

**Die Prozessierung der Dynamin-ähnlichen GTPase
Mgm1 durch mitochondriale Rhomboidproteasen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Anja Schäfer

aus
Heppenheim
an der Bergstraße

München
2008

Dissertation eingereicht am: 12.11.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

2. Gutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Mitochondrien	1
1.2	Morphologie und Dynamik der Mitochondrien.....	3
1.2.1	Die Teilung von Mitochondrien	4
1.2.2	Die Fusion von Mitochondrien	5
1.3	Die Fusionskomponente Mgm1	8
1.3.1	Die alternative Topogenese der Isoformen von Mgm1	9
1.4	Intramembranproteolyse	11
1.4.1	Rhomboidproteasen	12
1.4.2	Substratspezifität von Rhomboidproteasen	15
1.4.3	Die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1.....	16
1.4.4	PARL und OPA1, die humanen Homologe von Pcp1 und Mgm1	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Molekularbiologische Methoden	20
2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	20
2.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	21
2.1.3	Amplifizierung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion	22
2.1.4	Restriktionsverdau	23
2.1.5	Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugations- säulchen.....	23
2.1.6	Agarosegelelektrophorese.....	24
2.1.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	24
2.1.8	Ligation von DNA.....	25
2.1.9	Ethanol-fällung	25
2.1.10	Präparation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	25
2.1.11	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	26
2.1.12	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.1.13	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	27
2.1.14	DNA-Sequenzierung.....	27
2.1.15	Verwendete Vektoren	28

2.1.16	Klonierungsstrategien	30
2.1.17	Weitere verwendete Plasmide	38
2.2	Methoden der Hefegenetik.....	39
2.2.1	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.3	Sporulation diploider Hefestämme.....	40
2.2.4	Tetradendisektion	40
2.2.5	Generierung eines haploiden $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ Stammes	41
2.3	Zellbiologische Methoden	41
2.3.1	Gesamtproteinpräparation aus <i>S. cerevisiae</i> durch alkalische Lyse	41
2.3.2	Präparation von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.3.3	Digitoninfraktionierung von Hefemitochondrien	43
2.3.4	Alkalische Extraktion von Proteinen aus mitochondrialen Membranen.....	44
2.3.5	<i>In vitro</i> Import und Degradations-Experiment	45
2.3.6	Fluoreszenzmikroskopie	45
2.4	Proteinchemische Methoden	46
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	46
2.4.2	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	46
2.4.3	<i>In vitro</i> Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine	47
2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.4.5	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen.....	48
2.4.6	Autoradiographie und densitometrische Quantifizierung	49
2.5	Immunologische Methoden.....	49
2.5.1	Affinitätsreinigung von Antikörpern	49
2.5.2	Immundetektion von Proteinen	50
2.6	Puffer und Medien.....	50
2.7	Chemikalien und Geräte	52
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Charakterisierung der Prozessierung von Mgm1 durch die Rhomboidprotease Pcp1	57
3.1.1	Konservierung der Aminosäuresequenz in der Umgebung der Pcp1 Spaltstelle	57

3.1.2	Helix-destabilisierende Aminosäurereste der RCR von Mgm1 haben keinen Einfluss auf die Prozessierung durch Pcp1	59
3.1.3	Die Rolle der Aminosäuresequenz der RCR von Mgm1 für dessen Prozessierung durch Pcp1	60
3.1.4	Die Intramembranproteolyse von Mgm1 wird durch negativ geladene Aminosäurereste begünstigt.....	64
3.1.5	Stabilität der langen und kurzen Form von Mgm1 $_{\Delta D/E}$	70
3.1.6	Charakterisierung des D/E-Bereiches von Mgm1	72
3.1.7	Negativ geladene Aminosäurereste C-terminal der Pcp1 Spaltstelle haben keinen Einfluss auf die Prozessierung von Ccp1.....	76
3.1.8	Der Bereich zwischen den beiden hydrophoben Segmenten von Mgm1 ist entscheidend für die Spaltung durch Pcp1	79
3.1.9	Stabilität der Isoformen von Mgm1 $_{ITR2x}$, Mgm1 $_{\Delta 115-150}$ und Mgm1 $_{\Delta 132-150}$	87
3.1.10	Substraterkennung der humanen Rhomboidprotease PARL..	90
3.1.11	Einfluss der untersuchten Mgm1-Varianten auf die mitochondriale Morphologie	92
4	Diskussion.....	95
4.1	Substratspezifität mitochondrialer Rhomboidproteasen.....	95
4.1.1	Die Bedeutung des gespaltenen hydrophoben Segments für die Prozessierung des Substrats	95
4.1.2	Determinanten der Prozessierung von Mgm1 durch mitochondriale Rhomboidproteasen	97
4.1.3	Substraterkennung durch die humane Rhomboidprotease PARL.....	102
4.2	Die Funktion verschiedener Bereiche von Mgm1	103
5	Zusammenfassung	106
6	Summary.....	108
7	Literaturverzeichnis.....	110
8	Abkürzungen	120
9	Danksagung	122

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind an einer Vielzahl essentieller Prozesse in eukaryontischen Zellen beteiligt. Einer davon ist die oxidative Phosphorylierung, durch welche der Hauptanteil des zellulären ATPs gebildet wird (Saraste, 1999). Andere wichtige Funktionen der Mitochondrien sind zum Beispiel die Synthese von Eisen-Schwefel-Zentren (Lill and Kispal, 2000) und Häm sowie die Oxidation von Fettsäuren und die Calcium-Homöostase (Scheffler, 1999). Zusätzlich erfüllen sie eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Apoptose (Bernardi *et al.*, 1999).

Die Mitochondrien sind vor etwa 1,5 Milliarden Jahren durch einen Endosymbiose-Prozess entstanden, in dessen Verlauf ein Vorläufer der α -Proteobakterien von einer frühen eukaryontischen Zelle aufgenommen wurde (Margulis, 1971; Gray *et al.*, 1999). Während der Evolution wurden anschließend zahlreiche Gene des Endosymbionten in den Kern der eukaryontischen Zelle transferiert oder gingen aufgrund von Redundanz verloren. Heute variieren die Größe des verbliebenen mitochondrialen Genoms und die Anzahl der darauf codierten Proteine stark je nach Organismus (Scheffler, 1999; Burger *et al.*, 2003).

Mitochondrien bestehen aus unterschiedlichen Subkompartimenten, welche durch zwei Membranen, die äußere und die innere Membran (IM), voneinander abgetrennt werden. Zwischen diesen beiden Membranen befindet sich der Intermembranraum. Die innere Membran umschließt außerdem die mitochondriale Matrix und wird unterteilt in die innere Grenzmembran und die Cristaemembran. Die Cristae stellen hierbei Einstülpungen der IM dar, welche je nach Zelltyp und Stoffwechselbedingungen die unterschiedlichsten Strukturen aufweisen. Die innere Grenzmembran wird von der Cristaemembran durch die *Cristae junctions*, meist ringförmige Strukturen, abgegrenzt (Zick *et al.*, 2008). Aufgrund der spezifischen Struktur der Cristae und der Verteilung von Proteinen der IM auf die Cristaemembran bzw. die innere Grenzmembran

wird vermutet, dass der Intracristaeraum ebenfalls ein funktionell eigenständiges Subkompartiment des Intermembranraums der Mitochondrien darstellt (Mannella *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 2006).

Da die meisten Proteine, welche für den Aufbau und die Stoffwechselfvorgänge der Mitochondrien benötigt werden, im Zellkern codiert sind und an cytosolischen Ribosomen synthetisiert werden, muss deren Transport in die Organellen und ihre Membranen in koordinierter Weise sichergestellt werden. Dies geschieht mittels verschiedener Translokasen innerhalb der mitochondrialen Membranen. Der TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane of mitochondria*) befindet sich in der mitochondrialen Außenmembran und vermittelt den Proteintransport über und in diese Membran (Neupert, 1997; Ryan *et al.*, 2000). Ebenfalls in der Außenmembran befindet sich der TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer-membrane β -barrel proteins*), welcher für die Insertion von β -barrel Proteinen in die äußere mitochondriale Membran verantwortlich ist (Waizenegger *et al.*, 2004; Paschen *et al.*, 2005). Der Import löslicher Intermembranraum Proteine mit konservierten Cystein-Motiven erfolgt über ein Disulfidbrücken-Transfer-System im Intermembranraum mit Hilfe der Proteine Mia40 und Erv1 (Mesecke *et al.*, 2005). Proteine mit einer N-terminalen Signalsequenz werden über den TIM23-Komplex (*translocase of the inner membrane of mitochondria*) der IM entweder in die Matrix oder die IM transportiert. Die Insertion von Proteinen in die IM erfolgt, sofern der Signalsequenz ein hydrophober Bereich nachfolgt (Glick *et al.*, 1992; Rojo *et al.*, 1998). Beim konservativen Sortierungsweg hingegen, werden Proteine zunächst über den TIM23-Komplex in die Matrix importiert und anschließend über Oxa1, ein Protein der IM, in die IM inseriert. Über Oxa1 werden auch mitochondrial codierte Proteine von der Matrix aus in die IM integriert (Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001). Der TIM22-Komplex ist eine weitere Translokase der IM und vermittelt den Import hydrophober Proteine mit internen Signalsequenzen in die IM (Sirrenberg *et al.*, 1996).

1.2 Morphologie und Dynamik der Mitochondrien

Mitochondrien sind sehr dynamische Organellen. Sie liegen meist als ein tubuläres Netzwerk vor, welches sich durch ständige Fusion und Teilung aufrecht erhält und gleichzeitig ständig verändert (Nunnari *et al.*, 1997). Fusion und Teilung sind dabei ausbalancierte Prozesse. Bei einem Übermaß an Teilung kommt es zur Fragmentierung der Mitochondrien, dagegen führt zu viel Fusion zur Bildung einer Fischernetz-artigen Struktur der Organellen (Sesaki and Jensen, 1999) (Abbildung 1).



Abbildung 1: Struktur von Mitochondrien in *S. cerevisiae*. Die Mitochondrien wurden durch die Expression von GFP visualisiert, welches sich in der Matrix befindet. Die Abbildungen zeigen Wildtyp, Fusions- ($\Delta fzo1$) und Teilungsmutanten ($\Delta dnm1$). Es sind jeweils Kombinationen aus fluoreszenzmikroskopischen und Phasenkontrast Aufnahmen gezeigt. (Okamoto and Shaw, 2005)

Über die genauen Gründe für die ausgeprägte Dynamik der Mitochondrien wird bisher noch spekuliert. Vermutlich wird dadurch eine Durchmischung der mitochondrialen DNA (mtDNA) sowie der in den Mitochondrien enthaltenen Proteine erreicht. Die mitochondriale Dynamik ist auch mit verantwortlich für die gleichmäßige Verteilung und Vererbung der mtDNA. So führt der Verlust der mitochondrialen Fusion in der Regel zu teilweisem oder völligem Verlust der mtDNA in Hefe- und Säugerzellen (Nunnari *et al.*, 1997; Westermann, 2003). Weiterhin könnten Fusion und Teilung für einen Mechanismus der Qualitätskontrolle von Mitochondrien von Bedeutung sein (Herlan *et al.*, 2004; Duvezin-Caubet *et al.*, 2006). Auch für den Transport von Mitochondrien ist die mitochondriale Dynamik wichtig. In Neuronen ohne mitochondriale Fusion ist die Anzahl von Mitochondrien in

Synapsen und Dendriten stark reduziert. Dadurch wird auch die Signalweiterleitung an den Synapsen sowie die Morphologie der Dendriten beeinträchtigt (Li *et al.*, 2004; Verstreken *et al.*, 2005).

1.2.1 Die Teilung von Mitochondrien

Für die Teilung von Mitochondrien in *S. cerevisiae* ist die Dynamin-ähnliche GTPase Dnm1 essentiell. Die Deletion von *DNM1* in Hefezellen führt zu einer verstärkten Vernetzung der Mitochondrien untereinander, da die Fusionsprozesse weiterhin stattfinden (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki and Jensen, 1999). Dnm1 befindet sich in punktuellen Strukturen im Cytosol sowie auf der mitochondrialen Außenmembran (Otsuga *et al.*, 1998). Ist Dnm1 mit der Membran assoziiert, kommt es durch die Bindung von GTP zu einer Konformationsänderung wobei Dnm1 mit anderen Dnm1-Molekülen zu Spiralen assoziiert. Diese spiralartigen Strukturen bewirken vermutlich nach GTP-Hydrolyse die Einschnürung und Teilung der Mitochondrien (Ingberman *et al.*, 2005) (Abbildung 2a).

Es gibt zwei weitere essentielle Komponenten der mitochondrialen Teilungsmaschinerie in Hefen: Fis1 und Mdv1 (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu and Nunnari, 2000). Diese sind für die Rekrutierung von Dnm1 zu den Mitochondrien verantwortlich. Fis1 ist im Gegensatz zu Mdv1 und Dnm1 gleichmäßig über die Mitochondrien verteilt und dient als Membranrezeptor, der die anderen Komponenten mit der äußeren mitochondrialen Membran verbindet (Mozdy *et al.*, 2000). Fis1 ist mit seinem C-Terminus in der mitochondrialen Außenmembran verankert. Der N-terminale Bereich von Fis1 befindet sich im Cytosol und vermittelt die Interaktion mit Mdv1 (Mozdy *et al.*, 2000). Mdv1 besteht aus drei Bereichen wovon der N-terminale Teil mit Fis1 interagiert. Eine zentrale *coiled-coil*-Domäne bewirkt die Homooligomerisierung von Mdv1 und der C-terminale Bereich des Proteins interagiert mit Dnm1 (Tieu and Nunnari, 2000; Cerveny and Jensen, 2003) (Abbildung 2b). Mdv1 könnte daher eine Art Adapter sein, der Fis1 mit Dnm1 verknüpft (Tieu *et al.*, 2002). Weiterhin könnte Mdv1 die Teilung begünstigen, da es die Assemblierung von Dnm1 zu spiralartigen Strukturen fördert (Bhar *et al.*, 2006). Caf4, ein Paralog von Mdv1, ist keine essentielle Komponente

bei der Teilung von Mitochondrien. Caf4 ist ähnlich aufgebaut wie Mdv1. Es interagiert mit Fis1, Dnm1 und Mdv1, seine Rolle beim Teilungsprozess ist jedoch noch unklar (Griffin *et al.*, 2005) (Abbildung 2b).

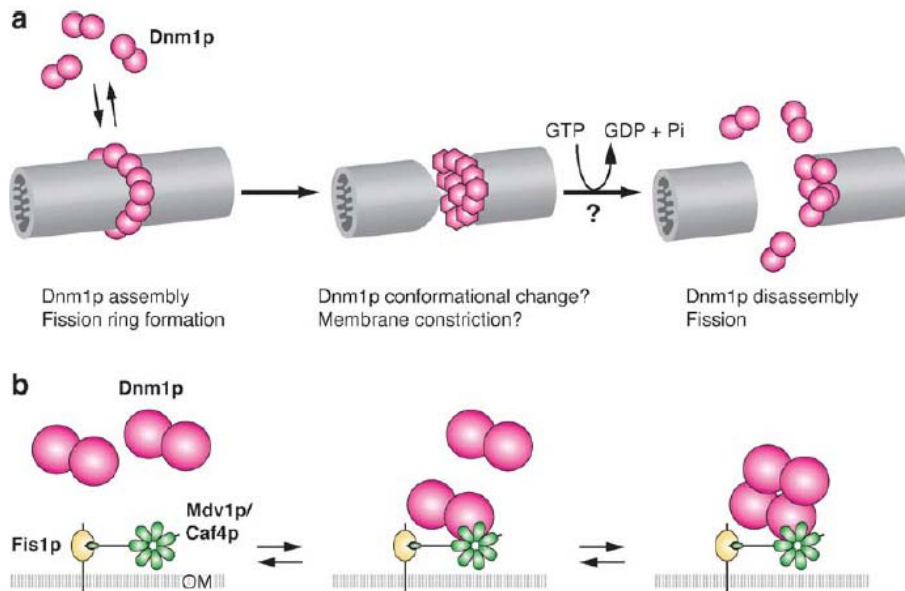


Abbildung 2: Modell der Dnm1-vermittelten Teilung von Mitochondrien. (a) Die Assemblierung von Dnm1 zu Dimeren im Cytosol geht der Rekrutierung zu den Mitochondrien voraus. Durch konformationelle Veränderungen mit Hilfe der Hydrolyse von GTP werden die Mitochondrien abgeschnürt. (b) Rekrutierung von Dnm1 zur äußeren mitochondrialen Membran durch die Proteine Fis1 und Mdv1 bzw. Caf4. (Okamoto and Shaw, 2005)

1.2.2 Die Fusion von Mitochondrien

Die Problematik bei der Fusion der Mitochondrien besteht im Vorhandensein von zwei Membranen, welche in einem koordinierten Prozess mit jeweils zwei entsprechenden Membranen fusioniert werden müssen. Die Fusion der äußeren und inneren Membranen laufen nacheinander ab, haben jedoch unterschiedliche energetische Voraussetzungen. Dabei wird für beide Prozesse GTP benötigt. Die Fusion der äußeren Membran hängt außerdem von einem Protonengradienten der IM ab. Für die Fusion der IM wird zusätzlich ein elektrisches Potential über der IM benötigt (Meeusen *et al.*, 2004).

In *S. cerevisiae* sind drei Proteine essentiell für die Fusion von Mitochondrien: Fzo1, Ugo1 und Mgm1. Alle drei Proteine zeigen den gleichen Deletionsphänotyp, Mitochondrien verlieren ihre mtDNA und durch die fortlaufende Teilung liegen sie nicht als tubuläres Netzwerk, sondern fragmentiert vor (Hermann *et al.*, 1998; Sesaki and Jensen, 2001; Herlan *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003b). Die Dynamin-ähnliche GTPase Fzo1 besitzt zwei Homologe im Menschen, die Mitofusine Mfn1 und Mfn2, wobei Deletionen im *MFN2* Gen zur Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A im Menschen führen (Chen *et al.*, 2003; Zuchner *et al.*, 2004). Fzo1 ist mit zwei Transmembrandomänen in der äußeren mitochondrialen Membran verankert, wobei die essentielle GTPase Domäne sowie die *coiled-coil*-Domänen des Proteins im Cytosol lokalisiert sind (Fritz *et al.*, 2001). Fzo1 vermittelt das Andocken zweier sich gegenüber liegender mitochondrialer Außenmembranen. Dies erfolgt vermutlich durch die Assemblierung von Fzo1-Molekülen in diesen Membranen, welche durch die GTPase- bzw. *coiled-coil*-Domänen vermittelt wird (Meeusen *et al.*, 2004) (Abbildung 3).

Ugo1 ist bisher nur bei den Pilzen bekannt. Es ist ein Mitglied der mitochondrialen Transporter-Familie und mit einer Transmembrandomäne in der mitochondrialen Außenmembran verankert. Dadurch befindet sich der N-Terminus von Ugo1 im Cytoplasma und der C-Terminus im Intermembranraum der Mitochondrien (Sesaki and Jensen, 2001). Ugo1 interagiert sowohl mit Fzo1 als auch mit Mgm1 und verbindet somit die Komponenten der Fusionsmaschinerie der äußeren und inneren mitochondrialen Membran (Wong *et al.*, 2003; Sesaki and Jensen, 2004) (Abbildung 3). Dies könnte der koordinierten Fusion beider Membranen dienen.

Mgm1 ist ebenfalls eine Dynamin-ähnliche GTPase (Wong *et al.*, 2000; Herlan *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003b) und besitzt mit OPA1 ein Homolog im Menschen (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000). Mgm1 existiert in zwei Isoformen, einer langen (l-Mgm1) und einer kurzen (s-Mgm1), welche beide für die Fusion von Mitochondrien benötigt werden (Herlan *et al.*, 2003). Die funktionellen Domänen beider Isoformen befinden sich im Intermembranraum der Mitochondrien, wobei l-Mgm1 in die IM integriert, s-Mgm1 mit ihr assoziiert ist (vgl. 1.2). Mgm1 ist für die Fusion der

IM wichtig (Meeusen *et al.*, 2006). So fusionieren Mitochondrien eines Stammes mit einer temperatursensitiven Variante von Mgm1 bei nicht-permissiver Temperatur *in vitro* zwar ihre Außenmembranen, die Innenmembranen bleiben jedoch voneinander getrennt. Mgm1 muss in beiden sich gegenüber liegenden Innenmembranen vorhanden sein, vermutlich um für die Annäherung der Membranen zu sorgen. Da die beiden Isoformen von Mgm1 miteinander interagieren, nimmt man an, dass sie bei der Fusion zusammen wirken (Meeusen *et al.*, 2006) (Abbildung 3). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch noch unbekannt.

Inzwischen wurde eine weitere Komponente bekannt, welche für die Fusion von Mitochondrien von Bedeutung ist: die mitochondriale Phospholipase D (MitoPLD), die in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist (Choi *et al.*, 2006). Nach dem Andocken zweier Mitochondrien hydrolysiert MitoPLD das Phospholipid Cardiolipin in der Außenmembran (Hovius *et al.*, 1993), wodurch die Krümmung der Membranen so verändert werden soll, dass sie fusionieren können (Choi *et al.*, 2006).

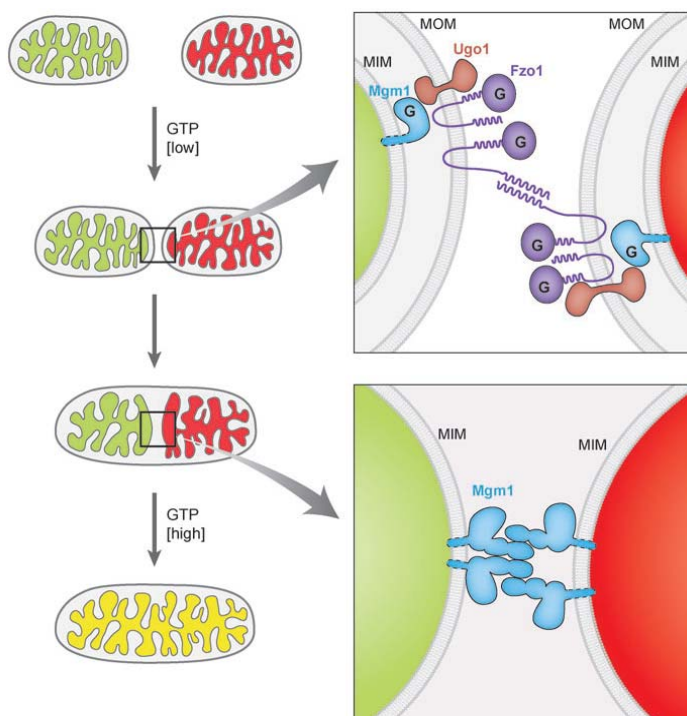


Abbildung 3: Modell des Mechanismus der mitochondrialen Fusion. Die Fusion von Mitochondrien findet in zwei Schritten, der Außenmembranfusion und der Innenmembranfusion, statt (links). Die GTPasen der Außen- und Innenmembran, Fzo1 und Mgm1, bilden homooligomere Komplexe in *cis* und in *trans* für die Annäherung der Außen- bzw. Innenmembranen (rechts). (Hoppins *et al.*, 2007)

1.3 Die Fusionskomponente Mgm1

Mgm1 (*mitochondrial genome maintenance*) ist eine Dynamin-ähnliche GTPase im Intermembranraum der Mitochondrien von *S. cerevisiae* (Wong et al., 2000; Herlan et al., 2003; Sesaki et al., 2003b). Mgm1 besitzt eine N-terminale Signalsequenz für den Import in Mitochondrien und zwei hydrophobe Segmente im N-terminalen Teil des Proteins: die Transmembrandomäne (TM), welche Aminosäurereste 94-111 umfasst und einen membrandurchspannenden Bereich, welcher durch die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 gespalten wird (Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003b). Dieser Bereich wurde *rhomboid cleavage region* (RCR) genannt und beinhaltet die Aminosäurereste 156-169. Des Weiteren besitzt Mgm1 typische Bestandteile Dynamin-ähnlicher Proteine wie eine GTPase-Domäne, eine GTPase-Effektor-Domäne und eine zentrale Dynamindomäne (Abbildung 4).



Abbildung 4: Schematische Darstellung der Dynamin-ähnlichen GTPase Mgm1. MTS, Mitochondriale Signalsequenz; 1, erstes hydrophobes Segment, die Transmembrandomäne von Mgm1 (TM); 2, zweites hydrophobes Segment, die *rhomboid cleavage region* von Mgm1 (RCR); GTPase, GTPase-Domäne; Dynamin, zentrale Dynamin-Domäne; GED, GTPase-Effektor-Domäne.

Mgm1 wurde erstmals in einer Studie über Mutanten mit Fehlern bei der Vererbung der mitochondrialen DNA beschrieben (Guan et al., 1993; Jones und Fangman, 1992). Dies erklärt den Verlust der Respirationskompetenz von Δ *mgm1*-Hefestämmen, da wichtige Komponenten der oxidativen Phosphorylierung auf der mtDNA codiert sind. Später wurde außerdem bekannt, dass Mgm1 eine wichtige Komponente bei der Fusion von Mitochondrien ist (vgl. 1.2.2) (Wong et al., 2000; Wong et al., 2003; Meeusen et al., 2006). Daher kommt es bei der Deletion des Proteins zur Fragmentierung und Aggregation der Organellen. Neben der Funktion

von Mgm1 bei der mitochondrialen Fusion, wurde außerdem eine Rolle bei der Ausbildung bzw. Stabilisierung der Cristae oder bei Teilungsprozessen der IM diskutiert (Wong *et al.*, 2000).

1.3.1 Die alternative Topogenese der Isoformen von Mgm1

Mgm1 liegt in einer langen (l-Mgm1) und einer kurzen Isoform (s-Mgm1) vor. Beide werden für den Erhalt der tubulären Morphologie und der mtDNA von Mitochondrien benötigt (Herlan *et al.*, 2003) und über den Prozess der alternativen Topogenese gebildet (Herlan *et al.*, 2004). Hierbei wird zunächst der Vorläufer von Mgm1 an cytosolischen Ribosomen gebildet und durch die Außenmembran der Mitochondrien transloziert. Der Import über die IM erfolgt über den TIM23-Komplex, einen der Proteintranslokationskomplexe der IM. Erreicht die mitochondriale Signalsequenz die Matrix, wird sie durch die Protease MPP (*mitochondrial processing peptidase*) abgespalten und die TM von Mgm1 kann in die IM inseriert werden, wodurch l-Mgm1 entsteht. Alternativ kann Mgm1 weiter über den TIM23-Komplex transloziert werden bis die RCR die IM erreicht. Dort wird das Protein innerhalb der RCR (zwischen Aminosäureresten 160 und 161 bzw. 162 und 163) durch die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 gespalten, was zur Bildung von s-Mgm1 führt (Abbildung 5) (Herlan *et al.*, 2004).

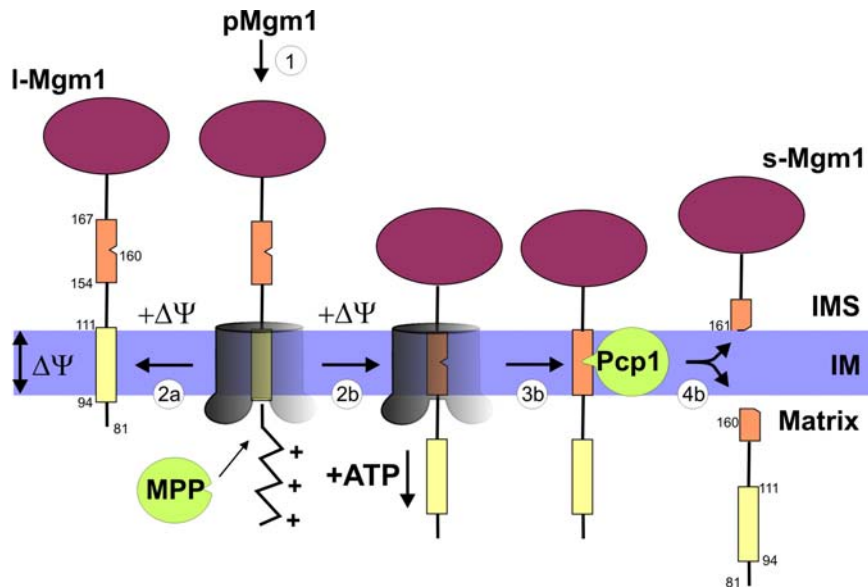


Abbildung 5: Alternative Topogenese von Mgm1. Die TIM23-Translokase der mitochondrialen IM mit den Komponenten des mitochondrialen Importmotors ist transparent grau dargestellt. Die beiden hydrophoben Segmente am N-Terminus von Mgm1 sind durch ein gelbes (erstes hydrophobes Segment, TM) bzw. oranges Rechteck mit Spaltstelle (zweites hydrophobes Segment, RCR) dargestellt. Das Vorstufenprotein von Mgm1 stoppt beim Import durch die Innenmembran an der TM (1). Dann erfolgt entweder die Insertion bei TM (2a) oder der weitere Import bis zu einem Stopp bei RCR (2b). In diesem Fall spaltet Pcp1 Mgm1 innerhalb der RCR und s-Mgm1 entsteht (3b, 4b). IMS, Intermembranraum; IM, mitochondriale Innenmembran; $\Delta\Psi$, Membranpotential; MPP, *mitochondrial processing peptidase*; pMgm1, Vorstufenprotein von Mgm1; I-Mgm1, lange Isoform von Mgm1; s-Mgm1, kurze Isoform von Mgm1. (Herlan *et al.*, 2004)

Die Hydrophobizität der TM ist entscheidend für die Entstehung der beiden Isoformen. Bei einer erhöhten Hydrophobizität der TM wird Mgm1 vollständig in die IM integriert und es liegt ausschließlich I-Mgm1 vor. Bei einer verminderten Hydrophobizität bzw. der vollständigen Deletion der TM entsteht nur noch s-Mgm1. Die Bildung von s-Mgm1 ist außerdem abhängig von den ATP-Mengen in der mitochondrialen Matrix sowie einem funktionellen Importmotor (Herlan *et al.*, 2004). Da beide Isoformen von Mgm1 für die effiziente Fusion der Mitochondrien benötigt werden, könnte dies einen Mechanismus darstellen, der den energetischen Zustand der Mitochondrien mit deren Fusion verknüpft. Dabei könnten Mitochondrien, welche Defekte aufweisen die zu einer Reduktion der ATP-Produktion führen, nicht mehr mit dem mitochondrialen Netzwerk fusionieren und möglicherweise von der Zelle entfernt werden (Herlan *et al.*, 2004).

Es wurde diskutiert, ob die lange Form von Mgm1 eine Art Vorstufe für die funktionelle kurze Form des Proteins sein könnte. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass l-Mgm1 nicht zu s-Mgm1 umgewandelt werden kann (Schaefer *et al.*, Manuskript eingereicht). Dies bekräftigt das beschriebene Modell der alternativen Biogenese der beiden Isoformen von Mgm1 und deren spezifische Funktionen bei der mitochondrialen Fusion.

1.4 Intramembranproteolyse

Intramembranproteasen stellen eine besondere Gruppe der Proteasen dar, da sie die hydrolytische Spaltung eines Proteins im hydrophoben Milieu einer Membran katalysieren. Dabei wird das Substrat innerhalb eines membrandurchspannenden Bereichs gespalten. Man unterscheidet drei Klassen von Intramembranproteasen: die Site-2-Proteasen (S2P) sind Metalloproteasen, die unter anderem für die Regulation des Fettsäuremetabolismus und die Stress-Antwort bei Bakterien von Bedeutung sind (Brown and Goldstein, 1997; Duncan *et al.*, 1997; Rawson *et al.*, 1997; Kanehara *et al.*, 2001). Signalpeptid-Peptidasen (SPP) und Presenilin (PS) sind Aspartylproteasen (De Strooper *et al.*, 1998; Wolfe *et al.*, 1999; Weihofen *et al.*, 2002). Beim Transport von Proteinen in das ER werden die N-terminalen Signalsequenzen durch eine Signalpeptidase von den translozierten Proteinen entfernt. Die in der ER-Membran verbleibenden Signalpeptide können anschließend von SPP gespalten werden (Weihofen *et al.*, 2002). Presenilin ist Teil eines Proteinkomplexes, der so genannten γ -Sekretase, welche für die Bildung des Amyloid- β Peptids bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit verantwortlich ist (Wolfe *et al.*, 1999). Die dritte Klasse, die Rhomboidproteasen, sind Serinproteasen (Lee *et al.*, 2001; Urban *et al.*, 2001), welche an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt sind (siehe unten).

S2P, SPP und Presenilin können ihre Substrate nur spalten, wenn diese zuvor durch andere Proteine, in nicht die Membran durchspannenden Bereichen prozessiert wurden (Sakai *et al.*, 1998; Lemberg and Martoglio, 2002; Wolfe and Kopan, 2004). Für die Rhomboidproteasen ist ein solcher

Mechanismus nicht bekannt. Weiterhin benötigen S2P, SPP sowie einige Rhomboidproteasen für die effiziente Spaltung ihrer Substrate Aminosäurereste innerhalb der Transmembranhelix der Substrate, welche deren α -helikale Struktur destabilisieren (Ye *et al.*, 2000; Lemberg and Martoglio, 2002; Urban and Freeman, 2003). Dies könnte für den Zugang des Wassers zur Spaltstelle von Bedeutung sein. Im Fall von S2P könnte die Destabilisierung der Transmembranhelix dazu führen, dass die Spaltstelle die leicht außerhalb der Membran gelegenen katalytischen Reste der Protease erreichen kann. Preseniline scheinen für die Prozessierung ihrer Substrate keine solchen Helix-destabilisierenden Reste zu benötigen (Wolfe and Kopan, 2004).

1.4.1 Rhomboidproteasen

Rhomboidproteasen wurden zuerst bei Untersuchungen zur Identifikation von Genen, welche für die Musterbildung von *Drosophila melanogaster* Embryonen benötigt werden, beschrieben (Mayer and Nusslein-Volhard, 1988). Sie gehören zu einer hochkonservierten Familie der Intramembranproteasen und sind in fast allen sequenzierten Genomen von Bakterien, Archaeen und Eukaryonten zu finden (Koonin *et al.*, 2003). Phylogenetische Analysen legen nahe, dass sich die Rhomboidproteasen in Bakterien entwickelten und durch mehrere horizontale Gentransfers an Archaeen und Eukaryonten weitergegeben wurden. In Eukaryonten gibt es zwei Subfamilien der Rhomboidproteasen: Rhomboid und PARL (Presenilin-assoziiertes Rhomboid-ähnliches Protein) (Koonin *et al.*, 2003).

Rhomboidproteasen sind an sehr unterschiedlichen Prozessen beteiligt. Die Funktion von Rhomboid-1, einer Rhomboidprotease aus *D. melanogaster*, ist bis heute am besten beschrieben. Rhomboid-1 spaltet den Vorläufer des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) Spitz in der Membran des Golgiapparats. Spitz wird somit von seiner Verankerung in der Golgimembran befreit und über den sekretorischen Weg von den Zellen sezerniert (Abbildung 6). Dadurch wird in benachbarten Zellen der EGFR- (*epidermal growth factor receptor*) Signalweg initiiert (Lee *et al.*, 2001; Tsruya *et al.*, 2002). Des Weiteren spielen Rhomboidproteasen wichtige

Rollen bei der Prüfung der Zelldichte von *Providencia stuartii* (Rather *et al.*, 1999; Gallio *et al.*, 2002), bei der Invasion von Wirtszellen durch die protozoischen Parasiten *Toxoplasma gondii* (Carruthers *et al.*, 2000; Brossier *et al.*, 2005) und *Plasmodium falciparum* (Baker *et al.*, 2006), sowie bei der Fusion von Mitochondrien in *Saccharomyces cerevisiae* (Dimmer *et al.*, 2002; Herlan *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003a).

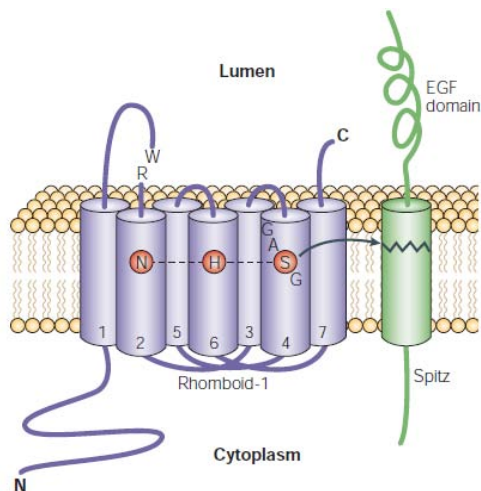


Abbildung 6: Schematische Darstellung von Rhomboid-1 aus *D. melanogaster* und dessen Substrat Spitz. Die Rhomboidprotease ist mit sieben Transmembrandomänen in die Membran des Golgi-Apparates eingebettet. Die Aminosäurereste der vorgeschlagenen katalytischen Triade der Serinprotease Rhomboid-1 sind rot hervorgehoben. Inzwischen ist bekannt, dass Rhomboidproteasen eine katalytische Diade aus Serin und Histidin besitzen. Der Serin-Rest des katalytischen Zentrums befindet sich innerhalb eines konservierten GASG-Motivs. Die EGF-Domäne von Spitz wird nach der Spaltung in das Lumen des Golgi-Apparates entlassen und stellt damit einen löslichen, aktiven Liganden dar. (Freeman, 2004)

Alle Rhomboidproteasen besitzen sechs konservierte Transmembranhelices, welche das aktive Zentrum beinhalten. Eukaryontische Rhomboidproteasen enthalten zusätzlich eine siebte Transmembrandomäne, welche sich entweder N- oder C-terminal zu den zentralen sechs befindet (Abbildung 6). Mitochondriale Rhomboidproteasen gehören zur PARL-Subfamilie und besitzen außerdem eine N-terminale mitochondriale Signalsequenz für den spezifischen Import der Protease in die Mitochondrien. Die siebte Transmembrandomäne dieser Proteine befindet sich N-terminal zu den sechs konservierten Transmembranhelices (Koonin *et al.*, 2003).

Vor kurzem wurde die Struktur von GlpG, einer Rhomboidprotease aus *E. coli*, und dessen Homolog in *H. influenzae* gelöst (Wang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Ben-Shem *et al.*, 2007; Lemieux *et al.*, 2007). Die katalytische Diade von GlpG besteht aus dem Histidinrest an Position 254 und dem Serinrest an Position 201. Es zeigte sich, dass das katalytische Zentrum in einer wassergefüllten Kavität innerhalb der Protease liegt. Es wird durch die sechs Transmembrandomänen von GlpG und der so genannten L1-Schleife von den Membranlipiden abgetrennt. Die L1-Schleife reicht ein Stück weit in die Membran hinein und wurde zunächst für einen regulierbaren Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum der Protease verantwortlich gemacht (Wang *et al.*, 2006) (Abbildung 7). Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass die Transmembrandomäne 5 sich nach außen bewegen kann, wodurch sich auch die L5-Schleife der Protease bewegt (Wu *et al.*, 2006). Diese Schleife wird auch als Kappe bezeichnet und bedeckt normalerweise das aktive Zentrum von GlpG von oben (Wang *et al.*, 2006) (Abbildung 7). Demnach wird durch die Bewegung der Transmembrandomäne 5 und der Kappe der Zugang des zu spaltenden Transmembransegments des Substrates zum katalytischen Zentrum der Rhomboidprotease geregelt. Diese laterale Öffnung der Protease stellt den limitierenden Schritt bei der Spaltung des Substrates dar (Baker *et al.*, 2007; Urban and Baker, 2008).

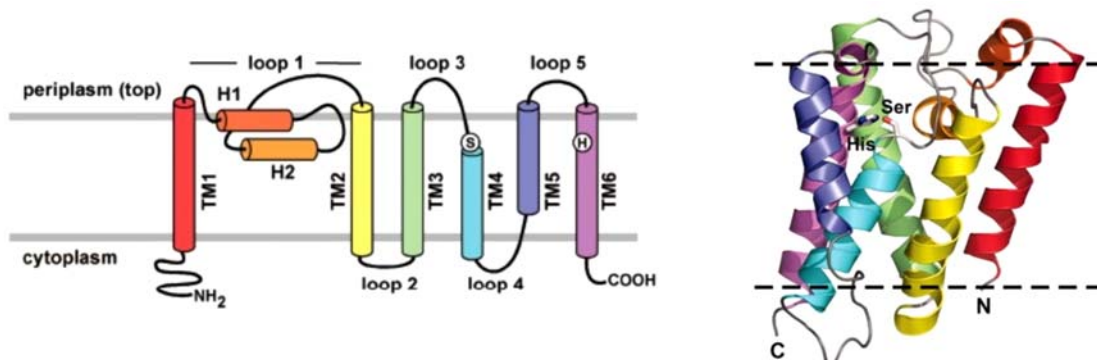


Abbildung 7: Darstellung der Sekundärstrukturelemente der Rhomboidprotease GlpG. links: Schematische Darstellung der Helices von GlpG und deren Orientierung innerhalb der Membran. rechts: Banddiagramm der Kristallstruktur von GlpG mit den katalytischen Aminosäureresten Serin und Histidin. (Ben-Shem *et al.*, 2007)

1.4.2 Substratspezifität von Rhomboidproteasen

Die ersten Untersuchungen zur Substratspezifität von Rhomboidproteasen erfolgten in *D. melanogaster*. Mutationen in Spitz, dem Substrat von Rhomboid-1, zeigten die Bedeutung der Transmembrandomäne von Spitz für dessen Prozessierung. Eine Region von sieben Aminosäureresten innerhalb des Transmembransegments von Spitz ist notwendig und ausreichend für die Spaltung durch Rhomboid-1. Dieses zweigeteilte Spitz-Substratmotiv besteht aus den drei Aminosäureresten Alanin, Serin und Isoleucin am Anfang der Transmembranhelix und Helix-destabilisierenden Aminosäureresten (GA oder GG), welche den Zugang der Protease zum Peptidrückgrat erleichtern könnten (Urban and Freeman, 2003) (Abbildung 8). Solche Reste könnten die Transmembrandomänen der Substrate von Rhomboidproteasen von Transmembranhelices anderer Proteine unterscheiden. Außerdem wurde die Notwendigkeit Helix-destabilisierender Aminosäurereste für den Zugang von Wasser zur Spaltstelle diskutiert (Urban and Freeman, 2003). *In vitro* Analysen mit Rhomboidproteasen aus Bakterien, Invertebraten und Vertebraten zeigten, dass die meisten, aber nicht alle der untersuchten Proteasen Spitz spalten können und dafür das charakteristische Spitz-Substratmotiv benötigen (Urban and Wolfe, 2005).

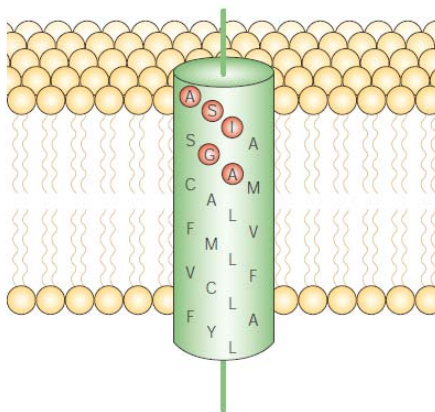


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Spitz-Substratmotifs. Die Transmembrandomäne von Spitz, welche von Rhomboid-1 gespalten wird, bildet eine α -Helix in der Membran. Die Aminosäurereste, die für die Erkennung von Spitz als Substrat benötigt werden, sind rot hervorgehoben. (Freeman, 2004)

Weitere Untersuchungen befassten sich mit Rhomboidproteasen und deren Substraten aus *P. falciparum*. Die Rhomboidprotease PfROM1 kann Spitz aus *D. melanogaster* und das Adhäsine AMA1 aus *P. falciparum* spalten. PfROM4 hingegen prozessiert Adhäsine, die PfROM1 nicht spaltet, kann aber weder Spitz noch AMA1 spalten. Dem gegenüber steht TgROM5, eine Rhomboidprotease aus *T. gondii*. Sie prozessiert sowohl Spitz als auch alle untersuchten Adhäsine aus *P. falciparum*. Die beschriebenen Proteasen zeigen also eindeutig unterschiedliche Substratspezifitäten, in allen Fällen ist jedoch die Transmembrandomäne des Substrats für die Spaltung notwendig (Baker *et al.*, 2006).

Ein Gegenbeispiel zu diesen Studien ist die Prozessierung von Thrombomodulin durch die Rhomboidprotease RHBDL2 aus Vertebraten. Die Transmembrandomäne von Thrombomodulin wurde durch die Transmembrandomänen anderer Proteine ersetzt, was die Spaltung durch RHBDL2 jedoch nicht beeinflusste. Statt dessen wurde der im Cytoplasma lokalisierte Teil von Thrombomodulin als Determinante für die Spaltung des Proteins identifiziert (Lohi *et al.*, 2004).

1.4.3 Die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1

Pcp1 (*processing of cytochrome c peroxidase 1*) ist die einzige bisher bekannte mitochondriale Rhomboidprotease in *S. cerevisiae*. Pcp1 prozessiert zwei Proteine der mitochondrialen IM, Mgm1 (vgl. 1.2) und Ccp1 (Cytochrom c Peroxidase) (Esser *et al.*, 2002; Herlan *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003a). Die Deletion von *PCP1* in Hefezellen führt zum gleichen Phänotyp wie die Deletion von *MGM1*. In beiden Fällen wird die mtDNA nicht vererbt und die Mitochondrien liegen fragmentiert vor (Dimmer *et al.*, 2002; Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003a).

Pcp1 ist mit sieben Transmembrandomänen in der IM der Mitochondrien verankert, wobei sich der N-Terminus des Proteins in der Matrix und der C-Terminus im Intermembranraum befinden (Bornhövd, 2006). Pcp1 besitzt eine N-terminale Signalsequenz, welche beim Import in Mitochondrien durch zwei Prozessierungsschritte von den Proteasen MPP und MIP (mitochondriale intermediäre Protease) entfernt wird (Abbildung 9).

Vermutlich erfolgt der Import von Pcp1 über den konservativen Sortierungsweg. Hierbei würde Pcp1 über die TIM23-Translokase der IM zunächst bis auf die C-terminale, siebte Transmembrandomäne in die mitochondriale Matrix importiert. Während des Imports würde die C-terminale Transmembranhelix in die IM integriert und die verbleibenden sechs hydrophoben Segmente durch Oxa1, von der Matrix aus, ebenfalls in die IM inseriert (Bornhövd, 2006).

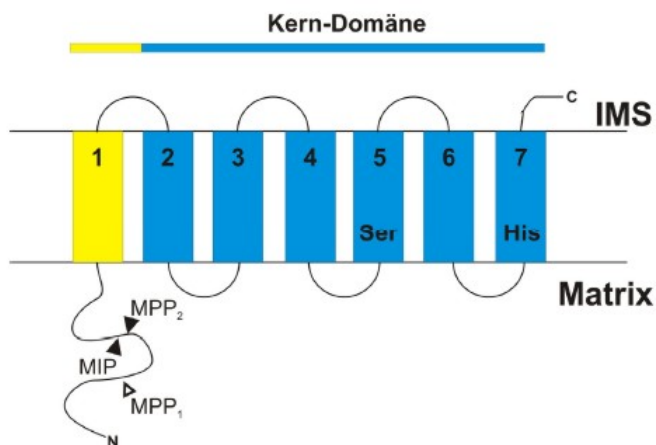


Abbildung 9: Modell der Topologie von Pcp1 in der mitochondrialen Innenmembran. Die Kern-Domäne von Pcp1 ist blau dargestellt, die zusätzlich vorhandene N-terminale Transmembrandomäne ist gelb dargestellt. Die möglichen Spaltstellen durch die Proteasen MPP und MIP sind angegeben. Die Zahlen bezeichnen die Transmembrandomänen von Pcp1. Ser, der katalytische Serin-Rest; His, der katalytische Histidin-Rest; IMS, Intermembranraum. (Bornhövd, 2006)

Die Substratspezifität von Pcp1 wurde bisher nicht untersucht. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass Pcp1 Mgm1 spalten kann, ohne dass die Präsequenz von Mgm1 zuvor von MPP entfernt werden muss (Herlan, 2004). Im Gegensatz zu den anderen bekannten Intramembranproteasen S2P, SPP und Presenilin und im Einklang mit den Ergebnissen zu anderen Rhomboidproteasen, benötigt Pcp1 damit keine vorherige Spaltung des Substrats durch eine andere Protease.

1.4.4 PARL und OPA1, die humanen Homologe von Pcp1 und Mgm1

OPA1 ist das humane Homolog von Mgm1 aus *S. cerevisiae* und für die Autosomal Dominante Optikusatrophie Typ I im Menschen verantwortlich (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000). Wie Mgm1 wird OPA1 für die Fusion von Mitochondrien benötigt (Olichon *et al.*, 2003; Cipolat *et al.*, 2004; Chen and Chan, 2005). Durch Transkription des OPA1 Gens und alternatives Spleißen des Primärtranskriptes entstehen zunächst acht verschiedene mRNA Varianten. Je nach Gewebetyp werden daraus bis zu fünf unterschiedliche Isoformen von OPA1 gebildet, welche sich, ähnlich wie bei Mgm1 in Hefe, in lange und kurze Isoformen unterscheiden lassen.

Die kurzen Isoformen von OPA1 entstehen durch Proteolyse, jedoch war zunächst umstritten, welche Protease für die Spaltung von OPA1 verantwortlich sein könnte. Da das humane Homolog von Pcp1, die mitochondriale Rhomboidprotease PARL (*presenilin associated rhomboid-like*), Pcp1 in Hefe funktionell ersetzen kann (McQuibban *et al.*, 2003; Duvezin-Caubet *et al.*, 2007) und da Pcp1 in Mitochondrien von *S. cerevisiae* Mgm1 spaltet, wurde zunächst vermutet, dass OPA1 von PARL prozessiert würde. Bei der Expression von PARL und OPA1 in einem $\Delta pcp1$ Stamm konnte jedoch keine Prozessierung von OPA1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren verschiedene Untereinheiten der m-AAA Protease, einer ATP-abhängigen Metalloprotease der IM (Atorino *et al.*, 2003), in der Lage, OPA1 zu prozessieren (Duvezin-Caubet *et al.*, 2007). Demnach werden die homologen Komponenten der mitochondrialen Fusion, Mgm1 und OPA1, durch unabhängige, nicht miteinander verwandte Proteasen prozessiert.

Im Gegensatz zu Mgm1 steht auch, dass die langen Isoformen von OPA1 schnell in die kurzen Formen umgewandelt werden können, während l-Mgm1 nicht zu s-Mgm1 gespalten wird, sondern durch einen alternativen Weg entsteht (Herlan *et al.*, 2004; Duvezin-Caubet *et al.*, 2007). Außerdem sind beide Isoformen von Mgm1, jedoch nur die langen Formen von OPA1, notwendig für die mitochondriale Fusion. Diese Beobachtungen führten zu folgendem Modell der Funktion von OPA1: In Mitochondrien mit Fehlfunktionen bioenergetischer Prozesse kommt es zur Prozessierung von

OPA1, wodurch die Fusion der Mitochondrien verhindert und nicht funktionelle mitochondriale Fragmente vom restlichen Netzwerk separiert werden (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Intramembranproteolyse durch Rhomboidproteasen ist ein hoch konservierter Mechanismus, welcher an zahlreichen Prozessen wie z.B. Signalweiterleitung innerhalb von Geweben, Invasion von Wirtszellen durch protozoische Parasiten und Fusion von Mitochondrien in Hefezellen beteiligt ist. Die Substraterkennung nicht-mitochondrialer Rhomboidproteasen hängt in vielen Fällen von Helix-destabilisierenden Aminosäureresten innerhalb des zu spaltenden Transmembransegments ab. Es existiert nur ein Beispiel, in dem die Prozessierung des Substrates von außerhalb der Transmembrandomäne gelegenen Bereichen abhängt. Jedoch wurden in diesem Fall keine vorhandenen Motive der Substraterkennung identifiziert. Da die Substraterkennung mitochondrialer Rhomboidproteasen bisher nicht untersucht wurde, sollten im Rahmen dieser Arbeit Determinanten der Prozessierung von Mgm1 durch die Rhomboidprotease Pcp1 in Mitochondrien von *S. cerevisiae* identifiziert werden. Außerdem sollte die Konservierung solcher Determinanten, in Bezug auf die Spaltung von Mgm1 durch die humane Rhomboidprotease PARL untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse (Prinzip nach (Birnboim and Doly, 1979) im kleinen (Plasmid-Minipräparation) oder großen Maßstab (Plasmid-Midipräparation). Die *E. coli* Zellen wurden jeweils in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Für die Plasmid-Minipräparation wurden jeweils 1 ml einer *E. coli* Kultur für 30 sec bei 16000 g zentrifugiert, das Zellpellet in 250 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl; pH 8,0) resuspendiert und die Zellen mit 250 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) lysiert. Nach vorsichtigem Mischen und Inkubation für 5 min bei RT wurden 250 µl Lösung 3 (3 M Natriumacetat; pH 4,8) zugesetzt, nochmals 5 min bei RT inkubiert und für 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde mit 800 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 16000 g pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml 70 % Ethanol (- 20 °C) gewaschen, getrocknet und in 10 µl sterilem H₂O gelöst.

Die Plasmid-Midipräparation erfolgte mit Hilfe des PureYield™ Midipreparations Kits der Firma Promega. Dazu wurden 50-100 ml einer *E. coli* Kultur zunächst für 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml *Cell Resuspension Solution* (10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl; pH 7,5) resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 6 ml *Cell Lysis Solution* (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS), Mischen und Inkubation für 3 min bei RT lysiert. Danach wurden 10 ml *Neutralization Solution* (759 mM Kaliumacetat, 2,12 M Essigsäure, 4,09 M Guanidinhydrochlorid; pH 4,8) zugegeben, vorsichtig gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 3000 g wurde der erhaltene Überstand auf eine *Clearing Column* gegeben und mit Hilfe einer Vakuum-

Station durch die darin enthaltene Membran gesaugt. Danach wurde die Lösung durch eine weitere Säule (*Binding Column*) gesaugt wobei die DNA an die enthaltene Silica-Membran gebunden wurde. Die an die Säule gebundene DNA wurde durch das Durchsaugen von 20 ml *Column Wash Solution* (60% (v/v) Ethanol, 60 mM Kaliumacetat, 0,04 mM EDTA, 8,3 mM Tris/HCl; pH 7,5) gewaschen. Nachdem das Vacuum für weitere 30-60 sec bestehen blieb wurden 600 µl heißes, Nuklease freies H₂O auf die Membran pipettiert und die Säule auf ein 50 ml Reagiergefäß gesteckt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 min gelöst und im Reagiergefäß gesammelt.

2.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Um genomische DNA aus *S. cerevisiae* zu isolieren wurde eine Kultur des Wildtyp-Stammes W303α über Nacht bei 30 °C in YPD Medium angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 3 min bei 4000 g in einer Avanti J-25-Zentrifuge (Beckman) mit dem Rotor JA-20 geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Waschpuffer (1 M Sorbitol, 100 mM EDTA) resuspendiert, in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt, für 15 sec bei 16000 g in einer Tischzentrifuge pelletiert und wiederum in 1 ml Puffer (1 M Sorbitol, 100 mM EDTA, 100 µg/ml Zymolyase) aufgenommen. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden die Zellen erneut wie zuvor pelletiert, in 1 ml Waschpuffer gewaschen und in 1 ml Lysepuffer resuspendiert (1 % (w/v) SDS, 20 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl; pH 7,5). Es wurde für 30 min bei 65 °C inkubiert, 400 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 16000 g wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt und die DNA mit dem gleichen Volumen Isopropanol gefällt. Es wurde für 10 min bei 16000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 200 µl H₂O aufgenommen, 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und einige Sekunden gevortext. Danach wurde für 5 min bei 16000 g zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reagiergefäß überführt. Dieser Vorgang

wurde noch zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt (vgl. 2.1.9) und in Wasser gelöst.

2.1.3 Amplifizierung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente erfolgte nach dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Ein Ansatz von 100 μ l enthielt dabei je 200 μ M der vier Desoxynukleotide, 75 pmol der beiden Oligonukleotide, 10-50 ng Plasmid-DNA bzw. 100 ng genomische DNA als Matrize sowie 2-3 U einer thermostabilen DNA-Polymerase und 10 μ l des vom Hersteller der Polymerase gelieferten Reaktionspuffers. Für die Amplifikation von längeren DNA-Fragmenten (\geq 1000 bp) wurde die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Promega) verwendet, die eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt (*proofreading*) wodurch die Fehlerrate bei der DNA-Synthese verringert wird. Bei kleineren DNA-Fragmenten (\leq 1000 bp) kam die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* zum Einsatz (New England BioLabs), welche keine *proofreading*-Aktivität besitzt aber eine höhere Prozessivität. Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) zunächst für 5 min bei 94 °C inkubiert, um die doppelsträngige Matrizen-DNA zu denaturieren. Danach folgten 30 Zyklen aus je 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Anlagerung der Oligonukleotide an die Matrizen-DNA bei 45-55 °C und 1-6 min Synthese der DNA bei 72 °C. Zum Abschluss wurde noch einmal 10 min bei 72 °C inkubiert, um die noch unvollständig synthetisierten DNA-Fragmente zu vervollständigen. Die Temperatur für das Anlagern der Oligonukleotide wurde mittels der "2+4-Regel" bestimmt (G/C = 4 °C, A/T = 2 °C). Die Dauer der DNA-Synthese wurde mit Hilfe der jeweiligen Synthese-Geschwindigkeiten der verwendeten Polymerasen abgeschätzt (*Pfu*: 2 min je 1 kb, *Taq*: 1 min je 1 kb). Die Entstehung des entsprechenden PCR-Produktes wurde anschließend auf einem Agarosegel überprüft und die DNA-Fragmente über ein Mikrozentrifugationsröhrchen (vgl. 2.1.5) oder ein präparatives Agarosegel isoliert.

Für die gezielte Veränderung von DNA-Sequenzen auf einem Plasmid wurde eine Mutagenese-Strategie (4-Primer-Mutagenese, vgl. 2.1.16) angewendet, bei der zwei DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert wurden. Diese waren für mindestens 25 bp komplementär. Die DNA-Fragmente wurden anschließend als Matrize in einer weiteren PCR eingesetzt. Durch Zugabe der beiden äußeren, am 3'- bzw. 5'-Ende der DNA-Fragmente gelegenen Oligonukleotide entstand ein Fusions-Produkt, welches bei der PCR amplifiziert wurde.

2.1.4 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (New England BioLabs). Für den Verdau wurde der entsprechende, vom Hersteller zur Verfügung gestellte, zehnfach konzentrierte Puffer verwendet und jeweils 1-2 U des Restriktionsenzym eingesetzt. Es wurden jeweils 5-10 µl einer Plasmid-Midipräparation (vgl. 2.1.1) oder 2 µl einer Plasmid-Minipräparation (vgl. 2.1.1) verdaut, wobei letzterer Reaktion zusätzlich 50 µg/ml Ribonuklease A zugesetzt wurden.

2.1.5 Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugations-säulchen

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels Mikrozentrifugationssäulchen der Firma PEQLAB (E.Z.N.A. *Gel Extraction Kit*). Dazu wurden dem PCR-Ansatz zunächst 400 µl Binde-Puffer zugegeben. Die Lösung wurde dann für 1 min bei 9000 g in einer Tischzentrifuge in einem Mikrozentrifugationssäulchen zentrifugiert, sodass die DNA an das Säulenmaterial binden konnte. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde das Säulenmaterial zwei mal mit 600 µl SPW-Waschpuffer gewaschen. Hierfür wurden die Säulchen je 2 min bei RT inkubiert und anschließend der Waschpuffer für 1 min bei 9000 g durch das Säulenmaterial zentrifugiert. Zum Trocknen wurde nochmals auf die gleiche

Weise zentrifugiert. Die DNA wurde danach mit 50 µl sterilem H₂O und Zentrifugation für 1 min bei 9000 g in ein 1,5 ml Reagiergefäß eluiert.

2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der horizontalen Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach getrennt. Dazu wurden 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 40 mM Tris/HCl/Acetate; pH 7,5) aufgekocht bis die Agarose gelöst war und bei 65 °C gelagert. Der Agaroselösung wurden nach dem Gießen der Gele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Die DNA wurde mit 5-fach konzentriertem Auftragspuffer (Endkonzentration: 6 % (w/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 0,01 % (w/v) Xylencyanolblau; pH 8) versetzt, auf das Agarosegel geladen und bei einer Feldstärke von 15 V/cm aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden mit UV-Licht in einem Transiluminator (GDS-7900 System, UVP) sichtbar gemacht. Zum Abschätzen der Größe der jeweiligen DNA-Fragmente wurden Größenstandards (DNA Ladder 1 kb und DNA Ladder 100 bp von New England BioLabs) geladen.

2.1.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die auf einem Agarosegel getrennten DNA-Banden wurden zunächst unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A. Gel Extraction Kits der Firma PEQLAB. Dazu wurden 800-1000 µl Binde-Puffer zu den Agarosegel Stücken gegeben und bei 65 °C unter Schütteln inkubiert bis die Agarose gelöst war. Die Lösung wurde auf ein Mikrozentrifugationssäulchen gegeben und 1 min bei 9000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die an das Säulenmaterial gebundene DNA zwei Mal mit 600 µl SPW-Waschpuffer gewaschen. Dazu wurde das Säulchen je 2 min mit dem Waschpuffer bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei 9000 g zentrifugiert. Zum Trocknen des Säulenmaterials wurde ein weiteres Mal wie oben beschrieben

zentrifugiert. Die DNA wurde mit 50 μ l sterilem H₂O durch erneute einminütige Zentrifugation bei 9000 g eluiert.

2.1.8 Ligation von DNA

Für die Ligation zweier DNA-Fragmente wurde zunächst deren ungefähre Menge über ein Agarosegel abgeschätzt. Ein Reaktionsansatz mit 50-100 ng linearisierter Vektor-DNA und einem 3-5 fachen molaren Überschuss des zu klonierenden Fragments wurde hergestellt. Ein Ligationsansatz von 10 μ l enthielt außerdem 1 μ l T4-DNA-Ligase sowie 1 μ l des entsprechenden zehnfach konzentrierten Ligasepuffers (beides von New England BioLabs). Es wurde für 2 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.1.9 Ethanolfällung

Um die Konzentration von DNA in einer Lösung zu erhöhen bzw. unerwünschte Salze zu entfernen, wurde DNA (z.B. Ligationsansätze) mit Hilfe von Ethanol gefällt. Hierfür wurden der DNA 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat Lösung (Endkonzentration 300 mM) beigemischt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen 100 % Ethanol (-20 °C) wurde die DNA präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 18000 g und 4 °C wurde die DNA mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem H₂O aufgenommen (bei präzipitierten Ligationsansätzen 10 μ l).

2.1.10 Präparation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

E. coli XL1-blue Zellen wurden auf einer Agarplatte über Nacht und anschließend erneut über Nacht in 50 ml flüssigem LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 500 ml LB-Medium mit dieser Vorkultur (1:100) angeimpft und bis zu einer OD_{578} von 0,5 angezogen. Danach wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend

durch Zentrifugation für 15 min bei 4000 g und 0 °C geerntet. Die Zellen wurden zunächst mit 500 ml, dann mit 250 ml und zuletzt mit 50 ml 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Dazu wurde jeweils für 15 min bei 4000 g und 0 °C zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 500 µl 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren.

2.1.11 Transformation von *E. coli* Zellen

Um elektrokompetente *E. coli* Zellen mit DNA zu transformieren, wurde zunächst ein Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut. Es wurden 1 µl eines Ligationsansatzes, 5 µl eines präzipitierten Ligationsansatzes oder 0,5 µl einer Plasmid-Midipräparation (vgl. 2.1.1) zu den Zellen gegeben. Zellen und DNA wurden in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und im Elektroporationsgerät (2,5, kV, 400 Ω, 25 µF) transformiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt, in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und für 30-60 min bei 37 °C geschüttelt, sodass sich die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin ausbilden konnte. Dann wurden die Zellen auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.12 Transformation von *S. cerevisiae*

Die entsprechenden Stämme von *S. cerevisiae* wurden in 50 ml des jeweiligen flüssigen Mediums (z.B. YPD) angeimpft und die Kulturen über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt und nach einigen Stunden bei einer OD_{600} von 0,5-1 in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 10 min bei 3000 g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 25 ml sterilem H₂O gewaschen, das Zellpellet in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Alternativ wurden die Stämme jeweils auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde etwa eine Impföse voll Zellen von der Platte genommen und die Zellen in 1 ml sterilem H₂O resuspendiert. Nach

Zentrifugation für 30 sec bei 16000 g in einer Tischzentrifuge wurde das Zellpellet in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert.

Die so geernteten Zellen wurden erneut bei 16000 g für 30 sec zentrifugiert und in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Für einen Transformationsansatz wurden jeweils 50 µl der Zellsuspension eingesetzt. Die Zellen wurden dafür noch einmal für 30 sec bei 16000 g abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Es wurden 240 µl 50 % (w/v) Polyethylenglycol 3350 auf das Zellpellet gegeben und jeweils 36 µl 1 M Lithiumacetat sowie 5 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) vorsichtig aufgetropft. Die zu transformierende DNA (5-10 µl einer Plasmid-Midipräparation oder 2-5 µl Vektor- und Insert-DNA für die homologe Rekombination) wurde in 80 µl H₂O (Endvolumen) aufgenommen und ebenfalls zum Transformationsansatz gegeben. Für eine Negativkontrolle wurden 80 µl H₂O ohne DNA eingesetzt. Danach wurde alles durch Pipettieren gut gemischt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 20 min bei 42 °C unter leichtem Schütteln. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 30 sec bei 16000 g pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 100 µl sterilem H₂O resuspendiert. Die Zellen wurden auf entsprechende Selektivplatten plattiert.

2.1.13 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration von DNA in wässriger Lösung zu bestimmen, wurde die Extinktion bei 260 nm (oD_{260}) in einem Spektrophotometer gemessen. DNA aus Plasmid-Midipräparationen wurde hierfür 1:50 in H₂O verdünnt und in eine geeignete Quarzküvette überführt. Eine oD_{260} von 1 entspricht 50 ng/ml doppelsträngiger DNA. Die Konzentration der DNA wurde unter Einbezug des Verdünnungsfaktors von einem Programm des Spektrophotometers berechnet.

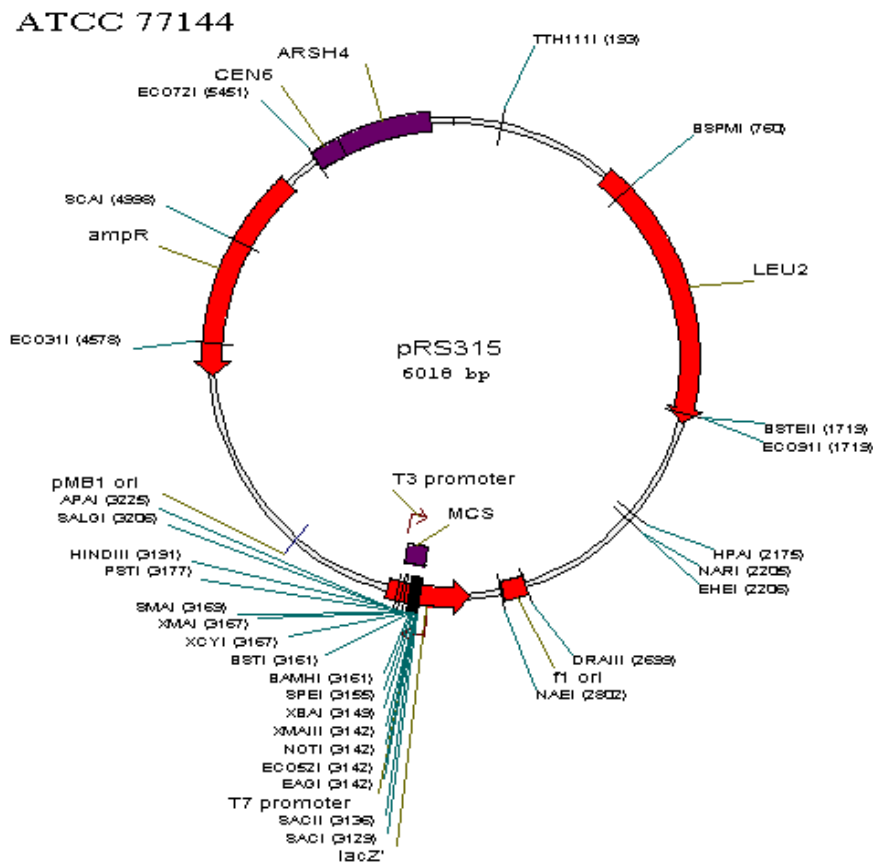
2.1.14 DNA-Sequenzierung

Für die Bestimmung der Sequenz eines DNA-Fragments wurden entsprechende Mengen einer Plasmid-Midipräparation (vgl. 2.1.1) und passender Oligonukleotide zu der Firma Medigenomix (Martinsried,

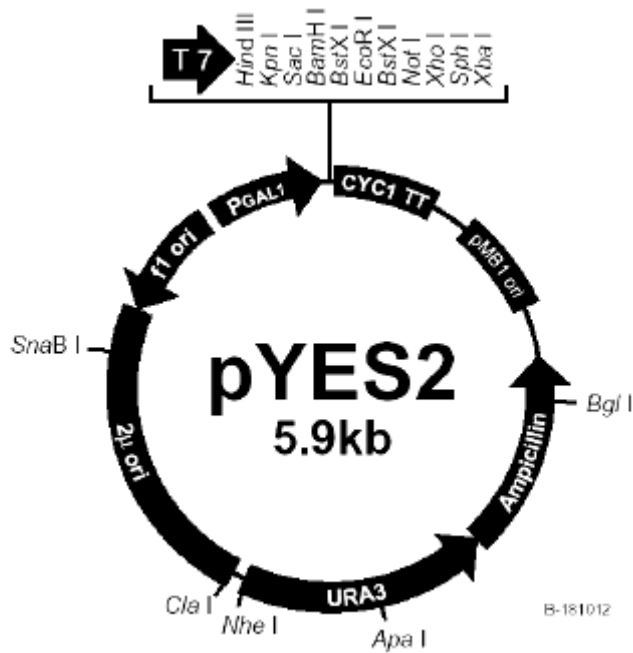
Deutschland) verschickt, welche die DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide durchführte. Zur Auswertung der erhaltenen DNA-Sequenzen wurden die Programme DNAMAN (Version 4.22, Lynnon BioSoft., Pointe-Claire, Kanada) und Chromas (Version 1.45, Conor McCarthy, Southport, Australien) verwendet.

2.1.15 Verwendete Vektoren

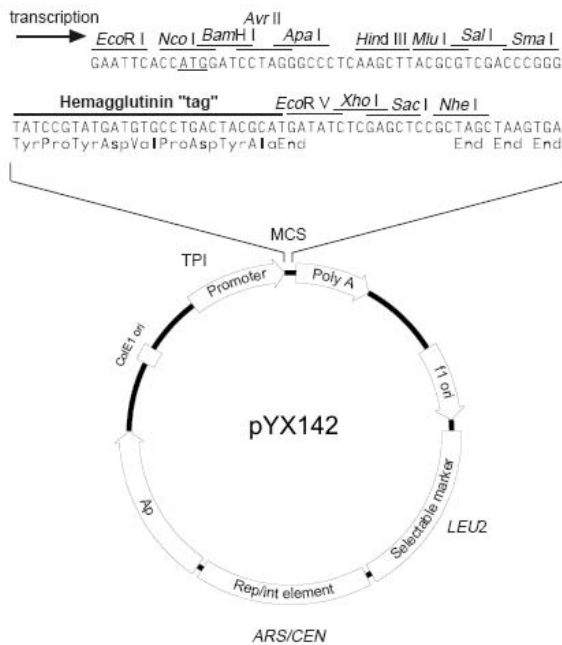
2.1.15.1 *pRS315* (Sikorski and Hieter, 1989)



2.1.15.2 *pYES2 (Invitrogen)*



2.1.15.3 *pYX142 (Novagen)*



2.1.16 Klonierungsstrategien

2.1.16.1 *pRS315proMgm1fl* (Herlan et al., 2003)

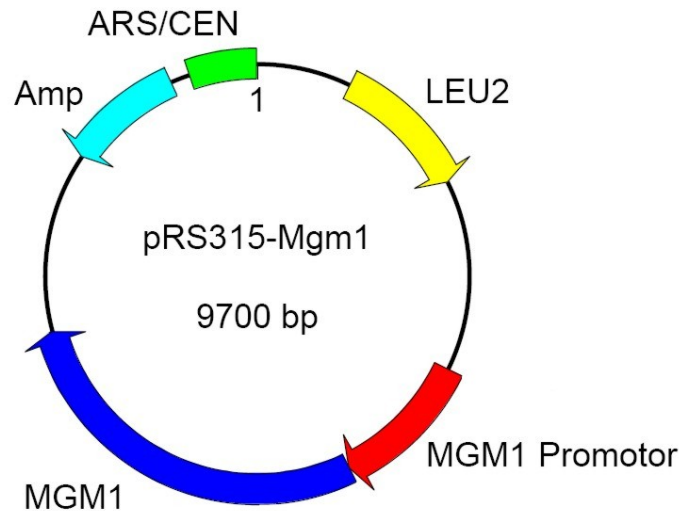


Abbildung 10: Schematische Darstellung von *pRS315proMgm1fl*.

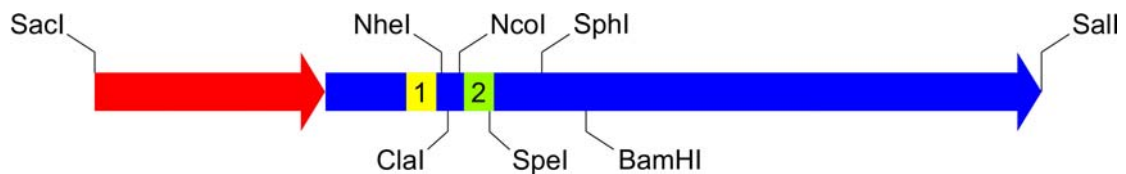


Abbildung 11: Schematische Darstellung des *Mgm1*-Gens. Roter Pfeil, endogener Promotor von *Mgm1*; blauer Pfeil, *Mgm1*-Gen; 1, Transmembrandomäne von *Mgm1* (TM); 2, zweites hydrophobes Segment von *Mgm1*, welches die *Pcp1*-Spaltstelle enthält (RCR).

Mit den Primern *Mgm1proup* und *Mgm1NcoI/SpeIrev* bzw. *Mgm1Sallrev* und *Mgm1SpeI fwd* (Tabelle 1) und dem Plasmid *pRS315proMgm1fl* (Abbildung 10) (Herlan et al., 2003) als Matrize wurden mittels PCR zwei DNA-Fragmente amplifiziert. Diese wurden über die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *SpeI* bzw. *Sall* und *SpeI* in das Plasmid *pRS315* (2.1.15.1) kloniert. Dadurch entstand *pRS315proMgm1fl_{mut}* (Abbildung 11), welches die Expression von *Mgm1* in Hefezellen unter dem endogenen *Mgm1*-Promotor ermöglichte. Durch die Klonierung wurde die DNA-Sequenz des *Mgm1*-Gens so verändert, dass die zwei

Restriktionsschnittstellen SpeI und NcoI entstanden (Abbildung 11). Diese Mutationen führten zu keiner Veränderung der Proteinsequenz von Mgm1 (stille Mutationen). Die erzeugten Restriktionsschnittstellen ermöglichten die Konstruktion weiterer Varianten von pRS315proMgm1fl_{mut} mit unterschiedlichen Punktmutationen, Deletionen, Insertionen und Austauschen (vgl. 2.1.16.2). Soweit nicht anders angegeben, wurde pRS315proMgm1fl_{mut} bei den Klonierungen aller weiteren Mgm1-Varianten als Matrize für die PCR eingesetzt.

Primer	Restriktions-schnittstelle	Sequenz (5' - 3')
Mgm1proup	SacI	CCCCGAGCTCCAAGTCATGTGAAGGATGGAC
Mgm1NcoI/SpeIrev	NcoI/SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGTT GGCACCGTCCATCGTTTCCATGGCCACCGT CTTG
Mgm1Sallrev	Sall	CCCCGTCTGACTCATAAATTTTTGGAGACGCC
Mgm1SpeI fwd	SpeI	CCCCACTAGTCTCGACGATGACGAAAGTAAG

Tabelle 1: Primer für die Klonierung von pRS315proMgm1fl-mut.

2.1.16.2 Varianten von pRS315-Mgm1fl

Für die Klonierung der Mgm1-Varianten pRS315proMgm1_{G156A}, -P159A, -G156A/P159A, -G156V, -P156V, -T160A, -A161F, -T162A, -A165F/A166F, -T160A/A161F/T162A, -T160V, -A161V, -T162V, -A165V/A166V, -D155A, -D155K, -ΔGND und -V_{VLL} wurden DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde der Primer Mgm1proup (Tabelle 1) und der entsprechende, in Tabelle 2 aufgeführte Primer verwendet, welcher die jeweils gewünschte Sequenzänderung enthielt. Die PCR-Produkte wurden über die Restriktionsschnittstellen SacI und SpeI in das ebenso geschnittene Plasmid pRS315proMgm1fl-mut ligiert.

Primer	Restriktions-schnittstelle	Sequenz (5' - 3')
Mgm1G156Arev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGTTGG CACCGTTGCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1P159Arev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGTTGC CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1G156A/ P159Arev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGTTGC CACCGTTGCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1G156Vrev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGTTGG CACCGTAACATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1P156Vrev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGTAAC CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1T160Arev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGCTGG CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1A161Frev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAAAAGTTGG CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1T162Arev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGCAGCAGTTGG CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1A165F/ A166Frev	SpeI	CCCCACTAGTGAAGAATATTAGAGTAGCAGTTGG CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1T160A/ A161F/T162Arev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGCAAAAGCTGG CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1T160Vrev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAACTGG CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1A161Vrev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAACAGTTGG CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1T162Vrev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAACAGCAGTTGG CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1A165V/ A166Vrev	SpeI	CCCCACTAGTAACAACACTATTAGAGTAGCAGTTGG CACCGTTCCATCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1D155Arev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGTTGG CACCGTTCCAGCGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1D155Krev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGTTGG CACCGTTCCCTTGTTTCCATGGCCACCGTCTTG
Mgm1ΔGNDrev	SpeI	CCCCACTAGTAGCGGCTATTAGAGTAGCAGTTGG CACCGTTCCATGGCCACCGTCTTGTGACTTATCA CC
Mgm1VVLLrev	SpeI	CCCCACTAGTCAAGAGTACCACAGCGGCTATTAG AGTAGCAGTTGG

Tabelle 2: Primer für die Klonierung von pRS315proMgm1_{G156A}, -P159A, -G156A/P159A, -G156V, -P156V, -T160A, -A161F, -T162A, -A165F/A166F, -T160A/A161F/T162A, -T160V, -A161V, -T162V, -A165V/A166V, -D155A, -D155K, -ΔGND und -VVLL.

Die Klonierung von pRS315proMgm1_{Dld1} und pRS315proMgm1_{TM} erfolgte über eine 4-Primer-Mutagenese Strategie. Dazu wurden zunächst jeweils zwei PCR-Produkte erzeugt, welche mit Mgm1proup (Tabelle 1) und dem entsprechenden antisense-Primer (Tabelle 3) und Mgm1BamHlrev (Tabelle 4) und dem entsprechenden sense-Primer (Tabelle 3) amplifiziert wurden. Diese beiden DNA-Fragmente wurden anschließend in einer weiteren PCR als Matrize eingesetzt. Hierbei wurden ebenfalls die Primer Mgm1proup und Mgm1BamHlrev verwendet. Dieses dritte PCR-Produkt

wurde mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen NheI und SphI in pRS315proMgm1_{fl_{mut}} kloniert. Die so entstandenen Mgm1-Varianten enthielten an Stelle der Basenpaare 466-507 von Mgm1 (entspricht den Aminosäureresten 156-169) die Basenpaare 136-183 von Dld1 (entspricht den Resten 46-61; pRS315proMgm1_{Dld1}) bzw. die Basenpaare 280-333 von Mgm1 (entspricht Aminosäureresten 94-111; pRS315proMgm1_{TM}). Dadurch wurde der zweite hydrophobe Bereich im N-terminalen Teil von Mgm1 durch die Transmembrandomäne von Dld1 bzw. die Transmembrandomäne von Mgm1 ausgetauscht.

Primer	Restriktions-schnittstelle	Sequenz (5' - 3')
Dldsense		CTTCAGCTACTCTATTTCGGTTATTTGTTTCGCTG ACGATGACGAAAGTAAG
Dldantisense		AACCGAATAGAGTAGCTGAAGAGGCGATGACA GAGTAATCGTTTCCATGACCACC
tm1sense		GGCGGGATGGCTGCTGCAGGGAGTTATATAGC TTATGACGATGACGAAAGTAAG
tm1antisense		GCAGCAGCCATCCCGCCACCCACATATATGGG TAAATCGTTTCCATGACCACC

Tabelle 3: Primer für die Klonierung von pRS315proMgm1_{Dld1} und pRS315proMgm1_{TM}.

Die Mgm1-Varianten pRS315proMgm1_{ΔD/E}, -Mgm1_{ΔDDDE}, -Mgm1_{5U}, -Mgm1_{5P}, -Mgm1_{9U}, Mgm1_{9P}, -Mgm1_{13U} und -Mgm1_{13P} wurden kloniert indem PCR-Produkte mit den Primern Mgm1BamHlrev und dem entsprechenden Mgm1fwd Primer (Tabelle 4) amplifiziert wurden. Die DNA-Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SpeI in den ebenso verdauten Vektor pRS315proMgm1_{fl_{mut}} kloniert. Durch die DNA-Sequenz der Primer Mgm1_{ΔD}/Estretchfwd bzw. Mgm1_{ΔDDDE}fwd wurden Deletionen in die Konstrukte eingeführt, welche zum Verlust der Aminosäurereste 182-194 (ΔD/E) bzw. 170-173 (ΔDDDE) von Mgm1 führten. Im Falle von Mgm1_{5U} bzw. Mgm1_{5P} wurden die Reste 182-186 mittels der veränderten Basensequenz der Primer durch ungeladene (5U) bzw. positiv geladene (5P) Reste ersetzt. Auf gleiche Weise wurden die Aminosäurereste 182-190 der Mgm1-Varianten Mgm1_{9U} und Mgm1_{9P} sowie die Reste 182-194 der Varianten Mgm1_{13U} und Mgm1_{13P} durch ungeladene bzw.

positiv geladene Reste ausgetauscht (vgl. 3.1.6). pRS315proMgm1 Δ TM Δ D/E wurde durch Subklonierung erzeugt. Dafür wurde mittels SacI und NheI ein Fragment aus pRS315proMgm1 Δ tm1 (Herlan) ausgeschnitten und in das ebenso verdaute Plasmid pRS315proMgm1 Δ D/E eingesetzt.

Primer	Restriktions-schnittstelle	Sequenz (5' - 3')
Mgm1BamHIrev	BamHI	CCCCGGATCCACCAAATCCAGTTTGGTAATGAC ACC
Mgm1 Δ D/Estretch fwd	SpeI	CCCCACTAGTCTCGACGATGACGAAAGTAAGAG GCAAGGAGATCCTAAAAACGATTCTGTAGATACA ACGC
Mgm1 Δ DDDEfwd	SpeI	CCCCACTAGTCTCAGTAAGAGGCAAGGAGATCC
Mgm1D/E5USpel fwd	SpeI	CCCCACTAGTCTCGACGATGACGAAAGTAAGAG GCAAGGAGATCCTAAATTTGTTGGTACTGCTGAT GATGATGACGAGGATGATGAAAACGATTCTG
Mgm1D/E5PSpel fwd	SpeI	CCCCACTAGTCTCGACGATGACGAAAGTAAGAG GCAAGGAGATCCTAAAAGAAGGAAGCGTAAAGA TGATGATGACGAGGATGATGAAAACGATTCTG
Mgm1D/E9USpel fwd	SpeI	CCCCACTAGTCTCGACGATGACGAAAGTAAGAG GCAAGGAGATCCTAAATTTGTTGGTACTGCTCAA ATTGGATCTGAGGATGATGAAAACGATTCTG
Mgm1D/E9PSpel fwd	SpeI	CCCCACTAGTCTCGACGATGACGAAAGTAAGAG GCAAGGAGATCCTAAAAGAAGGAAGCGTAAAAG GAAACGTAGAGAGGATGATGAAAACGATTCTG
Mgm1D/E13USpel fwd	SpeI	CCCCACTAGTCTCGACGATGACGAAAGTAAGAG GCAAGGAGATCCTAAATTTGTTGGTACTGCTCAA ATTGGATCTCCAGTTCTTCAAACGATTCTGTAG ATACAACG
Mgm1D/E13PSpel fwd	SpeI	CCCCACTAGTCTCGACGATGACGAAAGTAAGAG GCAAGGAGATCCTAAAAGAAGGAAGCGTAAAAG GAAACGTAGAAGAAAGAAGAGAAAACGATTCTGT AGATACAACG

Tabelle 4: Primer für die Klonierung von pRS315proMgm1 Δ D/E, - Δ DDDE, -5U, -5P, -9U, -9P, -13U und -13P.

Für die Klonierung von pRS315proMgm1_{ITS2x} und pRS315proMgm1_{ITS3x} wurden die Primer Mgm1ITSup und Mgm1ITSdn (Tabelle 5) in einer PCR eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment enthielt die bp 346 bis 459 von Mgm1 (Aminosäurereste 116 bis 153). Mit Hilfe der Restriktionsschnittstelle NheI (nach Nukleotid 346 von Mgm1) wurde das Insert einmal bzw. zweimal in pRS315proMgm1_{fl_{mut}} inseriert, sodass der so genannte ITS-Bereich (zwischen TM und RCR von Mgm1) verdoppelt bzw. verdreifacht wurde. Die Orientierung und Kopienzahl des inserierten Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft.

pRS315proMgm1 $\Delta_{115-150}$ und pRS315proMgm1 $\Delta_{132-150}$ wurden kloniert indem ein PCR-Produkt mit den Primern Mgm1proup (Tabelle 1) und Mgm1 $\Delta_{115-150}$ bzw. Mgm1 $\Delta_{132-150}$ (Tabelle 5) amplifiziert wurde. Dieses wurde in das mit SacI und NcoI verdaute Plasmid pRS315proMgm1fl_{mut} kloniert, wodurch die entsprechenden Deletionen entstanden.

Die Klonierung von pRS315proMgm1 $\Delta_{115-131}$ erfolgte über einen Zwischenschritt. Es wurde zunächst die Variante pRS315proMgm1 $\Delta_{118-131}$ kloniert und diese dann in pRS315proMgm1 $\Delta_{115-131}$ umgewandelt. Dazu wurde ein PCR-Fragment mit den Primern Mgm1 $\Delta_{118-131}$ (Tabelle 5) und Mgm1BamHIrev (Tabelle 4) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NheI und BamHI in pRS315proMgm1fl_{mut} inseriert. In das so entstandene Plasmid pRS315proMgm1 $\Delta_{118-131}$ wurde über die Restriktionsschnittstellen SacI und ClaI ein PCR-Produkt eingefügt, welches mit Hilfe der Primer Mgm1 $\Delta_{115-131}$ (Tabelle 5) und Mgm1proup (Tabelle 1) amplifiziert wurde.

Für das Konstrukt pRS315proMgm1 $\Delta_{121-140}$ wurde eine PCR mit den Primern Mgm1 $\Delta_{121-140}$ fwd (Tabelle 5) und Mgm1BamHIrev (Tabelle 4) durchgeführt. Das so entstandene PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen NheI und BamHI in das ebenso verdaute Plasmid pRS315proMgm1fl_{mut} inseriert.

Bei der Klonierung von pRS315proMgm1_{I27} wurden die bp 352-450 von Mgm1 (entspricht Aminosäureresten 118-150) durch ein DNA-Fragment gleicher Größe mit einer anderen DNA-Sequenz ersetzt. Dazu wurde durch eine PCR mit den Primern I27up und I27dn (Tabelle 5) und dem Plasmid pG4Su9(1-94)I27 (Okamoto 2002) als Matrize ein DNA-Fragment amplifiziert, welches für die Aminosäurereste 5265-5297 des humanen Muskelproteins Titin codiert. Dieses wurde mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen NheI und NcoI in das ebenso verdaute Konstrukt pRS315proMgm1fl_{mut} eingesetzt.

pRS315proMgm1 $\Delta_{TM\Delta_{132-150}}$ wurde durch Subklonierung erzeugt. Dafür wurde mittels SacI und NheI ein Fragment aus pRS315proMgm1 Δ_{tm1} (Herlan *et al.*, 2004) ausgeschnitten und in das ebenso verdaute Plasmid

pRS315proMgm1 Δ 132-150 eingesetzt. Die Klonierung von pRS315proMgm1 Δ TM Δ 112-149 erfolgte mittels PCR mit den Primern Mgm1proup (Tabelle 1) und Mgm1 Δ TM Δ 112-149 (Tabelle 5). Das PCR-Produkt wurde mit SacI und NcoI verdaut und in SacI/NcoI geschnittenes pRS315proMgm1fl_{mut} eingesetzt.

Primer	Restriktions-schnittstelle	Sequenz (5' - 3')
Mgm1ITSup	NheI	GGGGCTAGCTCTTTTACTAAGG
Mgm1ITSdn	NheI	GGGGCTAGCTCCATGACCACCGTCTTGTGAC
Mgm1 Δ 115-150rev	NcoI	GGGGCCATGGCCTTCCATCTTATAAGCTATATACTCC
Mgm1 Δ 118-131fwd	NheI	CCCCGCTAGCGAATCGATGAAGGAAAAG
Mgm1 Δ 115-131rev	Clal	CCCATCGATTCTTCCATCTTATAAGCTATATACTCC
Mgm1 Δ 132-150rev	NcoI	GGGGCCATGGCCACCTAAATCCTTGATTCCG
Mgm1 Δ 121-140fwd	NheI	CCCCGCTAGCTCTTTTACTATGTTTTCCGGTGATAAGTCAC
I27up	NheI	CCCCGCTAGCGTGTTTGTGGTGAACAGCC
I27dn	NcoI	GGGGCCATGGCCAGGGGAAGCTGTCAAAGGCTGTCC
Mgm1 Δ 91-149rev bzw. Mgm1 Δ TM Δ 112-149rev	NcoI	GGGGCCATGGCCACCTTTAGATATAATTTTAGGAAAATGTG

Tabelle 5: Primer für die Klonierung von pRS315proMgm1ITS_{2x}, -ITS_{3x}, - Δ 115-150, - Δ 118-131, - Δ 115-131, - Δ 132-150, - Δ 121-140, -I27 und - Δ TM Δ 112-149.

2.1.16.3 Varianten von pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR

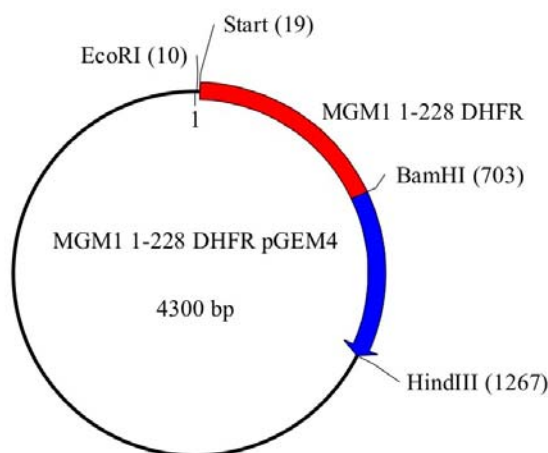


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Plasmids pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR. rot, Aminosäurereste 1-228 von Mgm1; blau, Dihydrofolatreduktase (DHFR) aus Mäusen.

Mit Hilfe von pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR können *in vitro* radioaktiv markierte Vorläuferproteine erzeugt werden, welche die ersten 228 Aminosäurereste von Mgm1 gekoppelt an die Dihydrofolatreduktase aus Mäusen (DHFR) enthalten. Der Bereich von Mgm1 umfasst dabei die mitochondriale Präsequenz, die Transmembrandomäne (TM), die Rhomboid cleavage region (RCR) und den D/E-Bereich des Proteins. Um Varianten von pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR zu erzeugen, welche einige der Mutationen tragen wie für die Varianten von pRS315proMgm1fl beschrieben (2.1.16.2), wurden PCR-Produkte mit Hilfe der Primer Mgm1up und Mgm11-228dn (Tabelle 6) generiert. Als Matrize dienten pRS315proMgm1 Δ D/E, Δ 115-150, Δ 132-150 bzw. Δ ITR_{2x}. Die PCR-Fragmente wurden mit EcoRI und BamHI verdaut und in das ebenso geschnittene Plasmid pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR ligiert. Somit entstanden pGEM4-Mgm1_{1-228- Δ D/E}DHFR, pGEM4-Mgm1_{1-228- Δ 115-150}DHFR, pGEM4-Mgm1_{1-228- Δ 132-150}DHFR und pGEM4-Mgm1_{1-228-ITR_{2x}}DHFR.

Primer	Restriktions-schnittstelle	Sequenz (5'-3')
Mgm1up	EcoRI/SacI	CCCCGAATTCGAGCTCGCCATGAGTAATTCTACTTCAT TAAGG
Mgm11-228dn	BamHI	CCCCGGATCCATGTGCAGAAGAAGAGTCC

Tabelle 6: Primer für die Klonierung verschiedener Varianten von pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR.

2.1.16.4 Varianten von pYX142-Ccp1

Die Klonierung der Plasmide pYX142Ccp1 und pYX142Ccp1-FLAG erfolgte mittels PCR. Dafür wurde in beiden Fällen der Primer Ccp1EcoRI_{fw} (Tabelle 7) und genomische DNA aus dem Hefestamm BY4742 als Matrize verwendet. Für die PCR zur Klonierung von pYX142Ccp1 kam der Primer Ccp1SacI_{rev} (Tabelle 7) zum Einsatz, im Falle von pYX142Ccp1-FLAG wurde der Primer Ccp1FLAG_{SacI}_{rev} (Tabelle 7) verwendet. Dadurch wurde eine DNA-Sequenz die für das FLAG-Epitop codiert an das Ccp1-Gen angefügt. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden in das mit EcoRI und SacI verdaute Plasmid pYX142 (2.1.15.3, Novagen) eingefügt, welches die

Expression von Proteinen unter dem starken Triosephosphat-Isomerase-Promotor ermöglicht.

Für pYX142Ccp1 Δ EDDE und pYX142Ccp1 Δ EDDE-FLAG wurde ebenfalls eine PCR durchgeführt, wobei die Primer Ccp1EcoRI _{fwd} und Ccp1 Δ EDDE _{Apal}rev (Tabelle 7) und genomische DNA des Hefestammes BY4742 als Matrize verwendet wurden. Die DNA-Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und Apal in die Konstrukte pYX142Ccp1 und pYX142Ccp1-FLAG eingefügt, wodurch die Basenpaare 295-306, welche für die Aminosäurereste 99-102 (EDDE) codieren, deletiert wurden.

Primer	Restriktions-schnittstelle	Sequenz (5' - 3')
Ccp1EcoRI _{fwd}	EcoRI	CCCCGAATTCATGACTACTGCTGTTAGGCTTTT ACC
Ccp1 _{SacI} rev	SacI	CCCCGAGCTCCTATAAACCTTGTTCTCTAAAG TC
Ccp1FLAG _{SacI} rev	SacI	CCCCGAGCTCCTTATCATCGTCATCTTTATAAT CTAAACCTTGTTCTCTAAAGTC
Ccp1 Δ EDDE _{Apal} rev	Apal	CGTAGGGCCCATAGCCTATATAGTTGTCATACC TCAGCTTGAG TGCAATCGC

Tabelle 7: Primer für die Klonierung von pYX142Ccp1, pYX142Ccp1-FLAG, pYX142Ccp1 Δ EDDE und pYX142Ccp1 Δ EDDE-FLAG.

2.1.17 Weitere verwendete Plasmide

2.1.17.1 *pYES2-PARL (Schäfer et al., Manuskript eingereicht)*

Auf diesem Plasmid ist die Splice-Variante 1 der humanen mitochondrialen Rhomboidprotease PARL codiert. Durch den *GAL1*-Promotor des pYES2-Plasmids (vgl. 2.1.17.1) kann PARL abhängig von Galactose überexprimiert werden.

2.1.17.2 *pVT100U-mtGFP (Westermann and Neupert, 2000)*

pVT100U-mtGFP codiert für ein Fusionsprotein aus der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 der F₀F₁-ATPase aus *Neurospora crassa*

(Aminosäurereste 1-69) und GFP. Durch die Präsequenz wird GFP in die mitochondriale Matrix importiert. Der 2 μ Replikationsursprung sorgt für eine hohe Kopienzahl des Plasmids. Dadurch und wegen des konstitutiven *ADH*-Promotors (Alkoholdehydrogenase) wird das mtGFP Fusionsprotein sehr stark exprimiert, was eine deutliche Fluoreszenzfärbung der Mitochondrien in lebenden Hefezellen ermöglicht.

2.2 Methoden der Hefegenetik

2.2.1 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Referenz
W303 α	MAT α ; ade2-1; his3-11,15; leu2,112; trp1; ura23-53; can1-100	(Rothstein und Sherman, 1980)
BY4742	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0	Biocat
Δ mgm1/ Δ mgm1	MAT α /MAT α , his3 Δ 1/his3 Δ 1, leu2 Δ 0/leu2 Δ 0, lys2 Δ 0/LYS2, MET15/met15 Δ 0, ura3 Δ 0/ura3 Δ 0, MGM1::kanMX4/MGM1::kanMX4	Research Genetics
Δ mgm1/ Δ pcp1	his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, MGM1::kanMX4, PCP1::his3MX6	diese Arbeit
Δ pcp1/ Δ pcp1	MAT α /MAT α , his3 Δ 1/his3 Δ 1, leu2 Δ 0/leu2 Δ 0, lys2 Δ 0/LYS2, MET15/met15 Δ 0, ura3 Δ 0/ura3 Δ 0, PCP1::kanMX4/PCP1::kanMX4	Research Genetics
Δ yta10/12	MAT α ; ade2-1; his3-11,15; leu2,112; trp1-1; ura3-52; can1-100; yta10::kanMX6; yta12::HIS3	(Atorino, 2003)
Δ ccp1	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, CCP1::kanMX	Biocat

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefestämme wurden nach Standardprotokollen kultiviert (Guthrie und Fink, 1991). Die Lagerung erfolgte in Lösungen mit 15 % (v/v) Glycerol bei -80 °C (Stocklösung). Für die Kultivierung bestimmter Hefestämme wurde jeweils ein Aliquot der Stocklösung entnommen und auf entsprechenden Agarplatten plattiert. Es wurden YPD (fermentierbare Kohlenstoffquelle) und Lactat-Medium (nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle) verwendet.

Hefestämme die ein bestimmtes Plasmid mit einem Markergen enthielten, wurden auf Selektivmedien mit verschiedenen Mengen Glucose oder Lactat als Kohlenstoffquelle kultiviert. Den Selektivmedien fehlten dabei die entsprechenden Aminosäuren oder Basen, sodass nur die Hefezellen, die das gewünschte Plasmid enthielten wachsen konnten. Flüssigkulturen wurden bei 140 rpm und 30 °C kultiviert. Zur Anfertigung von Stocklösungen wurden die Stämme auf Agarplatten kultiviert und mit einer sterilen Impföse ein Teil der Zellen in einer 15 % (v/v) Glycerollösung suspendiert. Die Stocklösungen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Sporulation diploider Hefestämme

Die Hefestämme wurden zunächst auf einer Agarplatte mit YPD- oder Selektivmedium kultiviert. Um die Zellen zur Sporulation anzuregen wurden sie anschließend auf eine nährstoffarme Sporulationsplatte (1 % (w/v) Kaliumacetat) überimpft. Diese wurden für 3–6 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Sporulation, also die Bildung von Tetraden aus einer diploiden Hefezelle, wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

2.2.4 Tetradendisektion

Einige der zuvor sporulierten Hefezellen wurden von der Sporulationsplatte abgenommen und in 200 µl sterilem H₂O resuspendiert. Es wurden 5 µl Zymolyase (10 mg/ml) zugegeben und für 3-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden die Zellwände angegriffen, ohne sie vollständig zu verdauen. 50 µl der Suspension wurden auf den Rand einer YPD-Platte aufgebracht und die vier Sporen einer Tetrade mit Hilfe eines Mikromanipulators getrennt. Die Sporen wurden in einer Reihe auf der Platte abgelegt und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die haploiden Kolonien, die aus den einzelnen Sporen hervorgingen, wurden auf ihren Phänotyp untersucht.

2.2.5 Generierung eines haploiden $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ Stammes

Zur Erzeugung des haploide $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ Stammes, wurde das *PCP1* Gen aus einem diploiden $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ Stamm deletiert und mittels Sporulation und Tetradendissektion Zellen isoliert, welchen das *MGM1* und das *PCP1* Gen fehlten. Die Deletion von *PCP1* erfolgte über homologe Rekombination einer Deletionskassette in den *Pcp1*-Lokus. Dazu wurde eine PCR mit den Primern *Mdm37disup* und *Mdm37disdn* (Tabelle 9) und dem Plasmid pFA6a-His3MX6 (Longtine *et al.*, 1998) als Matrize durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in den $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ Stamm transformiert und nach der Selektion auf Selektivmedium ohne Histidin Klone ausgewählt, welche wie unter 2.2.3 beschrieben sporuliert wurden. Nach der Sporulation wurden Tetraden vereinzelt (vgl. 2.2.4) und die Zellen auf die Expression von *Mgm1* bzw. *Pcp1* untersucht.

Primer	Sequenz (5'-3')
<i>Mdm37disup</i>	TCACCCTAAAACATCTGTACGTGTTTATATAGATATTTAAAGCAAT ACGTACGCTGCAGGTCGAC
<i>Mdm37disdn</i>	ATAGCAGTATTTACAATATTTCGAATGAGAATGTGTCTTTTTTTAA GTGAATCGATGAATTCGAGCTCG

Tabelle 9: Primer für die Deletion des *PCP1*-Gens.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Gesamtproteinpräparation aus *S. cerevisiae* durch alkalische Lyse

Die Hefezellen wurden in flüssigem Medium bis zu einer oD_{600} von 0,5-1,5 angezogen und 1-4 oD -Einheiten in einem geeigneten Reagiergefäß pelletiert. Alternativ wurden die Hefestämme auf Agarplatten kultiviert und ein Teil der Zellen in 1 ml H_2O resuspendiert. Die oD_{600} wurde bestimmt, eine entsprechende Menge Zellen entnommen und in einem 1,5 ml Reagiergefäß für 30 sec bei 16000 g zentrifugiert. Die so geernteten Zellen wurden in 250 μ l 50 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert und anschließend mit 50 μ l

Lysepuffer (1,85 M NaOH, 7,4 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 20 mM PMSF) versetzt. Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis inkubiert und danach die Proteine durch Zugabe von 220 μ l 72 % (w/v) Trichloressigsäure und Inkubation für 15 min auf Eis präzipitiert. Es wurde bei 20000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 1 ml 100 % Aceton (-20 °C) gewaschen. Zum Trocknen wurden die Proben für einige Minuten offen bei 37 °C inkubiert und danach die Proteine in SDS-Probenauftragspuffer (enthielt 10 mM Tris/Base) aufgenommen.

2.3.2 Präparation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung von Mitochondrien aus Wildtyp-Stämmen (W303 α) wurden die Zellen zunächst über Nacht in 50 ml Lactat-Medium bei 30 °C kultiviert. Diese Vorkultur wurde noch dreimal auf eine oD_{578} von 0,05 verdünnt wobei das Volumen stetig vergrößert wurde und eine oD_{578} von 1-1,5 nicht überschritten wurde, um die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Die Hauptkultur wurde schließlich auf eine oD_{578} von 0,02-0,1 angeimpft (4-10 l) und bis zu einer oD_{578} von 0,8-1,5 kultiviert. Die Anzucht von Hefestämmen, welche Plasmide enthielten erfolgte auf dem dafür geeigneten Selektivmedium. In der Regel wurden hierfür 0,5-2 % Glucose als fermentierbare Kohlenstoffquelle verwendet, da die in dieser Arbeit verwendeten Deletionsstämme atmungsdefizient sind.

Die Präparation der Mitochondrien erfolgte im Prinzip nach der Methode von Daum (Daum *et al.*, 1982). Dazu wurden die Zellen zunächst in einem JLA 8100 Rotor (Avanti J-20 XP Zentrifuge von Beckman) bei 4000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in einem geeigneten Volumen H₂O resuspendiert und in einen JA 10 Zentrifugationsbecher überführt und durch Zentrifugation bei 1500 g für 5 min (JA 10 Rotor, Avanti J-25 Zentrifuge von Beckman) gewaschen. Anschließend wurde das Frischgewicht der Zellen bestimmt und diese in 2 ml Puffer (100 mM Tris/Base, 10 mM DTT) je 1 g Frischgewicht resuspendiert. Nach Inkubation für 10 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln (140 rpm) wurden die Zellen für 5 min bei 1500 g zentrifugiert und in 1 ml Puffer (1,2 M Sorbitol, 20 mM KP_i; pH 7,4) je 0,15 g Frischgewicht gewaschen. Um die

Zellwände der Hefezellen aufzuschließen wurden diese in der gleichen Menge eines Zymolyase enthaltenden Puffers (1,2 M Sorbitol, 20 mM KP_i; pH 7,4 und 6 mg Zymolyase 20T je 1 g Frischgewicht) resuspendiert und unter leichtem Schütteln (140 rpm) für 30 bis 60 min bei 30 °C inkubiert. Daraufhin wurde erneut für 5 min bei 1500 g und 2 °C zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 1 ml Homogenisierungspuffer (1 mM EDTA, 0,2 % (w/v) fettsäurefreies BSA, 1 mM PMSF, 0,6 M Sorbitol, 10 mM HEPES; pH 7,4) je 0,15 g Frischgewicht resuspendiert. Für den Aufschluss der Zellen wurden diese in einem Glashomogenisator 10 mal homogenisiert, mit dem gleichen Volumen Homogenisierungspuffer verdünnt und dann erneut 10 Mal homogenisiert. Um große Zelltrümmer, Zellkerne und nicht aufgeschlossene Zellen abzutrennen, erfolgten zunächst zwei Zentrifugationsschritte bei 2000 g und 2 °C für 5 min in einem JA 20 Rotor (Avanti J-25 Zentrifuge von Beckman). Der Überstand, welcher die zu isolierenden Mitochondrien enthielt, wurde daraufhin bei 13000 g und 2 °C für 12 min zentrifugiert und das Pellet in 10 ml HS-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES; pH 7,4) resuspendiert. Um die Reinheit der Mitochondrien weiter zu verbessern, wurde noch einmal für 5 min bei 2000 g und 2 °C zentrifugiert und die Mitochondrien im Überstand erneut bei 13000 g und 2 °C für 12 min pelletiert. Die so isolierten Hefemitochondrien wurden in 100 µl HS-Puffer je 1 g Frischgewicht Zellen resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (vgl. 2.4.1), mit HS-Puffer auf 10 mg/ml eingestellt und die Mitochondrien in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.3.3 Digitoninfraktionierung von Hefemitochondrien

Um die submitochondriale Lokalisierung von Proteinen zu ermitteln, wurden zunächst Mitochondrien der entsprechenden Hefestämme isoliert (vgl. 2.3.2). 200 µl Mitochondrien mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml wurden in 1800 µl HS-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES; pH 7,4) verdünnt. Lösungen mit Digitoninkonzentrationen von 0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,1 bzw. 0,2 % (w/v) Digitonin wurden aus einer 10 % (w/v) Stammlösung und HS-Puffer hergestellt und je 10 µl

davon in 1,5 ml Reagiergefäßen vorgelegt. Dazu wurden jeweils 190 µl der zuvor verdünnten Mitochondrien (0,9 mg/ml) und 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach Inkubation auf Eis für 25 min wurden 5 µl 200 mM PMSF zugegeben, um den Abbau der Proteine durch die Proteinase K zu unterbrechen. Es wurde für weitere 5 min auf Eis inkubiert und danach für 10 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Die so sedimentierten Mitochondrien wurden mit 300 µl HS-Puffer (+ 1 mM PMSF) gewaschen, ohne das Pellet zu resuspendieren. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Mitochondrien in 300 µl HS-Puffer und 60 µl 72 % (w/v) TCA resuspendiert wodurch die Proteine präzipitiert wurden. Mit den Proben wurde wie in 2.4.2 beschrieben weiter verfahren.

2.3.4 Alkalische Extraktion von Proteinen aus mitochondrialen Membranen

Die Assoziation von Proteinen mit den mitochondrialen Membranen wurde durch alkalische Extraktion untersucht. Um eine möglichst schonende Extraktion der verwendeten Mitochondrien (isoliert aus atmungsdefizienten Deletionsstämmen) zu erreichen, wurde auf die sonst übliche osmotische Rupturierung der äußeren mitochondrialen Membran verzichtet. 100 µg isolierter Mitochondrien wurden in 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4) auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt, mit dem gleichen Volumen Na₂CO₃ (0,2 M) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 4 °C und 91000 g in einem TLA45-Rotor (Beckman Optima Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Die sedimentierte Membran-Fraktion wurde in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden mit TCA gefällt (vgl. 2.4.2) und ebenfalls in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen. Gleiche Mengen von Membran-Fractionen und löslichen Proteinen (bezogen auf das Ausgangsmaterial) wurden mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (vgl. 2.4.4), Western-Blot (vgl. 2.4.5) und Immundekoration (vgl. 2.5.2) analysiert.

2.3.5 *In vitro* Import und Degradations-Experiment

Radioaktiv markierte Vorstufenproteine wurden in isolierte Mitochondrien aus W303 Hefestämmen importiert. Dazu wurden je Importreaktion 50 µg isolierte Mitochondrien, 25 µl Importpuffer (600 mM Sorbitol; 50 mM HEPES/KOH; 80 mM KCl; 10 mM Magnesiumacetat; 2,5 mM EDTA; 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 1 mg/ml BSA; pH 7,2), 2,5 mM ATP, 5 mM NADH, 10 mM Creatinphosphat, 0,1 mg/ml Creatinkinase, je 2,5 mM Malat und Succinat und 2 mM MnCl₂ mit Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht. Nach einer Vorinkubation von 3 min bei 25 °C wurde je 1 µl der Lösung zugegeben, welche die radioaktiven Proteine enthielt (vgl. 2.4.3). Es wurde für 24 min bei 25 °C inkubiert und je Reaktion 450 µl HS-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES; pH 7,4) sowie 5 µl Trypsin (5 mg/ml) zugegeben, um nicht in die Mitochondrien importierte Proteine zu entfernen. Nach erneuter Inkubation für 20 min auf Eis wurden 5 µl Trypsininhibitor (100 mg/ml) zugegeben und nochmals für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien für 10 min bei 13000 g pelletiert, mit 500 µl HS-Puffer gewaschen und in 50 µl Importpuffer ohne BSA aufgenommen. In diesem Puffer wurden die Mitochondrien für 0, 15, 30 bzw. 45 min bei 30 °C inkubiert. Abschließend wurde erneut für 10 min bei 13000 g zentrifugiert, in HS-Puffer gewaschen und die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt (vgl. 2.4.2). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (2.4.4), Western-Blot (2.4.5) und Autoradiographie (2.4.6) analysiert.

2.3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Morphologie von Mitochondrien in lebenden Hefezellen zu untersuchen, wurden Hefestämme verwendet welche mitochondrial lokalisiertes GFP (Grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*) exprimierten. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop und dem dazugehörigen Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan-Neofluar, 100X, numerische Apertur 1,3). Die untersuchten Zellen wurden mit einer CCD-Kamera (AxioCam MRm, Carl

Zeiss, Jena) aufgenommen. Die Steuerung von Mikroskop und Kamera erfolgte mit Hilfe der AxioVision AC Software (Carl Zeiss, Jena). Für die Analyse von GFP wurde Filtersatz Nr. 38 HE verwendet (Anregung: 440 bis 470 nm, Emission: 525 bis 550 nm) (Heim and Tsien, 1996). Die Quantifizierung der verschiedenen Phänotypen wurde ohne Kenntnis der Identität des untersuchten Stammes durchgeführt.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) wurde das Bio-Rad-Proteinassay-Reagenz (Biorad) verwendet. Dieses wurde 1:5 mit H₂O verdünnt und je 1 ml davon zu den Proben gegeben. Es wurde 5 min bei RT inkubiert und danach die Absorption bei 595 nm gemessen. Mit dem Protein IgG wurde eine Eichkurve erstellt mit deren Hilfe die Proteinkonzentration in den Proben berechnet wurde.

2.4.2 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine wurden durch Zugabe von 72 % (w/v) Trichloressigsäure auf eine Endkonzentration von 12 % (w/v) und Inkubation für 15 min auf Eis präzipitiert. Es wurde bei 20000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 1 ml 100 % Aceton (-20 °C) gewaschen. Zum Trocknen wurden die Proben für einige Minuten offen bei 37 °C inkubiert und danach die Proteine in SDS-Probenauftragspuffer (enthält 10 mM Tris/Base) aufgenommen.

2.4.3 *In vitro* Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine

Für die Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine *in vitro* wurde das gekoppelte Transkriptions- und Translationssystem (TNT-Lysat, Promega) verwendet. Es wurden etwa 1 µg DNA, 2 µl TNT-Reaktionspuffer (Promega), 1 µl Aminosäurengemisch (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 1 µl RNasin (40 U/µl), 1 µl TNT SP6-RNA-Polymerase (Promega) und 2 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) mit 25 µl TNT-Kaninchenretikulozytenlysate (Promega) versetzt und mit sterilem, deionisiertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 30 °C für 90 min inkubiert und der Einbau des radioaktiven Methionins durch Zugabe von 2,5 µl 0,2 M Methionin beendet. Es wurde nochmals für 5 min bei 30 °C inkubiert und 30 min bei 100000 g und 2 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe erfolgte mittels vertikaler, diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Prinzip von Lämmli (Laemli, 1970). Die Gele wurden je nach Größe der zu untersuchenden Proteine mit einer Endkonzentration von 10 %/0,17 % (w/v) bzw. 12 %/0,2 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid und einer Dicke von 1 mm hergestellt. Vor der Elektrophorese wurden die Proteine in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen und durch Kochen für 5 min bei 95 °C denaturiert. Um die Größe der Proteine abschätzen zu können, wurden Größenstandards aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25-35 mA für 2,5-3,5 h.

Sammelgel:	5 % (w/v) Acrylamid/0,08 % (w/v) Bisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED, 60 mM Tris/HCl pH 6,8
Trenngel:	10-12 % (w/v) Acrylamid/0,17-0,2 % (w/v) Bisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,03 % (v/v) TEMED, 375 mM Tris/HCl pH 8,8
Laufpuffer:	380 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8,3

2.4.5 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Sollten Proteine immunologisch nachgewiesen werden, wurden sie zunächst auf einem SDS-Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt (vgl. 2.4.4) und anschließend durch ein Halbtrocken- oder Nassverfahren elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Western-Blot) (Towbin *et al.*, 1979). Für das Halbtrockenverfahren wurden Apparaturen mit Graphitelektroden verwendet, für das Nassverfahren kam ein Tankblot (Hoefer) zum Einsatz.

Vor dem Transfer wurden Gel und Nitrozellulosemembran 5 min in Blotpuffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,02 % (w/v) SDS) inkubiert. Zwei Lagen in Blotpuffer getränktes Filterpapier wurde auf der unteren Graphitelektrode (Anode) ausgelegt. Darauf wurden zuerst die Membran und dann das Gel gelegt und mit zwei weiteren Lagen getränktem Filterpapiers abgedeckt. Oben auf wurde die obere Graphitelektrode (Kathode) platziert. Der Aufbau für das Nassverfahren erfolgte nach dem gleichen Prinzip in einem Transfergitter der Blotapparatur, welches geschlossen und in den Tank eingesetzt wurde. Der Transfer erfolgte beim Halbtrockenverfahren bei 200 mA und beim Nassverfahren bei 400 mA für je 1,5 h. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran kurz in deionisiertem H₂O geschwenkt und für 5 min mit einer Färbelösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA) inkubiert, um die Proteine sichtbar zu machen. Überschüssige Färbelösung wurde durch Waschen mit deionisiertem H₂O entfernt.

2.4.6 Autoradiographie und densitometrische Quantifizierung

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran durch Autoradiographie detektiert und Densitometrie. Dazu wurden die Nitrozellulosemembranen getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners eingelesen und ihre Intensität mit dem Programm Image Master 1D (Pharmacia) densitometrisch bestimmt.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Für die Affinitätsreinigung eines Antikörpers gegen ein C-terminales Peptid von Mgm1 (Herlan *et al.*, 2003) wurde eine Säule mit dem Säulenmaterial Sulfolink Coupling Gel (Pierce) verwendet. Dieses war mit dem immunogenen Peptid, welches für die Immunisierung von Kaninchen verwendet wurde, gekoppelt. Die Säule wurde nacheinander mit je 10 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM Glycin/HCl (pH 2,5), 10 mM Tris/HCl (pH 8,8), 100 mM Natriumphosphat (pH 11,5) und erneut mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen. Für die Bindung der Antikörper wurden 4 ml Serum mit 16 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) gemischt und mit 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 mM o-Phenanthrolin sowie 1 µg/ml Leupeptin versetzt, um mögliche Proteaseaktivitäten zu unterbinden. Die Lösung wurde drei mal mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule zunächst mit 20 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und dann mit 20 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte durch Zugabe von je 10 ml 100 mM Citrat (pH 4,0), 100 mM Glycin/HCl (pH 2,5) und 100 mM Natriumphosphat (pH 11,5), sodass der pH-Wert stetig abgesenkt wurde. Es wurden Fraktionen von 500 µl gesammelt, welche mit 1 M Tris/Base (bei Citrat- und Glycinelution) bzw. 1 M Glycin/HCl (pH 2,5) (bei Natriumphosphatelution) neutralisiert wurden. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde nach

Bradford (vgl. 2.4.1) bestimmt, wobei die Fraktionen 2-4 der Glycinelution meist die höchsten Antikörpermengen enthielten. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und bei -20 °C gelagert. Zur Aufbewahrung der Säule wurde diese nach jedem Gebrauch mit 10 Säulenvolumina Puffer (0,02 % (w/v) Natriumazid, 10 mM Tris/HCl pH 7,5) gewaschen, mit 1 ml des gleichen Puffers überschichtet und bei 4 °C gelagert.

2.5.2 Immundetektion von Proteinen

Um Proteine auf Nitrocellulose-Membranen mit Antikörpern spezifisch nachweisen zu können, wurden die Membranen zunächst für 30-60 min in einer Lösung aus 5 % (w/v) Magermilchpulver und TBS-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde für 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit einer Lösung welche den entsprechenden Primärantikörper enthielt (1:500-1:1000 fach in 5 % (w/v) Magermilchpulver und TBS-Puffer) inkubiert. Nach der Bindung der Primärantikörpers wurden die Membranen dreimal für je 5-10 min in TBS-Puffer

2.6 Puffer und Medien

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: LB-Medium; 1,5 % (w/v) Agar

Für LB_{Amp}-Platten wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

S-Medium: 1,7 g/l *Yeast Nitrogen Base* ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/l Ammoniumsulfat; 2 % (w/v) Glukose (SD); 2 % (w/v) Galactose (SGal); 2 % (w/v) Lactat (SLac) oder 2 % (w/v) Glycerol (SG).

Auxotrophiemarker:

Adenin 20 mg/l

Uracil 20 mg/l

Histidin 30 mg/l

Leucin 30 mg/l

Lysin 30 mg/l

Methionin 30 mg/l

Tryptophan 30 mg/l

SDS-Probenpuffer: 2 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 60 mM

(Lämmli) Tris/HCl pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerol; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Sporulationsplatten: 1 % (w/v) Kaliumacetat; 2 % (w/v) Agar

PBS-Puffer: 0,9 % (w/v) NaCl; 0,2 % (w/v) Kaliumchlorid; 6,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat; pH 7,4

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) Bacto-Pepton; mit HCl auf pH 5 einstellen; autoklavieren
2 % (w/v) Glukose (YPD); 2 % (w/v) Galactose (YPGal) oder 2 % (w/v) Glycerol (YPG)
Glukose, Galactose und Glycerol wurden als 40 % (w/v) (Glukose und Glycerol) bzw. 30 % (w/v) (Galactose) konzentrierte Stammlösungen separat autoklaviert.

Lactat-Medium: 3 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l Calciumchlorid; 0,5 g/l Natriumchlorid; 0,6 g/l Magnesiumchlorid; 1 g/l Kaliumdihydrogenphosphat; 1 g/l Ammoniumchlorid; 3 mg/l Eisen-(III)-chlorid; 2 % (w/v) Lactat; mit NaOH auf pH 6 einstellen

Für die Herstellung von Kulturplatten für die Kultivierung von *S. cerevisiae*, wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich zu den Inhaltsstoffen des entsprechenden Flüssigmediums 2 % (w/v) Agar zugegeben.

2.7 Chemikalien und Geräte

2.7.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert (München)

Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

Amersham Biosciences (Piscataway)

Bacto-Pepton

AppliChem (Darmstadt)

Tris, Ampicillin

Beckton Dickenson (Heidelberg)

Bacto-Trypton

Biorad (München)

Proteinstandard und Reagenzien zur Proteinbestimmung, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-IgG

Braun (Melsungen)

Kanülen, Spritzen

Fuji (Düsseldorf)

Medical X-ray Film Super RX 13 x 18 cm

Gerbu (Gaiberg)

Acrylamid, Ampicillin, DTT, HEPES

Greiner (Kremsmünster)

15- und 50 ml Reagiergefäße

Fermentas (St. Leon-Rot)

Molekulargewichts-Standards für SDS-PAGE

Invitrogen (Groningen)

Yeast Nitrogen Base

Metabion (Martinsried)

Oligonukleotide

New England Biolabs (Schwalbach)

Restriktionsenzyme und 10 x Puffer für Restriktionsenzyme, Taq-DNA-Polymerase, Desoxynucleosidtriphosphate, T4-DNA-Ligase

peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)

Elektroporationsküvetten

Pierce (Rockford, USA)

Sulfolink® Coupling Gel

Pineda Antikörper Service (Berlin)

Antikörper gegen C-terminales Epitop von Mgm1 (Herlan et al., 2003)

Promega (Heidelberg)

Pfu-DNA-Polymerase

R&D Systems (Abingdon, UK)

pYX-Vektoren

Research Genetics (Huntsville, USA)

homozygot diploide Deletions Hefestammsammlung

Roche Applied Sciences (Mannheim)

Proteinase K

Sarstedt (Bad Homburg)

Reagiergefäße, Petrischalen, Pipettenspitzen

Schleicher & Schüll (Kassel)

Protan Nitrozellulosemembran BA83, Whatman Filterpapiere, Faltenfilter, Sterilfilter

Seikagaku (Tokyo, Japan)

Zymolyase 20T

Serva (Heidelberg)

Acrylamid, Agar-Agar, Agarose, Bisacrylamid, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Hefeextrakt, Lysozym, PMSF, Ponceau S, SDS, Serva Blau G, TEMED

Sigma (München)

Aminosäuren, Ammoniumperoxodisulfat, BSA Grade VIII (fettsäurefrei), Bromphenolblau, Coumarsäure, Ethidiumbromid, Glycerol, Lachsspermien-DNA, Luminol, β -Mercaptoethanol, Triton X-100

Töpfer (Dietmannsried)

Magermilchpulver

Alle übrigen Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.7.2 Geräte

Autoklav

Varioclav® 400E, H + P Labortechnik (Oberschleißheim)

Brutschränke, Inkubatoren

Heraeus Christ (Osterode)

CCD-Kamera für Fluoreszenzmikroskop, AxioCam MRm

Carl Zeiss (Jena)

Quantifizierungssoftware, Image Scanner und Software Image Master 1D

Amersham Biosciences (Freiburg)

Elektroporationssystem

Gene Pulser, BioRad (München)

Entwicklermaschine

Curix 60® Agfa-Gevaert (München)

Feinwaagen

Sartorius (Mainz)

Fluoreszenzmikroskop

Axioplan, Carl Zeiss Jena GmbH

Gelkammern

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)

Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad (München)

Kolbenhubpipetten

Abimed (Düsseldorf)

Magnetrührer

MR 3001 K, Heidorph Multipette Eppendorf (Hamburg)

Peristaltische Pumpe

P-1, Amersham Biosciences (Freiburg)

Photometer

Ultrospec 10 Amersham Biosciences (Freiburg)

BioPhotometer Eppendorf (Hamburg)

Quarzküvetten

Hellma

Reinstwasseranlagen

PureLab Plus, USF Deutschland GmbH (Ransbach-Baumbach)

Halbtrocken Blotapparatur

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)

Software Fluoreszenzmikroskop

Axiovision AC Carl Zeiss (Jena)

Spannungsquellen

Electrophoresis Power Supply EPS 600, Amersham Biosciences
(Freiburg)

Sterilbank

BDK

Thermocycler

Mastercycler gradient Eppendorf (Hamburg)

Thermomixer

Thermomixer *compact* Eppendorf (Hamburg)

Transiluminator

GDS-7900 System, Modell LM-26E (UVP, Upland, USA)

Überkopfschüttler

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)

Ultraschallgerät

Branson Sonifier B-15, G. Heinemann

Vortex-Mixer

Bender und Hobein (München)

Wärmeschränke

Memmert (Hannover)

Zentrifugen

Allegra X-22 R, Avanti J-20 XP, Avanti J-25, Beckman Instruments

Zentrifugen (Ultrazentrifugen)

Optima TLX, Optima MX-E, L8-50M/E und L8-M, Beckman Instruments

Zentrifugen (Tischzentrifugen)

5415D, 5810R, Eppendorf (Hamburg)

Zentrifugen (Kühlzentrifuge)

3K30, Sigma (München)

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Prozessierung von Mgm1 durch die Rhomboidprotease Pcp1

Über die Substratspezifität von Intramembranproteasen der Rhomboid-Familie ist bislang bekannt, dass Helix-destabilisierende Aminosäurereste innerhalb der gespaltenen Transmembrandomäne für die Prozessierung notwendig sein können (Urban and Freeman, 2003). Jedoch findet die Spaltung des Substrates in anderen Fällen unabhängig von solchen Resten statt. Die Substratspezifität mitochondrialer Rhomboidproteasen wurde bisher nicht untersucht. So war bislang unklar, wie die Rhomboidprotease Pcp1 der mitochondrialen IM zwischen ihrem Substrat Mgm1 und den zahlreichen anderen Proteinen der IM unterscheidet. Hier wurde die Prozessierung von Mgm1 in Mitochondrien von *S. cerevisiae* durch die Rhomboidprotease Pcp1 untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Bereiche von Mgm1 verändert und die Bildung von s-Mgm1 in Abhängigkeit von Pcp1 bzw. der humanen Rhomboidprotease PARL analysiert.

3.1.1 Konservierung der Aminosäuresequenz in der Umgebung der Pcp1-Spaltstelle

Zur Eingrenzung von Sequenzbereichen innerhalb von Mgm1, welche für die Substraterkennung durch Pcp1 benötigt werden könnten, wurde die SGD-Datenbank (*Saccharomyces Genome Database*; <http://www.yeastgenome.org>) mit Hilfe des WU-BLAST2 Algorithmus nach möglichen Homologen von Mgm1 in anderen Pilzarten durchsucht. Sequenzen mit der deutlichsten Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu Mgm1 (Sequenzidentität zwischen 32 % und 94 %) wurden für den Sequenzvergleich verwendet. Die der RCR (*rhomboid cleavage region*) von Mgm1 entsprechenden Bereiche der ausgewählten Proteine, wurden anhand ihrer N-terminalen Position innerhalb des Proteins und ihrer Hydrophobizität identifiziert. Die jeweiligen Sequenzbereiche wurden mit Hilfe des

Programms ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) aligniert. Die Aminosäurereste der RCR sind zwischen den verschiedenen *Saccharomyces* Spezies relativ gut konserviert (Abbildung 13, Zeile 1-6). Dagegen ist die Ähnlichkeit dieser Region zu den anderen untersuchten Spezies sehr gering. Im Vergleich mit allen analysierten Sequenzen kann, abgesehen von der allgemein deutlichen Hydrophobizität der meisten Aminosäurereste, keine Konservierung der Aminosäuresequenz im Bereich der RCR festgestellt werden. Jedoch sind in den hydrophoben Bereichen aller untersuchten Proteine Helix-destabilisierende Reste zu finden. Der zur RCR direkt N-terminal gelegene Rest weist in allen Fällen eine Ladung auf (Aspartat, D; Lysin, K; Arginin, R). Bei der Betrachtung des C-terminal zur RCR gelegenen Bereiches fällt eine starke Akkumulation von negativ geladenen Aminosäureresten (Aspartat, D; Glutamat, E) auf.

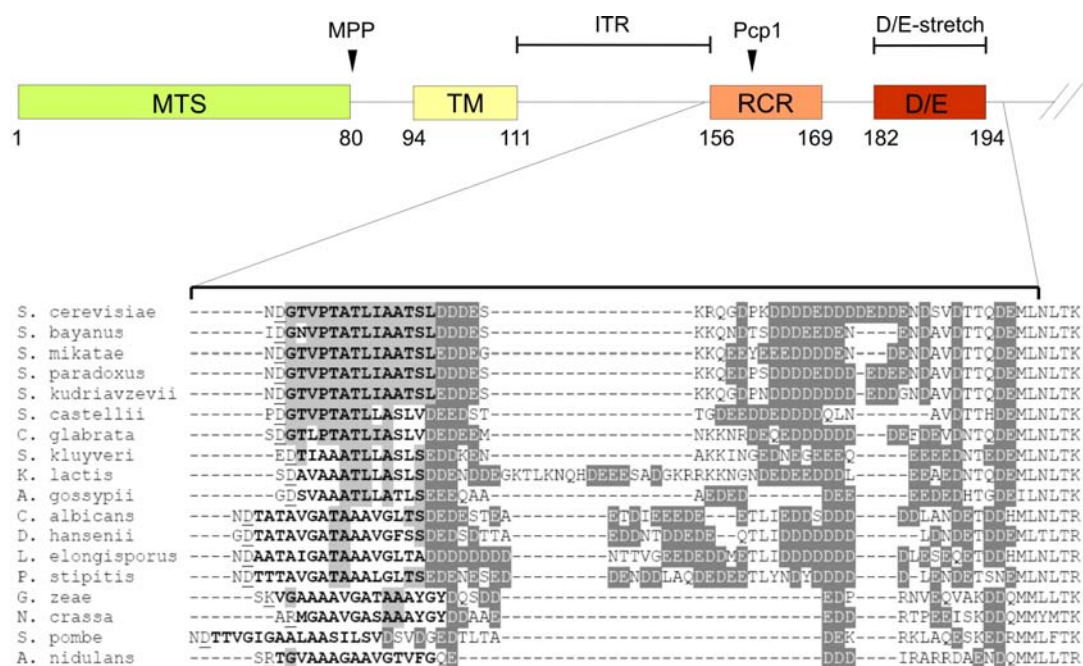


Abbildung 13: Analyse der Aminosäuresequenz von Mgm1 in der Umgebung der Pcp1 Spaltstelle. Die schematische Darstellung zeigt den N-terminalen Teil von Mgm1. Die Zahlen benennen die Aminosäurereste mit denen die gezeigten Bereiche von Mgm1 beginnen bzw. enden. Pfeilspitzen bedeuten die Spaltstellen durch die angegebenen Proteine. MTS, mitochondriale Signalsequenz, TM, Transmembrandomäne, RCR, *rhomboid cleavage region*, D/E, D/E-Bereich, MPP, *mitochondrial processing peptidase*, ITR, Inter Transmembran Region. Die Sequenzanalyse wurde für Mgm1 aus *S. cerevisiae* und ausgesuchte Bereiche Mgm1-ähnlicher Proteine der angegebenen Organismen mit Hilfe des Programms ClustalW durchgeführt. Hydrophobe Segmente, die der RCR von Mgm1 entsprechen sind fett dargestellt, konservierte Aminosäurereste dieser Segmente sind hellgrau, negativ geladene Reste dunkelgrau hinterlegt.

3.1.2 Helix-destabilisierende Aminosäurereste der RCR von Mgm1 haben keinen Einfluss auf die Prozessierung durch Pcp1

Um die Bedeutung der Helix-destabilisierenden Aminosäurereste innerhalb der RCR von Mgm1 für dessen Prozessierung durch Pcp1 zu untersuchen, wurden Glycin156 und Prolin159 jeweils einzeln bzw. gleichzeitig durch Alanin- bzw. Valin-Reste ersetzt (Abbildung 14). Die Varianten Mgm1_{G156A}, Mgm1_{P159A}, Mgm1_{G156A/P159A}, Mgm1_{G156V} und Mgm1_{P159V} wurden unter der Kontrolle des endogenen Promotors in einem $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ Hefestamm exprimiert.

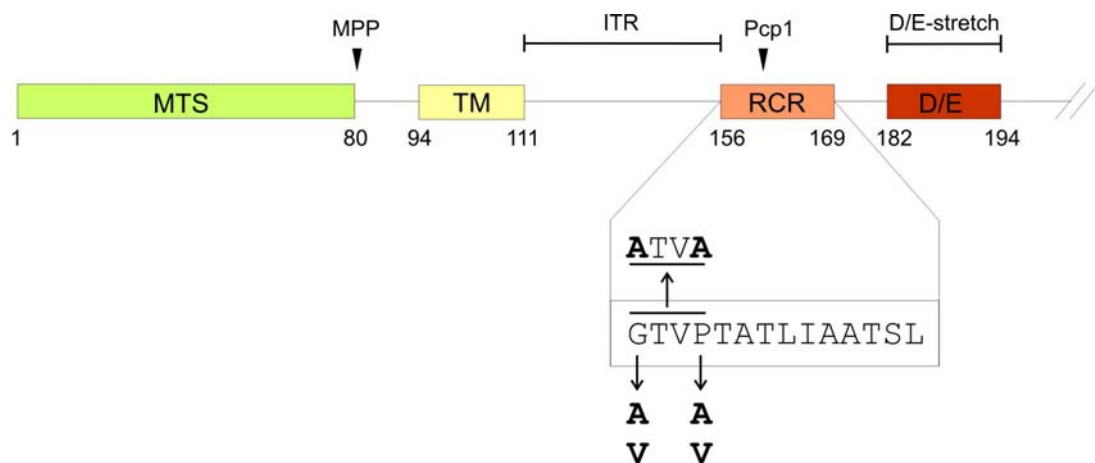


Abbildung 14: Schematische Darstellung des N-terminalen Teils von Mgm1 mit den durchgeführten Sequenzänderungen. Die Aminosäurereste sind durch Zahlen gekennzeichnet, Pfeilspitzen zeigen die Spaltstellen durch die angegebenen Proteasen an. Die Sequenz der RCR ist angegeben. Die Pfeile zeigen die Aminosäureaustausche G156A, G156V, P159A, P159V und G156A/P156A. MTS, mitochondriale Signalsequenz, TM, Transmembrandomäne, RCR, *rhomboid cleavage region*, D/E, D/E-Bereich, MPP, *mitochondrial processing peptidase*, ITR, Inter Transmembran Region.

Die Bildung von I- bzw. s-Mgm1 wurde mittels Gesamtproteinextraktion aus Hefezellen, SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert. Dazu wurde ein polyklonaler Antikörper gegen ein C-terminales Peptid von Mgm1 verwendet (Herlan *et al.*, 2003). Bei allen Varianten von Mgm1 mit Mutationen der Helix-destabilisierenden Aminosäurereste, wurde sowohl I- als auch s-Mgm1 gebildet (Abbildung 15). Die beiden Isoformen entstanden in diesen Varianten jeweils im gleichen

Verhältnis wie bei Wildtyp Mgm1 (Mgm1_{WT}). Um festzustellen, ob die Bildung von s-Mgm1 in den untersuchten Stämmen tatsächlich von Pcp1 abhängig ist, wurden die gleichen Mgm1-Varianten in einem $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ Stamm exprimiert und wie oben beschrieben analysiert. In Abwesenheit von Pcp1 wurde bei keiner der getesteten Varianten s-Mgm1 generiert (Abbildung 15). Pcp1 kann demnach alle untersuchten Varianten von Mgm1 gleichermaßen prozessieren. Daraus ist zu schließen, dass Helix-destabilisierende Reste innerhalb der RCR von Mgm1 keinen Einfluss auf dessen Erkennung und Spaltung durch Pcp1 haben.

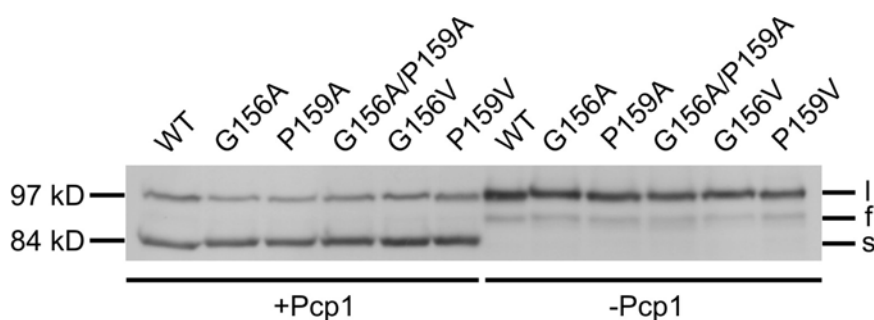


Abbildung 15: Die Prozessierung von Mgm1 ist unabhängig von Helix-destabilisierenden Aminosäureresten der RCR. Gesamtzellextrakte von $\Delta mgm1$ - (+Pcp1) und $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ -Stämmen (-Pcp1), welche die angegebenen Versionen von Mgm1 exprimieren, wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. WT, Wildtyp, l, l-Mgm1, s, s-Mgm1, f, unspezifisches Abbauprodukt von Mgm1.

3.1.3 Die Rolle der Aminosäuresequenz der RCR von Mgm1 für dessen Prozessierung durch Pcp1

Da keine Konservierung der Aminosäuresequenz der RCR von Mgm1 außerhalb der *Saccharomyces* Spezies gefunden werden konnte (vgl. 3.1.1), wurden als nächstes die um die Pcp1-Spaltstelle (N-terminal von A161 bzw. L163) gelegenen Reste mutiert (Abbildung 16). Folgende Mutationen wurden eingeführt: T160A, T160V, A161F, A161V, T162A, T162V, T160A/A161F/T162A, A165F/A166F, A165V/A166V. Da ein geladener Aminosäurerest N-terminal zur RCR in verschiedenen Spezies von Hefe konserviert ist, wurden außerdem die Mgm1-Varianten D155A, D155K und

Δ GND erzeugt. Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss eine erhöhte Hydrophobizität bzw. die Verlängerung der RCR auf die Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1 hat. Hierzu wurde die Mgm1-Variante VVLL generiert, bei welcher zwei Valin und zwei Leucin Reste zwischen T167 und S168 eingefügt wurden.

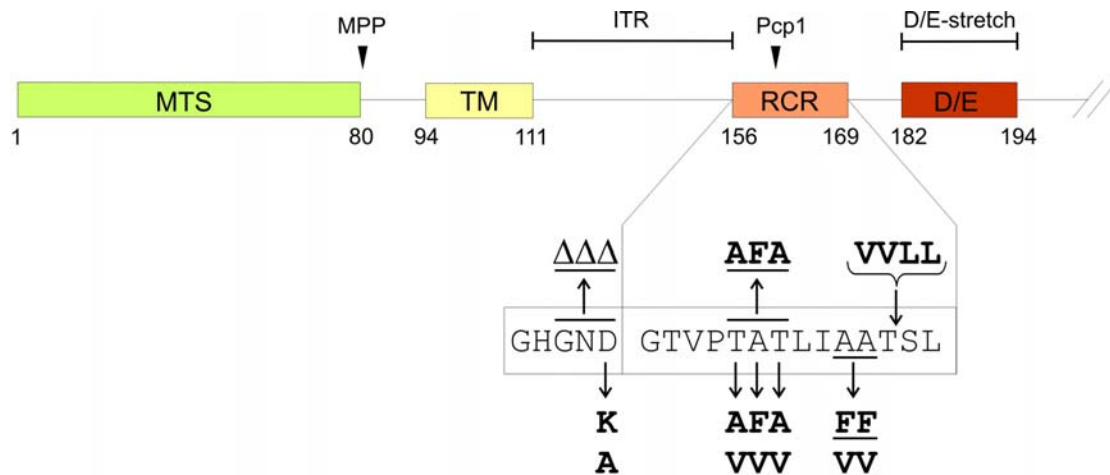


Abbildung 16: Schematische Darstellung des N-terminalen Teils von Mgm1 mit den durchgeführten Sequenzänderungen. Die Zahlen benennen die Aminosäurereste mit denen die gezeigten Bereiche von Mgm1 beginnen bzw. enden. Pfeilspitzen bedeuten die Spaltstellen durch die angegebenen Proteine. Die Sequenz der RCR und N-terminal benachbarter Aminosäurereste ist angegeben. Die Pfeile zeigen die Aminosäureaustausche T160A, T160V, A161F, A161V, T162A, T162V, T160A/A161F/T162A, A165F/A166F, A165V/A166V, D155A und D155K sowie die Deletion der Reste GND und die Insertion der Reste VVLL. MTS, mitochondriale Signalsequenz, TM, Transmembrandomäne, RCR, *rhomboid cleavage region*, D/E, D/E-Bereich, MPP, *mitochondrial processing peptidase*, ITR, Inter Transmembran Region.

Die Mgm1-Varianten wurden je in einem Δ mgm1/ Δ mgm1 bzw. einem Δ mgm1/ Δ pcp1 Stamm exprimiert und die Pcp1 abhängige Bildung von s-Mgm1 wie unter 3.1.2 beschrieben untersucht. In allen Fällen wurde Mgm1 in Anwesenheit von Pcp1 zu s-Mgm1 prozessiert (Abbildung 17). Ohne Pcp1 konnte nur die Bildung der langen Form von Mgm1 nachgewiesen werden. Das unterschiedliche Laufverhalten von l-Mgm1 bei manchen Varianten ist vermutlich auf deren veränderte Hydrophobizität zurückzuführen. Da die hier analysierten Varianten in mit Mgm1_{WT} vergleichbarem Maße, in Abhängigkeit

von Pcp1 prozessiert werden, hat keine der eingeführten Mutationen einen Einfluss auf die Substraterkennung bzw. Spaltung durch Pcp1.

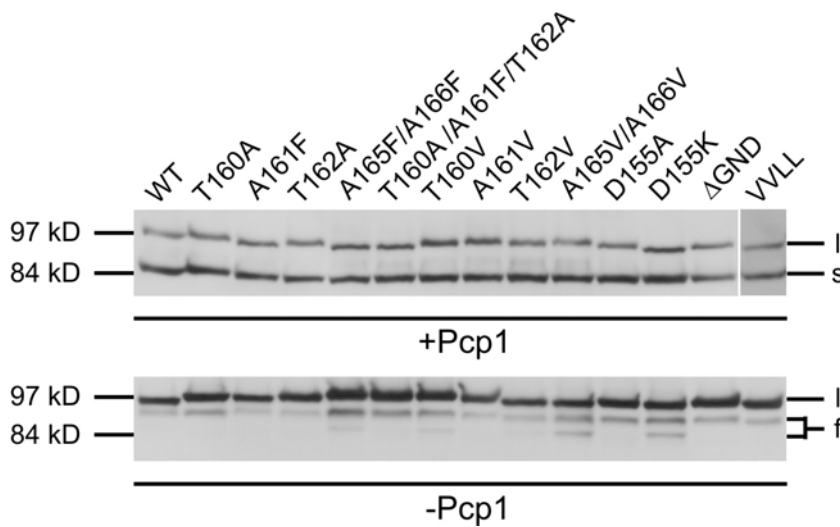


Abbildung 17: Veränderungen der Aminosäuresequenz der RCR haben keinen Einfluss auf die Prozessierung von Mgm1. Die angegebenen Varianten von Mgm1 wurden in $\Delta mgm1^-$ (+Pcp1) bzw. $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ -Stämmen (-Pcp1) exprimiert und die Bildung von l- und s-Mgm1 durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. WT, Wildtyp, VVLL, Insertion der Reste VVLL in die RCR von Mgm1, l, l-Mgm1, s, s-Mgm1, f, unspezifisches Abbauprodukt von Mgm1.

Um festzustellen ob die Aminosäuresequenz der RCR überhaupt eine Rolle bei der Prozessierung von Mgm1 hat, wurde diese durch hydrophobe Transmembrandomänen ersetzt, die keine Substrate für Pcp1 darstellen. Verwendet wurde die Transmembrandomäne des mitochondrialen Proteins Dld1 (D-Lactatdehydrogenase) (Abbildung 18). Dld1 ist, wie l-Mgm1, mit einer Transmembrandomäne in der IM verankert, wobei sich der C-Terminus im Intermembranraum befindet (Rojo *et al.*, 1998). Zum anderen wurde die RCR von Mgm1 durch die TM von Mgm1 ersetzt (Mgm1_{TM}) (Abbildung 18). Beide, die Transmembrandomäne von Dld1 und die von Mgm1, sind sowohl länger als auch hydrophober als die RCR und weisen eine deutlich unterschiedliche Aminosäuresequenz auf.

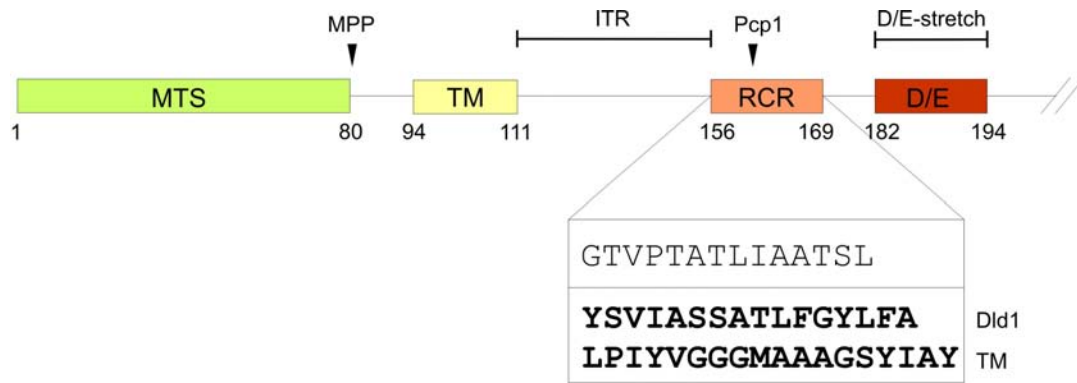


Abbildung 18: Schematische Darstellung des N-terminalen Teils von Mgm1 und des Austauschs der RCR. Die Zahlen benennen die Aminosäurereste mit denen die gezeigten Bereiche von Mgm1 beginnen bzw. enden. Pfeilspitzen bedeuten die Spaltstellen durch die angegebenen Proteine. Die Sequenz der RCR ist angegeben. Die Sequenzen der Transmembrandomäne von Dld1 (Dld1) und der TM von Mgm1 (TM) sind in fetter Schrift gezeigt. MTS, mitochondriale Signalsequenz, TM, Transmembrandomäne, RCR, *rhomboid cleavage region*, D/E, D/E-Bereich, MPP, *mitochondrial processing peptidase*, ITR, Inter Transmembran Region.

Die Varianten Mgm1_{Dld1} und Mgm1_{TM} wurden in einem $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ und einem $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ Stamm exprimiert und die Bildung der beiden Isoformen von Mgm1 mittels Gesamtproteinextraktion aus Hefezellen, SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Beide Varianten wurden mit gleicher Effizienz wie Mgm1_{WT} in Abhängigkeit von Pcp1 zu s-Mgm1 prozessiert (Abbildung 19). Daher ist die Aminosäuresequenz der RCR, abgesehen von einer generell benötigten Hydrophobizität des Segments, nicht von Bedeutung für die Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1. Auch eine erhöhte Hydrophobizität scheint der Prozessierung nicht abträglich zu sein.

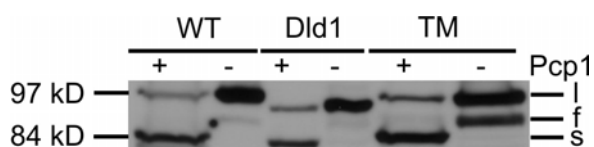


Abbildung 19: Die Prozessierung von Mgm1 ist unabhängig von der Aminosäuresequenz der RCR. Gesamtzellextrakte von $\Delta mgm1$ - (+Pcp1) und $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ -Stämmen (-Pcp1), welche die angegebenen Versionen von Mgm1 exprimieren, wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. WT, Wildtyp, Dld1, Austausch der RCR durch die Transmembrandomäne von Dld1, TM, Austausch der RCR durch die Transmembrandomäne von Mgm1, l, l-Mgm1, s, s-Mgm1, f, unspezifisches Abbauprodukt von Mgm1.

3.1.4 Die Intramembranproteolyse von Mgm1 wird durch negativ geladene Aminosäurereste begünstigt

Die Aminosäuresequenz von Mgm1 weist zwei Bereiche mit mehreren negativ geladenen Resten auf, welche C-terminal zur RCR lokalisiert sind (Aminosäurereste 170-173 bzw. 182-194). Auch in den Mgm1-verwandten Sequenzen befinden sich Anhäufungen von negativ geladenen Aminosäureresten (Abbildung 13). Um eine mögliche Bedeutung dieser Reste für die Prozessierung von Mgm1 zu untersuchen, wurden die Mgm1-Varianten $\Delta DDDE$ und $\Delta D/E$ konstruiert. Diesen fehlen jeweils die Aminosäurereste 170-173 bzw. 182-194 (Abbildung 20).

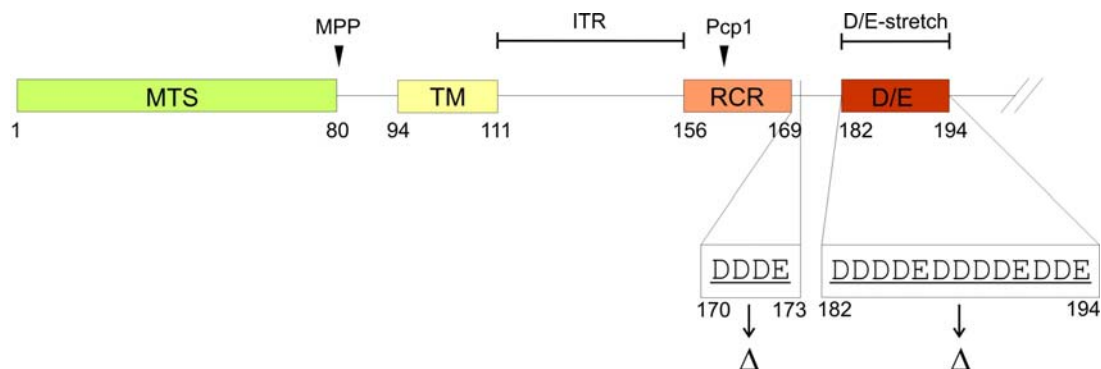


Abbildung 20: Schematische Darstellung des N-terminalen Teils von Mgm1 und der Deletionen negativ geladener Aminosäurereste. Die Zahlen benennen die Aminosäurereste mit denen die gezeigten Bereiche von Mgm1 beginnen bzw. enden. Pfeilspitzen bedeuten die Spaltstellen durch die angegebenen Proteine. Die Sequenzen der negativ geladenen Bereiche, welche deletiert wurden (Δ), sind unterstrichen dargestellt. MTS, mitochondriale Signalsequenz, TM, Transmembrandomäne, RCR, *rhomboid cleavage region*, D/E, D/E-Bereich, MPP, *mitochondrial processing peptidase*, ITR, Inter Transmembran Region.

Beide Proteine wurden in einem $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ und einem $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ Stamm exprimiert und die Bildung der beiden Isoformen von Mgm1 wie zuvor beschrieben analysiert. Die Variante Mgm1 $\Delta DDDE$ wurde wie Mgm1_{WT} prozessiert (Abbildung 21). Bei der Variante Mgm1 $\Delta D/E$ wurden jedoch nur stark reduzierte Mengen von s-Mgm1 detektiert, wobei l-Mgm1 zunahm. Die Bildung von s-Mgm1 war in beiden Fällen abhängig von Pcp1, da bei der Analyse der Varianten nach Expression im $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ Stamm

keine kurze Form von Mgm1 beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis zeigt, dass die dreizehn negativ geladenen Aminosäurereste C-terminal der RCR für eine effiziente Prozessierung von Mgm1 notwendig sind.

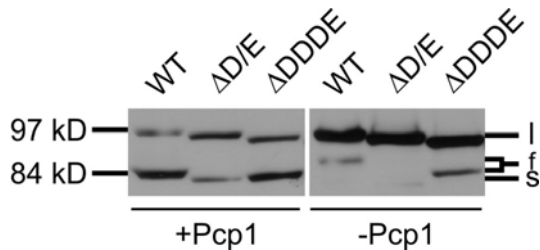


Abbildung 21: Negativ geladene Aminosäurereste C-terminal der RCR sind wichtig für die Prozessierung von Mgm1. Zwei Varianten von Mgm1 mit den angegebenen Deletionen negativ geladener Reste wurden in $\Delta mgm1$ - (+Pcp1) bzw. $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ -Stämmen (-Pcp1) exprimiert und die Bildung von I- und s-Mgm1 durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. WT, Wildtyp, I, I-Mgm1, s, s-Mgm1, f, unspezifisches Abbauprodukt von Mgm1.

Beide Isoformen von Mgm1 befinden sich normalerweise im Intermembranraum der Mitochondrien. Die reduzierte Bildung von s-Mgm1 $_{\Delta D/E}$ könnte von der fehlerhaften Sortierung in die einzelnen Subkompartimente der Mitochondrien z.B. in die mitochondriale Matrix herrühren. Dies wurde überprüft, indem zunächst Mitochondrien der entsprechenden Stämme isoliert wurden. Die Lokalisierung der Proteine wurde durch Behandlung der Mitochondrien mit Proteinase K (PK) und steigenden Konzentrationen Digitonin (zwischen 0 und 0,2 % w/v) untersucht (Abbildung 22). Die Zugänglichkeit der Protease zu Proteinen der IM bzw. der mitochondrialen Matrix, wurde durch Detektion des ADP/ATP-Transporters (Aac2) bzw. MPP (*mitochondrial processing peptidase*) kontrolliert. Aac2 ist mit 6 Transmembrandomänen in die IM der Mitochondrien integriert. Ist die Außenmembran durchlässig für PK wird ein C-terminales Fragment im Intermembranraum abgespalten und mittels Western-Blot wird eine kürzere Form von Aac2 detektiert. Sobald PK die mitochondriale Matrix durch die geöffnete IM erreicht, wird das Matrixprotein MPP verdaut und in geringerer Menge bzw. nicht mehr detektiert. Bei den so durchgeführten Digitoninfraktionierungen wurde Mgm1 bei der gleichen Digitoninmenge von PK verdaut wie Aac2, wobei MPP zunächst stabil blieb

(Abbildung 22). Die untersuchten Varianten von Mgm1 befinden sich demnach im Intermembranraum der Mitochondrien und sind nicht in der mitochondrialen Matrix lokalisiert.

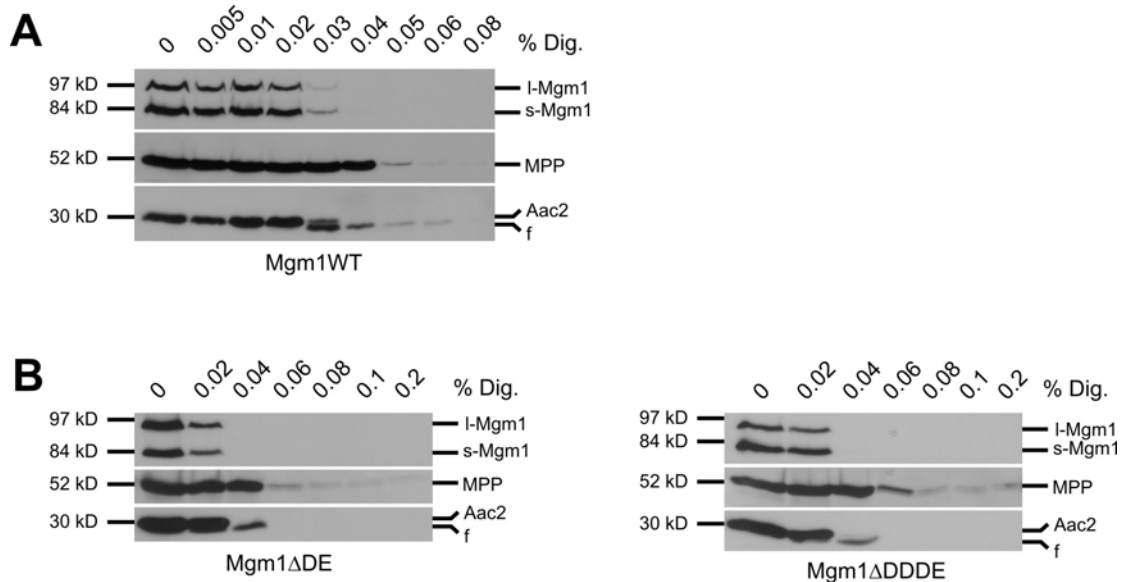


Abbildung 22: Mgm1 Δ D/E und Mgm1 Δ DDDE sind im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert. Isolierte Mitochondrien der entsprechenden Stämme wurden mit Digitoninlösungen steigender Konzentration (0-0,2 % Digitonin (w/v)) und gleichen Mengen Proteinase K (PK) versetzt. Die Zugänglichkeit von PK zu Mgm1 in den verschiedenen Proben, wurde mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Zum Vergleich wurden die gleichen Membranen mit Antikörpern gegen das Matrixprotein MPP und das Innenmembranprotein Aac2 dekoriert. f, Fragment von Aac2, welches durch den Verdau durch PK entsteht.

I-Mgm1 ist mit einer Transmembrandomäne in der IM verankert, während s-Mgm1 nur mit der Membran assoziiert ist (Herlan *et al.*, 2003). Zur Kontrolle der korrekten Integration bzw. Assoziation mit der mitochondrialen IM von Mgm1 Δ D/E bzw. Mgm1 Δ DDDE wurde die Extrahierbarkeit der Proteine aus entsprechenden, isolierten Mitochondrien durch Behandlung mit 0,1 M Natriumcarbonat untersucht. Lange und kurze Form von Mgm1 verhalten sich bei beiden untersuchten Mgm1-Varianten wie Mgm1_{WT} (Abbildung 23). Ein kleiner Teil der langen Isoform geht nach der Extraktion mit Natriumcarbonat in die lösliche Fraktion über, wobei der größte Teil von I-Mgm1 mit der Membranfraktion sedimentiert. Die kurze Form ist wesentlich stärker extrahierbar, so dass der überwiegende Anteil von s-Mgm1 sich im

Überstand befindet. Als Kontrollen dienten hier die in die IM integrierten Proteine Dld1 (vgl. Abschnitt 3.1.3) und Aac2 (s. oben), welche sich nach der Carbonatextraktion wie erwartet in der Membranfraktion befinden und das im Intermembranraum lösliche und somit im Überstand befindliche Protein Erv1 (Lange *et al.*, 2001). Dieses Experiment zeigt, dass beide Isoformen von Mgm1 Δ DDDE und Mgm1 Δ D/E in gleicher Weise wie Mgm1 Δ WT in die IM integriert bzw. mit dieser assoziiert sind. Daher und aufgrund der Lokalisierung beider Mgm1-Varianten im Intermembranraum, ist die stark verminderte Bildung der kurzen Form bei Mgm1 Δ D/E, nicht auf eine fehlerhafte Sortierung des Proteins zurückzuführen. Vielmehr scheint durch das Fehlen des D/E-Bereichs von Mgm1, die Prozessierung des Proteins durch Pcp1 beeinträchtigt zu sein.

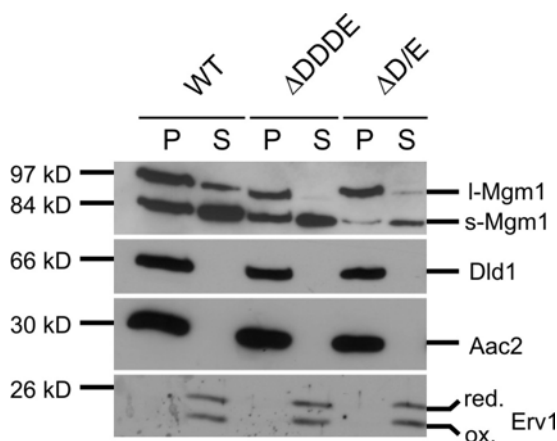


Abbildung 23: Die Deletion der negativ geladenen Bereiche von Mgm1 führt zu keiner Veränderung der Membranassoziation. Isolierte Mitochondrien wurden mit 0,1 M Natriumcarbonat extrahiert. Durch Zentrifugation wurden die Membranfraktionen (P) von den löslichen Fraktionen (S) getrennt. Die Extrahierbarkeit der mitochondrialen Proteine wurde durch SDS-PAGE der Proben und Immundekoration ermittelt. Hierzu wurden Antikörper gegen Mgm1, Dld1, Aac2 und Erv1 verwendet. red., reduzierte Form von Erv1, ox., oxidierte Form von Erv1.

Um die Bedeutung dieses D/E-Bereiches für die Spaltung von Mgm1 näher zu untersuchen, wurde ein Konstrukt erzeugt, welchem sowohl die TM als auch der D/E-Bereich fehlt (Mgm1 Δ TM+ Δ D/E). I-Mgm1 ist mit seiner TM in der IM der Mitochondrien verankert. Deletiert man jedoch diese TM, wird I-Mgm1 nicht mehr gebildet. Mgm1 wird importiert bis die RCR die IM erreicht

und dort vollständig von Pcp1 zu s-Mgm1 prozessiert, sodass ausschließlich die kurze Form des Proteins vorliegt (Herlan *et al.*, 2004). Mgm1 $_{\Delta TM+\Delta D/E}$ wurde wie oben beschrieben exprimiert und die Entstehung von l- und s-Mgm1 in Abhängigkeit von Pcp1 analysiert. Als Kontrolle diente die Variante Mgm1 $_{\Delta TM}$ (Herlan *et al.*, 2004). Aufgrund der fehlenden TM würde man erwarten, dass Mgm1 $_{\Delta TM+\Delta D/E}$ ausschließlich als s-Mgm1 vorliegt. Tatsächlich wurde die Variante von Pcp1 zu s-Mgm1 prozessiert, allerdings wurde ebenfalls l-Mgm1 detektiert (Abbildung 24). Demnach kann Pcp1 ohne den D/E-Bereich von Mgm1 eine Variante, die sonst zu 100 % prozessiert wird, nicht vollständig spalten. Dies belegt die Bedeutung dieses Bereiches für die Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1.

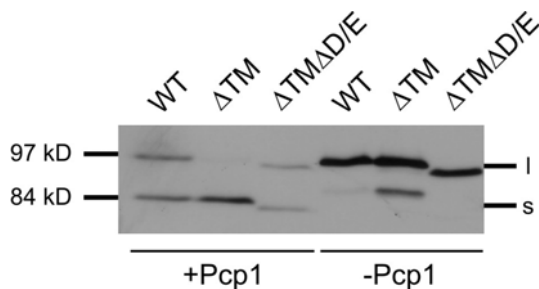


Abbildung 24: Der D/E-Bereich von Mgm1 wird für die Prozessierung durch Pcp1 benötigt. Es wurden Gesamtzellextrakte von $\Delta mgm1$ - (+Pcp1) und $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ -Stämmen (-Pcp1) hergestellt, welche die angegebenen Versionen von Mgm1 exprimieren. Die Bildung der beiden Isoformen von Mgm1 wurde durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. WT, Wildtyp, l, l-Mgm1, s, s-Mgm1, f, unspezifisches Abbauprodukt von Mgm1.

Die Lokalisierung von Mgm1 $_{\Delta TM\Delta D/E}$ im Intermembranraum wurde mittels Digitoninfraktionierung isolierter Mitochondrien des entsprechenden Stammes gezeigt (siehe oben). Wäre die bei dieser Variante entstehende, nicht prozessierte Form des Proteins in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, würde dies auf einen Einfluss von $\Delta D/E$ auf den Import von Mgm1 hinweisen. Dies kann ausgeschlossen werden durch den Nachweis der Lokalisierung im Intermembranraum (Abbildung 25).

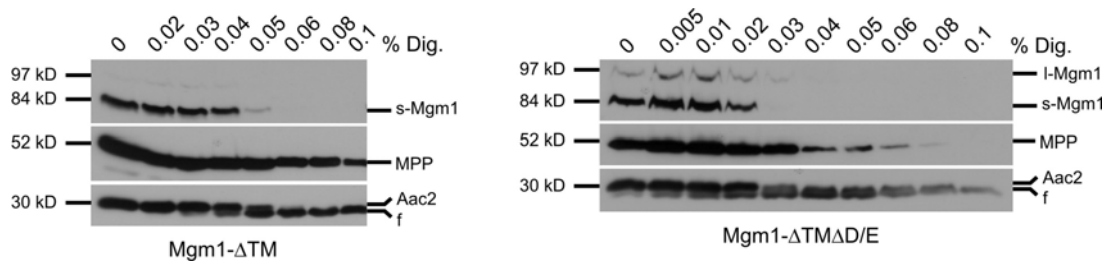


Abbildung 25: Mgm1 Δ TM und Mgm1 Δ D/E befinden sich im Intermembranraum der Mitochondrien. Isolierte Mitochondrien der entsprechenden Stämme wurden mit Digitoninlösungen steigender Konzentration (0-0,1 % Digitonin (w/v)) und gleichen Mengen Proteinase K (PK) versetzt. Die Zugänglichkeit von PK zu Mgm1 in den verschiedenen Proben, wurde mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Zum Vergleich wurden die gleichen Membranen mit Antikörpern gegen das Matrixprotein MPP und das Innenmembranprotein Aac2 dekoriert. f, Fragment von Aac2, welches durch den Verdau durch PK entsteht.

Um die Assoziation von Mgm1 Δ TM Δ D/E mit der IM zu untersuchen, wurde wie oben beschrieben die Extrahierbarkeit dieser Variante aus der Membranfraktion isolierter Mitochondrien untersucht. s-Mgm1 Δ TM ist hierbei wie auch s-Mgm1 $_{WT}$ nicht fest in die Membran integriert. Dies gilt auch für beide Formen von Mgm1 Δ TM Δ D/E (Abbildung 26). Die Deletion des D/E-Bereiches könnte also die Insertion von Mgm1 in die IM beeinträchtigen, wodurch es zu einer verminderten Prozessierung kommen würde. Dagegen spricht jedoch, dass I-Mgm1 Δ D/E wie I-Mgm1 $_{WT}$ in der IM verankert ist (Abbildung 23). Zusätzlich ist I-Mgm1 Δ TM, wie es in einem Δ *mgm1*/ Δ *pcp1* Stamm entsteht, ebenso aus der Membran extrahierbar wie s-Mgm1 $_{WT}$ bzw. s-Mgm1 Δ TM (nicht gezeigt). Somit ist die weniger starke Assoziation von I-Mgm1 Δ TM Δ D/E auf das Fehlen der TM zurückzuführen und nicht auf den Einfluss von Δ D/E auf die Membranintegration von Mgm1.

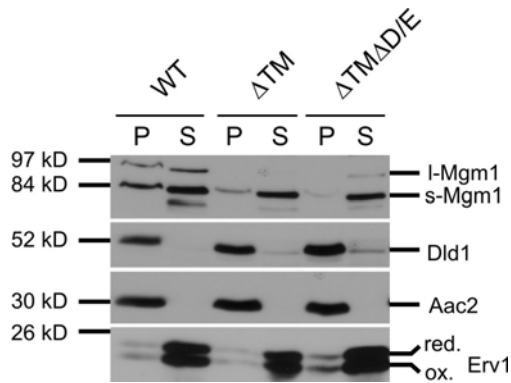


Abbildung 26: Membranassoziation von Mgm1 Δ TM und Mgm1 Δ TM Δ D/E. Isolierte Mitochondrien wurden mit 0,1 M Natriumcarbonat extrahiert. Durch Zentrifugation wurden die Membranfraktionen (P) von den löslichen Fraktionen (S) getrennt. Die Extrahierbarkeit der mitochondrialen Proteine wurde durch SDS-PAGE der Proben und Immundekoration ermittelt. Hierzu wurden Antikörper gegen Mgm1, Dld1, Aac2 und Erv1 verwendet. red., reduzierte Form von Erv1, ox., oxidierte Form von Erv1.

3.1.5 Stabilität der langen und kurzen Form von Mgm1 Δ D/E

Die schlechtere Prozessierung von Mgm1 Δ D/E, könnte von einer erhöhten Stabilität der langen bzw. vermehrtem Abbau der kurzen Form dieser Variante herrühren. Um dies zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Import Experiment durchgeführt und der Abbau der importierten Proteine über die Zeit beobachtet.

Die ersten 228 Aminosäurereste von Mgm1 umfassen die Signalsequenz, die TM, sowie die RCR und den D/E-Bereich des Proteins. Es wurde bereits gezeigt, dass ein radioaktiv markiertes Fusionsprotein aus Mgm1₁₋₂₂₈ und der Dihydrofolatreduktase aus Mäusen (DHFR) *in vitro* in isolierte Mitochondrien importiert und dort entsprechend lange und kurze Form gebildet wird (Herlan *et al.*, 2004). Es wurde eine Variante von Mgm1₁₋₂₂₈DHFR erzeugt, in der der D/E-Bereich deletiert wurde. Beide, Mgm1₁₋₂₂₈DHFR und Mgm1_{1-228- Δ D/E}DHFR wurden radioaktiv markiert und in isolierte Mitochondrien importiert. Der Import wurde gestoppt, die Mitochondrien reisoliert und für bis zu 45 min inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die langen und kurzen Formen der Proteine durch SDS-PAGE und Autoradiographie detektiert. Um beide

Isoformen eindeutig zu identifizieren, wurde jeweils ein Import mit bzw. ohne DCI (Dichloroisocoumarin) durchgeführt (nicht gezeigt). Diese Substanz hemmt Serinproteasen und somit auch Rhomboidproteasen wie Pcp1 (Urban *et al.*, 2001), sodass nur wenig s-Mgm1 gebildet wird. Die Stabilität der langen und kurzen Formen wurde durch Quantifizierung der Banden und Bestimmung der relativen Mengen im Vergleich zum Beginn der Inkubation ermittelt. Generell zeigte sich eine höhere Stabilität der kurzen Form von Mgm1₁₋₂₂₈DHFR verglichen mit der langen (Abbildung 27, Abbildung 28, Tabelle 10). Die kurzen Formen der beiden Fusionsproteine sind über den getesteten Zeitraum gleich stabil. Nach 45 min Inkubation sind noch 77 % von I-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR vorhanden, jedoch nur 31 % von I-Mgm1_{1-228-ΔD/E}DHFR. Demnach wird I-Mgm1_{1-228-ΔD/E}DHFR etwa zweimal schneller abgebaut als die lange Form von Mgm1₁₋₂₂₈DHFR. Daher kann die verminderte Bildung von s-Mgm1_{ΔD/E} nicht durch eine höhere Stabilität der langen oder durch einen verstärkten Abbau der kurzen Form erklärt werden. Die 13 negativ geladenen Aminosäurereste C-terminal der Pcp1-Spaltstelle sind folglich von entscheidender Bedeutung für die effiziente Prozessierung von Mgm1.

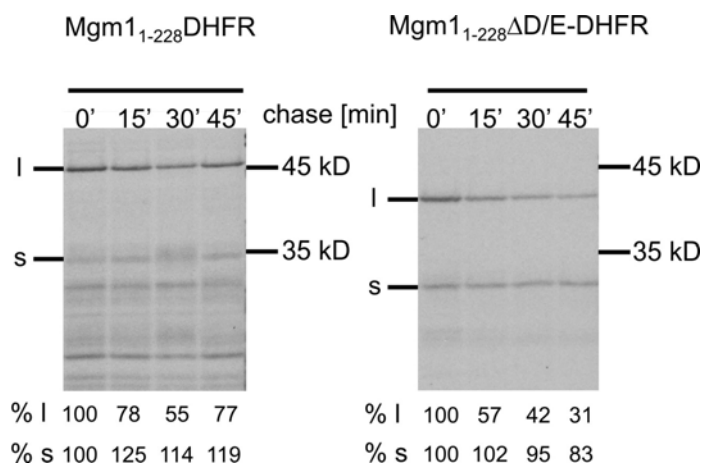


Abbildung 27: Import von radioaktiv markierten Vorläuferproteinen von Mgm1₁₋₂₂₈DHFR und Mgm1_{1-228-ΔD/E}DHFR. Nach 24 min Import der Proteine in isolierte Mitochondrien und Inkubation für 0, 15, 30 bzw. 45 min, wurde die Rate des Abbaus der importierten Proteine mittels SDS-PAGE, Autoradiographie und densitometrischer Messung der Banden bestimmt. Bezogen auf den Zeitpunkt 0 sind die Mengen der nach den Inkubationsschritten noch vorhandenen langen und kurzen Isoformen der Mgm1-Derivate angegeben. I, I-Mgm1, s, s-Mgm1.

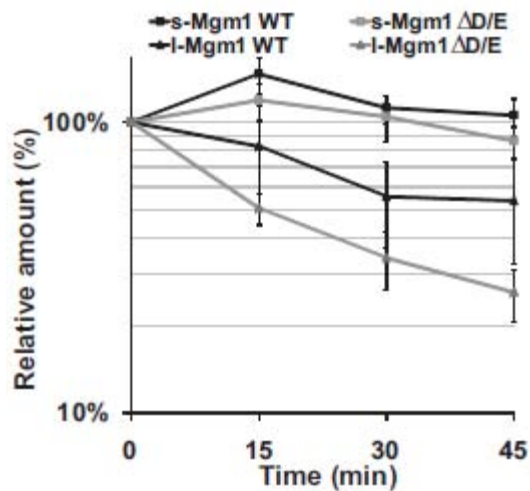


Abbildung 28: Die lange Form von Mgm1₁₋₂₂₈ Δ D/E-DHFR ist weniger stabil als I-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR. Die densitometrischen Auswertungen von jeweils drei Import Experimenten (vgl. Abbildung 27) wurden logarithmisch aufgetragen und der Abbau der zuvor detektierten Isoformen über die Zeit dargestellt. s-Mgm1WT, s-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR, s-Mgm1 Δ D/E, s-Mgm1_{1-228- Δ D/E}DHFR, I-Mgm1WT, I-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR, I-Mgm1 Δ D/E, I-Mgm1_{1-228- Δ D/E}DHFR.

Zeit [min]	0	15	30	45
I-WT	100	83 \pm 32	55 \pm 18	54 \pm 21
s-WT	100	147 \pm 21	112 \pm 12	106 \pm 15
I- Δ D/E	100	51 \pm 6	34 \pm 8	26 \pm 5
s- Δ D/E	100	119 \pm 17	105 \pm 19	86 \pm 11

Tabelle 10: Quantitative Analyse der Stabilität der entsprechenden Isoformen von Mgm1. Die relativen Mengen von I- und s-Mgm1 bezogen auf den Zeitpunkt 0 wurden durch densitometrische Auswertung der Autoradiographien bestimmt. Standardabweichungen von je drei Experimenten sind angegeben. I-WT, I-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR, s-WT, s-Mgm1₁₋₂₂₈DHFR, I- Δ D/E, I-Mgm1_{1-228- Δ D/E}DHFR, s- Δ D/E, s-Mgm1_{1-228- Δ D/E}DHFR.

3.1.6 Charakterisierung des D/E-Bereiches von Mgm1

Die Bedeutung der negativen Ladungen des D/E-Bereiches von Mgm1 sollte im folgenden genauer untersucht werden. Dazu wurden weitere Mgm1-Varianten erzeugt, deren D/E-Bereich durch Austausch der ersten fünf, neun oder aller 13 Reste gegen ungeladene oder positiv geladene

Aminosäurereste verändert wurde (Abbildung 29). Dadurch wurde die Ladung des D/E-Bereiches verändert, nicht aber dessen Länge.

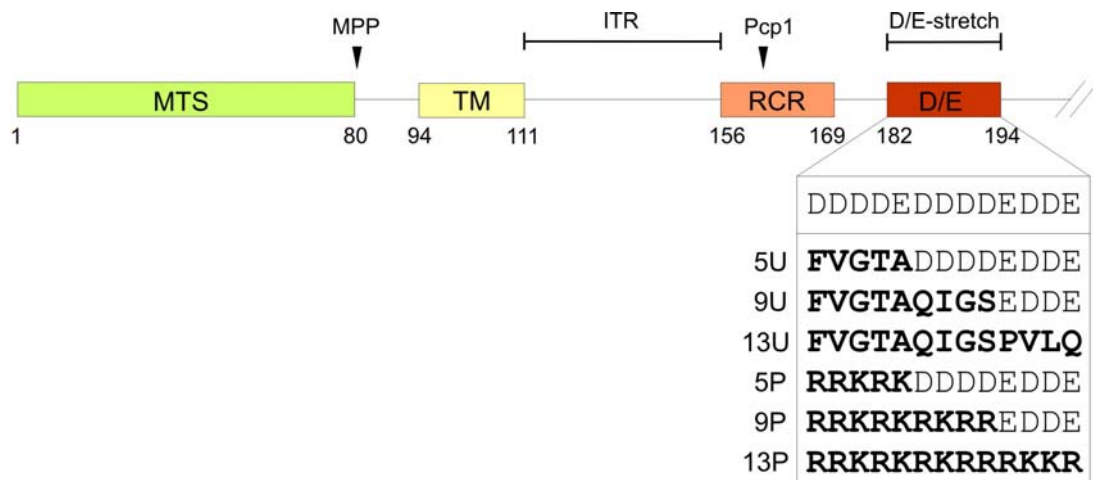


Abbildung 29: Schematische Darstellung des N-terminalen Teils von Mgm1 und der Aminosäureaustausche im D/E-Bereich. Die Zahlen benennen die Aminosäurereste mit denen die gezeigten Bereiche von Mgm1 beginnen bzw. enden. Pfeilspitzen bedeuten die Spaltstellen durch die angegebenen Proteine. Die Sequenz des D/E-Bereiches ist angegeben. Aminosäurereste, die ausgetauscht wurden sind fett dargestellt. 5U, 9U, 13U, Austausch der ersten fünf, der ersten neun bzw. aller 13 Reste des D/E-Bereiches durch ungeladene Reste. 5P, 9P, 13P, Austausch der ersten fünf, der ersten neun bzw. aller 13 Reste des D/E-Bereiches durch positiv geladene Reste. MTS, mitochondriale Signalsequenz, TM, Transmembrandomäne, RCR, *rhomboid cleavage region*, D/E, D/E-Bereich, MPP, *mitochondrial processing peptidase*, ITR, Inter Transmembran Region.

Wie zuvor beschrieben wurden die verschiedenen Mgm1-Varianten in Hefestämmen mit und ohne Pcp1 exprimiert und die Bildung von l- bzw. s-Mgm1 detektiert. Mgm1_{5U} und Mgm1_{5P} zeigten dabei ebenso effiziente Bildung der kurzen Form wie Mgm1_{WT} (Abbildung 30). Jedoch wurde s-Mgm1 bei den Varianten Mgm1_{9U} und Mgm1_{9P} in geringerem Maße gebildet. Beim Austausch des gesamten D/E-Bereiches durch ungeladene (Mgm1_{13U}) bzw. positiv geladene (Mgm1_{13P}) Reste, war die Bildung der kurzen Form sogar noch stärker beeinträchtigt (Abbildung 30). Je weniger negative Ladungen also in diesem Bereich von Mgm1 vorhanden waren, desto weniger effizient war die Spaltung von Mgm1 durch Pcp1.

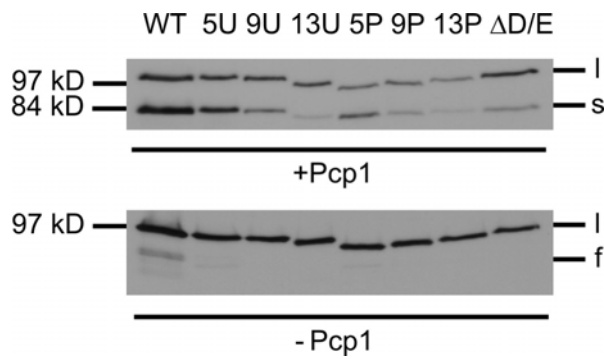


Abbildung 30: Je weniger negativ geladene Aminosäurereste sich im D/E-Bereich von Mgm1 befinden, desto weniger effizient wird Mgm1 prozessiert. Die angegebenen Varianten von Mgm1 wurden in $\Delta mgm1$ - (+Pcp1) bzw. $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ -Stämmen (-Pcp1) exprimiert und die Bildung von I- und s-Mgm1 durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. WT, Wildtyp, I, I-Mgm1, s, s-Mgm1, f, unspezifisches Abbauprodukt von Mgm1.

Auch für Mgm1_{5U}, Mgm1_{5P}, Mgm1_{9U}, Mgm1_{9P}, Mgm1_{13U} und Mgm1_{13P} wurde die korrekte Lokalisierung und die Assoziation der Isoformen mit der IM der Mitochondrien überprüft. Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien aus $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ Stämmen, welche die jeweiligen Mgm1-Varianten exprimieren, isoliert und Digitoninfraktionierungen sowie Carbonatextraktionen wie zuvor beschrieben durchgeführt (vgl. 3.1.4). Alle sechs Varianten mit verändertem D/E-Bereich befinden sich hiernach wie Mgm1_{WT} (vgl. Abbildung 22) im Intermembranraum der Mitochondrien (Abbildung 31).

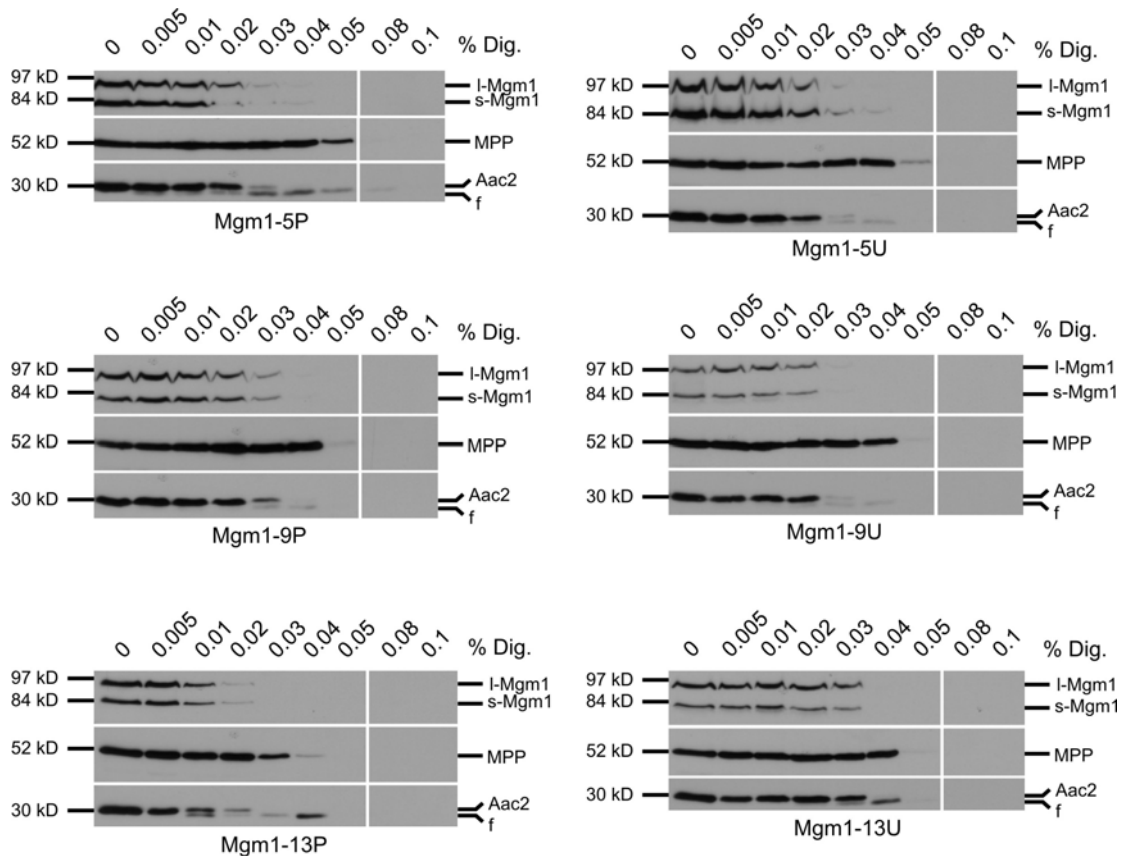


Abbildung 31: Alle Mgm1-Varianten mit verändertem D/E-Bereich sind im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Isolierte Mitochondrien der entsprechenden Stämme wurden mit Digitoninlösungen steigender Konzentration (0-0,1 % Digitonin (w/v)) und gleichen Mengen Proteinase K (PK) versetzt. Die Zugänglichkeit von PK zu Mgm1 in den verschiedenen Proben, wurde mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Zum Vergleich wurden die gleichen Membranen mit Antikörpern gegen das Matrixprotein MPP und das Innenmembranprotein Aac2 dekoriert. f, Fragment von Aac2, welches durch den Verdau durch PK entsteht.

Durch die Behandlung mit Natriumcarbonat werden wie bei Mgm1_{WT} die langen Formen der untersuchten Proteine in geringerem Maße aus Membranen gelöst als die kurzen Formen (Abbildung 32). Die langen Formen sind demnach in die IM integriert und die kurzen mit ihr assoziiert. Daher kann auch für die Mgm1-Varianten mit weniger negativ geladenen D/E-Bereichen eine fehlerhafte Sortierung innerhalb der Mitochondrien ausgeschlossen werden.

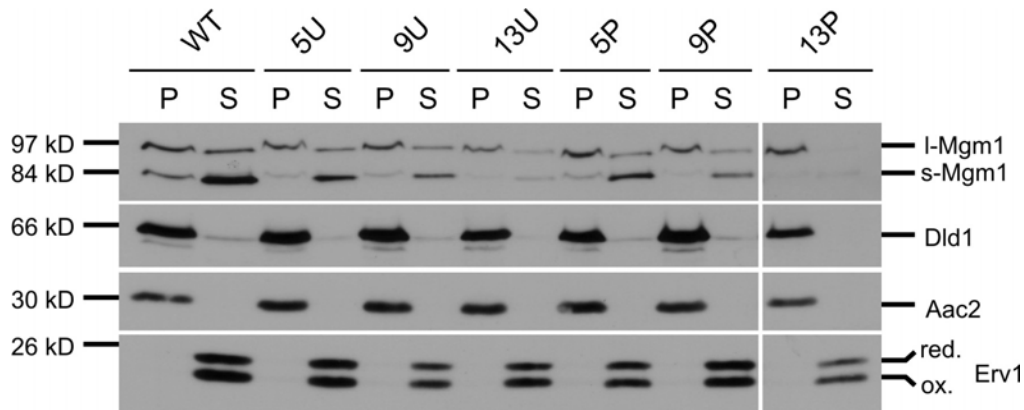


Abbildung 32: Mgm1-Varianten mit verändertem D/E-Bereich sind wie Mgm1_{WT} mit der Membran assoziiert. Isolierte Mitochondrien wurden mit 0,1 M Natriumcarbonat extrahiert. Durch Zentrifugation wurden die Membranfraktionen (P) von den löslichen Fraktionen (S) getrennt. Die Extrahierbarkeit der mitochondrialen Proteine wurde durch SDS-PAGE der Proben und Immundekoration ermittelt. Hierzu wurden Antikörper gegen Mgm1, Dld1, Aac2 und Erv1 verwendet. red., reduzierte Form von Erv1, ox., oxidierte Form von Erv1.

3.1.7 Negativ geladene Aminosäurereste C-terminal der Pcp1 Spaltstelle haben keinen Einfluss auf die Prozessierung von Ccp1

Aufgrund der Bedeutung des D/E-Bereichs in Mgm1 für dessen effiziente Prozessierung durch Pcp1 (vgl. Abschnitt 3.1.4), sollte untersucht werden, ob ähnliche Sequenzbereiche auch in Ccp1 (Cytochrom c Peroxidase), dem zweiten Substrat von Pcp1, vorhanden sind. Ccp1 ist im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert und an der Entfernung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt. Es wird in Mitochondrien importiert wo zunächst die m-AAA-Protease der mitochondrialen Matrix (Yta10/Yta12) ein N-terminales Peptid abspaltet. Daraus resultiert eine intermediäre Form von Ccp1 (i-Ccp1), welche anschließend durch Pcp1 zur reifen Form (m-Ccp1) gespalten wird. Diese Spaltung findet innerhalb eines im N-terminalen Bereich von Ccp1 gelegenen hydrophoben Segments statt (Esser *et al.*, 2002).

Für die Sequenzanalyse von Ccp1 wurde wie zuvor bei Mgm1 die SGD-Datenbank verwendet, um mit Ccp1 verwandte Proteine anderer Pilzarten zu identifizieren. Die relevanten Bereiche der gefundenen

Sequenzen wurden bestimmt und mittels ClustalW verglichen. Dabei fielen vier negativ geladene Aminosäurereste C-terminal der Pcp1 Spaltstelle auf (EDDE, 99-102), welche unter den betrachteten Spezies konserviert sind (Abbildung 33).

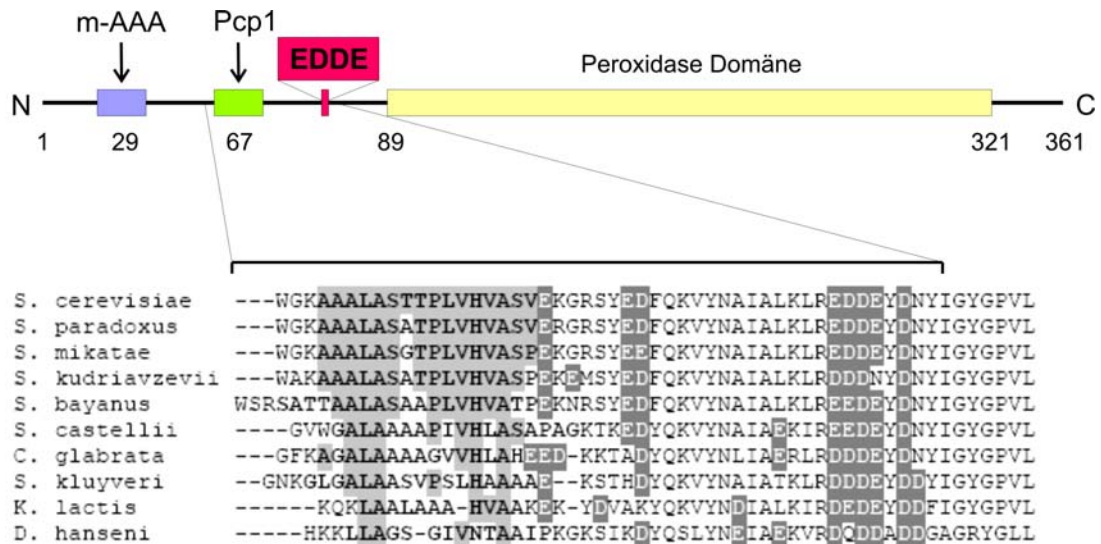


Abbildung 33: Analyse der Aminosäuresequenz von Ccp1 in der Umgebung der Pcp1 Spaltstelle. Die schematische Darstellung zeigt das Protein Ccp1. Zahlen stehen für die entsprechenden Aminosäurereste. Pfeile bedeuten die Stellen an denen Ccp1 durch die Yta10/Yta12-Protease (m-AAA) bzw. Pcp1 gespalten wird. Die vier negativ geladenen Reste C-terminal der Pcp1 Spaltstelle sind rot hinterlegt. Die Sequenzanalyse wurde für Ccp1 aus *S. cerevisiae* und ausgesuchte Bereiche Ccp1-ähnlicher Proteine der angegebenen Organismen mit Hilfe des Programms ClustalW durchgeführt. Hydrophobe Segmente, die dem durch Pcp1 gespaltenen hydrophoben Segment von Ccp1 entsprechen sind fett dargestellt, konservierte Aminosäurereste dieser Segmente sind hellgrau, negativ geladene Reste dunkelgrau hinterlegt.

Es sollte überprüft werden, ob eine Ccp1-Variante, der die Reste 99-102 fehlten, von Pcp1 prozessiert werden konnte. Hierzu wurden Ccp1_{WT} und Ccp1_{ΔEDDE} in einem Δccp1 Stamm exprimiert und die entstandenen Formen von Ccp1 mittels Gesamtproteinextraktion, SDS-PAGE und Western-Blot mit Antikörpern gegen Ccp1 nachgewiesen. Sowohl Ccp1_{WT} als auch Ccp1_{ΔEDDE} wurden zur reifen Form von Ccp1 (m-Ccp1) prozessiert, was auf eine vollständige Spaltung der beiden Ccp1-Varianten durch Pcp1 hindeutet. Zur Kontrolle wurden Gesamtproteinextrakte aus einem

$\Delta yta10/\Delta yta12$, einem $\Delta pcp1$ und einem W303 α Hefestamm verwendet. Im $\Delta yta10/\Delta yta12$ Stamm ist die m-AAA-Protease nicht vorhanden, welche den ersten Schritt bei der Prozessierung von Ccp1 übernimmt. Daher ist in diesem Stamm nur die Vorläuferform des Proteins (p-Ccp1) erkennbar. Im $\Delta pcp1$ Stamm dagegen wird Ccp1 der m-AAA Protease wie erwartet zu i-Ccp1 prozessiert. Im Wildtyp Stamm findet die Spaltung durch den Yta10/12-Komplex und Pcp1 statt und man detektiert m-Ccp1 (Abbildung 34).

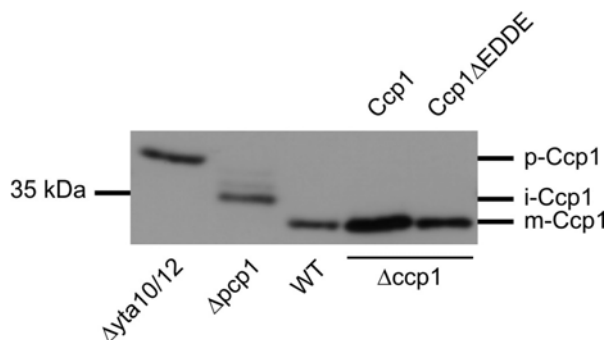


Abbildung 34: Die Prozessierung von Ccp1 durch Pcp1 ist unabhängig von negativ geladenen Aminosäureresten. Gesamtzellextrakte von $\Delta yta10/12$ -, $\Delta pcp1$ - und WT-Stämmen sowie $\Delta ccp1$ -Stämmen, welche die angegebenen Versionen von Ccp1 exprimieren, wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Ccp1 analysiert. p-Ccp1, Vorläuferprotein von Ccp1, i-Ccp1, intermediäre Form von Ccp1, m-Ccp1, reife Form von Ccp1.

Um zu zeigen, dass die Prozessierung beider Varianten tatsächlich von Pcp1 abhängig war, wurden Ccp1_{WT}FLAG und Ccp1 Δ EDDEFLAG generiert. Diese Proteine enthielten ein C-terminales FLAG-Epitop, welches die Detektion der Varianten in einem $\Delta pcp1$ Stamm ermöglichte, der noch endogenes Ccp1 enthielt. Ccp1_{WT}FLAG und Ccp1 Δ EDDEFLAG wurden in einem $\Delta ccp1$ und einem $\Delta pcp1$ Stamm exprimiert und die Bildung der entsprechenden Formen von Ccp1 untersucht. In diesem Fall wurde ein Antikörper gegen das FLAG-Epitop eingesetzt, um die Proteine nachzuweisen. Im $\Delta ccp1$ Stamm wurde je eine Bande bei etwa 35 kDa detektiert, welche m-Ccp1_{WT}FLAG bzw. m-Ccp1 Δ EDDEFLAG entspricht (Abbildung 35). Im $\Delta pcp1$ Stamm wurde je eine Bande detektiert, die größer war als die reifen Formen und somit die intermediären Formen der Proteine

darstellte. Demnach ist die Prozessierung von Ccp1 Δ EDDE zur reifen Form abhängig von Pcp1.

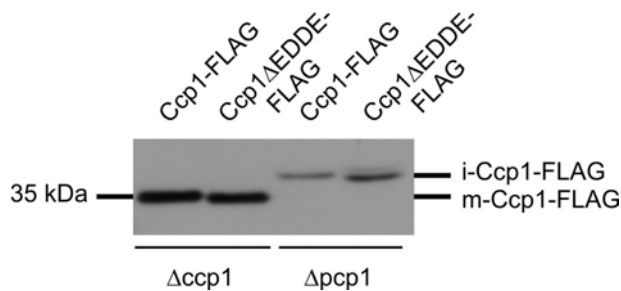


Abbildung 35: Die Bildung von m-Ccp1 Δ EDDE ist abhängig von Pcp1. Ccp1-FLAG und Ccp1 Δ EDDE-FLAG wurden in einem Δ ccp1- bzw. einem Δ pcp1-Stamm exprimiert. Gesamtzellextrakte dieser Stämme wurden mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen das FLAG-Epitop (Sigma) analysiert. i-Ccp1-FLAG, intermediäre Form der Ccp1-FLAG Varianten, m-Ccp1-FLAG, reife Form der Ccp1-FLAG Varianten.

Sowohl Ccp1_{WT} als auch Ccp1 Δ EDDE werden von der m-AAA-Protease und Pcp1 gespalten. Die vier negativ geladenen Aminosäurereste EDDE in Ccp1 haben daher, im Gegensatz zum D/E-Bereich in Mgm1, keinen Einfluss auf die Prozessierung durch Pcp1.

3.1.8 Der Bereich zwischen den beiden hydrophoben Segmenten von Mgm1 ist entscheidend für die Spaltung durch Pcp1

Der Bereich zwischen TM und RCR von Mgm1 (Aminosäurereste 112-155) wurde ITR genannt (Inter Transmembran Region). Sein Einfluss auf die Spaltung von Mgm1 durch die Rhomboidprotease wurde untersucht, indem die ITR zunächst verdoppelt bzw. verdreifacht wurde. Zusätzlich wurden die Aminosäurereste 115-150 der ITR deletiert (Abbildung 36).

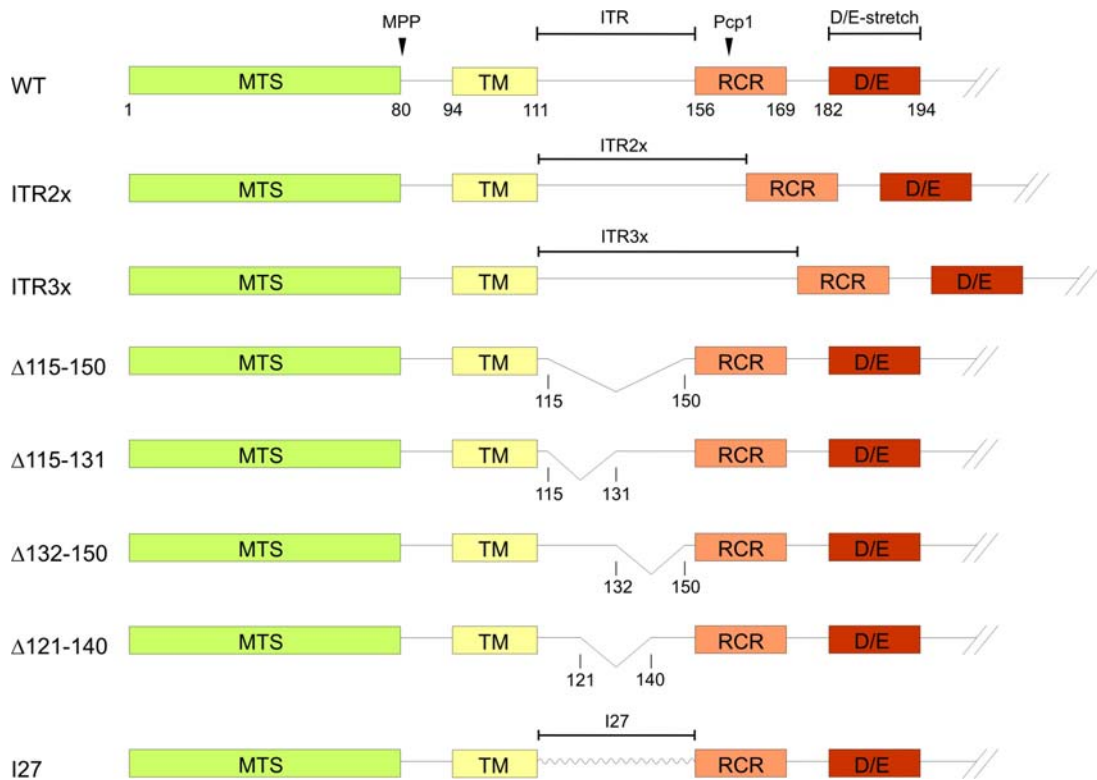


Abbildung 36: Schematische Darstellungen des N-terminalen Teils von Mgm1 und der eingeführten Sequenzänderungen. Die Zahlen benennen die entsprechenden Aminosäurereste in Mgm1. Pfeilspitzen deuten die Spaltstellen durch die angegebenen Proteasen an. Deletionen und Insertionen der ITR von Mgm1 sind dargestellt. MTS, mitochondriale Signalsequenz, TM, Transmembrandomäne, RCR, *rhomboid cleavage region*, D/E, D/E-Bereich, MPP, *mitochondrial processing peptidase*, ITR, Inter Transmembran Region, I27, Aminosäurereste 5265-5297 der Domäne I27 des humanen Muskelproteins Titin.

Die daraus resultierenden Varianten Mgm1_{ITR2x}, Mgm1_{ITR3x} und Mgm1_{Δ115-150} wurden wie zuvor in einem $\Delta m g m 1 / \Delta m g m 1$ und einem $\Delta m g m 1 / \Delta p c p 1$ Stamm exprimiert und mittels Gesamtproteinextraktion, SDS-PAGE und Western-Blot mit anti-Mgm1-Antikörpern die Bildung von I- und s-Mgm1 in Abhängigkeit von Pcp1 analysiert. Mgm1_{ITR2x} und Mgm1_{ITR3x} werden von Pcp1 prozessiert (Abbildung 37). Diese Prozessierung scheint sogar effektiver zu sein als bei Mgm1_{WT}, da die Mengen an I-Mgm1_{ITR2x} bzw. I-Mgm1_{ITR3x} reduziert sind. Der größere Abstand zwischen TM und RCR behindert die Spaltung von Mgm1 also nicht. Im Fall von Mgm1_{Δ115-150} konnte jedoch keine kurze Form detektiert werden. Das weist darauf hin, dass die ITR wahrscheinlich notwendig für die Prozessierung durch Pcp1 ist.

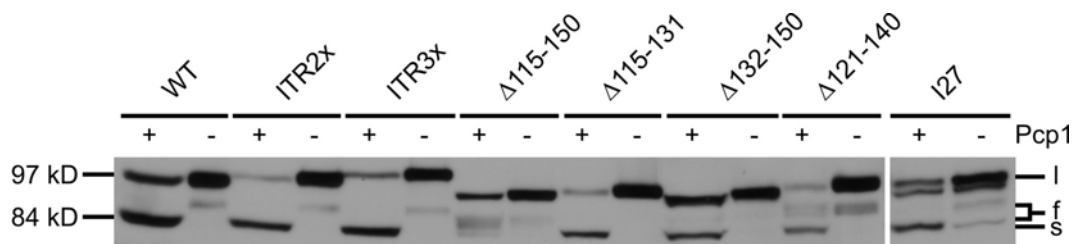


Abbildung 37: Teile der ITR von Mgm1 sind wichtig für die Prozessierung durch Pcp1. Die angegebenen Varianten von Mgm1 wurden in $\Delta mgm1$ - (+Pcp1) bzw. $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ -Stämmen (-Pcp1) exprimiert und die Bildung von l- und s-Mgm1 durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. WT, Wildtyp, l, l-Mgm1, s, s-Mgm1, f, unspezifisches Abbauprodukt von Mgm1.

Um die Bedeutung der ITR für die Spaltung von Mgm1 durch Pcp1 genauer zu analysieren, wurden weitere Varianten konstruiert: $Mgm1_{\Delta 115-131}$, $Mgm1_{\Delta 132-150}$ und $Mgm1_{\Delta 121-140}$ (Abbildung 36). $Mgm1_{\Delta 115-131}$ und $Mgm1_{\Delta 121-140}$ wurden in Abhängigkeit von Pcp1 zu s-Mgm1 prozessiert. $Mgm1_{\Delta 132-150}$ jedoch, wies nur stark reduzierte Mengen der kurzen Form von Mgm1 auf, es konnte also nicht so effizient gespalten werden wie $Mgm1_{WT}$ (Abbildung 37).

Durch die Variante $Mgm1_{I27}$ sollte geklärt werden, ob die verminderte Prozessierung von $Mgm1_{\Delta 115-150}$ bzw. $Mgm1_{\Delta 132-150}$ durch einen reduzierten Abstand zwischen TM und RCR zustande kommt oder ob die ITR eine bestimmte Aminosäuresequenz enthält, welche für die Substraterkennung durch Pcp1 benötigt wird. Dazu wurden die Aminosäurereste 115-150 der ITR von Mgm1 durch 36 Reste der Domäne I27 des humanen Muskelproteins Titin ersetzt (Abbildung 36). Es wurde bereits zuvor gezeigt, dass diese Domäne *in vitro* effektiv in isolierte Mitochondrien importiert werden kann (Okamoto *et al.*, 2002). Die Variante $Mgm1_{I27}$ wurde durch Pcp1 prozessiert, jedoch wurde auch bei der Analyse im $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ Stamm eine Proteinbande auf gleicher Höhe wie s-Mgm1 detektiert (Abbildung 37). Diese war deutlich schwächer als s-Mgm1 im $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ Stamm und stellt daher am wahrscheinlichsten ein unspezifisches Abbauprodukt von l-Mgm1 dar. Da die Sequenz des in Mgm1 eingesetzten Bereichs von I27 sich völlig von der Sequenz der ITR

unterscheidet, Mgm1₁₂₇ aber trotzdem effizient von Pcp1 gespalten wird, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass ein bestimmter Mindestabstand zwischen TM und RCR für die Prozessierung von Mgm1 benötigt wird.

Wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, wurde das Vorhandensein der hier gezeigten Varianten von Mgm1 im Intermembranraum von Mitochondrien mittels Digitoninfraktionierung bestätigt. Einzig ein kleiner Anteil der kurzen Form von Mgm1₁₂₇ scheint sich in der Matrix zu befinden (Abbildung 38). Dieser Anteil entspricht vermutlich dem zuvor identifizierten unspezifischen Abbauprodukt der langen Form dieser Variante (Abbildung 37). Somit kann eine falsche Lokalisierung der Mgm1-Varianten innerhalb der Mitochondrien als Grund für verminderte Prozessierung durch Pcp1 ausgeschlossen werden.

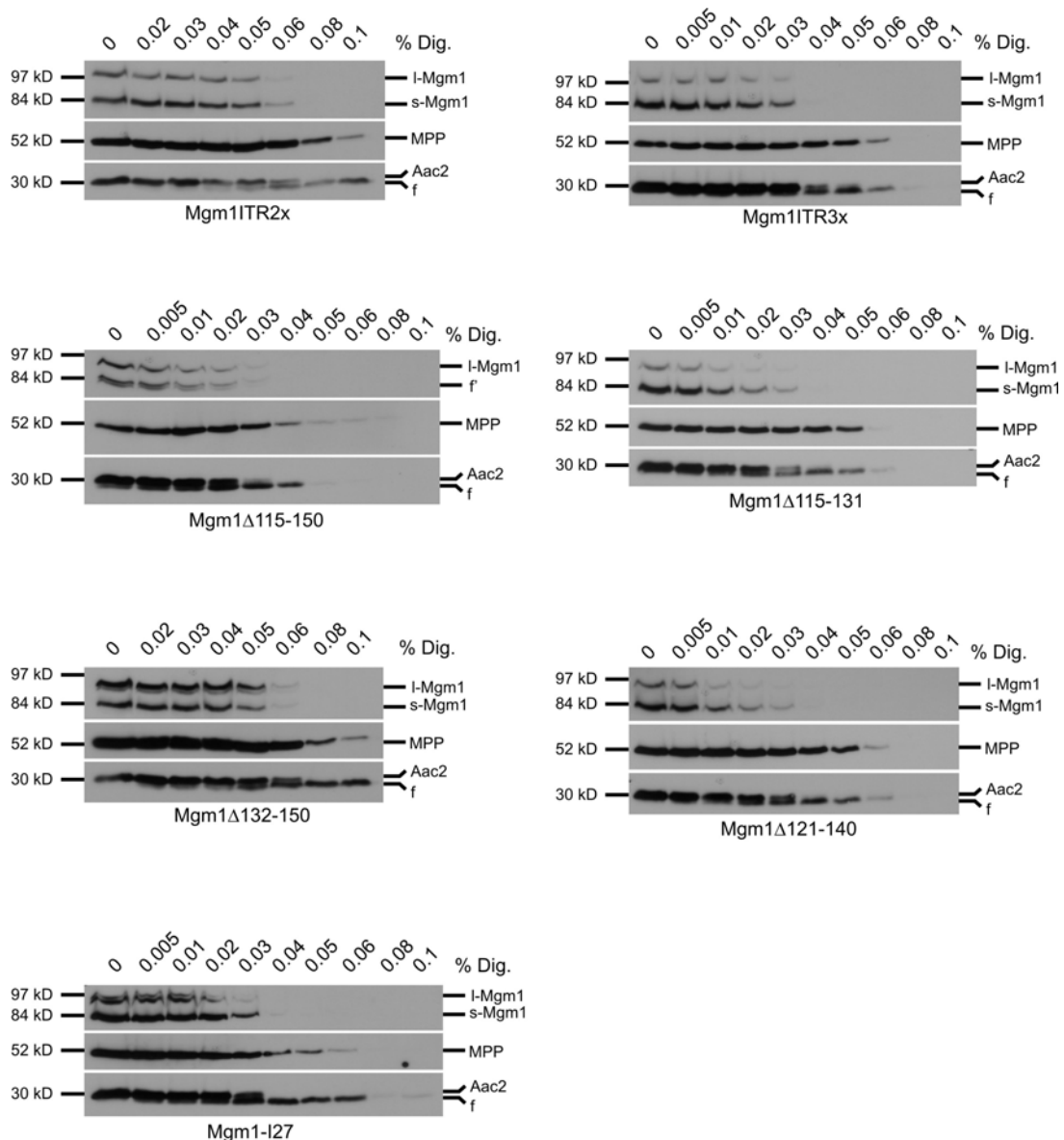


Abbildung 38: Submitochondriale Lokalisation der Mgm1-Varianten mit veränderter ITR. Isolierte Mitochondrien der entsprechenden Stämme wurden mit Digitoninlösungen steigender Konzentration (0-0,1 % Digitonin (w/v)) und gleichen Mengen Proteinase K (PK) versetzt. Die Zugänglichkeit von PK zu Mgm1 in den verschiedenen Proben, wurde mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Zum Vergleich wurden die gleichen Membranen mit Antikörpern gegen das Matrixprotein MPP und das Innenmembranprotein Aac2 dekoriert. f, Fragment von Aac2, welches durch den Verdau durch PK entsteht.

Ebenfalls wurde die Membranintegration beider Isoformen der hier untersuchten Mgm1-Varianten wie zuvor mittels Carbonatextraktion getestet. Die lange bzw. kurze Form von Mgm1_{ITR2x}, Mgm1_{ITR3x} und Mgm1_{I27} sind wie Mgm1_{WT} wenig bzw. stark aus der mitochondrialen Membranfraktion

extrahierbar (Abbildung 39). Die langen Formen von Mgm1 $_{\Delta 115-150}$, Mgm1 $_{\Delta 115-131}$, Mgm1 $_{\Delta 132-150}$ und Mgm1 $_{\Delta 121-140}$ wurden jedoch in viel größerem Maße im Überstand gefunden als I-Mgm1 $_{WT}$. Im Vergleich mit der Extrahierbarkeit der kurzen Form von Mgm1 $_{WT}$, deutet dies eher auf eine oberflächliche Assoziation der langen Form mit der IM hin, als auf eine membrandurchspannende Integration. Da aber zwei dieser Varianten (Mgm1 $_{\Delta 115-131}$ und Mgm1 $_{\Delta 121-140}$) wie Mgm1 $_{WT}$ von Pcp1 prozessiert werden (Abbildung 37), ist die reduzierte Spaltung von Mgm1 $_{\Delta 115-150}$ und Mgm1 $_{\Delta 132-150}$ vermutlich nicht auf eine mangelnde Membraninsertion zurückzuführen, sondern deutet eher auf eine bevorzugte Extraktion dieser Varianten bei der verwendeten Methode hin.

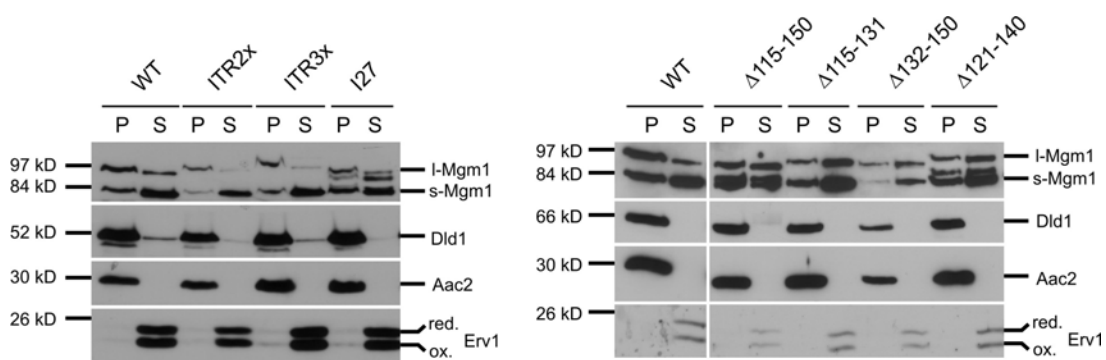


Abbildung 39: Membranassoziation der Mgm1-Varianten mit veränderter ITR. Isolierte Mitochondrien wurden mit 0,1 M Natriumcarbonat extrahiert. Durch Zentrifugation wurden die Membranfraktionen (P) von den löslichen Fraktionen (S) getrennt. Die Extrahierbarkeit der mitochondrialen Proteine wurde durch SDS-PAGE der Proben und Immundekoration ermittelt. Hierzu wurden Antikörper gegen Mgm1, Dld1, Aac2 und Erv1 verwendet. red., reduzierte Form von Erv1, ox., oxidierte Form von Erv1.

Die Rolle der Aminosäurereste 115-150 und 132-150 der ITR für die Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1 wurde durch die Varianten Mgm1 $_{\Delta TM\Delta 112-149}$ und Mgm1 $_{\Delta TM\Delta 132-150}$ weiterhin bestätigt (vgl. 3.1.4). Fehlt die TM von Mgm1 wird ausschließlich s-Mgm1 gebildet. Nach Expression von Mgm1 $_{\Delta TM\Delta 132-150}$, wird jedoch sowohl lange als auch kurze Form von Mgm1 detektiert (Abbildung 40). Im Fall von Mgm1 $_{\Delta TM\Delta 112-149}$ sogar ausschließlich lange Form. Das bedeutet, die Deletion der Reste 115-150

bzw. 132-150 verhindert völlig bzw. deutlich die sonst effiziente Prozessierung von Mgm1 Δ TM. Somit werden diese Bereiche für die Bildung von s-Mgm1 benötigt.

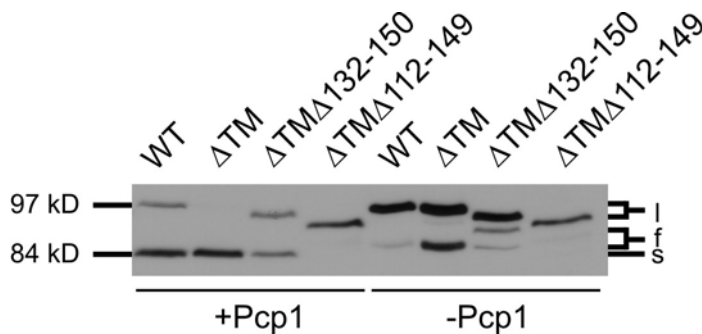


Abbildung 40: Bereiche der ITR von Mgm1 werden für dessen Spaltung durch Pcp1 benötigt. Gesamtzellextrakte von Δ mgm1- (+Pcp1) und Δ mgm1/ Δ pcp1-Stämmen (-Pcp1), welche die angegebenen Versionen von Mgm1 exprimieren, wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. WT, Wildtyp, l, l-Mgm1, s, s-Mgm1, f, unspezifisches Abbauprodukt von Mgm1.

Durch Digitoninfraktionierungen von Mitochondrien wurde die korrekte submitochondriale Lokalisierung von Mgm1 Δ TM Δ 112-149 und Mgm1 Δ TM Δ 132-150 im Intermembranraum von Mitochondrien bestätigt (Abbildung 41).

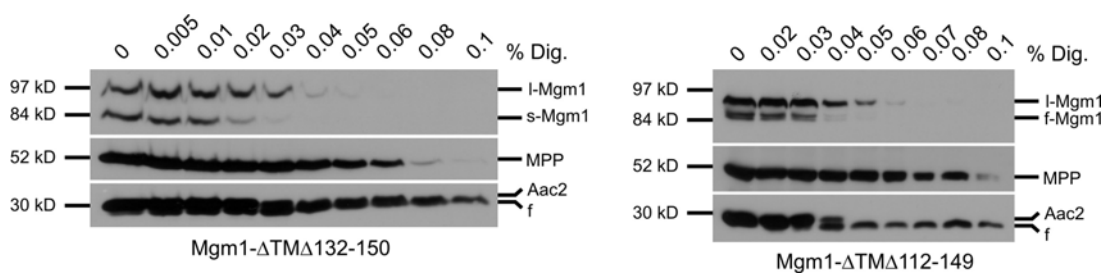


Abbildung 41: Mgm1 Δ TM Δ 132-150 und Mgm1 Δ TM Δ 112-149 sind im Intermembranraum lokalisiert. Isolierte Mitochondrien der entsprechenden Stämme wurden mit Digitoninlösungen steigender Konzentration (0-0,1 % Digitonin (w/v)) und gleichen Mengen Proteinase K (PK) versetzt. Die Zugänglichkeit von PK zu Mgm1 in den verschiedenen Proben, wurde mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Zum Vergleich wurden die gleichen Membranen mit Antikörpern gegen das Matrixprotein MPP und das Innenmembranprotein Aac2 dekoriert. f, Fragment von Aac2, welches durch den Verdau durch PK entsteht.

In Mitochondrien, welche $Mgm1_{\Delta TM\Delta 112-149}$ bzw. $Mgm1_{\Delta TM\Delta 132-150}$ enthalten, sind die langen bzw. kurzen Formen nicht fest in die mitochondriale IM integriert, wie Carbonatextraktionen zeigten (Abbildung 42). Sie befinden sich nach der Extraktion fast vollständig im Überstand, was zum Einen durch das Fehlen der TM erklärt werden kann. Diese ist für die feste Verankerung von I-Mgm1 in der IM verantwortlich. Zum Anderen liegen I-Mgm1 $_{\Delta 115-150}$ und I-Mgm1 $_{\Delta 132-150}$ wie s-Mgm1 $_{WT}$ nur mit der Membran assoziiert, nicht aber integriert vor. Dies führt möglicherweise, zusammen mit der fehlenden TM bei $Mgm1_{\Delta TM\Delta 132-150}$ und $Mgm1_{\Delta TM\Delta 112-149}$, zu der leichten Extrahierbarkeit der Isoformen aus der Membran. Auch I-Mgm1 $_{\Delta 115-131}$ und I-Mgm1 $_{\Delta 121-140}$ sind wie I-Mgm1 $_{\Delta 115-150}$ und I-Mgm1 $_{\Delta 132-150}$ nur mit der IM assoziiert aber nicht in diese integriert. Diese Varianten werden jedoch wie $Mgm1_{WT}$ von Pcp1 prozessiert (vgl. Abbildung 37 und Abbildung 39). Vermutlich führt somit die Deletion von Resten des ITR-Bereiches, zu einer Membraninsertion die weniger stabil ist und im Zuge des Extraktionsverfahrens aufgehoben wird. Dies scheint aber, wie schon gezeigt wurde, nicht der Grund für deren reduzierte Prozessierung zu sein.

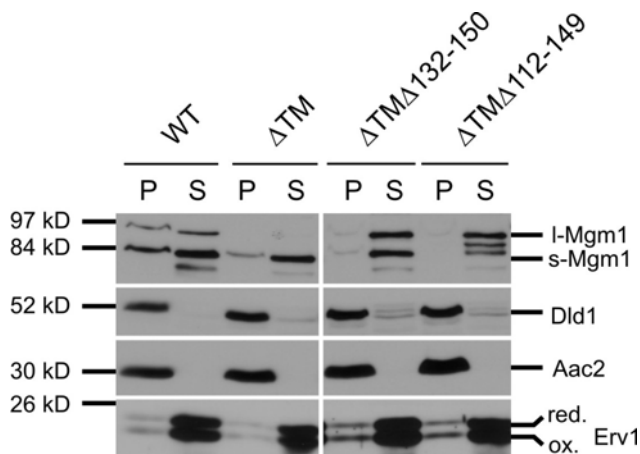


Abbildung 42: Membranassoziation von $Mgm1_{\Delta TM}$, $Mgm1_{\Delta TM\Delta 132-150}$ und $Mgm1_{\Delta TM\Delta 112-149}$. Isolierte Mitochondrien wurden mit 0,1 M Natriumcarbonat extrahiert. Durch Zentrifugation wurden die Membranfraktionen (P) von den löslichen Fraktionen (S) getrennt. Die Extrahierbarkeit der mitochondrialen Proteine wurde durch SDS-PAGE der Proben und Immundekoration ermittelt. Hierzu wurden Antikörper gegen Mgm1, Dld1, Aac2 und Erv1 verwendet. red., reduzierte Form von Erv1, ox., oxidierte Form von Erv1.

3.1.9 Stabilität der Isoformen von Mgm1_{ITR2x}, Mgm1_{Δ115-150} und Mgm1_{Δ132-150}

Die Stabilität einiger der Mgm1-Varianten mit veränderter ITR wurde untersucht, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben. Es wurden radioaktive Vorläufer Proteine von Mgm1_{1-228-ITR2x}-DHFR, Mgm1_{1-228-Δ115-150}-DHFR und Mgm1_{1-228-Δ132-150}-DHFR generiert und in isolierte Mitochondrien importiert. Die Mengen der nach verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation noch vorhandenen langen und kurzen Formen der Proteine wurden quantifiziert. Dabei zeigte sich ein zweimal schnellerer Abbau von l-Mgm1_{1-228-ITR2x}-DHFR verglichen mit l-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR (Abbildung 43, Tabelle 11). Dies erklärt die *in vivo* beobachteten, reduzierten Mengen von l-Mgm1_{ITR2x}. Somit führt der größere Abstand zwischen TM und RCR bei Mgm1_{ITR2x} nicht zu einer vermehrten Bildung der kurzen Form von Mgm1, sondern lediglich zu verstärktem Abbau der langen Form. Die Stabilität von l-Mgm1_{1-228-Δ115-150}-DHFR ist vergleichbar mit l-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR, l-Mgm1_{1-228-Δ132-150}-DHFR wird jedoch schneller abgebaut (Abbildung 43, Tabelle 11). Bei beiden Varianten konnten die Mengen der kurzen Formen nicht quantifiziert werden, da diese entweder gar nicht oder nur in sehr geringem Maße gebildet wurden. Damit ist das *in vivo* detektierte, veränderte Verhältnis von l- und s-Mgm1 bei Mgm1_{Δ115-150} bzw. Mgm1_{Δ132-150} (Abbildung 37), nicht durch deren veränderte Stabilität zu erklären. Dies gilt besonders für Mgm1_{Δ132-150}, da bei dieser Variante die lange Form weniger stabil ist als bei Mgm1_{WT} (Abbildung 43) aber im Vergleich zu s-Mgm1_{Δ132-150} trotzdem deutlich mehr lange Form vorliegt (Abbildung 37). Das Verhältnis von l- zu s-Mgm1 bei Mgm1_{Δ115-150} bzw. Mgm1_{Δ132-150} kann ebenfalls nicht durch den Abbau der kurzen Form erklärt werden, da in einer Importkinetik nach 3, 6, 12 und 24 min Import der entsprechenden Proteine jeweils gleiche Mengen der kurzen Form vorliegen und diese während der Importreaktion nicht abnehmen (nicht gezeigt). Folglich können Mgm1_{Δ115-150} und Mgm1_{Δ132-150} nicht effizient durch Pcp1 prozessiert werden, was zu reduzierter Bildung von s-Mgm1 führt.

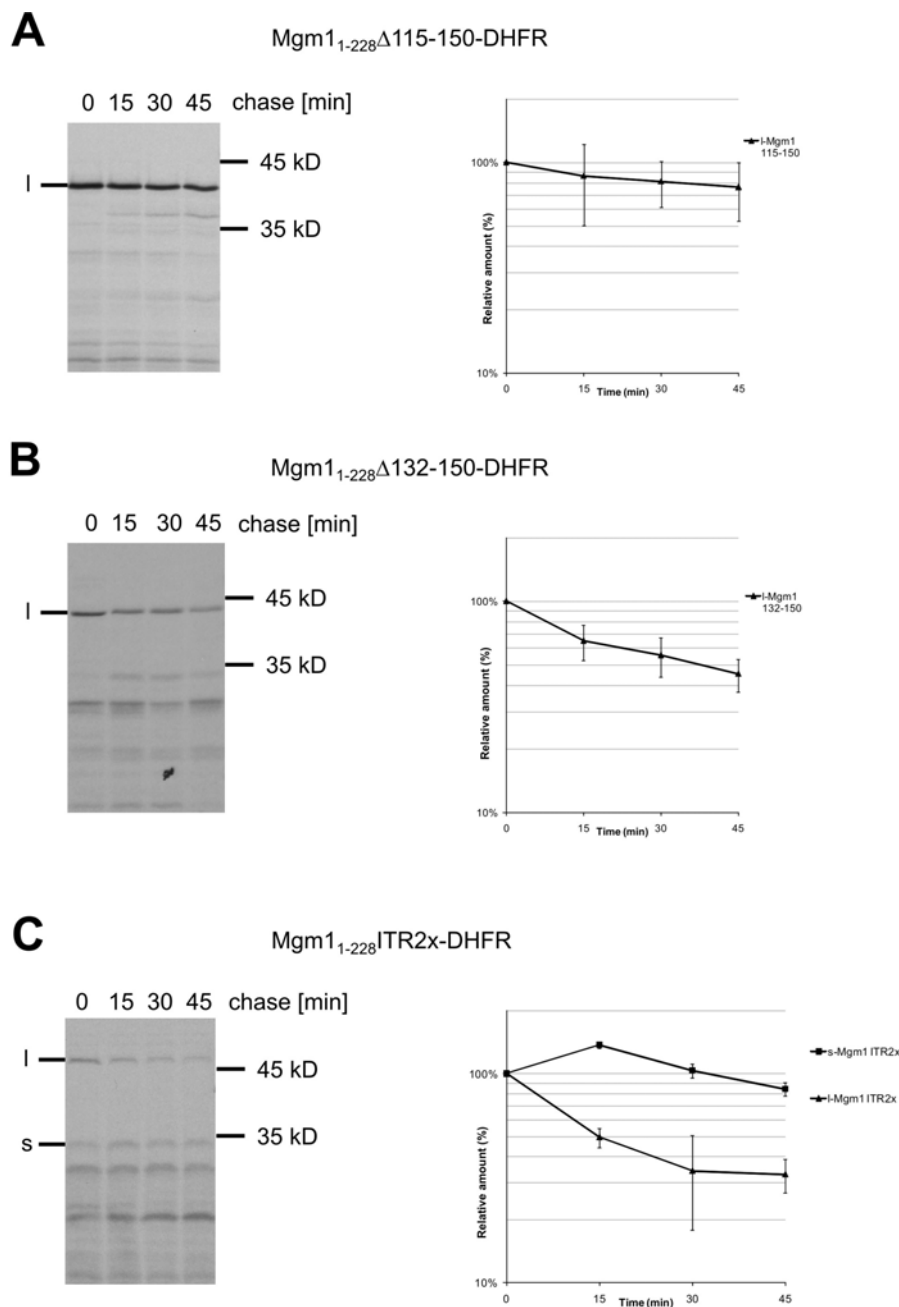


Abbildung 43: Stabilität der Isoformen von Mgm1_{Δ115-150}, Mgm1_{Δ132-150} und Mgm1_{ITR2x}. Radioaktiv markierte Vorläuferproteine von Mgm1₁₋₂₂₈-Δ115-150-DHFR, Mgm1₁₋₂₂₈-Δ132-150-DHFR und Mgm1₁₋₂₂₈-ITR2x-DHFR wurden für 24 min in isolierte Mitochondrien importiert. Die Importreaktion wurde abgestoppt und die Mitochondrien reisoliert. Nach anschließender Inkubation für 0, 15, 30 bzw. 45 min, wurde die Rate des Abbaus der gebildeten Isoformen mittels SDS-PAGE, Autoradiographie und densitometrischer Messung der Banden bestimmt. Die Standardabweichungen wurden aus den Werten von drei Experimenten berechnet und der Abbau der detektierten Proteine logarithmisch dargestellt. I, I-Mgm1, s, s-Mgm1.

Zeit [min]	0	15	30	45
I-WT	100	83± 32	55± 18	54± 21
s-WT	100	147± 21	112± 12	106± 15
I-Δ115-150	100	86± 10	81± 8	76± 12
I-Δ132-150	100	65± 13	55± 12	45± 8
I-ITR2x	100	50± 5	34± 8	33± 6
s-ITR2x	100	137± 5	104± 16	85± 6

Tabelle 11: Quantitative Analyse der Stabilität der entsprechenden Isoformen von Mgm1. Die relativen Mengen von I- und s-Mgm1 bezogen auf den Zeitpunkt 0 wurden durch densitometrische Auswertung der Autoradiographien bestimmt. Standardabweichungen von je drei Experimenten sind angegeben.

Welche Bedeutung hat die ITR für die Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1? Die Verlängerung oder das Ersetzen der ITR hat keinen Einfluss auf die Bildung von s-Mgm1. Die Deletion der ITR allerdings verhindert die Spaltung des Proteins (Abbildung 37). Möglicherweise wird durch diesen Bereich ein bestimmter Mindestabstand zwischen TM und RCR erreicht, der für die Bildung von I- und s-Mgm1 in gleichen Mengen benötigt wird. Dies könnte durch eine Kompetition der beiden hydrophoben Bereiche beim Import von Mgm1 erklärt werden. Wenn TM und RCR zu nahe beieinander liegen, ist die Wahrscheinlichkeit der Insertion von TM in die IM größer, da dieser Bereich länger und hydrophober ist als die RCR. Diese Erklärung kann für Mgm1_{Δ132-150} nicht angewendet werden, da im Fall von Mgm1_{Δ132-150} 19 Aminosäurereste deletiert wurden bei Mgm1_{Δ121-140}, welches normal prozessiert wird, allerdings 21 Reste fehlen (vgl. Abbildung 37). Möglicherweise erleichtert der Bereich der Aminosäurereste 132-150 der ITR die Prozessierung von Mgm1, indem eine bestimmte Konformation eingenommen wird, welche die Interaktion des Substrats mit der Protease ermöglicht oder zumindest vereinfacht. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Faktoren am Prozess der Erkennung und Spaltung von Mgm1 durch Pcp1 beteiligt sind und die hier identifizierten Bereiche für eine Interaktion mit anderen Proteinen wichtig sind.

3.1.10 Substraterkennung der humanen Rhomboidprotease PARL

Die mitochondriale Rhomboidprotease PARL ist das humane Ortholog von Pcp1. PARL kann Mgm1 zu s-Mgm1 prozessieren, wenn es in einem $\Delta pcp1$ Hefestamm exprimiert wird (Duvezin-Caubet *et al.*, 2007). Daher sollte anhand der hier gezeigten Varianten von Mgm1 untersucht werden, ob PARL die gleichen Merkmale der Substraterkennung zeigt wie Pcp1. Dazu wurde PARL unter der Kontrolle des GAL4-Promotors in einem $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ Stamm zusammen mit je einer der zuvor untersuchten Mgm1-Varianten exprimiert. Die unterschiedlichen Stämme wurden entweder auf Selektivmedium mit 2 % Glucose oder 2 % Glucose und 2 % Galactose kultiviert. In Abwesenheit von Galactose war die Expression von PARL reprimiert, durch Zugabe von Galactose wurde PARL überexprimiert. Die Expression von PARL wurde durch Detektion von Ccp1 überprüft, welches ebenfalls sowohl von Pcp1 als auch von PARL zur reifen Form von Ccp1 (m-Ccp1) prozessiert wird.

Alle Varianten mit Veränderter RCR werden wie Mgm1_{WT} von PARL prozessiert (Abbildung 44). Die Deletion des D/E-Bereiches führt zu keiner Spaltung durch PARL, wobei Mgm1 Δ DDDE prozessiert wird. Auch die Veränderung des D/E-Bereiches durch Austausch mit unterschiedlich geladenen Aminosäureresten zeigt vergleichbare Ergebnisse wie für Pcp1: je mehr negativ geladene Reste ausgetauscht werden, desto weniger s-Mgm1 wird gebildet. Damit werden die dreizehn negativ geladenen Aminosäurereste C-terminal der RCR ebenfalls für die effektive Spaltung von Mgm1 durch PARL benötigt. Mutationen in der ITR von Mgm1 haben auch ähnliche Effekte auf die Prozessierung durch PARL. Mgm1 Δ 115-150 wird nicht prozessiert, in allen anderen Fällen kann s-Mgm1 detektiert werden (Abbildung 44). Die Spaltung von Mgm1 Δ 132-150 scheint ebenfalls reduziert, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass leichte Schwankungen bei der Expression von PARL für diese Beobachtung verantwortlich sind. Ccp1 ist in diesem Fall, vermutlich aufgrund der Anzucht der Zellen in flüssigem Kulturmedium, fast ausschließlich als m-Ccp1 zu sehen. Da die intermediäre Form des Proteins kaum detektiert wurde, können keine genauen Aussagen zur Überexpression von PARL gemacht werden. Zusammenfassend kann

aus diesen Experimenten geschlossen werden, dass die Substraterkennung durch die mitochondrialen Rhomboidproteasen zwischen Mensch und Hefe konserviert ist.

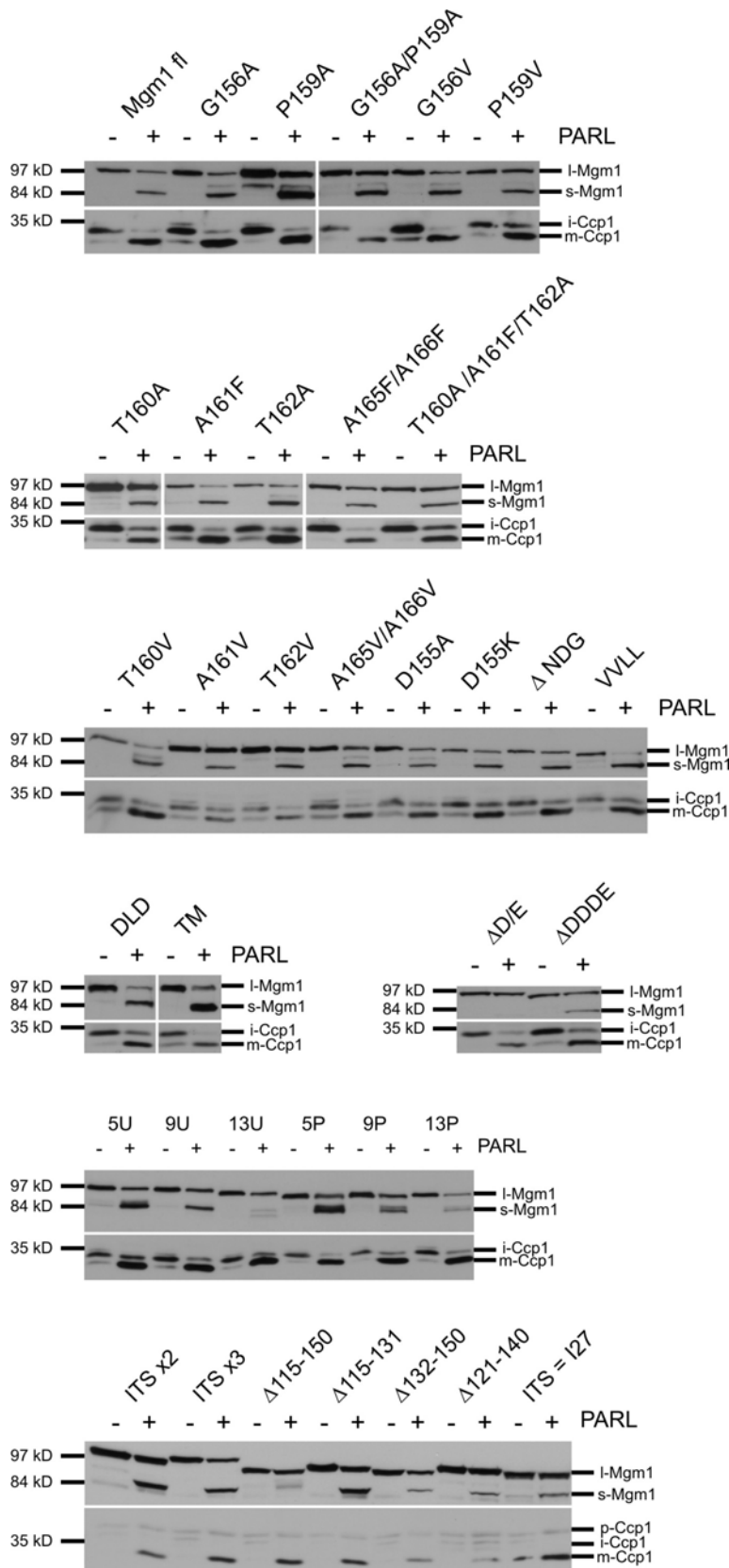


Abbildung 44: Die humane Rhomboid-Protease PARL hat die gleiche Substratspezifität wie Pcp1. Alle zuvor untersuchten Varianten von Mgm1 wurden in einem $\Delta mgm1/\Delta pcp1$ -Stamm exprimiert. Dieser enthielt ein Plasmid, welches die Expression von PARL in Abhängigkeit von Galactose ermöglicht. Die Zellen wurden jeweils auf Medium mit (+PARL) oder ohne Galactose (-PARL) kultiviert. Die Bildung von l- und s-Mgm1 in Abhängigkeit von PARL wurde mittels Gesamtzellextrakten, SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 untersucht. Die Bildung der reifen Form von Ccp1 wurde durch die Immundekoration der gleichen Membranen mit Antikörpern gegen Ccp1 analysiert, um die Expression von PARL zu kontrollieren. p-Ccp1, Vorläuferprotein von Ccp1, i-Ccp1, intermediäre Form von Ccp1, m-Ccp1, reife Form von Ccp1.

3.1.11 Einfluss der untersuchten Mgm1-Varianten auf die mitochondriale Morphologie

Das Vorhandensein beider Isoformen von Mgm1 ist wesentlich für den Erhalt der tubulären Struktur von Mitochondrien. Bei einigen der untersuchten Varianten von Mgm1, weicht das Verhältnis von l- und s-Mgm1 deutlich von den in WT-Stämmen beobachteten etwa gleichen Mengen der beiden Isoformen ab. Daher sollte die Funktionalität verschiedener Varianten anhand der Morphologie der Mitochondrien in den entsprechenden Hefestämmen überprüft werden. Es wurden $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ Stämme verwendet, welche Mgm1_{Did}, Mgm1_{TM}, Mgm1_{DDDE}, Mgm1_{ΔD/E}, Mgm1_{ITS2x}, Mgm1_{ITS3x}, Mgm1_{Δ115-150}, Mgm1_{Δ115-131}, Mgm1_{Δ132-150}, Mgm1_{Δ121-140} oder Mgm1_{I27} exprimieren. Diese wurden zusätzlich mit einem Konstrukt (pVT100U-mtGFP, vgl. 2.1.17.2) transformiert, das die Expression von GFP (grün fluoreszierendes Protein) und dessen Lokalisierung in Mitochondrien ermöglicht. Außerdem wurden zur Kontrolle Stämme verwendet, die Mgm1_{WT}, Mgm1_{ΔRCR} oder das entsprechende leere Plasmid enthielten ($\Delta mgm1$). Die Morphologie der Mitochondrien wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es wurden mindestens 100 Zellen jedes Stammes gezählt und den Kategorien tubulär oder fragmentiert zugeordnet. Eine Zelle wurde als tubulär gewertet, wenn mindestens ein Tubulus zu sehen war, welcher dreimal so lang war wie breit.

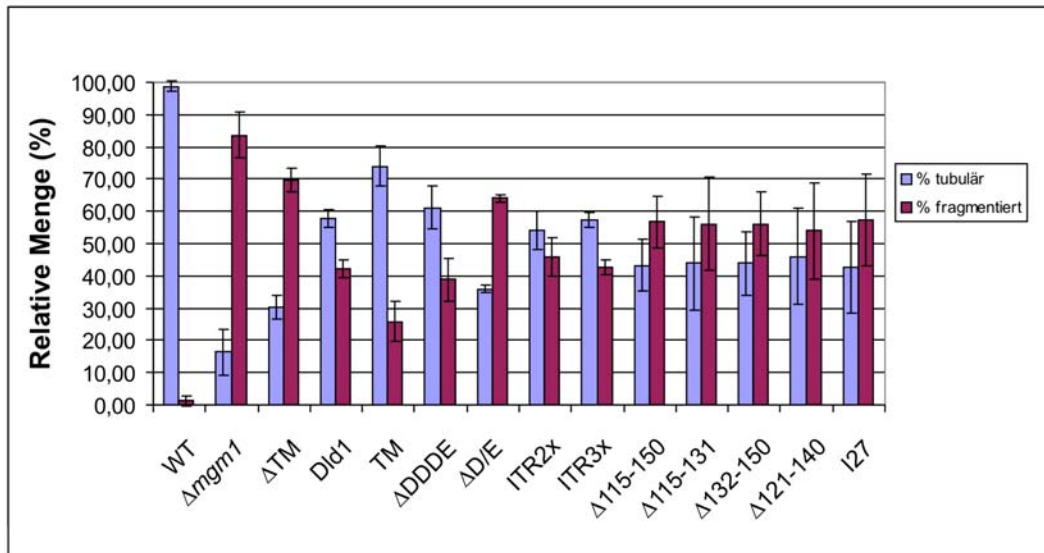


Abbildung 45: Untersuchung der Rolle der verschiedenen Varianten von Mgm1 auf die mitochondriale Morphologie. $\Delta mgm1$ -Stämme, welche die hier gezeigten Varianten von Mgm1 und in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes GFP exprimieren, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die Morphologie ihrer Mitochondrien untersucht. Mindestens einhundert Zellen wurden je Stamm gezählt und die Menge an Zellen mit tubulären bzw. fragmentierten Mitochondrien bestimmt. Jeder Stamm wurde mindestens dreimal gezählt. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen.

Wie bereits gezeigt wurde (Herlan *et al.*, 2003), kann die Expression von Mgm1_{WT} den Morphologie-Phänotyp der Mitochondrien eines $\Delta mgm1$ -Stammes vollständig komplementieren (Abbildung 45). Das heißt, die im $\Delta mgm1$ -Stamm fragmentiert vorliegenden Organellen bilden durch die ektopische Expression von Mgm1_{WT} wieder ein tubuläres Netzwerk, ähnlich den Zellen eines WT-Stammes. Dementsprechend liegen in einem $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ Stamm, der nur das leere Plasmid pRS315 enthält, hauptsächlich fragmentierte Mitochondrien vor (Abbildung 45). Mgm1_{ΔRCR} kann den $\Delta mgm1$ -Phänotyp ebenfalls nicht komplementieren, da hier nur die lange Form von Mgm1 gebildet wird. Diese reicht allein nicht aus, um die tubuläre Morphologie wieder herzustellen. Mgm1_{Did} und Mgm1_{TM} zeigen mehr als 50 % bzw. mehr als 70 % tubuläre Mitochondrien. Verglichen mit den Kontrollen deutet das auf eine Komplementation des $\Delta mgm1$ -Phänotyps durch die untersuchten Varianten hin. Damit hat die Sequenz der RCR von Mgm1 keine Bedeutung für die Funktion des Proteins bei der Fusion von Mitochondrien. Mgm1_{ΔDDDE} komplementiert in vergleichbarem Maße, die

Expression von Mgm1 $_{\Delta D/E}$ führt jedoch zu deutlich mehr Zellen mit fragmentierten Mitochondrien (über 60 %). Möglicherweise komplementiert diese Variante nicht, da das Verhältnis von l- zu s-Mgm1 deutlich von dem bei Mgm1 $_{WT}$ abweicht.

In $\Delta mgm1$ -Stämmen die Mgm1 $_{ITR2x}$ bzw. Mgm1 $_{ITR3x}$ exprimieren, wurden dagegen ebenfalls mehr als 50 % Zellen mit tubulären Mitochondrien beobachtet, was auf eine Komplementation dieser Varianten schließen lässt. Mgm1 $_{\Delta 115-150}$, Mgm1 $_{\Delta 115-131}$, Mgm1 $_{\Delta 132-150}$, Mgm1 $_{\Delta 121-140}$ und Mgm1 $_{I27}$ zeigen unabhängig von den jeweiligen Mengen an s-Mgm1 keine Komplementation. Dies betrifft nur solche Mgm1-Varianten, bei denen Teile der ITR deletiert oder ausgetauscht wurden. Die Verlängerung der ITR scheint keinen Einfluss auf die Funktion von Mgm1 zu haben.

Diese Ergebnisse werden durch eine zweite Studie unterstützt (persönliche Mitteilung Michael Zick und Dr. Stéphane Duvezin-Caubet). Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse beider vorliegender Studien klar die Bedeutung des ITR-Bereiches für die Funktion von Mgm1 bei der Fusion von Mitochondrien.

4 Diskussion

4.1 Substratspezifität mitochondrialer Rhomboidproteasen

Rhomboidproteasen sind eine hochkonservierte Familie der Intramembranproteasen. Sie sind an unterschiedlichsten Prozessen wie Signaltransduktion, Prüfung der Zelldichte, Invasion von Wirtszellen und Regulation der mitochondrialen Morphologie beteiligt (Gallio *et al.*, 2002; Herlan *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003a; Brossier *et al.*, 2005). Wodurch ihre Substratspezifität zustande kommt, ist jedoch nur für einige Beispiele wie Rhomboid-1 aus *D. melanogaster* bekannt (Urban and Freeman, 2003) und wurde für die Unterfamilie der PARL-ähnlichen mitochondrialen Rhomboidproteasen bisher nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde die Substratspezifität der mitochondrialen Rhomboidproteasen aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens*, Pcp1 und PARL, analysiert.

4.1.1 Die Bedeutung des gespaltenen hydrophoben Segments für die Prozessierung des Substrats

In den ersten Studien zur Substraterkennung durch Rhomboidproteasen in *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass Rhomboid-1 sein endogenes Substrat, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Spitz, über Bereiche in dessen Transmembrandomäne erkennt. Das identifizierte Substratmotiv besteht aus zwei Teilen. Der erste, etwas hydrophilere Teil könnte den Eintritt von Wasser zur Spaltstelle begünstigen. Der zweite Teil enthält Helix-destabilisierende Aminosäurereste (GA oder GG), welche durch Rhomboid-1 erkannt werden. Dieses Substratmotiv war sowohl notwendig als auch ausreichend für die Spaltung von Spitz durch Rhomboid-1 (Urban and Freeman, 2003). Weiterhin konnten zahlreiche Rhomboidproteasen aus Bakterien, Invertebraten und Vertebraten Spitz in einem heterologen System spalten, was ebenfalls von dem zuvor beschriebenen Substratmotiv innerhalb der Transmembrandomäne von Spitz abhing (Urban and Wolfe,

2005). Jedoch wurde der EGF Ligand Gurken aus *D. melanogaster*, der kein Spitz-ähnliches Substratmotiv enthält, trotzdem von Rhomboid-1 prozessiert (Urban *et al.*, 2002). Damit ist Rhomboid-1 prinzipiell in der Lage, Proteine unabhängig von diesem Signal zu spalten, was weitere Mechanismen der Substraterkennung nahe legt.

Die Untersuchung der Prozessierung von Spitz durch Rhomboidproteasen protozoischer Parasiten wie *T. gondii*, *P. falciparum* und *E. histolytica* ergab, dass einige der getesteten Proteasen Spitz spalten konnten (Baxt *et al.*, 2008). Dies geschah ebenfalls in Abhängigkeit des zuvor beschriebenen Substratmotivs. Rhomboidproteasen, welche Spitz nicht prozessierten, konnten dagegen unterschiedliche Adhäsine aus *P. falciparum* spalten. Auch hier war die Prozessierung abhängig von der Transmembrandomäne des Substrats bzw. darin enthaltener Helix-destabilisierender Aminosäurereste (Baxt *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu diesen Studien konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Helix-destabilisierende Aminosäurereste für die Prozessierung von Mgm1 durch die mitochondrialen Rhomboidproteasen Pcp1 bzw. PARL nicht benötigt werden. Wurden die Reste G156 bzw. P159 innerhalb der RCR von Mgm1 zu Alanin bzw. Valin Resten mutiert, konnten die entstandenen Varianten weiterhin gespalten werden. Ebenso wurde eine Beteiligung der Aminosäuresequenz der RCR, abgesehen von der notwendigen Hydrophobizität dieser Region, an der Substraterkennung ausgeschlossen. Nach dem Austausch der RCR durch die Transmembrandomäne von Mgm1 bzw. die Transmembrandomäne von Dld1 wurden die entsprechenden Varianten spezifisch und effizient sowohl von Pcp1 als auch von PARL zu s-Mgm1 prozessiert. Dies war unerwartet, da man bisher annahm, die TM von Mgm1 wäre kein Substrat für Pcp1 (Urban, 2006) und da endogenes Dld1 nicht durch Pcp1 gespalten wird.

Ein weiteres Beispiel ist das Protein Thrombomodulin, welches durch die humane Rhomboidprotease RHBDL-2 gespalten werden kann. Hierfür ist das Vorhandensein einer Transmembrandomäne in Thrombomodulin notwendig, deren Sequenz ist jedoch ohne Einfluss. Dagegen ist der cytoplasmatische Teil von Thrombomodulin notwendig und ausreichend als Determinante für die Prozessierung (Lohi *et al.*, 2004). Bestimmte Motive zur

Substraterkennung wurden in diesem cytoplasmatischen Teil des Substrats nicht identifiziert.

Zusammen mit den hier gewonnenen Ergebnissen zur Prozessierung von Mgm1 zeigt dies, dass weitere Mechanismen zur Substraterkennung durch Rhomboidproteasen existieren. Diese sind unabhängig von der Transmembrandomäne des Substrates und beruhen auf Regionen, die außerhalb dieses Bereiches liegen. Zwar scheint die Notwendigkeit eines Spitz ähnlichen Substratmotivs ein weit verbreiteter Mechanismus der Substraterkennung durch Rhomboidproteasen zu sein. Jedoch wurden in den vorliegenden Studien nur Spitz selbst bzw. solche Proteine untersucht, die aufgrund eines vorhandenen Spitz ähnlichen Substratmotivs als mögliche Substrate von Rhomboidproteasen identifiziert wurden. Möglicherweise ist damit die Substraterkennung durch andere Determinanten als die gespaltene Transmembrandomäne selbst ein viel weiter verbreitetes Prinzip als bisher angenommen.

4.1.2 Determinanten der Prozessierung von Mgm1 durch mitochondriale Rhomboidproteasen

Innerhalb der RCR von Mgm1 konnten keine Aminosäuresequenzen oder Motive für die Substraterkennung durch Pcp1 oder PARL identifiziert werden (siehe oben). Weitere Elemente mussten jedoch zwischen den Aminosäureresten 81 und 228 liegen. Die ersten 80 Reste bilden die mitochondriale Signalsequenz von Mgm1, welche in der Matrix von MPP abgespalten wird. Ein Fusionsprotein aus den ersten 228 Aminosäureresten von Mgm1 und DHFR (Dihydrofolatreduktase) wird durch Pcp1 prozessiert (Herlan *et al.*, 2004). Daher müssen Elemente der Substraterkennung von Mgm1 in diesem Bereich zu finden sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Bedeutung des D/E-Bereichs von Mgm1 für die Prozessierung durch mitochondriale Rhomboidproteasen. Die Deletion der 13 negativ geladenen Aminosäurereste führte zur stark reduzierten Bildung von s-Mgm1. Auch der schrittweise Austausch des D/E-Bereichs durch positiv geladene oder ungeladene Reste führte zu einer Beeinträchtigung der Prozessierung von Mgm1 sowohl durch Pcp1 als auch

durch PARL. Dabei war der Effekt umso stärker, je weniger negativ geladene Reste vorhanden waren. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre eine direkte Interaktion von Mgm1 mit Pcp1. Dieses besitzt in seinem C-terminalen, im Intermembranraum lokalisierten Teil sechs positiv geladene Reste, welche für eine direkte Interaktion mit dem D/E-Bereich von Mgm1 in Frage kämen. Eine Deletion der C-terminalen 18 Aminosäurereste von Pcp1 führte tatsächlich zu einer reduzierten Spaltung von Mgm1. Jedoch wurde auch Ccp1, welches nicht über einen Bereich von negativ geladenen Resten erkannt wird (siehe unten), weniger effizient von dieser Pcp1-Variante prozessiert. Weitere Analysen, wie der gezielte Austausch positiv geladener Aminosäurereste in Pcp1, sind notwendig, um diese Frage zu klären.

Inwieweit sich die Bedeutung negativ geladener Aminosäurereste in Mgm1 für die Spaltung durch Rhomboidproteasen auch auf andere Substrate übertragen lässt, ist ungewiss. Die Deletion der vier Reste EDDE C-terminal des von Pcp1 gespaltenen hydrophoben Segments führte zu keiner Beeinträchtigung der Spaltung von Ccp1. Jedoch sind weitere negativ geladene Aminosäurereste in diesem Bereich vorhanden, welche zusammen wirken könnten, um die Prozessierung von Ccp1 durch Pcp1 zu ermöglichen. Denkbar wäre auch, dass Ccp1, verglichen mit Mgm1, durch einen völlig verschiedenen Mechanismus von Pcp1 als Substrat erkannt wird.

Der D/E-Bereich von Mgm1 scheint nicht die einzige Determinante für dessen Prozessierung darstellen, da auch in Mgm1 $_{\Delta D/E}$ noch geringe Mengen an s-Mgm1 gebildet werden. Die Untersuchung der ITR von Mgm1 ergab, dass auch dieser Bereich wichtig für die Spaltung von Mgm1 durch die mitochondrialen Rhomboidproteasen Pcp1 und PARL ist. Eine Variante von Mgm1, deren ITR deletiert war, wurde nicht mehr zu s-Mgm1 prozessiert. Eine Variante, deren ITR durch ein gleich großes Segment aus dem humanen Muskelprotein Titin ausgetauscht wurde, konnte jedoch gespalten werden. Da zwei Varianten mit verlängerter ITR nach wie vor prozessiert wurden, scheint ein bestimmter Mindestabstand zwischen TM und RCR benötigt zu werden. Dies legt eine Rolle der ITR bei der Positionierung der RCR in der IM relativ zur TM nahe. Es wäre möglich, dass ohne genügenden Abstand der beiden hydrophoben Segmente die Insertion der TM in die IM vor der Insertion der RCR bevorzugt wird, da die TM länger

und hydrophober ist. In diesem Fall würde die RCR weder die IM noch das aktive Zentrum der Rhomboidprotease erreichen.

Die Positionierung des Substrats ist auch im Fall von Ccp1 ein wichtiger Faktor für dessen Prozessierung durch Pcp1. Zunächst spaltet die m-AAA Protease der IM ein N-terminales Peptid von Ccp1 ab. Daraufhin wird Ccp1 innerhalb eines hydrophoben Segments im N-terminalen Bereich des Proteins durch Pcp1 gespalten (Esser *et al.*, 2002). Man nahm an, die Prozessierung durch die m-AAA Protease wäre dabei eine Voraussetzung für die Spaltung von Ccp1 durch Pcp1. In einer neueren Studie wurde der m-AAA Protease jedoch eine andere Bedeutung zugeordnet. Eine nicht proteolytisch aktive Form der m-AAA Protease reichte aus, um die Spaltung von Ccp1 durch Pcp1 zu ermöglichen. Die m-AAA Protease hat die weitere Funktion, ein hydrophobes Segment von Ccp1 so aus der inneren Membran zu dislozieren, dass das von Pcp1 gespartene hydrophobe Segment die IM erreichen und die Prozessierung durch die Rhomboidprotease stattfinden kann (Tatsuta *et al.*, 2007). Möglicherweise wird somit die Spaltung beider Substrate von Pcp1 durch deren korrekte Positionierung in der Membran gewährleistet, wenn auch über unterschiedliche Mechanismen.

Eine weitere Determinante, welche die Prozessierung von Mgm1 beeinflusst, sind die Aminosäurereste 132-150 der ITR. Deren Deletion führt zu verminderter Bildung von s-Mgm1. Dieses Ergebnis kann jedoch nicht auf den reduzierten Abstand zwischen TM und RCR in dieser Variante von Mgm1 zurückgeführt werden. Da die Deletion des D/E-Bereichs und der Reste 132-150 jeweils nicht zu einem vollständigen Verlust der Prozessierung führt, wirken diese Bereiche womöglich zusammen, um die effiziente Spaltung von Mgm1 zu gewährleisten. Dies könnte durch die direkte Interaktion beider Bereiche mit der Protease erfolgen. Sie könnten jedoch ebenfalls an der Positionierung des Substrats in der IM beteiligt sein oder dessen Konformation beeinflussen, so dass die Spaltung möglich wird. Auch die Interaktion dieser Bereiche mit einem bisher unbekanntem Faktor, welcher die Bindung des Substrats an die Protease vermittelt, wäre denkbar. Hierfür kämen zum Beispiel Komponenten der TIM23-Translokase oder auch Ugo1, ein Interaktionspartner von Mgm1 in der äußeren mitochondrialen Membran (Wong *et al.*, 2003; Sesaki and Jensen, 2004), in Frage.

Eine weitere Möglichkeit, wie die ITR bzw. der D/E-Bereich von Mgm1 die Prozessierung durch die Rhomboidproteasen beeinflussen könnten, besteht durch einen Einfluss auf die alternative Topogenese von Mgm1 (vgl. 1.3.1). Beim Import von Mgm1 in Mitochondrien erreicht zunächst die TM die IM, wobei deren Hydrophobizität die Häufigkeit ihrer Insertion in die Membran und damit auch die Menge an gebildetem s-Mgm1 bestimmt. Sollte die Deletion der ITR oder des D/E-Bereichs die Insertion der TM begünstigen, würde demnach weniger s-Mgm1 gebildet, wie bei einigen der untersuchten Varianten beobachtet. Dies sollte durch die Mgm1-Varianten ohne TM untersucht werden. Tatsächlich zeigen sie nicht wie Mgm1 Δ TM ausschließlich kurze Form von Mgm1, sondern auch oder sogar ausschließlich die entsprechende lange Isoform von Mgm1. Das heißt, obwohl in diesen Varianten durch die Deletion der TM von Mgm1 die vermehrte Insertion bei TM ausgeschlossen werden kann, beeinflussen die ITR bzw. der D/E-Bereich die Prozessierung von Mgm1. Experimente zur Membranintegration der Varianten mit deletierter TM zeigten jedoch, dass die langen Formen der Proteine weniger stark mit der Membran verbunden waren als I-Mgm1_{WT}. Dies könnte an der Hydrophobizität der RCR liegen, welche geringer ist als die Hydrophobizität der TM von Mgm1 und sich daher bei dieser Art Experiment leichter aus der Membran löst. Jedoch könnten die langen Formen dieser Varianten auch entstehen, weil die Proteine noch bevor die RCR die IM erreichen kann, wieder aus der TIM23-Translokase heraus rutschen. Dann würden sie der IM aufliegen, nicht aber in sie inseriert werden. Diese Erklärung scheint zumindest für Mgm1 Δ TM Δ D/E unwahrscheinlich, da die Deletion des D/E-Bereichs weiter C-terminal liegt als die RCR selbst. Außerdem wird I-Mgm1, welches bei der Expression von Mgm1 Δ TM in einem Δ mgm1/ Δ pcp1 Stamm entsteht, ebenso leicht durch die Behandlung mit Natriumcarbonat aus der Membran extrahiert wie s-Mgm1. Dieses Protein kann nur über die RCR in die IM integriert sein und es trägt keine weiteren Mutationen, welche die Membranintegration beeinflussen könnten. Dies legt nahe, dass die vermehrte Extraktion der verschiedenen Mgm1-Varianten mit deletierter TM tatsächlich auf die geringe Hydrophobizität der RCR zurückzuführen ist. Trotzdem kann ein Einfluss der Deletionen von ITR bzw. D/E-Bereich auf die alternative Topogenese von

Mgm1 nicht endgültig ausgeschlossen werden. Weitere Experimente werden notwendig sein, um dies zu klären.

Es bleibt ebenfalls zu untersuchen, ob die identifizierten Bereiche nicht nur notwendig sondern auch ausreichend sind, um die Prozessierung von Mgm1 zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurden bereits Versuche unternommen, ein so genanntes Minimalsubstrat zu konstruieren, welches nur die ITR und den D/E-Bereich von Mgm1 enthalten sollte. Diese wurden zum einen zwischen die mitochondriale Signalsequenz der Untereinheit 9 der ATPase aus *N. crassa* und die codierende Sequenz für GFP kloniert, wobei die RCR von Mgm1 selbst als zu spaltendes Segment dienen sollte. Zum anderen wurden ITR und D/E-Bereich vor bzw. hinter der Transmembrandomäne von Dld1 eingebaut. In beiden Fällen konnten nach der Expression der Minimalsubstrate keine spezifischen Proteinbanden detektiert werden, welche den gespaltenen oder nicht gespaltenen Konstrukten entsprachen. Möglicherweise unterliegen die Proteine einer unspezifischen Degradation in Hefezellen.

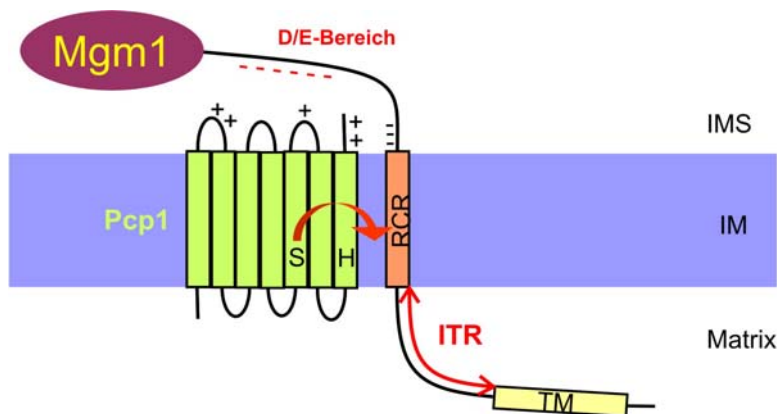


Abbildung 46: Determinanten der spezifischen Spaltung von Mgm1.

Die ITR von Mgm1 gewährleistet einen gewissen Abstand zwischen TM und RCR von Mgm1, welcher für die effiziente Prozessierung benötigt wird. Der D/E-Bereich mit seinen negativ geladenen Resten, könnte über die positiven Ladungen in Pcp1 mit der Protease interagieren. IMS, Intermembranraum; IM, innere mitochondriale Membran; MPP, mitochondriale prozessierende Peptidase.

4.1.3 Substraterkennung durch die humane Rhomboidprotease PARL

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, benötigen die beiden mitochondrialen Rhomboidproteasen Pcp1 aus *S. cerevisiae* und PARL aus *H. sapiens* gleiche Determinanten für die Prozessierung der Substrate. Dies steht im Einklang mit der Fähigkeit von PARL, die Deletion von Pcp1 in Hefe funktionell zu komplementieren (McQuibban *et al.*, 2003; Duvezin-Caubet *et al.*, 2007). Interessanterweise wird das humane Ortholog von Mgm1, OPA1, in Hefe weder von Pcp1 noch von PARL gespalten. Auch in PARL^{-/-}-Zellen aus Mäusen wird OPA1 weiterhin zu seinen kurzen Formen prozessiert. Die m-AAA Protease aus Hefe ist jedoch in der Lage OPA1 zu spalten (Duvezin-Caubet *et al.*, 2007). Das zweite Substrat von Pcp1, Ccp1, benötigt beide, die m-AAA Protease und Pcp1, für seine vollständige Prozessierung (Esser *et al.*, 2002; Tatsuta *et al.*, 2007). Möglicherweise wurde während eines früheren Zeitpunkts der Evolution sowohl die m-AAA Protease als auch die mitochondriale Rhomboidprotease für die Spaltung des Vorfahren von Mgm1 benötigt. Die Notwendigkeit der m-AAA Protease für die Prozessierung von Mgm1 mag mit der Zeit verloren gegangen sein, so wie OPA1 zum heutigen Zeitpunkt nicht mehr durch die mitochondriale Rhomboidprotease gespalten wird. Ccp1 hingegen benötigt immer noch beide Proteine, um vollständig prozessiert werden zu können. Tatsächlich enthält OPA1 auch keinen D/E-Bereich mit negativ geladenen Aminosäureresten, welcher als Determinante für seine Spaltung dienen könnte.

Die Gemeinsamkeiten bei der Substraterkennung zwischen Pcp1 und PARL und die Unterschiede zu anderen Rhomboidproteasen stehen ebenfalls im Einklang mit phylogenetischen Analysen. Diese ordnen die mitochondrialen Rhomboidproteasen einer eigenen Klasse der so genannten PARL-ähnlichen mitochondrialen Rhomboidproteasen zu. Möglicherweise können somit die hier gewonnenen Erkenntnisse zur Identifikation eines endogenen Substrats von PARL beitragen.

4.2 Die Funktion verschiedener Bereiche von Mgm1

Einige der in dieser Arbeit beschriebenen Varianten von Mgm1 wurden auf ihre Fähigkeit, die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks eines $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ Stammes wieder herzustellen, untersucht. Wie die Expression von Mgm1_{TM} und Mgm1_{Did1} zeigte, wird die RCR von Mgm1 für die Komplementation des Morphologie-Phänotyps nicht benötigt. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht, dass die RCR ebenfalls keine Rolle bei der Substraterkennung von Mgm1 durch Pcp1 spielt.

Im Gegensatz dazu konnte Mgm1 _{Δ D/E} nicht komplementieren. Dies ist möglicherweise auf die geringen Mengen an s-Mgm1 bei dieser Variante zurückzuführen, da beide Isoformen von Mgm1 für die Fusion von Mitochondrien benötigt werden (Herlan *et al.*, 2003). In einer zweiten Studie konnte Mgm1 _{Δ D/E} zusammen mit einem artifiziell erzeugten s-Mgm1 den $\Delta mgm1/\Delta mgm1$ -Phänotyp komplementieren (persönliche Mitteilung Michael Zick). Dies bestätigt, dass der D/E-Bereich von Mgm1, wenigstens in der langen Isoform von Mgm1, für dessen Funktionalität nicht gebraucht wird.

Weiterhin wurden die Varianten von Mgm1 mit veränderter ITR untersucht, wobei die Verlängerung dieses Bereichs keinen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins hatte. Mgm1_{ITR2x} und Mgm1_{ITR3x} waren beide in der Lage, die tubuläre Morphologie der Mitochondrien wieder herzustellen. Die Varianten mit Deletionen oder Austausch innerhalb der ITR konnten jedoch nicht komplementieren. Dies war unabhängig von den gebildeten Mengen an s-Mgm1 dieser Varianten. Damit sind bestimmte Sequenzbereiche der ITR notwendig für den Erhalt der Morphologie der Mitochondrien. Die ITR ist, abgesehen von der TM von Mgm1, der einzige Bereich, der l-Mgm1 von s-Mgm1 unterscheidet. Hier konnte durch die erhaltenen Ergebnisse zum ersten Mal die Bedeutung der ITR für die Funktionalität von Mgm1 gezeigt werden.

Unterschiedliche Ursachen kommen für diese Beobachtung in Frage. Mgm1 ist ein Dynamin-ähnliches Protein. Dynamine sind für ihre Assemblierung zu filamentösen oder Spiral-ähnlichen Strukturen bekannt (Hinshaw, 2000). Ein Teil der ITR (Aminosäurereste 125-142) könnte laut

Vorhersagen eine Helix ausbilden, welche auf einer Seite geladene Aminosäurereste und auf der anderen hydrophobe Reste trägt. Eine solche amphipathische Helix könnte ein Hinweis auf die Interaktion der langen Isoformen von Mgm1 miteinander sein.

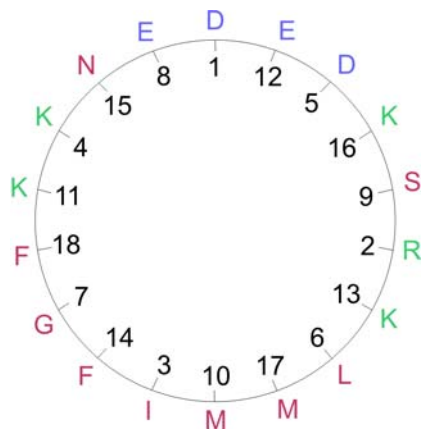


Abbildung 47: Grafische Darstellung der möglichen Helix der ITR von Mgm1. Die Aminosäurereste 125-142 der ITR von Mgm1 könnten laut Vorhersage eine Helix ausbilden, welche auf einer Seite geladene und auf der anderen ungeladene Reste trägt. Dargestellt sind die Reste 125-142 und ihre Positionen auf einem so genannten Helix-Rad. Die Zahlen stehen für die Position des jeweiligen Restes innerhalb der Helix. blau, negativ geladene Reste; grün, positiv geladene Reste; rot, ungeladene Reste.

Erste Untersuchungen mittels Immunpräzipitation von Mgm1 lassen ebenfalls auf eine Interaktion der langen Formen von Mgm1 mit sich selbst schließen (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden durch die Fusion von Mitochondrien *in vitro* neue Erkenntnisse zur Funktion von Mgm1 gewonnen. Vermutlich führen *in trans* Interaktionen von Mgm1-Molekülen sich gegenüber liegender Innenmembranen zur Annäherung und Fusion dieser Membranen bei der Fusion von Mitochondrien. Für die Bildung solcher *in trans*-Komplexe wurden die GTPase und die GED Domäne von Mgm1 verantwortlich gemacht (Meeusen *et al.*, 2006). Jedoch wurde in dieser Studie die Rolle der ITR nicht untersucht. Abgesehen von der Interaktion von Mgm1 mit sich selbst könnte die ITR jedoch auch die Interaktion mit anderen Proteinen, wie dem bekannten Interaktionspartner Ugo1 (Wong *et al.*, 2003; Sesaki and Jensen, 2004), vermitteln. Auch ein Einfluss auf andere für die Funktion wichtige Bereiche des Proteins, wie die GTPase Domäne, wäre denkbar. So könnte eine mögliche Assemblierung von Mgm1 zu

höhermolekularen Strukturen oder die Hydrolyse von GTP stimuliert werden, was wiederum die Fusion von Mitochondrien vorantreiben könnte. Weitere Untersuchungen zur Interaktion von Mgm1 mit sich selbst und/oder anderen Proteinen sowie Mutationsstudien zur Analyse der verschiedenen Domänen und ihrer Funktionen sind nötig, um dies zu klären.

5 Zusammenfassung

Die Dynamin-ähnliche GTPase Mgm1 aus *S. cerevisiae* existiert in einer langen (l-Mgm1) und einer kurzen Isoform (s-Mgm1). Beide Isoformen von Mgm1 sind für die Fusion von Mitochondrien sowie den Erhalt der mitochondrialen DNA notwendig. l-Mgm1 ist mit einer N-terminal gelegenen Transmembrandomäne (TM) in der inneren Mitochondrienmembran verankert, wogegen s-Mgm1 nach Intramembranproteolyse durch die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 gebildet wird. Die Spaltung erfolgt in einem hydrophoben Segment, der *rhomboid cleavage region* (RCR), das C-terminal zur TM liegt. In dieser Arbeit wurden Sequenzelemente in Mgm1, die für die Substraterkennung durch Pcp1 von Bedeutung sind, identifiziert. Hierfür wurden spezifische Sequenzbereiche und Aminosäurereste in Mgm1 deletiert oder ausgetauscht und die Prozessierung der resultierenden Mgm1-Varianten analysiert.

Die Aminosäuresequenz der RCR von Mgm1 enthält Helix-destabilisierende Aminosäurereste wie Glycin und Prolin. Solche Reste werden in Substraten anderer Rhomboidproteasen für die Spaltung benötigt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Helix-destabilisierende Aminosäurereste für die Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1 nicht notwendig sind. Des Weiteren ist die Aminosäuresequenz der RCR von Mgm1, abgesehen von einer generell notwendigen Hydrophobizität, unerheblich für dessen Spaltung durch Pcp1.

Ein Bereich C-terminal der RCR von Mgm1 weist eine Akkumulation negativ geladener Aminosäurereste (D/E-Bereich) auf und ist für die effiziente Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1 notwendig. Auch die Region zwischen TM und RCR von Mgm1, die Inter Transmembran Region (ITR), ist für dessen Spaltung durch Pcp1 wichtig. Vermutlich wird so ein notwendiger Mindestabstand zwischen den beiden hydrophoben Segmenten von Mgm1 gewährleistet. Außerdem wurden die Aminosäurereste 132-150 der ITR als positive Determinanten der Mgm1-Spaltung identifiziert.

Die hier analysierten Sequenzelemente beeinträchtigen nicht die Stabilität bzw. den Abbau entsprechender Varianten von Mgm1. Auch sind

die langen und kurzen Isoformen der meisten der untersuchten Varianten korrekt im Intermembranraum bzw. der Innenmembran der Mitochondrien lokalisiert. Ein Einfluss des D/E-Bereiches bzw. der ITR von Mgm1 auf die Topogenese von s- und l-Mgm1 kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurde die Fähigkeit einiger Varianten von Mgm1, die fragmentierte mitochondriale Morphologie eines $\Delta mgm1$ -Stammes zu komplementieren, mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die ITR, unabhängig von der Substraterkennung durch Pcp1, von Bedeutung für die Funktionalität von Mgm1 ist.

Interessanterweise sind die identifizierten Determinanten, welche für die Intramembranproteolyse von Mgm1 notwendig sind, zwischen Hefe und Mensch konserviert. Die genauen Funktionen dieser Bereiche und ob ähnliche Prinzipien der Substraterkennung für andere, nicht-mitochondriale Rhomboidproteasen gelten, müssen zukünftige Studien zeigen.

6 Summary

The dynamin-like GTPase Mgm1 in *S. cerevisiae* exists as a large (l-Mgm1) and a small isoform (s-Mgm1). Both isoforms of Mgm1 are required for fusion of mitochondria and proper inheritance of mitochondrial DNA. l-Mgm1 is anchored in the inner mitochondrial membrane with a transmembrane domain (TM) located in the N-terminal part of the protein, whereas s-Mgm1 is generated via intramembrane proteolysis by the mitochondrial rhomboid protease Pcp1. Cleavage occurs within a membrane spanning segment C-terminal to the TM, the rhomboid cleavage region (RCR). In this study, sequence elements in Mgm1 which are required for substrate recognition by Pcp1 were identified. To this end, specific regions and amino acid residues in Mgm1 were mutated or deleted and processing of the resulting Mgm1 variants was analyzed.

Within the amino acid sequence of the RCR of Mgm1 helix breaking residues like glycine and proline are present. Such residues are known to be required for processing of other rhomboid protease substrates. Nevertheless, this study revealed that helix breaking residues are not required for the processing of Mgm1 by Pcp1. Furthermore, the amino acid sequence of the RCR, despite a general hydrophobicity, is not relevant for Mgm1 processing.

A region C-terminal to the RCR of Mgm1 shows an accumulation of negatively charged residues (D/E-stretch) which is important for efficient processing of Mgm1. In addition, the region between TM and RCR of Mgm1, the inter transmembrane region (ITR), is important for Mgm1 processing. The ITR probably provides a certain distance between the two hydrophobic segments. Also, amino acid residues 132-150 of the ITR were identified as positive determinants of Mgm1 cleavage.

The stability or degradation rates of respective Mgm1 variants were not affected by the identified sequence elements. Also, long and short Mgm1 isoforms of most of the analyzed variants are properly sorted to the intermembrane space and the inner membrane of mitochondria. Still, an influence of the D/E-stretch or the ITR of Mgm1 on alternative topogenesis of the two isoforms cannot be excluded.

Furthermore, the ability of some Mgm1 variants to complement the fragmented mitochondrial morphology of a $\Delta mgm1$ strain was analyzed by fluorescent microscopy. Thereby it was shown that the ITR of Mgm1 is important for protein function, which is independent of substrate recognition by Pcp1.

Interestingly, the identified determinants required for intramembrane proteolysis of Mgm1 are conserved between yeast and human. The function of these sequence elements and whether similar principles of substrate recognition apply for other, non-mitochondrial rhomboid proteases has to be determined in future studies.

7 Literaturverzeichnis

Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S., and Wissinger, B. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26, 211-215.

Atorino, L., Silvestri, L., Koppen, M., Cassina, L., Ballabio, A., Marconi, R., Langer, T., and Casari, G. (2003). Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *The Journal of cell biology* 163, 777-787.

Baker, R.P., Wijetilaka, R., and Urban, S. (2006). Two *Plasmodium rhomboid* proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria. *PLoS pathogens* 2, e113.

Baker, R.P., Young, K., Feng, L., Shi, Y., and Urban, S. (2007). Enzymatic analysis of a rhomboid intramembrane protease implicates transmembrane helix 5 as the lateral substrate gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8257-8262.

Baxt, L.A., Baker, R.P., Singh, U., and Urban, S. (2008). An *Entamoeba histolytica* rhomboid protease with atypical specificity cleaves a surface lectin involved in phagocytosis and immune evasion. *Genes & development* 22, 1636-1646.

Ben-Shem, A., Fass, D., and Bibi, E. (2007). Structural basis for intramembrane proteolysis by rhomboid serine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 462-466.

Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., and Di Lisa, F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *European journal of biochemistry / FEBS* 264, 687-701.

Bhar, D., Karren, M.A., Babst, M., and Shaw, J.M. (2006). Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *The Journal of biological chemistry* 281, 17312-17320.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.

Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nature cell biology* 1, 298-304.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Brossier, F., Jewett, T.J., Sibley, L.D., and Urban, S. (2005). A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 4146-4151.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* *89*, 331-340.

Burger, G., Gray, M.W., and Lang, B.F. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* *19*, 709-716.

Carruthers, V.B., Sherman, G.D., and Sibley, L.D. (2000). The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *The Journal of biological chemistry* *275*, 14346-14353.

Cervený, K.L., and Jensen, R.E. (2003). The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Molecular biology of the cell* *14*, 4126-4139.

Chen, H., and Chan, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* *14 Spec No. 2*, R283-289.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology* *160*, 189-200.

Choi, S.Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nature cell biology* *8*, 1255-1262.

Cipolat, S., de Brito, O.M., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 15927-15932.

Daum, G., Bohni, P.C., and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry* *257*, 13028-13033.

De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* *391*, 387-390.

Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelléc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J., and Hamel, C.P. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* *26*, 207-210.

Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., and Westermann, B. (2002). Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 13, 847-853.

Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Sakai, J. (1997). Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *The Journal of biological chemistry* 272, 12778-12785.

Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M.F., Attardi, G., Larsson, N.G., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem*, 10.1074/jbc.M606059200; ePub Sep 26th 2006.

Duvezin-Caubet, S., Koppen, M., Wagener, J., Zick, M., Israel, L., Bernacchia, A., Jagasia, R., Rugarli, E.I., Imhof, A., Neupert, W., Langer, T., and Reichert, A.S. (2007). OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Molecular biology of the cell* 18, 3582-3590.

Esser, K., Tursun, B., Ingenhoven, M., Michaelis, G., and E., P. (2002). A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease pcp1. *J Mol Biol* 323, 835-843.

Freeman, M. (2004). Proteolysis within the membrane: rhomboids revealed. *Nature reviews* 5, 188-197.

Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., and Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by fzo1 is critical for organellar fusion. *The Journal of cell biology* 152, 683-692.

Gallio, M., Sturgill, G., Rather, P., and Kylsten, P. (2002). A conserved mechanism for extracellular signaling in eukaryotes and prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12208-12213.

Glick, B.S., Beasley, E.M., and Schatz, G. (1992). Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem Sci* 17, 453-459.

Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science (New York, N.Y)* 283, 1476-1481.

Griffin, E.E., Graumann, J., and Chan, D.C. (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *The Journal of cell biology* 170, 237-248.

Heim, R., and Tsien, R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 6, 178-182.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *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. *The EMBO journal* *20*, 1281-1288.
- Herlan, M., Bornhövd, C., Hell, K., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *The Journal of cell biology* *165*, 167-173.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *The Journal of biological chemistry* *278*, 27781-27788.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *The Journal of cell biology* *143*, 359-373.
- Hinshaw, J.E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 483-519.
- Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annual review of biochemistry* *76*, 751-780.
- Hovius, R., Thijssen, J., van der Linden, P., Nicolay, K., and de Kruijff, B. (1993). Phospholipid asymmetry of the outer membrane of rat liver mitochondria. Evidence for the presence of cardiolipin on the outside of the outer membrane. *FEBS letters* *330*, 71-76.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *The Journal of cell biology* *170*, 1021-1027.
- Kanehara, K., Akiyama, Y., and Ito, K. (2001). Characterization of the yaeL gene product and its S2P-protease motifs in *Escherichia coli*. *Gene* *281*, 71-79.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S., Rogozin, I.B., Davidovic, L., Letellier, M.C., and Pellegrini, L. (2003). The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol* *4*, R19.
- Lange, H., Lisowsky, T., Gerber, J., Muhlenhoff, U., Kispal, G., and Lill, R. (2001). An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO reports* *2*, 715-720.

Lee, J.R., Urban, S., Garvey, C.F., and Freeman, M. (2001). Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell* 107, 161-171.

Lemberg, M.K., and Martoglio, B. (2002). Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Molecular cell* 10, 735-744.

Lemieux, M.J., Fischer, S.J., Cherney, M.M., Bateman, K.S., and James, M.N. (2007). The crystal structure of the rhomboid peptidase from *Haemophilus influenzae* provides insight into intramembrane proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 750-754.

Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873-887.

Lill, R., and Kispal, G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25, 352-356.

Lohi, O., Urban, S., and Freeman, M. (2004). Diverse substrate recognition mechanisms for rhomboids; thrombomodulin is cleaved by Mammalian rhomboids. *Curr Biol* 14, 236-241.

Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 14, 953-961.

Mannella, C.A., Marko, M., and Buttle, K. (1997). Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci* 22, 37-38.

Margulis, L. (1971). Symbiosis and evolution. *Scientific American* 225, 48-57.

Mayer, U., and Nusslein-Volhard, C. (1988). A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes & development* 2, 1496-1511.

McQuibban, G.A., Saurya, S., and Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423, 537-541.

Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.

Meeusen, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science (New York, N.Y)* 305, 1747-1752.

Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., and Herrmann, J.M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121, 1059-1069.

Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., and Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *The Journal of cell biology* 151, 367-380.

Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annual review of biochemistry* 66, 863-917.

Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., and Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Molecular biology of the cell* 8, 1233-1242.

Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W., and Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *The EMBO journal* 21, 3659-3671.

Okamoto, K., and Shaw, J.M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39, 503-536.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743-7746.

Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W., and Shaw, J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *The Journal of cell biology* 143, 333-349.

Paschen, S.A., Neupert, W., and Rapaport, D. (2005). Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem Sci.*

Rather, P.N., Ding, X., Baca-DeLancey, R.R., and Siddiqui, S. (1999). *Providencia stuartii* genes activated by cell-to-cell signaling and identification of a gene required for production or activity of an extracellular factor. *Journal of bacteriology* 181, 7185-7191.

Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.Y., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Molecular cell* 1, 47-57.

- Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1998). Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements. *The Journal of biological chemistry* 273, 8040-8047.
- Ryan, M.T., Wagner, R., and Pfanner, N. (2000). The transport machinery for the import of preproteins across the outer mitochondrial membrane. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 13-21.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y)* 239, 487-491.
- Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Molecular cell* 2, 505-514.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science (New York, N.Y)* 283, 1488-1493.
- Scheffler, I.E. (1999). *Mitochondria*. Wiley-Liss.
- Sesaki, H., and Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *The Journal of cell biology* 147, 699-706.
- Sesaki, H., and Jensen, R.E. (2001). UGO1 Encodes an Outer Membrane Protein Required for Mitochondrial Fusion. *The Journal of cell biology* 152, 1123-1134.
- Sesaki, H., and Jensen, R.E. (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *The Journal of biological chemistry* 279, 28298-28303.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Hobbs, A.E., and Jensen, R.E. (2003a). Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochemical and biophysical research communications* 308, 276-283.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P., and Jensen, R.E. (2003b). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Molecular biology of the cell* 14, 2342-2356.
- 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.

- Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W., and Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* *384*, 582-585.
- Tatsuta, T., Augustin, S., Nolden, M., Friedrichs, B., and Langer, T. (2007). m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria. *The EMBO journal* *26*, 325-335.
- Tieu, Q., and Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *The Journal of cell biology* *151*, 353-366.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K., and Nunnari, J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *The Journal of cell biology* *158*, 445-452.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *76*, 4350-4354.
- Tsruya, R., Schlesinger, A., Reich, A., Gabay, L., Sapir, A., and Shilo, B.Z. (2002). Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the Drosophila EGF receptor ligand Spitz. *Genes & development* *16*, 222-234.
- Urban, S. (2006). Rhomboid proteins: conserved membrane proteases with divergent biological functions. *Genes & development* *20*, 3054-3068.
- Urban, S., and Baker, R.P. (2008). In vivo analysis reveals substrate-gating mutants of a rhomboid intramembrane protease display increased activity in living cells. *Biological chemistry*.
- Urban, S., and Freeman, M. (2003). Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Molecular cell* *11*, 1425-1434.
- Urban, S., Lee, J.R., and Freeman, M. (2001). Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* *107*, 173-182.
- Urban, S., Lee, J.R., and Freeman, M. (2002). A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all Drosophila membrane-tethered EGF ligands. *The EMBO journal* *21*, 4277-4286.
- Urban, S., and Wolfe, M.S. (2005). Reconstitution of intramembrane proteolysis in vitro reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 1883-1888.
- Verstreken, P., Ly, C.V., Venken, K.J., Koh, T.W., Zhou, Y., and Bellen, H.J. (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at Drosophila neuromuscular junctions. *Neuron* *47*, 365-378.

- Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology* 175, 237-247.
- Waizenegger, T., Habib, S.J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S.A., Hell, K., Neupert, W., and Rapaport, D. (2004). Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO reports* 5, 704-709.
- Wang, Y., Zhang, Y., and Ha, Y. (2006). Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature* 444, 179-180.
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M.K., Ashman, K., and Martoglio, B. (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science (New York, N.Y)* 296, 2215-2218.
- Westermann, B. (2003). Mitochondrial membrane fusion. *Biochimica et biophysica acta* 1641, 195-202.
- Westermann, B., and Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 16, 1421-1427.
- Wolfe, M.S., De Los Angeles, J., Miller, D.D., Xia, W., and Selkoe, D.J. (1999). Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38, 11223-11230.
- Wolfe, M.S., and Kopan, R. (2004). Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science (New York, N.Y)* 305, 1119-1123.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., and Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *The Journal of cell biology* 151, 341-352.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinske, T.J., Cassidy-Stone, A., and Nunnari, J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *The Journal of cell biology* 160, 303-311.
- Wu, Z., Yan, N., Feng, L., Oberstein, A., Yan, H., Baker, R.P., Gu, L., Jeffrey, P.D., Urban, S., and Shi, Y. (2006). Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease reveals a gating mechanism for substrate entry. *Nature structural & molecular biology* 13, 1084-1091.
- Ye, J., Dave, U.P., Grishin, N.V., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2000). Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5123-5128.

Zick, M., Rabl, R., and Reichert, A.S. (2008). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*.

Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M., Vance, J.M., and Battaloglu, E. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36, 449-451.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Schaefer, A., Herlan M., Neupert W. und Reichert A., Manuskript eingereicht

8 Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Ccp1	Cytochrome c Peroxidase
DHFR	Dihydrofolatreduktase
Dld1	D-Lactatdehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fis1	<i>mitochondrial fission</i>
Fzo1	<i>fuzzy onions</i>
<i>g</i>	9,81 m/s ²
GED	GTPase Effektor Domäne
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N´-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IM	Innenmembran der Mitochondrien
IP	Immunpräzipitation
ITR	Inter Transmembran Region
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
I-Mgm1	lange Isoform von Mgm1
Mdv1	<i>mitochondrial division</i>

MGM	<i>mitochondrial genome maintenance</i>
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARL	<i>Presenilin associated rhomboid like protein</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
Pcp1	<i>Processing of Cytochrome c peroxidase</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
P _i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
RCR	<i>Rhomboid cleavage region</i>
RHBDL-2	<i>Rhomboid-like protein 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s-Mgm1	kurze Isoform von Mgm1
Su9	Untereinheit 9 der F ₀ F ₁ -ATPase
TBS	Tris gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	Translokationskomplex der Innenmembran
TM	Transmembrandomäne von Mgm1
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit
Ugo1	Fusion
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

9 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Institut anfertigen zu können. Ich habe während der Zeit in seiner Arbeitsgruppe vieles, nicht nur im Bereich der Wissenschaft, gelernt. Seine stetige Diskussionsbereitschaft gaben mir immer wieder wertvolle Anregungen für meine Arbeit.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Jürgen Soll für seine Bereitschaft, meine Arbeit vor dem Fachbereich der Biologie zu vertreten.

Ich danke Prof. Dr. Andreas Reichert für die Betreuung meiner Arbeit. Seine Aufgeschlossenheit gegenüber neuen Ideen, die gute Atmosphäre in seiner Gruppe und die Freiheiten bei der Bearbeitung meiner Projekte ermöglichten es mir, mich ständig weiter zu entwickeln. Danke für die gute Zusammenarbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Gabriele Ludwig, Ilona Dietze und Christiane Kotthoff für die tatkräftige Unterstützung bei der Weiterführung meiner Projekte. Bei Christiane bedanke ich mich im Besonderen für ihre konstruktive Kritik und alles was ich von ihr lernen konnte.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Reichert für den tollen Zusammenhalt und die stetige Unterstützung in wissenschaftlichen wie privaten Dingen. Vor allem bedanke ich mich bei Regina, Nadine und Christiane für ihre offenen Ohren, ihr Verständnis und ihre Freundschaft. Danke auch an Mark, Carsten, Stéphane und Michi für die anregenden Diskussionen und stets neue Motivation.

Ich bedanke mich bei Sole, Nikola und Heike für "Model-Zeiten", viele gute Ratschläge und die Möglichkeit, mal die Perspektive zu wechseln.

Ich möchte auch allen anderen Mitarbeitern des "Neupert-Labors" für die gute Zusammenarbeit danken. Den guten Geistern wie Spülfrauen und Werkstattmitarbeitern, die immer für Ordnung sorgen und dafür, dass wir alles haben was wir zum Forschen brauchen. Christine Werner, Helga Döge und Fr. Hauck danke ich für die Unterstützung in Verwaltungsfragen sowie Dr. Kai Hell und Dr. Dejana Mokranjac für ihren wissenschaftlichen Input.

Mein Dank gilt auch meinen lieben Freunden, die mich durch die letzten vier Jahre begleitet haben. Patricia, weil sie mich immer wieder daran erinnert hat worauf es wirklich ankommt. Sandra, weil sie einfach alles versteht. Suse, weil man mit ihr auch auf große Entfernungen fernsehen kann. Andi, der sich immer um mich sorgt. Tine, die mich schon so lange kennt und immer noch da ist.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern für die ständige Unterstützung während meiner Ausbildung, für ihre Geduld und ihren Glauben an mich. Danke, dass ihr da seid.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Anja Schäfer
Geburtsdatum: 19.08.1977
Geburtsort: Bensheim

Schulbildung:

1983 -1987 Grundschole, Nibelungenschule Heppenheim
1987-1996 Gymnasium, Liebfrauenschule Bensheim
1996 Abitur, Liebfrauenschule Bensheim

Hochschulbildung:

10/1996-03/2003 Studium der Biologie, Technische Universität Darmstadt
07/2002 Diplomhauptprüfung
08/2002-02/2003 Diplomarbeit, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abteilung für Zellbiologie, Prof. Dr. Erich Nigg, Anleitung durch Dr. Herman Silljé
07/2003-11/2003 Lehrstuhl für Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abteilung Prof. Dr. Michael Boshart
04/2004 Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München