der Gegenwart der verschiedenen Hybridproteine untersucht. Zunächst wurde die proteolytische Aktivität gegenüber dem Substratprotein Cox2 in isolierten Mitochondrien analysiert. Wie in Abbildung 20A dargestellt, führte die Anwesenheit von IAP-1 in $\Delta yme1$ -Mitochondrien nicht zu einem signifikanten Abbau von neu synthetisiertem Cox2. Im Gegensatz dazu ließ sich ein schneller Yme1-abhängiger Abbau in Wildtyp-Mitochondrien (Yme1) beobachten. Für die beiden Hybridproteine SSNN und SSNS konnte eine signifikante proteolytische Aktivität festgestellt werden (Abb. 20A). In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die *in vivo*-Aktivität auf YPG-Medium bei 37°C zeigten beide Varianten im Vergleich zu Yme1 und $\Delta yme1$ eine intermediäre Aktivität. Für die Hybridproteine SNNN und SNNS konnte kein Abbau von Cox2 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse unterstützen damit die postulierten funktionellen Unterschiede in der AAA-Domäne der beiden AAA-Proteasen.

Des Weiteren wurde die Stabilität von importiertem Phb1 in isolierten Mitochondrien in Gegenwart der verschiedenen Protease-Varianten untersucht. Auch in diesem Falle konnte IAP-1 nicht die Aktivität von Yme1 ersetzen (Abb. 20B). Interessanterweise ließen sich für die beiden Hybridproteine SSNN und SSNS unterschiedliche Aktivitäten für den Abbau von Phb1 feststellen (Abb. 20B). Während SSNS einen von Yme1 nicht zu unterscheidenden Abbau von Phb1 vermitteln konnte, zeigte SSNN keine signifikante Aktivität (Abb. 20B). Auch die Hybridproteine SNNN und SNNS zeigten gegenüber Phb1 keine messbare Aktivität (Daten nicht gezeigt). Offenbar können neben funktionellen Unterschieden innerhalb der AAA-Domänen auch die CH-Regionen der Proteasen den Substratabbau spezifisch beeinflussen. Als drittes Substratprotein wurde das integrale Membranprotein Nde1 der inneren Mitochondrienmembran untersucht. Die C-terminale Markierung des Proteins mit einem Hämagglutinin (Ha)-Epitop führt zu einem Yme1-abhängigen Abbau und infolge dessen zu einem reduzierten Gleichgewichtsniveau des Proteins (Augustin *et al.*, 2005). Entsprechend kann das Gleichgewichtsniveau von Nde1-Ha als Maß für die proteolytische Aktivität der Protease-Varianten dienen. Die Hybridproteine SSNN und SSNS sowie Yme1 wurden plasmidkodiert in einem $\Delta yme1$ -Hefestamm, der eine genomisch markierte Nde1-Ha-Version trug, exprimiert. Nach einer differentiellen Zellfraktionierung wurden die Nde1-Ha-

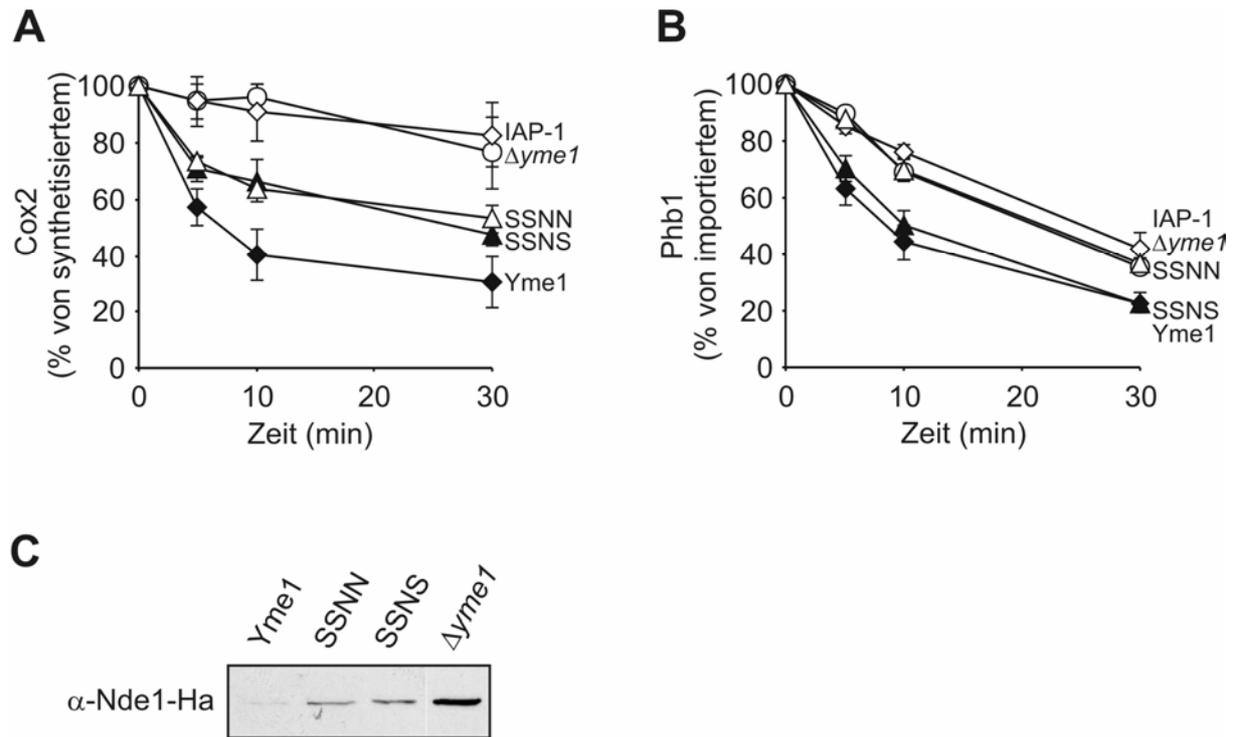


Abb. 20: Substratspezifischer Einfluss der CH-Region auf den Abbau von Substratproteinen.

(A) Stabilität von neu synthetisiertem Cox2. Mitochondriale Translationsprodukte wurden in der Gegenwart von ^{35}S -Methionin für 10 min bei 30°C in isolierten Mitochondrien, die kein Yme1 ($\Delta yme1$, \circ), Yme1 (\blacklozenge), IAP-1 (\blacklozenge), oder die beiden Hybridproteine SSNN (\triangle) und SSNS (\blacktriangle) exprimierten, synthetisiert. Nach Abstoppen der Translationsreaktion wurde die Stabilität von Cox2 bei 37°C mittels SDS-PAGE und Phosphoreszenzanalyse verfolgt. (B) Stabilität von importiertem Phb1. Radioaktiv markiertes Phb1 wurde in isolierte Mitochondrien für 20 min bei 25°C importiert, die wie unter (A) beschrieben verschiedene Protease-Varianten exprimierten. Die Stabilität von importiertem Phb1 wurde bei 37°C mittels SDS-PAGE und Phosphoreszenzanalyse verfolgt. (C) Gleichgewichtskonzentration von Nde1-Ha. Membranfraktionen wurden nach differentieller Zellfraktionierung von $\Delta yme1$ -Hefestämmen, die eine genomische Nde1-Variante mit C-terminalem Hämagglutinin (Ha)-Epitop sowie Yme1 oder die beiden Hybridproteine SSNN und SSNS exprimierten, durch SDS-PAGE und nachfolgender immunochemischer Analyse mit α -Ha-Antikörpern analysiert.

Gleichgewichtskonzentrationen in den Membranfraktionen der verschiedenen Hefestämme immunochemisch bestimmt (Abb. 20C). Übereinstimmend mit einem Yme1-abhängigen Abbau war die Gleichgewichtskonzentration von Nde1-Ha in Gegenwart von Yme1 deutlich reduziert (Abb. 20C). Die Expression der Hybridproteine SSNN und SSNS führte ebenfalls zu einer signifikanten Erniedrigung der Nde1-Ha-Konzentration, allerdings gegenüber Yme1 in einem reduzierten Maße (Abb. 20C).

Die Analyse der proteolytischen Aktivität von IAP-1 und den Yme1-IAP-1-Hybridproteinen ergibt somit einige interessante Schlussfolgerungen. Obwohl eine prinzipielle Aktivität von

IAP-1 durch das Wachstum ohne mitochondriale DNA impliziert wird und eine Assemblierung im heterologen System nachgewiesen wurde, konnte keine signifikante proteolytische Aktivität gegenüber den bekannten Yme1-Substraten Cox2 und Phb1 festgestellt werden. Die Untersuchung der proteolytischen Aktivität der hergestellten Yme1-IAP-1-Hybridproteine legt nahe, dass die funktionellen Unterschiede der beiden AAA-Proteasen zumindest teilweise in den AAA-Domänen begründet liegen. Darüber hinaus zeigte sich ein interessanter substratspezifischer Einfluss der konservierten C-terminalen Helices innerhalb der proteolytischen Domänen (CH-Region) der Proteasen. Obwohl der Abbau von Cox2 und Nde1-Ha nicht durch die verschiedenen CH-Regionen beeinflusst wurde, war der Abbau von Phb1 strikt von der Anwesenheit der CH-Region von Yme1 abhängig.

3.3.4. CH-spezifische Substratinteraktion der Yme1-IAP-1-Hybridproteine

Worauf sind die funktionellen Unterschiede der beiden AAA-Proteasen und ein substratspezifischer Einfluss der CH-Regionen zurückzuführen? Eine Möglichkeit stellt eine unterschiedliche Substrataffinität bzw. Substraterkennung dar. Um einen möglichen Einfluss der verschiedenen Domänen von Yme1 und IAP-1 auf die Substratbindung zu untersuchen, wurden Koimmunfällungen von den Substratproteinen Cox2 und Phb1 mit den entsprechenden Hybridproteinen durchgeführt.

Für die Interaktionsexperimente mit Cox2 wurden mitochondrial kodierte Proteine in Gegenwart von ^{35}S -Methionin in isolierten Mitochondrien, die kein Yme1 ($\Delta yme1$), Yme1 oder eines der Hybridproteine exprimierten, radioaktiv markiert. Um einen Einfluss von möglicherweise unterschiedlichen ATPase-Aktivitäten der einzelnen Hybridproteine auf die Substratbindung zu minimieren, wurden die Proben nach der Translation für 10 min bei 37°C inkubiert. Wie in Kapitel 3.1.5. gezeigt, kann dies den Cox2-Bindungsdefekt von ATPase-defizienten Yme1-Varianten fast vollständig reduzieren. Nach Solubilisierung mit Digitonin-haltigem Puffer wurden die löslichen Fraktionen mit α -Yme1-Antikörpern inkubiert, die eine in allen Proteinen vorhandene N-terminale Domäne von Yme1 erkennen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21A dargestellt. Erneut konnte Cox2 mit Yme1 gefällt werden (Abb. 21A). Im Gegensatz dazu konnten nach der Fällung der Hybridproteine SNNN und SSNN keine über Hintergrundniveau ($\Delta yme1$) liegenden Cox2-Signale nachgewiesen werden. Allerdings führte

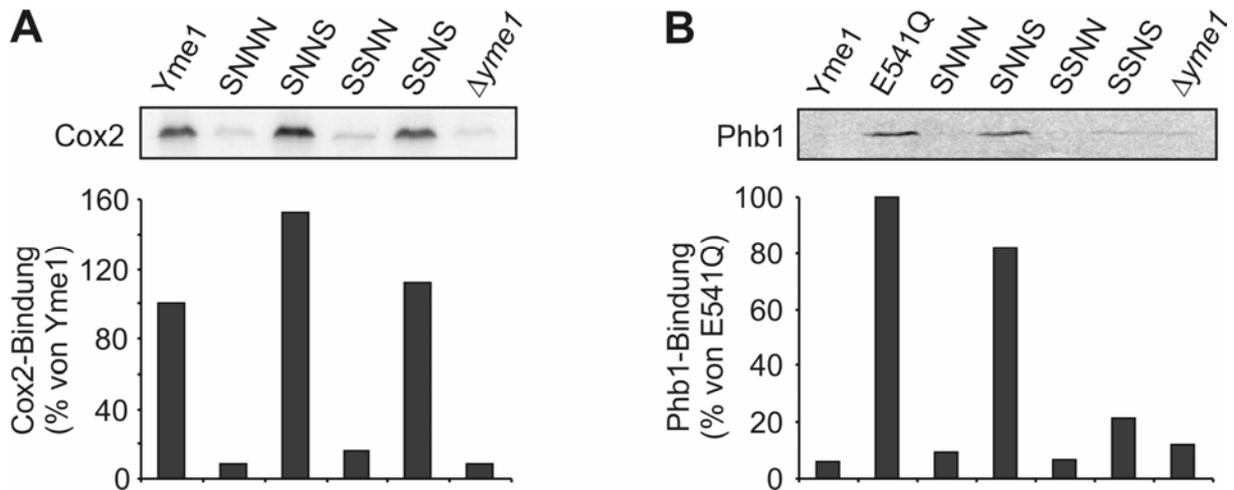


Abb. 21: Die CH-Region von Yme1 vermittelt eine effiziente Substratbindung an die *i*-AAA-Protease. (A, B) Untersuchung der Yme1-IAP-1-Hybridproteine auf die Bindung von Substratproteinen. Mitochondriale Translationsprodukte wurden in isolierten Mitochondrien, die kein Yme1 ($\Delta yme1$), Yme1, Yme1^{E541Q} (E541Q) oder eines der Yme1-IAP-1-Hybridproteine exprimierten, in Gegenwart von ³⁵S-Methionin für 10 min bei 30°C synthetisiert bzw. radioaktiv markiertes Phb1 bei 25°C für 20 min importiert. Die Proben wurden anschließend für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Koimmunfällungen wurden mit α -Yme1-Antikörpern, die gegen die N-terminale Domäne von Yme1 gerichtet waren, durchgeführt. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE und Phosphoreszenzanalyse untersucht. (A) Substratbindung von neu synthetisiertem Cox2. (B) Substratbindung von importiertem Phb1. Die Menge an gefälltem Cox2 mit Yme1 bzw. an gefälltem Phb1 mit Yme1^{E541Q} (E541Q) wurde als 100% gesetzt.

die Anwesenheit der CH-Region von Yme1 in den Hybridproteinen SNNS und SSNS zu einer mit Yme1 vergleichbaren Fällungseffizienz von Cox2 (Abb. 21A). Das heißt, die CH-Region von Yme1 ist für eine effiziente Fällung des Substratproteins Cox2 mit der Protease notwendig, obwohl sich die Kinetik des Cox2-Abbaus für die beiden Hybridproteine SSNN und SSNS nicht unterschied (vgl. Abb. 20A).

Zur Analyse der Phb1-Interaktion mit den verschiedenen Yme1-Varianten wurde radioaktiv markiertes Phb1 in isolierte Mitochondrien importiert und wie oben beschrieben durch Koimmunfällungen analysiert. Wie in vorangegangenen Experimenten wurde die Phb1-Bindung zusätzlich mit proteolytisch inaktivem Yme1^{E541Q} untersucht. Wie der Vergleich von Yme1 und der proteolytisch inaktiven Mutante Yme1^{E541Q} zeigte, konnte Phb1 nur im Falle einer gestörten proteolytischen Aktivität mit der Protease gefällt werden (Abb. 21B). Für die beiden proteolytisch inaktiven Hybridproteine SNNN und SNNS wurden deutlich unterschiedliche Affinitäten für Phb1 festgestellt (Abb. 21B). Im Gegensatz zu SNNN konnte die Einführung der CH-Region von Yme1 (SNNS) eine Phb1-Fällung vermitteln, die der für

Yme1^{E541Q} beobachteten entsprach. Demnach scheint die Phb1-Bindung an Yme1 strikt von der CH-Region abhängig zu sein. Konsistent mit dieser Schlussfolgerung konnte mit der gegenüber Phb1 ebenfalls proteolytisch inaktiven SSNN-Variante keine signifikante Menge an Phb1 gefällt werden (Abb. 21B). Eine fehlende Fällung von Phb1 mit dem Hybridprotein SSNS lässt sich wahrscheinlich auf einen Abbau von gebundenem Phb1 zurückführen (Abb. 21B).

Die Analyse der Substratinteraktion der Yme1-IAP-1-Hybridproteine belegt somit eine wichtige Rolle der C-terminalen Helices (CH-Region) der proteolytischen Domäne von Yme1 für die effiziente Bindung von Substratproteinen. Diese Ergebnisse liefern folglich eine Erklärung für den CH-abhängigen Abbau von Phb1. Wahrscheinlich ist eine CH-abhängige Bindung von Phb1 an die Protease für einen effizienten Abbau von Phb1 notwendig. Andererseits scheint eine von der CH-Region vermittelte Bindung von Substratproteinen nicht in jedem Fall den Substratabbau zu beeinflussen. Obwohl Cox2 in CH-unabhängiger Weise abgebaut wird, ist dessen Akkumulation an der Protease nur in Anwesenheit der Yme1-CH-Region zu beobachten.

3.3.5. Direkte Substratinteraktion der CH-Region

Der bisher als CH-Region bezeichnete Sequenzbereich umfasst die Aminosäurereste 604-748 von Yme1. Um die für eine spezifische Bindung notwendige Region weiter einzugrenzen, sollten die Substratbindungseigenschaften von Hybridproteinen untersucht werden, die entsprechend kleinere Bereiche dieser Yme1-Regionen beinhalten. Wie in Abbildung 22A dargestellt, wurde die CH-Region von Yme1 auf Aminosäure 662-748 (SNNS1) bzw. 662-712 (SNNS2) eingegrenzt. Die Cox2-Bindungseigenschaften dieser Hybridproteine wurden in Koimmunfällungsexperimenten untersucht. Wie im oberen Abschnitt der Abbildung 22B dargestellt, wiesen beide Hybridproteine eine mit Yme1 vergleichbare Cox2-Bindungseffizienz auf. Demnach sind offenbar Sequenzunterschiede in der Region von Aminosäurerest 662-712 in Yme1 für die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von Yme1 und IAP-1 verantwortlich. Um diese Schlussfolgerung zu überprüfen, sollten die Bindungseigenschaften eines Hybridproteins untersucht werden, das sich nur in der oben ermittelten minimalen CH-Region von Yme1 unterscheidet. Entsprechend wurde diese Region in Yme1 durch die homologe IAP-1 Region (637-678 As) ersetzt (SSSN1; Abb. 22A).

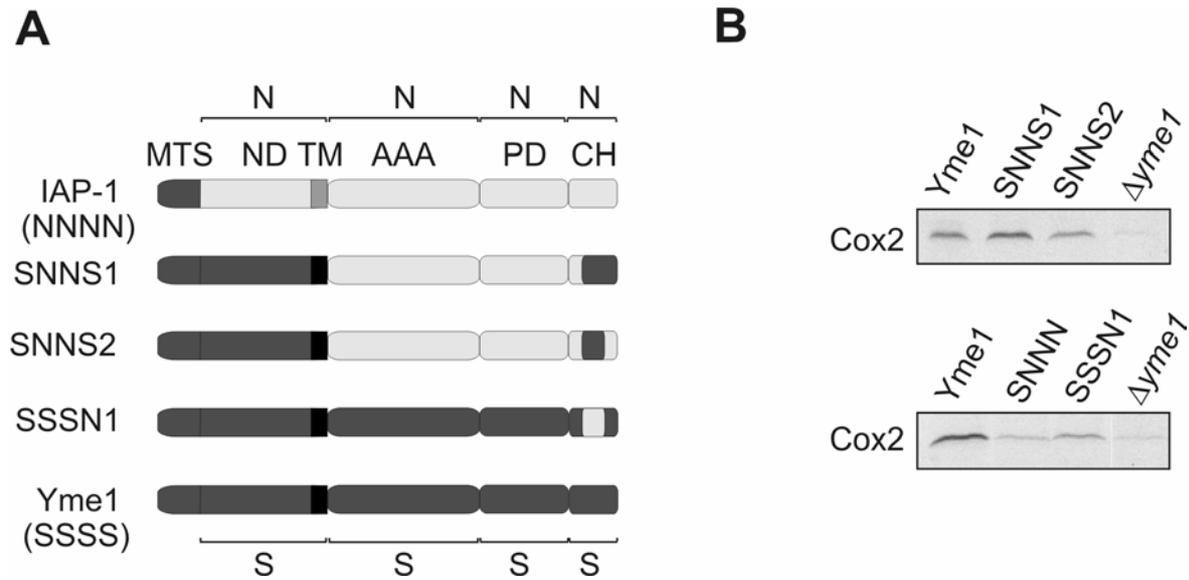


Abb. 22: Identifizierung einer minimalen CH-Region für die Substratbindung. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Yme1-IAP-1-Hybridproteine. Aus Yme1 stammende Domänen bzw. Sequenzabschnitte sind dunkelgrau (S), die aus IAP-1 stammenden hellgrau (N) markiert. MTS: mitochondriale Sortierungssequenz; ND: N-terminale Domäne; TM: Transmembrandomäne; AAA: AAA-Domäne; PD: proteolytische Domäne; CH: C-terminale Helices. (B) Cox2-Bindung der Yme1-IAP-1-Hybridproteine aus (A). Die Versuche wurden wie unter Abb. 21A beschrieben durchgeführt.

Dieses Hybridprotein SSSN1 zeigte im Vergleich zu Yme1 eine drastische Reduzierung von gebundenem Cox2 in Koimmunfällungsexperimenten (Abb. 22B, untere Teilabbildung). Ein Vergleich mit dem Hybridprotein SNNN zeigte, dass der Austausch der CH-Region ausreichend war, um die Cox2-Bindung an Yme1 fast auf das Niveau der IAP-1-Intermembranraumdomänen zu erniedrigen (Abb. 22B, untere Teilabbildung).

Die bisher geschilderten Ergebnisse sind mit einer direkten Substratbindung der CH-Region innerhalb der AAA-Proteasen konsistent. Dennoch lassen sich Einflüsse der CH-Regionen auf die Struktur des jeweiligen Hybridproteines, die den beobachteten unterschiedlichen Bindungseigenschaften ursächlich zugrunde liegen könnten, prinzipiell nicht ausschließen. Um eine direkte Substratbindung an die jeweiligen CH-Regionen der AAA-Proteasen zu untersuchen, wurden daher die entsprechenden Sequenzen von Yme1 (Aminosäure 650-709) und IAP-1 (Aminosäure 625-684) als GST-Fusionsproteine und als Kontrolle GST in *E. coli* exprimiert und affinitätsgereinigt. Mitochondriale Translationsprodukte wurden in $\Delta yme1$ -Mitochondrien radioaktiv markiert bzw. radioaktiv markiertes Phb1 importiert. Nach Lyse

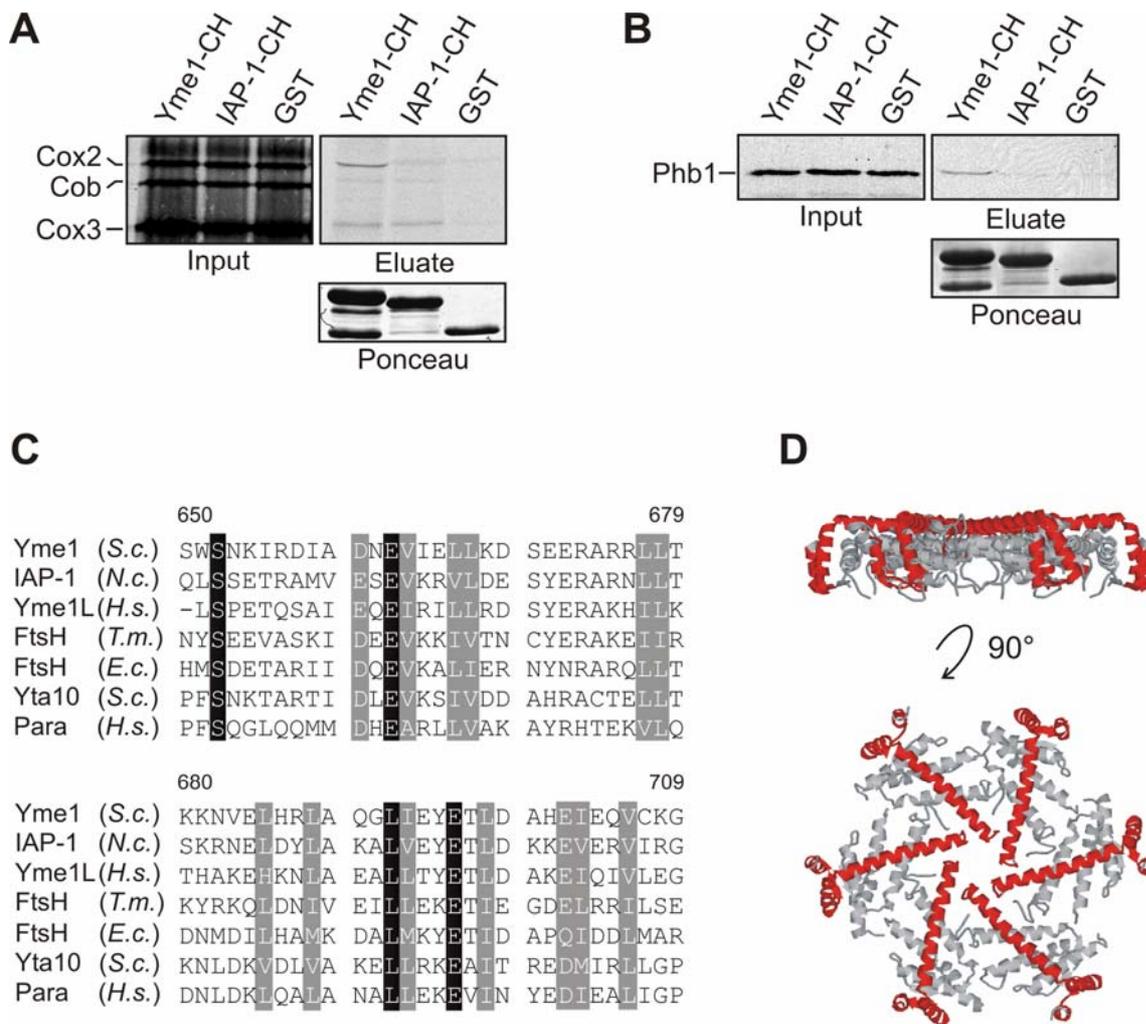


Abb. 23: Die oberflächenexponierte CH-Region von Yme1 interagiert mit hoher Spezifität direkt mit Substratproteinen. (A, B) Analyse der Substratbindung an GST-gekoppelten CH-Regionen von Yme1 und IAP-1 *in vitro*. Die CH-Regionen von Yme1 (Aminosäure 650-709) bzw. IAP-1 (Aminosäure 625-684) wurden als GST-Fusionsproteine, bzw. GST als Kontrolle, in *E. coli* exprimiert und zur Homogenität gereinigt. $\Delta yme1$ -Mitochondrien wurden nach der Translation mitochondrial kodierter Proteine in Gegenwart von ^{35}S -Methionin bzw. nach Import von radioaktiv markiertem Phb1 mit 2% (m/v) Digitonin-haltigem Puffer (0,5 mg/ml mitochondriales Protein für Cox2 bzw. 1 mg/ml für Phb1) lysiert. Die mitochondrialen Lysate (Input, 5%) wurden mit den Fusionsproteinen inkubiert, die an eine Glutathion-Sepharose-Matrix gebunden waren. Nach Waschen mit 0,2% (m/v) Digitonin-haltigem Puffer und steigenden Salzkonzentrationen (0,15-0,5 M KCl) wurden gebundene Proteine mit reduziertem Glutathion eluiert und mittels SDS-PAGE sowie Autoradiographie (Eluate) analysiert. Die Mengen der gebundenen GST-Fusionsproteine wurden über Ponceau Rot-Färbung (Ponceau) überprüft. (A) Bindung von neu synthetisiertem Cox2. (B) Bindung von importiertem Phb1. Diese Experimente wurden von Dr. G. Seewald durchgeführt. (C) Sequenzvergleich der CH-Regionen ausgewählter AAA-Proteasen. CH-Regionen von *S. cerevisiae* Yme1 (Aminosäure 650-709), *N. crassa* IAP-1 (Aminosäure 625-684), *H. sapiens* Yme1L (Aminosäure 652-710), *T. maritima* FtsH (Aminosäure 544-603), *E. coli* FtsH (Aminosäure 536-595), *S. cerevisiae* Yta10 (Aminosäure 672-731), *H. sapiens* Paraplegin (Aminosäure 690-749) wurden mittels ClustalW verglichen. Identische Aminosäurereste sind schwarz, homologe Reste grau markiert. (D) Oberflächenexposition der CH-

Region innerhalb der proteolytischen Domäne. Die CH-Region (Aminosäure 544-603 in *T. maritima*) ist in Seiten- bzw. Aufsicht der Kristallstruktur der proteolytischen Domäne von FtsH aus *T. maritima* rot markiert (Bieniossek *et al.*, 2006).

der Mitochondrien mit Digitonin-haltigem Puffer wurde die Interaktion der gereinigten Fusionsproteine mit Cox2 und Phb1 analysiert. Wie in Abbildung 23A gezeigt, konnte Cox2 in Anwesenheit des Yme1-CH-GST-Fusionsproteins im Vergleich zu den mitochondrialen Translationsprodukten Cob und Cox3 spezifisch angereichert werden. Darüber hinaus waren keine signifikanten Mengen an mit dem IAP-1-CH-GST-Fusionsprotein interagierendem Cox2 nachweisbar (Abb. 23A). Ein ähnliches Ergebnis konnte für die Interaktion der Fusionsproteine mit Phb1 ermittelt werden. Phb1 konnte im Vergleich zu IAP-1-CH-GST spezifisch mit Yme1-CH-GST präzipitiert werden (Abb. 23B). Diese *in vitro*-Experimente demonstrieren eine direkte Bindung von Substraten an die CH-Region von Yme1. Trotz einer hohen Sequenzidentität von 48% weisen die CH-Regionen von Yme1 und IAP-1 offenbar eine divergente Bindungsspezifität auf. Die Bestimmung der Kristallstruktur der verwandten AAA-Protease FtsH aus *T. maritima* erlaubte es, die strukturelle Lage der ermittelten substratbindenden CH-Region innerhalb der proteolytischen Domäne zu untersuchen (Bieniossek *et al.*, 2006). Die durch einen Sequenzvergleich (Abb. 23C) ermittelte homologe CH-Region in FtsH ist in Abbildung 23D rot markiert. Die CH-Region ist innerhalb der Kristallstruktur an der apikalen und lateralen Oberfläche der proteolytischen Domäne exponiert und damit ideal für eine initiale Substratinteraktion positioniert (Abb. 23D). Somit konnte die CH-Region als neue Substratbinderegion der *i*-AAA-Protease Yme1 identifiziert werden. Sie ist für eine effiziente Bindung von Substratproteinen an die Protease notwendig und weist offenbar eine hohe Spezifität auf. Trotzdem scheint die Funktion der CH-Region nicht für den Abbau aller Substratproteine obligatorisch zu sein.

3.3.6. Substrate mit geringer Faltungstabilität werden CH-spezifisch abgebaut

Am Beispiel der untersuchten Substratproteine Cox2 und Phb1 zeigt sich, dass trotz einer in beiden Fällen CH-abhängigen Bindung an die Protease der Abbauprozess nicht zwangsläufig auf die Bindungsfunktion der CH-Region angewiesen ist. Entsprechend stellt sich die Frage, durch welche Eigenschaften der Substratproteine bestimmt wird, ob Substrate während des Abbaus an die CH-Region binden müssen. Wie bereits erwähnt, wird die Biogenese von Cox2 durch das Chaperon Cox20 maßgeblich beeinflusst (Hell *et al.*, 2000). Cox20 bindet an neu synthetisiertes Cox2 nach der Insertion in die innere Mitochondrienmembran (Hell *et al.*, 2000). Es vermittelt die Prozessierung von Cox2 durch Imp1 in die reife Form (Abb. 24A) und wahrscheinlich die Faltung und Assemblierung von Cox2 in den Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplex (Hell *et al.*, 2000). Entsprechend könnte Cox20 gebundenes Cox2 in einer Konformation halten, die nicht von der CH-Region, wohl aber von anderen Substratbindestellen in Yme1 erkannt wird. Dies würde zu einem CH-unabhängigen Abbauprozess führen.

Um einen möglichen Einfluss von Cox20 auf den Abbauprozess von Cox2 durch Yme1 zu bestimmen, wurden Yme1 oder die beiden Hybridproteine SSNN und SSNS in einem $\Delta yme1 \Delta cox20$ -Hefestamm exprimiert. Nachfolgend wurde die Stabilität von radioaktiv markiertem Cox2 in isolierten Mitochondrien wie zuvor beschrieben verfolgt. Wie in Abbildung 24B dargestellt, wurde Cox2 auch in der Abwesenheit von Cox20 Yme1-abhängig abgebaut. Allerdings zeigte sich die Proteolyse in diesem Fall im Vergleich zu wildtypischen Mitochondrien verlangsamt. Vermutlich ist dies auf einen generellen Effekt der *COX20*-Deletion auf die Atmungskettenbiogenese und damit auf den Energiehaushalt der Mitochondrien zurückzuführen. Denn auch der Abbau von anderen mitochondrial kodierten Atmungskettenuntereinheiten, wie Cox3, das in einem *m*-AAA-Protease-abhängigen Prozess abgebaut wird, zeigte sich verlangsamt (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnte hier im Gegensatz zu wildtypischen Mitochondrien beobachtet werden, dass in Abwesenheit von Cox20 Cox2 nur von SSNS aber nicht durch SSNN abgebaut wurde (Abb. 24B). Das heißt, der Abbau von Cox2 wird unter diesen Bedingungen von der CH-Region von Yme1 vermittelt. Übereinstimmend mit den oben angestellten Überlegungen führt die Funktion von Cox20 offenbar zu einem CH-unabhängigen Abbauprozess von Cox2.

Die postulierte Chaperonfunktion von Cox20 während der Biogenese legt einen Einfluss auf den Faltungszustand von Cox2 nahe. Um zu bestimmen, ob sich der Faltungszustand von

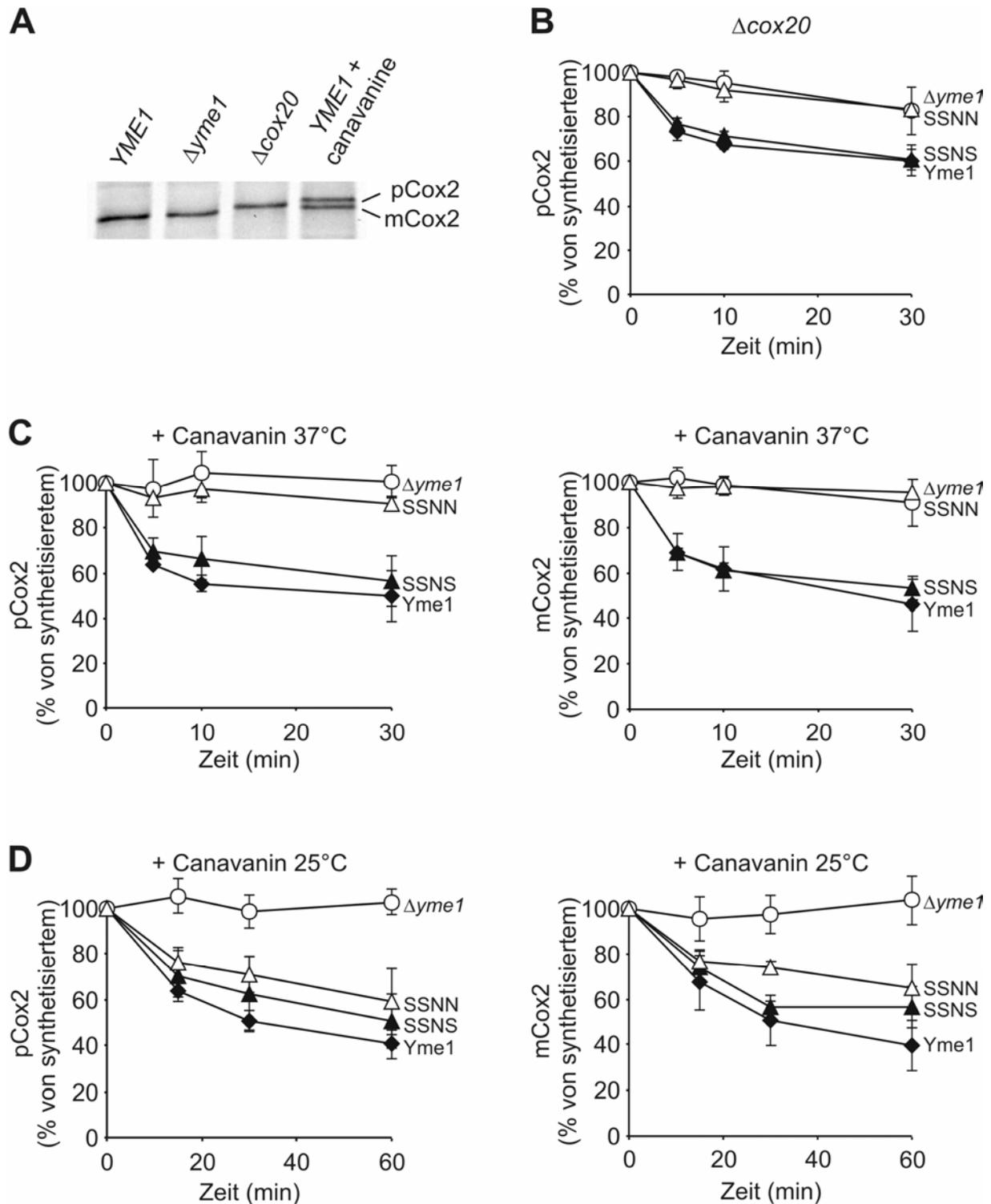


Abb. 24: Der Faltungszustand von Cox2 bestimmt die CH-Abhängigkeit des Abbauprozesses.

(A) Prozessierung von neu synthetisiertem Cox2. Die Prozessierung von Cox2 wurde nach Synthese mitochondrial kodierter Proteine in Gegenwart von ^{35}S -Methionin und, wenn angegeben, von 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Canavanin in isolierten wildtypischen (*YME1*), $\Delta\text{yme}1$ - oder $\Delta\text{cox}20$ -Mitochondrien durch SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht. pCox2: Vorläuferform von Cox2; mCox2: reife Form von Cox2. (B) CH-abhängiger Abbau von Cox2 in $\Delta\text{cox}20$ -Mitochondrien bei 37°C. Mitochondriale Translationsprodukte wurden in Gegenwart von ^{35}S -Methionin in $\Delta\text{yme}1\Delta\text{cox}20$ -Mitochondrien, die kein Yme1 ($\Delta\text{yme}1$, ○), Yme1 (◆) oder die beiden Hybridproteine SSNN (△) und SSNS (▲) exprimierten,

synthetisiert und die Stabilität von Cox2 bei 37°C mittels SDS-PAGE und Phosphoreszenzanalyse untersucht. **(C)** CH-abhängiger Abbau von Canavanin-destabilisiertem Cox2 bei 37°C. Mitochondriale Translationsprodukte wurden in Gegenwart von ^{35}S -Methionin und 12 $\mu\text{g/ml}$ Canavanin in $\Delta yme1$ -Mitochondrien, die kein Yme1 ($\Delta yme1$, \circ), Yme1 (\blacklozenge) oder die beiden Hybridproteine SSNN (\triangle) und SSNS (\blacktriangle) exprimierten, synthetisiert und die Stabilität der Vorläuferform (pCox2) und der reifen Form (mCox2) von Cox2 bei 37°C mittels SDS-PAGE und Phosphoreszenzanalyse verfolgt. **(D)** CH-unabhängiger Abbau von Canavanin-destabilisiertem Cox2 bei 25°C. Nach Synthese mitochondrialer Translationsprodukte, wie unter (C) beschrieben, wurde die Stabilität von Cox2 bei 25°C untersucht.

Cox2 tatsächlich auf die Abhängigkeit des Abbauprozesses von der CH-Region auswirken kann, sollte die Stabilität von Cox2 untersucht werden, das in der Gegenwart von Canavanin synthetisiert worden war. Canavanin ist ein Analogon der Aminosäure Arginin und wird an deren Stelle in naszierende Aminosäureketten eingebaut. Aufgrund der unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften führt dieser Einbau zu einer Destabilisierung der jeweiligen Proteinstruktur. Entsprechend wurden mitochondriale Translationsprodukte in der Anwesenheit von Canavanin und ^{35}S -Methionin in isolierten Mitochondrien, die kein Yme1 ($\Delta yme1$), Yme1 oder eines der beiden Hybridproteine SSNN und SSNS exprimierten, synthetisiert. Der Einbau des Canavanins in Cox2 spiegelte sich hierbei in einer partiell gestörten Prozessierung und einem veränderten Laufverhalten innerhalb der SDS-PAGE-Analysen wieder (Abb. 24A). Die Stabilität beider Cox2-Formen wurde dann in einer anschließenden Inkubation bei 37°C wie zuvor beschrieben verfolgt. Beide Formen von Cox2 wurden Yme1-abhängig abgebaut (Abb. 24C, linke und rechte Teilabbildung). Das Hybridprotein SSNS konnte unter diesen Bedingungen Yme1 bei dem Abbau beider Formen vollständig ersetzen (Abb. 24C). Interessanterweise war das Hybridprotein SSNN jedoch vollständig inaktiv (Abb. 24C). Offenbar ist der Cox2-Abbau unter den hier getesteten Bedingungen ein CH-abhängiger Prozess.

Um den Einfluss des Faltungszustandes von Cox2 auf die Abhängigkeit des Abbaus von der CH-Region zu untermauern, sollte die Cox2-Faltung nach Canavanin-Einbau durch eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur stabilisiert werden. Entsprechend wurde das oben beschriebene Experiment bei 25°C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte neben Yme1 und SSNS auch das Hybridprotein SSNN den Abbau beider Cox2-Formen effizient vermitteln (Abb. 24D). Cox2 wurde folglich wiederum CH-unabhängig abgebaut.

Die hier geschilderten Experimente verdeutlichen somit, dass zum einen die Deletion eines substratspezifischen Faktors wie Cox20 den Abbauprozess eines ansonsten CH-unabhängigen Substratproteins in einen CH-abhängigen Vorgang umwandeln kann, und zum

anderen, dass der Faltungszustand eines Substratproteins einen wichtigen Parameter darstellt, der bestimmt, ob ein Protein CH-abhängig abgebaut wird.

3.3.7. Die Membraninsertion eines Substratproteins beeinflusst die CH-Abhängigkeit des Abbaus

Die Analyse der Membraninsertion von importiertem Phb1 in isolierte Mitochondrien zeigte, dass diese Form nur teilweise stabil mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist (Abb. 25A). Nach alkalischer Extraktion mit Natriumcarbonat (pH 10.5) konnten nur etwa 50% in der Membranfraktion (P) detektiert werden (Abb. 25A). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass importiertes Phb1 nicht in einen Prohibitin-Komplex assemblieren kann (Tatsuta *et al.*, 2005). Endogenes Phb1 und Phb2 sind in einem solchen Komplex enthalten (Steglich *et al.*, 1999; Nijtmans *et al.*, 2000). In der alkalischen Extraktion konnten beide Proteine vollständig in der Membranfraktion nachgewiesen werden und verhielten sich folglich wie integrale Membranproteine (Abb. 25A, rechte Teilabbildung).

Es sollte daher überprüft werden, ob die Membraninsertion eines Substratproteins ebenfalls einen Parameter darstellt, der die CH-Abhängigkeit des Abbauprozesses von Substratproteinen beeinflusst. Um eine stabile Verankerung von Phb1 in der inneren Mitochondrienmembran zu erzielen, wurde die Transmembrandomäne von Phb1 durch die ersten 161 Aminosäurereste von Yta10 ersetzt (Yta10(1-161)-Phb1). Diese Sequenz gewährleistet zum einen den Import in isolierte Mitochondrien sowie eine mit Phb1 übereinstimmende Topologie dieses Fusionsproteins und zum anderen eine stabile Insertion in die innere Mitochondrienmembran (Abb. 25A). Radioaktiv markiertes Yta10(1-161)-Phb1 wurde in isolierte Mitochondrien importiert, die kein Yme1 ($\Delta yme1$), Yme1 oder die beiden Hybridproteine SSNN und SSNS exprimierten, und nachfolgend seine Stabilität bei 37°C mittels SDS-PAGE und Phosphoreszenzanalyse verfolgt. Wie in Abbildung 25B dargestellt, wurde Yta10(1-161)-Phb1 sowohl durch Yme1 als auch durch beide Hybridproteine SSNN und SSNS abgebaut. Im Gegensatz zu Phb1 ist der Abbau von Yta10(1-161)-Phb1 folglich ein CH-unabhängiger Prozess. Um zu überprüfen, ob die eingeführte Sequenz von Yta10(1-161) zu einer veränderten Substraterkennung führen kann, wurde Yta10(1-161) ohne fusionierte Phb1-Domäne in isolierte Mitochondrien importiert und dessen Stabilität bei 37°C

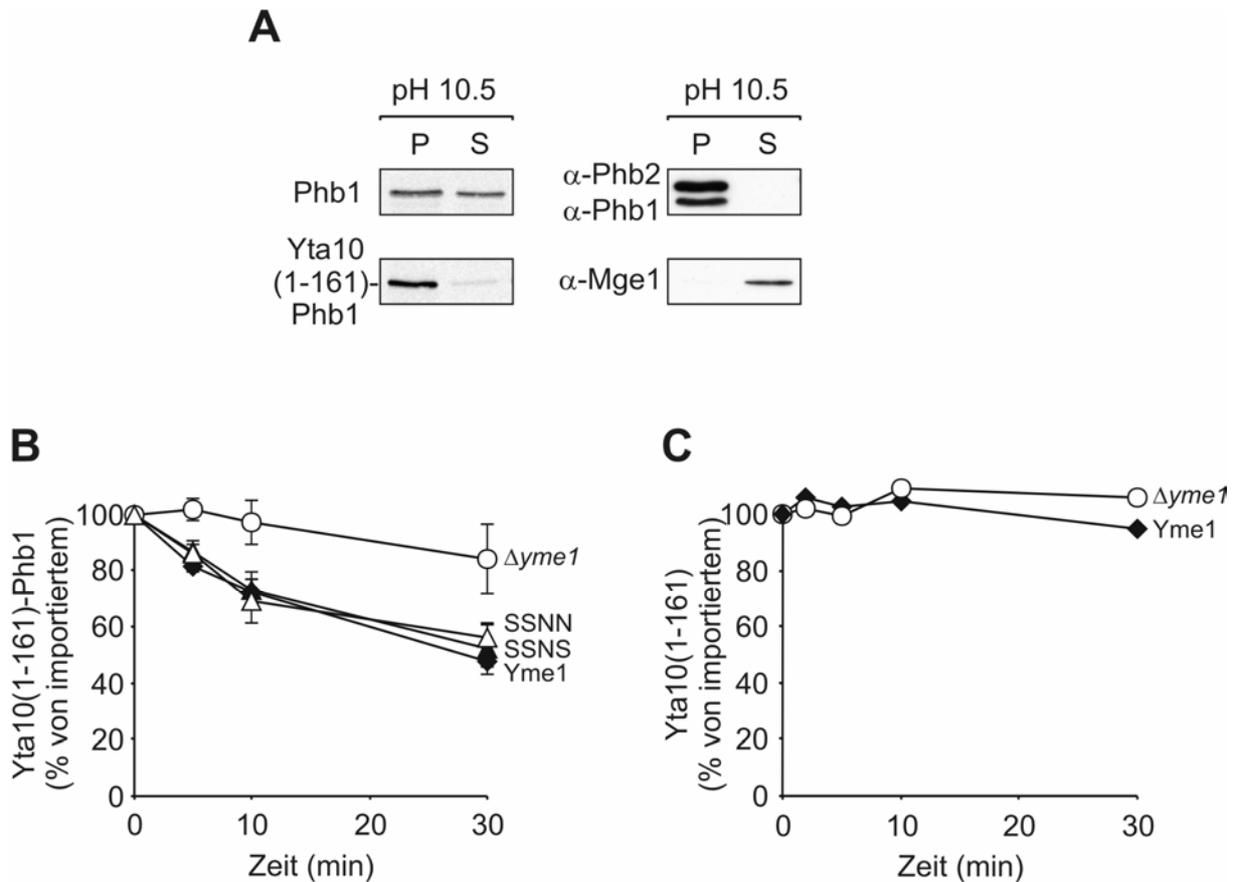


Abb. 25: Die Membraninsertion eines Substratproteins beeinflusst die CH-Abhängigkeit des Substratabbaus. (A) Unvollständige Membraninsertion von importiertem Phb1. Nach Import von radioaktiv markiertem Phb1 bzw. Yta10(1-161)-Phb1 in isolierte Mitochondrien wurde die Membranassoziation durch alkalische Extraktion (pH 10.5) untersucht. Membran- (P) und lösliche Fraktionen (S) wurden durch Zentrifugation getrennt und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie (linke Teilabbildung) bzw. immunochemisch (rechte Teilabbildung) mit Antikörpern gegen endogenes Phb1 und Phb2 bzw. das lösliche Matrixprotein Mge1 analysiert. **(B)** Yta10(1-161)-Phb1 wird CH-unabhängig abgebaut. ^{35}S -Methionin-markiertes Yta10(1-161)-Phb1 wurde in isolierte Mitochondrien importiert, die kein Yme1 ($\Delta yme1$, \circ), Yme1 (\blacklozenge) oder die beiden Hybridproteine SSNN (\triangle) und SSNS (\blacktriangle) exprimierten, und die Stabilität bei 37°C mittels SDS-PAGE und Phosphoreszenzanalyse untersucht. **(C)** Yta10(1-161) ist in isolierten Mitochondrien stabil. Radioaktiv markiertes Yta10(1-161) wurde in isolierte wildtypische (Yme1) oder $\Delta yme1$ -Mitochondrien importiert und die Stabilität bei 37°C durch SDS-PAGE und Phosphoreszenzanalyse verfolgt.

verfolgt. Es zeigte sich, dass dieses Protein in isolierten Mitochondrien stabil war und demzufolge von Yme1 nicht als Substrat erkannt wird (Abb. 25C). Daraus kann man schlussfolgern, dass die Erkennung von Yta10(1-161)-Phb1 durch den Phb1-Anteil des Fusionsproteins erfolgt. Zudem konnte eine spezifische Bindung von Yta10(1-161)-Phb1 an das Yme1-CH-GST-Fusionsprotein in mitochondrialen Lysaten nachgewiesen werden

(G. Seewald, persönliche Mitteilung). Das bedeutet, dass eine prinzipielle Erkennung von Yta10(1-161)-Phb1 durch die CH-Region möglich ist und nicht durch den Yta10(1-161)-Teil verhindert wird. Demnach kann die CH-Abhängigkeit des Substratabbaus durch die *i*-AAA-Protease Yme1 neben der Faltung auch mit der Art der Membraninsertion eines Substratproteins korreliert werden.

3.4. Analyse möglicher Wechselbeziehungen der verschiedenen Substratbinderegionen der *i*-AAA-Protease Yme1

In den bisher geschilderten Experimenten konnten drei Regionen innerhalb der *i*-AAA-Protease identifiziert werden, die die Substratbindung und den proteolytischen Prozess maßgeblich beeinflussen. Für die oberflächenexponierten CH- und NH-Regionen konnte dabei eine direkte Substratinteraktion nachgewiesen werden, während solche Evidenz für das YVG-Motiv von AAA-Proteasen noch fehlt. Im Nachfolgenden sollten mögliche Wechselbeziehungen dieser Substratbinderegionen untersucht werden. Inwieweit wirken sich Störungen einzelner oder mehrerer Binderegionen auf die Substratbindung aus und lässt sich daraus eine Abfolge der Substratbindung an die verschiedenen Regionen ableiten? Hierzu wurden die zuvor beschriebenen Veränderungen der jeweiligen Substratbinderegion, die zu deren gestörten Substratinteraktionen führen, systematisch miteinander kombiniert. Die Substrataffinitäten dieser Yme1-Varianten wurden in Koimmunfällungsexperimenten untersucht.

Zunächst wurden die möglichen Wechselbeziehungen der oberflächenexponierten CH- und NH-Regionen charakterisiert. Hierzu wurde die Substratbindung wie zuvor mit radioaktiv markiertem Cox2 in isolierten $\Delta yme1$ -Mitochondrien, die die entsprechenden Yme1-Varianten exprimierten, betrachtet. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Experimenten konnte eine Cox2-Bindung an Yme1 beobachtet werden, während sich für das Yme1-IAP-1-Hybridprotein SSNN mit einer CH-Region mit geringer Affinität eine deutlich erniedrigte Fällungseffizienz von Cox2 feststellen ließ (Abb. 26A). Das proteolytisch inaktive Yme1^{A6} mit einer niederaffinen NH-Region konnte dagegen deutliche Mengen an Cox2 akkumulieren (Abb. 26A). Untersuchte man nun eine Yme1-Variante (SSNN/A6), die beide Regionen in niederaffinem Zustand enthält, konnte ein vollständiger Verlust der Cox2-Substratbindung festgestellt werden (Abb. 26A). Für entsprechende Analysen in $\Delta cox20\Delta yme1$ -

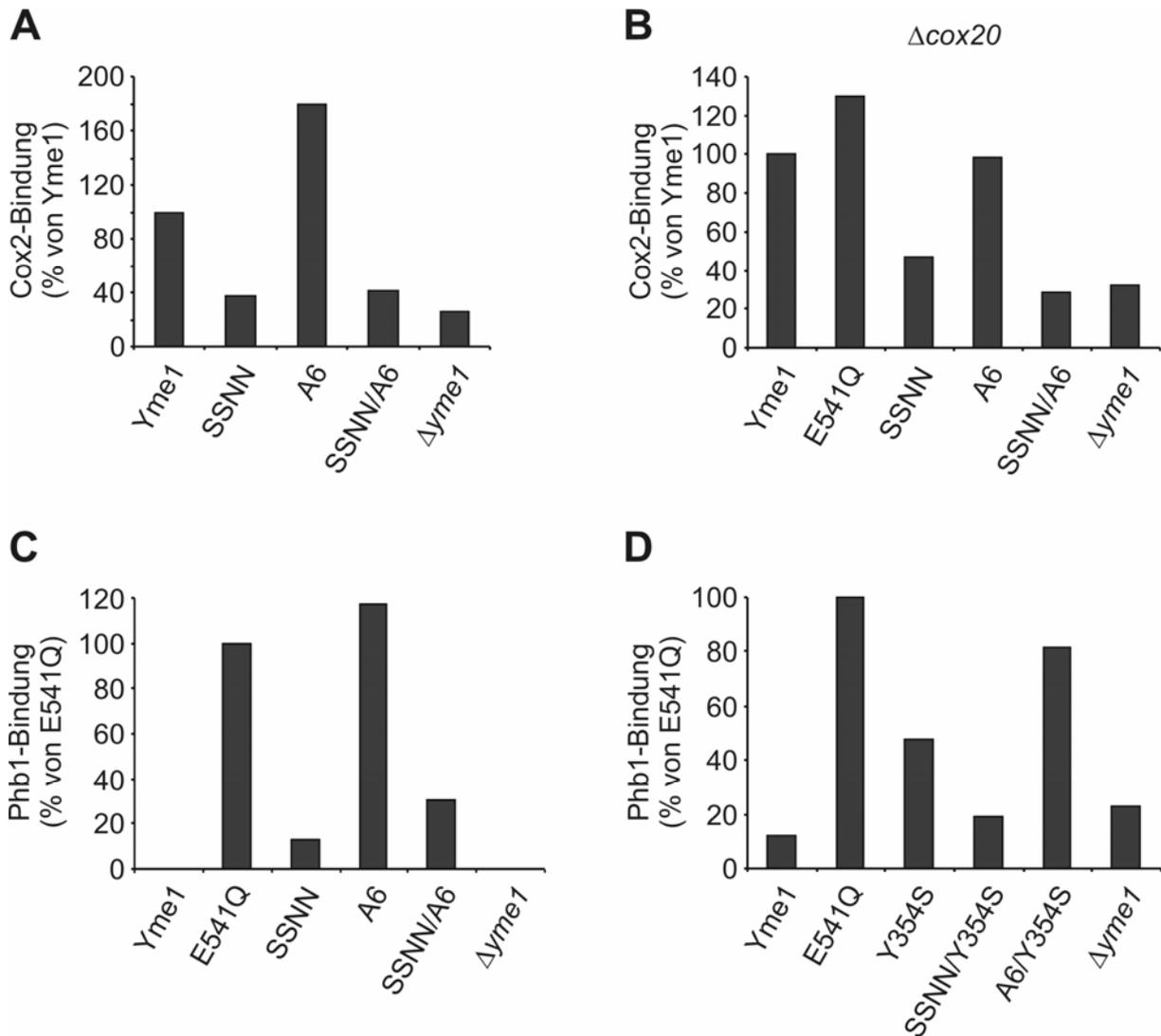


Abb. 26: Wechselbeziehungen der identifizierten Substratbinderegionen CH, NH und des YVG-Motivs von Yme1. Die Substratbindungseigenschaften der verschiedenen Yme1-Varianten wurden in Koimmunfällungsexperimenten untersucht. Hierzu wurden entweder mitochondriale Translationsprodukte mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert oder radioaktiv markiertes Phb1 in isolierte Mitochondrien importiert. Die Proben wurden anschließend für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Koimmunfällungen wurden mit α -Yme1-Antikörpern, die gegen die N-terminale Domäne von Yme1 gerichtet waren, durchgeführt. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE analysiert und durch Phosphoreszenzanalyse quantifiziert. Mit Yme1 gefälltes Cox2 bzw. mit Yme1^{E541Q} gefälltes Phb1 wurde als 100% gesetzt. **(A und B)** Wechselbeziehung der CH- und NH-Regionen für die Cox2-Bindung in Δyme1 - (A) und $\Delta\text{cox20} \Delta\text{yme1}$ -Mitochondrien (B). Die Cox2-Bindung wurde in isolierten Mitochondrien, die kein Yme1 (Δyme1), Yme1, die proteolytisch inaktive Yme1^{E541Q}-Mutante (E541Q), das Yme1-IAP-1-Hybrid SSNN mit einer niederaffinen CH-Region, eine NH-Region-Mutante Yme1^{A6} (A6) oder eine SSNN/A6-Doppelmutante exprimierten, untersucht. **(C)** Wechselbeziehung der CH- und NH-Regionen für die Phb1-Bindung in Δyme1 -Mitochondrien mit den unter A und B beschriebenen Yme1-Varianten. **(D)** Wechselbeziehung der CH- und NH-Regionen sowie des YVG-Motivs für die Phb1-Bindung. Yme1, die proteolytisch inaktive Yme1^{E541Q}-Mutante (E541Q), die YVG-

Motiv-Mutante Yme1^{Y354S} (Y354S), eine CH-Region und YVG-Motiv-Doppelmutante (SSNN/Y354S) und eine NH-Region und YVG-Motiv-Doppelmutante (A6/Y354S) wurden untersucht.

Mitochondrien, das heißt unter Bedingungen, in denen der Cox2-Abbau CH-abhängig verläuft, konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden (Abb. 26B). Anschließend wurde die Substratinteraktion mit Phb1, das in CH-abhängiger Weise abgebaut wird, in den entsprechenden isolierten Mitochondrien analysiert. Erneut wurde Phb1 nur mit proteolytisch inaktivem Yme1^{E541Q} effizient gefällt (Abb. 26C). Im Gegensatz dazu konnte für das gegenüber Phb1 ebenfalls proteolytisch inaktive Yme1-IAP-1-Hybridprotein SSNN keine signifikante Bindung von Phb1 festgestellt werden. Die A6-Austausche in der NH-Region erlaubten dagegen eine Phb1-Akkumulation an der Protease (Abb. 26C). Wurde nun zu dieser mutierten NH-Region zusätzlich eine bindungsdefiziente CH-Region eingeführt (SSNN/A6), konnte keine signifikante Substratbindung an die Protease beobachtet werden (Abb. 26C). Diese Ergebnisse sind somit mit einer CH-abhängigen Bindung von Cox2 und Phb1 an die *i*-AAA-Protease Yme1 konsistent. Bei gestörter Interaktion mit der NH-Region kommt es zu einer Beeinträchtigung des Proteolyseprozesses und zu einer Akkumulation von Substraten an der CH-Region. Eine intakte NH-Region ist folglich nicht für die Substratbindung an die CH-Region notwendig. In die Analysen der Wechselbeziehungen der Substratbinderegionen sollte nun das YVG-Motiv mit einbezogen und die Substratinteraktionen anhand Phb1 untersucht werden. Wie in Abbildung 26D dargestellt, führte die Y354S-Substitution in Yme1 zu einer signifikanten Akkumulation von Phb1 an der Protease, wenn auch im Vergleich zu Yme1^{E541Q} in reduziertem Maße (Abb. 26D). Auch hier ging die Substratbindung nach zusätzlicher Einführung der niederaffinen CH-Region von IAP-1 (SSNN/Y354S) vollständig verloren (Abb. 26D). Wurde dagegen eine bindungsdefiziente NH-Region mit Y354S kombiniert (A6/Y354S), konnten mit Yme1^{E541Q} vergleichbare Mengen an Phb1 gefällt werden (Abb. 26D). Folglich kommt es auch bei einer Beeinträchtigung des YVG-Motivs zu einer Substratakkumulation an der CH-Region der *i*-AAA-Protease Yme1. Für die Substratbindung an die CH-Region ist demnach weder die Funktion der NH-Region noch des YVG-Motivs notwendig. Diese Ergebnisse weisen somit auf eine initiale Bindung von Substratproteinen an die CH-Region hin.

4. Diskussion

Zwei hochkonservierte AAA-Proteasen üben eine duale Funktion in der inneren Mitochondrienmembran aus. Zum einen sind sie zentrale Komponenten der Qualitätskontrolle von mitochondrialen Proteinen, zum anderen kontrollieren sie die mitochondriale Biogenese durch die Prozessierung von regulatorischen Proteinen (Nolden *et al.*, 2005; Nolden *et al.*, 2006). Beide Prozesse werden grundlegend von der spezifischen Erkennung und Bindung von Substratproteinen bestimmt. Die molekularen Mechanismen der Substraterkennung durch AAA-Proteasen sind aber bisher kaum verstanden. Zudem stellt die Membranverankerung von Substraten und den AAA-Proteasen eine besondere Herausforderung an den generellen Abbaumechanismus von Substraten durch ATP-abhängige Proteasen dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher anhand der *i*-AAA-Protease Yme1 aus *S. cerevisiae* Substratbinderegionen identifiziert und deren Eigenschaften sowie Funktionen für den Proteinabbau charakterisiert werden.

4.1. Die CH- und NH-Region - zwei oberflächenexponierte Substratbindestellen

In dieser Arbeit konnten die CH- und NH-Region als neue Substratbindestellen in Yme1 identifiziert werden, die die Bindung und die Proteolyse von Substratproteinen kontrollieren. Die Lage und Struktur dieser Regionen kann anhand der Kristallstruktur der cytoplasmatischen Domänen der verwandten AAA-Protease FtsH aus *T. maritima* bestimmt werden (Abb. 27) (Bieniossek *et al.*, 2006). Die CH-Region umfasst die Aminosäuren 650-709 in Yme1. Die homologe Region in FtsH besteht aus drei konservierten C-terminalen Helices in der proteolytischen Domäne, die in der Nomenklatur für FtsH als $\alpha 16$, $\alpha 17$ und $\alpha 18$ bezeichnet werden (Abb. 27) (Bieniossek *et al.*, 2006). Diese α -Helices sind an der apikalen und seitlichen Oberfläche der proteolytischen Domäne exponiert. Die Helix $\alpha 16$ erstreckt sich von deren zentraler Pore bis zur Peripherie (Abb. 27). Die Helices $\alpha 17$ und $\alpha 18$ werden durch einen kurzen β -Strang ($\beta 7$) verbunden und formen an der seitlichen Oberfläche eine U-förmige Struktur (Abb. 27). Die NH-Region setzt sich in Yme1 aus den Aminosäuren 268-313 zusammen und weist in der FtsH-Struktur ebenfalls überwiegend α -helikale Strukturen auf (Abb. 27). Die Helices werden als $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bezeichnet

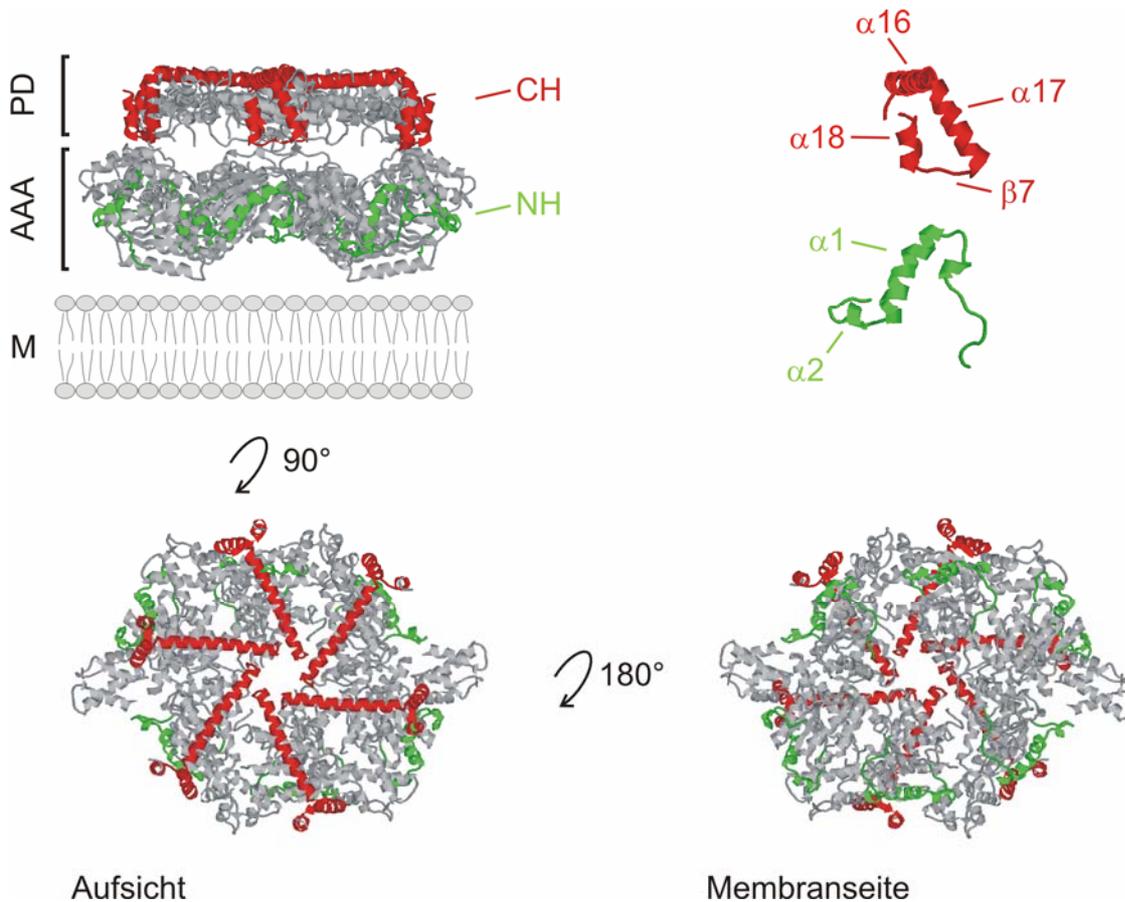


Abb. 27: Die CH- und NH-Regionen in der Kristallstruktur von FtsH aus *T. maritima*. Die zur CH-Region aus Yme1 (Aminosäure 650-709) homologe Sequenz (Aminosäure 544-603) ist in der FtsH-Struktur in rot dargestellt. Die NH-Region aus Yme1 (Aminosäure 268-313) wurde in der entsprechenden Region von FtsH (Aminosäure 148-193) grün markiert. Die Seitenansicht des Komplexes aus den AAA- und proteolytischen Domänen ist links oben abgebildet und wurde für die Aufsicht um 90° (links unten) bzw. diese für die Ansicht der Membranseite (rechts unten) um weitere 180° gedreht. Rechts oben sind die isolierte CH- (rot) und NH- (grün) Region aus einer Seitenansicht abgebildet und die Bezeichnungen der Sekundärstrukturen angegeben. AAA: AAA-Domänen, PD: proteolytische Domänen, M: Membran, CH: CH-Region, NH: NH-Region. Die Kristallstruktur der cytoplasmatischen Domänen von FtsH aus *T. maritima* und die Nomenklatur der Sekundärstrukturen wurde aus (Bieniossek *et al.*, 2006) entnommen.

(Bieniossek *et al.*, 2006). Die NH-Region ist überwiegend an der seitlichen Oberfläche der AAA-Domänen exponiert, reicht aber mit ihrem N-terminalen Ende an der Unterseite des AAA-Domänenrings in die Nähe der zentralen Pore (Abb. 27). In ihrer Gesamtheit bilden die CH- und NH-Regionen eine Struktur, die die AAA- und proteolytischen Domänen käfigartig umfasst und somit ideal für eine initiale Substratbindung geeignet ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die Funktion der CH- und NH-Regionen während des Abbaus von

Membranproteinen unterscheiden. Während die NH-Region eine zentrale Rolle für den Abbau aller getesteten Substrate spielt, weist die CH-Region offenbar eine Spezialisierung für die Proteolyse von entfalteten und nicht integralen Membranproteinen auf.

4.1.1. Die CH-Region

Die CH-Region wurde als Substratbinderegion identifiziert, indem funktionelle Unterschiede der beiden homologen AAA-Proteasen Yme1 aus *S. cerevisiae* und IAP-1 aus *N. crassa* über Domänenaustauschexperimente näher charakterisiert wurden. Die Expression von IAP-1 führt zwar zu einer Komplementation des *petite*-negativen Phänotypen, nicht aber zu einem respiratorischen Wachstum eines $\Delta yme1$ -Hefestammes bei erhöhter Temperatur (Klanner *et al.*, 2001). Die Deletion der CH-Region verursachte eine gestörte Komplexassemblierung der *i*-AAA-Protease. Daher erlaubte erst ein solcher Hybridproteinansatz eine Identifizierung und Analyse der Substratbindung der CH-Region, da die entsprechende CH-Region von IAP-1 die Assemblierung des Protease-Komplexes wiederherstellen konnte.

Die Untersuchung der proteolytischen Aktivität der Hybridproteine zeigte eine substratspezifische Funktion der CH-Region von Yme1 auf. Während die Proteolyse von nicht assembliertem Phb1 durch die *i*-AAA-Protease strikt von der Anwesenheit der CH-Region von Yme1 abhängig war, konnte Cox2 und Epitop-markiertes Nde1 CH-unabhängig abgebaut werden. Ob der Abbauprozess in Abhängigkeit von der CH-Region abläuft, wird durch mindestens zwei Eigenschaften der Substratproteine bestimmt. Zum einen spielt die Membraninsertion des Substrates eine Rolle. So konnte der CH-abhängige Abbau einer importierten Phb1-Domäne durch eine stabile Membranverankerung in einen CH-unabhängigen Vorgang umgewandelt werden. Die distale Position der CH-Region in der Struktur könnte also dazu dienen, periphere oder sogar lösliche Substratproteine für den Abbau an die Protease zu binden. Zum anderen ist der Faltungszustand eines Substratproteins eine weitere Eigenschaft, die die CH-Abhängigkeit des Abbauprozesses beeinflusst. Cox2 wurde in einem CH-unabhängigen Mechanismus abgebaut. Wurde die Faltung allerdings durch Canavanin-Einbau und durch entsprechende Temperaturen modifiziert, konnte auch die CH-Abhängigkeit des Abbauprozesses beeinflusst werden. Bei hoher Temperatur und damit unter destabilisierenden Bedingungen wurde Cox2 CH-abhängig abgebaut. Durch eine Erniedrigung der Temperatur konnte die Cox2-Faltung in Gegenwart von Canavanin sehr wahrscheinlich wieder stabilisiert werden und der Cox2-Abbau konnte wiederum in einen

CH-unabhängigen Prozess umgewandelt werden. In einem weiteren Ansatz sollte durch die Deletion des Chaperons Cox20 die Faltung manipuliert werden. Auch unter diesen Bedingungen konnte der Cox2-Abbau in einen CH-abhängigen Prozess umgewandelt werden. Die besondere Funktion der CH-Region für den Abbau von entfalteten Proteinen deutet auf eine Rolle bei der Qualitätskontrolle von Membranproteinen hin. Denn hier müssen nicht assemblierte und denaturierte Proteine spezifisch erkannt und proteolytisch entfernt werden. Interessanterweise konnte kein oder nur ein geringer Einfluss der CH-Region auf die Komplementation der $\Delta yme1$ -Wachstumsphänotypen durch die entsprechenden Yme1-IAP-1-Hybridproteine beobachtet werden. Die molekularen Grundlagen dieser Phänotypen sind zwar bisher nicht verstanden, aber möglicherweise trägt eine Störung der Qualitätskontrolle nur unwesentlich zur Manifestation der Wachstumsphänotypen bei. Dies würde mit Beobachtungen übereinstimmen, die für die Funktion der *m*-AAA-Protease gemacht wurden (Nolden *et al.*, 2005). Hefezellen können ohne die proteolytische Aktivität der *m*-AAA-Protease nicht respiratorisch wachsen (Tauer *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1998). Dies lässt sich auf eine defekte Prozessierung des ribosomalen Proteins MrpL32 zurückführen, was eine stark inhibierte mitochondriale Translation zur Folge hat (Nolden *et al.*, 2005). Offenbar spielt nicht die Qualitätskontrolle durch die *m*-AAA-Protease, sondern ihre regulatorische Funktion die entscheidende Rolle für das respiratorische Wachstum der Zellen.

Die Untersuchung der Substratbindung durch die verschiedenen Yme1-IAP-1-Hybridproteine zeigte, dass Substratproteine CH-abhängig an der Protease akkumulierten. Die unterschiedliche proteolytische Aktivität der Hybridproteine gegenüber Phb1 kann folglich mit einer CH-abhängigen Bindung erklärt werden. Interessanterweise konnte auch eine CH-abhängige Akkumulation von Cox2 an der Protease festgestellt werden, obwohl dessen Abbau nur unter bestimmten Bedingungen durch die CH-Region beeinflusst wurde. Möglicherweise kann Cox2 durch das Chaperon Cox20 in einer abbaukompetenten Konformation gehalten werden, die eine schnelle, CH-unabhängige Proteolyse erlaubt. Die an die CH-Region gebundene Spezies könnte demnach ein Nebenprodukt dieses Cox20-vermittelten Prozesses darstellen. Ebenso könnte freies, nicht mit Cox20 assoziiertes Cox2 über die CH-Region gebunden werden. In jedem Falle beeinflusst jedoch die zusätzliche Bindung an die CH-Region nicht die Kinetik des Abbaus von Cox2.

Die Analyse der funktionellen Wechselwirkungen der CH- und NH-Regionen sowie des YVG-Motivs zeigte, dass die Substratbindung an die CH-Region nicht von der Funktion der NH-Region oder des Porenmotivs YVG abhängt. Die Bindung an die CH-Region stellt damit sehr wahrscheinlich die initiale Substraterkennung bei CH-abhängigen Abbauprozessen dar.

Eine direkte Wechselwirkung von Cox2 und Phb1 mit der CH-Region konnte *in vitro* anhand isolierter GST-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die Yme1- und IAP-1-CH-Regionen wiesen hier die gleichen Bindungsspezifitäten auf, die für die entsprechenden Hybridproteine beobachtet werden konnten. Die Yme1-CH-Region konnte Cox2 und Phb1 binden, während die IAP-1-CH-Region nicht mit den Substraten interagiert. Dies zeigt, dass die CH-Region von Yme1 direkt mit Substratproteinen interagieren kann und eine von IAP-1 divergierende Substratspezifität besitzt.

Wie kommt diese divergierende Substratspezifität der CH-Regionen trotz einer hohen Sequenzidentität von 48% zustande? Da Kristallstrukturdaten für Yme1 und IAP-1 noch nicht zur Verfügung stehen, sollen mögliche Unterschiede prinzipiell anhand der Strukturdaten von FtsH aus *T. maritima* und einem darauf basierenden Strukturmodell der Yme1-CH-Region aufgezeigt werden (Abb. 28). Aufgrund der seitlichen oberflächenexponierten Lage erscheint eine Teilstruktur der CH-Region, die aus α 17, β 7 und α 18 besteht, für eine direkte Substratbindung besonders geeignet (Abb. 27 und 28A). Wird diese Struktur raumfüllend dargestellt, lässt sich darüber hinaus ein zentraler hydrophober Bereich (blau) aus Resten der flankierenden α -Helices 17 und 18 sowie des β 7-Stranges für FtsH und Yme1 erkennen (Abb. 28B und D). Hydrophobe Wechselwirkungen dieses zentralen Bereichs mit unstrukturierten Substratsequenzen könnten die strukturelle Grundlage für die bevorzugte Bindung von entfalteten Substratproteinen bilden. Im Vergleich von FtsH und Yme1 kann man interessante Unterschiede innerhalb dieses zentralen Bereichs erkennen. Aufgrund eines Isoleucin (FtsH I585) zu Glycin (Yme1 G691) Austauschs formt der zentrale Bereich von Yme1 eine Art hydrophobe Tasche, die in der Darstellung als Öffnung sichtbar ist (Abb. 28D, die dahinter liegenden Strukturen sind nicht dargestellt). Im Sequenzvergleich von Yme1 und IAP-1 finden sich ebenfalls verschiedene Austausche von hydrophoben Aminosäuren, die an der Ausbildung dieses zentralen Bereiches beteiligt sind (Abb. 28C). Solche Unterschiede könnten prinzipiell zu einer divergierenden Erkennung von hydrophoben Aminosäuren mit verschiedenen Seitenketten beitragen. Der zentrale Bereich wird von überwiegend polaren und geladenen Aminosäureresten der Helices flankiert (Abb. 28B und D). Deren Zusammensetzung könnte neben der Erkennung von hydrophoben Aminosäuren durch den zentralen Bereich ebenfalls eine unterschiedliche Sequenzspezifität der CH-Regionen ermöglichen. Ob diese Teilstruktur tatsächlich die direkte Substratbindung und eine divergierende Substraterkennung durch Yme1 und IAP-1 vermittelt, kann durch gerichtete Mutagenese untersucht werden.

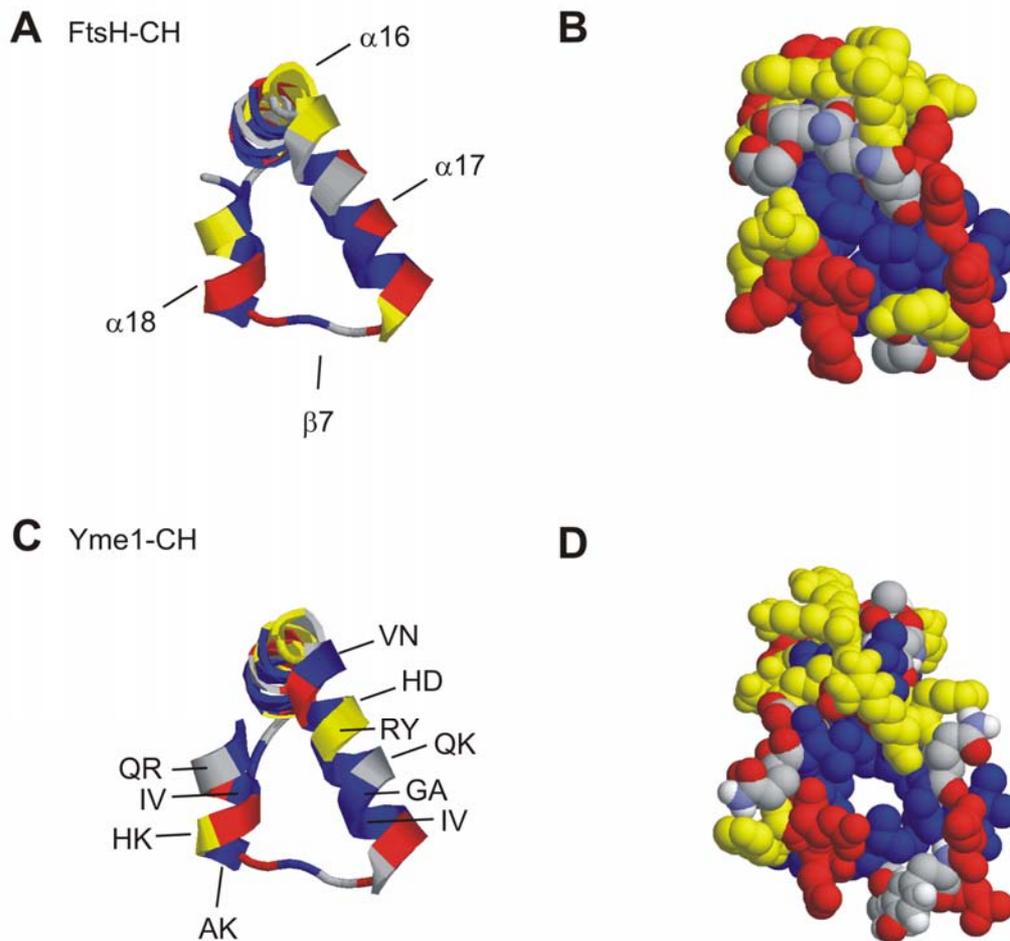


Abb. 28: Struktureller Vergleich der CH-Regionen von FtsH und Yme1. (A, B) CH-Region aus der Kristallstruktur von FtsH aus *T. maritima* (Bieniossek *et al.*, 2006). (C, D) Strukturmodellierung der CH-Region von Yme1 basierend auf der Kristallstruktur von FtsH. (A, C) Darstellung der Sekundärstrukturen. (B, D) Raumfüllende Darstellung der jeweiligen CH-Regionen aus (A) und (C). In A ist die Benennung der Sekundärstrukturen $\alpha 16$, $\alpha 17$, $\beta 7$ und $\alpha 18$ nach (Bieniossek *et al.*, 2006) angegeben. In C sind zusätzlich die Aminosäureunterschiede zwischen Yme1 (erster Rest) und IAP-1 (zweiter Rest) im Ein-Buchstabenkode aufgeführt. Hydrophobe Aminosäurereste sind in blau, polare in grau, positiv geladene in gelb und negativ geladene in rot dargestellt. Die Strukturmodellierung der CH-Region von Yme1 wurde von Dr. Kisters-Woike nach (Guex und Peitsch, 1997) durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

4.1.2. Die NH-Region

Eine weitere Binderegion wurde durch N-terminale Helices der AAA-Domäne gebildet und als NH-Region bezeichnet. Die Kristallstruktur von FtsH (Abb. 27) und die Strukturmodellierung von Yme1 (Nolden *et al.*, 2006) zeigen eine Positionierung der NH-

Region an der äußeren, seitlichen Oberfläche der Ringstruktur der AAA-Domänen. Die NH-Region ist damit ideal für die Erkennung und Bindung von Substratproteinen lokalisiert.

Eine systematische Alanin-Mutagenese von oberflächenexponierten Aminosäureresten in der NH-Region konnte eine essentielle Bedeutung von negativ geladenen Aminosäuren für die *in vivo*-Aktivität von Yme1 aufzeigen. Die Substitution von sechs überwiegend konservierten Resten mit den entsprechenden Amidformen erlaubte es, diesen Effekt direkt auf die negativen Ladungen zurückzuführen. Übereinstimmend mit dieser zentralen Bedeutung für die *in vivo*-Aktivität von Yme1 konnte eine vollständige proteolytische Inaktivierung der Protease durch eine veränderte NH-Region gegenüber allen getesteten Substratproteinen festgestellt werden.

Die Untersuchung der Substratbindung von Yme1 mit einer veränderten NH-Region zeigte, dass Substratproteine durch die mutierte Protease gebunden werden können. So akkumulierte Phb1 an einer Yme1-Variante mit mutanter NH-Region. Weiterführende Analysen konnten belegen, dass die beobachtete Substratbindung durch die CH-Region vermittelt wurde. Offenbar wird der Abbauprozess von Phb1 durch die veränderte NH-Region unterbrochen und das Substrat bleibt nach der initialen Erkennung an der CH-Region gebunden. Die Bindung von Substraten an die NH-Region konnte daher im Kontext von Yme1 nicht direkt untersucht werden. Die Analyse von C-terminal verkürzten Yme1-Varianten zeigte jedoch eine physikalische Wechselwirkung der Substratproteine Cox2 und Phb1 mit der NH-Region. Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen einer vorherigen Studie, in der eine Bindung eines entfalteten Modellsubstrates an die NH-Region ermittelt werden konnte (Leonhard *et al.*, 1999). Die Substitution der negativ geladenen Aminosäuren in diesen verkürzten Versionen führte zu einem drastischen Bindungsdefekt. Offenbar hängt die Substratbindung der NH-Region von den negativ geladenen Aminosäuren ab. Somit lässt sich der Verlust der proteolytischen Aktivität von Yme1 auf einen Bindungsdefekt in der NH-Region zurückführen. Denn in Anwesenheit einer mutanten NH-Region kommt es zwar zu einer initialen Bindung von Phb1 an die CH-Region, die Proteolyse ist aber trotzdem gestört. Wahrscheinlich ist eine Interaktion von CH-gebundenen Substraten mit der NH-Region für einen produktiven Abbauprozess notwendig. Ebenso könnten Mutationen eine direkte Interaktion von Cox2 mit der NH-Region und damit dessen CH-unabhängigen Abbau unterbinden.

Neben einer divergierenden Substratspezifität in den CH-Regionen von Yme1 und IAP-1 konnten Hinweise erhalten werden, dass auch die AAA-Domänen beider Proteasen zu den beobachteten funktionellen Unterschieden beitragen. Es ist bisher nicht klar, worin diese

Unterschiede liegen könnten. Da die für die Substratbindung kritischen negativen Aminosäurereste zwischen Yme1 und IAP-1 größtenteils konserviert sind, erscheinen diese Eigenschaften der NH-Region als Erklärung unwahrscheinlich. Möglicherweise könnten auch Sequenzunterschiede in den α -Subdomänen der AAA-Domänen, für die Eigenschaften einer Substratbinderegion für prokaryotische Clp- und Lon-Proteasen gezeigt werden konnten und die hier als SSD-Domäne bezeichnet wird, zu den Funktionsunterschieden beitragen (Smith *et al.*, 1999).

Die Bindung von nicht assemblierten und entfaltenen Substratproteinen durch AAA-Proteasen deutet auf hydrophobe Wechselwirkungen hin. Solche Interaktionen lassen sich nicht ohne weiteres mit der essentiellen Rolle der negativ geladenen Aminosäuren für die Substratbindung an die NH-Region in Einklang bringen. Interessanterweise können in den identifizierten Erkennungssequenzen der Chaperone Hsp70/DnaK und ClpB positiv geladene Aminosäuren gefunden werden. So setzt sich das Hsp70/DnaK-Bindungsmotiv aus einem Kern, der aus vier bis fünf hydrophoben Aminosäureresten besteht, und flankierenden Regionen, die präferentiell positiv geladene, basische Reste aufweisen, zusammen. Negativ geladene Aminosäuren sind dagegen von der Kernregion ausgeschlossen und in den flankierenden Regionen stark abgereichert (Rudiger *et al.*, 1997). Das prokaryotische AAA⁺-Protein ClpB, das in Kooperation mit DnaK die Solubilisierung und Faltung von aggregierten Proteinen vermittelt, bindet mit großer Präferenz an Peptidsequenzen, die eine positive Nettoladung aufweisen (Schlieker *et al.*, 2004). Zudem können in einigen terminalen Erkennungssequenzen der prokaryotischen ClpXP-Protease neben hydrophoben und polaren Resten auch positiv geladene Aminosäuren gefunden werden (Flynn *et al.*, 2003). Diese Befunde deuten darauf hin, dass Substratproteine von Chaperonen und Proteasen prinzipiell an Peptidsequenzen erkannt werden können, die positive Ladungen tragen. Entsprechend könnte eine solche Erkennung auch durch die negativen Ladungen der NH-Region in Yme1 vermittelt werden. Zusätzlich könnte eine geringe Affinität der NH-Region gegenüber entfaltenen Proteinen durch die spezifische Funktion der CH-Region kompensiert werden. Deren initiale Bindung von entfaltenen Proteinen könnte die lokale Konzentration dieser Substrate an der strukturell benachbarten NH-Region erhöhen und damit zu einem effizienten Abbauprozess führen.

Interessanterweise konnten negativ geladene Aminosäuren auch in den zentralen Poren von ClpB und FtsH gefunden werden (Schlieker *et al.*, 2004; Okuno *et al.*, 2006). Im Falle von ClpB üben diese eine wichtige Funktion bei der Substraterkennung und -bindung aus (Schlieker *et al.*, 2004).

4.2. Das YVG-Motiv der zentralen Pore

Die Kristallstrukturen von verschiedenen AAA⁺-Proteinen zeigen eine zentrale Pore innerhalb der oligomeren Ringkomplexe. In diese werden Substratproteine inseriert und nachfolgend in die proteolytische Kammer transloziert. Auf einer Schlaufenstruktur in dieser Pore befindet sich ein konserviertes @XG-Motiv mit einem aromatischen oder hydrophoben Aminosäurerest (@) (Bochtler *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Kim und Kim, 2003; Lee *et al.*, 2003; Schlieker *et al.*, 2004; Bieniossek *et al.*, 2006). Basierend auf der Analyse von Nukleotid-induzierten Konformationsänderungen wurde diesem Aminosäurerest eine direkte Rolle bei der Substrattranslokation durch die zentrale Pore und der damit verbundenen aktiven Entfaltung von Substratproteinen zugeordnet (Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Die Strukturmodellierung der AAA-Domänen von Yme1 und die Kristallstruktur der verwandten bakteriellen AAA-Protease FtsH deuten darauf hin, dass ein entsprechendes YVG-Motiv in Yme1 ebenfalls in der zentralen Pore lokalisiert ist (Krzywda *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2002; Bieniossek *et al.*, 2006; Nolden *et al.*, 2006). Um eine mögliche Funktion dieses Porenmotivs für den Abbau von Membranproteinen durch AAA-Proteasen zu untersuchen, wurde eine Mutationsanalyse des Aminosäurerestes Y354 des YVG-Motivs von Yme1 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass diesem Rest eine essentielle Bedeutung für die *in vivo*-Aktivität und für die Proteolyse von integralen Membranproteinen wie Cox2 und Yta10(1-161)-DHFR^{mut} zukommt. Hierbei konnte eine klare Bevorzugung von hydrophoben Aminosäureresten an Position 354 festgestellt werden. Auch die Funktion anderer AAA⁺-Proteine wird von einer hohen Hydrophobizität an dieser Position des Porenmotivs bestimmt (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003; Schlieker *et al.*, 2004; Siddiqui *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005). Diese Befunde deuten daher auf einen konservierten Mechanismus des Porenmotivs von AAA⁺-Proteinen hin.

Interessanterweise konnte für die Bindung der beiden getesteten Substrate ein substratspezifischer Effekt beobachtet werden. Während ein mutiertes YVG-Motiv im Falle von Yta10(1-161)-DHFR^{mut} zu einer Substratakkumulation an der Protease führte, konnte Cox2 nicht stabil an die Protease binden. Das YVG-Motiv kann somit mindestens an zwei Schritten der Proteolyse durch AAA-Proteasen beteiligt sein. Zum einen an der initialen Bindung und zum anderen an den ihr nachfolgenden Schritten. Der Faltungszustand eines Substratproteins bestimmt dabei wahrscheinlich maßgeblich, welcher Schritt durch das mutierte Porenmotiv beeinträchtigt ist. Denn wurde Cox2 durch erhöhte Temperatur destabilisiert, konnte wie für Yta10(1-161)-DHFR^{mut}, das eine entfaltete Domäne in den

Intermembranraum exponiert, eine Substratakkumulation an der Protease beobachtet werden. Interessanterweise wiesen ATPase-defiziente Yme1-Varianten, die Mutationen in den konservierten Walker-A- oder Walker-B-Motiven der AAA-Domänen trugen, Bindungsdefekte auf, wie sie auch für die YVG-Motiv-Mutante beobachtet werden konnten. Folglich könnte das YVG-Motiv an einer ATP-abhängigen Entfaltung von Substratproteinen beteiligt sein. Trotz des Fehlens einer robusten Unfoldase-Aktivität von bakteriellen AAA-Proteasen besitzt die *i*-AAA-Protease demnach zumindest eine limitierte Fähigkeit zur aktiven Proteinentfaltung (Herman *et al.*, 2003).

Die Akkumulation von entfaltenen Substraten an YVG- oder ATPase-defizienten Yme1-Varianten, die, wie für Phb1 gezeigt, CH-abhängig gebunden sind, lässt sich durch eine gestörte Substrattranslokation in der zentralen Pore erklären. Nukleotid-induzierte Konformationsänderungen führen zu einem gerichteten Transport der gebundenen Substrate in die proteolytische Kammer (Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Ist dieser Prozess gestört, kann es zwar zu einer Bindung von Substraten, nicht aber zu deren Abbau kommen. Ebenso könnte ein gestörter Translokationsprozess eine aktive Proteinentfaltung und damit eine Bindung von gefalteten Substratproteinen verhindern. In diesem Falle wird der Translokationsprozess an einer entfaltenen Sequenz initiiert und übt eine Zugkraft aus. Aufgrund der sterischen Hinderung der engen zentralen Pore kommt es bei dieser versuchten Translokation zu einer Entfaltung der angrenzenden Strukturen und durch die Kooperativität der Proteinfaltung zu einer kompletten Denaturierung des Substratproteins (Ortega *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2001; Kenniston *et al.*, 2003; Kenniston *et al.*, 2005). Im Falle von Cox2 würde also ein gestörter Translokationsmechanismus die Proteinentfaltung und als Konsequenz die Bindung an die Protease inhibieren.

Wie können Mutationen im YVG-Motiv die Translokation beeinflussen? Die räumliche Nähe eines Substrates und der Schlaufenstrukturen der zentralen Pore von AAA⁺-Proteinen konnte im Falle von ClpB und ClpA durch Quervernetzungsexperimente nachgewiesen werden (Schlieker *et al.*, 2004; Hinnerwisch *et al.*, 2005). Entsprechend könnte das YVG-Motiv direkt mit den Substratproteinen interagieren und durch ATP-abhängige Konformationsänderungen die Translokation bewirken. Für die prokaryotische AAA-Protease FtsH konnte allerdings im Gegensatz zu anderen AAA⁺-Proteinen ein Einfluss von Mutationen im Porenmotiv auf die ATPase-Aktivität festgestellt werden (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003; Hanson und Whiteheart, 2005). Dementsprechend könnten auch Mutationen des YVG-Motivs von Yme1 zu einer gestörten ATPase-Aktivität führen und, wie die Untersuchungen der ATPase-defizienten Yme1-Mutanten Yme1^{K327R} und Yme1^{E381Q} belegen, die beobachteten

Substratbindungsdefekte bewirken. Eine gestörte ATPase-Aktivität könnte auch die unerwartete Beeinträchtigung der Bindung von Cox2 durch Yme1^{E541Q}, das eine Mutation in dem konservierten Metallionenbindungsmotiv HEXXH trägt, erklären. Entsprechende Mutationen reduzieren die ATPase-Aktivität der *m*-AAA-Protease auf etwa 20% der Wildtyp-Aktivität (T. Tatsuta und S. Augustin, persönliche Mitteilung).

Die Funktionsanalysen zeigen demnach eine wichtige Rolle des zentralen Porenmotivs von Yme1 für die ATP-abhängige Entfaltung und Proteolyse von Substratproteinen und deuten darauf hin, dass membrangebundene Substrate aktiv durch die zentrale Pore in die proteolytische Kammer von AAA-Proteasen transportiert werden könnten.

4.3. Cox20 – ein Kofaktor für den Cox2-Abbau

Untersuchungen zur Spezifität der CH-Region führten zur Identifizierung von Cox20 als substratspezifischen Kofaktor der Proteolyse durch Yme1. Das konservierte Chaperon Cox20 bindet neu synthetisiertes Cox2 und vermittelt dessen proteolytische Reifung durch Imp1 (Hell *et al.*, 2000). Der überwiegende Teil des gereiften, nicht assemblierten Cox2 bleibt an Cox20 gebunden (Daten nicht gezeigt) (Hell *et al.*, 2000). Interessanterweise beeinflusste Cox20 den Cox2-Abbau durch Yme1. Im Wildtyp wurde Cox2 durch Cox20 gebunden und CH-unabhängig abgebaut. Nach genomischer Deletion von *COX20* konnte dagegen ein CH-abhängiger Abbau von Cox2 festgestellt werden. Waren sowohl Cox20 als auch die CH-Region von Yme1 abwesend, konnte kein Abbau von Cox2 beobachtet werden. Offenbar können Cox20 und die CH-Region die Proteolyse von Cox2 initiieren und weisen demnach eine überlappende Funktion auf. Die molekularen Wechselwirkungen zwischen Cox20 und Cox2 sind bisher nicht verstanden. Der Einfluss von Cox20 auf den Cox2-Abbauprozess lässt sich aber prinzipiell durch zwei Modelle erklären. In einer ersten Variante wird Cox2 durch die Interaktion mit Cox20 in einer Konformation gehalten, die nicht durch die CH-Region erkannt werden kann, eine direkte Bindung an die NH-Region und damit einen Abbau aber erlaubt. Dieses Modell schreibt Cox20 eine Funktion zu, die an den Wirkungsmechanismus des prokaryotischen Kofaktors RssB erinnert (Studemann *et al.*, 2003). Dieser ist am Abbau des alternativen Sigmafaktors σ^s beteiligt. Durch die Bindung wird eine Konformationsänderung in σ^s induziert, die zu einer Exposition einer Erkennungssequenz und damit zu einem Abbau durch ClpXP führt (Studemann *et al.*, 2003). Alternativ könnte Cox20 selbst an Yme1 binden und dadurch die lokale Konzentration an mitgeführtem Cox2 an der Protease

erhöhen. Dieses Szenario weist Parallelen zu der Funktionsweise des prokaryotischen Kofaktors SspB auf. Dieser interagiert durch seine N-terminale Substratbindedomäne mit SsrA-markierten Proteinen, bindet über eine C-terminale Region an ClpXP und bewirkt somit einen verstärkten Abbau dieser Substrate (Levchenko *et al.*, 2000; Wah *et al.*, 2003; Bolon *et al.*, 2004). Beide Modelle stehen mit der Beobachtung in Einklang, dass nach Entfaltung von Cox2 dessen Abbau CH-abhängig ist.

Die physiologische Relevanz dieser differentiellen Cox2-Erkennung durch Yme1 ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise kann eine Cox20-vermittelte Interaktion einem erleichterten Abbau dienen, so dass nicht assembliertes Cox2 bevorzugt aus der inneren Mitochondrienmembran durch die *i*-AAA-Protease entfernt wird. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung von Chaperonen anderer mitochondrial kodierter Proteine auf eine mögliche Funktion für die Proteolyse ihrer Substratproteine durch AAA-Proteasen interessant. So wurde für Mss51 eine Funktion sowohl als spezifischer Translationsfaktor als auch für die Bindung von nicht assembliertem Cox1 beschrieben und daher ein regulatorischer Rückkopplungsmechanismus postuliert (Perez-Martinez *et al.*, 2003). In diesem wird Mss51 durch eine Akkumulation von nicht assembliertem Cox1 an der Aktivierung der Translation gehindert. Um diese negative Rückkopplung aufzulösen, muss Mss51-gebundenes Cox1 assemblieren oder abgebaut werden. Ein durch Mss51 geförderter Abbau von Cox1 wäre daher für eine Reaktivierung der Cox1-Translation wünschenswert. Cox1 ist ein Substrat der *m*-AAA-Protease (Guélin *et al.*, 1996). Der Abbaumechanismus ist auch hier bisher nicht verstanden. Strukturell ist Cox1 durch zwölf Transmembrandomänen und durch das Fehlen von exponierten löslichen Domänen gekennzeichnet (Tsukihara *et al.*, 1996). Eine Mss51-vermittelte Substraterkennung der *m*-AAA-Protease erscheint daher als attraktives Modell.

In einer neueren Studie konnte zudem ein Protein, Mgr1, identifiziert werden, dass mit Yme1 interagieren kann und den Abbau des Modellsubstrates Yta10(1-161)-DHFR^{mut} beeinflusst. Möglicherweise erfüllt dieses nur in Pilzen vorkommende Protein hier ebenfalls eine Kofaktorfunktion (Dunn *et al.*, 2006).

4.4. Modell für den Abbau von Substratproteinen durch die *i*-AAA-Protease

Die Funktionen der CH- und NH-Regionen sowie die mögliche Rolle des YVG-Motivs für den Abbau von Substratproteinen durch die *i*-AAA-Protease sollen im Nachfolgenden anhand eines Modells zusammengefasst werden (Abb. 29). Innerhalb dieses Modells können prinzipiell drei Schritte unterschieden werden: die Substratbindung, die Entfaltung bzw. Translokation und die Proteolyse von Substraten. Die Schritte sind dabei allerdings nicht immer klar voneinander zu trennen, denn insbesondere die Bindung von Cox2 kann auch eine aktive Entfaltung und eine nachfolgende CH-Bindung beinhalten.

Substratbindung

Im Wildtyp wird neu synthetisiertes Cox2 durch Cox20 gebunden und in seiner Faltung unterstützt. Cox20 hält dabei Cox2 in einer bindungskompetenten Konformation bzw. erhöht durch direkte Interaktion mit Yme1 die Substratkonzentration an der Protease. Unter diesen Bedingungen bindet Cox2 direkt an die NH-Region (1). Unstrukturierte Sequenzen des Substrates können dann in die zentrale Pore inseriert werden, und ATP-induzierte Konformationsänderungen bewirken eine aktive Entfaltung von Cox2 (4). Die Substratentfaltung geht dabei nicht immer mit einer Translokation einher und denaturiertes Cox2 kann durch die Interaktion mit der CH-Region für eine erneute Bindung an die NH-Region an der Protease gehalten werden (2).

In Abwesenheit von Cox20 oder bei Entfaltung wird Cox2 initial durch die CH-Region an Yme1 gebunden (2). Das CH-gebundene Substrat kann dann mit der NH-Region interagieren und wird in die zentrale Pore inseriert (4). In gleicher Weise werden periphere Membranproteine zuerst an die CH-Region gebunden und dann über die NH-Region in die zentrale Pore eingeführt (3 und 5).

Dieses Modell zeigt somit zwei alternative Bindungswege für Substratproteine an der *i*-AAA-Protease auf. Erstens einen CH-abhängigen Weg, der für entfaltete und periphere Membranproteine gilt, und zweitens einen CH-unabhängigen Weg, der durch eine direkte Interaktion von gefaltetem Cox2 mit der NH-Region charakterisiert ist. Für die initiale Bindung von entfaltenen Substratproteinen über den ersten Bindungsweg sind demnach die CH- und NH-Regionen nicht gleich bedeutend. Damit wird die Beobachtung berücksichtigt, dass eine intakte NH-Region zwar für die Proteolyse notwendig ist, aber eine Bindung in Abwesenheit der Yme1-CH-Region von entfaltenen Substraten an die NH-Region nicht direkt

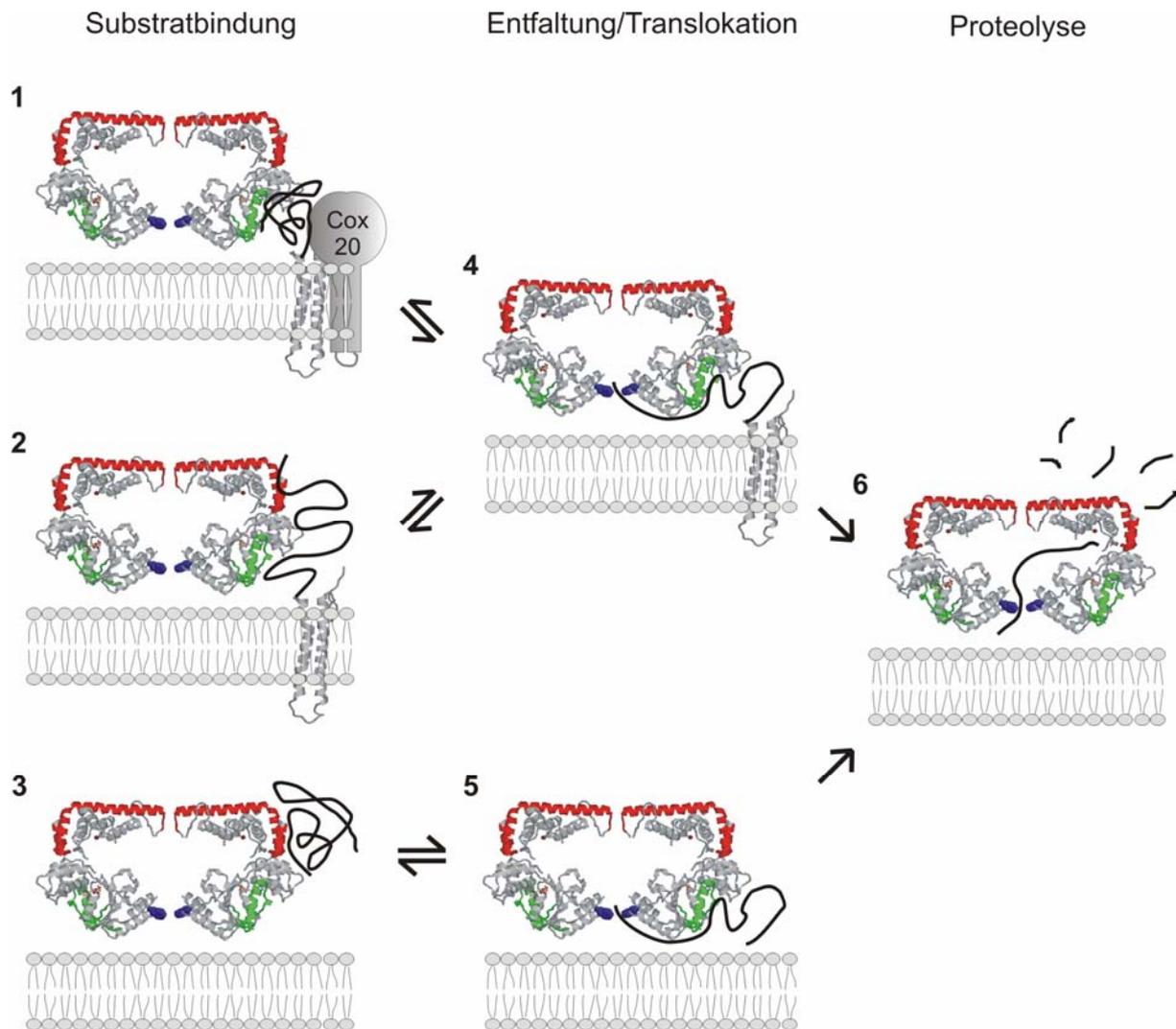


Abb. 29: Modell des Abbaus von Substratproteinen durch die *i*-AAA-Protease. Beschreibung siehe Text. Die CH-Region ist in rot, die NH-Region in grün und Y354 des Porenmotivs YVG raumfüllend in blau dargestellt. Die *i*-AAA-Protease ist basierend auf den Strukturdaten von FtsH aus *T. maritima* durch zwei gegenüberliegende Untereinheiten des hexameren Ringkomplexes symbolisiert (Bieniossek *et al.*, 2006). Die eigentliche Membranverankerung der AAA-Proteasen wird durch die Nähe zur Membran angedeutet.

beobachtet werden konnte. Dies ist möglicherweise auf eine niedrige Substrataffinität oder auf einen schnellen, ATP-induzierten Wechsel zwischen einem hoch- und niederaffinen Zustand der NH-Region zurückzuführen. In beiden Fällen könnten Substratproteine nur transient mit der NH-Region interagieren. Dies könnte durch eine Holdase-Funktion der CH-Region kompensiert werden, die entfaltete oder periphere Membranproteine in der Nähe der NH-Region hält und dadurch eine produktive bzw. wiederholte Interaktion zwischen den Substraten und der NH-Region ermöglicht.

Entfaltung/Translokation

Interagieren die gebundenen Substratproteine über unstrukturierte Sequenzen mit der zentralen Pore, kann die Translokation initiiert werden (4 und 5). Eine direkte Bindung der Substrate an das YVG-Motiv der Pore, wie es für andere AAA⁺-Proteine nahe gelegt wird, wäre dabei möglich (Schlieker *et al.*, 2004; Hinnerwisch *et al.*, 2005). Durch ATP-induzierte Konformationsänderung, an denen auch das YVG-Motiv beteiligt sein könnte, wird dann eine gerichtete Zugkraft auf das gebundene Substrat ausgeübt und es kann aufgrund der sterischen Zwänge z. B. der engen zentralen Pore zu einer Proteinentfaltung kommen. Das entfaltete Substrat kann nachfolgend durch Translokation in die proteolytische Kammer eingeführt werden.

Auf welche Weise Substrate an die zentrale Pore des Ringkomplexes von AAA-Proteasen gelangen, ist bisher nicht geklärt. Neben anderen sind hierzu zwei Modelle vorstellbar. In einem ersten Modell werden unstrukturierte Sequenzen lateral in den Ringkomplex zwischen den AAA-Domänen und der Membran eingefädelt (*threading model*) (Nolden *et al.*, 2006), wie es in Abbildung 30 angedeutet ist. Daneben könnten Substrate über eine laterale Öffnung des Ringkomplexes von AAA-Proteasen in die Pore eingeführt werden (*lateral opening model*) (Nolden *et al.*, 2006). Ein ähnlicher Mechanismus wird für die DNA-Bindung von ringförmigen Helicasen beschrieben (Ahnert *et al.*, 2000). Die Translokation von Substratproteinen kann auch eine Dislokation von Transmembran- und löslichen Domänen, die auf der gegenüberliegenden Membranseite lokalisiert sein können, durch die Membran beinhalten (Kihara *et al.*, 1999; Leonhard *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus ist im Einzelnen ebenfalls nicht verstanden. Verschiedene Experimente deuten aber darauf hin, dass die Transmembrandomänen der AAA-Proteasen selbst eine Dislokationspore formen könnten und Substrate über diese aus der Membran in die proteolytische Kammer gezogen werden (Akiyama und Ito, 2003; Korbel *et al.*, 2004).

Proteolyse

Durch die Translokation wird das Substratprotein in die proteolytische Kammer der AAA-Protease eingeführt. Hier kommt es dann zu einem prozessiven Abbau der Polypeptidkette und zu einer Freisetzung der generierten Peptidfragmente von der Protease (6).

Wie lässt sich dieses Modell des Proteinabbaus durch AAA-Proteasen mit den Bindungsmechanismen von löslichen ATP-abhängigen Proteasen vergleichen? Beiden gemeinsam ist die essentielle Rolle des @XG-Motivs für die Translokation von

Substratproteinen durch die zentrale Pore in die proteolytische Kammer (Song *et al.*, 2000; Yamada-Inagawa *et al.*, 2003; Hinnerwisch *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Für die prokaryotische Protease ClpXP konnte für dieses Motiv zusätzlich eine Funktion bei der spezifischen Erkennung von bestimmten Sequenzmotiven beobachtet werden (Siddiqui *et al.*, 2004). Daneben sind akzessorische Domänen wie die N-Domänen von ClpXP und ClpAP sowie die I-Domäne von HslUV offenbar an der Substratbindung beteiligt (Song *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Wojtyra *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2004; Hinnerwisch *et al.*, 2005). Deren Positionierung in axialer Verlängerung des Komplexes dient wahrscheinlich dazu, Substrat in der Nähe der zentralen Pore zu binden und eine Initiation des Translokationsprozesses zu erleichtern. Aufgrund der Membranverankerung lässt sich eine solche Position der Substratbindestellen für AAA-Proteasen wahrscheinlich nicht beobachten. Hier ist die relative Orientierung der Protease und der membrangebundenen Substrate auf die Ebene der Membran beschränkt. Folglich ist die seitliche Oberflächenexposition der CH- und NH-Region ideal für die Bindung solcher Substrate geeignet. Daneben kann die sechsfach größere Anzahl der CH- und NH-Bindungsstellen gegenüber einer zentralen Pore in AAA-Proteasen eine hohe Bindungskapazität bewirken. Insbesondere in Hinblick auf die geringe Unfoldase-Aktivität von bakteriellen AAA-Proteasen könnte dies einer optimalen Auslastung der geschwindigkeitsbestimmenden Substratentfaltung und -translokation durch die zentrale Pore dienen (Herman *et al.*, 2003).

4.5. Ausblick

Die Identifizierung von definierten Substratbinderegionen in der *i*-AAA-Protease Yme1 aus *S. cerevisiae* ermöglicht es, in zukünftigen Experimenten die molekularen Grundlagen der Substratbindung von AAA-Proteasen weitergehend zu analysieren. So lassen sich basierend auf der Struktur der CH-Region gezielt wichtige Aminosäurereste für die Substratbindung durch gerichtete Mutagenese ermitteln und damit die Bindungseigenschaften dieser Region detailliert untersuchen. Zum anderen könnten mögliche Erkennungsmotive in den Substratproteinen identifiziert werden. Insbesondere der Befund einer divergierenden Spezifität der CH-Regionen der homologen AAA-Proteasen Yme1 und IAP-1 könnte auf eine sequenzspezifische Erkennung von Substratproteinen hindeuten. In dieser Hinsicht wäre es besonders interessant, die Bindungsspezifitäten der CH-Regionen von Untereinheiten heterooligomerer AAA-Proteasen zu untersuchen. Die CH-Regionen könnten die Grundlage

von möglicherweise unterschiedlichen Substratspektren dieser Untereinheiten bilden und damit eine Erklärung für einen heterooligomeren Aufbau solcher AAA-Proteasen liefern. Darüber hinaus könnte dies letztlich zur Identifizierung von spezifischen Substraten verschiedener Komplexe führen. Möglicherweise können solche unterschiedlichen Substratspektren gewebespezifische Defekte in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease-Untereinheit Paraplegin in Säugern erklären (Fink, 2003; Ferreirinha *et al.*, 2004).

5. Zusammenfassung

ATP-abhängige Proteasen der AAA⁺-Proteinfamilie vermitteln die energieabhängige Proteolyse zellulärer Proteine. Zwei hochkonservierte AAA-Proteasen in der inneren Mitochondrienmembran üben wichtige Funktionen bei der mitochondrialen Qualitätskontrolle und Biogenese aus. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Substraterkennung von AAA-Proteasen sind allerdings kaum verstanden. Zur Identifizierung und funktionalen Charakterisierung von Substratbindestellen sollte daher die *i*-AAA-Protease Yme1 aus *S. cerevisiae* untersucht werden.

In dieser Arbeit konnten zwei Substratbinderegionen in Yme1 identifiziert werden, die in der Kristallstruktur einer homologen AAA-Protease den hexameren Ringkomplex an der Oberfläche käfigartig umfassen. Die Substitution von konservierten, negativ geladenen Resten innerhalb einer überwiegend α -helikalen Region am N-Terminus der AAA-Domäne (NH-Region) führte zu einer gestörten Substratbindung an diese Region und zu einem generellen Defekt der Proteolyse. Eine zweite Bindestelle wurde durch Domänen-austauschexperimente zwischen Yme1 und der orthologen AAA-Protease IAP-1 aus *N. crassa* identifiziert. Diese Region setzte sich aus konservierten C-terminalen α -Helices der proteolytischen Domäne zusammen (CH-Region) und vermittelte die Proteolyse von Substratproteinen in Abhängigkeit von deren Faltungszustand und Membraninsertion sowie einem substratspezifischen Faktor.

Des Weiteren wurde die Funktion des konservierten YVG-Motivs, das in der zentralen Pore von hexameren AAA⁺-Ringstrukturen lokalisiert ist, für den Abbau von Membranproteinen durch Yme1 über Mutationsanalyse untersucht. Eine hydrophile Substitution von Y354 bewirkte dabei substratspezifische Defekte bei der Bindung von Substratproteinen. Diese führen wahrscheinlich auch zu der beobachteten Abhängigkeit der proteolytischen und *in vivo*-Aktivität der Protease von Aminosäureresten mit hoher Hydrophobizität an dieser Position.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen ein Modell von alternativen Bindungswegen für die Substratinteraktion von AAA-Proteasen nahe, in dem entfaltete Substrate sequentiell mit zwei oberflächenexponierten Bindestellen interagieren können, bevor sie durch die zentrale Pore des AAA-Rings in die proteolytische Kammer transloziert werden. Die Identifizierung von definierten Substratbindestellen erlaubt es nun, in weiteren Experimenten die molekularen Grundlagen der Substraterkennung durch AAA-Proteasen detailliert zu bestimmen.

6. Literaturverzeichnis

- Ahnert, P., Picha, K. M., and Patel, S. S. (2000). A ring-opening mechanism for DNA binding in the central channel of the T7 helicase-primase protein. *EMBO J.* *19*, 3418-3427.
- Akiyama, Y., and Ito, K. (2003). Reconstitution of membrane proteolysis by FtsH. *J. Biol. Chem.* *278*, 18146-18153.
- Ang, X. L., and Wade Harper, J. (2005). SCF-mediated protein degradation and cell cycle control. *Oncogene* *24*, 2860-2870.
- Ardley, H. C., and Robinson, P. A. (2005). E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem.* *41*, 15-30.
- Arendt, C. S., and Hochstrasser, M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *94*, 7156-7161.
- 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.
- Asahara, Y., Atsuta, K., Motohashi, K., Taguchi, H., Yohda, M., and Yoshida, M. (2000). FtsH recognizes proteins with unfolded structure and hydrolyzes the carboxyl side of hydrophobic residues. *J. Biochem. (Tokyo)* *127*, 931-937.
- 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.
- Banecki, B., Wawrzynow, A., Puzewicz, J., Georgopoulos, C., and Zylicz, M. (2001). Structure-function analysis of the zinc-binding region of the ClpX molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* *276*, 18843-18848.
- Barrientos, A., Zambrano, A., and Tzagoloff, A. (2004). Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* *23*, 3472-3482.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* *92*, 367-380.
- 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* *103*, 3066-3071.
- Blaszczak, A., Georgopoulos, C., and Liberek, K. (1999). On the mechanism of FtsH-dependent degradation of the sigma 32 transcriptional regulator of *Escherichia coli* and the role of the Dnak chaperone machine. *Mol. Microbiol.* *31*, 157-166.
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H. K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., and Huber, R. (2000). The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature* *403*, 800-805.
- Bolon, D. N., Wah, D. A., Hersch, G. L., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2004). Bivalent tethering of SspB to ClpXP is required for efficient substrate delivery: a protein-design study. *Mol. Cell* *13*, 443-449.

- Brown, N. G., Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1994). Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial *COX3* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 1045-1053.
- Burger, G., Gray, M. W., and Lang, B. F. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* *19*, 709-716.
- Campbell, C. L., Tanaka, N., White, K. H., and Thorsness, P. E. (1994). Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by *yme1* are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol. Biol. Cell* *5*, 899-905.
- 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.
- Chen, P., and Hochstrasser, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* *86*, 961-972.
- Chiba, S., Akiyama, Y., Mori, H., Matsuo, E., and Ito, K. (2000). Length recognition at the N-terminal tail for the initiation of FtsH-mediated proteolysis. *EMBO Rep.* *1*, 47-52.
- Chiba, S., Akiyama, Y., and Ito, K. (2002). Membrane protein degradation by FtsH can be initiated from either end. *J. Bacteriol.* *184*, 4775-4782.
- Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1988). Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *85*, 2677-2681.
- de Vrij, F. M., Fischer, D. F., van Leeuwen, F. W., and Hol, E. M. (2004). Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog. Neurobiol.* *74*, 249-270.
- 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.
- Dobson, C. M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* *15*, 3-16.
- Donaldson, L. W., Wojtyra, U., and Houry, W. A. (2003). Solution structure of the dimeric zinc binding domain of the chaperone ClpX. *J. Biol. Chem.* *278*, 48991-48996.
- Dougan, D. A., Reid, B. G., Horwich, A. L., and Bukau, B. (2002). ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol. Cell* *9*, 673-683.
- Dunn, C. D., Lee, M. S., Spencer, F. A., and Jensen, R. E. (2006). A genomewide screen for petite-negative yeast strains yields a new subunit of the *i*-AAA protease complex. *Mol. Biol. Cell* *17*, 213-226.
- Elleuch, N., Depienne, C., Benomar, A., Hernandez, A. M., Ferrer, X., Fontaine, B., Grid, D., Tallaksen, C. M., Zemmouri, R., Stevanin, G., *et al.* (2006). Mutation analysis of the paraplegin gene (SPG7) in patients with hereditary spastic paraplegia. *Neurology* *66*, 654-659.
- Erbse, A., Schmidt, R., Bornemann, T., Schneider-Mergener, J., Mogk, A., Zahn, R., Dougan, D. A., and Bukau, B. (2006). ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*. *Nature* *439*, 753-756.
- Esser, C., Alberti, S., and Hohfeld, J. (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta* *1695*, 171-188.
- 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.

- Feldman, D. E., and Frydman, J. (2000). Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 26-33.
- 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.
- Fink, J. K. (2003). Advances in the hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol* *184 Suppl 1*, S106-110.
- Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y. I., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2003). Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol. Cell* *11*, 671-683.
- 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.
- Funes, S., Nargang, F. E., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2004). The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1853-1861.
- Gandhi, S., and Wood, N. W. (2005). Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 2749-2755.
- 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.
- Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* *82*, 373-428.
- Gorbea, C., Taillandier, D., and Rechsteiner, M. (1999). Assembly of the regulatory complex of the 26S proteasome. *Mol. Biol. Rep.* *26*, 15-19.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., and Sauer, R. T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* *12*, 1338-1347.
- Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* *2*, REVIEWS1018.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* *386*, 463-471.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* *11*, 1062-1067.
- Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T., and Huber, R. (2005). Molecular machines for protein degradation. *ChemBiochem.* *6*, 222-256.
- 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.
- Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* *18*, 2714-2723.
- Guo, F., Esser, L., Singh, S. K., Maurizi, M. R., and Xia, D. (2002). Crystal structure of the heterodimeric complex of the adaptor, ClpS, with the N-domain of the AAA+ chaperone, ClpA. *J. Biol. Chem.* *277*, 46753-46762.

- 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.
- 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. (1983). Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet Neurol.* *1*, 1151-1155.
- Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* *295*, 1852-1858.
- He, S., and Fox, T. D. (1997). Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol. Biol. Cell.* *8*, 1449-1460.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., and Wolf, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* *272*, 25200-25209.
- Heinemeyer, W., Ramos, P. C., and Dohmen, R. J. (2004). The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 1562-1578.
- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W., and Stuart, R. A. (1997). Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett.* *418*, 367-370.
- Hell, K., Tzagoloff, A., Neupert, W., and Stuart, R. A. (2000). Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J. Biol. Chem.* *275*, 4571-4578. Order.
- Herman, C., Thevenet, D., Bouloc, P., Walker, G. C., and D'Ari, R. (1998). Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev.* *12*, 1348-1355.
- Herman, C., Prakash, S., Lu, C. Z., Matouschek, A., and Gross, C. A. (2003). Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH. *Mol. Cell* *11*, 659-669.
- Herrmann, J. M., and Funes, S. (2005). Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* *354*, 43-52.
- 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.
- Hinnerwisch, J., Reid, B. G., Fenton, W. A., and Horwich, A. L. (2005). Roles of the N-domains of the ClpA unfoldase in binding substrate proteins and in stable complex formation with the ClpP protease. *J. Biol. Chem.* *280*, 40838-40844.
- Hoskins, J. R., Yanagihara, K., Mizuuchi, K., and Wickner, S. (2002). ClpAP and ClpXP degrade proteins with tags located in the interior of the primary sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *99*, 11037-11042.
- Hoskins, J. R., and Wickner, S. (2006). Two peptide sequences can function cooperatively to facilitate binding and unfolding by ClpA and degradation by ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *103*, 909-914.
- Huang, L., Kirmizialtin, S., and Makarov, D. E. (2005). Computer simulations of the translocation and unfolding of a protein pulled mechanically through a pore. *J. Chem. Phys.* *123*, 124903.
- Ishikawa, T., Beuron, F., Kessel, M., Wickner, S., Maurizi, M. R., and Steven, A. C. (2001). Translocation pathway of protein substrates in ClpAP protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *98*, 4328-4333.

- Ishikawa, T., Maurizi, M. R., and Steven, A. C. (2004). The N-terminal substrate-binding domain of ClpA unfoldase is highly mobile and extends axially from the distal surface of ClpAP protease. *J. Struct. Biol.* *146*, 180-188.
- Ito, K., and Akiyama, Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Ann. Rev. Microbiol.* *59*, 211-231.
- 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.
- Jenal, U., and Hengge-Aronis, R. (2003). Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 163-172.
- 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.
- 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, S. G., Dimitrova, M. N., Ortega, J., Ginsburg, A., and Maurizi, M. R. (2005). Human mitochondrial ClpP is a stable heptamer that assembles into a tetradecamer in the presence of ClpX. *J Biol Chem* *280*, 35424-35432.
- 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.
- 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.
- Keiler, K. C., Waller, P. R., and Sauer, R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* *271*, 990-993.
- Kenniston, J. A., Baker, T. A., Fernandez, J. M., and Sauer, R. T. (2003). Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine. *Cell* *114*, 511-520.
- Kenniston, J. A., Burton, R. E., Siddiqui, S. M., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2004). Effects of local protein stability and the geometric position of the substrate degradation tag on the efficiency of ClpXP denaturation and degradation. *J. Struct. Biol.* *146*, 130-140.
- Kenniston, J. A., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2005). Partitioning between unfolding and release of native domains during ClpXP degradation determines substrate selectivity and partial processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *102*, 1390-1395.
- 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.
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1995). FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 4532-4536.
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1999). Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J.* *18*, 2970-2981.
- Kim, D. Y., and Kim, K. K. (2003). Crystal structure of ClpX molecular chaperone from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* *278*, 50664-50670.
- Kim, Y. I., Burton, R. E., Burton, B. M., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2000). Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol. Cell* *5*, 639-648.

- 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.
- Kobiler, O., Koby, S., Teff, D., Court, D., and Oppenheim, A. B. (2002). The phage lambda CII transcriptional activator carries a C-terminal domain signaling for rapid proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *99*, 14964-14969.
- Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L., and Finley, D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol. Cell* *7*, 1143-1152.
- Kolodziejczak, M., Kolaczowska, A., Szczesny, B., Urantowka, A., Knorpp, C., Kieleczawa, J., and Janska, H. (2002). A higher plant mitochondrial homologue of the yeast *m*-AAA protease. Molecular cloning, localization, and putative function. *J. Biol. Chem.* *277*, 43792-43798.
- 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.
- Krause, K., Lopes de Souza, R., Roberts, D. G., and Dieckmann, C. L. (2004). The mitochondrial message-specific mRNA protectors Cbp1 and Pet309 are associated in a high-molecular weight complex. *Mol. Biol. Cell.* *15*, 2674-2683.
- Kremmidiotis, G., Gardner, A. E., Settasatian, C., Savoia, A., Sutherland, G. R., and Callen, D. F. (2001). Molecular and functional analyses of the human and mouse genes encoding AFG3L1, a mitochondrial metalloprotease homologous to the human spastic paraplegia protein. *Genomics* *76*, 58-65.
- 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.
- Kwon, A. R., Kessler, B. M., Overkleeft, H. S., and McKay, D. B. (2003). Structure and reactivity of an asymmetric complex between HslV and I-domain deleted HslU, a prokaryotic homolog of the eukaryotic proteasome. *J. Mol. Biol.* *330*, 185-195.
- Kwon, A. R., Trame, C. B., and McKay, D. B. (2004). Kinetics of protein substrate degradation by HslUV. *J. Struct. Biol.* *146*, 141-147.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Langer, T. (2000). AAA proteases - cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 207-256.
- 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.
- Layfield, R., Lowe, J., and Bedford, L. (2005). The ubiquitin-proteasome system and neurodegenerative disorders. *Essays Biochem.* *41*, 157-171.
- 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, 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.
- Lee, Y. Y., Chang, C. F., Kuo, C. L., Chen, M. C., Yu, C. H., Lin, P. I., and Wu, W. F. (2003). Subunit oligomerization and substrate recognition of the *Escherichia coli* ClpYQ (HslUV) protease implicated by in vivo protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *J. Bacteriol.* *185*, 2393-2401.

- Lemaire, C., Hamel, P., Velours, J., and Dujardin, G. (2000). Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F₀-ATPase subunit accumulation in an *oxal1* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 23471-23475.
- 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.
- Levchenko, I., Smith, C. K., Walsh, N. P., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (1997). PDZ-like domains mediate binding specificity in the Clp/Hsp100 family of chaperones and protease regulatory subunits. *Cell* *91*, 939-947.
- Levchenko, I., Seidel, M., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2000). A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine. *Science* *289*, 2354-2356.
- Lindholm, D., Eriksson, O., and Korhonen, L. (2004). Mitochondrial proteins in neuronal degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* *321*, 753-758.
- Liu, C. W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N., and Thomas, P. J. (2003). Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* *299*, 408-411.
- 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.
- Lupas, A. N., and Martin, J. (2002). AAA proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *12*, 746-753.
- Manthey, G. M., and McEwen, J. E. (1995). The product of the nuclear gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *14*, 4031-4043.
- Manthey, G. M., Przybyla-Zawislak, B. D., and McEwen, J. E. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Eur. J. Biochem.* *255*, 156-161.
- Martin, A., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2005). Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* *437*, 1115-1120.
- McClellan, A. J., Tam, S., Kaganovich, D., and Frydman, J. (2005). Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat. Cell. Biol.* *7*, 736-741.
- Meriin, A. B., and Sherman, M. Y. (2005). Role of molecular chaperones in neurodegenerative disorders. *Int. J. Hyperthermia* *21*, 403-419.
- Miller, J., and Gordon, C. (2005). The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett.* *579*, 3224-3230.
- Mock, W. L., and Stanford, D. J. (1996). Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry* *35*, 7369-7377.
- Mulero, J. J., and Fox, T. D. (1993). Alteration of the *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111. *Mol Biol Cell* *4*, 1327-1335.
- Mulero, J. J., and Fox, T. D. (1993). *PET111* acts in the 5'-leader of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial COX2 mRNA to promote its translation. *Genetics* *133*, 509-516.

- Naithani, S., Saracco, S. A., Butler, C. A., and Fox, T. D. (2003). Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *14*, 324-333.
- Nakai, T., Yasuhara, T., Fujiki, Y., and Ohashi, A. (1995). Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for the degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome *c* oxidase in yeast mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4441-4452.
- Nargang, F. E., Preuss, M., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2002). The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* *277*, 12846-12853.
- Navon, A., and Goldberg, A. L. (2001). Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. *Mol. Cell* *8*, 1339-1349.
- Neher, S. B., Flynn, J. M., Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2003). Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev.* *17*, 1084-1089.
- Neupert, W., and Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 555-565.
- 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.
- Nijtmans, L. G., Taanman, J. W., Muijsers, A. O., Speijer, D., and Van den Bogert, C. (1998). Assembly of cytochrome-*c* oxidase in cultured human cells. *Eur. J. Biochem.* *254*, 389-394.
- 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., *Topics Curr. Gen.* *16*, 119-147.
- 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.
- Ohlmeier, S., Kastaniotis, A. J., Hiltunen, J. K., and Bergmann, U. (2004). The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J. Biol. Chem.* *279*, 3956-3979.
- Okuno, T., Yamanaka, K., and Ogura, T. (2006). An AAA protease FtsH can initiate proteolysis from internal sites of a model substrate, apo-flavodoxin. *Genes Cells* *11*, 261-268.
- Okuno, T., Yamanaka, K., and Ogura, T. (2006). Characterization of mutants of the *Escherichia coli* AAA protease, FtsH, carrying a mutation in the central pore region. *J. Struct. Biol.*
- 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.

- Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N., and Herrmann, J. M. (2006). Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *Embo J.*
- 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.
- Park, E., Rho, Y. M., Koh, O. J., Ahn, S. W., Seong, I. S., Song, J. J., Bang, O., Seol, J. H., Wang, J., Eom, S. H., and Chung, C. H. (2005). Role of the GYVG pore motif of HslU ATPase in protein unfolding and translocation for degradation by HslV peptidase. *J. Biol. Chem.* 280, 22892-22898.
- Paschen, S. A., Neupert, W., and Rapaport, D. (2005). Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 30, 575-582.
- 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.
- Pelham, H. R., and Jackson, R. J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67, 247-256.
- Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., and Fox, T. D. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22, 5951-5961.
- Petroski, M. D., and Deshaies, R. J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 9-20.
- 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.
- Pines, J., and Lindon, C. (2005). Proteolysis: anytime, any place, anywhere? *Nat. Cell. Biol.* 7, 731-735.
- Piszczek, G., Rozycki, J., Singh, S. K., Ginsburg, A., and Maurizi, M. R. (2005). The molecular chaperone, ClpA, has a single high affinity peptide binding site per hexamer. *J. Biol. Chem.* 280, 12221-12230.
- 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.
- Rape, M., and Jentsch, S. (2004). Productive RUpture: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1695, 209-213.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248, 183-228.
- 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.
- 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.
- Rudiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *Embo J.* 16, 1501-1507.
- Sakamoto, W. (2006). Protein Degradation Machineries in Plastids. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57, 599-621.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Saracco, S. A., and Fox, T. D. (2002). Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane. *Mol. Biol. Cell* *13*, 1122-1131.
- 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.
- Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A., and Lindquist, S. (1996). Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 289-296.
- 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, M., Lupas, A. N., and Finley, D. (1999). Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *3*, 584-591.
- 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.
- 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.
- Sharon, M., Witt, S., Felderer, K., Rockel, B., Baumeister, W., and Robinson, C. V. (2006). 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation. *J. Biol. Chem.* *281*, 9569-9575.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* *350*, 3-41.
- Shotland, Y., Teff, D., Koby, S., Kobilier, O., and Oppenheim, A. B. (2000). Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *299*, 953-964.
- Shringarpure, R., Grune, T., and Davies, K. J. (2001). Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 1442-1450.
- Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J., and Davies, K. J. (2003). Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* *278*, 311-318.
- 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.
- Singh, S. K., Grimaud, R., Hoskins, J. R., Wickner, S., and Maurizi, M. R. (2000). Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *97*, 8898-8903.
- Singh, S. K., Rozycki, J., Ortega, J., Ishikawa, T., Lo, J., Steven, A. C., and Maurizi, M. R. (2001). Functional domains of the ClpA and ClpX molecular chaperones identified by limited proteolysis and deletion analysis. *J. Biol. Chem.* *276*, 29420-29429.
- Smith, D. M., Kafri, G., Cheng, Y., Ng, D., Walz, T., and Goldberg, A. L. (2005). ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol. Cell.* *20*, 687-698.
- Smith, K. C., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (1999). Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 6678-6682.

- Song, H. K., Hartmann, C., Ramachandran, R., Bochtler, M., Behrendt, R., Moroder, L., and Huber, R. (2000). Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 14103-14108.
- 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.
- Souza, R. L., Green-Willms, N. S., Fox, T. D., Tzagoloff, A., and Nobrega, F. G. (2000). Cloning and characterization of COX18, a *Saccharomyces cerevisiae* PET gene required for assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 275, 14898-14902.
- Spiess, C., Meyer, A. S., Reissmann, S., and Frydman, J. (2004). Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends Cell Biol.* 14, 598-604.
- 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.
- Studemann, A., Noirclerc-Savoye, M., Klauck, E., Becker, G., Schneider, D., and Hengge, R. (2003). Sequential recognition of two distinct sites in sigma(S) by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX. *Embo J.* 22, 4111-4120.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2003). Ribosome binding to the Oxal complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* 22, 6448-6457.
- Tatsuta, T., Joob, D. M., Calendar, R., Akiyama, Y., and Ogura, T. (2000). Evidence for an active role of the DnaK chaperone system in the degradation of sigma(32). *FEBS Lett.* 478, 271-275.
- 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., Schnall, R., Pajic, A., Langer, T., and Feldmann, H. (1994). Yta10p, a member of a novel ATPase family in yeast, is essential for mitochondrial function. *FEBS Lett.* 353, 197-200.
- 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.
- Tian, L., Holmgren, R. A., and Matouschek, A. (2005). A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF-kappaB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1045-1053.
- 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.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136-1144.
- Tzagoloff, A., 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.

- Urantowka, A., Knorpp, C., Olczak, T., Kolodziejczak, M., and Janska, H. (2005). Plant mitochondria contain at least two i-AAA-like complexes. *Plant Mol Biol* 59, 239-252.
- Vallee, B. L., and Auld, D. S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29, 5647-5659.
- Vestweber, D., and Schatz, G. (1988). Point mutations destabilizing a precursor protein enhance its post-translational import into mitochondria. *EMBO J.* 7, 1147-1151.
- Wah, D. A., Levchenko, I., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2002). Characterization of a specificity factor for an AAA+ ATPase: assembly of SspB dimers with *ssrA*-tagged proteins and the ClpX hexamer. *Chem. Biol.* 9, 1237-1245.
- Wah, D. A., Levchenko, I., Rieckhof, G. E., Bolon, D. N., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2003). Flexible linkers leash the substrate binding domain of SspB to a peptide module that stabilizes delivery complexes with the AAA+ ClpXP protease. *Mol. Cell.* 12, 355-363.
- 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, J., Song, J. J., Seong, I. S., Franklin, M. C., Kamtekar, S., Eom, S. H., and Chung, C. H. (2001). Nucleotide-dependent conformational changes in a protease-associated ATPase HslU. *Structure* 9, 1107-1116.
- Weber-Ban, E. U., Reid, B., Miranker, A. D., and Horwich, A. L. (1999). Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* 401, 90-93.
- Weber, E. R., Rooks, R. S., Shafer, K. S., Chase, J. W., and Thorsness, P. E. (1995). Mutations in the mitochondrial ATP synthase gamma subunit suppress a slow-growth phenotype of *yme1* yeast lacking mitochondrial DNA. *Genetics* 140, 435-442.
- Weber, E. R., Hanekamp, T., and Thorsness, P. E. (1996). Biochemical and functional analysis of the *YME1* gene product, an ATP and zinc-dependent mitochondrial protease from *S. cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 7, 307-317.
- Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 169-178.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., and Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 14473-14476.
- Wojtyra, U. A., Thibault, G., Tuite, A., and Houry, W. A. (2003). The N-terminal zinc binding domain of ClpX is a dimerization domain that modulates the chaperone function. *J. Biol. Chem.* 278, 48981-48990.
- Wolf, D. H., and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta.* 1695, 19-31.
- Xia, D., Esser, L., Singh, S. K., Guo, F., and Maurizi, M. R. (2004). Crystallographic investigation of peptide binding sites in the N-domain of the ClpA chaperone. *J. Struct. Biol.* 146, 166-179.
- 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.
- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., and Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 781-791.
- Young, L., Leonhard, K., Tatsuta, T., Trowsdale, J., and Langer, T. (2001). Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* 291, 2135-2138.

- Zeth, K., Ravelli, R. B., Paal, K., Cusack, S., Bukau, B., and Dougan, D. A. (2002). Structural analysis of the adaptor protein ClpS in complex with the N-terminal domain of ClpA. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 906-911.
- 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, Y., Gottesman, S., Hoskins, J. R., Maurizi, M. R., and Wickner, S. (2001). The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev.*, 627-637.
- Zwickl, P., Baumeister, W., and Steven, A. (2000). Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 242-250.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AAA	“ATPases associated with a variety of cellular activities“
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Amoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CH	C-terminale Helices
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli (E.c.)</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	“green fluorescent protein“
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
Ha	Hämagglutinin (-Epitop)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonat
<i>H. sapiens (H.s.)</i>	<i>Homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin G
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
MgAc	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonat
mRNA	”messenger“ RNA
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid

NADH	Nicotinamiddinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
ng	Nanogramm
NH	N-terminale Helices
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offenes Leseraster („open reading frame“)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein-A-Sepharose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pmol	Picomol pro Liter
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i> (<i>S.c.</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SRH	”second region of homology“
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
<i>T. maritima</i> (<i>T.m.</i>)	<i>Thermotoga maritima</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit(s)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
YP	„yeast extract-peptone“

8. Anhang

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Nolden, M., Kisters-Woike, B., Langer, T., and Graef, M. (2006)

„Quality control of proteins in the mitochondrion“

Topics in Current Genetics, *16*, 119-147.

Abstract:

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

Graef, M. and Langer, T. (2006)

“Substrate specific consequences of central pore mutations in the *i*-AAA protease Yme1 on substrate engagement”

Journal of Structural Biology, *in press*

Two membrane-bound ATP-dependent AAA proteases conduct protein quality surveillance in the inner membrane of mitochondria and control crucial steps during mitochondrial biogenesis. AAA domains of proteolytic subunits are critical for the recognition of non-native membrane proteins which are extracted from the membrane bilayer for proteolysis. Here, we have analysed the role of the conserved loop motif YVG, which has been localized to the central pore in other hexameric AAA(+) ring complexes, for the degradation of membrane proteins by the *i*-AAA protease Yme1. Proteolytic activity was found to depend on the presence of hydrophobic amino acid residues at position 354 within the pore loop of Yme1. Mutations affected proteolysis in a substrate-specific manner: whereas the degradation of misfolded membrane proteins was impaired at a post-binding step, folded substrate proteins did not interact with mutant Yme1. This reflects most likely deficiencies in the ATP-dependent unfolding of substrate proteins, since we observed similar effects for ATPase-deficient Yme1 mutants. Our findings therefore suggest an essential function of the central pore loop for the ATP-dependent translocation of membrane proteins into a proteolytic cavity formed by AAA proteases.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. Thomas Langer für die Bereitstellung des Themas, sein großes Engagement und seine fortwährende Unterstützung und Förderung der wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Professor Dr. J. Dohmen für die Übernahmen des Koreferates und die gemeinsamen Gruppen-Seminare.

Dr. Brigitte Kisters-Woike für die Strukturmodellierungen und Dr. Georgeta Seewald für die gelungenen *in vitro*-Interaktionsexperimente

Susanne Scheffler, Tina Chiaradia und Dr. Matthias Cramer für die Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Instituts-, Organisations- und Bestellungsproblemen.

Dr. Gerrit Praefcke und Dr. Michael Knittler für die freundliche/freundschaftliche Aufnahme in ihrem Büroraum („Puma-Käfig“).

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Langer, ehemalige und jetzige, die in ganz unterschiedlicher Weise zu einem guten Arbeitsklima, zu interessanten Seminaren und lustigen Weinabenden und Festen beigetragen haben:

Fabian-, „Fab“-Anton, Dr. Isabel Arnold, Steffen-, „Barbados“-Augustin, Sascha-, „ordering-boy“-Dargazanli, Tanja-, „Zenti“-Engmann, Dr. Mafalda Escobar-Henriques Dias, Sarah Ehses, Björn Friedrichs, Dr. Dominik Galluhn, Olaf Hardt, Dr. Melanie Kambacheld, Mirko-, „Leidensgenosse“-Koppen, Matthias Könn, Daniel Korbel, Joanna Majczak, Carsten-, „TrS“-Merkwirth, Metodi Dimitrov Metodiev, Dr. Mark-, „anwesend“-Nolden, Christof Osman, Ines-, „Organisatorin“-Raschke, Jens Seeger, Dr. Georgeta-, „Experimentier-Göttin“-Seewald, Dr. Takashi Tatsuta, Daniela Tils, Claudia-, „Wilmes“-Wilmes, Stephanie Wurth und Gudrun Zimmer.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine „Familie“: Claudia, Lars, Thomas, Daniela, Bianca, Chrissie (Lifei und Kay) und Barbara.

Ich danke meiner Familie und Verwandten.

Danke, Anne und Carsten.

Eidesstattliche Erklärung

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

Martin Graef

Köln im Mai 2006

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Graef, M. and Langer, T. (2006). Substrate specific consequences of central pore mutations in the *i*-AAA protease Yme1 on substrate engagement. *J. Struc. Biol.*, in press.

Nolden, M., Kisters-Woike, B., Langer, T., and **Graef, M.** (2006). Quality control of proteins in the mitochondrion. *Topics Curr. Gen.*, *16*, 119-147.

Lebenslauf

Vor- und Zuname: Martin Graef
Geburtstag: 05.12.1975
Geburtsort: Köln
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982 – 1983 kath. Grundschule Wachtberg-Pech
1983 – 1986 kath. Grundschule Porz-Langel
1986 – 1995 Lessing-Gymnasium Porz-Zündorf
Juni 1995 Abitur

Zivildienst

Juli 1995 – August 1996 Krankenhaus Porz am Rhein

Hochschulbildung

Okt. 1996 – Sept. 2001 Studium der Biologie an der Universität zu Köln,
Diplomarbeit am Institut für Genetik bei
Prof. Dr. S. Korsching mit dem Thema:
„Charakterisierung der Promotoraktivität der
proximalen *upstream*-Region des olfaktorischen
Rezeptorgens DROR2.1 des Zebrafisches,
Danio rerio“
Abschluss als Diplom-Biologe
September 2001 Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. Thomas
seit Oktober 2001 Langer am Institut für Genetik der Universität zu
Köln; Dissertation zum Thema:
„Mechanismen der Substraterkennung der
mitochondrialen AAA-Protease Yme1 aus
Saccharomyces cerevisiae“

