

**Untersuchungen proteolytischer Prozesse
in der Innen- und Außenmembran
von Mitochondrien**

Dissertation
Fakultät für Biologie
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Michael Käser
aus Nürnberg

München 2001

Dissertation eingereicht am 10.12.01
Erstgutachter: Prof. Dr. R. G. Herrmann
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Bandlow
Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert
Mündliche Prüfung am 12.02.02

Abkürzungen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
Ω	Ohm
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CCCP	Carbonyl-Cyanid- <i>m</i> -Chlorophenylhydrazon
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
DFDNB	1,5-Difluoro-2,5-Dinitrobenzen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Methansulfonsäureethylester
ER	Endoplasmatisches Reticulum
G	Guanin
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin A
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
IMR	Intermembranraum
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KLH	Keyhole limpet hemocyanin (<i>M. crenulata</i>)
l	Liter
M	Mol pro Liter
mA	Milliampère
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure

MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
NSF	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
<i>o</i> -Phe	<i>o</i> -Phenantrolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
pmol	Picomol pro Liter
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC-Medium	Synthetisches Vollmedium
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
STI	Soybean trypsin inhibitor
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
ts	thermosensitiv
U	Unit(s)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	Bedeutung der zellulären Proteolyse	5
1.2	Proteasen und ATP-abhängige Proteolyse	6
1.2.1	Lon-Proteasen	7
1.2.2	Clp-Proteasen	8
1.2.3	AAA-Proteasen	8
1.2.4	26S-Proteasom und Ubiquitin-Proteasom-System	9
1.3	Proteolyse von Membranproteinen	10
1.3.1	Proteine der Plasmamembran	11
1.3.2	Membranproteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER)	12
1.3.3	Proteolyse von Membranproteinen in Mitochondrien	13
1.4	Mechanismus des Abbaus von Membranproteinen durch AAA-Proteasen	15
1.4.1	Substraterkennung und Chaperon-Funktion	15
1.4.2	Extraktion aus der Membran	16
1.4.3	Kooperation verschiedener Proteasen	17
1.4.4	Modelle zur Substratdislokation	17
1.5	Ziele der Arbeit	19
1.5.1	Mechanismus des Membranproteinabbaus	19
1.5.2	Proteolyse in der mitochondrialen Außenmembran	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Molekularbiologische Methoden	21
2.1.1	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	21
2.1.1.1	Reinigung in kleinem Maßstab	21
2.1.1.2	Reinigung in großem Maßstab	22
2.1.1.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	22
2.1.2	Isolierung von chromosomaler und Plasmid-DNA aus Hefezellen	22
2.1.3	Schnellpräparation von DNA aus Hefezellen	23
2.1.4	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.1.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	24
2.1.5.1	Restriktionsverdau	24
2.1.5.2	Ligation	24
2.1.5.3	Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten in das Plasmid pCRII-TOPO	24
2.1.5.4	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	25
2.1.5.5	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation	25
2.1.6	Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	25
2.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.1.8	Klonierungen	26
2.1.8.1	pGEM4-HA-DHFR ^{WT} -TOM6 und pGEM4-HA-DHFR ^{MUT} -TOM6	26
2.1.8.2	YIp351-GAL10-HA-DHFR ^{WT} -TOM6 und YIp351-GAL10-HA-DHFR ^{MUT} -TOM6	27
2.1.9	Verwendete Plasmide	27
2.1.10	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	28

2.2	Methoden der Hefegenetik	29
2.2.1	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	29
2.2.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	29
2.2.2.1	Herstellung Lithiumacetat-kompetenter Hefezellen	29
2.2.2.2	Transformation Lithiumacetat-kompetenter Hefezellen	30
2.2.3	Kreuzen und Sporulation von Hefestämmen	30
2.2.4	Herstellung mutanter Hefestämme	31
2.2.4.1	Disruption von Genen	31
2.2.4.2	Überexpression von HA-DHFR ^{WT} -Tom6 in Stämmen von <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.5	Nachweis von Genmanipulationen in <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.6	Mutagenese des Hefestammes <i>tom40^{ts}</i> mit EMS	32
2.2.7	Lokalisierung von Mutationen auf dem Plasmid	32
2.2.8	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	33
2.3	Proteinbiochemische Methoden	35
2.3.1	Denaturierende Fällung von Proteinen mit TCA	35
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	35
2.3.3	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen	36
2.3.4	Quantifizierung durch Autoradiographie/Densitometrie und durch Phosphorimaging	36
2.3.5	Synthese von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen <i>in vitro</i>	36
2.3.5.1	Transkription	37
2.3.5.2	Translation in Retikulozytenlysat	37
2.3.6	Reinigung von Su9(1-69)-DHFR mit Histidin-Anhang aus <i>E. coli</i>	38
2.3.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	38
2.3.8	Messung der chymotryptischen Aktivität von Proteasom-Mutanten	38
2.4	Zellbiologische Methoden	39
2.4.1	Alkalische Lyse von Hefezellen	39
2.4.2	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	39
2.4.3	Isolierung von Membranen aus <i>S. cerevisiae</i>	40
2.4.4	Induktion von Proteolyse in isolierten Mitochondrien	41
2.4.5	Import von Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien und Induktion von Proteolyse	41
2.4.6	Herstellen von Mitoplasten	42
2.4.7	Submitochondriale Lokalisierung von Proteinen	42
2.4.7.1	Proteasebehandlung	42
2.4.7.2	Alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen	43
2.4.8	Inaktivierung der mitochondrialen ATP-abhängigen Proteasen	43
2.4.8.1	ATP-Depletion isolierter Mitochondrien	43
2.4.8.2	Komplexierung von Metallionen in isolierten Mitochondrien	44
2.4.9	Pulsmarkierung und Abbau <i>in vivo</i>	44
2.4.10	Proteintranslation in isolierten Mitochondrien (<i>in organello</i> Translation)	44
2.4.11	Chemische Quervernetzung von Proteinen	45
2.5	Immunologische Methoden	45
2.5.1	Gewinnung polyklonaler Antisera in Kaninchen	45
2.5.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)	46
2.5.3	Bindung und kovalente Kopplung der Immunglobuline an Protein A-Sepharose	47
2.5.4	Immunfällung von Proteinen	47
2.5.5	Verwendete Antisera	48
2.6	Puffer und Medien	49
2.7	Chemikalien und Geräte	50
2.7.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	50
2.7.2	Geräte	51

3	ERGEBNISSE	52
3.1	Zum Mechanismus der Proteolyse mitochondrialer Innenmembranproteine	52
3.1.1	Oxa1 ^{ts} als polytopisches Modells substrat	52
3.1.1.1	Abbau von Oxa1 ^{ts}	52
3.1.1.2	Insertion von Oxa1 ^{ts} in der mitochondrialen Innenmembran	52
3.1.1.3	Die Rolle der <i>m</i> -AAA-Protease bei der Proteolyse von Oxa1 ^{ts}	55
3.1.1.4	Die Rolle der <i>i</i> -AAA-Protease bei der Proteolyse von Oxa1 ^{ts}	57
3.1.1.5	ATP-Abhängigkeit der Proteolyse und Fragmentbildung von Oxa1 ^{ts}	58
3.1.1.6	Beteiligung einer Metallopeptidase am Abbau von Oxa1 ^{ts}	61
3.1.2	Untersuchungen zum Mechanismus der Membranextraktion durch AAA-Proteasen	61
3.1.2.1	Beteiligung des TIM17/23-Komplexes	63
3.1.2.2	Beteiligung des OXA1-Komplexes	64
3.1.2.3	Beteiligung der Insertionskomponenten Cox18 und Pnt1	66
3.1.2.4	Beteiligung der Export- und Insertionskomponente Mba1	69
3.2	Proteolyse in der Außenmembran von Mitochondrien	72
3.2.1	Spezifische Proteolyse von HA-DHFR ^{WT} -Tom6	72
3.2.1.1	Lokalisierung von HA-DHFR ^{WT} -Tom6	73
3.2.1.2	Der Faltungszustand der DHFR im Fusionsprotein HA-DHFR ^{WT} -Tom6	74
3.2.1.3	HA-DHFR ^{WT} -Tom6 wird <i>in vivo</i> abgebaut	75
3.2.1.4	HA-DHFR ^{WT} -Tom6 wird vollständig abgebaut	76
3.2.1.5	Charakterisierung der Proteolyse von HA-DHFR ^{WT} -Tom6	76
3.2.1.6	Die Rolle des Proteasoms für die Proteolyse von HA-DHFR ^{WT} -Tom6	77
3.2.1.7	Die Stabilität von HA-DHFR ^{WT} -Tom6 in verschiedenen mutanten Hefestämmen	80
3.2.2	Genetische Durchmusterung mit <i>tom40^{ts}</i>	81
3.2.2.1	Prinzip der genetischen Durchmusterung	81
3.2.2.2	Herstellung von Suppressoren durch Mutagenese	82
3.2.2.3	Lokalisierung von Mutationen auf dem Plasmid	83
3.2.2.4	Stabilisierung von Tom40 ^{ts} durch eine Rückmutation in einer hoch konservierten Region	85
3.2.2.5	Die Suppressor-Mutationen führen zu keiner Stabilisierung von Tom40 ^{ts}	86
4	DISKUSSION	88
4.1	Proteolyse eines polytopischen Proteins in der mitochondrialen Innenmembran	88
4.2	Dislokation von Proteinen der mitochondrialen Innenmembran durch AAA-Proteasen	90
4.3	Proteolyse in der mitochondrialen Außenmembran	93
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	LITERATURVERZEICHNIS	101

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der zellulären Proteolyse

Die Bildung funktionsfähiger Proteine setzt die Faltung von an Ribosomen synthetisierten linearen Polypeptidketten in ihre native Struktur voraus. Die Faltung von Proteinen wird durch molekulare Chaperone unterstützt, die Faltungsintermediate binden und deren Aggregation verhindern. Trotzdem ist die Faltung von Proteinen unter zellulären Bedingungen ineffizient. Daher muss ein beständiger Abbau missgefalteter Proteine gewährleistet sein, um deren Akkumulation und die Bildung von Aggregaten zu verhindern. Der Abbau missgefalteter Proteine wird häufig durch ATP-abhängige Proteasen gewährleistet. Neben der Kontrolle der Qualität zellulärer Proteine überwachen diese Proteasen auch den Konformationszustand kurzlebiger Proteine und üben auf diese Weise wichtige regulatorische Funktionen in der Zelle aus.

Die Bedeutung von Proteasen für die zelluläre Homöostase wird besonders nach einer Störung proteolytischer Prozesse deutlich. Eine Beeinträchtigung des zellulären Proteolyseapparates hat z.T. drastische Störungen der Zellphysiologie zur Folge. Dies führt zum Beispiel beim Menschen häufig zu neurodegenerativen Prozessen. Nicht funktionsfähige Proteasen führen bei Amyloid-Krankheiten zur Aggregation von Polypeptidketten mit einem hohen Anteil an β -Faltblatt-Struktur: Das Amyloid β -Peptid bei der Alzheimerschen Krankheit, Huntingtin bei der Huntingtonschen Erkrankung, α Synuclein bei der Parkinsonschen Krankheit, Tau bei frontotemporaler Demenz und anderen Tautopathien (Crowther und Goedert, 2000; El-Agnaf und Irvine, 2000; Steiner und Haass, 2000; Tobin und Signer, 2000). Beispiele für TSE-Krankheiten („transmissible spongiform encephalopathy“), auch als Prionen-Krankheiten bekannt, sind Kuru Kuru und die Creutzfeld-Jakob-Erkrankung beim Menschen sowie BSE („bovine spongiform encephalopathy“), Scrapie und verwandte Krankheiten bei verschiedenen Tieren (Prusiner, 1997; Prusiner, 1998). Proteinaggregaten in Form von Aggresomen (Kopito und Sitia, 2000) kommen dabei eine bedeutende Rolle zu. Sie sind nicht nur das Endprodukt von gestörter Proteasefunktion, sondern beeinträchtigen zusätzlich noch das zelluläre Proteolyse-System in seiner Funktion (Bence *et al.*, 2001). Dieser positive Rückkopplungs-Mechanismus mag den oft dramatischen

Verlust neuronaler Funktionen bei vielen neurodegenerativen Krankheiten erklären. Dennoch sind die molekularen Grundlagen der Pathogenese für die meisten Krankheiten weitgehend unklar, weshalb die Komponenten der Qualitätskontrolle in der Zelle intensiv untersucht werden.

1.2 Proteasen und ATP-abhängige Proteolyse

Unter Bedingungen des Nährstoffmangels können Proteine wie auch gesamte Organellen durch Endocytose bzw. Autophagocytose über Lysosomen in der Zelle abgebaut werden, um schnell den Energie- und Aminosäurebedarf zu decken (Klionsky und Emr, 2000; Knop *et al.*, 1993; Luzikow, 1999; Teter und Klionsky, 2000). Während die lysosomale Proteolyse unspezifisch ist, führen ATP-abhängige Proteasen außerhalb der Lysosomen zu einer spezifischen Proteolyse. ATP-abhängige Proteasen sind in allen Organismen vorhanden und üben, unter Energieverbrauch durch Hydrolyse von ATP, eine zentrale Funktion bei der Qualitätskontrolle und Regulation zellulärer Prozesse aus. Verschiedene Proteasefamilien können unterschieden werden, die in Struktur und Funktion stark konserviert sind. Eine konservierte ATPase-Domäne bestehend aus 230-250 Aminosäuren, das sogenannte AAA⁺-Modul (Confalonieri und Duguet, 1995; Patel und Latterich, 1998), kennzeichnet ATPasen der AAA⁺-Superfamilie (Neuwald *et al.*, 1999). Diese vermitteln die Assemblierung oder Disassemblierung von Proteinkomplexen (Langer, 2000; Ogura und Wilkinson, 2001) oder die Entfaltung von Proteinen („Unfoldase“; Weber-Ban *et al.*, 1999; AAA: ATPases associated with a variety of cellular activities; Kunau *et al.*, 1993).

Für die ATPase-Aktivität essentielle Bereiche innerhalb der ATPase-Domäne sind das Nukleotid-bindende Walker-A-Motiv und das Magnesium-Ionen bindende Walker-B-Motiv, (Lupas *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1982). AAA-Proteine unterscheiden sich von anderen ATPasen des Walkertyps durch eine konservierte Sequenz im C-terminalen Bereich der AAA-Domäne, die SRH-Region („second region of homology“). Röntgenstrukturen verschiedener AAA-Proteasen zeigen, dass dieser Bereich an der Oberfläche zwischen zwei Untereinheiten lokalisiert ist (Karata *et al.*, 1999; Lupas *et al.*, 1997). Die SRH-Region übt über einen konservierten Arginin-Rest vermutlich eine intermolekulare katalytische Funktion während der ATP-Hydrolyse aus (Karata *et al.*, 1999).

Proteasen der AAA⁺-Familie haben Bindungseigenschaften ähnlich wie molekulare Chaperone und gewährleisten auf diese Weise eine spezifische Erkennung möglicher Substrate (Akiyama *et al.*, 1998; Gottesman *et al.*, 1997a). Beispiele sind die AAA-Domäne von Yme1 in Hefemitochondrien (Leonhard *et al.*, 1999) und die ATPase-Untereinheiten der Clp-Proteasen (Weber-Ban *et al.*, 1999; Wickner *et al.*, 1994) sowie des 26S-Proteasoms (Braun *et al.*, 1999). Dabei ist die Bindung gefalteter Peptidketten ATP-abhängig, während die Peptidhydrolyse unabhängig von ATP erfolgt (Neuwald *et al.*, 1999).

Kristallstrukturanalysen verschiedener Vertreter der AAA⁺-Familie zeigen oligomere, häufig hexamere Komplexe (Bochtler *et al.*, 2000; Guenther *et al.*, 1997; Lenzen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Offenbar bilden die Komplexe Mikrokompartimente, die eine abgeschirmte Proteolyse ermöglichen („self-compartmentalizing proteases“, Lupas *et al.*, 1997). Dies wurde bisher für ClpP (Wang *et al.*, 1997), HslV (Groll *et al.*, 1997) und das 20S-Proteasom (Coux *et al.*, 1996; Hilt und Wolf, 1996; Löwe *et al.*, 1995) gezeigt, wo die proteolytisch aktiven Zentren jeweils ins Innere der Reaktionskammern ragen. In ihrer Struktur ähneln sich daher HslUV, die Clp-Proteasen und das Proteasom. Eine elektronenmikroskopische Analyse von gereinigtem FtsH zeigte ebenfalls eine ringförmige Struktur (Shotland *et al.*, 1997). Ob die AAA-Proteasen alle eine Ringstruktur und darüber hinaus Mikrokompartimente bilden, die groß genug sind, um Substrate einzuschließen, ist noch nicht abschließend untersucht.

Aufgrund von Sequenzanalysen unterscheidet man vier Klassen von ATP-abhängigen Proteasen: die Lon-, die Clp-, die AAA-Proteasen und 26S-Proteasomen, die im folgenden kurz eingeführt werden sollen.

1.2.1 Lon-Proteasen

Die Lon-Protease aus *E. coli* und die mitochondrialen Homologe Lon beim Menschen (Wang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994) und Pim1 in der Hefe *S. cerevisiae* (Suzuki *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.*, 1994) bilden einen löslichen homooligomeren Komplex mit Ringstruktur. Sie sind als Serin-Proteasen Teil des Qualitätskontrollsystems in der Zelle (Gottesman, 1996; Maurizi, 1987; Suzuki *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). Eine ATPase-Domäne ist vermutlich an der Entfaltung von Substratproteinen beteiligt (Smith *et al.*, 1999; Van Melderen *et al.*, 1996). Die Pim1-Protease ist außerdem an der Expression von mitochondrial kodierten

Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe beteiligt und gewährleistet die Integrität der mitochondrialen DNA (Van Dyck und Langer, 1999; Van Dyck *et al.*, 1998).

1.2.2 Clp-Proteasen

Zusammen mit der Lon-Protease bauen Clp-Proteasen (*caseino-lytic protease*; Schirmer *et al.*, 1996) in *E. coli* einen Großteil der missgefalteten löslichen Proteine ab (Suzuki *et al.*, 1997). Clp-Proteasen sind heterooligomere Komplexe, die aus proteolytischen Untereinheiten sowie ATPase-Untereinheiten bestehen (Gottesmann, 1999). Letztere haben regulatorische Funktion und vermitteln aktiv die Entfaltung von Substratproteinen (Weber-Ban *et al.*, 1999).

Die proteolytischen Untereinheiten bilden einen Kernkomplex aus zwei homo-heptameren Ringen mit den Proteolysezentren im Inneren der entstandenen Kammer (Bochtler *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). An beiden Seiten dieses Komplexes können hexamere Ringe aus regulatorischen Untereinheiten mit ATPase-Aktivität, wie ClpA, ClpX und ClpY (HslU), binden (Schmidt *et al.*, 1999). Es entstehen die ATP-abhängigen Clp-Proteasen ClpAP, ClpXP und ClpQY (HslUV) (Bochtler *et al.*, 1997; Bochtler *et al.*, 2000; Gottesman *et al.*, 1997b; Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001). Diese sind spezifisch für unterschiedliche Substrate. Während in Mitochondrien von *S. cerevisiae* keine Clp-Protease gefunden wurde (Van Dyck *et al.*, 1998), sind Homologe in höheren Eukaryonten beschrieben worden (Bross *et al.*, 1995; De Sagarra *et al.*, 1999).

1.2.3 AAA-Proteasen

Die AAA-Proteasen bilden eine eigene Klasse von ATP-abhängigen Metalloproteasen. Sie sind als große, membranständige Komplexe in zellulären Membranen von Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien organisiert (Langer, 2000). Mehrere identische oder stark homologe Untereinheiten von einer Molekularmasse von 70-80 kDa assemblieren zu einem funktionellen Komplex von ca. 1000 kDa. Die genaue Stöchiometrie der Untereinheiten ist noch unbekannt. Die Untereinheiten der AAA-Proteasen in Bakterien und in Hefe sowie Mensch weisen eine Aminosäuresequenzidentität von über 40% auf (Beyer, 1997; Neuwald *et al.*, 1999). Sie enthalten sowohl eine ATPase-Domäne mit Walker-A-, Walker-B- und SRH-Region als auch eine proteolytische Domäne. In letzterer stellt ein metallbindendes Motiv,

HEXGH, das proteolytisch aktive Zentrum dar. Am carboxyterminalen Ende von AAA-Protease-Untereinheiten ist eine „coiled-coil“-Struktur konserviert, die vermutlich einen Leucin-Zipper bildet. Ihre Funktion ist bislang noch unklar, vermutlich ist sie als strukturelles Element essentiell für die proteolytische Funktion in Bakterien (Shotland *et al.*, 2000). Bei eukaryontischen Vertretern befindet sich am Aminoterminus der Untereinheiten eine Sortierungssequenz, die die Lokalisierung in den Mitochondrien bzw. Chloroplasten gewährleistet. Im aminoterminalen Bereich finden sich eine (Klasse I) oder zwei (Klasse II) Transmembranregionen (Langer, 2000).

AAA-Proteasen sind offenbar in Eubakterien und Eukaryonten ubiquitär (Juhola *et al.*, 2000; Langer, 2000). Die am besten untersuchte bakterielle AAA-Protease stellt FtsH dar, ein essentielles Protein in *E. coli* (Tomoyasu *et al.*, 1993). FtsH bildet einen homooligomeren Komplex in der Plasmamembran und exponiert proteolytische und ATPase-Domänen zum Cytoplasma. FtsH übt durch den Abbau von löslichen Substraten sowie Membranproteinen, wie z.B. SecY (Kihara *et al.*, 1995) oder YccA (Kihara *et al.*, 1998), Qualitätskontrolle aus. Des weiteren ist FtsH an der Regulation des Fettsäure-Stoffwechsels beteiligt (Ogura *et al.*, 1999), was auf die essentielle Bedeutung dieser AAA-Protease hinweisen kann.

Sequenzanalysen weisen darauf hin, dass AAA-Proteasen in Eukaryonten offenbar ubiquitär sind (Juhola *et al.*, 2000; Langer, 2000). Auch beim Menschen wurden Vertreter gefunden (Casari *et al.*, 1998). AAA-Proteasen kommen in Chloroplasten und Mitochondrien vor (Langer, 2000). In *S. cerevisiae* wurden zwei mitochondriale Vertreter, die *m*- und *i*-AAA-Protease, identifiziert und charakterisiert (Langer und Neupert, 1996), die in Kap. 1.3.3 genauer beschrieben werden. Das Vorkommen der beiden mitochondrialen AAA-Proteasen ist anscheinend ebenfalls zwischen den Organismen konserviert (Klanner *et al.*, 2001).

1.2.4 26S-Proteasom und Ubiquitin-Proteasom-System

Missgefaltete oder fehlerhafte Proteine im Cytosol eukaryontischer Zellen werden überwiegend durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Voges *et al.*, 1999). 26S-Proteasomen machen bei Eukaryonten bis zu 1% der Proteine einer Zelle aus (Bochtler *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2000). Das Proteasom stellt eine heterooligomere Protease dar (Maurizi, 1998), die ein Mikrokompartment bilden (Baumeister und Lupas, 1997; Baumeister *et al.*, 1998). Ein zylindrisches Kernpartikel aus vier heptameren Ringen (Voges *et al.*, 1999), das die proteolytischen Untereinheiten enthält und als 20S-Proteasom bezeichnet wird, kann von

einem regulatorischen 19S-Komplex unterschieden werden. Das Proteasom weist Caspase-, Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Proteaseaktivitäten auf (Bochtler *et al.*, 1999). Der äußere Ring (α -Ring) des Kernpartikels verschließt mit den Aminotermini seiner Untereinheiten die Reaktionskammer. Bei dessen Öffnung erlangt das 20S-Proteasom seine proteolytische Funktion (Groll *et al.*, 2000; Kohler *et al.*, 2001a; Kohler *et al.*, 2001b). An beiden Enden des 20S-Proteasoms bindet je ein 19S-Komplex, der aus zwei Subkomplexen besteht. Die AAA-Proteasen sorgen u. a. für die Öffnung des α -Ringes und für die Substratentfaltung (Kohler *et al.*, 2001b; Rubin *et al.*, 1998). Der Deckel vermittelt die Bindung von Ubiquitinkonjugaten (Braun *et al.*, 1999).

Das 26S-Proteasom baut Proteine ab, die durch Ubiquitin markiert worden sind. Zur Ubiquitinierung von Proteinen sind verschiedene Faktoren nötig, die sich auf Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1), Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2), Ubiquitin-Ligasen (E3) und ein Enzym zur Multiubiquitinierung, E4, zusammenfassen lassen (Joazeiro und Hunter, 2000; Koegl *et al.*, 1999). Ubiquitin ist ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren und dient der Markierung verschiedenster Proteine, um sie z. B. zu proteolytischen Elementen der Zelle zu transportieren (Varshavsky, 1997). Eine Monoubiquitinierung von Proteinen oder eine Diubiquitinierung über den Lysinrest an Position 63 von Ubiquitin führt dazu, dass Substrate durch Endocytose dem lysosomalen Abbauweg unterliegen (Hicke, 1999; Hicke, 2001). Polyubiquitinierung hingegen führt Substrate dem Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg zu. 26S-Proteasomen erkennen und binden polyubiquitinierte Proteine, bevor sie diese deubiquitinieren (Papa *et al.*, 1999; Swaminathan *et al.*, 1999) und in entfalteter Form in die Reaktionskammer einschleusen (Ciechanover, 1994; Hochstrasser *et al.*, 1999; Varshavsky, 1997).

1.3 Proteolyse von Membranproteinen

Die Proteolyse von Membranproteinen stellt eine besondere Problematik dar, da die Spaltung von Peptidbindungen eine hydrophile Umgebung erfordert. Dazu müssen membraninsertierte Teile eines abzubauenen Proteins aus der Lipidumgebung der Membran herausgelöst werden. Das stellt ein energetisches Problem beim Abbau dar. Viele integrale Proteine besitzen lösliche Domänen, die als Angriffspunkt für Proteasen dienen können. Komplizierter ist jedoch der Abbau von Transmembrandomänen selbst oder von löslichen Domänen eines

Membranproteins, die in unterschiedliche Kompartimente ragen. Dabei liegt zusätzlich ein topologisches Problem vor. In diesen Fällen muss entweder die Beteiligung verschiedener Proteasen oder der Transfer hydrophiler Regionen eines Substratproteins durch die Lipiddoppelschicht gefordert werden.

Proteolyse von Membranproteinen dient der Qualitätskontrolle, kann aber auch direkte regulatorische Funktion haben. Ein Beispiel dafür ist der Prozess der „regulated intramembrane proteolysis“ (RIP; Brown *et al.*, 2000). Durch einen endoproteolytischen Schnitt innerhalb der Lipidschicht werden cytosolische Domänen von ihrem Membrananker befreit und zum Zellkern transportiert. Dort sind sie physiologisch aktiv, z.B. als Transkriptionsfaktor (SREBP) oder Signalübermittler (Notch). Die Spaltung erfolgt durch spezifische Proteasen. Ein anderer Mechanismus spaltet von membranverankerten Proteinen lösliche Domänen ab, die ebenfalls der Signaltransduktion dienen (Hoppe *et al.*, 2000). Hierbei ist das Ubiquitin-Proteasom-System beteiligt, entsprechend wird der Mechanismus „regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing“ (RUP) genannt (Hoppe *et al.*, 2000; Hoppe *et al.*, 2001; Vik und Rine, 2000). In diesen Fällen werden Membranproteine prozessiert; dies muss von vollständiger Proteolyse unterschieden werden. Ein vollständiger Abbau von Membranproteinen ist bisher für Proteine der Plasmamembran, der ER-Membran und der mitochondrialen Innenmembran bekannt und soll im folgenden kurz vorgestellt werden.

1.3.1 Proteine der Plasmamembran

Proteine der Plasmamembran sind an vielen Vorgängen der Signalaufnahme und -übermittlung beteiligt (Hicke, 2001). Diese Prozesse können spezifisch über die Stabilität von Rezeptorproteinen oder anderen Komponenten des Signalweges kontrolliert werden. Proteine der Plasmamembran werden ubiquitiniert, durch Endocytose aufgenommen und schließlich in den Lysosomen abgebaut (Hicke, 1997; Hicke, 1999). Ein alternativer Abbauweg von Proteinen der Plasmamembran durch 26S-Proteasomen wurde daneben zumindest für einige Membranproteine gezeigt (Aviel *et al.*, 2000; Galan *et al.*, 1998).

1.3.2 Membranproteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER)

Proteine, die für Sekretion oder den Transport in die Plasmamembran oder sekretorische und endosomale Organellen bestimmt sind, unterliegen einer strengen Qualitätskontrolle im ER (Ellgaard *et al.*, 1999). Missgefaltete oder nicht-assemblierte Proteine – sowohl luminale als auch ER-Membranproteine – werden ubiquitiniert und in das Cytoplasma transportiert, wo sie durch 26S-Proteasomen abgebaut werden (Brodsky und McCracken, 1997; Brodsky und McCracken, 1999; Kopito, 1997; Plemper und Wolf, 1999; Riezmann, 1997; Sommer und Wolf, 1997). Proteasomen sind in *S. cerevisiae* zum Großteil mit Kern- und ER-Membranen assoziiert gefunden (Enekel *et al.*, 1998). Verschiedene Schritte können während des Abbaus von ER-Proteinen durch 26S-Proteasomen unterschieden werden.

Missgefaltete oder nicht-assemblierte Proteine werden durch das molekulare Chaperon BiP erkannt, ein luminales Chaperon der Hsp70-Familie (Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1997). An Erkennung, Entfaltung und Transport zur Translokationspore von Substraten sind außerdem folgende Komponenten beteiligt: die Ubiquitin-Ligase Hrd1 (Der3) mit einer essentiellen Polypeptide bindenden und Zink-stabilisierten RING-Finger-Domäne im Lumen (Bays *et al.*, 2001; Bordallo *et al.*, 1998), Der1 (Knop *et al.*, 1996) und Hrd3 (Hampton *et al.*, 1996). Der HRD-Ubiquitin-Ligase-Komplex (Gardner *et al.*, 2001) vermittelt Ubiquitinierung von abzubauenen Proteinen. Des weiteren ist Ubc6, ein Ubiquitin-konjugierendes (E2) Enzym in der ER-Membran (Sommer und Jentsch, 1993), für den ER-Abbau essentiell, sowie Ubc7 (Hiller *et al.*, 1996), das mit dem membrangebundenen Cue1 assembliert (Biederer *et al.*, 1997). Die Polyubiquitinierung von Substraten und deren retrograde Translokation aus dem Lumen des ER in das Cytoplasma findet offenbar in einer gekoppelten Reaktion statt. Retrotranslokation erfolgt über den Sec61-Kanal (Plemper *et al.*, 1997; Wiertz *et al.*, 1996), über den auch der Import sekretorischer Proteine in das ER erfolgt. Es wurde vermutet, dass ATPase-Untereinheiten des Proteasoms Substratproteine auf der cytosolischen Membranseite binden und über eine ATP-abhängige Konformationsänderung die Translokation über die Membran ermöglichen (Mayer *et al.*, 1998). In höheren Eukaryonten wurde eine wesentliche Funktion von Cdc48/VCP als Transportfaktor für polyubiquitinierte Konjugate und damit für den Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System gefunden (Dai und Li, 2001).

1.3.3 Proteolyse von Membranproteinen in Mitochondrien

Bereits frühe Untersuchungen zeigten unterschiedliche Stabilitäten von Proteinen der äußeren und inneren mitochondrialen Membran und wiesen daher auf die Existenz unterschiedlicher proteolytischer Systeme in beiden Membranen hin (Burgess *et al.*, 1978; Dice und Goldberg, 1975; Lipsky und Pedersen, 1981; Russel *et al.*, 1980; Walker *et al.*, 1978). Während über Proteolyse mitochondrialer Außenmembranproteine bisher nichts bekannt ist, sind Aktivitäten der zwei identifizierten AAA-Proteasen in der Innenmembran charakterisiert worden. Die *i*-AAA-Protease aus *S. cerevisiae* bildet einen vermutlich homooligomeren Komplex aus Yme1-Untereinheiten (Leonhard *et al.*, 1996), während die *m*-AAA-Protease einen heterooligomeren Komplex aus den homologen Untereinheiten Yta10 (Afg3) und Yta12 (Rca1) darstellt (Arlt *et al.*, 1996). Die katalytisch aktiven Domänen sind im Falle der *i*-AAA-Protease zum Intermembranraum, im Falle der *m*-AAA-Protease zur Matrix hin exponiert (siehe Abb. 1). Beide Komplexe haben eine native Molekularmasse von ca. 1000 kDa.

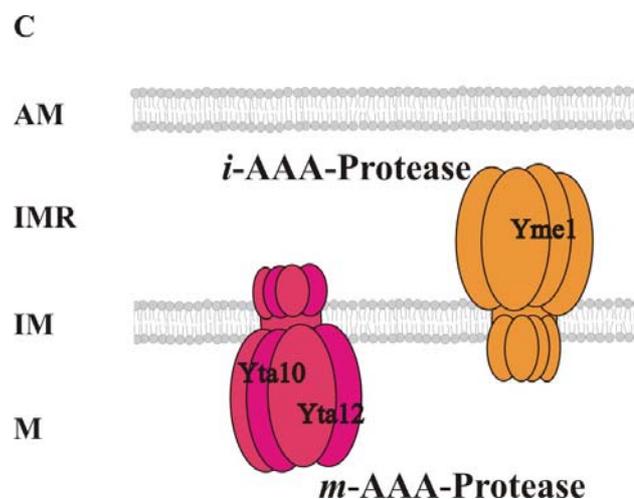


Abb. 1 Schematische Darstellung der *i*- und *m*-AAA-Protease in der mitochondrialen Innenmembran in *S. cerevisiae*. C, Cytosol, AM, Außenmembran, IMR, Intermembranraum; IM, Innenmembran, M, Matrix

Zellen der Hefe *S. cerevisiae* zeigen in Abwesenheit der *i*-AAA-Protease pleiotrope Defekte: eine Beeinträchtigung der respiratorischen Kompetenz bei höherer Temperatur (Weber *et al.*, 1995), eine veränderte mitochondriale Morphologie (Campbell *et al.*, 1994), was vermutlich zu Autophagocytose ganzer Mitochondrien führt (Campbell und Thorsness, 1998), und eine erhöhte Verlustrate mitochondrialer DNA (Thorsness *et al.*, 1993). Der *i*-AAA Protease

kommt eine wichtige Funktion bei der Qualitätskontrolle mitochondrialer Proteine zu. Bisher bekannte Substrate sind nicht-assembliertes Cox2 und Yme2 (Leonhard *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 1995; Pearce und Sherman, 1995; Weber *et al.*, 1996). Weitere Substrate sind wahrscheinlich, da eine Reihe von unterschiedlichen Phänotypen einzeln durch verschiedene extragenische Mutationen supprimiert werden können (Campbell *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1995).

Die *m*-AAA-Protease ist essentiell für die respiratorische Funktion von Hefezellen. Sie ist an Spleißprozessen mitochondrialer Transkripte beteiligt und kontrolliert auch die posttranslationale Assemblierung respiratorischer Komplexe und der ATP-Synthase (Arlt *et al.*, 1998; Guélin *et al.*, 1994; Paul und Tzagoloff, 1995; Schnall *et al.*, 1994; Tauer *et al.*, 1994; Tzagoloff *et al.*, 1994). Bekannte Substrate sind nicht-assemblierte Untereinheiten 1 und 3 der Cytochrom c Oxidase, Cytochrom b des Cytochrom bc₁-Komplexes sowie die Untereinheiten 6, 8 und 9 der F₀F₁-ATPase (Arlt *et al.*, 1996; Guélin *et al.*, 1996). Eine Deletion beider Proteasen in *S. cerevisiae* ist letal, was auf eine überlappende Substratspezifität beider Proteasen hinweist (Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000).

m- und *i*-AAA-Proteasen kommen vermutlich in Mitochondrien aller Eukaryonten vor (Langer, 2000). Auch beim Menschen wurden Orthologe der *i*- und *m*-AAA-Protease gefunden (HsYME1L, HsAFG3L1, HsAFG3L2 und SPG7; Juhola *et al.*, 2000). Eine Mutation der menschlichen AAA-Protease Paraplegin (SPG7) verursacht spastische Paraplegie (HSP), die autosomal rezessiv vererbt wird (Casari *et al.*, 1998). Neurodegeneration der Axone im Corticospinaltrakt führt zu fortschreitender Unbeweglichkeit der unteren Extremitäten. Die molekulare Grundlage der Pathogenese ist allerdings noch unklar.

Der Abbau von Proteinen durch die *m*-AAA-Protease wird offenbar durch Prohibitine reguliert (Steglich *et al.*, 1999). Die entfernt verwandten Proteine HflK und HflC aus *E. coli* üben einen ähnlichen Effekt auf die AAA-Protease FtsH aus (Kihara *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 1997; Kihara *et al.*, 1998). Die beiden Untereinheiten Phb1 und Phb2 sind mit ihrer löslichen Domäne in den Intermembranraum ausgerichtet und bilden, gemeinsam mit der *m*-AAA-Protease, einen Superkomplex von über 2 MDa. Prohibitine haben eine negative regulatorische Funktion während der Proteolyse. Vielleicht modulieren sie die spezifische proteolytische Aktivität der *m*-AAA-Protease. Da Prohibitine jedoch auch direkt Substrate binden, wurde eine Chaperon-Funktion vorgeschlagen (Nijtmans *et al.*, 2000).

1.4 Mechanismus des Abbaus von Membranproteinen durch AAA-Proteasen

Um den Abbau von Membranproteinen durch AAA-Proteasen zu erklären, werden verschiedene Modelle diskutiert: i) Lösliche Domänen werden an der Oberfläche der Membran abgeschnitten („shedding“-Modell; Langer, 2000). Dass dabei die Membrananker des Substrates unverdaut in der Membran verbleiben, ist im Sinne der Qualitätskontrollfunktion unwahrscheinlich. Ein Abspalten von Ladungen könnte die Transmembranregionen destabilisieren und ebenfalls für einen Abbau von der Membranoberfläche aus zugänglich machen. ii) Ein Substrat kann erkannt, gebunden und zur Proteolyse aus der Membran gezogen werden („pulling“-Modell; Kihara *et al.*, 1999; Langer, 2000). Lösliche Proteindomänen, die in ein anderes Kompartiment ragen oder Transmembrandomänen polytopischer, die Membran mehrmals durchspannender Proteine könnten sukzessive und kontinuierlich aus der Membran gelöst werden. Dabei ist theoretisch ein Zusammenspiel mehrerer Proteasen möglich. Die Verankerung der AAA-Proteasen in der Membran ist vielleicht Bedingung für die Ausübung einer Zugkraft auf das Substrat, um eine Extraktion von membraninsetierten Domänen einer Polypeptidkette zu gewährleisten.

1.4.1 Substraterkennung und Chaperon-Funktion

Die Erkennung membranassoziierter Substrate durch AAA-Proteasen ist bislang nur in Grundzügen verstanden. Die AAA-Domäne von AAA-Proteasen besitzt Chaperon-ähnliche Eigenschaften und erkennt spezifisch entfaltete Domänen von Substratproteinen (Leonhard *et al.*, 1999). Die Bedeutung des Faltungszustandes von aus der Membran herausragenden Domänen für die Proteolyse wurde durch Untersuchungen an Hybridproteinen aus Membranproteinen und Dihydrofolatreduktase (DHFR) der Maus nachgewiesen (Leonhard *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 1999). Membrangebundene Modellproteine in der mitochondrialen Innenmembran mit einer entfalteten Domäne im Intermembranraum werden von der AAA-Domäne von Yme1 (*i*-AAA-Protease) erkannt und gebunden. Umgekehrt wird eine entfaltete Domäne in der Matrix von der *m*-AAA-Protease erkannt (Leonhard *et al.*, 1999). Allein die Topologie der entfalteten Domäne des Substratproteins bestimmt, welche AAA-Protease

beteiligt ist. Zur Proteolyse des Substrates müssen allerdings beide Domänen von Yme2 entfaltet sein, die im Intermembranraum und die in der Matrix (Leonhard *et al.*, 2000).

Während diese Befunde dem Faltungszustand aus der Membran herausragender Domänen von Substratproteinen eine entscheidende Bedeutung für die Substraterkennung zuweisen, ist der Abbau von Membranproteinen ohne solche Domänen unklar. Eine Erkennung durch AAA-Proteasen setzt eine Mindestlänge von löslichen Segmenten voraus (Chiba *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000). Untersuchungen mit verkürzten Versionen von Yme2-Derivaten in Hefe zeigen, dass eine Mindestlänge von ca. 20 exponierten Aminosäuren außerhalb der Transmembranregion für den Abbau durch eine der beiden mitochondrialen AAA-Proteasen nötig ist (Leonhard *et al.*, 2000). Um einen Abbau durch FtsH in *E. coli* zu ermöglichen, sind ebenfalls etwa 20 Aminosäuren notwendig (Chiba *et al.*, 2000). Allerdings ist noch unklar, ob nur terminale Enden oder auch aus der Membran ragende Schleifen gebunden werden.

1.4.2 Extraktion aus der Membran

Nach der Bindung eines Substrates durch die AAA-Protease müssen membranverankerte Proteine nach einem der beiden postulierten Modelle – „shedding“ oder „pulling“ – abgebaut werden. Untersuchungen an bakteriellem FtsH und an mitochondrialen AAA-Proteasen weisen darauf hin, dass Membranproteine während der Proteolyse aus der Membran extrahiert werden und nachfolgend in einer hydrophilen Umgebung abgebaut werden („pulling“-Modell). Das mitochondriale Innenmembranprotein Yme2, das aus der Membran herausragende Domänen im Intermembranraum und der Matrix besitzt, kann von beiden AAA-Proteasen abgebaut werden (Leonhard *et al.*, 2000). In Abwesenheit einer der beiden Proteasen können Domänen abgebaut werden, die ursprünglich auf der gegenüberliegenden Membranseite lokalisiert sind. Dies belegt die aktive Extraktion der Polypeptidkette während der Proteolyse.

Die bakterielle AAA-Protease FtsH vermittelt den Abbau von nicht-assembliertem SecY (Kihara *et al.*, 1995). Untersuchungen mit Fusionen von alkalischer Phosphatase (PhoA) an SecY und an das ebenfalls polytopische YccA (Kihara *et al.*, 1999) ergaben, dass bei der Proteolyse der Fusionsproteine Fragmente bis zur gefalteten PhoA-Domäne entstehen. Wahrscheinlich werden membraninsertierte Schleifen konsekutiv aus der hydrophoben Umgebung extrahiert. Eine gefaltete Domäne auf der der Protease gegenüberliegenden Membranseite verhindert die weitere Membranextraktion. Zur Proteolyse der

Transmembranregionen von Substraten ist demnach eine Dislokation aus der Membran Voraussetzung (Kihara *et al.*, 1998).

1.4.3 Kooperation verschiedener Proteasen

Der Abbau von Membranproteinen durch Kooperation von zwei Proteasen wurde zumindest für einen Fall in *A. thaliana* beschrieben (Haussühl *et al.*, 2001). Im Stroma von Chloroplasten muss das polytopische Protein D1 effektiv abgebaut und ersetzt werden können (Lindahl *et al.*, 2000), denn innerhalb des Sauerstoff generierenden Photosystems II wird das Reaktionszentrum mit dem Protein D1 während der Photoinhibition durch Lichtstress geschädigt. Eine neu identifizierte Protease, mit der Thylakoidmembran auf der Stromaseite assoziiert, DegP2, führt den initialen Schnitt zur Proteolyse des D1 Proteins aus, das auch auf der Stroma-exponierten Membranoberfläche lokalisiert ist (Haussühl *et al.*, 2001). Dadurch wird offenbar die nachfolgende Proteolyse des gebildeten Fragmentes durch FtsH ermöglicht.

1.4.4 Modelle zur Substratdislokation

Im Falle der AAA-Proteasen weisen bisherige Befunde auf Extraktion von Membranproteinen während der Proteolyse hin. Da Transmembranregionen abgebaut werden und sogar lösliche Domänen von Membranproteinen durch eine Membran gezogen werden können, muss eine hydrophile Region in der Membran gefordert werden, durch die die Polypeptidketten transferiert werden. Triebkraft könnten ATP-abhängige Konformationsänderungen der AAA-Domäne sein. Zwei unterschiedliche Modelle werden diskutiert:

i) Die Protease bildet einen Kanal in der Membran. FtsH in *E. coli* ist ein Multimer (Akiyama *et al.*, 1995) und hat als solches eine ringförmige Struktur (Shotland *et al.*, 1997). Eine Substitution der Transmembranregionen von FtsH mit einer Leucin-Zipper-Sequenz zeigt, dass die Membrananker für die Oligomerisierung des FtsH-Komplexes und damit für eine ATPase- und proteolytische Funktion bezüglich löslicher Substrate wesentlich sind. Eine Rekrutierung des Komplexes an die Membran durch eine nicht-verwandte Transmembranregion gewährleistete neben löslichen Proteinen auch einen Abbau von Membranproteinen (Akiyama und Ito, 2000; Akiyama und Ito, 2001). Diese Befunde weisen auf eine Bedeutung der Transmembranregion zur Oligomerisierung hin. Außerdem wären

damit die cytoplasmatischen Domänen richtig angeordnet, um Dislokation und Proteolyse von Membranproteinen zu ermöglichen (Akiyama und Ito, 2001).

ii) AAA Proteasen kooperieren mit Translokasen der Innenmembran während des Abbaus von Innenmembranproteinen. Als Kandidaten für Translokationsporen, durch die Dislokation von Substratproteinen erfolgen könnte, gelten zunächst die Import-Komplexe TIM17/23 und TIM22/54 (Neupert, 1997). Dieses Modell ist analog zu proteolytischen Prozessen in der ER-Membran (Abb. 2). Hier wurden ausgesprochene dislokations-spezifische Mutanten von Sec61 gefunden (Zhou und Schekman, 1999).

Eine weiterer hydrophiler Kanal in der mitochondrialen Innenmembran, der für die Extraktion von Membranproteinen genutzt werden könnte, ist die OXA1-Translokase. Oxa1 ist für die Insertion von Proteinen in die Innenmembran von der Matrixseite her zuständig (He und Fox, 1997; Hell *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001). Überexpression von Oxa1 supprimiert den Phänotyp der Deletion der *m*-AAA-Protease (Rep *et al.*, 1996), die molekularen Grundlagen dafür sind bislang unbekannt.

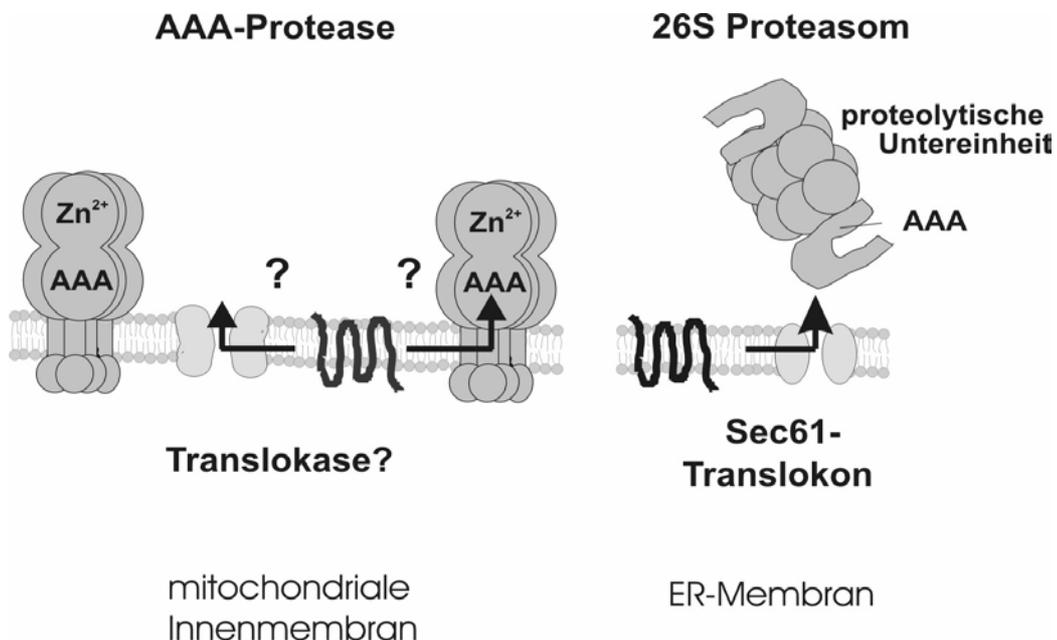


Abb. 2 Mögliche Analogie der Proteolysemechanismen in der mitochondrialen Innenmembran und der ER-Membran (nach Langer *et al.*, 2001). Die Extraktion membranverankerter oder polytopischer Proteine der mitochondrialen Innenmembran kann durch einen von den mitochondrialen AAA-Proteasen gebildeten Kanal oder eine andere Translokase vermittelt werden. Der Abbau von ER-Proteinen erfolgt durch das 26S-Proteasom nach Retranslokation durch die Sec61-Translokationspore.

Weitere Komponenten, die an dem Extraktionsvorgang beteiligt sein könnten, aber wahrscheinlich keine Translokasen bilden, sind Mba1 (Preuss *et al.*, 2001; Rep und Grivell, 1996; Rep *et al.*, 1996), Cox18 (Souza *et al.*, 2000) und Pnt1 (He und Fox, 1999), da sie offenbar an Export- bzw. Insertionsprozessen von Proteinen in der Innenmembran beteiligt sind.

1.5 Ziele der Arbeit

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit soll die Proteolyse von Membranproteinen in der mitochondrialen Innenmembran genauer untersucht werden, im zweiten Teil soll die Proteolyse von mitochondrialen Außenmembranproteinen näher charakterisiert werden.

1.5.1 Mechanismus des Membranproteinabbaus

1. Um weitergehende Einblicke in die Mechanismen des Membranproteinabbaus durch AAA-Proteasen zu erhalten, soll die Proteolyse polytopischer Membranproteine untersucht werden. Zur genaueren Untersuchung des Mechanismus von polytopischen Membranproteinen soll Oxa1 als Modellprotein verwendet werden. Insbesondere soll eine temperatursensitive Variante dieses Proteins im Hinblick auf seine Stabilität charakterisiert werden. Dabei ist von besonderem Interesse, zu prüfen, ob beide – oder gegebenenfalls welche der beiden – AAA-Proteasen am Abbau beteiligt sind oder ob sogar weitere Proteasen involviert sein könnten.
2. Es soll eine mögliche Beteiligung von Proteintranslokasen an der Proteolyse von Membranproteinen der mitochondrialen Innenmembran festgestellt werden. Dabei sollen zum einen Translokasen durch die Akkumulation von Translokationsintermediaten inaktiviert werden, zum anderen verschiedene, zur Verfügung stehende Mutanten von Translokaseuntereinheiten auf ihren Effekt auf proteolytische Prozesse hin untersucht werden.

1.5.2 Proteolyse in der mitochondrialen Außenmembran

Bislang gibt es noch keine Kenntnisse über Komponenten, die an spezifischer Proteolyse von Proteinen der mitochondrialen Außenmembran beteiligt sind. Es soll mittels einer genetischen

Durchmusterung mit einer mutierten Form eines Außenmembranproteins, Tom40^{ts}, nach einer Komponente gesucht werden. Als weiteres spezifisches Substrat soll ein Fusionsproteins aus DHFR und dem Außenmembranprotein Tom6 untersucht werden. Die Stabilität dieses Hybridproteins soll in verschiedenen Hefestämmen mit Mutationen in Proteinen, die für Proteolyse in Frage kommen, bestimmt werden. Entsprechende Kandidaten-Proteine sind vakuoläre Proteasen, die *i*-AAA-Protease, Msp1, ein Außenmembranprotein mit ATPase-Domäne, und verschiedene Untereinheiten des 26S-Proteasoms.

2 Material und Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden weitgehend nach Ausubel *et al.*, 1992; Sambrook *et al.*, 1989 durchgeführt. Bei den entsprechenden Methoden nicht aufgeführte Puffer und Medien sind in Kapitel 2.6 angegeben. Verwendete Abkürzungen sind auf der ersten Seite der Arbeit aufgelistet.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

DNA wurde nach alkalischer Lyse der entsprechenden *E. coli*-Zellen isoliert. Die Bakterien wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert.

2.1.1.1 Reinigung in kleinem Maßstab

2 ml-Kulturen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 20 s bei 13000 Upm und Raumtemperatur (RT) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und in 100 µl 50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 8,0, 25 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension 5 min bei RT geschüttelt. Es wurden 200 µl 200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS zugegeben und die Reaktionsgefäße 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 150 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 zugegeben, kurz geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Ausgefällene Proteine und chromosomale DNA wurden 20 s bei 13000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde mit 1 ml 96%igem (v/v) Ethanol gemischt und 10 min bei 13 000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml 70%igem (v/v) Ethanol und anschließendem 10minütigen Trocknen bei 37°C wurde die Plasmid-DNA in 20-30 µl H₂O resuspendiert. Um störende RNA zu entfernen, wurde 1 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben. Die Proben wurden 5 min bei RT geschüttelt und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der RNase wurden die Ansätze anschließend 10 min auf 65°C erhitzt. Zur Entfernung von Protein-Verunreinigungen wurde gegebenenfalls eine Phenolextraktion durchgeführt. Dabei wurde die wässrige Phase mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/

Isoamylalkohol (25/24/1) gemischt. Nach anschließender Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde die wässrige Phase abgenommen. Der Reinigungsschritt wurde wiederholt, die gereinigte DNA der wässrigen Phase nach einer Ethanol-fällung in H₂O resuspendiert.

2.1.1.2 Reinigung in großem Maßstab

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde der Jetstar[®]-Kit der Firma Genomed verwendet. Hierfür wurden die Bakterien in 30 ml LB^{Amp}-Medium kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der gewonnenen DNA mit 500 µl Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm gegen Wasser gemessen. Die Extinktion der gelösten Plasmid-DNA bei 260 nm ist proportional zur Konzentration der DNA. Eine E₂₆₀ von 1,0 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient E₂₆₀/E₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der Präparation. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.2 Isolierung von chromosomaler und Plasmid-DNA aus Hefezellen

1 ml einer Hefesuspension einer optischen Dichte (OD₅₇₈) von 1 wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert und in 500 µl Wasser aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation der Zellsuspension wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl Zymolyasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 25 mM EDTA; 5 mg/ml Zymolyase) resuspendiert. Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer [0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS] zugegeben und die Proben 30 min auf 65°C erwärmt. Zellwände und Membranen wurden durch die Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat pH 4,5 während einer sich anschließenden Inkubation von 30 min bei 4°C ausgefällt und durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 20000 g isoliert. Der Überstand wurde mit 1 ml 96%iger (v/v) Ethanol (-20°C) versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei -20°C wurde die Probe erneut 15 min bei 4°C und 20000 g zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und in 40 µl Wasser

resuspendiert. Die gewonnene chromosomale DNA wurde als Matrize für Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) verwendet.

2.1.3 Schnellpräparation von DNA aus Hefezellen

Um die Integration von Disruptionskassetten in das gewünschte Gen mittels PCR zu überprüfen, wurde eine Schnellmethode zum Aufschluß der entsprechenden Hefezellen angewandt. Dazu wurden mit einem sterilen Zahnstocher Hefezellen in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und diese, mit offenem Deckel, für 60 s bei 750 W in einem Mikrowellenherd erhitzt. Zur Durchführung der PCR wurden der vorbereitete PCR-Master-Mix und die DNA-Polymerase direkt zu den lysierten Zellen gegeben.

2.1.4 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird durch den wiederholten Ablauf von Strangtrennung, Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNA-Synthese mit hitzestabiler DNA-Polymerase eine exponentielle Synthese von DNA-Molekülen aus Desoxynukleosidtriphosphaten erreicht (Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985). Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl enthielt zusätzlich zu dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM der Desoxynukleosidtriphosphate, 10^5 - 10^6 DNA-Moleküle des Matrizenstranges, 10 bis 50 pmol Oligonukleotide und 2 U *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquilus* und/oder *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyranococcus furiosus*. Gegebenfalls wurde ein Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-DNA-Polymerase mit einem Mischungsverhältnis von 2:1 verwendet. Der PCR-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und in einem programmierbaren Thermostat inkubiert. Ein typischer Reaktionsablauf begann mit einer 4minütigen Vorinkubation bei 94°C zur vollständigen Denaturierung der Matrizenstränge. Dann wurde eine Reaktionsfolge 20 bis 30 mal wiederholt, die aus Denaturieren der DNA (30 s bei 94°C), Anlagern der Oligonukleotide (40 s bei 40°C bis 50°C) und Synthese der DNA (1-2 min bei 72°C) bestand. PCR-Reaktionen mit Hybrid-Primern zur Amplifizierung von Gen-Disruptionskassetten erforderten eine zweistufige PCR-Reaktion, bei der einer typischen Inkubationsfolge mit relativ hoher Anlagerungstemperatur

wenige Zyklen mit geringer Anlagerungstemperatur vorausgingen. Schließlich wurde während einer 4minütigen Nachinkubation bei 72°C die DNA-Synthese vervollständigt. Die Bildung des amplifizierten DNA-Fragments wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.1.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.1.5.1 Restriktionsverdau

Die spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern. Es wurden ca. 1-2 U Enzym für 1 µg zirkuläre DNA eingesetzt und 60 min bei der für das entsprechende Enzym angegebenen Temperatur inkubiert.

2.1.5.2 Ligation

Um zwei DNA-Fragmente mit der aus dem Phagen T4 isolierten DNA-Ligase zu verknüpfen, wurden 50 bis 200 ng DNA des linearisierten Vektors mit einem etwa fünffachen molaren Überschuss des gewünschten DNA-Fragmentes in dem vom Hersteller (Gibco/BRL) mitgelieferten Puffer [0,25 M Tris/HCl pH 7,6; 50 mM Magnesiumchlorid; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25% (v/v) PEG-8000] versetzt. Der Ansatz (5-10 µl) wurde mit 0,5 U T4-Ligase 2 h bei 25°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.1.5.3 Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten in das Plasmid pCRII-TOPO

Um eine zuverlässige Restriktion der DNA-Fragmente zu gewährleisten, die durch PCR erzeugt wurden, erfolgte zunächst eine Zwischenklonierung der Fragmente in den Vektor pCRII-TOPO der Firma Invitrogen. Durch PCR mit *Taq*-Polymerase erzeugte DNA-Fragmente tragen an den 5'-Enden überhängende Adenosinnukleotide und können deshalb direkt in das linearisierte Plasmid eingesetzt werden, das an den 3'-Enden Thymidinnukleotide trägt. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben für 5 min bei RT. Der Ligationsansatz wurde in Zellen des *E. coli*-Stammes DH5α transformiert. Positive Klone wurden isoliert und ihre Plasmid-DNA extrahiert. Das benötigte DNA-Fragment wurde durch einen geeigneten Restriktionsverdau für die weitere Klonierung aus dem Plasmid isoliert.

2.1.5.4 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zellen des *E. coli*-Stammes DH5 α wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen und am nächsten Morgen zum Animpfen 1 l des gleichen Mediums verwendet. Die Zellen wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 4°C und 4400 g zentrifugiert. Alle verwendeten Behälter und Lösungen wurden bei 4°C vorgekühlt. Die Zellen wurden im Kühlraum nacheinander in 500 ml, in 250 ml und schließlich in 50 ml 10% (v/v) Glycerin gewaschen und nach jedem Waschschrift 15 min bei 2°C und 4400 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vollständig abgenommen, die Bakterien in 500 μ l 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, zu je 40 μ l portioniert und bei -70°C aufbewahrt.

2.1.5.5 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

1 μ g Plasmid-DNA wurde unter 40 μ l auf Eis aufgetaute, kompetente *E. coli*-Zellen gemischt. Dieser Ansatz wurde 30 s auf Eis inkubiert, um eine effiziente Bindung der DNA an die Bakterienoberfläche zu gewährleisten. Die Bakteriensuspension wurde in eine vorgekühlte Transformationsküvette überführt und in einem Elektroporationsgerät durch Stromstöße transformiert (2,5 kV, 400 Ω und 25 μ F). Anschließend wurde der Ansatz sofort mit 1 ml SOC-Medium gemischt, 30-60 min bei 37°C geschüttelt, kurz zentrifugiert und in 100 μ l SOC-Medium aufgenommen. Die transformierten Zellen wurden auf LB^{Amp}-Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

2.1.6 Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur gelelektrophoretischen Analyse von DNA wurden Agarose-Flachgele mit 30 bzw. 100 ml Bettvolumen benutzt. Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 7,5; 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA) aufgeköcht und bei 65°C aufbewahrt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen im Bereich von 1 bis 3% (w/v) gewählt. Die Ethidiumbromidkonzentration der Agarosegele betrug 0,5 μ g/ml. Die Proben wurden in Auftragspuffer [2 mM EDTA pH 8,0; 4% (w/v) Saccharose; 0,025% (w/v) Bromphenolblau] aufgenommen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit TAE-Puffer bei einer Spannung von 15 V/cm durchgeführt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurden sie unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden nach Herstellerangabe gelöst und mit Qiaquick[®]-Säulen der Fa. Qiagen isoliert.

2.1.8 Klonierungen

2.1.8.1 pGEM4-HA-DHFR^{WT}-TOM6 und pGEM4-HA-DHFR^{MUT}-TOM6

Mit den Primern TL405 und TL414 (siehe Tab. 1) und dem Plasmid YIp351-*GAL10-TOM70(1-29)-DHFR^{WT}* als Matrize wurde eine PCR durchgeführt. Der 5'-Primer enthält eine *XbaI*-Schnittstelle und eine DNA-Sequenz, die für ein HA-Epitop (Hämagglutinin) kodiert. Der 3'-Primer enthielt eine *NotI*- und *SalI*-Schnittstelle. Das entstandene PCR-Produkt sowie der Vektor pGEM4 wurden mit den Schnittstellen *XbaI* und *SalI* verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Nach der Ligation wurde das entstandene Konstrukt pGEM4-*HA-DHFR^{WT}* in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert und isoliert. Ein Konstrukt pGEM4-*HA-DHFR^{MUT}* wurde parallel dazu hergestellt.

Das *TOM6*-Gen wurde durch PCR mit den Primern TL407 und TL408 (siehe Tab. 1) aus genomischer DNA amplifiziert. Der 5'-Primer beinhaltet eine *NotI*-Schnittstelle und führt zu einem Basenaustausch innerhalb von *TOM6*, die eine *PstI*-Schnittstelle innerhalb des Gens unkenntlich macht, ohne die Aminosäure-Kodierung zu verändern. Im 3'-Primer ist eine *PstI*-Schnittstelle enthalten. Das resultierende PCR-Produkt wurde zunächst in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Die Konstrukte pCRII-TOPO-*TOM6PstI* sowie pGEM4-*HA-DHFR^{WT}* wurden mit *NotI* und *PstI* verdaut und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die isolierten und eluierten Fragmente *TOM6PstI* und pGEM4-*HA-DHFR^{WT}* wurden ligiert, in DH5 α transformiert und amplifiziert. Es konnte das Konstrukt pGEM4-*HA-DHFR^{WT}-TOM6* reisoliert werden. Analog dazu wurde das Konstrukt pGEM4-*HA-DHFR^{MUT}-TOM6* hergestellt. Die resultierenden DNA-Konstrukte wurden durch Sequenzierung (Fa. TopLab) auf die korrekte Nukleotidsequenz hin überprüft.

Primer	Sequenz
TL405	5'-CCC CCT CTA GAA TGT ATC CGT ATG ATG TGC CTG ACT ACG CAA TGG TTC GAC CAT TGA AC-3'
TL414	5'-CCC CCG TCG ACC GCG GCC GCG TCT TTC TTC TCG TAG ACT TC-3'
TL407	5'-CCC CCG CGG CCG CGA TGG ACG GTA TGT TTG CTA TGC CAG GCG CAG CAG CAG GT-3'
TL408	5'-CCC CCC TCG AGC TGC AGT TAT AAT TGT GGG GCC AAC ATG TCC AT-3'

Tabelle 1 Primer zur Klonierung der Plasmide pGEM4-HA-DHFR^{WT}-TOM6 und pGEM4-HA-DHFR^{MUT}-TOM6

2.1.8.2 YIp351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 und YIp351-GAL10-HA-DHFR^{MUT}-TOM6

Aus dem Plasmid pGEM4-HA-DHFR^{WT}-TOM6 wurde das Fragment mit den Schnittstellen *Xba*I und *Pst*I ausgeschnitten. Der Vektor YIp351 mit dem *Sac*I-/*Bam*HI-klonierten Galaktosepromotor (*GAL10*) wurde freundlicherweise von A. Tzagoloff zur Verfügung gestellt (Hill *et al.*, 1986). Er wurde ebenfalls mit den Enzymen *Xba*I und *Pst*I verdaut. Die DNA-Fragmente wurden über ein Agarosegel gereinigt und ligiert. Eine Transformation in DH5 α -Zellen mit anschließender Amplifizierung und Reisolierung ergab das Plasmid YIp351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6. Parallel dazu wurde das Konstrukt YIp351-GAL10-HA-DHFR^{MUT}-TOM6 hergestellt.

2.1.9 Verwendete Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 2 aufgelistet. Der pGEM4-Vektor (Fa. Promega) ist mit einem SP6-RNA-Polymerase-Promotor ausgestattet und wurde daher zur *in vitro* Transkription verschiedener Gene verwendet. Die pGEM4-Konstrukte mit Yme2 und dessen Derivaten wurden von B. Guiard hergestellt (Leonhard *et al.*, 2000).

Der YIp-Vektor ist ein das *LEU3*-Gen tragender Hefevektor, der in das mutierte *leu3*-Gen eines Hefestammes integrieren kann. Dazu ist das Plasmid vor der Transformation innerhalb

des *LEU3*-Gens zu linearisieren. Erhaltene Klone sind zweimal auf SC-Platten, denen der Auxotrophiemarker Leucin fehlt, zu selektionieren.

Die beiden Hefevektoren pRS314 und pRS316 (Sikorski und Hieter, 1989) wurden aus Hefestämmen isoliert, die freundlicherweise von K. Kassenbrock (Kassenbrock *et al.*, 1993) zur Verfügung gestellt wurden (siehe 2.2.8). Es sind centromerische Plasmide mit einem *URA3*- (pRS316) bzw. *TRP1*- (pRS314) Auxotrophie-Marker.

Plasmid	Referenz
pGEM4- <i>OXA1</i>	Herrmann <i>et al.</i> , 1997
pGEM4- <i>oxa1^{ts}</i>	K. Hell (unveröffentlicht)
pGEM4- <i>SU9(1-69)-DHFR^{MUT}-TM-DHFR^{MUT}</i>	Leonhard <i>et al.</i> , 2000
pGEM4- <i>SU9(1-69)-DHFR^{MUT}-YME2ΔN</i>	Leonhard <i>et al.</i> , 2000
pGEM4- <i>SU9(1-69)-YME2ΔN17</i>	Leonhard <i>et al.</i> , 2000
pGEM4- <i>YME2ΔC23</i>	Leonhard <i>et al.</i> , 2000
pQE40- <i>SU9(1-69)-DHFR^{MUT}-6HIS</i>	Stan <i>et al.</i> , 2000
pGEM4- <i>HA-DHFR^{WT}-TOM6</i>	diese Arbeit
pGEM4- <i>HA-DHFR^{MUT}-TOM6</i>	diese Arbeit
YIp351- <i>GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6</i>	diese Arbeit
YIp351- <i>GAL10-HA-DHFR^{MUT}-TOM6</i>	diese Arbeit
pRS316- <i>TOM40</i>	Kassenbrock <i>et al.</i> , 1993
pRS314- <i>tom40^{ts}</i> #6	Kassenbrock <i>et al.</i> , 1993
pFA- <i>MXKAN4</i>	EUROFAN Wach <i>et al.</i> , 1994
pFA- <i>MXHIS3</i>	EUROFAN Wach <i>et al.</i> , 1994

Tabelle 2 Verwendete Plasmide

2.1.10 Verwendete *E. coli*-Stämme

Für alle Klonierungen sowie für die Expression von Su9(1-69)-DHFR-6HIS wurde der *E. coli*-Stamm DH5α verwendet [supE44 ΔlacU196 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1]. Für die Analyse der *tom40^{ts}*-Suppressoren wurden *E. coli*-Zellen des Stammes MH1, zur Reinigung von Su9(1-69)DHFR-His der Stamm BL21 verwendet.

2.2 Methoden der Hefegenetik

2.2.1 Anzucht von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von Hefekulturen erfolgte standardmäßig bei 30°C, temperatursensitive (ts) Stämme wurden bei 24°C gezüchtet. Die Zellen wurden auf Lactatmedium oder YP-Medium kultiviert. Letzteres enthielt als Kohlenstoffquelle 2% (w/v) Glukose oder Galaktose und gegebenenfalls zusätzlich 0,5% (w/v) Laktat. Hefezellen aus einer Glycerin-Stammkultur wurden auf Agarplatten mit 2% (w/v) Galaktose ausgestrichen und im Brutschrank inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur von 10 ml angeimpft. Sie wurde mit 150 Upm geschüttelt und über mehrere Tage angezogen und verdünnt, ohne dass die Kulturen die stationäre Phase erreichten. Anschließend wurde die Hauptkultur angeimpft, die bei einer OD₅₇₈ von 1,5 bis 3 geerntet wurde.

Um Glycerin-Stammkulturen herzustellen, wurden mit der Impföse 2-3 Tage lang inkubierte Hefezellen von einer Agarplatte in 15% (v/v) Glycerin überführt und bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2 Transformation von *S. cerevisiae*

2.2.2.1 Herstellung Lithiumacetat-kompetenter Hefezellen

Der entsprechende Hefestamm wurde über Nacht in YPD kultiviert. Eine 50 ml Kultur wurde am nächsten Morgen auf eine OD₅₇₈ von ungefähr 0,2 verdünnt. Die Zellen wurden bis zu einer OD₅₇₈ von ungefähr 1,5 weiter inkubiert und 50 ml der Hefesuspension in einen sterilen Behälter abgefüllt. Die Zellen wurden bei RT 3 min lang bei 1000 g in sterilen Behältern in einer Heraeus Bactifuge[®] zentrifugiert, in 25 ml sterilem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die isolierten Zellen wurden in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 15 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Zellen in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und die Zellsuspension zu je 50 µl portioniert. Die kompetenten Zellen wurden sofort transformiert (Gietz und Schiestl, 1995).

2.2.2.2 Transformation Lithiumacetat-kompetenter Hefezellen

Einzelsträngige DNA (2 mg/ml) aus Lachsspermien wurde 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. 50 µl Suspension kompetenter Zellen wurden 5 min bei 3000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den Hefezellen wurden folgende Substanzen zugegeben: 240 µl PEG 3350 [50% (v/v)]; 36 µl 1 M Lithiumacetat; 25 µl Lachsspermien-DNA (2 mg/ml); 50 µl steriles Wasser, in dem 0,1-10 µg der zu transformierenden DNA gelöst war. Der Ansatz wurde 1 min kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei 30°C bzw. 24°C inkubiert. Darauf folgte eine 20-25minütige Inkubation bei 42°C. Nun wurden die Hefezellen 15 s bei 8000 Upm zentrifugiert, in sterilem Wasser resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert (Gietz und Schiestl, 1995). Die Selektion erfolgreich transformierter Zellen erfolgte über Auxotrophiemarker auf den entsprechenden SC-Platten oder über Geneticinresistenz auf YPD-Platten mit 500 µg/ml Geneticin (G418). Bei der Selektion mit G418 wurden die Zellen nach der Transformation zunächst in 1 ml YPD-Flüssigmedium aufgenommen und erst nach einer 2-3stündigen Inkubation bei 30°C in einem Hefeschüttler auf YPD-G418-Platten ausgestrichen. Üblicherweise wurde eine Transformationseffizienz von 10000 Transformanten/µg Plasmid-DNA und 200 Transformanten/µg PCR-Produkt bei homologer Rekombination erreicht.

2.2.3 Kreuzen und Sporulation von Hefestämmen

Zum Kreuzen wurden zwei Stämme unterschiedlichen Paarungstyps frisch angezogen. Zellen von beiden Stämmen wurden auf einer YPD-Platte mit der Impföse gemischt und 8 h bei 30°C bzw. 24°C inkubiert. Anschließend wurden diploide Hefezellen auf SC-Platten über je einen Auxotrophiemarker der beiden Stämme selektioniert. Nach einem Reinigungsausstrich auf einer entsprechenden SC-Platte wurden die diploiden Zellen auf nährstoffarmen Platten (Sporulationsplatten) zur Sporulation angeregt. Die Platten wurden 5-9 Tage bei 30°C inkubiert und die Sporen der einzelnen Tetraden anschließend mit einem Mikromanipulator getrennt. Die Sporen wurden zunächst auf YPD-Platten angezogen und dann auf SC-Platten über die entsprechenden Auxotrophiemarker selektioniert, um die gewünschten haploiden Stämme zu isolieren.

2.2.4 Herstellung mutanter Hefestämme

2.2.4.1 Disruption von Genen

Disruptionsmutanten wurden hergestellt, indem die entsprechenden Gene über homologe Rekombination durch eine den Kanamycin- oder den Histidinmarker tragende Kasette ersetzt wurden. Primer wurden synthetisiert, die an ihren äußeren Enden mit dem zu deletierenden Gen und mit ihren inneren Enden mit den Plasmiden pFA-*MXKAN4* bzw. pFA-*MXHIS3* hybridisierten. Durch PCR konnte eine entsprechende Disruptionskasette amplifiziert werden (Wach *et al.*, 1994). Für die Reaktion wurden eine zweistufige PCR durchgeführt (siehe 2.1.4). Lithiumacetat-kompetente Hefezellen wurden mit je 5 µl PCR-Produkt transformiert. Zellen wurden auf YPD-G418-Platten (für den Kanamycin-Marker) oder auf SC-His-Platten (für den Histidin-Marker) selektioniert und die Kolonien nach 3-4 Tagen noch einmal auf Selektionsplatten ausgestrichen. Mehrere Klone wurden mittels PCR auf Disruption getestet (siehe 2.2.5) und nach einem Zellaufschluss, SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulose mit entsprechenden Antikörpern dekoriert. Disruptionen wurden im Wildtyp-Stamm W303-1A sowie in Mutanten durchgeführt, die bereits eine Deletion oder Punktmutationen aufwiesen (siehe Tab. 3).

2.2.4.2 Überexpression von HA-DHFR^{WT}-Tom6 in Stämmen von *S. cerevisiae*

Das integrative Plasmid YIp351 (Hill *et al.*, 1986) mit dem Konstrukt *GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6* sowie YIp351-*GAL10-HA-DHFR^{MUT}-TOM6* wurden mit dem Enzym *Cla*I linearisiert und die DNA durch Ethanol-fällung gereinigt. 15 µl DNA wurden in Lithiumacetat-kompetente Hefezellen transformiert und auf SC-Leu-Platten selektioniert. Nach zweimaligem Ausstreichen der erhaltenen Klone auf Selektionsplatten konnten die Transformanten auf YPD-Medium kultiviert werden. Zur Expression des Fusionsproteins wurden die Zellen auf YPGal-Medium kultiviert.

2.2.5 Nachweis von Genmanipulationen in *S. cerevisiae*

Die Integration von PCR-Produkten zur synthetischen Deletion eines Gens wurden mittels PCR (siehe 2.1.4) geprüft (Wach *et al.*, 1994). Oligonukleotide wurden um jeweils 400 bp außerhalb des 5' bzw. 3'-Endes des Genlokus synthetisiert. Die erhaltenen PCR-Produkte

ergaben im Wildtyp die Größe des Wildtyp-Gens bzw. im Falle einer erfolgreichen Disruption die Größe der integrierten Disruptionskassette. Ein Primer außerhalb des Genlokus und ein weiterer Primer innerhalb der Disruptionskassette ergab bei entsprechender PCR-Reaktion Fragmente der richtigen Größe im Falle einer Disruption, keine Fragmente beim Wildtyp.

2.2.6 Mutagenese des Hefestammes *tom40^{ts}* mit EMS

Methansulfonsäureethylester (EMS) wurde zur Mutagenese des Hefestammes *tom40^{ts}* nach (Ausubel *et al.*, 1992) und (Lawrence, 1991) angewandt, um Klone zu erhalten, die den temperatursensitiven Phänotyp von *tom40^{ts}* supprimieren. EMS produziert fast ausschließlich Transitionen an G- und C-Nukleotiden. Eine Titration von EMS in einem Vortest ergab, dass bei 0,1% EMS eine Überlebensrate von ca. 60% der mutagenisierten Zellen gewährleistet ist. Die Mutagenese wurde in Flüssigkultur bei 24°C für 1 h durchgeführt und die Mutagenesereaktion mit 5% Natriumthiosulfat gestoppt. Ebenso wurden alle Gefäße, die mit EMS in Berührung kamen, mit 5% Natriumthiosulfat gründlich ausgespült. Durch Messung der OD₅₇₈ wurde die Zellzahl ermittelt, jeweils 12x10⁵ Zellen pro Platte auf YPD ausgestrichen und diese bei nicht-permissiver Temperatur (37°C) für 3 Tage inkubiert. Suppressoren wurden erneut auf YPD ausgestrichen und für weitere 2 Tage inkubiert.

2.2.7 Lokalisierung von Mutationen auf dem Plasmid

Um Klone zu identifizieren, in denen Rückmutationen auf dem *tom40^{ts}* tragenden Plasmid zur Suppression des Phänotyps führten, wurden von allen Suppressoren die Plasmide isoliert, im *E. coli*-Stamm MH1 amplifiziert und in den isogenen Wildtyp-Stamm KKY3 transformiert. KKY3 (Kassenbrock *et al.*, 1993) weist eine Deletion des chromosomalen *TOM40* auf und trägt das *TOM40*-Gen auf einem Plasmid [pRS316/*TOM40* (*URA3*)]. Nach Transformation der aus den Suppressorstämmen isolierten Plasmide wurden die Transformanten auf 5-FOA-Platten (5-Fluoro-*orotic acid*) ausgestrichen. Die Produkte des *Uracil*-Gens wandeln 5-FOA in das für die Zellen toxisch wirkende Fluorodeoxyuridin um (Boeke *et al.*, 1987), weshalb auf Zellen selektioniert werden kann, die das *URA3*-Plasmid und damit das *TOM40*-Gen verloren haben (*URA3*-Gegenselektion). Die resultierenden

Teststämme stellten Zellen dar, die keiner Mutagenese unterzogen wurden, und enthielten die jeweiligen Plasmide pRS314/*tom40^{ts}* (*TRP1*) der Suppressorstämme. Die Teststämme wurden auf ihren Phänotyp hin untersucht: waren sie temperatursensitiv, konnte geschlossen werden, dass das Plasmid im Ausgangs-Suppressorstamm durch die Mutagenese nicht betroffen war (siehe auch schematische Darstellung, Abb. 29). Das Plasmid des Suppressors *Sup1*, der eindeutig Plasmid-Bezug aufwies und einen starken Suppressions-Phänotyp hatte, wurde sequenziert.

2.2.8 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Die verwendeten Hefestämme sind in Tab. 3 aufgelistet. Die Stämme *pre1-1*, *pre1-1pre2-1* und *pre1-1pre4-1* mit den Mutationen in Untereinheiten des Proteasoms wurden freundlicherweise von D.H. Wolf zur Verfügung gestellt (Gerlinger *et al.*, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1993; Hilt *et al.*, 1993; Seufert und Jentsch, 1992). Der Stamm *tom40^{ts}#6* [Δ *tom40* pRS314/*tom40^{ts}*(TRP)#6] und der isogene Wildtyp KKY3 [Δ *tom40* pRS316/TOM40^{WT} (URA)] wurden von K. Kassenbrock (Kassenbrock *et al.*, 1993) erhalten. Der Stamm *mpr1-1* mit dem isogenen Wildtypstamm *Mpr1* wurden freundlicherweise von T. Rinaldi (Rinaldi *et al.*, 1998), der Stamm Δ *ump1* von J. Dohmen (Ramos *et al.*, 1998) zur Verfügung gestellt.

Stamm	Genotyp
W303-1A	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100</i>
Δ <i>oxa1</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1::HIS3</i> (Hell <i>et al.</i> , 1997)
Δ <i>oxa1</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1::KAN-MX4</i> (Hell <i>et al.</i> , 1997)
<i>oxa1^{ts}</i> (pet ts1402)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1^{ts} L240S</i> (Hell <i>et al.</i> , 1997)
Δ <i>yta10</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 yta10::URA3</i> (Pajic <i>et al.</i> , 1994)
Δ <i>yme1</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 yme1::URA3</i> (Leonhard <i>et al.</i> , 1996)
<i>oxa1^{ts}Δyta10</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1^{ts} L240S yta10::HIS3</i> (diese Arbeit)
<i>oxa1^{ts}Δyme1</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1^{ts} L240S yme1::HIS3</i> (diese Arbeit)

$\Delta yta10/yta10^{E559Q}$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 yta10::URA3 YCplac111::ADH1-yta10^{E559Q} (LEU2)</i> (Arlt et al., 1996)
$\Delta cox18$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1::HIS3</i> (K. Hell, unveröffentl.)
$\Delta pnt1$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 pnt1::HIS3</i> (diese Arbeit)
$\Delta mba1$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 mba1::HIS3</i> (Preuss et al., 2001)
$\Delta oxa1\Delta cox18$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1::KAN-MX4 cox18::HIS3</i> (diese Arbeit)
<i>oxa1^{ts}</i>$\Delta cox18$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1^{ts} L240S cox18::HIS3</i> (diese Arbeit)
$\Delta oxa1\Delta mba1$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1::KAN-MX4 mba1::HIS3</i> (Preuss et al., 2001)
<i>oxa1^{ts}</i>$\Delta mba1$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1^{ts} L240S mba1::HIS3</i> (Preuss et al., 2001)
$\Delta oxa1\Delta pnt1$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1::KAN-MX4 pnt1::HIS3</i> (diese Arbeit)
<i>oxa1^{ts}</i>$\Delta pnt1$	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 can1-100 oxa1^{ts} L240S pnt1::HIS3</i> (diese Arbeit)
<i>yta12^{ts}</i>$\Delta yme1$	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 ura3-52 yta12 yme1::KAN</i> (K. Leonhard, unveröffentl.)
W303/HA-DHFR^{WT}-TOM6	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 YIp351::GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 (LEU2)</i> (diese Arbeit)
W303/HA-DHFR^{MUT}-TOM6	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 YIp351-GAL10-HA-DHFR^{MUT}-TOM6 (LEU2)</i> (diese Arbeit)
<i>pre1-1</i>/HA-DHFR^{WT}-TOM6	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 pre1-1 YIp351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 (LEU2)</i> (diese Arbeit)
<i>pre1-1pre4-1</i>/HA-DHFR^{WT}-TOM6	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 pre1-1 pre4-1 YIp351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 (LEU2)</i> (diese Arbeit)
<i>Mpr1</i>/HA-DHFR^{WT}-TOM6	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 trp1-Δ2 can1-100 YIp351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 (LEU2)</i> (diese Arbeit)
<i>mpr1-1</i>/HA-DHFR^{WT}-TOM6	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 trp1-Δ2 can1-100 mpr1-1 YIp351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 (LEU2)</i> (diese Arbeit)
$\Delta pep4$/HA-DHFR^{WT}-TOM6	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 pep4::KAN YIp351-GAL10-HA-DHFR^{MUT}-TOM6 (LEU2)</i> (diese Arbeit)
<i>Ump1</i>/HA-DHFR^{WT}-TOM6	<i>MATa his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 ura3-52 lys2-801 YIp351-GAL10-HA-DHFR^{MUT}-TOM6 (LEU2)</i> (diese Arbeit)
$\Delta ump1$/HA-DHFR^{WT}-TOM6	<i>MATa his3Δ200 leu2-3,112 trp1Δ63 ura3-52 lys2-801 ump1::HIS3 YIp351-GAL10-HA-DHFR^{MUT}-TOM6 (LEU2)</i> (diese Arbeit)
KKY3	<i>MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-3,112suc2-Δ9 trp1-Δ901 ura3-52 isp42::HIS3 pRS316::TOM40 (URA3)</i> (Kassenbrock et al., 1993)
<i>tom40^{ts}</i> #6	<i>MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-3,112suc2-Δ9 trp1-Δ901 ura3-52 isp42::HIS3 pRS314::tom40^{ts} #6 (TRP1)</i> (Kassenbrock et al., 1993)

Tabelle 3 Verwendete Hefestämme

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Denaturierende Fällung von Proteinen mit TCA

Proteine wurden nach Zugabe von TCA [12,5% (w/v) Endkonzentration] während einer nachfolgenden Inkubation von mindestens 10 min auf Eis ausgefällt. Die Proben wurden zentrifugiert (20 min, 30000 g, 4°C), ein- bis zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen und nach dem Trocknen bei 37°C in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970). Dazu wurden Glasplatten von 160 x 140 mm und Abstandhalter von 1 mm Dicke verwendet. Die Endkonzentrationen von Acrylamid bzw. Bisacrylamid betragen je nach Molekulargewicht der untersuchten Proteine 16% (w/v) bzw. 0,11% (w/v) oder 12% (w/v) bzw. 0,08% (w/v). Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA für 2 h 20 min. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert.

Trenngellösung:	16% (w/v) Acrylamid/0,1% (w/v) Bisacrylamid (für Proteine mit einer molekularen Masse bis ca. 60 kDa) 10-12% (w/v) Acrylamid/0,1% (w/v) Bisacrylamid (für Proteine mit einer molekularen Masse über 60 kDa) 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,03% (v/v) TEMED.
Sammelgellösung:	5% (w/v) Acrylamid; 0,03% (w/v) Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED.
Bodengellösung:	20% (w/v) Acrylamid; 0,13% (w/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% APS (w/v); 0,25% (v/v) TEMED.
10x-Laufpuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 8,3; 3,8 M Glyzin; 1% (w/v) SDS.

2.3.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, wurden sie nach dem Halbtrockenverfahren auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (Kyshe-Anderson, 1984; Towbin *et al.*, 1979). Gel, Nitrozellulose-Membran und Whatman-Filterpapier wurden mit Blotpuffer [20 mM Tris; 150 mM Glyzin; 20% (v/v) Methanol; 0,02% (w/v) SDS] getränkt. Zwei Lagen Filterpapier wurden auf die untere Graphitelektrode gelegt, über die Nitrozellulose-Membran, das Gel und weitere zwei Lagen Filterpapier geschichtet wurden. Die obere Graphitelektrode wurde aufgelegt und mit Gewichten beschwert. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,5 h bei 200 mA. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran anschließend mit entsalztem Wasser gewaschen, in Ponceau S-Färbelösung [0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA] geschwenkt und mit entsalztem Wasser leicht entfärbt.

2.3.4 Quantifizierung durch Autoradiographie/Densitometrie und durch Phosphorimaging

Radioaktiv markierte Proteine auf Nitrozellulose-Membranen wurden entweder durch Autoradiographie und Densitometrie oder durch Phosphorimaging quantifiziert. Nach dem Trocknen unter einer Rotlicht-Wärmelampe wurde ein Röntgenfilm für mehrere Stunden bis Tage exponiert (Autoradiographie). Die auf den Röntgenfilmen sichtbaren Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Fa. Pharmacia) eingelesen und ihre Intensität gemessen (Densitometrie). Alternativ wurden die Nitrozellulose-Membranen nach dem Transfer der Proteine direkt auf Phosphorimaging-Platten exponiert und die Intensität der radioaktiv markierten Proteinbanden durch einen Phosphorimager (Fa. Fuji) bestimmt.

2.3.5 Synthese von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen *in vitro*

Um Vorstufenproteine für Importreaktionen in isolierte Mitochondrien zu synthetisieren, die mit [³⁵S]Methionin markiert sind, wurden die im Plasmid pGEM4 klonierten Konstrukte mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase in mRNA transkribiert und anschließend in Kaninchen-

Retikulozytenlysat in Gegenwart von [³⁵S]Methionin translatiert (Pelham und Jackson, 1976).

2.3.5.1 Transkription

Zu 120 µl Transkriptionsansatz, 10 µl 2,5 mM m⁷G(5')ppp(5')G und 4,5 µl RNasin (40 U/µl) wurden 10-20 µg DNA und steriles Wasser ad 200 µl zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion mit 1,5 µl SP6-RNA-Polymerase (25 U/µl) gestartet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 20 µl 10 M Lithiumchlorid und 600 µl 96%igem (v/v) Ethanol (-20°C) wurde die RNA durch eine 30minütige Inkubation bei -70°C und eine ebenfalls 30 min lange Zentrifugation bei 20000 g und 2°C isoliert. Der Überstand wurde abgenommen, die RNA bei 30°C vorsichtig getrocknet und in 50 µl Wasser und 1 µl RNasin (40 U/µl) gelöst. Die RNA wurde in Portionen zu je 16 µl bei -70°C eingefroren.

10x Transkriptionssalz: 400 mM HEPES/KOH pH 7,4; 60 mM Magnesiumacetat;
20 mM Spermidin

Transkriptionsansatz: 1 ml 10x-Transkriptionssalze; 20 µl 50 mg/ml BSA; 100 µl 1 M DTT; 50 µl 100 mM ATP; 50 µl 100 mM CTP; 10 µl 100 mM GTP; 50 µl 100 mM UTP; steriles Wasser ad 5 ml; sterilfiltriert

2.3.5.2 Translation in Retikulozytenlysat

Für die Translation von Vorstufenproteinen *in vitro* wurden 70 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 2 µl RNasin (40 U/µl), 2 µl Aminosäure-Mix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin je 1 mM), 8 µl [³⁵S]Methionin (10 mCi/ml) und 16 µl RNA gemischt. Der Ansatz wurde 60 min bei 30°C inkubiert. Durch eine 30minütige Zentrifugation des Translationsansatzes bei 100000 g und 2°C wurden an Ribosomen gebundene, unvollständig translatierte Polypeptidketten entfernt. Anschließend wurden 2,5 µl 0,2 M Methionin und 20 µl 1,5 M Saccharose zugegeben. Der Translationsansatz wurde portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.6 Reinigung von Su9(1-69)-DHFR mit Histidin-Anhang aus *E. coli*

Das Fusionsprotein aus mitochondrialer Zielsequenz von ATPase-Untereinheit 9, der DHFR und einem Histidin-Anhang wurde in *E. coli* exprimiert. Eine Übernacht-Kultur in LB-Amp-Medium bei 37°C wurde bei einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 2 mM IPTG für 1 h induziert. Die Zellen wurden geerntet (10 min, 4000 Upm, Beckman-JA10-Rotor, 4°C), in 25 ml Puffer A [30 mM Tris/HCl pH 7,0, 7 M Harnstoff, 10 mM Imidazol, 0,5% (v/v) Triton X-100] resuspendiert und durch Beschallung solubilisiert (Mikrospitze, Stufe 1, 40% Leistung, 10 Impulse von je 10 s, unterbrochen durch je 10 s Kühlung auf Eis). Durch Zentrifugation (15 min, 12000 Upm, Beckmann-JA20-Rotor, 4°C) wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Der Überstand wurde zu 2 ml NiNTA-Agarose (mit Puffer A äquilibriert, (Hochuli, 1988), gegeben und bei 4°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Material in einer Säule gepackt, in einer FPLC mit 20 ml Puffer B (30 mM Tris/HCl pH 7,0, 7 M Harnstoff, 10 mM Imidazol) bei einer Flußrate von 0,5 ml/min gewaschen und das Protein mit einem Gradienten von 10-300 mM Imidazol bei gleicher Flußrate eluiert. 10 µl der gesammelten 5 ml-Fractionen wurden durch SDS-PAGE untersucht, die Fractionen mit dem angereicherten Protein vereinigt, die Proteinkonzentration gemessen und Aliquots bei -70°C gelagert.

2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford, 1976, mit dem Reagenz Bio-Rad-Proteinassay, das nach Anleitung der Herstellerfirma verwendet wurde. Nach Absorptionsmessung der Eichkurve mit dem Protein IgG sowie der zu messenden Proben bei 595 nm konnte die Proteinkonzentration errechnet werden.

2.3.8 Messung der chymotryptischen Aktivität von Proteasom-Mutanten

Um die chymotryptische Aktivität der Proteasom-Mutanten *pre1-1*-HA-DHFR^{MUT}-Tom6 und *pre1-1pre4-1*-HA-DHFR^{MUT}-Tom6 zu ermitteln, wurde aus dem entsprechenden Wildtyp-Stamm W303-1A-HA-DHFR^{MUT}-TOM6 und den mutanten Hefestämmen Cytosol präpariert wie unter 2.4.3 beschrieben. Beim letzten Schritt wurde nicht das Membranpellet, sondern der Überstand gesammelt und die Konzentration durch Proteinbestimmung ermittelt.

250 µg Cytosol wurde in 100 mM Tris pH 8,0 mit 1 mM Substrat S12 Z-G-G-L-pNitroanilid in DMSO gemischt und für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit gleicher Menge 10% (w/v) TCA gestoppt und mit 8facher Menge Entwickler-Mix (200 µl 0,1% NaNO₂, 200 µl 0,5% Ammoniumsulfat, 400 µl 0,05% N-Naphthylethylendiamin in 95% Ethanol) entwickelt (Heinemeyer *et al.*, 1993; Heinemeyer *et al.*, 1991). Eine Extinktionsmessung bei 545 nm ergab ein Maß für die chymotryptische Aktivität im isolierten Cytosol.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Alkalische Lyse von Hefezellen

1 ml einer Hefekultur (OD₅₇₈ ca. 1) wurden 3 min bei 13000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 0,5 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,0 und 1 mM EDTA resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert. Nun wurden die Zellen in 0,5 ml H₂O resuspendiert und mit 75 µl Aufschlußpuffer [2 M NaOH; 2 mM PMSF; 7% (v/v) β-Mercaptoethanol] gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden 575 µl 50% (w/v) TCA (4°C) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt, mindestens 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (20 min, 30000 g, 2°C). Der Proteinniederschlag wurde zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 40 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert (im wesentlichen nach Yaffe und Schatz, 1984). Anschließend wurden die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.4.2 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung erfolgte nach der von Daum beschriebenen Methode (Daum *et al.*, 1982). Die Hefekulturen wurden bei einer OD₅₇₈ von 1,2-1,9 geerntet. Mitochondrien, die aus Hefekulturen einer OD₅₇₈ von unter 1,5 isoliert wurden, wurden für Experimente verwendet, welche die osmotische Disruption der Außenmembran erfordern. Wurden Mitochondrien aus Kulturen einer OD₅₇₈ um 1,8 gewonnen, waren sie für Versuche geeignet, bei denen die Integrität der Außenmembran wichtig war.

Die Hefekulturen wurden zentrifugiert (5 min, 2000 g, RT), die geernteten Hefezellen mit destilliertem Wasser gewaschen und ihr Feuchtgewicht bestimmt. Sie wurden pro g Feuchtgewicht in 1 ml 0,1 M Tris/HCl pH 9,4 und 10 mM DTT resuspendiert und 10 min bei 30°C bzw. 24°C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 2000 g), einmal in 1,2 M Sorbitol gewaschen und pro g Feuchtgewicht in 6,5 ml 1,2 M Sorbitol, 3 mg Zymolyase und 20 mM Kaliumphosphat pH 7,4 resuspendiert. Der Ansatz wurde 30-60 min bei 30°C bzw. 24°C unter Schütteln inkubiert. Die Bildung von Sphäroplasten wurde nach 30 min durch osmotische Lyse in Wasser getestet. Dafür wurden je 50 µl Sphäroplastenlösung mit 2 ml Wasser bzw. 1,2 M Sorbitol gemischt und nach 2 min die optische Dichte bei 578 nm gemessen. Sobald der Wert in Wasser gegenüber dem in 1,2 M Sorbitol auf 20% gesunken war, wurden die Sphäroplasten geerntet (5 min, 2000 g, 2°C) und in 13 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer/g Feuchtgewicht resuspendiert [10 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 0,5% (w/v) fettsäurefreies BSA; 1 mM PMSF]. Die Sphäroplasten wurden durch 13 Stöße in einem Glashomogenisator auf Eis aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 2000 g und 2°C wurde der Überstand 10 min bei 17500 g und 2°C zentrifugiert. Die zentrifugierte Fraktion wurde in 10 ml kaltem SEM-Puffer resuspendiert und erneut 5 min bei 2000 g und 2°C zentrifugiert. Der Überstand wurde 10 min bei 17500 g und 2°C zentrifugiert. Isolierte Mitochondrien wurden in SEM-Puffer aufgenommen, eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt, nachfolgend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.4.3 Isolierung von Membranen aus *S. cerevisiae*

Die gewünschten Hefezellen wurden von Platte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in sterilem Wasser resuspendiert. Ein Volumen dieser Hefesuspension, das einer OD₅₇₈-Einheit von 1 entsprach, wurde in einer Eppendorf-Tischzentrifuge kurz zentrifugiert und in 200 µl Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 10 mM EDTA; 2 mM PMSF) aufgenommen. Dem Ansatz wurden Glaskügelchen (Ø 0,3 mm) entsprechend einem Volumen von etwa 200 µl zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden dreimal 30 s stark geschüttelt und jeweils anschließend 30 s auf Eis gekühlt. Dann wurden 600 µl Lysepuffer zugegeben und die Ansätze 10 min bei 370 g und 4°C zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Membranen 10 min bei 16 000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand entspricht der cytosolischen Fraktion. Die isolierten Membranen wurden in

25 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei RT geschüttelt. Ein Erhitzen auf über 40°C muss vermieden werden, da dies zu Aggregation der isolierten Membranproteine führen kann.

2.4.4 Induktion von Proteolyse in isolierten Mitochondrien

Um die Stabilität von mitochondrialen Proteinen zu untersuchen, wurden 30 µg Mitochondrien (0,5 mg/ml) in Importpuffer (siehe 2.6) in Anwesenheit von ATP und ATP-regenerierendem System (2 mM ATP; 2 mM NADH; 20 mM Kreatinphosphat; 100 µg/ml Kreatinkinase, siehe auch Kap. 2.6) bei 25°C oder 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Proteolyse durch Kühlung der Proben auf Eis beendet. Mitochondrien wurden 10 min bei 4500 g und 4°C zentrifugiert, mit 500 µl SHKCl-Puffer gewaschen und erneut 10 min bei 4500 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 25 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Endogene oder importierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot bzw. über Autoradiographie und Phosphorimaging analysiert.

2.4.5 Import von Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien und Induktion von Proteolyse

Isolierte Mitochondrien (30 µg) wurden mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Importpuffer (siehe Kap. 2.6) unter Zugabe von ATP und ATP-regenerierendem System (siehe Kap. 2.6) resuspendiert. Mitochondrien von temperatursensitiven Stämmen wurden bei 37°C für 15-20 min vorinkubiert, um den Phänotyp *in vitro* zu induzieren. Der Ansatz wurde 3 min bei 25°C vorinkubiert, um die Funktionen der mitochondrialen Proteine zu aktivieren. Retikulozytenlysat wurde in einer Endkonzentration von 1-2% (v/v) des Gesamtvolumens zugefügt. Die Vorstufenproteine wurden 10 bis 20 min bei 25°C importiert. Nicht importierte Vorstufenproteine wurden anschließend mit 100 µg/ml Trypsin (20 min, 4°C) oder 50 µg/ml Proteinase K (PK) (30 min, 4°C) abgebaut. Die zugegebenen Proteasen wurden durch einen 20fachen Überschuß an Trypsininhibitor (STI) bzw. durch 1,5 mM PMSF inhibiert. Um die Stabilität der importierten Proteine zu untersuchen, wurden die Ansätze zentrifugiert, die Mitochondrien erneut in Importpuffer mit ATP und ATP-regenerierendem System

resuspendiert und – wie in 2.4.4 beschrieben – weiterbehandelt. Die Importreaktion wurde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie bzw. Phosphorimaging analysiert.

2.4.6 Herstellen von Mitoplasten

Zur Lokalisierung von überexprimierten mitochondrialen Proteinen, importierten Vorstufenproteinen und zum Absättigen der Importporen der mitochondrialen Innenmembran mit Su9(1-69)-DHFR wurde die Außenmembran der Mitochondrien durch osmotisches Schwellen disruptiert und damit Mitoplasten hergestellt. Dazu wurden 30 µg Mitochondrien in 270 µl 20 mM HEPES/KOH pH 7,2 (4°C) mit 30 µl Importpuffer resuspendiert. Nach Behandlung entsprechend des jeweiligen Experimentes wurden die Mitoplasten 10 min bei 18000 g zentrifugiert, mit SHKCl-Puffer gewaschen und in 25 µl SDS-Probenpuffer lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Um die Disruption der Außenmembran und die Integrität der Innenmembran zu prüfen, wurde eine Westernblot-Analyse mit Antiseren gegen Cytochrom *b*₂ (Cyb2, löslich im Intermembranraum), ADP/ATP-Translokator (Aac2, Innenmembran) und Mge1 (löslich in der Matrix) durchgeführt.

2.4.7 Submitochondriale Lokalisierung von Proteinen

2.4.7.1 Proteasebehandlung

Zur submitochondrialen Lokalisierung von überexprimierten mitochondrialen Proteinen und importierten Vorstufenproteinen wurden 50 µg Mitochondrien und Mitoplasten (jeweils 0,5 mg/ml) in Abwesenheit oder Gegenwart von 50 µg/ml PK für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Proteolyse der Proteine, die vom Intermembranraum aus zugänglich sind, wurde durch die Zugabe von 1,5 mM PMSF beendet. Proteine und Fragmente wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und über Autoradiographie bzw. Westernblot-Analyse detektiert. Die Disruption der Außenmembran bzw. die Integrität der Innenmembran wurde immunologisch mit Antiseren gegen Aac2, Mge1 und Yme1 oder Cyb2 überprüft.

2.4.7.2 Alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen

Die Membraninsertion von in isolierte Mitochondrien importierten Proteinen wurde durch alkalische Extraktion der Membranen durch Natriumcarbonat überprüft (Fujiki *et al.*, 1982). Dabei verbleiben integrale Membranproteine nach anschließender Zentrifugation in der Pelletfraktion, lösliche und peripher an die Membran gebundene Proteine sind im Überstand. Nach dem Import der Vorstufenproteine wurden die Mitochondrien durch eine 10minütige Zentrifugation bei 4500 g und 4°C isoliert, mit 500 µl SHKCl-Puffer gewaschen und anschließend in 0,1 M Na₂CO₃ pH 11,5 und 1 mM PMSF in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden die löslichen Bestandteile und die nicht extrahierbaren Bestandteile der Membranen durch eine 60minütige Zentrifugation bei 220000 g getrennt. Der Überstand wurde mit TCA gefällt und wie die zentrifugierten Bestandteile mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert. Die Trennung in integrale Membranbestandteile und lösliche Proteine wurde durch immunologischen Nachweis mit Antiseren gegen Aac2, Mge1 und Cyb2 überprüft.

2.4.8 Inaktivierung der mitochondrialen ATP-abhängigen Proteasen

2.4.8.1 ATP-Depletion isolierter Mitochondrien

Um die ATP-Abhängigkeit der Abbauvorgänge zu prüfen, wurde der Import von *in vitro* translatierten Proteinen in isolierte Mitochondrien ohne ATP und ATP-regenerierendem System (siehe Kap. 2.6) vorgenommen. Nach der Trypsinbehandlung wurden die Mitochondrien 10 min bei 4500 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden sie in Importpuffer ohne Zusatz von ATP und ATP-regenerierendem System, aber mit 4 U/ml Apyrase (-ATP) bzw. als Kontrolle in Importpuffer mit ATP und ATP-regenerierendem System (+ATP) resuspendiert. Die Ansätze wurden 10 min bei 4°C und daraufhin 30 min bei 37°C inkubiert. Der Abbau der importierten Proteine mit und ohne ATP wurde durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.4.8.2 Komplexierung von Metallionen in isolierten Mitochondrien

Der Import der Vorstufenproteine wurde in Gegenwart von nur 1 mM Magnesiumacetat anstelle der unter Standardbedingungen verwendeten 10 mM durchgeführt. Alle übrigen Konzentrationen und Bedingungen entsprechen dem Standardprotokoll für Import in Mitochondrien (siehe Kap. 2.4.5). Nach der Trypsinbehandlung wurden einer Hälfte des Importansatzes ad 5 mM EDTA und 5 mM *o*-Phenantrolin zugesetzt (+EDTA/*o*-Phe). Die Proben wurden 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie für 30 min bei 37°C inkubiert.

2.4.9 Pulsmarkierung und Abbau *in vivo*

Um den Abbau von endogenem Protein Tom40^{ts} nach Translation zu verfolgen, wurden Zellen vom Stamm *tom40^{ts} in vivo* mit [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) radioaktiv markiert (pulse). Hefezellen aus einer bei 24°C logarithmisch wachsenden Kultur wurden für 7 min mit 5 µl [³⁵S]-Methionin/OD-Einheit Zellen versetzt, bevor die Translation mit einem Überschuß an Methionin (10 mM) und 100 µg/ml Cycloheximid gestoppt wurde. Die Kultur wurde von 24°C auf 37°C erwärmt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben von jeweils 3 OD-Einheiten entnommen (chase) und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden geerntet und alkalisch aufgeschlossen. Durch eine nachfolgende Immunfällung (siehe 2.5.4) mit einem gegen ein C-terminales Peptid von Tom40 gerichtetes Antiserum wurde noch vorhandenes Tom40^{ts}-Protein isoliert und über SDS-PAGE und Autoradiographie quantifiziert.

2.4.10 Proteintranslation in isolierten Mitochondrien (*in organello* Translation)

Die Translation der mitochondrial kodierten Proteine wurde modifiziert nach dem Protokoll von (McKee und Poyton, 1984) in isolierten Mitochondrien durchgeführt. Ein Ansatz enthielt: 20 µl Translationspuffer (0,9 M Sorbitol; 225 mM K-Phosphatpuffer pH 7,4; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 19 mM MgSO₄; 6 mM ATP; 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), 1,5 µl Pyruvatkinase (2 mg/ml), 20 µg Mitochondrien und H₂O zu einem Endvolumen von 30 µl. Nach Vorinkubation für 5 min bei 25°C (Mitochondrien

von temperatursensitiven-Mutanten wurden wiederum für 15 min bei 37°C vorinkubiert) wurden 1 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 25°C inkubiert, durch Zugabe von 7,5 µl 200 mM Methionin und 2 µl Puromycin (1g/l) wurde die Translation gestoppt und die Proben aliquotiert. Eine Inkubation bei 37°C für verschieden lange Zeit erlaubte, die Stabilität von neusynthetisierten mitochondrialen Translationsprodukten zu analysieren. Mitochondrien wurden durch Zentrifugation isoliert, in 200 µl Waschpuffer (0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 5 mM Methionin) gewaschen und in Auftragspuffer aufgenommen, um mittels SDS-PAGE analysiert zu werden.

2.4.11 Chemische Quervernetzung von Proteinen

Radioaktiv markiertes Vorstufenprotein DHFR^{MUT}-Yme2ΔN wurde mit Innenmembranproteinen chemisch quervernetzt. Dazu wurde das Vorstufenprotein wie in 2.4.5 beschrieben in isolierte Mitochondrien importiert. Nach Trypsinverdau wurde der Ansatz für 5 min bei 25°C weiterinkubiert, um vollständigen Import aller Translokationsintermediate zu gewährleisten. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt. 300 µM Quervernetzer DFDNB (in DMSO) wurde zugegeben und der Ansatz für weitere 20 min bei 0°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM Glyzin pH 8,0 10 min gestoppt. Die Mitochondrien wurden isoliert, mit 500 µl SHKCl-Puffer gewaschen, solubilisiert und einer Immunfällung mit verschiedenen Antikörpern (siehe 2.5.4) unterzogen.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Gewinnung polyklonaler Antiseren in Kaninchen

Zur Herstellung spezifischer Antiseren wurden chemisch synthetisierte Oligopeptide als Antigene eingesetzt, die in Tab. 4 aufgelistet sind. Die Peptide wurden von Fa. Neosystem synthetisiert und über einen endständigen Cysteinrest an ein aktiviertes Trägerprotein gebunden. Dafür wurden 2 mg mit Maleimid-aktiviertem Ovalbumin (Fa. Pierce) als Trägerprotein in 200 µl Wasser gelöst und sofort mit 200 µl des Oligopeptids gemischt, das in einer Konzentration von 10 mg/ml in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 gelöst war.

Nach einer Inkubation von 2 h bei 25°C wurde das Konjugat durch Gelfiltration über eine PD10-Säule in 100 mM Natriumchlorid und 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 überführt. Für die Erstinjektion der Kaninchen wurden etwa 200 µg des gekoppelten Peptids mit 200 µl TiterMax™ vermischt und subkutan an 2-4 Stellen injiziert. Weitere Injektionen erfolgten in einem Abstand von vier Wochen mit inkomplettem Freundschens Adjuvans. 10 Tage nach jeder Injektion wurde den Kaninchen ungefähr 30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes bei RT wurde das Serum durch zweimalige Zentrifugation (erst 5 min bei 3000 g, dann 15 min bei 40000 g) gewonnen. Anschließend wurde das Komplementsystem inaktiviert, indem das Serum 30 min auf 56°C erhitzt wurde. Die Lagerung des Serums erfolgte bei -20°C.

2.5.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Nitrozellulose-Membranen nach dem Proteintransfer bei RT für 30 min in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer geschwenkt. Es folgte eine 60minütige Immundekoration mit einem spezifischen Antiserum, das je nach Titer zwischen 1:200 und 1:2000 mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS verdünnt war. Danach wurden die Membranen 10 min in TBS-Puffer, ebenfalls 10 min in 0,05% (v/v) Triton X-100 in TBS und wieder 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen Immunglobulin G von Kaninchen 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 erneut gewaschen und die gebundene Peroxidase mit wenigen ml chemolumineszierenden Reagenzien nachgewiesen [Lösung 1: 10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5; 1 ml Aminophthalhydrazid (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% Hydrogenperoxid; add 100 ml H₂O]. Die Membranen wurden mit der Lumineszenz-Lösung inkubiert und zwischen 5 s und 30 min auf Röntgenfilmen exponiert.

2.5.3 Bindung und kovalente Kopplung der Immunglobuline an Protein A-Sepharose

Antikörper wurden zur Immunfällung an Protein A-Sepharose-Beads (PAS) gebunden. 25 µl PAS wurde zweimal in TBS und dann in dem jeweiligen Puffer gewaschen. 25 µl Antiserum wurden zugegeben und der Ansatz für 10-30 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die gekoppelten Antikörper zur Immunfällung verwendet.

Um die Detektion von Immunglobulinen nach SDS-PAGE auf der Nitrozellulose-Membran in manchen Experimenten zu vermeiden, wurden sie kovalent an PAS gekoppelt, weshalb sie nicht mit den gebundenen Antigenen eluiert wurden. Zur kovalenten Bindung wurden 50 µl PAS dreimal mit 1 ml PBS (150 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 65 mM Na₂HPO₄) gewaschen und mit 50 µl Serum in 400 µl PBS bei 4°C für 1 h unter Rotieren inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 1 ml 0,2 M Natriumborat pH 9,0 gewaschen. Nach Aufnahme in 1 ml 0,2 M Natriumborat pH 9,0 wurden 5,2 mg des Quervernetzers Dimethylpimelidat (DMP) zugegeben und für 30 min bei RT und leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurde die PAS mit 1 ml 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 für 2 h bei RT geschüttelt, um die Quervernetzungsreaktion zu stoppen. Anschließend folgten einige Waschschrte: 2x 1 ml TBS, 1x 1 ml 0,1 M Glycin pH 2,5, 1x 1 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,8, 2x 1 ml TBS. Die PAS-Beads mit den gekoppelten Immunglobulinen wurden in TBS bei 4°C gelagert.

2.5.4 Immunfällung von Proteinen

100-200 µg Mitochondrien bzw. Gesamtzell-Protein nach alkalischer Lyse von 3 OD-Einheiten Hefezellen wurden zum Solubilisieren in 20 µl SDS-Puffer [1% (w/v) SDS; 100 mM Tris/HCl pH 7,4; 10 mM PMSF] resuspendiert und für 10 min bei RT geschüttelt. Das Solubilisat wurde 20-fach mit TBS/0,5% (v/v) Triton X-100 verdünnt und zentrifugiert (TLA45-Rotor; 45000 Upm; 30 min; 2°C), um unlösliches Material abzutrennen. Der Überstand wurde auf die mit demselben Puffer gewaschenen PAS-Beads mit (kovalent) gebundenen Antikörpern gegeben. Inkubation bei 4°C für 1 h unter Rotieren erlaubte die Bindung des Antigens. Nach zwei Waschschrten in TBS/0,5% (v/v) Triton X-100 und einem in 10 mM Tris/HCl pH 7,4 erfolgte die Elution der immunadsorbierten Proteine durch Schütteln für 15 min bei 4°C in 30 µl Laemmli-Puffer. Die Proben wurden durch SDS-

PAGE, Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran und Autoradiographie oder immunologischen Nachweis analysiert.

2.5.5 Verwendete Antiseren

Die verwendeten Antiseren sind in Tab. 4 aufgelistet. Alle polyklonalen Seren wurden durch die Immunisierung von Kaninchen gewonnen, die monoklonalen Antikörper wurden von den Firmen wie angegeben bezogen. Antiseren wurden für Westernblot-Analysen und Immunfällungen eingesetzt.

Antikörper	Antigen	Organismus
Oxa1-C	CDNEKKLQESFKEKR, gekoppelt an Ovalbumin, (entspricht AS 370-384; (Herrmann <i>et al.</i> , 1997)	<i>S. cerevisiae</i>
Oxa1-N	SIDELTSSAPSLSASTSD, gekoppelt an Ovalbumin (entspricht AS 61-78; diese Arbeit)	<i>S. cerevisiae</i>
Yme1-C	Peptid, gekoppelt an Ovalbumin (Leonhard <i>et al.</i> , 1996)	<i>S. cerevisiae</i>
Yta10-C	Peptid, gekoppelt an Ovalbumin (Pajic <i>et al.</i> , 1994)	<i>S. cerevisiae</i>
Cyb2	AS 168-557 mit Hexahistidinpeptid, in <i>E. coli</i> exprimiert	<i>S. cerevisiae</i>
Aac2	mit Hexahistidinpeptid, in <i>E. coli</i> exprimiert	<i>N. crassa</i>
HA	Fa. Roche Diagnostics Corp.	<i>M. musculus</i>
Tom6-N	Acetyl-QQPksRFQAFKESC, an KLH gekoppelt (entspricht AS 18-30; diese Arbeit)	<i>S. cerevisiae</i>
DHFR	Fa. Becton Dickinson	<i>M. musculus</i>
Tom40-C	Peptid, an Ovalbumin gekoppelt	<i>S. cerevisiae</i>
Tom70-C	Peptid, an Ovalbumin gekoppelt	<i>S. cerevisiae</i>

Tabelle 4 Verwendete Antikörper

2.6 Puffer und Medien

Importpuffer:	50 mM HEPES/KOH pH 7,2; 0,5 M Sorbitol; 80 mM Kaliumchlorid; 10 mM Magnesiumacetat; 2 mM Kaliumphosphat pH 7,4; 1 mM Magnesiumchlorid; 3% (w/v) BSA (fettsäurefrei)
ATP und ATP-regenerierendes System:	2 mM ATP, 2 mM NADH, 20 mM Kreatinphosphat, 100 µg/ml Kreatinkinase
LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid ; für LB ^{Amp} wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben
LB-Platten:	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid ; 1,5% (w/v) Agar Für LB ^{Amp} -Platten wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.
SC-Platten:	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/l Ammoniumsulfat; 2% (w/v) Agar; 2% (w/v) Glucose; 1,5 g/l Aminosäuremix (Mischung aller Aminosäuren zu gleichen Gewichtsanteilen außer der, auf die selektioniert wird)
SDS-Probenpuffer:	2% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin; 0,02% (w/v) Bromphenolblau
SEM-Puffer:	250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM MOPS/KOH pH 7,4
SHKCl-Puffer:	50 mM HEPES/KOH pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 80 mM Kaliumchlorid
SOB-Medium:	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,58 g/l Natriumchlorid; 0,19 g/l Kaliumchlorid
SOC-Medium:	10 ml SOB-Medium; 20 mM Glucose; 10 mM Magnesiumchlorid
Sporulationsplatten:	1% (w/v) Kaliumacetat; 2% (w/v) Agarose.
TBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM Natriumchlorid
TE-Puffer:	1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0
YP-Medium:	1% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Pepton; pH 5 mit HCl einstellen; autoklavieren
YPD-Medium:	1% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Pepton; mit HCl pH 5 einstellen; autoklavieren; 40% (w/v) Glucose (autoklaviert) ad 2% (v/v) zugeben
YPD-G418-Platten:	2% (w/v) Hefeextrakt; 4% (w/v) Pepton; 2% (w/v) Agar; mit HCl pH 5 einstellen; autoklavieren; auf unter 65°C abkühlen lassen; in Wasser vorgelöstes G418 ad 500 mg/l und Glucose ad 2% (w/v) zugeben
5-FOA-Platten:	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/l Ammoniumsulfat; 2% (w/v) Agar; 2% (w/v) Glucose; 1,5 g/l Aminosäuremix (Mischung aller Aminosäuren zu gleichen Gewichtsanteilen außer der, auf die selektioniert wird); 0,1% (w/v) 5-FOA, in warmem Wasser gelöst und sterilfiltriert (Filterpapier Ø 0,2 µm), nach dem Autoklavieren zum Medium zugeben

2.7 Chemikalien und Geräte

2.7.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agfa-Gevaert, München:	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
ARK, Frankfurt	Oligonukleotide
Behring-Werke, Marburg:	Freunds inkomplettes Adjuvans
Biometra, Göttingen:	Reagenzien für Polymerase-Kettenreaktion (Prime-Zyme [®])
Biorad, München:	Reagenzien zur Proteinbestimmung, Anti-Kaninchen-IgG-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase
Biozym, Hess. Oldendorf:	SP6-RNA-Polymerase
Boehringer, Mannheim:	Complete Proteaseinhibitoren, dNTPs, Ethidiumbromid, Klenow-Fragment, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, NTPs, Oligomycin, Phosphoenolpyruvat, Proteinase K, Restriktionsenzyme, RNase A, Tris
Böhringer Ingelheim, Heidelberg:	Ammoniummolybdat
Clontech, Heidelberg:	<i>E. coli</i> DH5 α
CyrRX, Norcross, USA:	TiterMax TM
DIFCO, Detroit, USA:	Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt
Fluka, Buchs, USA:	Trichloressigsäure
Fuji, Düsseldorf:	Röntgenfilme
Genomed, Bad Oeynhausen:	Jetstar [®] -Reagenzien und -Säulen zur Plasmidisolierung
Gerbu, Gaiberg:	Acrylamid, Ampicillin, DTT, IPTG, NADH, NADPH
GIBCO-BRL, Eggenstein:	Agarose, T4-Ligase, Restriktionsenzyme
ICN Pharmaceuticals, Eschwege:	[³⁵ S]Methionin (1100-1400 Ci/mmol)
Invitrogen, Groningen:	pCRII-TOPO-Vektor
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat MD
Neosystem, Straßburg, Frankreich:	Oligopeptide
NEB, Frankfurt	Restriktionsenzyme
Nestlé-Alete, München:	Magermilchpulver
Pharmacia, Freiburg:	m ⁷ G(5')ppp(5')G, Protein A-Sepharose
Pierce, Rockford, USA:	aktiviertes Ovalbumin für Peptidkopplungen, PD10-Säulen
Promega, Heidelberg:	RNasin, Kaninchen-Retikulozytenlysat, pGEM-Vektoren
Qiagen, Homburg:	Gel Extraction Kit [®] , Ni-NTA-Agarose
Riedel de Haen, Seelze:	Kaliumacetat
Sarstedt, Bad Homburg:	Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Röhrchen
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulose-Membranen 0,2 μ m, Faltenfilter, Filterpapier, Sterilfilter
Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan:	Zymolyase 20T
Serva, Heidelberg:	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES,

	Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, Spermidin, TEMED
Sigma, München:	Aminosäuren, Ammoniumperoxodisulfat, Apyrase, BSA (fettsäurefrei), CCCP, DHFR, Dihydrofolat, EMS, Glycerin, Lachsspermien-DNA, Leupeptin, β -Mercaptoethanol, Methothrexat, Mineralöl, Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE, N-CB7-Leu-Leu-Glu- β -Naphthylamide, Oligomycin, PMSF, STI, Triton X-100, Trypsin (Typ XIII, Rinderpankreas)
USB, Cleveland, Ohio, USA:	Pepton, Trypton, Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)
Whatman, Maidstone, England:	DE52-Zellulose

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

2.7.2 Geräte

Abimed, Düsseldorf:	Kolbenhubpipetten
Agfa-Gevaert, München:	Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Gevamic [®] 60
Beckman, München:	Hochgeschwindigkeits- und Ultrazentrifugen J2-21, TL-100 und L8, Rotoren, Zentrifugationsröhrchen
Bender und Hobein, München:	Vortex-Mixer
Biorad:	Elektroporator
Branson, Heusenstamm:	Ultraschallgerät Sonifier B-15
Braun, Melsungen:	Schüttelwasserbäder, Kanülen, Spritzen
Consort, Freiburg:	Spannungsgeräte für die Elektrophorese
Eppendorf, Hamburg:	Photometer, Multipette, Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen
Fuji, Tokyo, Japan:	Phospho-Imager BAS-1500
Heraeus Christ, Osterode:	Tischzentrifuge Bactifuge [®] , Brutschränke, Inkubatoren
Ika, Staufen:	Magnetrührer
Julabo, Seelbach:	Wasserbadthermostat
Memmert, Hannover:	Wärmeschränke
Pharmacia, Freiburg:	Spannungsgeräte für Gelelektrophorese und Immunoblots, Densitometer Ultrascan XL, FPLC
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen, Ultrafiltrationsapparatur, Sterilfilter
Schütt, Göttingen:	Autoklav Bioclav [®]
Shimadzu, Kyoto, Japan:	Photometer UV-120-02 und UV-240
Sigma, München:	Kühlzentrifuge MK
Werkstatt des Instituts, München:	Semi-dry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopfschüttler

3 Ergebnisse

3.1 Zum Mechanismus der Proteolyse mitochondrialer Innenmembranproteine

3.1.1 Oxa1^{ts} als polytopisches Modellsubstrat

3.1.1.1 Abbau von Oxa1^{ts}

Oxa1 ist ein polytopisches Protein in der mitochondrialen Innenmembran mit fünf Transmembrandomänen (Herrmann *et al.*, 1997; Kermorgant *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1997). Basierend auf einem multiplen Sequenzvergleich von zu Oxa1 homologen Proteinen wurde ein topologisches Modell erstellt (Abb. 3). Oxa1 ist für die Assemblierung der Cytochrom c Oxidase und des F₀F₁-ATPase-Komplexes essentiell, indem es die Insertion von Proteinen von der Matrixseite in die Innenmembran vermittelt (Altamura *et al.*, 1996; Bauer *et al.*, 1994; Bonnefoy *et al.*, 1994a; Bonnefoy *et al.*, 1994b; Meyer *et al.*, 1997). Die Deletionsmutante zeigt dementsprechend einen *petite*-Phänotyp. Eine temperatursensitive Mutante, *pet ts1402*, weist eine Punktmutation auf, die einen Aminosäureaustausch bei Position 240 von Leucin zu Serin zur Folge hat (Bauer *et al.*, 1994; Bonnefoy *et al.*, 1994b). Beide Proteine, Oxa1 und Oxa1^{ts}, wurden auf ihre Stabilität bei 37°C hin untersucht. Sowohl endogenes Oxa1 als auch in zellfreiem System synthetisiertes und in isolierte Mitochondrien importiertes Oxa1 blieb bei 37°C über eine Stunde hinweg stabil (Abb. 4). Wenn dagegen aus dem Stamm *oxa1^{ts}* isolierte Mitochondrien für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden, war ein rascher Abbau des mutanten Proteins festzustellen (Abb. 4A). Eine ähnliche Proteolyserate wurde *in vitro* beobachtet. Dazu wurde Oxa1^{ts} *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert, anschließend in isolierte Wildtyp-Mitochondrien importiert und der Abbau durch Inkubation bei 37°C induziert (Abb. 4B).

3.1.1.2 Insertion von Oxa1^{ts} in der mitochondrialen Innenmembran

Die Mutation L240S führt offensichtlich zu einer Destabilisierung des Proteins bei 37°C. Der schnelle Abbau des mutanten Proteins Oxa1^{ts} könnte aber auch darauf zurückzuführen sein,

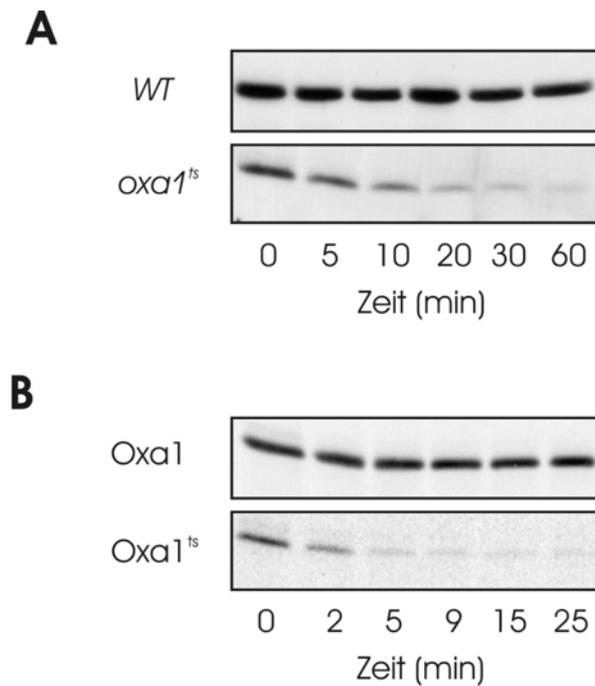


Abb. 4 Proteolyse von Oxa1^{ts} bei 37°C. **A:** Isolierte Wildtyp- und *oxa1^{ts}*-Mitochondrien (0,5 mg/ml) wurden – wie in Kap. 2.4.4 beschrieben – bis zu einer Stunde bei 37°C inkubiert und die Menge an endogenem Protein mit einem Antikörper gegen ein C-terminales Epitop von Oxa1 immunologisch nachgewiesen. **B:** *In vitro* translatiertes, radioaktiv markiertes Oxa1 bzw. Oxa1^{ts} wurde in Wildtyp-Mitochondrien – wie in Kap. 2.4.5 beschrieben – importiert und der Abbau bei 37°C bis zu 25 min über Autoradiographie verfolgt.

terminalen Fragmenten, die ein Molekulargewicht von ungefähr 27 kDa aufweisen (f27, (Herrmann *et al.*, 1997). Oxa1 wie auch das Fragment sind in der Membran inseriert, was die alkalische Extraktion von Membranen mit Na₂CO₃ zeigt. Eine Fraktionierung von Mitochondrien des *oxa1^{ts}*-Stammes zeigt ein ähnliches Bild (Abb. 5, mittlerer Teil). Zusätzlich zu dem Fragment f27 entsteht allerdings ein Fragment f19, das ebenfalls mit einem gegen ein C-terminales Peptid von Oxa1 gerichteten Antiserum immunologisch nachgewiesen wird. Dies weist auf eine zusätzliche Spaltung in der dem Intermembranraum zugewandten Schleife von Oxa1^{ts} zwischen der zweiten und dritten Transmembranregion hin, in der die Punktmutation liegt. Das Fragment f19 verbleibt nach einer Carbonat-Extraktion der Membran in der Pelletfraktion, was für eine Insertion des C-terminalen Bereiches in der Membran spricht. Dieselbe Lokalisierung von Oxa1^{ts} wurde auch nach Deletion von *YTA10* festgestellt (Abb. 5, rechter Teil). Darüber hinaus konnte in analogen Fraktionierungsexperimenten auch die Membraninsertion von Oxa1^{ts} bei 24°C nach posttranslationalem Import in isolierte Mitochondrien nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Diese Befunde belegen die korrekte Insertion von Oxa1^{ts} in die Innemembran. Im Einklang damit ist die Funktionsfähigkeit von

Oxa1^{ts} bei 24°C, denn *oxa1^{ts}*-Zellen weisen bei dieser permissiven Temperatur kein Wachstumsdefizit auf, und das Vorstufenprotein pCox2 wird zur reifen Form prozessiert (nicht gezeigt).

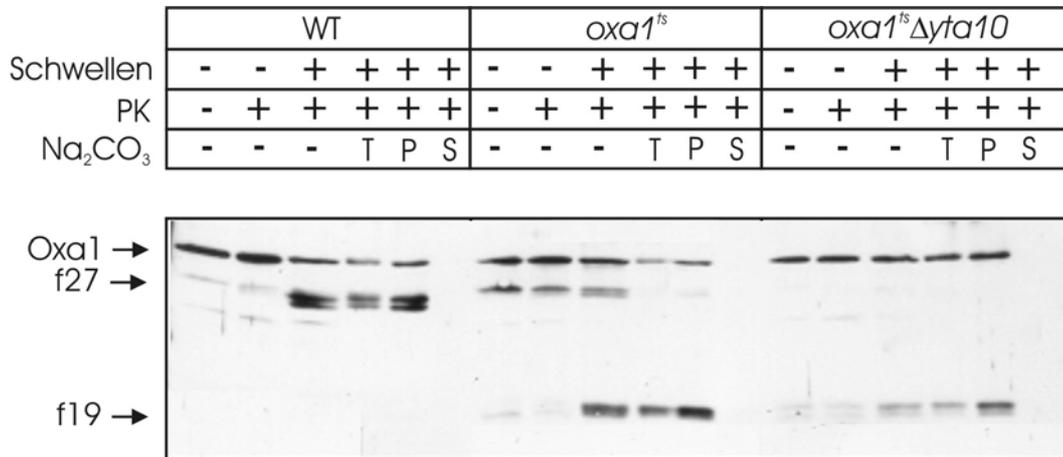


Abb. 5 Submitochondriale Lokalisierung von Oxa1 bzw. Oxa1^{ts}. Wildtyp-, *oxa1^{ts}*- und *oxa1^{ts}Δyta10*-Mitochondrien (0,5 mg/ml) wurden unbehandelt (Spur 1) oder nach Behandlung mit 50 µg/ml Proteinase K (PK; Spur 2) aufgetragen. Nach osmotischem Schwellen der Mitochondrien und Behandlung mit PK ist der N-Terminus von Oxa1 Protease-zugänglich, zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von ca. 27 kDa entstehen (Spur 3, f27, Herrmann *et al.*, 1997). Nach osmotischem Schwellen und PK-Behandlung wurden die Membranen mit Natrium-Carbonat extrahiert und das TCA-Präzipitat aufgetragen (T, Total; Spur 4) oder zuvor in Pellet (P; Spur 5) und Überstand (S; Spur 6) getrennt. Im Falle von Oxa1^{ts} entsteht überwiegend das Fragment f19, was vermutlich einem Schnitt durch PK in der die Mutation tragenden Schleife entspricht. Die Menge an Oxa1 wurde über ein gegen ein C-terminales Epitop von Oxa1 gerichtetes Antiserum nachgewiesen.

3.1.1.3 Die Rolle der *m*-AAA-Protease bei der Proteolyse von Oxa1^{ts}

Eine mögliche Beteiligung der AAA-Proteasen am Abbau von Oxa1^{ts} wurde untersucht, indem *in vitro* translatiertes Oxa1^{ts} bei 24°C in Mitochondrien des Wildtyp-Stammes und der Stämme *Δyta10* und *Δyme1* importiert und die Stabilität des importierten Proteins bei 37°C überprüft wurde (Abb. 6). In Wildtyp-Mitochondrien wird Oxa1^{ts} rasch abgebaut, wobei ein Fragment von ca. 14 kDa nachgewiesen werden konnte. Oxa1^{ts} wird im Stamm *Δyta10* verlangsamt abgebaut. Es akkumulieren Abbauprodukte verschiedener Größe von Oxa1^{ts}, jedoch keines mit einem Molekulargewicht von 14 kDa. Offenbar kann Oxa1^{ts} in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease nicht vollständig abgebaut werden. Die Proteolyserate von Oxa1^{ts} ist in Abwesenheit der *i*-AAA-Protease nicht betroffen (Abb. 6).

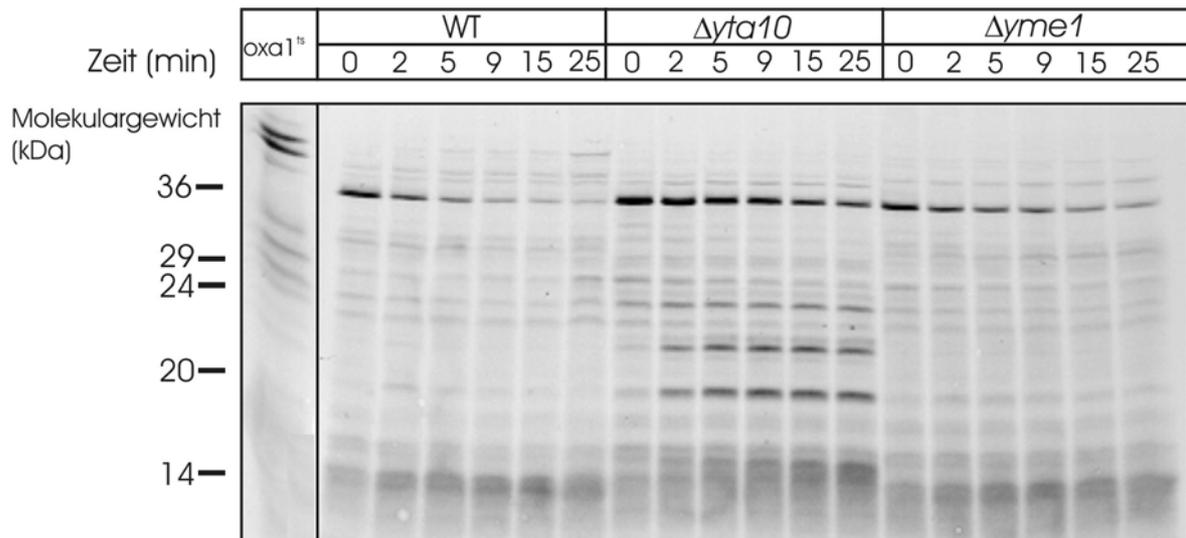


Abb. 6 Die Rolle der mitochondrialen AAA-Proteasen bei der Proteolyse von importiertem Oxa1^{ts}. *In vitro* translatiertes, radioaktiv markiertes Oxa1^{ts}-Protein (linke Spur; Vorstufenprotein entspricht oberer Bande) wurde in isolierte Mitochondrien (0,5 mg/ml) des Wildtyp-Stammes und der Stämme $\Delta yta10$ und $\Delta yme1$ importiert (siehe Kap. 2.4.5), der Abbau bei 37°C induziert und die Menge an Protein zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 25 min über SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht.

Um die in der $\Delta yta10$ -Mutante entstehenden Fragmente genauer zu untersuchen, wurde auch der Abbau von endogenem Oxa1^{ts} in den Stämmen *oxa1^{ts}*, *oxa1^{ts}Δyta10* und *oxa1^{ts}Δyme1* durch Western-Analyse untersucht (Abb. 7). N- und C-terminale Abbauprodukte wurden mit Antiseren nachgewiesen, die gegen N- bzw. C-terminale Peptide von Oxa1 gerichtet sind. In *oxa1^{ts}*-Mitochondrien entsteht das C-terminale Fragment mit einem Molekulargewicht von 14 kDa, C14 (Abb. 7, Pfeil), das der löslichen Domäne in der Matrix entspricht. Dieses Fragment erscheint auch im Stamm *oxa1^{ts}Δyme1*, nicht aber im Stamm *oxa1^{ts}Δyta10*. Die *m*-AAA-Protease spaltet offenbar die C-terminale Domäne von Oxa1^{ts} ab.

In Abwesenheit der *m*-AAA-Protease akkumulieren verschiedene Fragmente (Abb. 7). Sie wurden zum einen aufgrund der Erkennung durch die beiden Antiseren als N- und C-terminale Fragmente von Oxa1^{ts} benannt, zum anderen nach ihrem Molekulargewicht, das durch SDS-PAGE mittels einer logarithmischen Eichkurve ermittelt wurde. Mit dem gegen ein aminoterminal Peptid von Oxa1 gerichteten Antikörper sind N28, N27, N25 und N22 zu detektieren, der gegen ein carboxyterminales Peptid gerichtete Antikörper erkennt C20, C18, C17, C16 und C15. Die Fragmente sind nach Präparation von Mitochondrien des Stammes *oxa1^{ts}Δyta10* schon vorhanden (Zeitpunkt 0 min) und akkumulieren – mit Ausnahme von N27 – bei weiterer Inkubation bei 37°C (Zeitpunkt 30 min). In Abwesenheit der *m*-AAA-Protease

ist daher der Abbau von Oxa1^{ts} nicht vollständig. Sämtliche Fragmente sind in der Membran inseriert (nicht gezeigt).

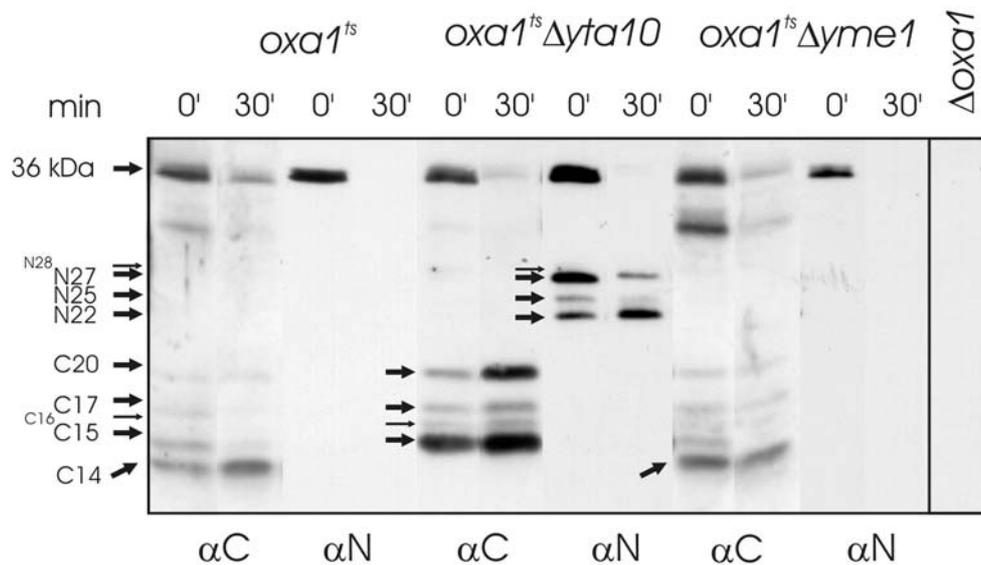


Abb. 7 Die Rolle der mitochondrialen AAA-Proteasen bei der Proteolyse von endogenem Oxa1^{ts}. Oxa1^{ts} wurde in den Stämmen *oxa1^{ts}*, *oxa1^{ts}Δyta10* und *oxa1^{ts}Δyme1* mit jeweils einem gegen ein C-terminales bzw. N-terminales Peptid von Oxa1 gerichteten Antiserum nachgewiesen. Mitochondriale Proteine der jeweiligen Stämme (0,5 mg/ml) wurden zum Zeitpunkt 0 oder nach Induktion der Proteolyse bei 37°C für 30 min (30') – wie in Kap. 2.4.4 beschrieben – über SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurden Zellen des Stammes *Δoxa1* aufgetragen.

3.1.1.4 Die Rolle der *i*-AAA-Protease bei der Proteolyse von Oxa1^{ts}

Eine Deletion von *YME1* beeinflusste weder die Stabilität von Oxa1^{ts} noch die Bildung von Abbauprodukten (Abb. 6 und 7). Es entsteht ebenfalls das Fragment C14 wie im Wildtyp (Abb. 6 und 7, Pfeil). Die beiden mitochondrialen AAA-Proteasen besitzen jedoch eine überlappende Substratspezifität (Lemaire *et al.*, 2000; Leonhard *et al.*, 2000), weshalb eine parallele oder kooperierende Funktion der *i*-AAA- und *m*-AAA-Protease nicht auszuschließen ist. Um eine etwaige Beteiligung beider Proteasen nachzuweisen, wurde ein temperatursensitiver Stamm verwendet, der eine Mutation in *YTA12* (*RCA1*, kodiert für Untereinheiten der *m*-AAA-Protease) trägt und dem das Gen *YME1* (kodiert für Untereinheiten der *i*-AAA-Protease) fehlt. Mitochondrien wurden aus diesem Stamm bei 24°C isoliert. Nach einer Induktion des temperatursensitiven Phänotyps *in vitro* bei 37°C für 15 min wurden radioaktiv markierte Vorstufenproteine importiert und deren Stabilität untersucht (Abb. 8). Unter diesen Bedingungen ist eine vollständige Stabilisierung eines bekannten

Substrates der *m*-AAA-Protease, Yme2 Δ C23 (Leonhard *et al.*, 2000), zu beobachten (rechte Grafik). Dies weist auf eine vollständige Inaktivierung der *m*-AAA-Protease im Stamm *yta12^{ts} Δ yme1* nach Induktion des Phänotyps hin. Dagegen hat eine Inaktivierung der *m*-AAA-Protease in Abwesenheit der *i*-AAA-Protease keinen Einfluss auf die Stabilität von Oxa1^{ts} (linke Grafik). Keine der beiden mitochondrialen AAA-Proteasen ist für die Proteolyse des Vollängen-Proteins Oxa1^{ts} nötig.

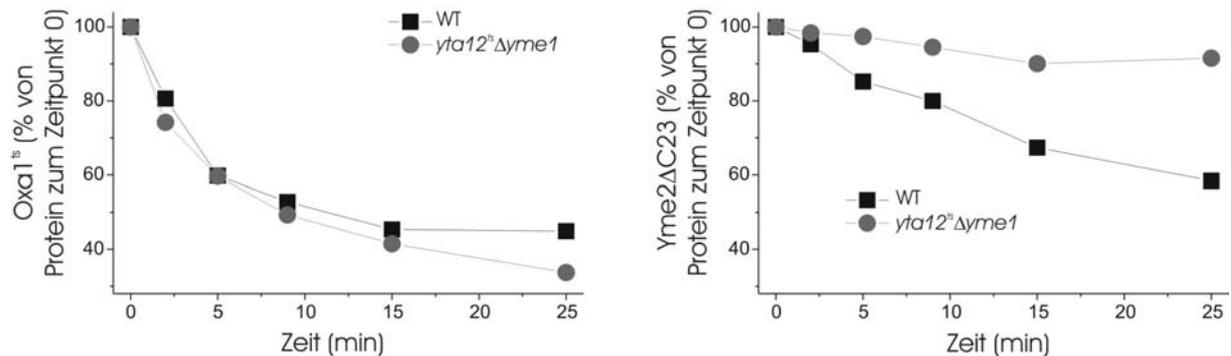


Abb. 8 Die Rolle der mitochondrialen AAA-Proteasen bei der Proteolyse von Oxa1^{ts}. Der Stamm *yta12^{ts} Δ yme1*, der eine temperatursensitive Version von *YTA12* und eine Deletion von *YME1* trägt, wurde verwendet, um den Abbau von Oxa1^{ts} nach Inaktivierung beider AAA-Proteasen zu untersuchen. *In vitro* translatiertes und importiertes Oxa1^{ts} wurde in Wildtyp- und *yta12^{ts} Δ yme1*-Mitochondrien (0,5 mg/ml) importiert und der Abbau induziert (linke Graphik, siehe Kap. 2.4.5). Als Kontrolle für die Induktion des *yta12^{ts} Δ yme1*-Phänotyps wurde ein Substrat der *m*-AAA-Protease, Yme2 Δ C23 (Leonhard *et al.*, 2000), nach Import in *yta12^{ts} Δ yme1*-Mitochondrien untersucht (rechte Graphik). Die zum Zeitpunkt 0 in den Mitochondrien vorhandene Menge Protein wurde als 100% gesetzt.

3.1.1.5 ATP-Abhängigkeit der Proteolyse und Fragmentbildung von Oxa1^{ts}

Um zu testen, ob der Abbau von Oxa1^{ts} in einer ATP-abhängigen Reaktion vermittelt wird, wurde die Abbaukinetik des Substrats in *oxa1^{ts}*-Mitochondrien unter Depletion von ATP beobachtet (Abb. 9). Unter Bedingungen mit (linke Seite) und ohne ATP (Mitte) ist eine nahezu identische Proteolyserate des Vollängenproteins Oxa1^{ts} zu erkennen. Das für Oxa1^{ts} typische Proteolysefragment C14 ist in Anwesenheit von ATP deutlich zu erkennen. Eine Depletion von ATP mit Apyrase führt, wie die Deletion von *YTA10* (vgl. Abb. 6 und 7), zur Akkumulation der Fragmente C15, C17, C18 und C20 (Abb. 9, Mitte) sowie N23, N25 und N27 (nicht gezeigt). Die Apyrasebehandlung führt in diesem Experiment offenbar zur Hemmung der *m*-AAA-Protease. Dagegen kann in *oxa1^{ts} Δ yta10*-Mitochondrien eine Apyrase-Behandlung jedoch nur die *i*-AAA-Protease (oder unbekannte proteolytisch aktive ATPasen)

hemmen. Eine Apyrase-Behandlung führt in *oxa1^{ts}Δyta10*-Mitochondrien zu keiner Beeinflussung der Proteolyse, was wiederum gegen eine Beteiligung der *i*-AAA-Protease am Oxa1^{ts}-Abbau spricht (Abb. 10A zeigt die C-terminalen, Abb. 10B die N-terminalen Fragmente). Da die *i*-AAA-Protease nicht den Abbau der Proteolyse-Fragmente vermittelt, die in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease entstehen, ist sie am Abbau von Oxa1^{ts} überhaupt nicht beteiligt. Dasselbe Experiment wurde mit *in vitro* synthetisiertem, radioaktiv markiertem Oxa1^{ts} nach Import in *oxa1^{ts}Δyta10*-Mitochondrien wiederholt (Abb. 10C). Das Volllängen-Protein verhält sich wie das endogene Oxa1^{ts}. Die Akkumulation der Fragmente kann in diesem Puls-Markierungs-Experiment direkt verfolgt werden. Die Depletion von ATP zeigt hier ebenfalls keine zusätzliche Akkumulation von Proteolyse-Fragmenten. Das radioaktive Signal (Abb. 10C) lässt alle Fragmente erkennen, die auch im Falle des endogenen Oxa1^{ts} mit dem Antiserum gegen C- (Abb. 10A) und N-terminale (Abb. 10B) Epitope von Oxa1 nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass unter diesen Bedingungen die *i*-AAA-Protease vollständig gehemmt ist, wurde radioaktiv markiertes Yme2ΔN17 importiert (Abb. 10D), das von der *i*-AAA-Protease abgebaut wird (Leonhard *et al.*, 2000). Nach Apyrase-Behandlung ist dieses Yme2-Derivat stabilisiert.

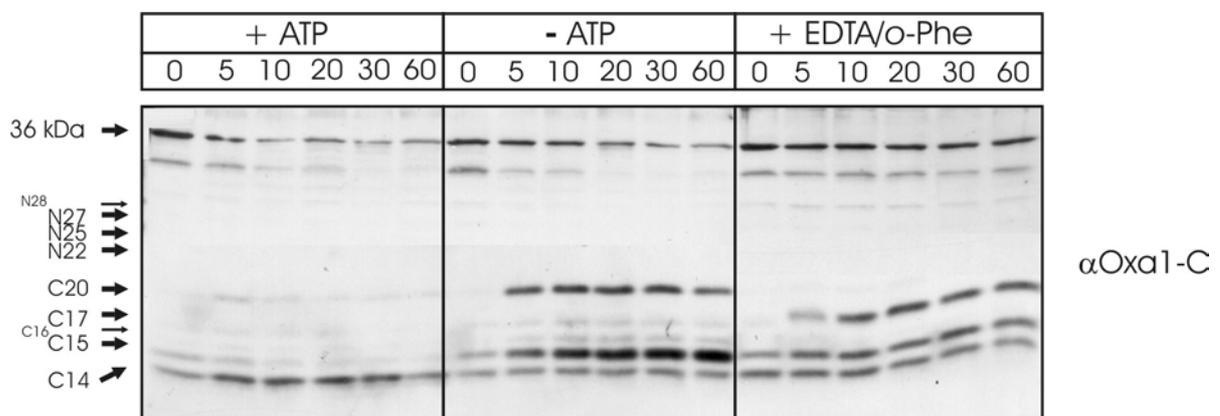


Abb. 9 ATP-Abhängigkeit der Proteolyse von Oxa1^{ts}. Mitochondrien des Stammes *oxa1^{ts}* (0,5 mg/ml) wurden bei 37°C bis zu einer Stunde in Importpuffer inkubiert (siehe Kap. 2.4.4). Dabei wurde ATP und ATP-regenerierendes System zugegeben (linke Seite) bzw. Puffer ohne ATP verwendet und restliches ATP in den Mitochondrien durch Zusatz von 40 U/ml Apyrase abgebaut (Mitte). Ein weiterer Ansatz wurde in Anwesenheit von ATP und unter Zugabe der Komplexbildner EDTA (5 mM) und *o*-Phenanthrolin (*o*-Phe, 2,5 mM) inkubiert (rechte Seite). Die Fragmente sind wie in Abb. 7 gekennzeichnet. Oxa1^{ts} und Proteolyse-Fragmente wurden mit einem Antiserum gegen ein C-terminales Epitop von Oxa1 immunologisch nachgewiesen.

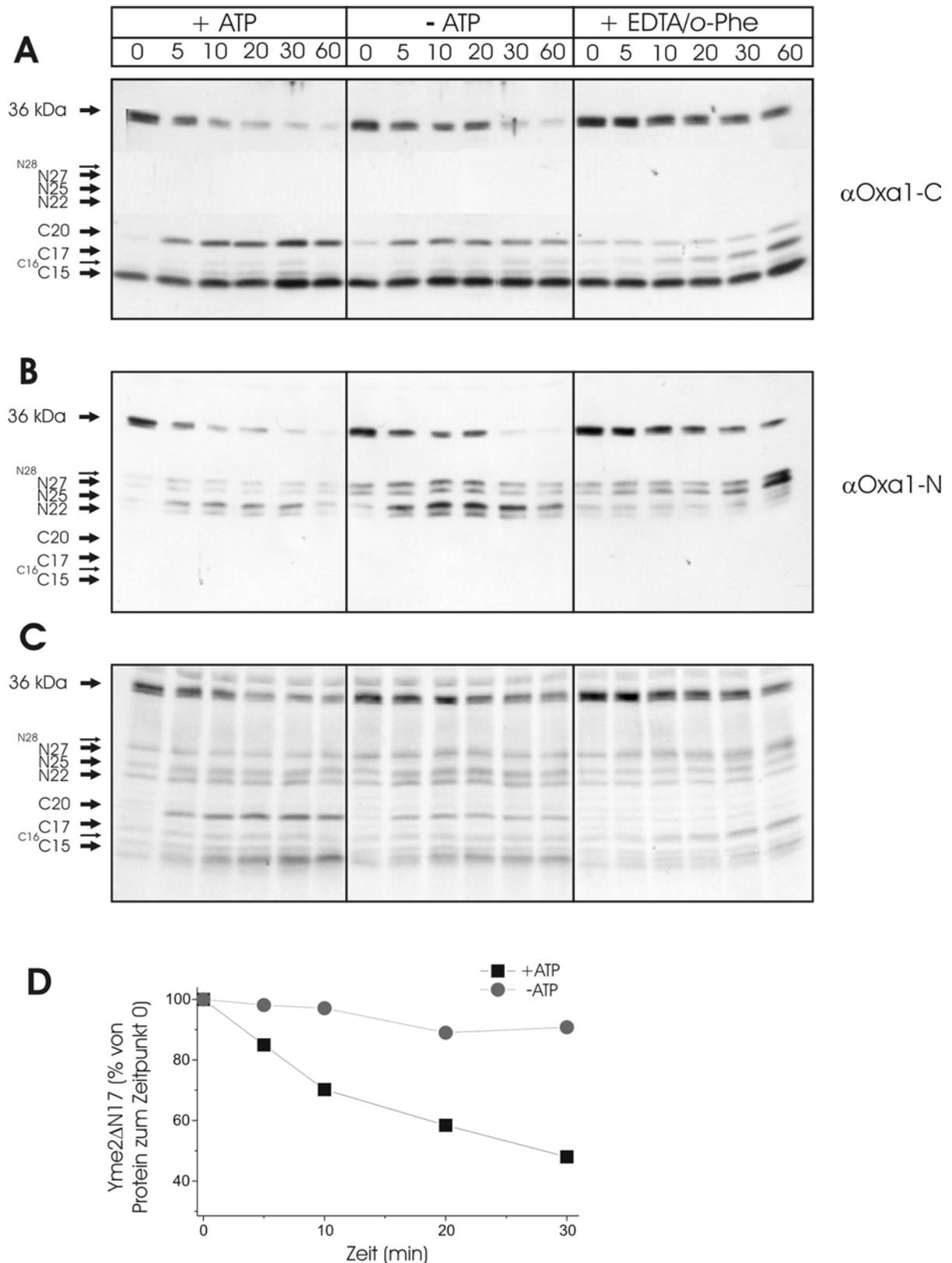


Abb. 10 ATP-Abhängigkeit der Proteolyse von Oxa1^{ts}. Mitochondrien des Stammes *oxa1^{ts}Δyta10* (0,5 mg/ml) wurden bei 37°C bis zu einer Stunde – wie in Kap. 2.4.4 beschrieben – in Importpuffer inkubiert. Dabei wurde ATP und ATP-regenerierendes System zugegeben (linke Seite) bzw. Puffer ohne ATP verwendet und Mitochondrien mit Zusatz von 40 U/ml Apyrase von restlichem ATP depletiert (Mitte). Ein weiterer Ansatz wurde in Anwesenheit von ATP und unter Zugabe der Komplexbildner EDTA (5 mM) und *o*-Phenanthrolin (*o*-Phe,

2,5 mM) inkubiert (rechte Seite). Die Fragmente sind wie in Abb. 7 gekennzeichnet. **A:** Oxa1^{ts} und Proteolyse-Fragmente wurden mit einem Antiserum gegen ein C-terminales Epitop von Oxa1 immunologisch nachgewiesen. **B:** Oxa1^{ts} und Proteolyse-Fragmente wurden mit einem Antiserum gegen ein N-terminales Epitop von Oxa1 immunologisch nachgewiesen. **C:** *In vitro* translatiertes, radioaktiv markiertes und in *oxa1^{ts}Δyta10*-Mitochondrien (0,5 mg/ml) importiertes Oxa1^{ts} wurde unter denselben Abbaubedingungen untersucht und über Autoradiographie analysiert. **D:** Als Kontrolle für eine erfolgreiche Hemmung der *i*-AAA-Protease wurde unter diesen Bedingungen parallel die Stabilität von Yme2ΔN17, das nur von der *i*-AAA-Protease abgebaut wird, in An- und Abwesenheit von ATP untersucht. Die zum Zeitpunkt 0 in den Mitochondrien vorhandene Menge Protein wurde als 100% gesetzt.

3.1.1.6 Beteiligung einer Metallopeptidase am Abbau von Oxa1^{ts}

Die *i*-AAA-Protease ist nicht am Abbau von Oxa1^{ts} beteiligt. Die Zugabe der Metallionen-Chelatoren EDTA und *o*-Phenanthrolin zu *oxa1^{ts}*- (Abb. 9) und *oxa1^{ts}Δyta10*-Mitochondrien (Abb. 10) beeinträchtigen die Proteolyse des Volllängenproteins Oxa1^{ts} jedoch erheblich (Abb. 9, 10A und 10B, jeweils rechte Seite). Dies deutet auf die Beteiligung einer Metallopeptidase am Abbau von Oxa1^{ts} hin. Eine Inaktivierung der *m*-AAA-Protease ist dabei ausgeschlossen, denn die entsprechenden Fragmente entstehen nicht. Auch nach Import von radioaktiv markiertem Oxa1^{ts} in isolierte Mitochondrien des Stammes *oxa1^{ts}Δyta10* ist eine Proteolyse von Oxa1^{ts} zu beobachten, die mit EDTA/*o*-Phenanthrolin deutlich verlangsamt ist (Abb. 10C, rechte Seite). Bei Komplexierung der Metallionen akkumulieren die Fragmente C17 und N27. Offensichtlich wird in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease und bei einer Hemmung der Metalloprotease die Aktivität einer anderen Komponente erkennbar, die diese beiden Fragmente generiert.

3.1.2 Untersuchungen zum Mechanismus der Membranextraktion durch AAA-Proteasen

Während der Proteolyse werden Membranproteine durch die AAA-Proteasen aus der Membran extrahiert und im wässrigen Milieu hydrolysiert. Dazu kann eine hydrophile Dislokationspore durch die membrangebundenen Domänen der AAA-Proteasen oder auch durch eine andere Translokase der mitochondrialen Innenmembran gebildet werden. Nachfolgend wurde untersucht, ob eine der bisher bekannten Translokasen der Innenmembran an der Vermittlung der Extraktion von Proteinen während der Proteolyse beteiligt ist.

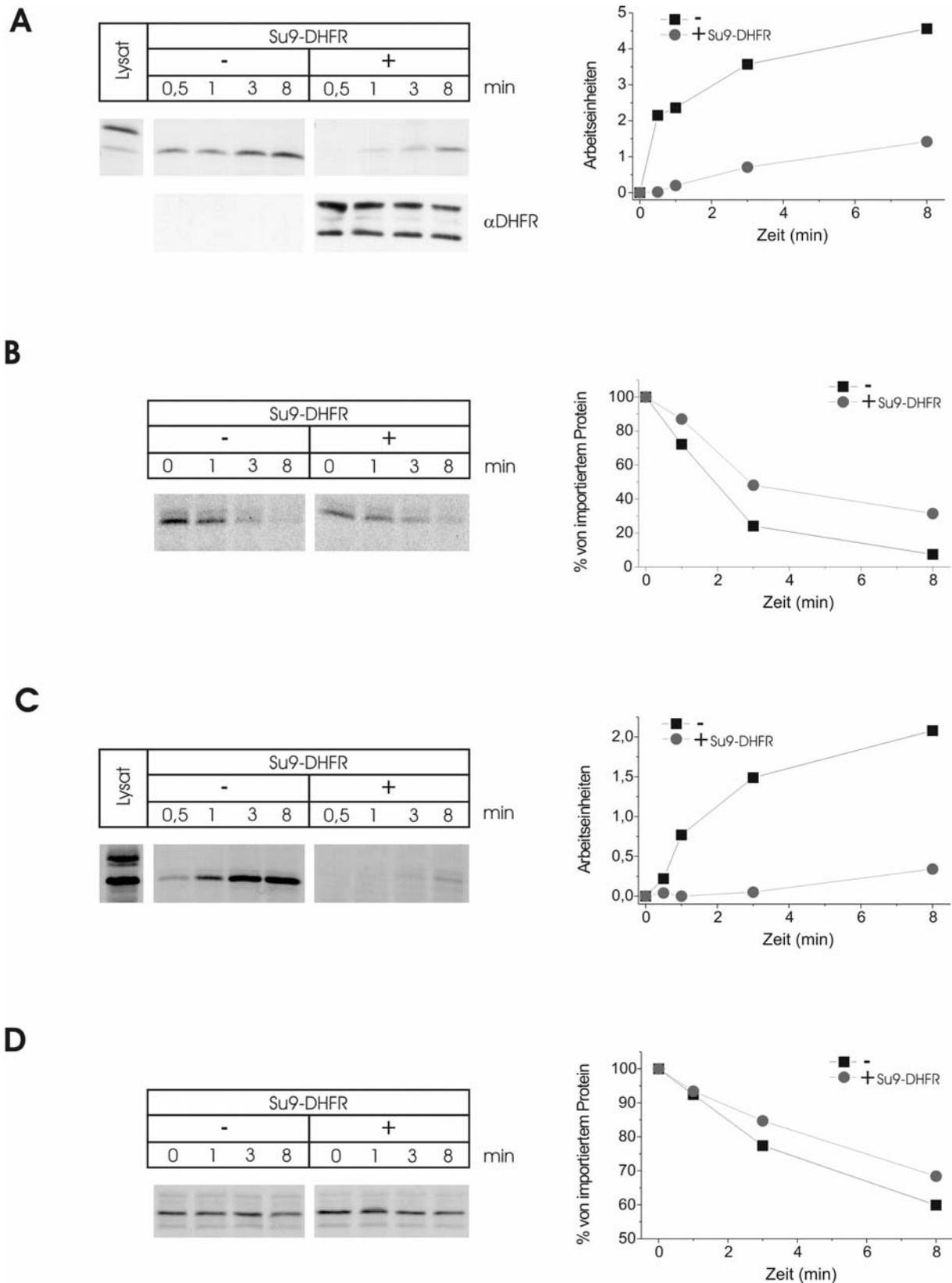


Abb. 11 Die TIM17/23-Translokase ist nicht am Abbau von Innenmembranproteinen beteiligt. Mitoplasten (30 μ g, 0,5 mg/ml) wurden – wie in Kap. 2.4.6 beschrieben – hergestellt und mit Su9(1-69)-DHFR (40 μ g pro Ansatz) für 30 min bei 25°C in Importpuffer unter Anwesenheit von ATP in einem Thermomixer inkubiert. Zugabe von 10 μ M Methotrexat und 10 μ M NADPH stabilisiert die DHFR-Domäne (Eilers und Schatz, 1986), wodurch

Su9(1-69)-DHFR Translokationsintermediate bildet, die die TIM17/23-Translokasen quantitativ absättigen. **A, C:** Oxa1^{ts} bzw. DHFR^{MUT}-TM-DHFR^{MUT} (Leonhard *et al.*, 2000) wurde mit Mitoplasten inkubiert, deren TIM17/23-Poren zuvor mit Translokationsintermediaten abgesättigt wurden. Die Importrate von behandelten (jeweils rechte Seite) ist gegenüber unbehandelten Mitoplasten (jeweils linke Seite) wurde ermittelt. Die linke Spur zeigt jeweils das *in vitro* translatierte, nicht prozessierte Vorläuferprotein (A: Oxa1^{ts}, C: DHFR^{MUT}-TM-DHFR^{MUT}). Die radioaktiven Signale sind über Autoradiographie detektiert, über Phosphorimaging quantifiziert worden und graphisch in Arbeitseinheiten angegeben. Ein immunologischer Nachweis mit einem Antiserum gegen DHFR zeigt prozessiertes Su9(1-69)-DHFR. **B, D:** Die Absättigung der TIM17/23-Translokase wurde erst nach Import des radioaktiv markierten Vorstufenproteins durchgeführt und anschließend der Abbau ohne (linke Seite) und mit Vorinkubation mit Su9(1-69)-DHFR (rechte Seite) der TIM17/23-Pore untersucht (der Unterschied der beiden Kurven in B ist nach mehrfacher Reproduktion nicht signifikant). Das radioaktive Signal des importierten Proteins zum Zeitpunkt 0 wurde für die graphische Darstellung der Abbaukinetik als 100% gesetzt.

3.1.2.1 Beteiligung des TIM17/23-Komplexes

Der Import Matrix-lokalisierter Proteine erfolgt über die TIM17/23-Translokase in der Innenmembran (Herrmann und Neupert, 2000; Neupert, 1997; Pfanner, 2000). Um eine Beteiligung der TIM17/23-Pore an Proteolyse zu untersuchen, wurde ein Fusionsprotein aus der Präsequenz der Untereinheit 9 der F₀-ATP-Synthase von *N. crassa* und der DHFR-Domäne, Su9(1-69)DHFR, verwendet (Stan *et al.*, 2000). Es wurde nach Expression in *E. coli* über einen Histidin-Anhang aufgereinigt. Zugabe von Methotrexat und NADPH hält die DHFR-Domäne in gefalteter Struktur und verhindert somit die Translokation des Proteins (Eilers und Schatz, 1986). Die Präsequenz dieses Fusionsproteins ist nicht lang genug, um eine stabile Akkumulation eines Translokationsintermediates zu ermöglichen. Deshalb wurden durch osmotisches Schwellen von Mitochondrien Mitoplasten hergestellt und diese mit Su9(1-69)DHFR unter Stabilisierung der DHFR-Domäne inkubiert. Die Präsequenz war nun lang genug, um von Hsp70-Molekülen in der Matrix festgehalten zu werden, und die gefaltete DHFR-Domäne verhindert den Import des Proteins. Auf diese Weise konnten in Mitoplasten die TIM17/23-Poren in der Innenmembran mit Translokationsintermediaten abgesättigt werden und standen deshalb für einen weiteren Import oder aber für einen etwaigen Export während der Proteolyse nicht mehr zur Verfügung.

Zunächst wurde geprüft, ob der Import radiochemischer Mengen an *in vitro* translatierten Vorstufenproteinen durch die Translokationsintermediate gehemmt wird. Oxa1^{ts} wurde in Mitoplasten importiert, die zuvor mit keinem Protein oder Su9(1-69)DHFR inkubiert wurden. Der Import war deutlich verlangsamt (Abb 11A). Dasselbe gilt für ein *in vitro* translatiertes Derivat von Yme2 bestehend aus der Transmembranregion von Yme2 und zwei DHFR^{MUT}-

Domänen in Intermembranraum bzw. Matrix, DHFR^{MUT}-TM-DHFR^{MUT} (Leonhard *et al.*, 2000). Hier ist der Import fast komplett gehemmt (Abb. 11C). Damit ist eine quantitative Absättigung der TIM17/23-Poren durch Su9(1-69)DHFR gegeben. Eine Untersuchung der Stabilität von Substratproteinen der AAA-Proteasen konnte nun unter diesen Bedingungen vorgenommen werden. Dazu wurden die radioaktiv markierten Substratproteine Oxa1^{ts} und DHFR^{MUT}-TM-DHFR^{MUT} zunächst in Mitoplasten importiert. Nach anschließender Absättigung der TIM17/23-Translokasen wurden die Mitoplasten bei 37°C inkubiert, um Proteolyse einzuleiten (Abb. 11B und 11D). Beide Proteine, Oxa1^{ts} (Abb. 11B) und DHFR^{MUT}-TM-DHFR^{MUT} (Abb. 11D) wurden unabhängig von der Absättigung des TIM17/23-Komplexes mit gleicher Kinetik abgebaut. Offenbar sind TIM17/23-Komplexe nicht an der Extraktion von Proteinen während der Proteolyse durch AAA-Proteasen beteiligt.

3.1.2.2 Beteiligung des OXA1-Komplexes

Oxa1 bildet vermutlich eine Pore in der mitochondrialen Innenmembran, die die Insertion einiger Innenmembranproteine von der Matrixseite aus vermittelt (Altamura *et al.*, 1996; Hell *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001; Kermorgant *et al.*, 1997). Auch die Membraninsertion von Oxa1 selbst erfolgt über diese Translokase (Hell *et al.*, 1998). *OXA1* wurde in einer genetischen Durchmusterung als Suppressor einer *YTA10*-Deletion nach Überexpression gefunden (Rep *et al.*, 1996), was auf eine Rolle von Oxa1 bei der Proteolyse hindeuten kann. Hinweise auf eine Beteiligung von Oxa1 bei der Extraktion von Proteinen während des Proteinabbaus wurden im Rahmen von chemischen Quervernetzungs-experimenten erhalten. Ein Derivat von Yme2, in dem die Matrixdomäne durch eine entfaltete Form der DHFR ersetzt wurde (Abb. 12A), wurde nach *in vitro* Translation in aus verschiedenen Stämmen isolierte Mitochondrien importiert (Abb. 12B). Nach Zugabe des chemischen Quervernetzers DFDNB wurde in Wildtyp-Mitochondrien ein hochmolekulares Produkt gebildet, das mit einem Antiserum gegen ein C-terminales Peptid von Oxa1 immungefällt werden konnte (Abb. 12B). Das Quervernetzungsprodukt ist im Stamm Δ *oxa1* nicht zu detektieren, weshalb es – trotz der geringen Effizienz der Quervernetzung – als spezifisch für Oxa1 gelten kann (Abb. 12B und 12C).

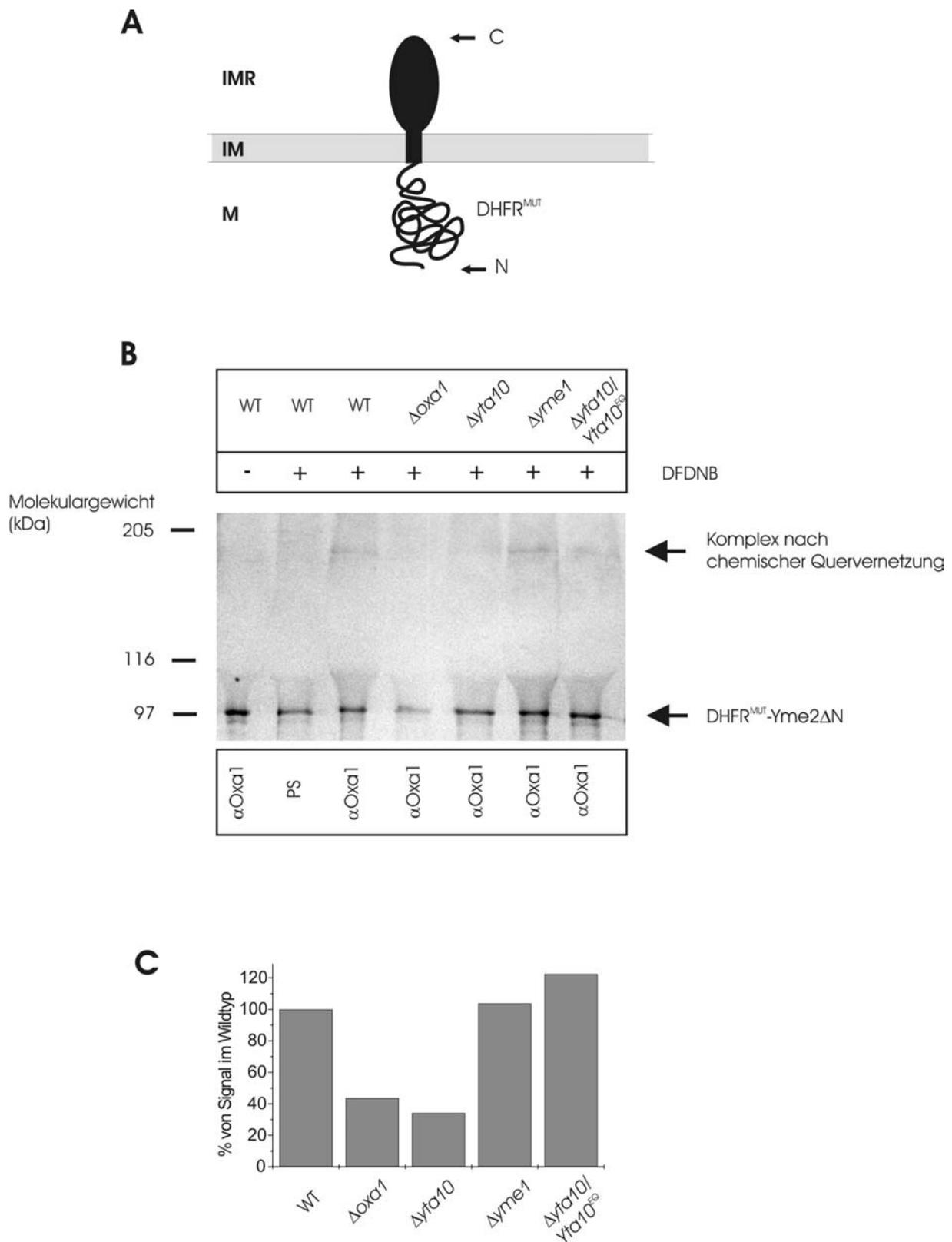


Abb. 12 Chemische Quervernetzung von DHFR^{MUT}-Yme2ΔN und Oxa1. **A:** Schematische Darstellung des Hybridproteins DHFR^{MUT}-Yme2ΔN [DHFR^{MUT}-YME2(778-2550); Leonhard *et al.*, 2000], das Yme2 mit einer Substitution der N-terminalen Domäne durch DHFR^{MUT} entspricht. **B:** *In vitro* translatiertes DHFR^{MUT}-Yme2ΔN (10% des Gesamtansatzes) wurden in isolierte Mitochondrien der angegebenen Stämme importiert und der Import durch Trypsinbehandlung gestoppt (siehe Kap. 2.4.5). Um vollständige Insertion aller importierten

Vorstufenproteine zu gewährleisten, wurden die Proben bei 25°C für 5 min weiterinkubiert. Die Proben wurden – wie angegeben – mit dem Quervernetzer DFDNB versetzt und anschließend mit Präimmunserum (PS) bzw. Antiserum gegen ein C-terminales Peptid von Oxa1 immungefällt. Die Pfeile zeigen DHFR^{MUT}-Yme2ΔN und das Quervernetzungsprodukt. **C**: Quantifizierung des chemisch quervernetzten Komplexes nach Autoradiographie. Das Signal im Wildtyp-Stamm wurde als 100% gesetzt, die Signale in den Mutanten sind als Prozentanteil des Signals im Wildtyp-Stamm angegeben. IMR: Intermembranraum, IM: Innenmembran, M: Matrix.

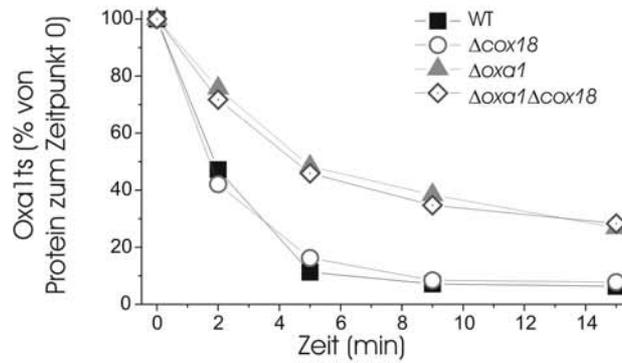
Im Stamm *Δyta10* ist ebenfalls kein solches Quervernetzungsprodukt mit Oxa1 zu finden. Offensichtlich ist die Quervernetzung des Substrates abhängig von der Anwesenheit der *m*-AAA-Protease, da auch in Gegenwart einer proteolytisch inaktiven Form von Yta10, Yta10^{EQ}, das chemische Quervernetzungsprodukt nachweisbar war (Abb. 12B und 12C). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Rolle von Oxa1 während der Proteolyse durch die AAA-Proteasen hin. Es ist vorstellbar, dass nach Bindung des Substrates die *m*-AAA-Protease dieses in die OXA1-Pore inseriert. Daher wurde die Stabilität verschiedener Modellproteine *in vitro* in isolierten *Δoxa1*-Mitochondrien bei 37°C untersucht (nicht gezeigt). Die getesteten Substrate schlossen Yme2 und Derivate ein, sowie Derivate des Innenmembranproteins ADP/ATP-Translokator von *N. crassa*, Aac2(TM5-6) (Endres *et al.*, 1999) und Aac2(TM5-6)DHFR (M. Endres, nicht veröffentlicht), die in Wildtyp-Mitochondrien in der Innenmembran inseriert sind und abgebaut wurden. Die Deletion von *OXA1* beeinflusste in keinem Fall die Kinetik der Proteolyse (Abb. 13). Nur Oxa1^{ts} war in *Δoxa1*-Mitochondrien leicht stabilisiert, wobei bekannt ist, dass die Insertion in diesem Fall nicht vollständig ist (Hell *et al.*, 1998). Trotz des erhaltenen Quervernetzungsproduktes zu Oxa1 muss unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen festgestellt werden, dass die OXA1-Pore keinen offensichtlichen Beitrag zur Extraktion von Substratproteinen der AAA-Proteasen in der mitochondrialen Innenmembran leistet.

3.1.2.3 Beteiligung der Insertionskomponenten Cox18 und Pnt1

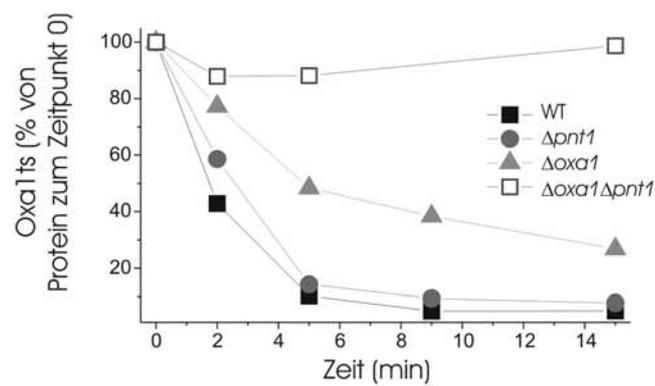
Die Tatsache, dass die Deletion von *OXA1* keinen Effekt auf die Proteolyse von Substratproteinen zeigt, könnte durch die Beteiligung verschiedener Translokationsporen erklärt werden. Daher wurde die Rolle weiterer Komponenten untersucht, die vermutlich an der Membraninsertion beteiligt sind und deshalb auch eine Dislokation abzubauenen Membranproteine vermitteln könnten. Cox18 und Pnt1 sind Proteine der mitochondrialen

Innenmembran, die als Export- und Insertionskomponenten für mitochondrial kodierte Innenmembranproteine gefunden wurden (He und Fox, 1999; Souza *et al.*, 2000).

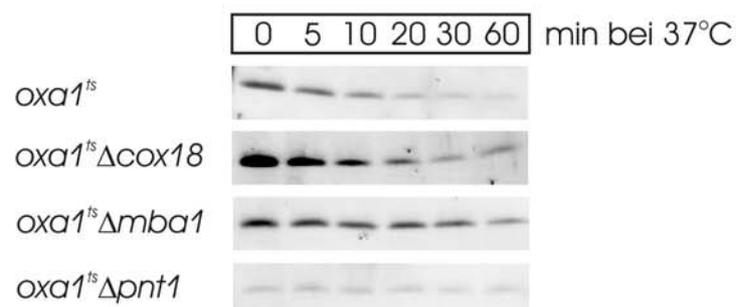
A



B



C



D

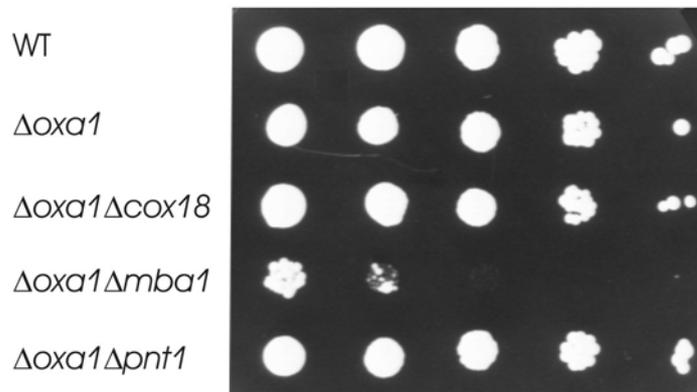


Abb. 13 Einfluss der Insertionskomponenten Cox18 und Pnt1 auf die Proteolyse von Innenmembranproteinen. **A, B:** Oxa1^{ts} wurde in zellfreiem Retikulozytenlysat translatiert, in isolierte Mitochondrien der angegebenen Stämme importiert und anschließend bei 37°C bis zu 15 min weiterinkubiert (siehe Kap. 2.4.5). Das radioaktive Signal wurde über Phosphorimaging analysiert, das Signal zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% gesetzt. **C:** Isolierte Mitochondrien verschiedener Stämme wurden bei 37°C für die angegebene Zeit in Importpuffer inkubiert (siehe Kap. 2.4.4). Endogenes Oxa1^{ts} wurde über Western-Blot-Analyse mit einem Antiserum gegen ein C-terminales Peptid von Oxa1 detektiert. **D:** Wachstum verschiedener Hefestämme auf Glukose-Medium bei 30°C. Zellen wurden in Flüssigmedium kultiviert, jeweils 0,1 OD-Einheit Zellen geerntet, je 5 µl einer Verdünnungsreihe (jeweils 1:10) auf eine Agarplatte (YPD) aufgebracht und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Wie in Abb. 13A gezeigt, konnte für die Proteolyse von Oxa1^{ts} kein Unterschied zwischen Wildtyp- und $\Delta cox18$ -Mitochondrien festgestellt werden. Die Doppelmutante $\Delta oxa1\Delta cox18$ weist ebenfalls keinen zusätzlichen Effekt zu der leicht verminderten Abbaurate von Oxa1^{ts} in $\Delta oxa1$ auf (Abb. 13A). Yme2 und sämtliche Derivate wurden unter denselben Versuchsbedingungen auf ihre Stabilität hin untersucht. Es konnte aber keine Abweichung von der Situation in Wildtyp-Mitochondrien beobachtet werden (nicht gezeigt). Zellen des Stammes $\Delta oxa1\Delta cox18$ zeigen auch kein Wachstumsdefizit bei 30°C auf YPD auf (Abb. 13D).

Auch die Deletion von *PNT1* beeinträchtigte weder die Proteolyse von Oxa1^{ts} (Abb. 13B) noch die von Yme2 und Yme2-Derivaten (nicht gezeigt). Die Deletion von *PNT1* hat jedoch einen synergistischen Effekt auf die Proteolyse im $\Delta oxa1$ -Stamm, denn Mitochondrien der Doppelmutante $\Delta oxa1\Delta pnt1$ zeigen komplette Stabilisierung des Proteins Oxa1^{ts} (Abb. 13B). Für Yme2 und sämtliche Derivate wurden dagegen in diesen Mitochondrien keine Stabilisierung beobachtet (nicht gezeigt). Möglicherweise haben Oxa1 und Pnt1 eine ähnliche Funktion in der mitochondrialen Innenmembran und auch bei der Proteolyse von Oxa1^{ts}. Eine

Western-Analyse von endogenem Oxa1^{ts} bestätigt die *in vitro*-Daten (Abb. 13C): ein gegen ein C-terminales Peptid von Oxa1 gerichtetes Antiserum zeigt einen Abbau des polytopischen Proteins in Mitochondrien der Stämme *oxa1^{ts}* sowie *oxa1^{ts}Δcox18*. In *oxa1^{ts}Δpnt1*-Mitochondrien ist die Proteolyse komplett gehemmt. Die Menge an Oxa1^{ts} zum Zeitpunkt 0 ist unter den Versuchsbedingungen *in vitro* wie *in vivo* gegenüber dem Wildtyp und den Einzelmutanten erniedrigt, weshalb vielleicht zusätzlich ein Import- oder Insertionsdefekt zugrunde liegen kann. Eine Analyse des Wachstumsphänotyps bei 30°C auf YPD ergab keine Hinweise auf synthetische Wachstumsdefekte von *Δoxa1Δpnt1*-Zellen (Abb. 13D). Damit unterscheidet sich Pnt1 von Mba1, das in der Doppelmutante *Δoxa1Δmba1* einen synthetischen Wachstumsdefekt aufweist (Abb. 13D und Preuss *et al.*, 2001).

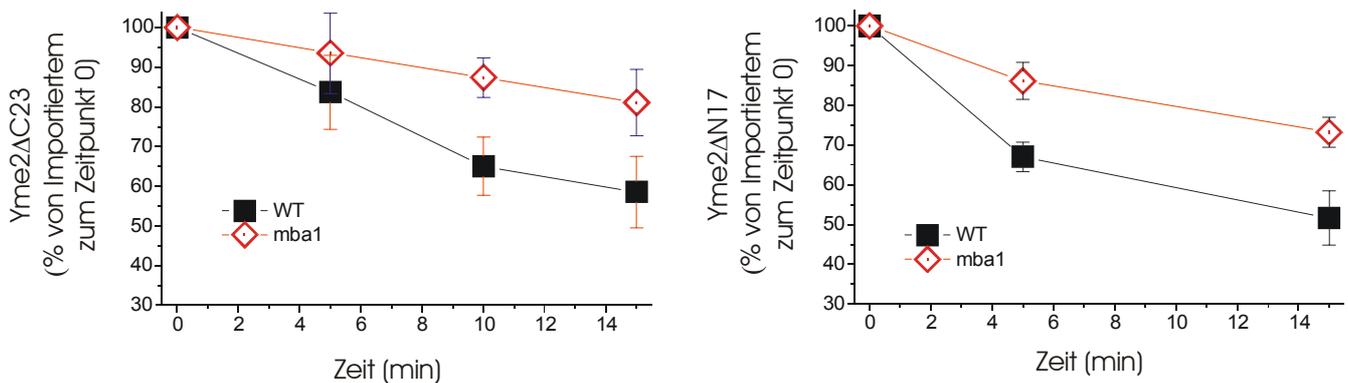


Abb. 14 Einfluss von Mba1 auf die Proteolyse von Innenmembranproteinen. Derivate von Yme2 wurden verwendet, die entweder ausschließlich durch die *m*-AAA-Protease (Yme2ΔC23, linke Grafik) oder *i*-AAA-Protease (Yme2ΔN17, rechte Grafik) abgebaut werden (Leonhard *et al.*, 2000). Radioaktiv markierte Translationsprodukte wurden in isolierte Mitochondrien importiert und anschließend – wie in Kap. 2.4.5 beschrieben – bei 37°C bis zu 15 min weiterinkubiert. Das radioaktive Signal wurde über Phosphorimaging analysiert, das Signal zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% gesetzt. Das Experiment wurde mehrmals reproduziert (Fehlerbalken, n = 9).

3.1.2.4 Beteiligung der Export- und Insertionskomponente Mba1

Mba1 wurde wie Oxa1 als Überexpressions-Suppressor von *Δyta10* identifiziert (Rep *et al.*, 1996), ist mit der mitochondrialen Innenmembran assoziiert und trägt zur Assemblierung von respiratorischen Atmungsketten-Komplexen bei (Rep und Grivell, 1996). Mba1 stellt vermutlich eine Komponente einer neuen Insertionsmaschinerie in der mitochondrialen Innen-

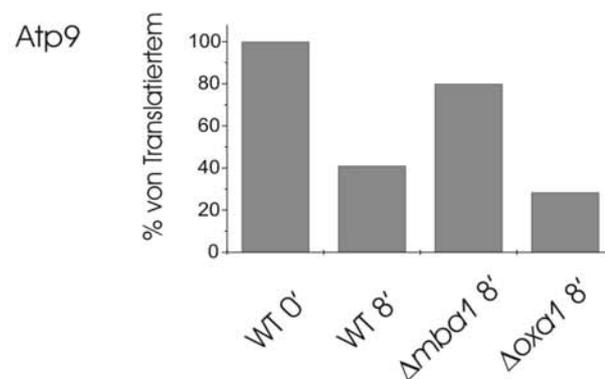
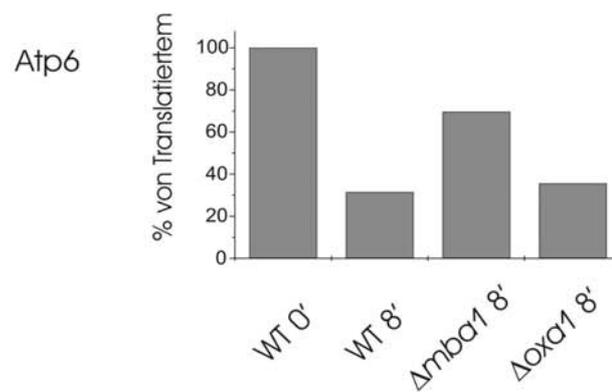
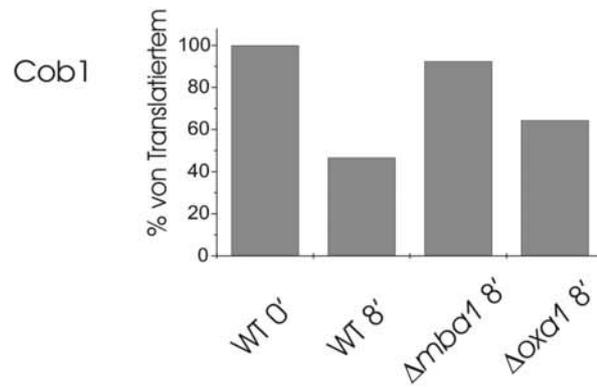
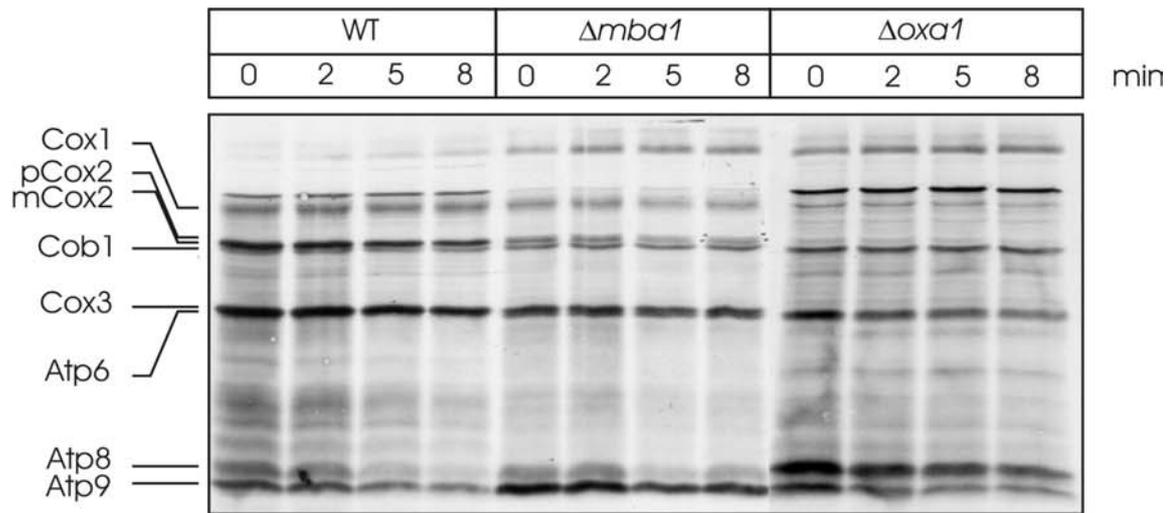


Abb. 15 Proteolyse von neusynthetisierten mitochondrialen Translationsprodukten. In isolierten Mitochondrien wurde eine *in organello*-Translation unter Zugabe von [³⁵S]-Methionin für 10 min durchgeführt, die Translation gestoppt und die Mitochondrien bis zu 8 min bei 37°C inkubiert (siehe Kap. 2.4.10). Aliquots wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und über Phosphorimaging quantifiziert. Um alle Translationsprodukte verschiedener Größen aufzutrennen, wurden jeweils unterschiedliche SDS-Gelsysteme verwendet. Das gezeigte Gelsystem trennte Atp8 und Atp9 voneinander (16/0,2 AA/Bis-AA, 25 mA, 3 h). Zur Trennung von mCox2 und Cob1 bzw. von Cox3 und Atp6 wurde das Gelsystem 10/0,2 AA/Bis-AA, 25 mA, 2,5 h verwendet. Eine Quantifizierung ist in den Balkendiagrammen gezeigt. Das radioaktive Signal der Translationsprodukte zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% gesetzt. Cox1: Untereinheit 1 der Cytochrom c Oxidase; pCox2: Vorläuferprotein und mCox2: reifes Protein der Untereinheit 2 der Cytochrom c Oxidase; Cox3: Untereinheit 3 der Cytochrom c Oxidase; Cob1: Cytochrom b; Atp6, Atp8 und Atp9: Untereinheiten 6, 8 und 9 der F_O-ATP-Synthase.

membran dar, die in Kooperation mit oder unabhängig von der Oxa1-Pore wirkt (Preuss *et al.*, 2001). Eine Doppeldeletion von *MBA1* und *OXAI* zeigt einen starken Wachstumsphänotyp auf Glukose-Medium (Abb. 13D und Preuss *et al.*, 2001). Bei einer Untersuchung der Proteolyse mehrerer Substratproteine in *Ambal*-Mitochondrien wurde ein schwacher, aber statistisch signifikanter Einfluss auf den Abbau von Yme2-Derivaten festgestellt, die nur von jeweils einer der beiden AAA-Proteasen abgebaut werden können (Abb. 14). Die Proteolyse von neusynthetisierten mitochondrialen Translationsprodukten wurde in Wildtyp-, *Ambal*- und *Δoxa1*-Mitochondrien untersucht (Abb. 15). Dazu wurden radioaktiv markierte, *in organello* translatierte Produkte nach Stopp der Translation bei 37°C bis zu 8 min weiterinkubiert (siehe Kap. 2.4.10). Während in *Δoxa1*-Mitochondrien kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt wurde, war der Abbau von Cytochrom b und der Untereinheiten 6 und 9 der F_O-ATP-Synthase in *Ambal* verlangsamt (siehe Balkendiagramme, Abb. 15). Endogenes Oxa1^{ts} wurde im Stamm *oxa1^{ts}Ambal* auch leicht verlangsamt abgebaut (siehe Abb. 13C). Dazu wurden *oxa1^{ts}Ambal*-Mitochondrien bei 37°C inkubiert und Oxa1^{ts} mit einem Antiserum gegen ein C-terminales Peptid von Oxa1 immunologisch nachgewiesen (Abb. 13C). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Deletion von *MBA1* zu einer Beeinträchtigung der Proteolyse von einigen mitochondrialen Innenmembranproteinen führt. *Mba1* hat jedoch keine essentielle Bedeutung für die Proteolyse von Proteinen der mitochondrialen Innenmembran.

3.2 Proteolyse in der Außenmembran von Mitochondrien

3.2.1 Spezifische Proteolyse von HA-DHFR^{WT}-Tom6

Um eine Analyse proteolytischer Prozesse in der Außenmembran der Mitochondrien zu ermöglichen, wurde zunächst ein Modellprotein durch die Fusion von Tom6 mit der Dihydrofolatreduktase (DHFR) der Maus erzeugt (Abb. 16). Tom6 besitzt eine aminoternale Domäne bestehend aus 30 Aminosäuren im Cytosol und ist über eine Transmembrandomäne nahe dem C-Terminus in der Außenmembran verankert. Neun Aminosäuren am C-Terminus ragen in den Intermembranraum (Kassenbrock *et al.*, 1993). Die DHFR-Domäne wurde an den Aminoterminus von Tom6 fusioniert, um sie im Cytosol zu lokalisieren. Ein Epitop des menschlichen Hämagglutinin (HA) wurde zusätzlich mit dem N-Terminus zum immunologischen Nachweis fusioniert. Ein zweites Konstrukt wurde parallel mit DHFR^{MUT} konstruiert, einer Variante von DHFR mit drei Punktmutationen in der DHFR-Domäne (Vestweber und Schatz, 1988). Die Hybrid-Gene wurden über homologe Rekombination in das chromosomale *LEU2*-Gen integriert. Die Fusionsproteine wurden unter der Kontrolle des *GAL10*-Promotors exprimiert. Bei Anzucht auf Galaktose-haltigen Medien konnte eine starke Überexpression erhalten werden.

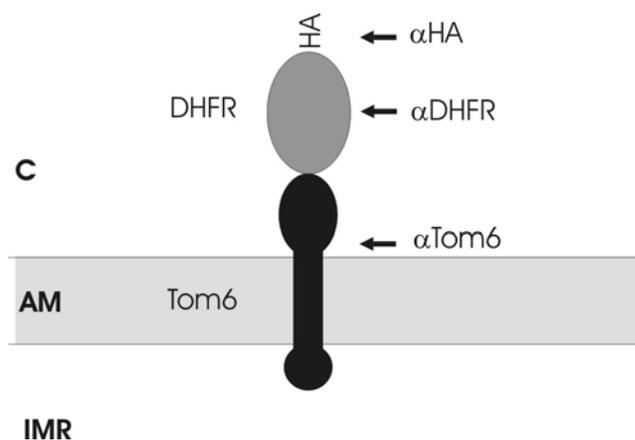


Abb. 16 Schematische Darstellung des Fusionsproteins HA-DHFR^{WT}-Tom6. Tom6 ist in schwarz dargestellt, die DHFR-Domäne in grau. Die Epitope, an die die verwendeten Antikörper binden, sind mit Pfeilen dargestellt. C: Cytosol, AM: Außenmembran, IMR: Intermembranraum. HA: Hämagglutinin-Epitop, DHFR: Dihydrofolatreduktase.

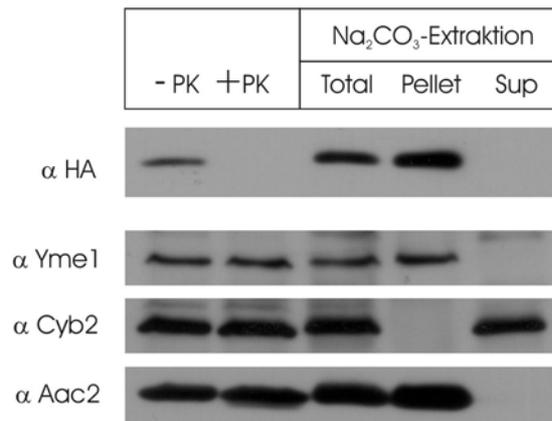


Abb. 17 Submitochondriale Lokalisierung von HA-DHFR^{WT}-Tom6 nach Überexpression. 50 µg Mitochondrien (0,5 mg/ml) wurden – wie in 2.4.7 beschrieben – in Ab- oder Anwesenheit von 50 µg/ml PK inkubiert (Spuren 1 und 2). 100 µg Mitochondrien (0,1 mg/ml) wurden mit Na₂CO₃ pH 11,0 behandelt, mit TCA gefällt (Total), bzw. vorher durch Zentrifugation in Pellet und Überstand (Sup) getrennt und TCA-gefällt. Die Anwesenheit des Fusionsproteins wurde nach SDS-PAGE-Analyse durch immunologischen Nachweis mit einem Antiserum gegen den HA-Anhang nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden Antiseren gegen Yme1 (membrangebunden in der Innenmembran, mit Domäne im Intermembranraum), Cyb2 (Cytochrom b₂, löslich im Intermembranraum) und Aac2 (ADP/ATP-Translokator, Membranprotein in der Innenmembran) verwendet.

3.2.1.1 Lokalisierung von HA-DHFR^{WT}-Tom6

Eine Deletion von *TOM6* hat keinen Wachstumsphänotyp, ist aber in Verbindung mit einer temperatursensitiven Mutante des Außenmembranproteins Tom40, Tom40^{ts}, letal (Kassenbrock *et al.*, 1993). Eine Überexpression von Tom6 komplementiert entsprechend den temperatursensitiven Phänotyp von *tom40^{ts}* (Cao und Douglas, 1995). Das Fusionsprotein DHFR-Tom6 zeigt die gleiche Suppression des *tom40^{ts}*-Phänotyps und ist von daher biologisch aktiv (Cao und Douglas, 1995). Mit Hilfe eines gegen den HA-Anhang gerichteten Antiserums konnten die beiden Fusionsproteine HA-DHFR^{WT}-Tom6 und HA-DHFR^{MUT}-Tom6 nach Zellfraktionierung ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Nach Analyse über ein blaues Nativgel konnte – in Übereinstimmung mit der Komplementierung des Phänotyps von *tom40^{ts}*-Zellen – gezeigt werden, dass zumindest ein Teil von HA-DHFR^{WT}-Tom6 in den Tom-Komplex (Ahting *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 1998; Künkele *et al.*, 1998) assembliert ist (nicht gezeigt). Um die Topologie der Fusionsproteine in der mitochondrialen Membran zu bestimmen, wurden isolierte Mitochondrien mit PK behandelt (Abb. 17). HA-DHFR^{WT}-Tom6 wird abgebaut, während mitochondriale Proteine des Intermembranraumes, der Innenmembran und der Matrix, stabil bleiben. Nach alkalischer Extraktion mit Natriumcarbonat sind beide Fusionsproteine

ausschließlich in der Membranfraktion nachzuweisen (Abb. 17). HA-DHFR^{WT}-Tom6 und HA-DHFR^{MUT}-Tom6 (nicht gezeigt) sind somit in der Außenmembran von Mitochondrien inseriert, wobei die Tom6- und die DHFR-Domäne ins Cytosol ragen (Abb. 16).

3.2.1.2 Der Faltungszustand der DHFR im Fusionsprotein HA-DHFR^{WT}-Tom6

Um den Faltungszustand der DHFR-Domäne von HA-DHFR^{WT}-Tom6 zu ermitteln, wurde das Fusionsprotein in einem zellfreien System in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin synthetisiert und unter Standardbedingungen in isolierte Mitochondrien importiert. Die Mitochondrien wurden nachfolgend mit unterschiedlichen Konzentrationen an PK inkubiert (Abb. 18). Eine gefaltete DHFR-Domäne ist in Gegenwart von 20 µg/ml PK stabil und als 20 kDa-Fragment im Überstand zu detektieren (Gaume *et al.*, 1998), nach Zugabe von 200 µg/ml PK wird sie jedoch vollständig abgebaut. Die DHFR-Domäne des Fusionsproteins wurde bei 20 µg PK vollständig abgebaut und ist demnach nicht gefaltet. Ein Grund dafür könnte die Assemblierung des Fusionsproteins mit dem TOM-Komplex sein, durch die eine Faltung sterisch verhindert wird.

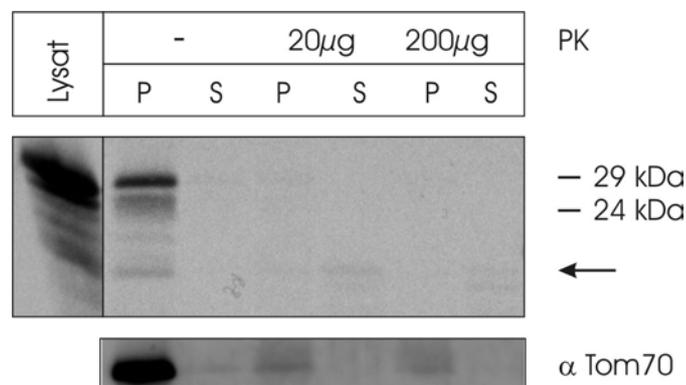


Abb. 18 Die DHFR-Domäne von HA-DHFR^{WT}-Tom6 ist entfaltet. *In vitro* translatiertes und in isolierte Mitochondrien (0,5 mg/ml) importiertes HA-DHFR^{WT}-Tom6 wurde mit verschiedenen Mengen an PK inkubiert und durch Zentrifugation (10 min, 4500 g, 2°C) in Membran- und lösliche Fraktionen getrennt. Der Pfeil zeigt die Größe des 20 kDa-Fragmentes einer gefalteten, PK-resistenten DHFR-Domäne. Als Kontrolle für den PK-Verdau wurde die Menge an Tom70 mit einem gegen Tom70 gerichteten Antiserum immunologisch nachgewiesen. P: Pellet, S: Überstand.

Wie nachfolgend gezeigt wird, werden die Fusionsproteine HA-DHFR^{WT}-Tom6 und HA-DHFR^{MUT}-Tom6 mit derselben Kinetik abgebaut (Abb. 19). Daher ist vermutlich auch die Wildtyp-Form der DHFR in dem Hybridprotein nicht gefaltet. Deshalb werden die

Experimente mit dem Fusionsprotein HA-DHFR^{WT}-Tom6 gezeigt, für HA-DHFR^{MUT}-Tom6 wurden jeweils dieselben Ergebnisse erhalten.

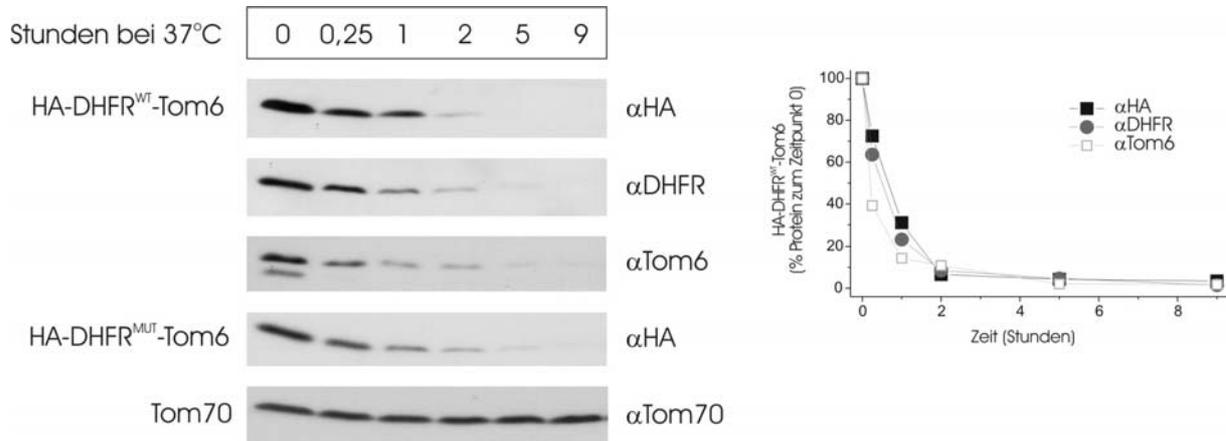


Abb. 19 Abbau von HA-DHFR^{WT}-Tom6 *in vivo*. Wildtyp-Zellen wurden mit dem Plasmid Yip351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 transformiert und Expressionsklone identifiziert. Galaktose-induzierte Zellkulturen wurden durch Zugabe von Cycloheximid (100 µg/ml) in ihrer Proteinbiosynthese gehemmt und bei 37°C für die angegebenen Zeiten weiterinkubiert. Der Abbau des Fusionsproteins HA-DHFR^{WT}-Tom6 wurde nach Zellaufschluss und TCA-Fällung des Gesamtproteins über SDS-PAGE und immunologischen Nachweis mit den angegebenen Antiseren analysiert und mit dem von HA-DHFR^{MUT}-Tom6 verglichen. Endogenes Tom70 wurde als Kontrolle für die Integrität der Mitochondrien parallel immunologisch nachgewiesen. Die zum Zeitpunkt 0 in den Mitochondrien vorhandene Menge Protein wurde als 100% gesetzt. Die Abbaukinetiken, die mit den drei Antikörpern gegen die verschiedenen Epitope des Fusionsproteins HA-DHFR^{WT}-Tom6 erhalten wurden, wurden quantifiziert und sind graphisch dargestellt.

3.2.1.3 HA-DHFR^{WT}-Tom6 wird *in vivo* abgebaut

Um die Stabilität von HA-DHFR^{WT}-Tom6 *in vivo* zu untersuchen, wurde die Proteinbiosynthese von Zellen einer wachsenden Kultur durch Zugabe von Cycloheximid gestoppt und die Zellen wurden bis zu 9 Stunden bei 37°C weiterinkubiert. Ein immunologischer Nachweis mit einem Antiserum gegen das HA-Epitop ließ deutlichen Abbau des Fusionsproteins erkennen (Abb. 19). Dagegen ist keine Abnahme des Außenmembranproteins Tom70 unter diesen Bedingungen zu beobachten, weshalb ein unspezifischer Probenverlust ausgeschlossen werden kann. Nach Überexpression von HA-DHFR^{MUT}-Tom6 wurden Mitochondrien isoliert und *in vitro* bei 37°C inkubiert. Die Menge an Protein wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 20). Innerhalb von 75 min ist kein Abbau des Fusionsproteins nachweisbar. Nachdem in isolierten Mitochondrien keine Proteolyse erfolgt, werden offensichtlich für den Abbau des Hybridproteins ein oder mehrere

cytoplasmatische Faktoren benötigt. Allerdings wurde auch durch Zugabe einer cytosolischen Fraktion das Fusionsprotein nicht destabilisiert (Abb. 20, rechte Seite).

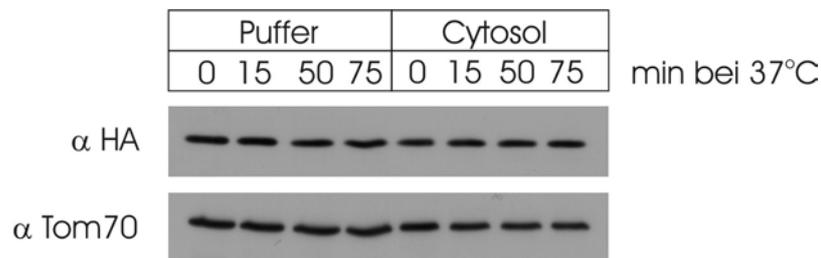


Abb. 20 HA-DHFR^{MUT}-Tom6 wird in isolierten Mitochondrien nicht abgebaut. Isolierte Mitochondrien (0,5 mg/ml) des HA-DHFR^{MUT}-Tom6 überexprimierenden Stammes wurden bis zu 75 min in Importpuffer bei 37°C inkubiert (siehe Kap. 2.4.4), dem gegebenenfalls cytosolische Fraktion (5 mg/ml) zugesetzt wurde. Die Proben wurden über SDS-PAGE und Immundekoration mit einem gegen HA gerichteten Antiserum analysiert. Ein Westernblot mit Antiserum gegen Tom70 dient als Gelladkontrolle.

3.2.1.4 HA-DHFR^{WT}-Tom6 wird vollständig abgebaut

Um auszuschließen, dass nur eine N-terminale Region des Fusionsproteins abgespalten wird, wurden die Proben mit mehreren Antiseren analysiert, die gegen verschiedene Bereiche des Fusionsproteins gerichtet sind. Ein immunologischer Nachweis der Proteinmenge mit einem Antiserum gegen die DHFR ergab dieselbe Abbaukinetik wie mit einem Antiserum gegen den HA-Anhang beobachtet (Abb. 19). Das genaue Epitop der DHFR, an das der monoklonale Antikörper bindet, ist jedoch nicht bekannt. Um des weiteren eine Abspaltung der DHFR-Domäne von Tom6 auszuschließen, wurde ein Antikörper in Kaninchen gegen den cytosolischen Bereich von Tom6 (Aminosäurereste 18-30) generiert (siehe auch Abb. 16). Eine immunologische Analyse der Menge an Fusionsprotein zeigt wiederum dieselbe Abbaukinetik (Abb. 19). Damit ist gezeigt, dass das Hybridprotein mindestens bis zum Membrananker von Tom6 hydrolysiert wird.

3.2.1.5 Charakterisierung der Proteolyse von HA-DHFR^{WT}-Tom6

Die Stabilität von HA-DHFR^{WT}-Tom6 wurde *in vivo* unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Zugabe von Natrium-Azid oder dem Protonophor CCCP hatte eine komplette Stabilisierung des Fusionsproteins zur Folge (Abb. 21). Da beide Reagenzien die ATP-Synthese in der Zelle hemmen bzw. das Membranpotential über die mitochondriale

Innenmembran zerstören, weisen die Untersuchungen auf eine ATP-Abhängigkeit des Prozesses hin. Eine Zugabe der Inhibitoren PMSF (Serinprotease-Inhibitor) und β -lacton (Proteasom-Inhibitor) zeigte keine hemmende Wirkung auf den Abbau (nicht gezeigt). Zwar sind beide Wirkstoffe membrangängig, eine Diffusion ins Cytosol könnte aber auch durch die Zellwand behindert sein.

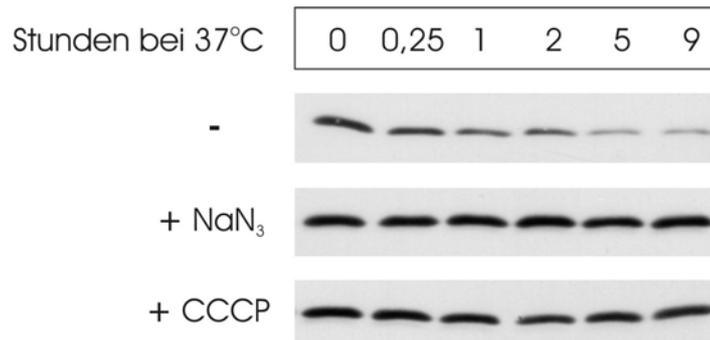


Abb. 21 Charakterisierung der Proteolyse von HA-DHFR^{WT}-Tom6. Der Ansatz eines *in vivo*-Abbau-Experimentes (s. Abb. 19) wurde mit 2 mM NaN₃ bzw. 1 mM CCCP versetzt und nachfolgend bis zu 9 Stunden inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Probenentnahme und -Analyse wie in Abb. 19. Protein wurde mit einem gegen das HA-Epitop gerichtete Antiserum immunologisch nachgewiesen.

3.2.1.6 Die Rolle des Proteasoms für die Proteolyse von HA-DHFR^{WT}-Tom6

Aufgrund der möglichen ATP-Abhängigkeit der Proteolyse wurde die Stabilität von HA-DHFR^{WT}-Tom6 in verschiedenen Hefestämmen getestet, die Mutationen in ATP-abhängigen Proteasen tragen. Beim Abbau von Proteinen des ER spielt das 26S-Proteasom eine entscheidende Rolle (Plempner und Wolf, 1999; Sommer und Wolf, 1997). Es ist vorstellbar, dass die Stabilität mitochondrialer Außenmembranproteine ebenfalls von 26S-Proteasomen kontrolliert wird. Daher wurde der Abbau des Fusionsproteins HA-DHFR^{WT}-Tom6 *in vivo* in mehreren Hefestämmen mit Mutationen untersucht, die die Aktivität des Proteasoms betreffen (Abb. 22). HA-DHFR^{WT}-Tom6 wurde in den Stämmen *pre1-1*, *pre1-1pre2-1* und *pre1-1pre4-1* exprimiert, die mutante Proteasomen mit stark verringerter proteolytischer Aktivität besitzen (Gerlinger *et al.*, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1993; Hilt *et al.*, 1993; Seufert und Jentsch, 1992). In keinem Fall wurde nach einem Abbau-Experiment eine signifikante Verzögerung der Proteolyse festgestellt (Abb. 22A, gezeigt für *pre1-1pre4-1*). Die Einschränkung der Proteasomaktivität in diesen Zellen wurde durch eine Messung der

chymotryptischen Aktivität des Proteasoms verifiziert (Abb. 22B; Heinemeyer *et al.*, 1993; Heinemeyer *et al.*, 1991). Die Deletion von *PEP4*, kodierend für die vakuoläre Proteinase A, in *pre1-1pre4-1*-Zellen führte zu keiner Stabilisierung (nicht gezeigt). Deshalb kann eine mögliche redundante Funktion vakuolärer Proteasen und des Proteasoms ausgeschlossen werden.

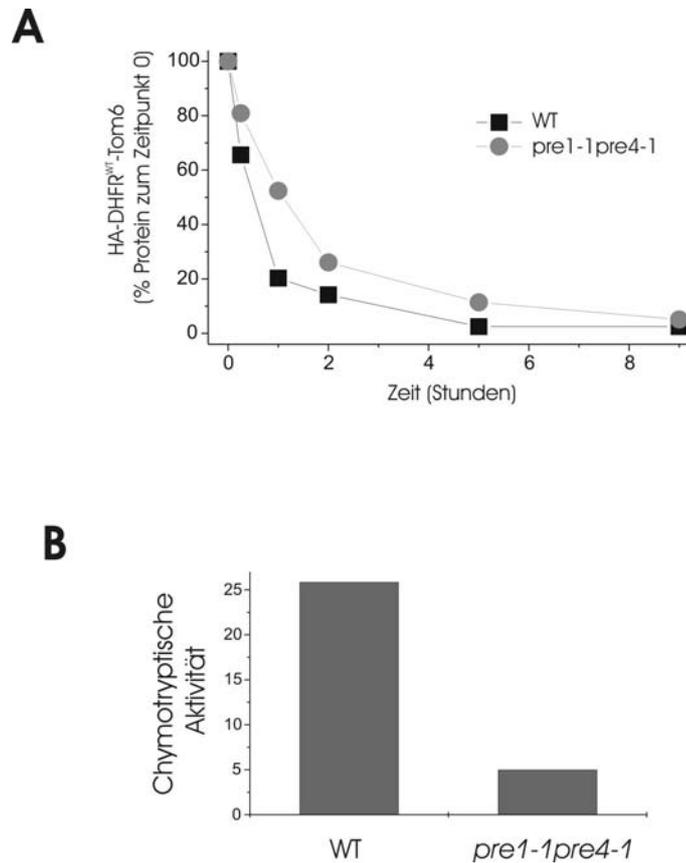


Abb. 22 **A:** Abbau von HA-DHFR^{WT}-Tom6 in *pre1-1pre4-1*-Zellen. Die Proteasom-Mutante *pre1-1pre4-1* wurde mit dem Plasmid Ylp351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 transformiert und Expressionsklone identifiziert. Ein *in vivo*-Abbau-Experiment und immunologischer Nachweis mit einem Antiserum gegen HA – wie in Abb. 19 beschrieben – ergab Abbaukinetiken, die graphisch dargestellt sind. Protein wurde mit einem gegen das HA-Epitop gerichtete Antiserum immunologisch nachgewiesen. Die zum Zeitpunkt 0 in den Mitochondrien vorhandene Menge HA-DHFR^{WT}-Tom6 wurde auf 100% gesetzt. **B:** Messung der chymotryptischen Aktivität von Proteasom-Mutanten. Die chymotryptische Aktivität des Proteasoms von HA-DHFR^{WT}-Tom6 exprimierenden Wildtyp- und *pre1-1pre4-1*-Zellen wurde nach (Heinemeyer *et al.*, 1993; Heinemeyer *et al.*, 1991) bestimmt. Die Zellen wurden – wie in Kap. 2.3.8 beschrieben – mit dem Substrat Z-G-G-L-p Nitroanilid inkubiert und mit Entwickler-Mix behandelt. Bei einer Absorption von 545 nm wurde die chymotryptische Aktivität gemessen und in Arbeitseinheiten angegeben.

Eine Mutante einer regulatorischen Untereinheit des Proteasoms, *mpr1-1*, zeigt pleiotrope Defekte, die auch die mitochondriale Morphologie betreffen (Rinaldi *et al.*, 1998). Bei höherer Temperatur und bei Übergang einer Zellkultur in die stationäre Phase ist eine

Akkumulation von (poly-)ubiquitinierten Konjugaten beschrieben (Rinaldi *et al.*, 1998). Diese Beobachtung konnte nach immunologischem Nachweis mit einem Ubiquitin-Antikörper reproduziert werden (nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen ist jedoch keine signifikant verlangsamte Proteolyse von HA-DHFR^{WT}-Tom6 in *mpr1-1*-Zellen festzustellen (Abb. 23). Außerdem ergab eine gleichzeitige Western-Analyse der Proteine von lysierten *mpr1-1*-Zellen mit einem Antiserum gegen das HA-Epitop keine Hinweise auf eine Ubiquitinierung des Modellproteins HA-DHFR^{WT}-Tom6 (nicht gezeigt).

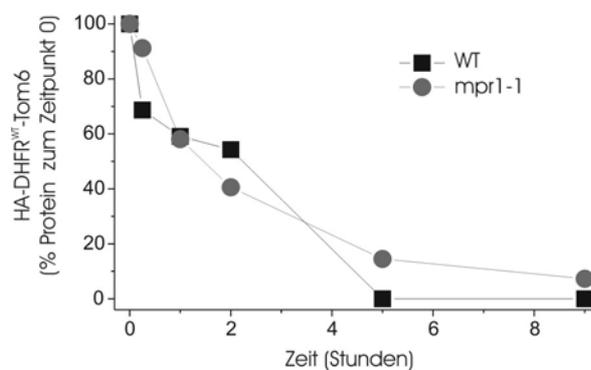


Abb. 23 Abbau von HA-DHFR^{WT}-Tom6 in *mpr1-1*-Zellen. *mpr1-1*-Zellen wurden mit dem Plasmid Ylp351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 transformiert und Expressionsklone identifiziert. Ein *in vivo*-Abbau-Experiment und immunologischer Nachweis mit einem Antiserum gegen HA – wie in Abb. 19 beschrieben – ergab Abbaukinetiken, die graphisch dargestellt sind. Protein wurde mit einem gegen das HA-Epitop gerichtete Antiserum immunologisch nachgewiesen. Die zum Zeitpunkt 0 in den Mitochondrien vorhandene Menge HA-DHFR^{WT}-Tom6 wurde als 100% gesetzt.

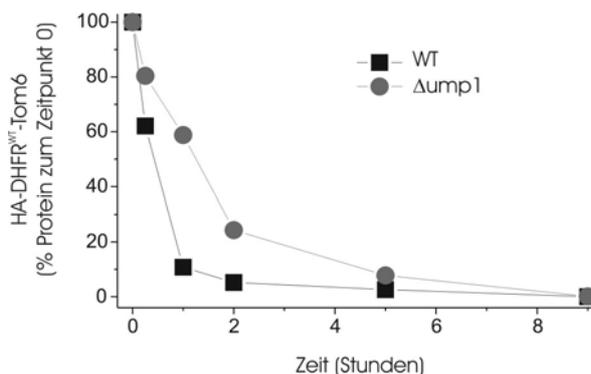


Abb.24 Abbau von HA-DHFR^{WT}-Tom6 in $\Delta ump1$ -Zellen. Die das Proteasom in seiner Funktion betreffende Mutante $\Delta ump1$ wurde mit dem Plasmid Ylp351-GAL-HA-DHFR^{WT}-TOM6 transformiert und Expressionsklone identifiziert. Ein *in vivo*-Abbau-Experiment und immunologischer Nachweis mit einem Antiserum gegen HA – wie in Abb. 19 beschrieben – ergab Abbaukinetiken, die graphisch dargestellt sind. Protein wurde mit einem gegen das HA-Epitop gerichtete Antiserum immunologisch nachgewiesen. Die zum Zeitpunkt 0 in den Mitochondrien vorhandene Menge HA-DHFR^{WT}-Tom6 wurde als 100% gesetzt.

Die Deletion von *UMPI* führt zu einer drastischen Reduktion der Proteasomaktivität in den Zellen, da das kodierte Protein Ump1 die Assemblierung des 20S-Proteasoms vermittelt (Ramos *et al.*, 1998). Jedoch wurde auch in diesen Zellen keine Stabilisierung von HA-DHFR^{WT}-Tom6 beobachtet (Abb. 24).

3.2.1.7 Die Stabilität von HA-DHFR^{WT}-Tom6 in verschiedenen mutanten Hefestämmen

Nachdem keine Beteiligung des 26S-Proteasoms bei der Proteolyse von HA-DHFR^{WT}-Tom6 nachgewiesen werden konnte, wurde die Stabilität des Hybridproteins in weiteren möglichen Protease-Mutanten untersucht. Es ist vorstellbar, dass die mitochondriale *i*-AAA-Protease vom Intermembranraum aus auch in der Außenmembran aktiv ist. Die Deletion von *YME1* führte aber zu keiner Verlangsamung der Proteolyse von HA-DHFR^{WT}-Tom6 (Abb. 25). Die vakuoläre Proteinase A, die vom Gen *PEP4* kodiert wird, prozessiert viele weitere vakuoläre Proteasen hydrolytisch. In der Mutante $\Delta pep4$ ist damit deren Reifung verhindert (Rupp und Wolf, 1995; Teichert *et al.*, 1989). Die $\Delta pep4$ -Mutante zeigt ebenfalls keinen Effekt auf den Abbau des Modellproteins (Abb. 25). Das Außenmembranprotein Msp1 mit bekannter ATPase-Domäne (Nakai *et al.*, 1993; Schnall *et al.*, 1994) hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Proteolyse von HA-DHFR^{WT}-Tom6 (nicht gezeigt).

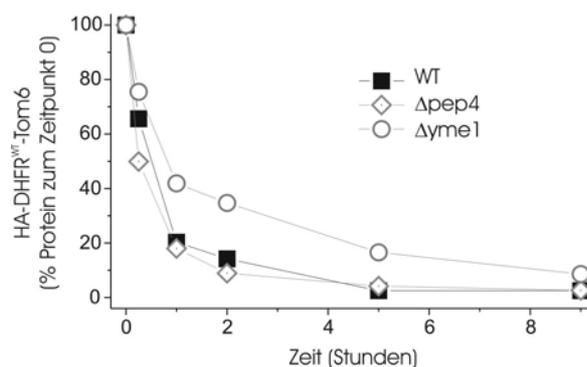


Abb. 25 Abbau von HA-DHFR^{WT}-Tom6 in $\Delta yme1$ und $\Delta pep4$ -Zellen. $\Delta yme1$ und $\Delta pep4$ -Zellen wurden mit dem Plasmid Ylp351-GAL10-HA-DHFR^{WT}-TOM6 transformiert und Expressionsklone identifiziert. Ein *in vivo*-Abbau-Experiment und immunologischer Nachweis mit einem Antiserum gegen HA – wie in Abb. 19 beschrieben – ergab Abbaukinetiken, die graphisch dargestellt sind. Protein wurde mit einem gegen das HA-Epitop gerichtete Antiserum immunologisch nachgewiesen. Die zum Zeitpunkt 0 in den Mitochondrien vorhandene Menge HA-DHFR^{WT}-Tom6 wurde als 100% gesetzt.

Eine Stabilisierung des entfalteten Fusionsproteins in der mitochondrialen Außenmembran mit einer großen, löslichen Domäne im Cytosol, die mit der Hemmung durch Natrium-Azid vergleichbar wäre, wurde in keiner der untersuchten Mutanten gefunden. Weder das 26S-Proteasom noch die mitochondriale *i*-AAA-Protease noch die vakuolären Proteasen sind offenbar an der Proteolyse des Modellproteins HA-DHFR^{WT}-Tom6 beteiligt.

3.2.2 Genetische Durchmusterung mit *tom40^{ts}*

Die Untersuchungen zur Stabilität von HA-DHFR^{WT}-Tom6 führte zu keiner Identifizierung von Komponenten, die an der Proteolyse von Proteinen der mitochondrialen Außenmembran beteiligt sind. Daher wurde eine genetische Durchmusterung durchgeführt, um eine potentielle Protease oder einen zellulären Faktor, der in den Abbau von Außenmembranproteinen involviert ist, zu finden.

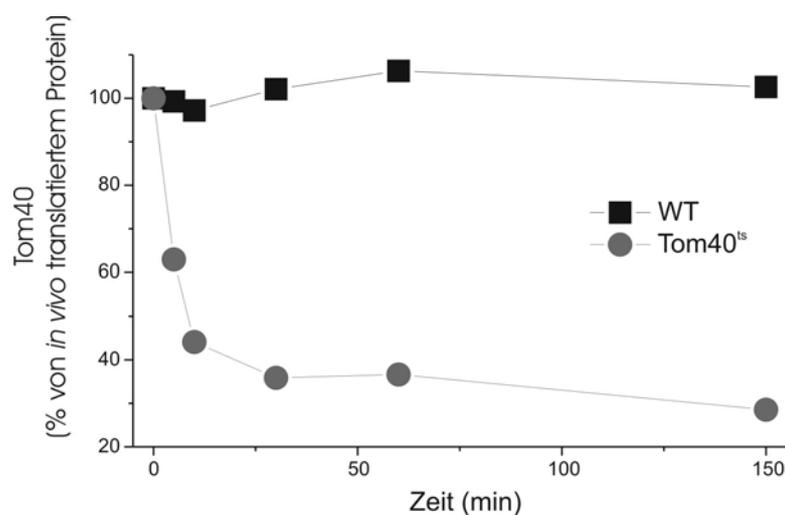


Abb. 26 Stabilität von Tom40 und Tom40^{ts} bei 37°C. Zellen des Wildtyp- und *tom40^{ts}*-Stammes wurden – wie in Kap. 2.4.9 beschrieben – *in vivo* radioaktiv markiert, die Translation gestoppt und der Ansatz bei 37°C weiterinkubiert. Ein anschließender Zellaufschluss und eine Immunpräzipitation mit einem Antiserum gegen Tom40 erlaubte eine Quantifizierung der Proteinmenge zu den angegebenen Zeitpunkten. Die zum Zeitpunkt 0 in den Zellen vorhandene Menge Tom40 wurde als 100% gesetzt.

3.2.2.1 Prinzip der genetischen Durchmusterung

Tom40 ist ein essentielles Protein (Blom *et al.*, 1993) und stellt eine Hauptkomponente des TOM-Komplexes („translocase of the outer membrane“) in Mitochondrien dar (Ahting *et al.*,

1999; Hill *et al.*, 1998; Künkele *et al.*, 1998). Das Allel *tom40^{ts}* wurde durch PCR-Mutagenese erzeugt (Kassenbrock *et al.*, 1993). Der Stamm *tom40^{ts}* weist bei 24°C normales, bei 37°C kein Wachstum mehr auf (Abb. 27). Temperatursensitive Mutanten sind häufig auf Abbau und damit niedrige Mengen an mutiertem Protein zurückzuführen. Im Gegensatz zu Tom40 wird Tom40^{ts} in einem Puls-Experiment nach radioaktiver Markierung („pulse“) *in vivo* innerhalb von wenigen Minuten abgebaut („chase“, Abb. 26). Auch die Akkumulation von Tom40^{ts}-Protein ist in der Mutante deutlich geringer als von Tom40 im Wildtyp (Abb. 28). Unter der Annahme, dass die niedrige Proteinmenge im Stamm *tom40^{ts}* mit dem temperatursensitiven Wachstumsdefekt korreliert, wurde eine genetische Durchmusterung durchgeführt. Eine Hemmung der Proteolyse sollte das Wachstum der *tom40^{ts}*-Zellen bei 37°C erlauben. Es wurde eine EMS-Mutagenese durchgeführt und nach Mutanten gesucht, die bei nicht-permissiver Temperatur wachsen. Damit wurde auf Kandidaten selektioniert, in denen ein proteolytischer Faktor Mutations-Defekte aufweist, der am Abbau von Tom40^{ts} beteiligt ist. Die erlangten Suppressoren sollten nach Transformation mit einer „Multi-copy-Library“ wieder den temperatursensitiven Phänotyp aufweisen (negative Durchmusterung), so dass ein den Abbau von Tom40^{ts} vermittelndes Gen isoliert werden kann.

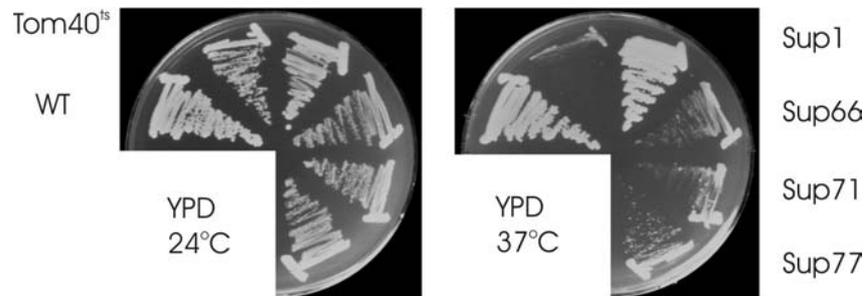


Abb. 27 Wachstumsphänotyp von *tom40^{ts}* und der Suppressoren. Zellen der jeweiligen Stämme wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und bei den angegebenen Temperaturen für 3 Tage inkubiert.

3.2.2.2 Herstellung von Suppressoren durch Mutagenese

Nach Mutagenese von *tom40^{ts}*-Zellen mit EMS (wie in Kap. 2.2.6 beschrieben) wurden diese auf YPD-Platten bei 37°C kultiviert, um auf temperatursensitive Suppressoren zu selektionieren. 77 Klone wurden auf diese Weise isoliert (*Sup1* - *Sup77*), die bei 37°C wachsen. Das Wachstum der Wildtyp- und *tom40^{ts}*-Zellen sowie Zellen der Suppressorstämme *Sup1*, *Sup66*, *Sup71* und *Sup77* ist in Abb. 27 exemplarisch gezeigt. Die

Suppression des Wachstumsdefektes ist zwischen den isolierten Stämmen unterschiedlich stark. 38 der erhaltenen Klone wiesen eine zu *tom40^{ts}*-Zellen leicht erhöhte Menge an Tom40^{ts}-Protein auf, was für Zellen der Stämme *Sup66*, *Sup71* und *Sup77* gezeigt ist (Abb. 28).

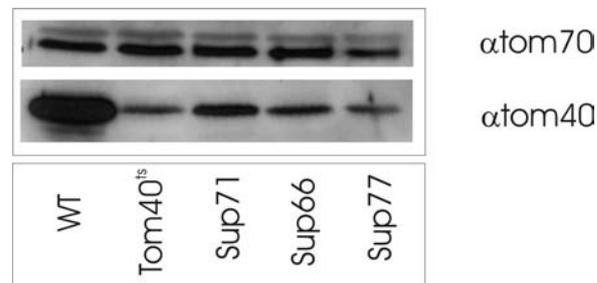


Abb. 28 Tom40-Proteinmenge in *tom40^{ts}*- und Suppressor-Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Die Zellen wurden bei 24°C bis zu gleicher optischer Dichte kultiviert, anschließend geerntet und aufgeschlossen. Protein wurde mit TCA präzipitiert und über SDS-PAGE und Western-Blot mit Antiseren gegen Tom40 und Tom70 als Gelladekontrolle analysiert.

3.2.2.3 Lokalisierung von Mutationen auf dem Plasmid

Wildtyp- und *tom40^{ts}*-Stamm tragen die kodierende Sequenz für Tom40 bzw. Tom40^{ts} auf einem Plasmid und weisen eine Deletion des chromosomalen *TOM40*-Gens auf (vgl. Kap. 2.2.7). Für die genetische Durchmusterung sind Mutationen auf dem Plasmid mit dem Gen *tom40^{ts}* als potentielle Rückmutationsereignisse unerwünscht, da chromosomal kodierte Faktoren isoliert werden sollen. Die Integrität des *tom40^{ts}*-Gens muss daher sichergestellt sein, weshalb auf Mutationen auf dem Plasmid der isolierten Revertanten getestet wurde (siehe schematische Darstellung Abb. 29, vgl. Kap. 2.2.7). Dazu wurde das Plasmid aus den mutagenisierten Zellen isoliert und in Wildtypzellen (KKY3) transformiert. Diese tragen das *TOM40*-Gen auf einem URA3-Plasmid, gegen das auf 5-FOA-Platten selektioniert werden kann. Die resultierenden Klone der Teststämme enthalten schließlich das Tom40^{ts} kodierende Plasmid. Zwölf Teststämme zeigten weiterhin einen temperatursensitiven Wachstumsphänotyp (Abb. 30). Die entsprechenden Suppressor-Ausgangsklone wiesen also keine Mutation im *tom40^{ts}*-Gen auf und wurden für den weiteren Verlauf der Durchmusterung verwendet. Alle übrigen Klone zeigten den Wildtyp-Phänotyp, was auf eine Plasmid-gekoppelte Rückmutation zum *TOM40*-Gen hinweist. Einer dieser Klone ist *Sup1*, dessen Plasmid sequenziert wurde.

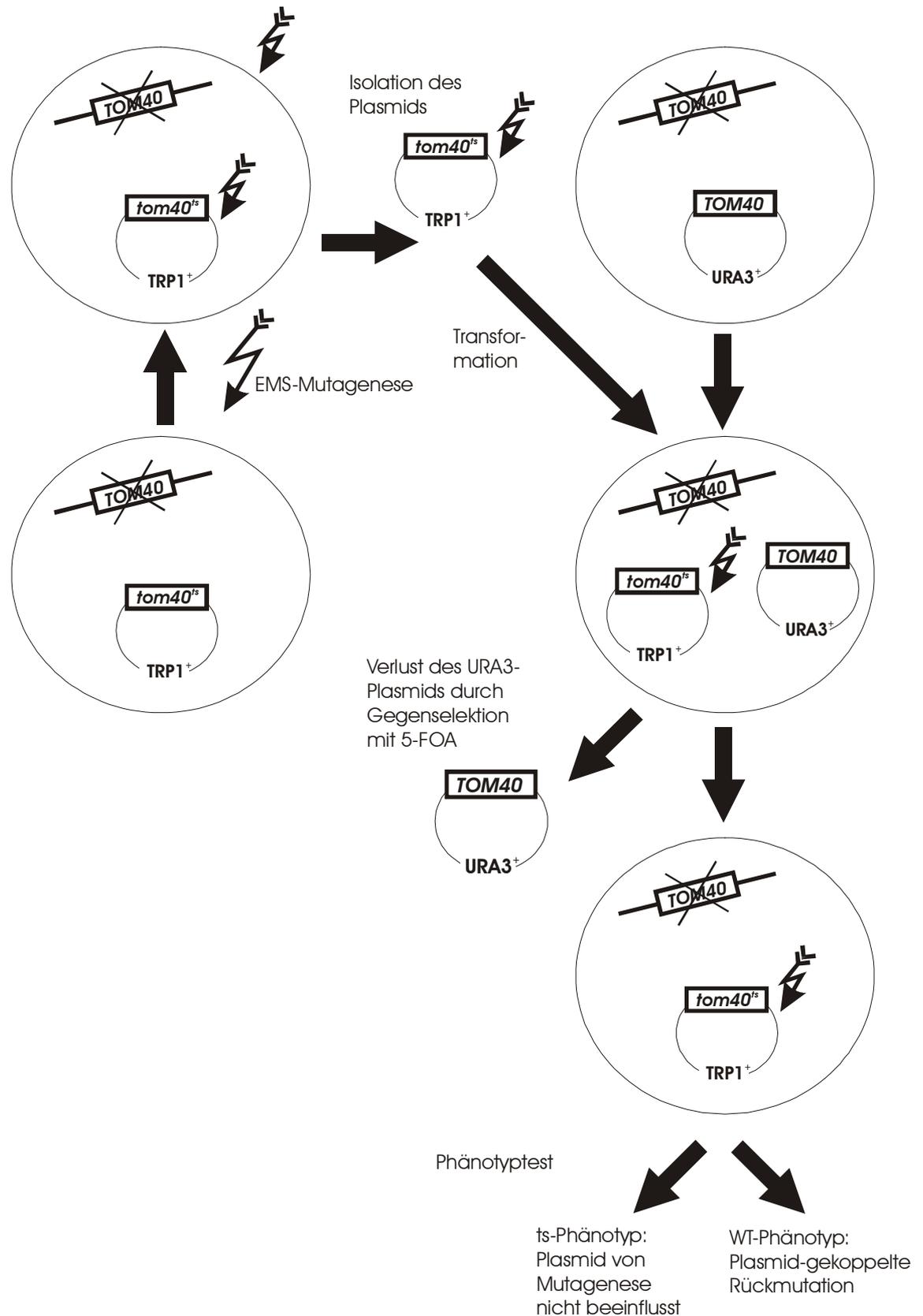


Abb. 29 Schematische Darstellung der Mutagenese und der nachfolgenden Analyse der erhaltenen revertanten Klone. Weitere Erklärungen im Text und in den Kap. 2.2.6 und 2.2.7.

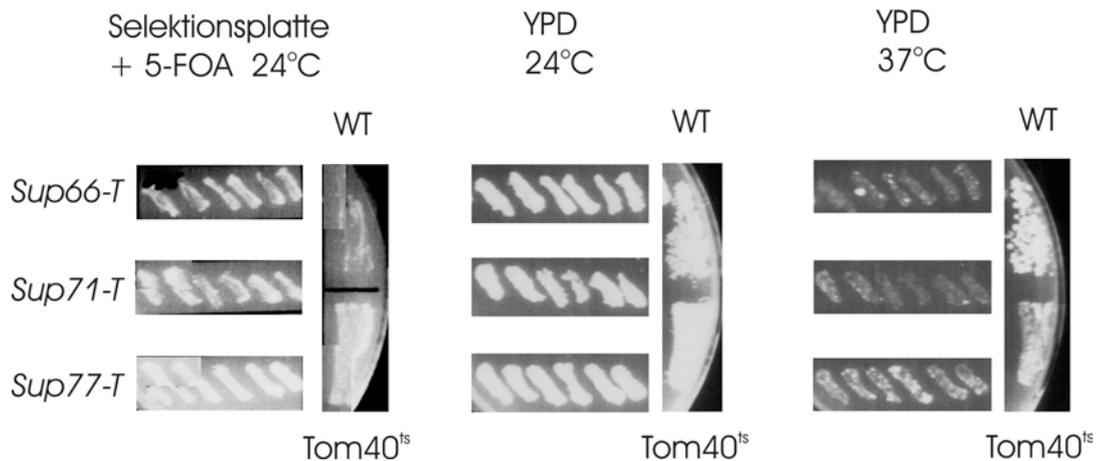


Abb. 30 Phänotypentest der Teststämme nach Retransformation. Aus den Suppressoren isolierte Plasmide wurden – wie in Abb. 29 gezeigt und in 2.2.7 beschrieben – in isogene Wildtyp-Zellen transformiert und auf SC-trp-Platten selektioniert. Es entstanden Teststämme, von denen *Sup66-T*, *Sup71-T* und *Sup77-T* gezeigt sind. Positive Klone wurden auf 5-FOA-Platten (5-Fluoro-orotic-acid, linke Platte) ausgestrichen, wachsende Kolonien hatten das *URA3*-Plasmid mit dem *TOM40*-Gen verloren. Nachdem *Tom40* essentiell ist und der Wildtyp-Stamm [$\Delta tom40/pRS316-TOM40(URA3)$] das *URA3*-Plasmid daher nicht verlieren kann, wächst dieser nicht auf 5-FOA (linke Platte). Kolonien der Teststämme, die auf 5-FOA wachsen konnten, wurden für den Phänotyp-Test auf YPD bei 24°C (mittlere Platte) bzw. 37°C (rechte Platte) inkubiert. Die Klone der drei gezeigten Teststämme sind temperatursensitiv und weisen damit ein Plasmid auf, das von Rückmutationen in *tom40^{ts}* nicht betroffen ist. Alle Klone eines Teststammes müssen sich – statistisch – identisch verhalten, daher sind jeweils sechs ausgestrichene Klone dargestellt. Mit Wildtyp- (Wachstum bei 24°C und 37°C) und *tom40^{ts}*-Zellen (Wachstum bei 24°C, kein Wachstum bei 37°C) wurden Kontrollausstriche durchgeführt.

3.2.2.4 Stabilisierung von *Tom40^{ts}* durch eine Rückmutation in einer hoch konservierten Region

Das Plasmid des *tom40^{ts}*-Ausgangsstammes wies nach Sequenzierung acht Nukleotid-austausche in der Promotor-Region auf und zwölf Mutationen in der kodierenden Region, die zu zehn Aminosäureaustauschen im Protein führen. Die Sequenzanalyse von *Sup1* zeigte eine Rückmutation der Aminosäure 66 von Prolin (*Tom40^{ts}*) zu Leucin (*Tom40*, siehe Abb. 31). Obwohl alle anderen Nukleotide mit denen von *tom40^{ts}* identisch sind, ist der Wachstumsdefekt vollständig supprimiert. Das Protein *Tom40^{ts}* akkumuliert in *Sup1*-Zellen in mit Wildtyp vergleichbaren Mengen (nicht gezeigt). Mutantes *Tom40* im *Sup1*-Stamm bleibt bei einem Pulsmarkierungs-Experiment komplett stabil (Abb. 32). Die Aminosäure Leucin an Position 66 von *Tom40* aus *S. cerevisiae* (Abb. 31) entspricht der Aminosäure Isoleucin an Position 47 in *Tom40* von *N. crassa*. In diesem Organismus ist der Bereich der Aminosäuren 40-50 essentiell für die Assemblierung des Proteins in den TOM-Komplex (Rapaport *et al.*,

2001). Die Bindung des Vorstufenproteins an den mitochondrialen Import-Rezeptor und die Insertion von Tom40 in die Membran sind dabei jedoch nicht beeinträchtigt. Die beobachtete Rückmutation an dieser Position ermöglicht anscheinend wieder eine Assemblierung mit dem TOM-Komplex, wodurch Tom40^{ts} stabilisiert wird. Damit erhält das mutante Tom40^{ts}-Protein in *Sup1* wieder volle Funktionsfähigkeit (vgl. Wachstumsphänotyp, Abb. 27).

	44		73
Tom40	TYKQLHSHRQSLELVNPGTVE	N L	NKEVSRD
Tom40^{ts}	TYKQLHSHRQSLELVNPGTVE	D P	NKEVSRD
Tom40^{ts}Sup1	TYKQLHSHRQSLELVNPGTVE	L	NKEVSRD
	74		103
Tom40	VF	L S	QYFF TGLRADLNKAF SMNPAFQTSHT
Tom40^{ts}	VF	M S	QYFF TGLRADLNKAF SMNPAFQTSHT
Tom40^{ts}Sup1	VF	M S	QYFF TGLRADLNKAF SMNPAFQTSHT

Abb. 31 Sequenzvergleich von Tom40, Tom40^{ts} und Tom40^{ts}Sup1 für die Aminosäuren 44 bis 103. Die *TOM40*-Gene der Stämme *tom40^{ts}* und *Sup1* wurden auf ihre Gesamtlänge hin sequenziert. Tom40^{ts} weist im *tom40^{ts}*-Stamm neben einigen anderen Mutationen in Promotor- und kodierender Region (wie z.B. Positionen 65 und 76) eine Mutation von Leucin zu Prolin auf, im Suppressor-Stamm *Sup1* eine Rückmutation von Prolin zum Leucin des Wildtyps. Die übrigen Mutationen im *TOM40^{ts}*-Gen sind C119F; R140K; F187Y; E192N; P281H; C355Y; P385L.

3.2.2.5 Die Suppressor-Mutationen führen zu keiner Stabilisierung von Tom40^{ts}

Mit den zwölf Suppressoren, die keine Mutation auf dem Plasmid aufwiesen, sowie mit *Sup1*-Zellen, wurden Pulsmarkierungs-Experimente durchgeführt. Zellkulturen wurden radioaktiv markiert („pulse“) und anschließend bis zu einer Stunde bei 37°C inkubiert („chase“). Ein nachfolgender Zellaufschluss und Immunfällung mit Antiserum gegen Tom40 ergab die Abbauraten von neu synthetisiertem Protein (Abb. 32A). Tom40 wird im Gegensatz zu Tom40^{ts} nicht abgebaut. In den Suppressorzellen wurde keine oder nur eine geringe Stabilisierung von Tom40^{ts} festgestellt (Abb. 32A und 32B). Obwohl die Suppressorzellen keinen Wachstumsdefekt zeigen (Abb. 27), sind die entstandenen Mutationen nicht mit proteolytischer Aktivität in der Zelle in Zusammenhang zu bringen.

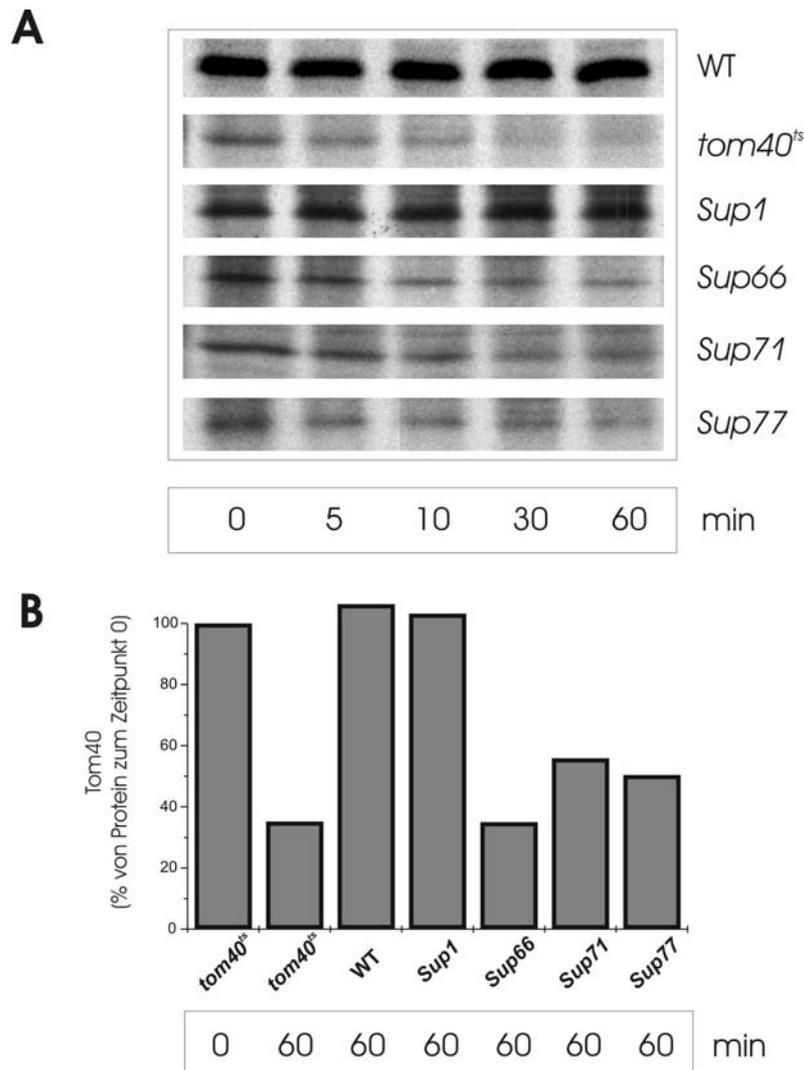


Abb. 32 Pulsmarkierungs-Experimente mit nachfolgender Immunpräzipitation in Wildtyp-, *tom40^{ts}*- und Suppressor-Stämmen. **A:** Zellen der Stämme wurden *in vivo* – wie in 2.4.9 beschrieben – radioaktiv markiert, die Translation gestoppt, der Ansatz bei 37°C weiterinkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen. Durch Immunfällung mit einem Antiserum gegen Tom40 konnte nach SDS-PAGE und Autoradiographie die Stabilität von Tom40 in den verschiedenen Stämmen bestimmt werden. **B:** Die Quantifizierung der erhaltenen Ergebnisse ist in B gezeigt. Die zum Zeitpunkt 0 in den Zellen vorhandene Menge Tom40 wurde als 100% gesetzt. Angegeben sind die Zeitpunkte 0 min und 60 min für *tom40^{ts}*. Für den Wildtyp-Stamm und die Suppressoren ist der Zeitpunkt 60 min gezeigt.

4 Diskussion

4.1 Proteolyse eines polytopischen Proteins in der mitochondrialen Innenmembran

In der vorliegenden Arbeit wurde das polytopische, die mitochondriale Innenmembran mehrmals durchspannende Protein Oxa1 als Substrat untersucht. Während endogenes sowie in Mitochondrien importiertes Oxa1 stabil bleibt, führt eine Punktmutation in *OXA1* zu einer Destabilisierung und zum vollständigen Abbau des Proteins Oxa1^{ts}. Zu einem geringen Anteil entsteht ein ca. 14 kDa großes, C-terminales Fragment von Oxa1^{ts}, das der C-terminalen Domäne in der Matrix entspricht.

Die Proteolyse von Oxa1^{ts} wird durch die *m*-AAA-Protease vermittelt, die *i*-AAA-Protease ist allerdings nicht beteiligt. Nachdem für den Abbau von Yme2 und Yme2-Derivaten bekannt ist, dass beide AAA-Proteasen überlappende Substratspezifität aufweisen, ist dieses Ergebnis überraschend. Die Topologie von Oxa1^{ts} lässt jedenfalls den Abbau durch beide AAA-Proteasen möglich erscheinen. Außerdem ist die Mutation L240S in einer Schleife lokalisiert, die sich im Intermembranraum befindet. Vermutlich führt die Mutation jedoch zu einer allgemeinen Konformationsänderung des Proteins. Warum die *i*-AAA-Protease nicht am Abbau von Oxa1^{ts} beteiligt ist, ist unklar. Vielleicht ist die im Intermembranraum lokalisierte N-terminale Domäne stabil gefaltet und die Schleifen, die in den Intermembranraum ragen, zu kurz, um von der *i*-AAA-Protease erkannt zu werden.

In Abwesenheit der *m*-AAA-Protease ist das Volllängenprotein Oxa1^{ts} nicht vollständig stabilisiert und es entstehen Proteolyse-Fragmente von Oxa1^{ts}. Aus dieser Beobachtung muss geschlossen werden, dass eine oder mehrere weitere proteolytische Aktivitäten am Abbau des Modellproteins beteiligt sind. Die Untersuchung der Fragmentbildung charakterisierte diese als ATP-unabhängig, aber abhängig von der Anwesenheit von Metallionen. Nachdem N- und C-terminale Fragmente verschiedener Größe nachgewiesen werden können, liegen definierte, endoproteolytische Spaltungen von Oxa1^{ts} im Stamm *oxa1^{ts}Δyta10* vor.

Der Aminosäureaustausch L240S von Oxa1^{ts} befindet sich zwar im Intermembranraum, dennoch ist die endoproteolytische Spaltung des Modellproteins in Fragmente mit größerer Wahrscheinlichkeit in der Matrix anzunehmen. Zum einen weist eine Chelatierung von

Metallionen durch EDTA allein, das nicht in die mitochondriale Matrix gelangen kann, eine geringere Stabilisierung von Oxa1^{ts} auf als eine zusätzliche Hemmung der Metalloprotease(n) durch membrangängiges *o*-Phenanthrolin (nicht gezeigt). Zum anderen zeigt ein Abbau von Oxa1^{ts} in durch osmotisches Schwellen hergestellten Mitoplasten, denen vermutlich alle Komponenten des Intermembranraumes fehlen, dieselbe Fragmentbildung (nicht gezeigt). Sicherheit über den Wirkort der Metalloprotease kann jedoch nur eine Analyse der Position der Schnittstellen, an denen Oxa1^{ts} zu Fragmenten geschnitten wird, geben. Eine Isolierung der Fragmente zur Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Eine Hemmung der Metalloprotease-Aktivität in *oxa1^{ts}Δyta10*-Mitochondrien führt zur Akkumulation von zwei anderen Fragmenten als in Abwesenheit von EDTA und *o*-Phenanthrolin und weist damit außerdem auf eine weitere proteolytische Aktivität hin.

Aufgrund der Hemmung des Abbaus von Oxa1^{ts} durch die Zugabe von Komplexbildnern für Metallionen wurde nach Kandidatenproteinen für Metalloproteasen gesucht. Als mitochondriale Oligopeptidase ist bisher nur MOP bekannt (Serizawa *et al.*, 1995). Ein Homolog dazu in *S. cerevisiae* ist die Metalloprotease Prd1, die zu 5% im mitochondrialen Intermembranraum aktiv ist (Büchler *et al.*, 1994; Garcia-Alvarez *et al.*, 1987). Außerdem wurden in einer Datenbanksuche die offenen Leserahmen YDR430C und YER078C identifiziert, deren Translationsprodukte vermutlich in Mitochondrien lokalisiert sind und ein vorhergesagtes Zink-Bindungs-Motif aufweisen. Eine Deletion der vermuteten Oligopeptidasen im Stamm *oxa1^{ts}Δyta10* zeigte jedoch dieselbe Bildung der Oxa1^{ts}-Fragmente (nicht gezeigt). Für *PNT1*, das in einer Durchmusterung für Exportdefizienz aus der Matrix identifiziert wurde (He und Fox, 1999), konnte in einer Datenbanksuche eine Motivsequenz für eukaryontische Cystein-Proteasen gefunden werden. Die Identifizierung in der Durchmusterung kann auch auf eine proteolytische Funktion hinweisen, indem Mutationen in *PNT1* den Abbau von Cox2 verhindern und damit einen positiven Klon ergeben. Eine Deletion von *PNT1* in *oxa1^{ts}Δyta10* zeigt jedoch dasselbe Akkumulationsmuster der Oxa1^{ts}-Fragmente.

Das Zusammenspiel der *m*-AAA-Protease, der Metalloprotease und der weiteren proteolytischen Komponente ist aufgrund der bisherigen Daten unklar. Es ist möglich, dass die endoproteolytische Spaltung durch die nicht identifizierte Protease die Voraussetzung für den Abbau der Fragmente durch die *m*-AAA-Protease bildet. Allerdings kann es auch sein, dass die *m*-AAA-Protease normalerweise Oxa1^{ts} prozessiv abbaut und dass nur bei deren

Abwesenheit die nicht identifizierte Metalloprotease Oxa1^{ts} schneidet. Bei einer zusätzlichen Hemmung könnte dann die weitere proteolytische Aktivität wirksam werden. Damit wäre eine Art Ersatzsystem gegeben, das nur partielle Proteolyse ermöglicht.

Der Abbau von polytopischen Membranproteinen durch AAA-Proteasen wurde auch in anderen Systemen untersucht. Eine Kooperation verschiedener Proteasen wurde in Chloroplasten von *A. thaliana* festgestellt. Beim Abbau des D1-Proteins führt die Protease DegP2 eine initiale Spaltung durch, bevor FtsH den Abbau eines somit gebildeten Fragmentes vermitteln kann (Hausühl *et al.*, 2001). Das zu den mitochondrialen AAA-Proteasen homologe FtsH in *E. coli* ist am Abbau von polytopischen Membranproteinen beteiligt. Die die Plasmamembran mehrfach durchspannenden Proteine SecY (Kihara *et al.*, 1995) und YccA (Kihara *et al.*, 1999) werden bis zu einer fusionierten, gefalteten PhoA-Domäne abgebaut. Dabei transferiert FtsH die Membranregionen vermutlich konsekutiv aus der hydrophoben Membran (Kihara *et al.*, 1998).

4.2 Dislokation von Proteinen der mitochondrialen Innenmembran durch AAA-Proteasen

Die Transmembranregionen von in der Membran verankerten Proteinen sowie von polytopischen Proteinen müssen zum Abbau aus der Membran herausgelöst werden. Untersuchungen an bakteriellem FtsH (Kihara *et al.*, 1998; Kihara *et al.*, 1999) und an mitochondrialen AAA-Proteasen (Leonhard *et al.*, 2000) zeigen in der Tat, dass Membranteile sowie ganze lösliche Domänen aus bzw. durch die Membran transferiert werden können. Die AAA-Proteasen könnten durch eine ATP-abhängige Konformationsänderung eine Zugkraft entwickeln, die entfaltete Domänen der gegenüberliegenden Membranseite durch die Lipid-Doppelschicht ziehen kann (Leonhard *et al.*, 2000). Die mitochondriale Innenmembran muss dazu aber Protein-Faktoren bergen, die einen Übergang von Peptidketten aus der lipophilen Umgebung der Membran in eine hydrophile erlauben. Dazu wurde eine mögliche Funktion verschiedener Proteintranslokasen in der Innenmembran untersucht.

Die TIM17/23-Translokase vermittelt den Import vieler kernkodierter Proteine mit mitochondrialer Zielsequenz in Matrix und Innenmembran (Neupert, 1997). Eine Rolle der

TIM17/23-Pore bei der Dislokation von Innenmembranproteinen während der Proteolyse konnte durch die gezeigten Experimente ausgeschlossen werden.

Oxa1, ein Homolog zum *E. coli* YidC (Luirink *et al.*, 2001; Sääf *et al.*, 1998; Samuelson *et al.*, 2000; Scotti *et al.*, 2000), bildet vermutlich eine Translokase. Obwohl eine Interaktion von Oxa1 mit abzubauenen Proteinen durch chemische Quervernetzung festgestellt wurde, konnte keine essentielle Funktion dieser Translokase während der Proteolyse verschiedener Innenmembran-Proteine nachgewiesen werden. Umgekehrt führte auch eine Überexpression von Oxa1 zu keiner Beschleunigung der Proteolyse verschiedener Substrate (nicht gezeigt). Der Abbau von Oxa1^{ts} in der Δ oxa1-Mutante ist leicht gehemmt, daher ist Oxa1 nicht nur an seiner eigenen Insertion, sondern vielleicht auch an seiner Proteolyse beteiligt.

Mba1, Cox18 und Pnt1 stellen Komponenten dar, die eine Rolle für die Insertion von kernkodierten und mitochondrial kodierten Proteinen spielen (He und Fox, 1999; Preuss *et al.*, 2001; Rep und Grivell, 1996; Rep *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2000). Diese wurden auf ihre Beteiligung an proteolytischen Prozessen untersucht. *MBA1* wurde, wie *OXAI*, als Suppressor der *YTA10*-Deletion nach Überexpression identifiziert (Rep *et al.*, 1996). Die Deletion von *MBA1* zeigte eine Verlangsamung des Abbaus einiger Membranproteine. Mba1 hat keine essentielle Bedeutung für eine Translokation während der Proteolyse. Bei der Insertion von Innenmembranproteinen weist Mba1 eine partielle, überlappende Substratspezifität mit Oxa1 auf (Preuss *et al.*, 2001). Darüber hinaus zeigt der synthetische Defekt der Doppelmutante Δ oxa1 Δ mba1 parallele Aktivitäten der beiden Proteine, deren Hemmung eine deutliche Störung der Biogenese zur Folge hat (Preuss *et al.*, 2001). Dabei wirkt Mba1 vermutlich als Rezeptor an der Matrixseite der Innenmembran (Preuss *et al.*, 2001). Eine derartige Funktion könnte auch die Störung der Proteolyse in Abwesenheit von Mba1 erklären. Im Stamm Δ mba1 werden Yme2-Derivate, die Substrate von nur jeweils einer der beiden AAA-Proteasen sind, verlangsamt abgebaut. Insbesondere zeigt das Konstrukt, das von der *i*-AAA-Protease abgebaut wird, dass der beobachtete Effekt nicht die Insertion, sondern die Proteolyse betrifft. Denn es ist im Intermembranraum lokalisiert, während Mba1 – membrangebunden – in der Matrix aktiv ist. Der schwache Effekt von Δ mba1 kann auf eine Hilfsfunktion bei der Proteolyse von Membranproteinen hinweisen, z. B. durch Chaperonaktivität oder als Rezeptor für Substrate.

Der synthetische Proteolysedefekt von $\Delta oxal1$ und $oxal1^{ts}$ mit der Deletion von *PNT1* ist besonders markant, da die Einzelmutante $\Delta pnt1$ keinerlei Effekt auf den Abbau von Proteinen erkennen lässt. Pnt1 ist in der Innenmembran verankert, mit einer Lokalisierung der löslichen terminalen Domänen in der Matrix. Das Motiv der aktiven Region einer Cystein-Protease lässt die Spekulation über eine proteolytische Funktion in Abwesenheit von Oxa1 zu. Vielleicht kann Pnt1 Substrate hydrolysieren, die ansonsten über die OXA1-Pore für die AAA-Protease(n) zugänglich sind. Es ist auch denkbar, dass Pnt1 eine Chaperon-Funktion bei der Präsentation für die *m*-AAA-Protease ausübt, die in Abwesenheit der OXA1-Pore essentiell ist. Da der Abbaufekt jedoch nur das polytopische Substrat Oxa1^{ts} betrifft, bleibt es vorerst fraglich, ob die experimentelle Beobachtung einen Effekt auf die Insertion oder die Proteolyse zeigt. Der Unterschied im Wachstum von $\Delta oxal1\Delta pnt1$ und $\Delta oxal1\Delta mba1$ deutet jedenfalls auf verschiedene molekulare Funktionen von Pnt1 und Mba1 hin.

Eine Extraktion mitochondrialer Innenmembranproteine während der Proteolyse ist in Analogie zur retrograden Dislokation von Substraten beim ER-Abbau zu sehen (vgl. Abb. 2). Die im ER-Abbau untersuchten Substrate werden durch die Sec61-Translokase retrograd ins Cytosol geschleust. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Translokase identifiziert werden, die für die Proteolyse essentiell ist. Dies kann folgende Gründe haben: i) Entweder ist das System der Extraktion von Proteinen durch die Membran redundant, so dass bei Inaktivierung einer oder mehrerer Translokasen weitere Poren funktionell sein können. ii) Zum zweiten ist es möglich, dass die Transmembranregionen der AAA-Proteasen eine Pore bilden, durch die Substrate gezogen werden können. Eine Dislokation durch die AAA-Protease FtsH wurde für den Abbau eines Membranproteins in der periplasmatischen Membran in *E. coli* vorgeschlagen (Kihara *et al.*, 1999). Die Funktion der Membranregion kann jedoch auch auf eine Verankerung der Protease in der Membran beschränkt sein. Zwar ist die Transmembranregion von FtsH wichtig für die Funktion der AAA-Protease, denn eine Substitution der Membran-Domäne durch die des Proteins EnvZ mit vergleichbarer Topologie komplementiert den Phänotyp der *ftsH1*-Mutation nicht (Akiyama *et al.*, 1995). Dabei ist es aber wahrscheinlicher, dass der Membrananker von FtsH v.a. zur Oligomerisierung des Protease-Komplexes nötig ist (Makino *et al.*, 1997). Neuere Studien weisen jedoch durch Substitutionen der Transmembranregion von FtsH auf eine Funktion der Transmembranbereiche zur Oligomerisierung des Komplexes hin sowie auf eine Verankerung in der Membran, wodurch eine Dislokation von Substraten ermöglicht wird (Akiyama und Ito,

2000; Akiyama und Ito, 2001). iii) Schließlich ist nicht ganz auszuschließen, dass die Zugkraft der AAA-Protease so stark ist, dass eine ausgesprochene Dislokationspore nicht nötig ist. Dann würde eine Proteinumgebung unspezifischer Natur genügen, um den Transfer einer Polypeptidkette zu erlauben. Die Proteolyse eines membranverankerten Proteins mit einer cytosolischen Domäne, Ubc6, wurde kürzlich als unabhängig von Sec61 beschrieben (Walter *et al.*, 2001). Jedoch handelt es sich hierbei um ein sogenanntes „tail-anchored“ Protein, während in der mitochondrialen Innenmembran zum einen ein polytopisches Membranprotein abgebaut wird, zum anderen ganze lösliche Domänen durch die Membran gezogen werden können.

4.3 Proteolyse in der mitochondrialen Außenmembran

Frühe Arbeiten weisen darauf hin, dass Proteine der Außenmembran, der Innenmembran und der Matrix unabhängig von Autophagozytose abgebaut werden können und unterschiedlichen Proteolyseraten unterliegen (Burgess *et al.*, 1978; Dice und Goldberg, 1975; Lipsky und Pedersen, 1981; Russel *et al.*, 1980; Walker *et al.*, 1978). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Außenmembran der Mitochondrien in der Tat ein eigenständiges proteolytisches System enthält, das offenbar spezifisch den Abbau nicht-nativer Proteine vermittelt.

Im ER werden Proteine, die durch die Qualitätskontrolle ausgemustert wurden, zur Sec61-Translokationspore transportiert, polyubiquitiniert und retrograd durch die Sec61-Pore transloziert („ER-degradation“). Auf der cytosolischen Seite werden abzubauen Proteine von membranassoziierten Proteasomen erkannt, deubiquitiniert und hydrolysiert (Plempner und Wolf, 1999). Mutante Formen von Sec61 unterliegen diesem Abbauweg, des weiteren einige lösliche und Membran-Proteine des ER, die speziell erkannt und an die Translokationspore geführt werden müssen. Wie in Abb. 2 für die mitochondriale Innenmembran dargestellt, ist auch ein analoges Modell der Dislokation von Membranproteinen der mitochondrialen Außenmembran durchaus denkbar. Überdies wird durch indirekte Ergebnisse aus verschiedenen Studien das Ubiquitin-Proteasom-System zunehmend mit mitochondrialen Funktionen in Verbindung gebracht.

Die folgenden Befunde geben (indirekte) Hinweise auf Ubiquitinierung von Mitochondrien:

1. Frühe *in vitro*-Experimente in Retikulozyten zeigten, dass der Abbau mitochondrialer Proteine von ATP-Hydrolyse und der Anwesenheit von Ubiquitin abhängig ist (Dubiel *et al.*, 1986; Rapoport *et al.*, 1985).
2. Die Insertion von *in vitro* synthetisierter Monoamino-Oxidase B in die Außenmembran von Rattenleber-Mitochondrien wird durch die Formierung von Ubiquitin-Konjugaten unterstützt. Eine verringerte Membraninsertion nach Depletion von Ubiquitin konnte durch Zugabe von Wildtyp- nicht aber mutantern Ubiquitin wieder erhöht werden (Zhuang und McCauley, 1989).
3. Durch Immunogold-Markierung von Rattenhirnzellen konnten Ubiquitin-Konjugate mit ER und Mitochondrien ko-lokalisiert werden (Magnani *et al.*, 1991). Experimente mit gereinigter Hexokinase in Hasen zeigten allerdings, dass nur die lösliche Form, Ib, nicht aber die mitochondrial gebundene Form, Ia, vom Ubiquitin-System erkannt und folglich abgebaut wird (Magnani *et al.*, 1994; Magnani *et al.*, 1987).
4. Die morphologischen und Funktionsdefekte von Mitochondrien der *YME1*-Deletionsmutante werden durch eine Mutation im Gen *YNT1/RPT3* kompensiert (Campbell *et al.*, 1994). *YNT1* kodiert für eine ATPase-Untereinheit des 19S regulatorischen Komplexes des Proteasoms.
5. Eine Mutation in *RPN11/MPRI* (in Kap. 3.2.1.6 beschrieben), einer weiteren Untereinheit des regulatorischen Komplexes, verändert die mitochondriale Morphologie und verursacht eine Erhöhung der mitochondrialen DNA-Menge (Rinaldi *et al.*, 1998).
6. Überexpression einer mutanten Variante von Ubiquitin, K63R-Ubiquitin, führt zu Veränderungen der mitochondrialen Morphologie und Verteilung in *S. cerevisiae*, Überexpression von Wildtyp-Ubiquitin nicht (Fisk und Yaffe, 1999).
7. Die Aktivität der Ubiquitin-Ligase Rsp5 ist essentiell für mitochondriale Vererbung in Hefe, eine Überexpression von Ubiquitin hebt den Defekt in Δ *rsp5*-Zellen jedoch auf (Fisk und Yaffe, 1999). Vermutlich ist der Effekt von Rsp5 jedoch indirekt, da die Ubiquitin-Ligase-Aktivität über den Weg des RUP („regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing“) zu einem Mangel an ungesättigten Fettsäureresten in der Zelle führt (Hoppe *et al.*, 2000), was auf indirektem Weg eine Verteilung von Mitochondrien zu Tochter-Zellen verhindern kann.
8. Eine Studie mit Säugerspermien zeigt Ubiquitinierung von Spermien-Mitochondrien bis zum Vier bis Acht-Zellstadium. Ab dann sind die Spermien-Mitochondrien selber nicht mehr zu detektieren sind. Ubiquitinierung von Mitochondrien könnte als Signal für die Zerstörung der Mitochondrien von Spermien nach der Befruchtung der Eizelle gelten, um eine streng maternale Vererbung von Mitochondrien zu gewährleisten (Sutovsky *et al.*, 1999).
8. Der Wachstumsdefekt von Δ *rpm2*-Zellen auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle mit

unbekannter molekularer Grundlage kann durch Mutationen aufgehoben werden, die die Aktivität des 26S-Proteasoms betreffen (Lutz *et al.*, 2000). *RPM2* kodiert für ein mitochondriales Enzym, das tRNA prozessiert (Dang und Martin, 1993; Morales *et al.*, 1992). Offensichtlich stellt eine verminderte Funktion des Proteasoms Ressourcen zur Verfügung, die in Abwesenheit von Rpm2 notwendig sind. Dies kann durch Regulation von Proteinsynthese oder auch durch Proteinumsatz geschehen und könnte eine Verbindung zwischen der Funktion von Proteasomen mit der von Mitochondrien darstellen (Lutz *et al.*, 2000). 9. Bei einer Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf mitochondrialen Proteinimport in Säugerzellen wurde bei einer Hemmung der Proteasomaktivität mit Lactacystin eine Erhöhung der Proteinmenge von mitochondrialen Vorstufenproteinen, eine Erhöhung der Proteinmenge an Tom20 und eine veränderte Lokalisierung von Mitochondrien innerhalb der Zelle beobachtet (Wright *et al.*, 2001). Jedoch konnte in dieser Arbeit keine Ubiquitinierung von Vorläuferproteinen gezeigt werden.

Aufgrund der möglichen Verbindung zwischen Proteolyse in Mitochondrien und dem Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg wurde in der vorliegenden Arbeit eine Rolle des 26S-Proteasoms beim Abbau von mitochondrialen Außenmembranproteinen untersucht. Dazu wurden zwei Modellproteine der Außenmembran mit unterschiedlicher Topologie verwendet. Wie aus Studien der mitochondrialen Innenmembran bekannt, ist die Topologie von Substratproteinen entscheidend für die Erkennung und den Abbau durch verschiedene Proteasen. Daher wurden zum einen das membranverankerte Protein HA-DHFR^{WT}-Tom6 mit einer cytosolischen Domäne, zum anderen das polytopische Tom40^{ts} untersucht.

HA-DHFR^{WT}-Tom6 ist in der mitochondrialen Außenmembran inseriert und exponiert die DHFR- und die N-terminale Tom6-Domäne in das Cytosol. Die DHFR-Domäne ist entfaltet, weshalb dieses Hybridprotein mit einer vergleichbaren Kinetik wie das Konstrukt mit der entfalteten Version, HA-DHFR^{MUT}-Tom6, abgebaut wird. Das Fusionsprotein HA-DHFR^{WT}-Tom6 ist zumindest zum Teil in den Tom-Komplex assembliert, was auch die Suppression des temperatursensitiven Phänotyps von *tom40^{ts}* (*isp42*; Cao und Douglas, 1995) erklärt. Proteolyse des Modellproteins erfolgte nur *in vivo*, während das Protein in isolierten Mitochondrien völlig stabil ist. Der Abbau *in vivo* konnte durch Natrium-Azid und CCCP gehemmt werden, was auf eine ATP-Abhängigkeit der Proteolyse hinweist. In sämtlichen untersuchten Proteasom-Mutanten (*pre1-1*, *pre1-1pre4-1*, *pre1-1pre2-1*, *mpr1-1*) konnte *in vivo* keine signifikante Stabilisierung des Substrates beobachtet werden. Selbst in der Mutante

mit den stärksten bekannten Effekten auf den Abbau cytosolischer Proteine (Ramos *et al.*, 1998), der Deletion eines Assemblierungsfaktors für Proteasom-Untereinheiten, $\Delta ump1$, konnte kein signifikanter Unterschied zum isogenen Wildtyp-Stamm detektiert werden. Unter den reproduzierten Bedingungen für eine Akkumulation von Poly-Ubiquitin-Konjugaten in der Mutante einer regulatorischen Proteasom-Untereinheit, *mpr1-1*, konnte keine Ubiquitinierung von HA-DHFR^{WT}-Tom6 festgestellt werden.

Mit Tom40^{ts} wurde ein polytopisches, die Außenmembran mehrmals durchspannendes Substrat ohne lösliche Domäne untersucht. Dieses trägt zehn Aminosäure-Austausche im Vergleich zum Tom40-Protein und wird mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten abgebaut. Mit dem Ausgangsstamm Tom40^{ts} und dem Aufbau der genetischen Durchmusterung konnte ein Suppressor isoliert und beschrieben werden, der eine Rückmutation zum Wildtyp-Gen, *TOM40*, an einem für die Assemblierung von Tom40 in den TOM-Komplex essentiellen Bereich aufweist. Die Revertante *Sup1* zeigt, dass die genetische Durchmusterung so aufgebaut war, dass grundsätzlich Suppressoren mit stabilem Tom40^{ts} gefunden werden können. Jedoch ergab die genetische Durchmusterung keinen eindeutigen Faktor, der die Proteolyse von Tom40^{ts} vermittelt. Daher war eine Transformation einer dieser Suppressor-Stämme mit einer Library hinfällig, da sie die Isolierung eines Faktors, der am Proteolysesystem der mitochondrialen Außenmembran beteiligt ist, nicht erlaubte. Der Erfolg der Durchmusterung basierte auf der Annahme, dass der Wachstumsdefekt der *tom40^{ts}*-Mutante mit dem Abbau von Tom40^{ts} korreliert. Es ist möglich, dass eine minimale Erhöhung der Menge an Tom40^{ts} – in den Analysen der Westernblot- und Pulsmarkierungs-Experimente nicht zu detektieren – das Zellwachstum wieder vollständig herstellt. Eine andere Möglichkeit ist, dass keine Korrelation zwischen der Proteolyse von Tom40^{ts} und dem Wachstumsphänotyp herrscht. Die Suppressoren hätten dann einen vom Tom40^{ts}-Abbau unabhängigen molekularen Charakter. Dagegen spricht allerdings die komplette Stabilisierung von Tom40^{ts} in dem Suppressor *Sup1*, die auch den Wachstumsdefekt vollständig aufhebt. Als weitere Möglichkeit bleibt, dass ein redundantes System vorliegt. Ist ein Faktor oder Abbauweg durch eine Mutation gehemmt, kann die Proteolyse von einem anderen proteolytischen System übernommen werden. Außerdem ist die Rolle einer essentiellen Protease für den Abbau von Tom40^{ts} denkbar. Allerdings waren die gewählten Mutagenese-Bedingungen so gewählt, dass Punktmutationen statt einer kompletten Inaktivierung einer Protease zu erwarten sind, um auch eventuelle essentielle Faktoren in der Durchmusterung zu

identifizieren. Mit einer ähnlichen Durchmusterung wurde mittels der Mutante *sec61*, die eine strukturveränderte Sec61-Translokationspore der ER-Membran aufweist, das Gen *UBC6* gefunden, das für ein Ubiquitin-Konjugations-Enzym kodiert (Sommer und Jentsch, 1993). Ubc6 ist mit Sec61 assoziiert und vermittelt die Ubiquitinierung des mutierten Sec61, um es abzubauen. In Abwesenheit des Ubiquitin-Konjugations-Faktors wird mutiertes Sec61 nicht dem Proteasom-Abbauweg zugeführt und bleibt dadurch weiter, zumindest teilweise funktionell.

Über beide experimentellen Ansätze – die Charakterisierung des Abbaus eines spezifischen, membranverankerten Substrates wie HA-DHFR^{WT}-Tom6 und der genetischen Durchmusterung mit dem polytopischen Protein Tom40^{ts} – konnte kein proteolytischer Faktor gefunden werden. Die Beteiligung weiterer Kandidaten-Proteine wurde ebenfalls ausgeschlossen: Eine Deletion der Proteinase A (*Δpep4*) zeigte keine Stabilisierung von HA-DHFR^{WT}-Tom6, weshalb eine mögliche Rolle des vakuolären Systems für dieses Fusionsprotein ausgeschlossen ist. Auch die mitochondriale *i*-AAA-Protease hatte keinen Einfluss auf die Proteolyse des Modellproteins. Des Weiteren wurde der Abbau von Tom40^{ts} auch in den Proteasom-Mutanten nicht beeinflusst (nicht gezeigt).

Eine Ubiquitinierung und ein Proteasom-vermittelter Abbau von mitochondrialen Außenmembranproteinen kann aber auch nicht ganz ausgeschlossen werden. Da das Proteasom essentiell ist, führen alle Mutationen zu einer Beeinträchtigung der Proteasomen-Aktivität, aber nicht zu kompletter Inaktivierung. Eine Restaktivität des Proteasoms ist daher immer gegeben. Trotzdem ist es unwahrscheinlich, dass diese Aktivität genügt, um einen mit dem Wildtyp-Stamm vergleichbaren Abbau von HA-DHFR^{WT}-Tom6 zu vermitteln, da die Mutationen starke Effekte auf andere vom Proteasom abhängige Prozesse hat. Darüber hinaus kann das Ubiquitin-Proteasom-System eine hohe Substratspezifität für mitochondriale Außenmembranproteine aufweisen, so dass andere Substrate außer den hier untersuchten einer Proteasom-vermittelten Proteolyse unterliegen. Da jedoch zwei Modellproteine unterschiedlicher Topologie untersucht wurden, ist diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich. Vielleicht ist die DHFR-Domäne von HA-DHFR^{WT}-Tom6 kein Zielprotein für Ubiquitinierung. Cytosolische DHFR mit einem N-terminalen Arginin-Rest wird jedoch von Proteasomen abgebaut (Johnston *et al.*, 1995). Des Weiteren kann der Proteolyse von mitochondrialen Außenmembranproteinen ein redundantes System zugrunde liegen. Eine Kombination aus der *Δpep4*-Mutante und den Proteasom-Mutanten konnte allerdings eine

Redundanz dieser beiden Proteolysewege für das Fusionsprotein HA-DHFR^{WT}-Tom6 ausschließen. Schließlich ist es denkbar, dass für Proteolyse in der mitochondrialen Außenmembran ein eigenes proteolytisches System existiert. Die bisherigen Befunde für eine Verbindung des Ubiquitin-Proteasom-Abbauweges und mitochondrialer Proteolyse sind jedenfalls nur indirekter Natur. Vielleicht stellt die oben erwähnte Störung im Fettsäurestoffwechsel durch eine Inaktivierung des RUP („regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing“) eine Erklärung für die Mehrzahl der indirekten Hinweise auf eine Beteiligung von Proteasomen an der Proteolyse von mitochondrialen Proteinen dar.

Für das untersuchte Außenmembranprotein HA-DHFR^{WT}-Tom6 konnte eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems ausgeschlossen werden. Folgende Ansätze könnten zur weiteren Klärung des Außenmembranabbaus verfolgt werden. Um zu klären, ob andere mitochondriale Außenmembranproteine vom Ubiquitin-Proteasom-Abbau betroffen sind, sollten Ubiquitin-Konjugate in mitochondrialen Fraktionen nachgewiesen werden können. In Zellfraktionierungsexperimenten, die Mitochondrien, ER-Fraktion und Außenmembranvesikel voneinander trennten, konnten keine Hinweise auf Ubiquitinierung von mitochondrialen Proteinen erhalten werden (nicht gezeigt). Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ist die proteolytische Aktivität für den Abbau von mitochondrialen Außenmembranproteinen im Cytosol lokalisiert. Zugabe von isoliertem Cytosol zu isolierten Mitochondrien war in den durchgeführten Experimenten bisher nicht erfolgreich. Zur Charakterisierung durch Proteaseinhibitoren wurden zellwandfreie Hefezellen, Sphäroplasten, hergestellt (nicht gezeigt). Das Fusionsprotein wurde nicht mehr abgebaut, weshalb Tests mit Inhibitoren nicht möglich waren. Eine ausführliche Untersuchung der cytosolischen Fraktion könnte zur Charakterisierung der Proteolyseaktivität beitragen. Der Ansatz einer genetischen Durchmusterung ermöglicht, einen proteolytischen Faktor unabhängig von dessen subzellulärer Lokalisierung zu identifizieren. Die Topologie von Proteinen hat eine große Bedeutung für eine substratspezifische Erkennung und Proteolyse durch Proteasen. Daher kann eine genetische Durchmusterung mit z.B. einer temperatursensitiven Mutante von Tom70, das sich in seiner Topologie deutlich von Tom40 unterscheidet, möglicherweise zur Identifikation einer entsprechenden Protease führen.

5 Zusammenfassung

Proteolytische Prozesse spielen eine wichtige Rolle während der Biogenese von Mitochondrien und bei der Qualitätskontrolle mitochondrialer Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau von Proteinen in der Innen- und Außenmembran von Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* untersucht.

Ein erster Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Mechanismen der Proteolyse in der mitochondrialen Innenmembran. Dazu wurde der Abbau einer mutanten Variante des polytopischen Membranproteins Oxa1 verfolgt. Es zeigte sich, dass die *m*-AAA-Protease den Abbau von Oxa1^{ts} vermittelt, während keine Hinweise auf eine Beteiligung der *i*-AAA-Protease erhalten wurden. In Abwesenheit der *m*-AAA-Protease wird Oxa1^{ts} ebenfalls proteolytisch durch eine (oder mehrere) bislang nicht identifizierte Metallopeptidase(n) gespalten. Allerdings ist kein vollständiger Abbau von Oxa1^{ts} durch diese Peptidase(n) zu beobachten. Vielmehr akkumulieren proteolytische Intermediate in den Mitochondrien. Nach den vorliegenden Untersuchungen kann die endoproteolytische Aktivität der Metallopeptidase(n) entweder eine Voraussetzung für die Proteolyse durch die *m*-AAA-Protease sein oder aber einen Bestandteil eines molekularen Ersatzsystems zum Abbau von mitochondrialen Innenmembranproteinen in Abwesenheit der *m*-AAA-Protease darstellen.

Während der Proteolyse durch AAA-Proteasen wird eine Dislokation von Membranproteinen beobachtet. Daher wurde eine mögliche Beteiligung von Translokationsporen der Innenmembran an Abbauvorgängen untersucht. Eine Rolle der TIM17/23-Translokase konnte ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte auch für die OXA1-Pore keine essentielle Bedeutung für die Dislokation von Membranproteinen während der Proteolyse nachgewiesen werden. Eine Inaktivierung der Proteine Mba1 und Pnt1, die an Insertion von mitochondrialen Proteinen in die Innenmembran beteiligt sind, führte jedoch zu einer Beeinträchtigung von Abbauprozessen in der Innenmembran. Diese Befunde weisen auf eine Rezeptor- oder Chaperon-Funktion von Mba1 und Pnt1 während des Abbaus durch die AAA-Proteasen hin.

In einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde genetisch und biochemisch nach Komponenten gesucht, die den Abbau von Proteinen der mitochondrialen Außenmembran vermitteln. Ein Fusionsprotein, HA-DHFR^{WT}-Tom6, das eine lösliche entfaltete Domäne in

das Cytoplasma exponiert und im TOM-Komplex assembliert ist, wurde als Modellsubstrat verwendet. Während in isolierten Mitochondrien kein Abbau stattfindet, unterliegt das Protein *in vivo* deutlicher Proteolyse. Dieser Prozess wurde als ATP-abhängig charakterisiert. Eine Beteiligung des vakuolären Proteolyse-Systems, der *i*-AAA-Protease sowie des Ubiquitin-Proteasom-Abbauweges konnte unter den verwendeten experimentellen Bedingungen ausgeschlossen werden. Zur Identifizierung von Komponenten, die an der Proteolyse von Außenmembranproteinen beteiligt sind, wurde eine genetische Durchmusterung durchgeführt. Eine temperatursensitive Mutante des essentiellen Außenmembranproteins Tom40, das unter nicht-permissiven Bedingungen rasch abgebaut wird, wurde verwendet, um nach stabilisierenden Mutanten zu suchen. Die identifizierten Mutanten unterdrückten zwar den Wachstumsdefekt, führten aber zu keiner Stabilisierung von Tom40^{ts}, weshalb keine am Abbau beteiligten Komponenten identifiziert werden konnten. Allerdings wurde durch die Isolierung eines Suppressors ein Bereich innerhalb des Proteins Tom40 beschrieben, der für die Assemblierung von Tom40 in den TOM-Komplex essentiell ist.

6 Literaturverzeichnis

- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W. and Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore or the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.*, **147**, 959-968.
- Akiyama, Y., Ehrmann, M., Kihara, A. and Ito, K. (1998) Polypeptide binding of *Escherichia coli* FtsH (HflB). *Mol. Microbiol.*, **28**, 803-812.
- Akiyama, Y. and Ito, K. (2000) Roles of multimerization and membrane association in the proteolytic functions of FtsH (HflB). *Embo J.*, **19**, 3888-95.
- Akiyama, Y. and Ito, K. (2001) Roles of homooligomerization and membrane association in atpase and proteolytic activities of ftsH in vitro. *Biochemistry*, **40**, 7687-93.
- Akiyama, Y., Yoshihisa, T. and Ito, K. (1995) FtsH, a membrane-bound ATPase, forms a complex in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23485-23490.
- Altamura, N., Capitanio, N., Bonnefoy, N., Papa, S. and Dujardin, G. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of the cytochrome c oxidase and the oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett.*, **382**, 111-115.
- 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.
- 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.
- Ausubel, F.J., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1992) *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M. and Ciechanover, A. (2000) Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane Protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 23491-23499.
- Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Michaelis, G. and Pratje, E. (1994) PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol Gen Genet*, **245**, 272-278.
- Baumeister, W. and Lupas, A. (1997) The proteasome. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **7**, 273-282.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367-80.
- Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A. and Hampton, R.Y. (2001) Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol*, **3**, 24-9.
- Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, **292**, 1552-1554.
- Beyer, A. (1997) Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.*, **6**, 2043-2058.
- Biederer, T., Volkwein, C. and Sommer, T. (1997) Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science*, **278**, 1806-1809.
- Blom, J., Kubrich, M., Rassow, J., Voos, W., Dekker, P.J., Maarse, A.C., Meijer, M. and Pfanner, N. (1993) The essential yeast protein MIM44 (encoded by MPI1) is involved in an early step of preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol*, **13**, 7364-71.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. and Huber, R. (1999) The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 295-317.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M. and Huber, R. (1997) Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6070-6074.

- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. and Huber, R. (2000) The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature*, **403**, 800-805.
- Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G. and G.R., F. (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol*, **154**, 164-175.
- Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Groudinsky, O., Minet, M., Slonimski, P.P. and Dujardin, G. (1994a) Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an *oxa1*-mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 11978-11982.
- Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Groudinsky, O., Minet, M., Slonimski, P.P. and Dujardin, G. (1994b) *OXAL1*, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J. Mol. Biol.*, **239**, 201-212.
- Bordallo, J., Plemper, R.K., Finger, A. and Wolf, D.H. (1998) Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol. Cell. Biology*, **9**, 209-222.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.-M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 221-226.
- Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1997) ER-associated and proteasome-mediated protein degradation: how two topologically restricted events came together. *Trends Cell Biol.*, **7**, 151-156.
- Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Cell and developmental biology*, **10**, 507-513.
- Bross, P., Andresen, B.S., Knudsen, I., Kruse, T.A. and Gregersen, N. (1995) Human ClpP protease: cDNA sequence, tissue-specific expression and chromosomal assignment of the gene. *FEBS Lett.*, **377**, 249-252.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B. and Goldstein, J.L. (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, **100**, 391-398.
- Büchler, M., Tisljar, U. and Wolf, D.H. (1994) Proteinase yscD (oligopeptidase yscD). Structure, function and relationship of the yeast enzyme with mammalian thimet oligopeptidase (metalloendopeptidase, EP 24.15). *Eur. J. Biochem.*, **219**, 627-639.
- Burgess, R.J., Walker, J.H. and Mayer, R.J. (1978) Choice of precursors for the measurement of protein turnover by the double-isotope method. Application to the study of mitochondrial proteins. *Biochem J*, **178**, 919-926.
- 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.
- Cao, W. and Douglas, M.G. (1995) Biogenesis of ISP6, a small carboxy-terminal anchored protein of the receptor complex of the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5674-5679.
- Casari, G., De-Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., DeMichele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., Durr, A., Fontaine, B. and Ballabio, A. (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*, **93**, 973-983.
- 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 Reports*, **1**, 47-52.
- Ciechanover, A. (1994) The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *Cell*, **79**, 13-21.
- Confalonieri, F. and Duguet, M. (1995) A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *BioEssays*, **17**, 639-650.

- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847.
- Crowther, R.A. and Goedert, M. (2000) Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *Journal of Structural Biology*, **130**, 271-279.
- Dai, R.M. and Li, C.C. (2001) Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol*, **3**, 740-4.
- Dang, Y.L. and Martin, N.C. (1993) Yeast mitochondrial RNase P. Sequence of the RPM2 gene and demonstration that its product is a protein subunit of the enzyme. *J Biol Chem*, **268**, 19791-6.
- Daum, G., Gasser, S.M. and Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13075-13080.
- De Sagarra, M.R., Mayo, I., Marco, S., Rodriguez-Vilarino, S., Oliva, J., Carrascosa, J.L. and Castano, J.G. (1999) Mitochondrial localization and oligomeric structure of HClpP, the human homologue of *E. coli* ClpP. *J Mol Biol*, **292**, 819-825.
- Dice, J.F. and Goldberg, A.L. (1975) Relationship between in vivo degradative rates and isoelectric points of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3893-3897.
- Dubiel, W., Müller, M. and Rapoport, S. (1986) Kinetics of ¹²⁵I-ubiquitin conjugation with and liberation from rabbit reticulocyte stroma. *FEBS Lett.*, **194**, 50-54.
- Eilers, M. and Schatz, G. (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature*, **322**, 228-232.
- El-Agnaf, O.M.A. and Irvine, G.B. (2000) Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from α -synuclein and related proteins. *Journal of Structural Biology*, **130**, 300-309.
- Ellgaard, L., Molinari, M. and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, **286**, 1882-1888.
- Endres, M., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J.*, **18**, 3214-3221.
- Enenkel, C., Lehmann, A. and Kloetzel, P.-M. (1998) Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO Journal*, **17**, 6144-6154.
- Fisk, H.A. and Yaffe, M.P. (1999) A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **145**, 1199-1208.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. and Lazarow, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application of endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **93**, 97-102.
- Galan, J.-M., Cantegrit, B., Garnier, C., Namy, O. and Haguener-Tsapis, R. (1998) 'ER degradation' of a mutant yeast plasma membrane protein by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J*, **12**, 315-323.
- Garcia-Alvarez, N., Teichert, U. and Wolf, D.H. (1987) Proteinase yscD mutants of yeast. Isolation and characterization. *Eur J Biochem*, **163**, 339-346.
- Gardner, R.G., Shearer, A.G. and Hampton, R.Y. (2001) In vivo action of the HRD ubiquitin ligase complex: mechanisms of endoplasmic reticulum quality control and sterol regulation. *Mol Cell Biol*, **21**, 4276-91.
- Gaume, B., Klaus, C., Ungermann, C., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *EMBO J*, **17**, 6497-6507.
- Gerlinger, U.M., Guckel, R., Hoffmann, M., Wolf, D.H. and Hilt, W. (1997) Yeast cycloheximide-resistant *crl* mutants are proteasome mutants defective in protein degradation. *Mol Biol Cell*, **8**, 2487-2499.
- Gietz, R.D. and Schiestl, R.H. (1995) Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **5**, 255-269.
- Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.*, **30**, 465-506.
- Gottesman, S., Maurizi, M.R. and Wickner, S. (1997a) Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell*, **91**, 435-438.

- Gottesman, S., Wickner, S. and Maurizi, M. (1997b) Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.*, **11**, 815-823.
- Gottesmann, S. (1999) Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 142-147.
- 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., 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**, 463-71.
- Guélin, E., Rep, M. and Grivell, L.A. (1994) Sequence of the *AFG3* gene encoding a new member of the FtsH/Yme1/Tma subfamily of the AAA-protein family. *Yeast*, **10**, 1389-1394.
- Guélin, E., Rep, M. and Grivell, L.A. (1996) Afg3p, a mitochondrial ATP-dependent metalloprotease, is involved in the degradation of mitochondrially-encoded Cox1, Cox3, Cob, Su6, Su8 and Su9 subunits of the inner membrane complexes III, IV and V. *FEBS Lett.*, **381**, 42-46.
- Guenther, B., Onrust, R., Sali, A., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1997) Crystal structure of the d' subunit of the clamp-loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell*, **91**, 335-345.
- Hampton, R.Y., Gardner, R.G. and Rine, J. (1996) Role of the 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 2029-2044.
- Haussühl, K., Andersson, B. and Adamska, I. (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J*, **20**, 713-722.
- 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.
- He, S. and Fox, T.D. (1999) Mutations affecting a yeast mitochondrial inner membrane protein, Pnt1p, block export of a mitochondrially synthesized fusion protein from the matrix. *Mol Cell Biol*, **19**, 6598-6607.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Möhrle, V., Mahe, Y. and Wolf, D.H. (1993) PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, **268**, 5115-5120.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. and Wolf, D.H. (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO Journal*, **10**, 555-562.
- 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., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2250-2255.
- Hell, K., Neupert, W. and Stuart, R.A. (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO Journal*, **20**, 1281-1288.
- Herrmann, J.M. and Neupert, W. (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 210-214.
- Herrmann, J.M., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J*, **16**, 2217-2226.
- Hicke, L. (1997) Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J.*, **11**, 1215-1225.
- Hicke, L. (1999) Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporter and channels. *Trends Cell Biol.*, **9**, 107-112.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 195-201.

- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A. (1986) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, **2**, 163-167.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature*, **395**, 516-521.
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M. and Wolf, D.H. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, **273**, 1725-1728.
- Hilt, W., Enenkel, C., Gruhler, A., Singer, T. and Wolf, D.H. (1993) The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem*, **268**, 3479-3486.
- Hilt, W. and Wolf, D. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 96-102.
- Hochstrasser, M., Johnson, P.R., Arendt, C.S., Amerik, A., Swaminathan, S., Swanson, R., Li, S.J., Laney, J., Pals-Rylaarsdam, R., Nowak, J. and Connerly, P.L. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-proteasome system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 1513-22.
- Hochuli, E. (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr*, **444**, 293-302.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D. and Jentsch, S. (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*, **102**, 577-586.
- Hoppe, T., Rape, M. and Jentsch, S. (2001) Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 344-8.
- Joazeiro, C.A. and Hunter, T. (2000) Biochemistry. Ubiquitination--more than two to tango. *Science*, **289**, 2061-2.
- Johnston, J.A., Johnson, E.S., Waller, P.R. and Varshavsky, A. (1995) Methotrexate inhibits proteolysis of dihydrofolate reductase by the N- end rule pathway. *J Biol Chem*, **270**, 8172-8.
- Juhola, M.K., Shah, Z.H., Grivell, L.A. and Jacobs, H.T. (2000) The mitochondrial inner membrane AAA metalloprotease family in metazoans. *FEBS Lett.*, **481**, 91-95.
- 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.
- Kassenbrock, C.K., Cao, W. and Douglas, M.G. (1993) Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex. *EMBO J.*, **12**, 3023-3034.
- 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. (1996) A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J.*, **15**, 6122-6131.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1997) Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage λ : Transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5544-5549.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1998) Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the

- interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA. *J. Mol. Biol.*, **279**, 175-188.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1999) Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J.*, **18**, 2970-2981.
- 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 Mitochondrial Inner Membrane of *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell*, **12**, 2858-69.
- Klionsky, D.J. and Emr, S.D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, **290**, 1717-1721.
- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K. and Wolf, D.H. (1996) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J.*, **15**, 753-763.
- Knop, M., Schiffer, H.H., Rupp, S. and Wolf, D.H. (1993) Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Op. Cell Biol.*, **5**, 990-996.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. and Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-644.
- Kohler, A., Bajorek, M., Groll, M., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H. and Finley, D. (2001a) The substrate translocation channel of the proteasome. *Biochimie*, **83**, 325-32.
- Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L. and Finley, D. (2001b) 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**, 1143-52.
- Kopito, R.R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell*, **88**, 427-430.
- Kopito, R.R. and Sitia, R. (2000) Aggresomes and Russel bodies. *EMBO reports*, **1**, 225-231.
- Kunau, W.H., Beyer, A., Franken, T., Gotte, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A. and Wiebel, F.F. (1993) Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. *Biochimie*, **75**, 209-224.
- Künkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, **93**, 1009-1019.
- Kyshe-Anderson, J. (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth*, **10**, 203-207.
- 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. *Biochem Soc Trans*, **29**, 431-6.
- Langer, T. and Neupert, W. (1996) Regulated protein degradation in mitochondria. *Experientia*, **52**, 1069-1076.
- Lawrence, C.W. (1991) Classical Mutagenesis Techniques. In Guthrie, C. and Frank, G.R. (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, Vol. 194, pp. 273-281.
- Lemaire, C., Hamel, P., Velours, J. and Dujardin, G. (2000) Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F₀-ATPase subunit accumulation in an *oxal* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23471-23475.
- Lenzen, C.U., Steinmann, D., Whiteheart, S.W. and Weis, W.I. (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell*, **94**, 525-536.
- Leonhard, K., 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.

- 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.
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A.B., Adam, Z. and Andersson, B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *The Plant Cell*, **12**, 419-431.
- Lipsky, N.G. and Pedersen, P.L. (1981) Protein turnover in animal cells: half-lives of mitochondria and mitochondrial subfractions of rat liver based on [¹⁴C] bicarbonate incorporation. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8652-8657.
- Liu, J., Smith, C.L., DeRyckere, D., DeAngelis, K., Martin, G.S. and Berger, J.M. (2000) Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol Cell*, **6**, 637-48.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995) Crystal Structure of the 20 S Proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å Resolution. *Science*, **268**, 533-539.
- Luirink, J., Samuelsson, T. and de Gier, J.-W. (2001) YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Letters*, **501**, 1-5.
- Lupas, A., Flanagan, J.M., Tamura, T. and Baumeister, W. (1997) Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 399-404.
- Lutz, M.S., Ellis, S.R. and Martin, N.C. (2000) Proteasome mutants, *pre4-2* and *ump1-2*, suppress the essential function but not the mitochondrial RNaseP function of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *RPM2*. *Genetics*, **154**, 1013-1023.
- Luzikow, V.N. (1999) Quality control: from molecules to organelles. *FEBS Letters*, **448**, 201-205.
- Magnani, M., Crinelli, R., Antonelli, A., Casabianca, A. and Serafini, G. (1994) The soluble but not mitochondrially bound hexokinase is a substrate for the ATP- and ubiquitin-dependent proteolytic system. *Biochim Biophys Acta*, **1206**, 180-190.
- Magnani, M., Serafini, G., Antonelli, A., Malatesta, M. and Gazzanelli, G. (1991) Evidence for a particulate location of ubiquitin conjugates and ubiquitin-conjugating enzymes in rabbit brain. *J. Biol. Chem.*, **266**, 21018-21024.
- Magnani, M., Stocchi, V., Chiarantini, L., Serafini, G. and Fornaini, G. (1987) Decay mechanisms of rabbit hexokinase during reticulocyte maturation. *Biomed Biochim Acta*, **46**, 162-166.
- Makino, S., Qu, J.N., Uemori, K., Ichikawa, H., Ogura, T. and Matsuzawa, H. (1997) A silent mutation in the *ftsH* gene of *Escherichia coli* that affects FtsH protein production and colicin tolerance. *Mol Gen Genet*, **254**, 578-583.
- Maurizi, M.R. (1987) Degradation *in vitro* of bacteriophage lambda N protein by Lon protease in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 2696-2703.
- Maurizi, M.R. (1998) Proteasome assembly: biting the hand... *Current Biology*, **8**, R453-R456.
- Mayer, T.U., Braun, T. and Jentsch, S. (1998) Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *EMBO J.*, **17**, 3251-3257.
- McKee, E.E. and Poyton, P. (1984) Mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Optimal conditions for protein synthesis in isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9320-9331.
- Meyer, W., Bauer, M. and Pratje, E. (1997) A mutation in cytochrome oxidase subunit 2 restores respiration of the mutant *pet ts1402*. *Curr Genet*, **31**, 401-407.
- Morales, M.J., Dang, Y.L., Lou, Y.C., Sulo, P. and Martin, N.C. (1992) A 105-kDa protein is required for yeast mitochondrial RNase P activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9875-9.
- Nakai, M., Endo, T., Hase, T. and Matsubara, H. (1993) Intramitochondrial protein sorting. *J Biol Chem*, **268**, 24262-24269.

- 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.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.*, **66**, 863-917.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. and Koonin, E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.*, **9**, 27-43.
- Nijtmans, L.G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P.J., Berden, J.A., Back, J.W., Muijsers, A.O., van der Spek, H. and Grivell, L.A. (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *Embo J*, **19**, 2444-51.
- Ogura, T., Inoue, K., Tatsuta, T., Suzaki, T., Karata, K., Young, K., Su, L.-H., Fierke, C.A., Jackman, J.E., Raetz, C.R.H., Coleman, J., Tomoyasu, T. and Matsuzawa, H. (1999) Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **31**, 833-844.
- Ogura, T. and Wilkinson, A.J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells*, **6**, 575-97.
- 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.
- Papa, F.R., Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (1999) Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 741-756.
- Patel, S. and Latterich, M. (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.*, **8**, 65-71.
- 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.
- Pfanner, N. (2000) Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr Biol*, **10**, R412-415.
- Pilon, M., Schekman, R. and Römisch, K. (1997) Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J.*, **16**, 4540-4548.
- Plempner, R.K., Böhmeler, S., J., B., Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*, 891-895.
- Plempner, R.K. and Wolf, D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 266-270.
- Preuss, M., Leonhard, K., Hell, K., Stuart, R.A., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2001) Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **153**, 1085-1095.
- Prusiner, S.B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, **278**, 245-251.
- Prusiner, S.B. (1998) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13363-13383.
- Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A. and Dohmen, R.J. (1998) Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell*, **92**, 489-499.
- Rapaport, D., Taylor, R.D., Käser, M., Langer, T., Neupert, W. and Nargang, F.E. (2001) Structural requirements of Tom40 for assembly into preexisting TOM complexes of mitochondria. *Mol Biol Cell*, **12**, 1189-1198.
- Rapoport, S., Dubiel, W. and Müller, M. (1985) Proteolysis of mitochondria in reticulocytes during maturation is ubiquitin-dependent and is accompanied by a high rate of ATP hydrolysis. *FEBS Lett.*, **180**, 249-252.

- Rep, M. and Grivell, L.A. (1996) *MBA1* encodes a mitochondrial membrane-associated protein required for biogenesis of the respiratory chain. *FEBS Lett.*, **388**, 185-188.
- Rep, M., Nooy, J., Guélin, E. and Grivell, L.A. (1996) Three genes for mitochondrial proteins suppress null-mutations in both *AFG3* and *RCA1* when overexpressed. *Curr. Genet.*, **30**, 206-211.
- Riezmann, H. (1997) The ins and outs of protein translocation. *Science*, **278**, 1728-1729.
- Rinaldi, T., Ricci, C., Porro, D., Bologin-Fukuhara, M. and Frontali, L. (1998) A mutation in a novel yeast proteasomal gene, RPN11/MPR1, produces a cell cycle arrest, overreplication of nuclear and mitochondrial DNA and an altered mitochondrial morphology. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 2917-2931.
- Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S. and Finley, D. (1998) Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO Journal*, **17**, 4909-4919.
- Rupp, S. and Wolf, D.H. (1995) Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). The use of active-site mutants of proteinase yscA to determine the necessity of the enzyme for vacuolar proteinase maturation and proteinase yscB stability. *Eur J Biochem*, **231**, 115-125.
- Russel, S.M., Burgess, R.J. and Mayer, R.J. (1980) Protein degradation in rat liver during post-natal development. *Biochem. J.*, **192**, 321-330.
- Sääf, A., Monne, M., de Gier, J.-W. and von Heijne, G. (1998) Membrane topology of the 60-kDa Oxa1p homologue from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **273**, 30415-30418.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J. and Dalbey, R.E. (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature*, **406**, 637-641.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. and Lindquist, S. (1996) Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 289-296.
- Schmidt, M., Lupas, A.N. and Finley, D. (1999) Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 584-591.
- Schnall, R., Mannhaupt, G., Stucka, R., Tauer, R., Ehnle, S., Schwarzlose, C., Vetter, I. and Feldmann, H. (1994) Identification of a set of yeast genes coding for a novel family of putative ATPases with high similarity to constituents of the 26S protease complex. *Yeast*, **10**, 1141-1155.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770-4.
- Scotti, P.A., Urbanus, M.L., Brunner, J., de Gier, J.-W.L., von Heijne, G., van der Boes, C., Driessen, A.J.M., Oudega, B. and Luirink, J. (2000) YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J*, **19**, 542-549.
- Serizawa, A., Dando, P.M. and Barrett, A.J. (1995) Characterization of a mitochondrial metallopeptidase reveals neurolysin as a homologue of thimet oligopeptidase. *J Biol Chem*, **270**, 2092-2098.
- Seufert, W. and Jentsch, S. (1992) In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J*, **11**, 3077-3080.
- Shotland, Y., Koby, S., Teff, D., Mansur, N., Oren, D.A., Tatematsu, K., Tomoyasu, T., Kessel, M., Bukau, B., Ogura, T. and Oppenheim, A.B. (1997) Proteolysis of the phage I CII regulatory protein by FtsH (HflB) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **24**, 1303-1310.

- Shotland, Y., Teff, D., Koby, S., Kobiler, O. and Oppenheim, A.B. (2000) Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **299**, 953-64.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- 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.
- Sommer, T. and Jentsch, S. (1993) A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature*, **365**, 176-179.
- Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997) Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J.*, **11**, 1227-1233.
- Sousa, M.C., Trame, C.B., Tsuruta, H., Wilbanks, S.M., Reddy, V.X. 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 the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, **275**, 14898-14902.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Kunkele, K.P., Nussberger, S., Neupert, W. and Rapaport, D. (2000) Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *Embo J*, **19**, 4895-902.
- 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.
- Steiner, H. and Haass, C. (2000) Intramembrane Proteolysis by presenilins. *Nature Reviews*, **1**, 217-224.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. and Schatten, G. (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, **402**, 371-372.
- Suzuki, C.K., Rep, M., Van Dijl, J.M., Suda, K., Grivell, L.A. and Schatz, G. (1997) ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 118-123.
- Suzuki, C.K., Suda, K., Wang, N. and Schatz, G. (1994) Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science*, **264**, 273-276.
- Swaminathan, S., Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (1999) The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell*, **10**, 2583-2594.
- 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.
- Teichert, U., Mechler, B., Müller, H. and Wolf, D.H. (1989) Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J Biol Chem*, **264**, 16037-16045.
- Teter, S.A. and Klionsky, D.J. (2000) Transport of proteins to the yeast vacuole: autophagy, cytoplasm-to-vacuole-targeting, and role of the vacuole in degradation. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 173-179.
- 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.
- Tobin, A.J. and Signer, E.R. (2000) Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends in cell biology*, **10**, 531-536.
- Tomoyasu, T., Yuki, T., Morimura, S., Mori, H., Yamanaka, K., Niki, H., Hiraga, S. and Ogura, T. (1993) The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression. *J. Bacteriol.*, **175**, 1344-1351.
- 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 USA*, **79**, 267-271.

- 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.
- Van Dyck, L. and Langer, T. (1999) ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Life Sci.*, **55**, 825-842.
- Van Dyck, L., Neupert, W. and Langer, T. (1998) The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.*, **12**, 1515-1524.
- Van Dyck, L., Pearce, D.A. and Sherman, F. (1994) *PIM1* encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 238-242.
- Van Melderen, L., Thi, M.H., Lecchi, P., Gottesman, S., Couturier, M. and Maurizi, M.R. (1996) ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions. *J Biol Chem*, **271**, 27730-8.
- Varshavsky, A. (1997) The ubiquitin system. *TIBS*, **22**, 383-387.
- Vestweber, D. and Schatz, G. (1988) Point mutations destabilizing a precursor protein enhance its post-translational import into mitochondria. *EMBO J.*, **7**, 1147-1151.
- Vik, A. and Rine, J. (2000) Membrane biology: membrane-regulated transcription. *Current Biology*, **10**, R869-R871.
- Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 1015-1068.
- Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.
- Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T. and Neupert, W. (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.*, **13**, 5135-5145.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945-951.
- Walker, J.H., Burgess, R.L. and Mayer, R.J. (1978) Relative rates of turnover of subunits of mitochondrial proteins. *Biochem. J.*, **176**, 927-932.
- Walter, J., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T. (2001) Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J.*, **20**.
- 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., Y.J., I., 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*, **9**, 177-184.
- Wang, N., Gottesman, S., Willingham, M.C., Gottesman, S. and Maurizi, M.R. (1993) A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11247-11251.
- Wang, N., Maurizi, M.R., Emmert, B.L. and Gottesman, S. (1994) Synthesis, processing, and localization of human Lon protease. *J. Biol. Chem.*, **269**, 29308-29313.
- Weber, 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.
- 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-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.
- Wickner, S., Gottesman, S., Skowyra, D., Hoskins, J., McKenney, K. and Maurizi, M.R. (1994) A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12218-22.

- Wiertz, E.J.H.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. and Ploegh, H.L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, **384**, 432-438.
- Wright, G., Terada, K., Yano, M., Sergeev, I. and Mori, M. (2001) Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. *Exp Cell Res*, **263**, 107-117.
- Yaffe, M.P. and Schatz, G. (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4819-4823.
- Yamada, T., Okuhara, K., Iwamatsu, A., Seo, H., Ohta, K., Shibata, T. and Murofushi, H. (2000) p97 ATPase, an ATPase involved in membrane fusion, interacts with DNA unwinding factor (DUF) that functions in DNA replication. *FEBS Letters*, **466**, 287-291.
- Yu, R.C., Hanson, P.I., Jahn, R. and Brünger, A.T. (1998) Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 803-811.
- Zhang, X., Shaw, A., Bates, P.A., Newman, R.H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M.A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van Heel, M. and Freemont, P.S. (2000) Structure of the AAA ATPase p97. *Molecular Cell*, **6**, 1473-1484.
- Zhou, M. and Schekman, R. (1999) The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol. Cell*, **4**, 925-934.
- Zhuang, Z. and McCauley, R. (1989) Ubiquitin is involved in the in vitro insertion of monoamine oxidase B into mitochondrial outer membranes. *J. Biol. Chem.*, **264**, 14594-14596.

Danksagung

Ich danke besonders Prof. Dr. Thomas Langer für das stetige und anhaltende Interesse an meinen Projekten, für die kompetente Anleitung und fundierte Schulung und für das Ermöglichen einer ständigen, wissenschaftlichen Diskussionskultur. Dabei habe ich immer seine Fähigkeit bewundert, im Laboralltag zwischen verschiedensten Arbeitsinhalten schnell und mit gesamter Aufmerksamkeit zu wechseln.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert, in dessen Labor und wissenschaftlichem Umfeld ich wissenschaftliches Denken und Arbeiten lernen und diese Dissertation erarbeiten durfte. Die Qualität an Forschung, die Kontakte zu Wissenschaftlern anderer Forschungsgruppen, die experimentellen Möglichkeiten und die Internationalität der Arbeitsgruppe waren eine deutliche Bereicherung für meinen Werdegang.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. R. Herrmann, der freundlicherweise die Begutachtung meiner Arbeit für den Fachbereich Biologie übernommen hat.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Kollegen bedanken, die mit mir den meisten Teil des Forschungsalltages verbracht und mir diesen versüßt haben. Die gesellige und organisatorische Ader von Petra Robisch und natürlich ihre hervorragende technische Assistenz in der Durchführung von Experimenten hat wesentlich zum Fortgang und Erfolg meiner Arbeit beigetragen. Die freundschaftliche und gute Laune verbreitende Art von Alexandra Stiegler mit einer gewissen Neigung zu eher trockenerem Humor hat mir über die härteren Phasen hinweggeholfen. Ich danke auch besonders Sandra Esser, die ihre Kollegen durch ihr glöckchenhelles Lachen zuweilen daran erinnert hat, dass Forschung nicht alles ist. Einen herzlichen Dank an Dr. Klaus Leonhard, der durch aktive Diskussion, Verständnis und Miterleben weit mehr als ein Kollege geworden ist. Des weiteren einen herzlichen Dank an Drs Heike Arlt, Luc van Dyck, Carola Rast, Gregor Steglich, Kai Hell, Markus Dembowski, Uwe Ahting, Doron Rapaport, Michael Brunner und Takashi Tatsuta und den Rest der gesamten Arbeitsgruppe. Herzlichen Dank an Dr. Koji und Noriko Okamoto for fruitful discussion and a cup of original Japanese green tee at some of the deeper points of research.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Spülküche, insbesondere Frau Regina Lapschansky, den Mitarbeiterinnen des Sekretariats und des Kaninchenstalles. Vielen Dank an die Mitarbeiter der Werkstatt für die hervorragende technische Unterstützung, aber vor allem dass sie durch Organisieren von Festen und Ausflügen sowie durch Diskussionen über die wirklich wichtigen Dinge im Leben dafür sorgen, das Sozialsystem der Arbeitsgruppe herzustellen und zusammenzuhalten.

Ein spezieller Dank geht an meine Frau Esther, die mir zeitlich viel (zu viel) Freiraum für die Wissenschaft gegeben hat und in allen Phasen der Dissertation spürbar hinter mir stand. Und an viele meiner Freunde, die den Kontakt zu mir nicht ganz abgebrochen haben, obwohl ich zu üblichen Zeiten des Sozialkontaktes oft genug mit der äußerst wichtigen Züchtung von Bierhefe beschäftigt war.

Lebenslauf

Michael Käser geboren 30.05.70 in Nürnberg

Ausbildung

09.80 – 06.89 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Oberasbach, Bayern
Allgemeine Hochschulreife

bis 10.90 Zivildienst im Rettungsdienst des Bayer. Roten Kreuzes Deggendorf
Ausbildung und Prüfung zum Rettungssanitäter

Studium

ab 10.90 Grundstudium Biologie Diplom an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen/Nürnberg mit Diplom-Vorprüfung

ab 10.92 – 05.96 Hauptstudium Biologie Diplom an der Georg-August-Universität
Göttingen mit Diplomprüfung

06.96 – 05.97 Diplomarbeit im Bereich Molekulare Evolution/Populationsgenetik
menschlicher Populationen an der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Abteilung Prof. S. Pääbo: „Mitochondriale und Y-chromosomale
Untersuchung der genetischen Diversität bei den San“

Promotion

seit 07.97 derzeit Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Physiologische
Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Abteilung Prof. W. Neupert / Prof. T. Langer

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

- Käser, M. and Langer, T. (2000) Protein degradation in mitochondria. *Sem. Cell Dev. Biol.*, **11**, 181-190.
- 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. *Biochem Soc Trans*, **29**, 431-6.
- Rapaport, D., Taylor, R.D., Käser, M., Langer, T., Neupert, W. and Nargang, F.E. (2001) Structural requirements of Tom40 for assembly into preexisting TOM complexes of mitochondria. *Mol Biol Cell*, **12**, 1189-1198.