Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Qualitätskontrolle von Proteinen in Mitochondrien: Identifizierung und Charakterisierung neuer AAA-Proteasen und Chaperone

von
Carola Klanner
aus
München

München
2001

Erklärung:
Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3. bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dr. W. Neupert (Fachvertreter: Prof. Dr. Dr. M. Biel) betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 10. 05. 2001

Dissertation eingereicht am 11. 05. 2001
Tag der mündlichen Prüfung: 19. 06. 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Martin Biel

Verwendete Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
α	Antikörper
A	Ampère
AAA	AAA-Domäne von Yme1
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CCHL	Cytchrom c_1-Haemlyase
CCPO	Cytochrom-*c*-Peroxidase
cDNA	copy-DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
D. melanogaster	Drosophila melanogaster
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
g	Gramm
G418	Geneticin
gDNA	genomische DNA
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H. sapiens	Homo sapiens
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
IMR-Domäne	Intermembranraum-Domäne
KAc	Kaliumazetat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KLH	Keyhole-Limpet-Hämocyanin
KP_i	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter

LiAc	Lithiumazetat
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
M	Mol pro Liter
M. crenulata	Megathura crenulata
m/v	Masse pro Volumen
mA	Milliampère
MBP	maltose-binding-protein
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
$MgAc_2$	Magnesiumazetat
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
N. crassa	Neurospora crassa
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD_{578}	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SC-Medium	Synthetisches Vollmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SRH	second region of homology
STI	soybean trypsin inhibitor
T. thermophilus	Thermus thermophilus
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Ω	Ohm

1 EINLEITUNG 1

1.1 Molekulare Chaperone 2
1.1.1 Die Chaperonin-Familie 4

1.2 ATP-abhängige Proteasen 8
1.2.1 AAA-Proteasen 16
1.2.1.1 AAA-ATPase-Familie 16
1.2.1.2 AAA-Proteasen 18

1.3 Zielsetzungen der Arbeit 23
1.3.1 Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Tcm62, einem Protein mit Sequenzähnlichkeit zu mitochondrialen Chaperoninen von *S. cerevisiae* 23
1.3.2 Identifizierung neuer AAA-Proteasen in *N. crassa* 23
1.3.3 Untersuchungen zur Bedeutung der Oligomerisierung der AAA-Proteasen für die Funktion der ATPase am Beispiel von Yme1 aus *S. cerevisiae* 24

2 MATERIAL UND METHODEN 26

2.1 Molekularbiologische Methoden 26
2.1.1 Präparation von DNA 26
2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 26
2.1.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* 28
2.1.1.3 Isolierung von DNA aus *N. crassa* 29
2.1.1.4 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 29
2.1.2 Klonierung von DNA-Fragmenten 31
2.1.2.1 Restriktionsverdau von DNA 31
2.1.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase 31
2.1.2.3 TA-Klonierung von PCR-Produkten 31
2.1.2.4 Präparation von kompetenten *E. coli* Zellen 32
2.1.2.5 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation 32
2.1.3 Reinigung und Analyse von DNA 33
2.1.3.1 Gelelektrophorese von DNA 33
2.1.3.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen 33
2.1.3.3 Phenolextraktion und Ethanolfällung von DNA 34
2.1.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA 34
2.1.3.5 Nachweis spezifischer DNA-Fragmente mittels Hybridisierungssonden (Southern Blot) 35
2.1.3.5.1 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Nitrozellulose 35
2.1.3.5.2 Lyse einzelner *E. coli* Kolonien und Fixierung der DNA auf Nitrozellulose (Koloniehybridisierung) 36
2.1.3.5.3 Gewinnung einer digoxigeninmarkierten DNA-Sonde 36
2.1.3.5.4 Nachweis von Genfragmenten durch DNA-Hybridisierung 37
2.1.4 Klonierungen 37
2.1.4.1 Plasmide und *E. coli* Stämme 37

2.1.4.2 Klonierungsstrategien 39
2.1.4.2.1 Klonierung von pGEM4-*TCM62* 39
2.1.4.2.2 Klonierung von pGEM4-*iap-1* und pGEM4-*iap-1ΔN33* 39
2.1.4.2.3 Klonierung von pGEMT-*iap-1** 41
2.1.4.2.4 Klonierung von pGEM4-*map-1* 41
2.1.4.2.5 Klonierung von pQE9-*TCM62* 42
2.1.4.2.6 Klonierung von pMal-cRI-*YME1* und pMal-cRI-*yme1ΔPD* 42
2.1.4.2.7 Klonierung von pRS314-*iap-1** 43
2.1.4.2.8 Klonierung von pVTU100-*iap-1** 45
2.1.4.2.9 Klonierung von pCB1179-*iap-1* 46

2.2 Genetische Methoden 46
2.2.1 Hefegenetik 46
2.2.1.1 Kultivierung von *S. cerevisiae* 46
2.2.1.2 Transformation von *S. cerevisiae* 47
2.2.1.2.1 Transformation Lithiumazetat-konditionierter Hefezellen mit rekombinanter DNA 47
2.2.1.2.2 Disruption der Gene *TCM62* und *YME1* in *S. cerevisiae* 48
2.2.1.3 Kreuzen und Sporulation von Hefezellen 49
2.2.1.4 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae* 50
2.2.2 *N. crassa* Genetik 52
2.2.2.1 Kultivierung von *N. crassa* 52
2.2.2.1.1 Gewinnung der Konidien 52
2.2.2.1.2 Anzucht der Hyphen 52
2.2.2.1.3 Konservierung der Hyphen durch Silikattrocknung 53
2.2.2.2 Transformation von *N. crassa* 53
2.2.2.2.1 Gewinnung transformationskompetenter Sphäroplasten 53
2.2.2.2.2 Transformation der Sphäroplasten 54
2.2.2.2.3 Gewinnung von Mikrokonidien zur Herstellung homokaryontischer Stämme 54
2.2.2.3 Gendisruption in *N. crassa* durch »*r*epeat-*i*nduced *p*oint mutation« (RIP) 55
2.2.2.4 Kreuzung und Sporulation von *N. crassa* Zellen 56
2.2.2.5 Verwendete Stämme von *N. crassa* 56

2.3 Proteinchemische Methoden 57
2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration 57
2.3.2 Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) 57
2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 58
2.3.4 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen 59
2.3.5 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot) 59
2.3.6 Quantifizierung von Proteinbanden durch Autoradiographie und Phosphorimaging 60
2.3.7 Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine *in vitro* 60
2.3.7.1 Transkription 60
2.3.7.2 Translation im Retikulozytenlysat 61
2.3.8 Gelfiltrationschromatographie 61

2.3.9 Expression und Reinigung von Yme1 und Yme1ΔPD als MBP-Fusionsproteine 62
2.3.10 Messung der ATPase-Aktivität 63

2.4 Zellbiologische Methoden 64
2.4.1 Zellbiologische Methoden bei *S. cerevisiae* 64
2.4.1.1 Zellaufschluß durch alkalische Lyse (»Rödel-Aufschluß«) 64
2.4.1.2 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* 65
2.4.1.2.1 »Schnellpräparation« von Mitochondrien oder Membranen von *S. cerevisiae* 65
2.4.1.2.2 Präparation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* 66
2.4.1.2.3 Subfraktionierung von Hefezellen 67
2.4.1.3 Gewinnung von Mitoplasten durch hypotones Schwellen 68
2.4.1.4 Translation mitochondrial kodierter Proteine *in vivo* 68
2.4.1.5 Translation mitochondrial kodierter Proteine in isolierten Mitochondrien von *S. cerevisiae* (»*in organello* Translation«) 69
2.4.2 Zellbiologische Methoden bei *N. crassa* 70
2.4.2.1 Schnellpräparation von Membranen 70
2.4.2.2 Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa* 71
2.4.2.3 Submitochondriale Lokalisierung von Proteinen durch Digitoninfraktionierung 71
2.4.3 Import *in vitro* synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien 72
2.4.4 Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranen (Carbonatextraktion) 73

2.5 Immunologische Methoden 74
2.5.1 Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen 74
2.5.1.1 Gewinnung der Antigene 74
2.5.1.1.1 Heterologe Expression von Tcm62 aus *S. cerevisiae* in *E. coli* 74
2.5.1.1.2 Gewinnung eines Peptidantiserums gegen IAP-1; Kopplung von Peptiden an *K*eyhole-*L*impet-*Hä*mocyanin (KLH) 75
2.5.1.2 Gewinnung der Antiseren 76
2.5.1.3 Affinitätsreinigung des Antiserums α-Tcm62 76
2.5.1.3.1 Kopplung von denaturiertem Tcm62 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B 76
2.5.1.3.2 Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen (Ellman-Assay) 77
2.5.1.3.3 Affinitätsreinigung des Antiserums 78
2.5.2 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot) 79

2.6 Medien und Puffer 80
2.6.1 Medien 80
2.6.1.1 Medien für *E. coli* 80
2.6.1.2 Medien für Hefe 80
2.6.1.3 Medien für *N. crassa* 81
2.6.2 Puffer 83

2.7 Geräte, Chemikalien und Enzyme 84
2.7.1 Geräte 84
2.7.2 Chemikalien und Enzyme 85

3 ERGEBNISSE 89

3.1 Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Tcm62, eines Proteins mit Ähnlichkeiten zu Chaperoninen 89

3.1.1 Charakterisierung von Tcm62 89

3.1.1.1 Proteinsequenz 89

3.1.1.2 Lokalisierung und Topologie 91

3.1.1.2.1 Lokalisierung von Tcm62 in den Mitochondrien 91

3.1.1.2.1.1 Subzelluläre Fraktionierung 91

3.1.1.2.1.2 Import in isolierte Mitochondrien 93

3.1.1.2.2 Submitochondriale Lokalisierung und Topologie 94

3.1.1.3 Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Tcm62 95

3.1.2 Bedeutung von Tcm62 für die Biogenese von Mitochondrien 97

3.1.2.1 Einfluß von Tcm62 auf die Atmungskompetenz der Zellen; Wachstumsphänotyp 97

3.1.2.2 Die Bedeutung von Tcm62 für die mitochondriale Proteinsynthese 98

3.1.2.3 Tcm62 verhindert die Aggregation von Var1 100

3.2 MAP-1 und IAP-1, zwei neue AAA-Proteasen aus *N. crassa* 102

3.2.1 Klonierung der Gene 102

3.2.1.1 *map-1* 102

3.2.1.2 *iap-1* 103

3.2.2 Charakterisierung der Proteine MAP-1 und IAP-1 107

3.2.2.1 Lokalisierung und Topologie 107

3.2.2.1.1 Import in isolierte Mitochondrien 107

3.2.2.1.2 Submitochondriale Lokalisierung und Topologie 108

3.2.2.2 Bestimmung der nativen Molekulargewichte 111

3.2.3 Funktionen von IAP-1 in *N. crassa* 113

3.2.3.1 Disruption von *iap-1* durch »repeat-induced point mutation« (RIP) 113

3.2.3.2 Wachstumsphänotyp des Stamms *iap-1*^{RIP} unter Hitzestreß 114

3.2.3.3 Morphologie der Mitochondrien 115

3.2.3.4 Abbau von Membranproteinen durch die Protease IAP-1 116

3.2.4 Komplementationsstudien von Yme1 durch IAP-1 in *S. cerevisiae* 118

3.2.4.1 Import von IAP-1 und IAP-1* in isolierte Mitochondrien von *S. cerevisiae* 118

3.2.4.2 Komplementation des Wachstumsphänotyps in *S. cerevisiae* 120

3.2.4.3 Komplementation der mitochondrialen Morphologie in *S. cerevisiae* 121

3.3 Untersuchungen zur Oligomerisierung der *i*-AAA-Protease Yme1 aus *S. cerevisiae* 122

3.3.1 Untersuchungen zur Oligomerisierung von Yme1 am isolierten Komplex 122

3.3.1.1 Reinigung von Yme1 als heterolog exprimiertes MBP-Fusionsprotein 122

3.3.1.2 Bestimmung des nativen Molekulargewichts von MBP-Yme1 124

3.3.1.3 Charakterisierung der ATPase-Aktivität des isolierten MBP-Yme1-Komplexes 125

3.3.1.4 Die Rolle der Oligomerisierung für die ATPase-Aktivität von Yme1 127

3.3.2 Untersuchungen zur Bedeutung der Matrixdomäne von Yme1 für die Oligomerisierung *in vivo* 130

3.3.2.1 Bestimmung des Wachstumsphänotyps des Stamms *yme1ΔN* 131
3.3.2.2 Submitochondriale Lokalisierung von Yme1ΔN 132
3.3.2.3 Bestimmung des oligomeren Zustands von Yme1ΔN 133

4 DISKUSSION 135

4.1 Tcm62 ist ein neues, in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes Protein mit Chaperonfunktionen 135

4.2 MAP-1 und IAP-1, zwei neue Vertreter der AAA-Proteasen 139
4.2.1 Die AAA-Protease IAP-1 zeigt im Vergleich mit ihrem Homolog Yme1 aus *S. cerevisiae* gleiche, aber auch unterschiedliche Funktionen 140

4.3 Bedeutung der Oligomerisierung für die Funktion der AAA-Protease Yme1 143
4.3.1 Die ATPase-Aktivität der AAA-Protease Yme1 ist abhängig von der oligomeren Struktur 143
4.3.2 Yme1 assembliert über die Matrixdomäne 144

5 ZUSAMMENFASSUNG 147

6 LITERATURVERZEICHNIS 150

1 Einleitung

Die Ausbildung und Erhaltung der nativen Struktur von Proteinen wird in der Zelle durch ein Proteinqualitätskontrollsystem garantiert. Damit wird die Akkumulation potentiell toxischer Aggregate verhindert. Dieses Proteinqualitätskontrollsystem besteht aus zwei eng kooperierenden Klassen von molekularen Maschinen. »Molekulare Chaperone« unterstützen die Faltung von Proteinen. Allerdings erreichen offenbar nur ~70% aller neu synthetisierten Polypeptide ihre native Konformation (Schubert *et al*., 2000). Um eine Akkumulation der nicht-nativen Proteine zu verhindern, ist daher eine ständige Hydrolyse dieser Polypeptide durch Proteasen erforderlich. Diese Funktion wird häufig durch ATP-abhängige Proteasen übernommen, die ihrerseits chaperonähnliche Eigenschaften besitzen. Neben der Funktion bei der Qualitätskontrolle von Proteinen sind diese Proteasen auch am kontrollierten Abbau kurzlebiger Proteine, und damit maßgeblich an der Regulation unterschiedlichster biologischer Prozesse beteiligt.

Eine Störung der Qualitätskontrolle von Proteinen ist Ursache fast aller neurodegenerativer Erkrankungen des Menschen wie z. B. dem Parkinson-Syndrom, der Alzheimerschen Krankheit, der Chorea Huntington, der Amyotrophischen Lateralsklerose und auch verschiedener Prion-erkrankungen. Allen Krankheiten gemeinsam ist die Ausbildung von typischen Einschlußkörperchen aus aggregierten Proteinen in den Nerven- und Gliazellen der Patienten. Die Bildung dieser Aggregate ist u. a. auf Mutationen der Proteine zurückzuführen, die sich dadurch dem Proteinqualitätskontrollsystem der Zelle entziehen. Aber auch direkte Störungen des Kontrollmechanismus können für die Ausbildung der Einschlußkörperchen verantwortlich sein (Alves Rodrigues *et al*., 1998; Gething, 2000; Kopito, 2000; Tran und Miller, 1999). Die Rolle der Proteinaggregate für den Krankheitsverlauf ist bisher noch nicht genau verstanden. Neueste Untersuchungen gaben jedoch erste Hinweise darauf,

daß die progressive Natur vieler neurodegenerativer Erkrankungen tatsächlich auf die fortschreitende Akkumulation denaturierter Proteine zurückzuführen ist (Yamamoto *et al.*, 2000). In einem Maus-Modell für Chorea Huntington wurde gezeigt, daß ein Verhindern der Aggregation weiterer Proteine nicht nur den Verlauf der Erkrankung verlangsamen, sondern sogar zur Auflösung schon gebildeter Aggregate führen kann (Yamamoto *et al.*, 2000). Eine Unterdrückung der Aggregation der Proteine durch Regulation des Proteinqualitätskontrollsystems könnte daher neue Ansätze für eine Behandlung dieser bisher als unheilbar geltenden Krankheiten bieten.

1.1 Molekulare Chaperone

Der Begriff »Molekulare Chaperone« wurde ursprünglich zur Beschreibung der Rolle des Zellkernproteins Nukleoplasmin bei der Assemblierung von Nukleosomen eingeführt (Laskey *et al.*, 1978). Inzwischen werden als »Molekulare Chaperone« allgemein Proteine definiert, die vorübergehend an andere Proteine binden und dabei eine instabile Konformation dieser Polypeptide stabilisieren. Durch wiederholtes Binden und anschließendes Freisetzen ermöglichen sie diesem anderen Protein seine native Struktur *in vivo* zu erreichen (Bukau und Horwich, 1998; Hendrick und Hartl, 1993).

Molekulare Chaperone finden sich in Eubakterien, Archaebakterien und Eukaryonten. Zwischenzeitlich sind über 20 verschiedene Familien von Chaperonen beschrieben. Zu den bekanntesten und am besten untersuchten gehören die stark konservierten Hsp70-, Hsp90- und Hsp100/Clp-Proteine und die Chaperonine (siehe 1.1.1), aber auch die Hitzeschockproteine mit kleinem Molekulargewicht (Agashe und Hartl, 2000; Beissinger und Buchner, 1998; Martin und Hartl, 1997; Schirmer *et al.*, 1996). Ungefähr ein Viertel aller Chaperone gehören zu den sogenannten Streßproteinen,

die unter Streßbedingungen, wie z. B. erhöhten Temperaturen, vermehrt synthetisiert werden. Die meisten sind aber auch unter normalen Wachstumsbedingungen für die Zelle essentiell (Georgopoulos und Welch, 1993; Hartl, 1996).

Worin besteht die essentielle Funktion von Chaperonen bei der Faltung von Proteinen *in vivo*? Die Information zur Ausbildung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ist in der Primärsequenz der Polypeptidkette enthalten. Unter *in vitro* Bedingungen können Proteine daher spontan und unkatalysiert falten (Anfinsen *et al*., 1961; Anfinsen, 1973; Dobson und Karplus, 1999). Die in der Zelle vorliegende hohe Konzentration an Makromolekülen (300g/l) (van den Berg *et al*., 2000), sowie die Exposition ungefalteter Polypeptide an den Ribosomen während der Translation, führen hier jedoch häufig zur Aggregation von Faltungsintermediaten und verhindern so das Erreichen der aktiven Struktur der Proteine (Ellis, 1997b; van den Berg *et al*., 2000).

Chaperone sind an den unterschiedlichsten Vorgängen der Zelle beteiligt. Sie vermitteln die Faltung neu synthetisierter Proteine, die Rückfaltung von unter Streßbedingungen denaturierter Polypeptide, aber auch den Transport von Proteinen über zelluläre Membranen und den Abbau von Proteinen. Daneben kommt ihnen eine wichtige Bedeutung bei der Oligomerisierung und der Aktivierung von Proteinkomplexen zu (Agashe und Hartl, 2000). Im Gegensatz zu den sogenannten Faltungsenzymen, wie den *P*eptidyl*p*rolyl*i*somerasen (PPI) oder den *P*rotein*d*isulfid*i*somerasen (PDI), unterstützen sie die Faltung von Proteinen durch Stabilisierung nicht-nativer Strukturen, zeigen aber keine katalytische Aktivität im eigentlichen Sinne (Netzer und Hartl, 1998).

1.1.1 Die Chaperonin-Familie

Chaperonine finden sich ubiquitär in fast allen Organismen; in Eubakterien und Archaebakterien, sowie in Zytosol, Mitochondrien und Chloroplasten der Eukaryonten. Mit Ausnahme der Vertreter in Chloroplasten und dem eukaryontischen Zytosol gehören sie zur Gruppe der Hitzeschockproteine (Hartl, 1996), sind aber auch unter normalen Wachstumsbedingungen essentiell. Charakteristisch für Chaperonine ist die Ausbildung zylinderförmiger Komplexe, die sich aus zwei symmetrisch übereinanderliegenden Ringen zusammensetzen. Das Innere dieses Zylinders bildet ein Mikrokompartiment, in dem der Faltungsprozeß in einer geschützten Umgebung ablaufen kann. Auf diese Weise wird insbesondere die Faltung aggregationsgefährdeter Proteine unter zellulären Bedingungen gewährleistet (Ellis, 1999; Wang *et al*., 1998; Mayhew *et al*., 1996).

Die Familie der Chaperonine läßt sich in zwei Untergruppen gliedern (Agashe und Hartl, 2000; Hartl, 1996), die zueinander nur geringe Sequenzähnlichkeiten aufweisen. Zur Gruppe I gehören das GroEL der Bakterien, das mitochondriale Hsp60 sowie das *R*ubisco-*B*indungs-*P*rotein (RBP) der Chloroplasten. Charakteristisch ist die Ausbildung hochmolekularer Komplexe von ~1 000 kDa, die sich aus zwei Ringen, bestehend aus je sieben homooligomeren Untereinheiten, aufbauen. Die Funktion der Chaperonine der Gruppe I wird durch ein Kochaperonin moduliert, das ein molekulare Masse von ~10 kDa besitzt und als heptamerer Ring den Zylinder des Chaperonins abschließt. Im Falle des bakteriellen Chaperonins handelt es sich dabei um GroES, im Falle von Mitochondrien und Chloroplasten um Hsp10 bzw. Cpn10.

Zur Gruppe II gehören das Chaperonin im Zytosol der Eukaryonten, das als TRiC (für *T*CP-*c*ontaining *r*ing *C*omplex) bzw. CCT (für *C*haperonin *c*ontaining *T*CP-1) bezeichnet wird, sowie das Thermosom der Archaebakterien. Im Gegensatz zu Gruppe I-Chaperoninen besteht der

TRiC/CCT-Komplex aus zwei Ringen mit je acht unterschiedlichen, aber verwandten Untereinheiten (Kubota *et al*., 1994; Leroux und Hartl, 2000). Das Thermosom ist aus zwei Ringen mit je acht oder neun Untereinheiten aufgebaut. Es bildet dabei entweder ein Homooligomer oder ist aus zwei oder drei verschiedenen Proteinen zusammengesetzt (Archibald *et al*., 1999; Waldmann *et al*., 1995). Ein Kofaktor wie GroES scheint bei Mitgliedern der Gruppe II zu fehlen. Vermutlich enthält das Chaperonin selbst eine Domäne mit GroES-ähnlicher Funktion (Ditzel *et al*., 1998; Klumpp *et al*., 1997; Llorca *et al*., 1999). Interessanterweise wurde ein heterooligomerer Proteinkomplex in *S. cerevisiae* und höheren Eukaryonten entdeckt, der mit Gruppe II-Chaperoninen interagiert (GimC bzw. Prefoldin). Diese Proteine können spezifisch Substrate binden und diese auf das Chaperonin übertragen (Geissler *et al*., 1998; Leroux *et al*., 1999; Siegers *et al*., 1999; Vainberg *et al*., 1998).

Bedeutung der Chaperonine für die Zelle

In *E. coli* nutzen schätzungsweise ~10% aller *de novo* synthetisierten Proteine (das sind etwa 300) die GroEL-Maschinerie zur Faltung (Ewalt *et al*., 1997; Houry *et al*., 1999). Ungefähr 50 dieser Proteine sind heute bekannt. Interessanterweise scheinen bevorzugt Proteine mit Domänen, die αβ–Sekundärstrukturen aufweisen, mit dem Chaperonin zu interagieren (Houry *et al*., 1999). Dies sind Proteine, die besonders viele hydrophobe Segmente exponieren und daher nur langsam ihre native Struktur erreichen können. Ähnliche Schätzungen wurden für das eukaryontische TRiC/CCT-System durchgeführt; hier scheinen ~15% aller neu synthetisierten Proteine mit dem zytosolischen Chaperonin zu interagieren (Thulasiraman *et al*., 1999). Die beiden bekanntesten Vertreter sind Aktin und Tubulin (Gao *et al*., 1992; Yaffe *et al*., 1992). Diese Befunde deuten darauf hin, daß Chaperonine für die Faltung einer bestimmten und relativ genau definierten Gruppe an Proteinen erforderlich sind, die offenbar durch eine

hohe Tendenz zu Fehlfaltung und Aggregation gekennzeichnet sind.

Chaperonine aus beiden Gruppen kooperieren mit Hsp70-Chaperonen während der Faltung von Proteinen (Langer *et al*., 1992a; Leroux *et al*., 1999; Siegers *et al*., 1999; Teter *et al*., 1999; Vainberg *et al*., 1998). Neu synthetisierte Polypeptidketten binden zunächst kotranslational an das Hsp70-System. Während einige Proteine nach Freisetzung von Hsp70 falten, werden andere auf ein Chaperonin übertragen (Hartl, 1996; Johnson und Craig, 1997). Es wird derzeit diskutiert, ob es sich dabei um einen gerichteten Faltungsweg handelt, oder ob verschiedene Chaperonsysteme ständig um Substrate konkurrieren (Buchberger *et al*., 1996; Farr *et al*., 1997; Fenton und Horwich, 1997). Letzteres Modell ist offenbar für die Rückfaltung denaturierter Proteine relevant (Agashe und Hartl, 2000).

Funktionsmechanismus der Chaperonine am Beispiel von GroEL

GroEL aus *E. coli* ist das sowohl strukturell wie mechanistisch am besten untersuchte Chaperonin. Jede Untereinheit des homooligomeren, tetradodekameren Komplex enthält drei Domänen: die äquatoriale Domäne enthält die ATP-Bindungsstelle und vermittelt die Interaktionen zwischen den Untereinheiten eines heptameren Rings wie auch zwischen den Ringen. Über eine scharnierartige Zwischendomäne ist sie mit der apikalen Domäne verbunden. Diese liegt an der oberen Öffnung des Zylinders und bindet sowohl das Substrat wie auch das Kochaperon GroES (Boisvert *et al*., 1996; Braig *et al*., 1994; Bukau und Horwich, 1998; Fenton und Horwich, 1997; Langer *et al*., 1992b; Roseman *et al*., 1996; Xu *et al*., 1997). Zur Faltung eines Substrats ist der folgende Mechanismus gezeigt (Fenton und Horwich, 1997; Hartl, 1996): Das ungefaltete oder nur partiell gefaltete Protein wird durch hydrophobe Aminosäuren der apikalen Domäne gebunden. Die Bindung von 7 ATP-Nukleotiden am selben Ring (*cis*-Ring) induziert einen Konformationswechsel der apikalen Domäne, aufgrund dessen die GroES-Bindungsstellen an der Öffnung exponiert

werden. Die anschließende Bindung von GroES induziert einen weiteren Konformationswechsel, so daß das Innere des GroEL-Zylinders hydrophile Aminosäuren exponiert. Das Substrat wird daher von seinen Bindungsstellen freigesetzt und kann im Inneren des abgeschlossenen Zylinders falten (Mayhew *et al*., 1996; Xu *et al*., 1997). Durch ATP-Hydrolyse im *cis*-Ring und ATP-Bindung an den *trans*-Ring kommt es zur Freisetzung von GroES. Das gefaltete Substrat kann anschließend den Zylinder verlassen. Faltungsintermediate, die noch nicht ihre vollständige native Konformation erreichen konnten, exponieren immer noch hydrophobe Segmente. Sie binden daher erneut an das Chaperonin und durchlaufen einen weiteren Zyklus. Tatsächlich scheinen nur etwa 5-20% aller Substrate nach dem ersten Zyklus ihre native Konformation erreicht zu haben (Ewalt *et al*., 1997).

Mitochondriale Chaperonine

Das bisher einzige in Mitochondrien bekannte Chaperonin ist das Hitzeschockprotein Hsp60. Es weist eine Sequenzidentität von über 50% zu GroEL aus *E. coli* auf (Reading *et al*., 1989). Seine Struktur und sein Funktionsmechanismus sind dem von GroEL sehr ähnlich (Johnson *et al*., 1989; Langer und Neupert, 1994; McMullin und Hallberg, 1987; McMullin und Hallberg, 1988). Das mitochondriale Kochaperonin ist Hsp10, das, ähnlich wie GroES, eine für Hsp60 essentielle Funktion ausübt (Höhfeld und Hartl, 1994; Rospert *et al*., 1993). Als lösliches Protein der Matrix ist Hsp60 an der Faltung von Polypeptiden nach der Translokation durch die Membranen beteiligt (Cheng *et al*., 1989; Hallberg *et al*., 1993; Ostermann *et al*., 1989; Rospert *et al*., 1996). Aber auch eine Faltung mitochondrial kodierter und translatierter Proteine wird durch Hsp60 vermittelt (Prasad *et al*., 1990). Unter Hitzestreß verhindert es die Denaturierung anderer Proteine und hält sie in einer aktiven Konformation (Martin *et al*., 1992).

1.2 ATP-abhängige Proteasen

Neben molekularen Chaperonen stellen ATP-abhängige Proteasen einen weiteren zentralen Bestandteil des zellulären Proteinqualitäts-kontrollsystems dar. Diesen Proteasen kommt dabei eine zweifache Funktion zu (Goldberg, 1992; Gottesman und Maurizi, 1992; Schmidt *et al*., 1999): Zum einen vermitteln sie die Beseitigung falsch gefalteter oder beschädigter Polypeptidketten und verhindern deren Aggregation mit möglicherweise schwerwiegenden Folgen für zelluläre Funktionen. Zum anderen katalysieren sie den Abbau kurzlebiger regulatorischer Proteine.

Die Gruppe der ATP-abhängigen Proteasen kann aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in vier Familien eingeteilt werden: Das Proteasom ist die wichtigste Protease im eukaryontischen Zytosol. Clp-, Lon- und AAA-Proteasen wurden in Bakterien und in eukaryontischen Organellen mit endosymbiontischen Ursprung (Mitochondrien und Chloroplasten) identifiziert. Alle ATP-abhängigen Proteasen enthalten eine ATPase-Domäne der Klasse der AAA^+-ATPasen (Neuwald *et al*., 1999; Patel und Latterich, 1998) (siehe 1.2.1.1), die eine Untergruppe der sogenannten »P-loop«-NTPasen bildet (Lupas *et al*., 1997; Walker *et al*., 1982). Sie besitzen jedoch unterschiedliche proteolytische Aktivitäten. Im Falle des 26S-Proteasoms handelt es sich um einen Vertreter der Ntn-Hydrolasen (*N-t*erminal *n*ucleophile-Hydrolasen), die AAA-Proteasen besitzen eine metallabhängige Peptidase-Aktivität. Während Clp- und Lon-Proteasen den Serinproteasen zuzurechnen sind (Schmidt *et al*., 1999). Die proteolytische Domäne liegt bei den AAA- und Lon-Proteasen auf einer Polypeptidkette C-terminal zur ATPase-Domäne, während sie beim 26S-Proteasom und den Clp-Proteasen eine selbstständige Untereinheit bildet.

Trotz der Unterschiede in den Primärsequenzen zeigen alle ATP-abhängigen Proteasen eine ähnliche Architektur (Schmidt *et al*., 1999). Die proteolytischen Untereinheiten bzw. Domänen bilden ein zylinderförmiges

Subkompartiment, in dessen Inneren sich die katalytisch aktiven Zentren befinden. Die ATPase-Untereinheiten/Domänen zeigen Chaperonaktivität (Braun *et al*., 1999; Gottesman *et al*., 1997; Leonhard *et al*., 1999; Suzuki *et al*., 1997; Weber-Ban *et al*., 1999). Sie binden und entfalten Substrate und kontrollieren ihre Übertragung in den proteolytischen Zylinder. Diese Vorgänge benötigen metabolische Energie, die durch ATP-Hydrolyse gewonnen wird.

Im folgenden werden die Charakteristika der verschiedenen Proteasefamilien kurz vorgestellt. Da für die vorliegende Arbeit die Familie der AAA-Proteasen eine besondere Bedeutung hat, wird sie ausführlicher in einem eigenen Kapitel behandelt (siehe 1.2.1).

26S-Proteasomen

26S-Proteasomen finden sich im Zytosol und Nukleus von Eukaryonten und Archaebakterien, wohingegen sie in Eubakterien nur innerhalb der Familie der Aktinomyzeten vorkommen (Baumeister *et al*., 1998). Eubakterien enthalten allerdings die HslVU-Protease, deren proteolytische Untereinheit homolog zu entsprechenden Untereinheiten des Proteasoms sind (Lupas *et al*., 1994) (siehe dort). Das Proteasom katalysiert den spezifischen Abbau von Substraten, die durch Konjugation mit einer Polyubiquitinkette markiert wurden (Ciechanover, 1998; Haas und Siepmann, 1997). Das Ubiquitin-Proteasom-System ist der wichtigste Abbauweg der eukaryontischen Zelle.

Das 26S-Proteasom setzt sich aus einem zentralen 20S-Komplex, der die proteolytischen Zentren enthält, und ein oder zwei mit dessen Enden assoziierten 19S-Komplexen mit regulatorischer Funktion zusammen (Bochtler *et al*., 1999; Voges *et al*., 1999). Der zylinderförmige 20S-Komplex von ~700 kDa besteht aus vier übereinanderliegenden heptameren Ringen. Die beiden inneren werden von β–Untereinheiten mit

den katalytischen Zentren, die beiden äußeren von α–Untereinheiten gebildet. In Archaebakterien bestehen die Ringe aus je sieben identischen α- bzw. β-Protomeren, in Eukaryonten dagegen aus je zwei Kopien von sieben unterschiedlichen Untereinheiten (Groll *et al*., 1997; Löwe *et al*., 1995). Der Zugang zum Zylinder des Proteasoms ist durch einen Kanal möglich, durch den nur entfaltete Proteine transportiert werden können. Für das 20S-Proteasom konnten eine chymotrypsin-, eine trypsin-, und eine caspaseähnliche Aktivität gegen künstliche Substrate nachgewiesen werden (Orlowski *et al*., 1993). Überraschenderweise sind bei Eukaryonten, im Gegensatz zu Archaebakterien, lediglich sechs der 14 β–Untereinheiten tatsächlich aktiv. Als katalytisch aktive Aminosäurereste wurden die N-terminalen Threonine der β–Untereinheiten identifiziert, die durch autokatalytische Abspaltung von Propeptiden während der Biogenese des Proteasomkomplexes aktiviert werden (Groll *et al*., 1997; Löwe *et al*., 1995; Seemüller *et al*., 1995). Der Abbau der Substrate erfolgt zu Peptiden von 3-20 Aminosäurereste (Kisselev *et al*., 1998).

Der Zugang zum Zylinder des 20S-Proteasom wird durch den regulatorischen 19S-Komplex kontrolliert (Groll *et al*., 2000). Der 19S-Komplex setzt sich aus zwei Subkomplexen zusammen (Bochtler *et al*., 1999; Voges *et al*., 1999): Die sogenannte »Basis« besteht aus acht Protomeren, wovon sechs der Familie der AAA-ATPasen zuzurechnen sind (siehe 1.2.1.1). Die ATPase-Untereinheiten bilden vermutlich einen hexameren Ring und interagieren direkt mit der Öffnung des 20S-Proteasomenzylinders (Baumeister *et al*., 1998). Ihre genaue Funktion für den Abbau ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnte eine Chaperonaktivität nachgewiesen werden (Braun *et al*., 1999). Es wird daher vermutet, daß sie, wie die regulatorischen Untereinheiten anderer ATP-abhängiger Proteasen, die Substrate für den Abbau entfalten und in den proteolytischen Zylinder übertragen. Die Basis des 19S-Komplexes ist vermutlich nicht an der Bindung ubiquitinierter Substrate beteiligt

(Glickman *et al*., 1998a). Sie scheint jedoch eine Bindungsstelle für nicht-ubiquitinierte aber entfaltete Proteine zu besitzen (Braun *et al*., 1999). Die Erkennung und Bindung der ubiquitinierten Substrate erfolgt durch den zweiten Subkomplex des 19S-Proteasoms, dem sogenannten »Deckel«. Dieser besteht aus mindestens acht verschiedenen Untereinheiten ohne ATPase-Aktivität (Glickman *et al*., 1998a; Glickman *et al*., 1998b).

Zahlreiche neuere Befunde machen deutlich wie komplex die Wirkungsweise des 26S-Proteasoms ist. So können äußere Einflüsse bewirken, daß β–Untereinheiten durch die Translationsprodukte der Gene *LMP2* und *LMP7* ersetzt werden. Dies führt zu einer veränderten proteolytischen Aktivität und ermöglicht so eine effizientere Präsentation von Antigenen durch MHC-Moleküle der Klasse I (Boes *et al*., 1994; Heemels und Ploegh, 1995). Mit Ornithindecarboxylase ist ein Substrat bekannt, daß unabhängig von Ubiquitin abgebaut wird (Murakami *et al*., 1992). Es wurde auch eine reine Prozessierungsaktivität beobachtet. Die Vorstufe der Untereinheit p105 des Transkriptionsfaktors NF-κB wird durch die Protease in die p50-Untereinheit überführt (Coux *et al*., 1996; Hilt und Wolf, 1996; Palombella *et al*., 1994). Ein ähnlicher Mechanismus wurde vor kurzem auch für die membrangebundenen Transkriptions-faktoren Spt23 und Mga2 beschrieben (Hoppe *et al*., 2000).

Clp-Proteasen

Clp-Proteasen finden sich in allen Eubakterien wie auch in Mitochondrien und Chloroplasten der Eukaryonten. Sie setzen sich aus regulatorischen Untereinheiten (ClpA, ClpX, in Chloroplasten ClpC) und einem proteolytischen Komplex (ClpP) zusammen. Der proteolytische Komplex bildet einen zentralen Zylinder, der aus zwei übereinanderliegenden Ringen, die sich aus je sieben ClpP-Polypeptidketten zusammensetzen, aufgebaut ist. (Kessel *et al*., 1995; Wang *et al*., 1997). Die Kristallstruktur von ClpP zeigt, daß auch hier die aktiven Zentren der Peptidase in einer

Reaktionskammer liegen, die nur über kleine Poren an den beiden Enden zugänglich ist (Wang *et al*., 1997). Die regulatorischen Untereinheiten gehören zur Familie der Clp-ATPasen. Sie bilden hexamere Ringe, die auf beiden Seiten des proteolytischen Zylinders binden können (Beuron *et al*., 1998; Kessel *et al*., 1995). Clp-ATPasen können gebundene Substrate entfalten und übertragen diese direkt in die Reaktionskammer des proteolytischen Zylinders (Hoskins *et al*., 1998; Kim *et al*., 2000; Ortega *et al*., 2000; Weber-Ban *et al*., 1999; Wickner *et al*., 1999).

Die Clp-ATPasen ClpA und ClpX interagieren mit dem proteolytischen Komplex ClpP. Die dadurch gebildeten Clp-Proteasen zeigen Unterschiede in der Substratspezifität (Gottesman *et al*., 1993; Grimaud *et al*., 1998). ClpAP hydrolysiert sowohl Casein, als auch den Hitzeschock-Transkriptionsfaktor σ^{32} und RepA, einen Initiationsfaktor der DNA-Replikation. Im Gegensatz dazu baut ClpXP die Proteine λO und MuA-Transposase ab, zeigt aber keine Aktivität gegenüber Casein oder σ^{32} (Hoskins *et al*., 2000; Thompson und Maurizi, 1994; Wojtkowiak *et al*., 1993). Aufgrund von Bindungsstudien *in vitro* wurde eine C-terminale Region der ATPasen ClpA, X, Y und B, die sogenannte SSD-Domäne (*S*ensor und *S*ubstrate *D*iscrimination Domain), als mögliche Substratbindungsstelle identifiziert (Smith *et al*., 1999). Interessanterweise findet sich in der Protease Lon eine homologe Region mit ähnlicher Aktivität (Smith *et al*., 1999). Im Gegensatz zu diesen Befunden wurde jedoch für ClpX anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Substratbindungsstelle am N-Terminus postuliert. Diese Aufnahmen zeigten eine Bindung des Substrats am distalen Ende der ATPase-Domäne (Ortega *et al*., 2000). Die Anpassung der dreidimensionalen Struktur von ClpX an die bekannte Kristallstruktur der ClpY-ATPase (siehe unten) lokalisierte den N-Terminus von ClpX an die Position die I-Domäne von ClpY (Ortega *et al*., 2000) und damit an das distale Ende der ATPase-Domäne (Ishikawa *et al*., 2000). Allerdings wird diese Lage der I-Domäne zur Zeit noch kontrovers diskutiert; Bochtler und Mitarbeiter zeigten anhand der Kristallstruktur eine umgekehrte Orientierung und damit eine

Interaktion der I-Domäne mit dem Zylinder der Protease (Bochtler *et al*., 2000). Die postulierte Substratbindungsstelle von ClpX am N-Terminus muß daher noch weiter überprüft werden.

Vertreter der Familie der Clp-ATPasen üben als molekulare Chaperone auch nicht-proteolytische Funktionen aus (Kruklitis *et al*., 1996; Pak und Wickner, 1997; Wawrzynow *et al*., 1996; Weber-Ban *et al*., 1999; Wickner *et al*., 1994). Dabei scheint die Disassemblierung inaktiver Proteine zu aktiven Strukturen eine für diese Familie typische Funktion zu sein (Levchenko *et al*., 1995; Schirmer *et al*., 1996). Ein Vertreter der Clp-ATPasen-Familie, ClpB, ist maßgeblich an der zellulären Thermotoleranz beteiligt. Für das ClpB-Homolog Hsp104 in *S. cerevisiae* ist eine essentielle Rolle bei der Auflösung von Proteinaggregaten, die durch Hitzestreß entstanden sind, gezeigt (Glover und Lindquist, 1998; Parsell *et al*., 1994; Sanchez *et al*., 1992). ClpB-Proteine interagieren offenbar nicht mit einer proteolytischen Untereinheit und sind daher auch nicht an Abbauvorgängen in der Zelle beteiligt (Woo *et al*., 1992).

Mitochondrien höherer Eukaryonten enthalten ein Ortholog zur ClpP-Protease (Bross *et al*., 1995; Corydon *et al*., 1998) und der ClpX-ATPase (Corydon *et al*., 2000). In Mitochondrien von *S. cerevisiae* sind nur zwei Homologe der Clp-ATPase-Familie bekannt. Das Hitzeschockprotein Hsp78, ein Vertreter der ClpB-Unterfamilie, kann mt-Hsp70 zumindest teilweise beim Import, aber auch bei der Verhinderung der Aggregation mitochondrialer Proteine ersetzen (Schmitt *et al*., 1995). Außerdem konnte eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Thermotoleranz und der Reaktivierung der mitochondrialen Proteinsynthese nach Hitzeschock gezeigt werden (Schmitt *et al*., 1996). Das in der Matrix lokalisierte Mcx1 ist der ClpX-Unterfamilie zuzurechnen (van Dyck *et al*., 1998a). Seine Funktion ist noch nicht bekannt. Eine Beteiligung an proteolytischen Prozessen gilt aber als unwahrscheinlich, da in Mitochondrien von *S. cerevisiae* kein ClpP-Homolog vorhanden ist.

HslVU-Protease

Die Protease HslVU (*h*eat *s*hock *l*ocus *VU*) aus *E. coli* weist eine ähnliche Struktur wie die Clp-Proteasen und das Proteasom auf; der proteolytisch aktive Zylinder ist aus zwei übereinanderliegenden Ringen aufgebaut, die sich aus je sechs Untereinheiten, die starke Sequenzähnlichkeiten zu den β–Untereinheiten des Proteasoms zeigen, zusammensetzen (Missiakas *et al*., 1996; Rohrwild *et al*., 1996). Die regulatorische Untereinheit HslU (ClpY) gehört jedoch zur Familie der Clp-ATPasen. Sie enthält sechs oder sieben Polypeptidketten und bindet zusammen mit ATP an die Enden des proteolytischen Zylinders (Rohrwild *et al*., 1997). Auch für HslU wurde *in vitro* eine Chaperonaktivität unabhängig von HslV gezeigt (Seong *et al*., 2000). Vor kurzem wurde die Kristallstruktur der HslVU-Protease aufgeklärt (Bochtler *et al*., 2000; Sousa *et al*., 2000). Sie zeigt Ähnlichkeiten zur Kristallstruktur der D2-AAA-Domäne von NSF (*N*-ethylmaleimide *s*ensitive *f*actor) (Lenzen *et al*., 1998).

Lon –Protease

Lon (La)-Proteasen sind ubiquitär vor allem in den Eubakterien und Archaebakterien zu finden, aber auch in den Mitochondrien der eukaryontischen Zelle vertreten. Sie bilden hochmolekulare, homooligomere Komplexe, wobei die genaue Anzahl der Untereinheiten noch nicht bekannt ist. Für das mitochondriale Lon-Homolog Pim1 aus *S. cerevisiae* wurde aufgrund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen ein heptamerer Ring beschrieben (Stahlberg *et al*., 1999). Die Analyse mitochondrialer Extrakte durch Gelfiltrationsexperimente dagegen lassen eine noch größere molekulare Masse von etwa 1 600 kDa vermuten (Wagner *et al*., 1997). Jede Untereinheit besteht aus einer C-terminalen proteolytischen und einer zentralgelegenen ATPase-Domäne, die sich, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Proteasen, auf einer einzigen Polypeptidkette finden (Lupas *et al*., 1997). Darüber hinaus enthalten Lon-

Proteasen eine nur gering konservierte N-terminale Domäne von unterschiedlicher Größe.

Auch für die ATPase-Domäne der Lon-Proteasen wird eine Chaperonaktivität postuliert. Während der Abbau von Peptiden auch in Gegenwart nicht hydrolysierbarer ATP-Analoga erfolgt, ist die Proteolyse von nativen Proteinen strikt ATP-Hydrolyse-abhängig (Rasulova *et al*., 1998; Waxman und Goldberg, 1985). Es wird daher vermutet, daß auch hier die durch ATP-Spaltung gewonnene Energie für die Entfaltung der Substrate durch die regulatorische Untereinheit benötigt wird. Die postulierte Chaperonaktivität scheint vermutlich bei keiner der Proteasen ausreichend zu sein, um eine Aggregation der Substrate zu verhindern, was eine Voraussetzung für den Abbau durch die proteolytische Domäne wäre. Dies wird offenbar in Eubakterien, wie auch in Mitochondrien, durch eine Kooperation mit dem Hsp70-System erreicht (Jubete *et al*., 1996; Langer und Neupert, 1996; Savel´ev *et al*., 1998; Sherman und Goldberg, 1992; Wagner *et al*., 1994).

Zu den bislang identifizierten Substraten der Lon-Proteasen in Eubakterien und Mitochondrien gehören ungefaltete oder fehlgefaltete Polypeptide wie z. B. die nicht assemblierten Polypeptidketten der β–Untereinheit der *M*itochondrialen *P*rozessierungs*p*eptidase MPP und der F_1F_0-ATPase (Suzuki *et al*., 1997; Wagner *et al*., 1994), aber auch einige kurzlebige native Proteine (SulA, der Transkriptions-Aktivator des kapsulären Polysaccharidgens RcsA, UmuD, ein Protein der SOS-Mutagenese, das DNA-assoziierte StpA) (Gonzalez, 1998; Johansson und Uhlin, 1999; Maurizi, 1987; Stout *et al*., 1991). Die ungewöhnlichste Eigenschaft der Lon-Proteasen ist die Fähigkeit, sequenzspezifisch an DNA zu binden (Fu *et al*., 1997; Fu und Markovitz, 1998). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre eine Modulierung der DNA-Replikation und/oder Transkription durch die Protease, indem diese den Abbau regulatorischer DNA-gebundener Proteine vermittelt.

Für das mitochondriale Homolog Pim1 wurde zusätzlich eine wichtige Funktion für die Expression zweier mitochondrialer Mosaikgene gezeigt. Die proteolytische Aktivität von Pim1 ist sowohl für die Stabilität der pre-mRNA und dem Splicing der Introns für die Gene *COX1* (Untereinheit 1 der Cytochrom-*c*-Oxidase) und *COB* (Cytochrom *b* des bc_1-Komplexes), als auch für die Translation der reifen mRNA essentiell (van Dyck *et al*., 1998b; van Dyck und Langer, 1999).

1.2.1 AAA-Proteasen

Unter den ATP-abhängigen Proteasen nimmt die Familie der AAA-Proteasen eine Sonderstellung ein. Sie ist die einzige Familie, deren Vertreter in der Membran verankert sind und Membranproteine abbauen. Charakteristisch für alle AAA-Proteasen ist die hochkonservierte AAA-Domäne, weshalb sie der Familie der AAA-ATPasen zuzurechnen sind (Kunau *et al*., 1993; Neuwald *et al*., 1999).

1.2.1.1 AAA-ATPase-Familie

Die Familie der AAA-ATPasen (*A*TPases *a*ssociated with a variety of cellular *a*ctivities; oder auch CAD, für *c*onserverd *A*TPase *d*omain) ist in Eubakterien, Archaebakterien und Eukaryonten vertreten (Neuwald *et al*., 1999). Sie ist eine Unterfamilie der sogenannten »P-loop«-ATPasen (Walker *et al*., 1982). AAA-Domänen finden sich in Proteinen, die an unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind, wie der Zellzykluskontrolle, der Biogenese von Organellen, dem Proteintransport durch Vesikel und der Proteolyse von Proteinen (Patel und Latterich, 1998). Je nach Sequenzähnlichkeit lassen sich verschiedene Unterfamilien unterscheiden (Beyer, 1997; Neuwald *et al*., 1999). Zu AAA-Proteinen mit

proteolytischer Funktion zählen die AAA-Proteasen und Untereinheiten des 26S-Proteasoms. Sequenzvergleiche und Strukturanalysen haben gezeigt, daß die AAA-Familie darüber hinaus strukturell zu Mitgliedern der Clp/Hsp100-Familie, der Lon-Proteasen, der »clamp-loader« Komplexe der Polymerase III, die RuvB–Helikasen und verschiedenen Dyneinen verwandt ist. Sie werden unter der Bezeichnumg AAA^+-ATPasen zusammengefaßt (Neuwald *et al*., 1999).

Mitglieder der AAA-ATPasen enthalten ein oder zwei Kopien einer etwa 230 Aminosäuren langen AAA-Domäne. Ähnlich wie die ATPase-Domänen anderer Proteasen scheint diese auch Chaperoneigenschaften zu besitzen (Kunau *et al*., 1993; Leonhard *et al*., 1999). Diese AAA-Kassette enthält drei hoch konservierte Regionen: Die als Walker A und Walker B bezeichneten Sequenzmotive sind auch in anderen ATPasen des Walker-Typs zu finden und vermitteln ATP-Bindung und die Koordination von Magnesiumionen bei der ATP-Hydrolyse (Walker *et al*., 1982). Typisch für AAA-Proteine ist eine dritte C-terminale konservierte Region, die als SRH-Region (*s*econd-*r*egion-of-*h*omology) bezeichnet wird (Swaffield *et al*., 1992). Auch diese Region scheint an der ATP-Hydrolyse beteiligt zu sein. So führen Punktmutationen in der SRH-Region der *E. coli* AAA-Protease FtsH zu einem vollständigen Verlust der ATP-Hydrolyseaktivität (Karata *et al*., 1999). Ein Erklärung für diese Beobachtung gibt die Kristallstruktur der D2-AAA-Domäne von NSF (Lenzen *et al*., 1998; Yu *et al*., 1998). Hier liegt die SRH-Region zwischen den Kontaktflächen zweier Protomerer der ATPase. Das ATP-Nukleotid wird dabei über einen Lysinrest (Lys 631) der einen Untereinheit und weiteren Aminosäuren der benachbarten Untereinheit gebunden (Yu *et al*., 1998). ATP-Hydrolyse scheint demnach unter direkter Beteiligung von zwei Protomeren zu erfolgen. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Hypothese, daß die bei fast allen AAA-ATPasen beobachtete oligomere Struktur essentiell für die ATP-Hydrolyse ist. Eine weitergehende Untersuchung dieser Fragestellung am Beispiel der AAA-Protease Yme1 war unter anderem Thema der vorliegenden Arbeit (siehe 3.3).

1.2.1.2 AAA-Proteasen

AAA-Proteasen sind eine Unterfamilie der AAA-ATPasen. Sie finden sich in allen Eubakterien sowie in Mitochondrien und Chloroplasten der Eukaryonten. In Archaebakterien konnten sie bisher nicht nachgewiesen werden. Neben der AAA-Domäne enthalten sie eine C-terminale proteolytische Domäne mit dem konservierten Metallbindungsmotiv HEXXH (Langer, 2000). Die N-terminale Domäne zeigt nur geringe Konservierung und enthält eine oder zwei Transmembranregionen.

AAA-Proteasen sind die einzigen bekannten ATP-abhängigen Proteasen, die in der Membran verankert sind und den Abbau von Membranproteinen katalysieren. Der Mechanismus des Membranproteinabbaus wird noch nicht vollständig verstanden. Jedoch gibt es immer mehr Hinweise darauf, daß die Substrate von den AAA-Proteasen aktiv aus der Membran gezogen und dabei hydrolysiert werden. So wurde sowohl für bakterielle, wie auch mitochondriale AAA-Proteasen gezeigt, daß sie die vollständige Hydrolyse von Modellproteinen mit Domänen auf der gegenüberliegenden Seite der Protease katalysieren (Kihara *et al*., 1999; Leonhard *et al.*, 1999). Die nötige Zugkraft könnte dabei durch eine ATP-abhängige Konformationsänderung gewonnen werden. Eine Konformationsänderung wurde *in vitro* schon sowohl für *E. coli* FtsH (Karata *et al*., 1999), wie auch für die isolierte Intermembranraumdomäne von Yme1 (Leonhard, 2000) gezeigt. Die Ausübung einer Zugkraft auf membrangebundene Substrate setzt voraus, daß die Protease ihrerseits fest in der Membran verankert ist. Genau diese Integration in der Membran unterscheidet die AAA-Proteasen von allen anderen bisher bekannten ATP-abhängigen proteolytischen Systemen, die nur gelöste Substrate verdauen.

AAA-Proteasen lassen sich aufgrund der Topologie ihrer Untereinheiten in der Membran in zwei Klassen einteilen (Langer, 2000): Proteine der Klasse I enthalten nur eine Transmembranregion. C- und N-Terminus liegen auf unterschiedlichen Seiten der Membran. Ein typischer Vertreter ist die *i*-AAA Protease Yme1 in *S. cerevisiae.* Im Gegensatz dazu liegen

C- und N-Terminus der Untereinheiten von Proteasen der Klasse II auf derselben Seite der Membran. Sie enthalten zwei Transmembranregionen. Beispiele sind Yta10 und Yta12, Bestandteile der *m*-AAA-Protease in *S. cerevisiae* und das *E. coli* FtsH (Arlt *et al*., 1996; Tomoyasu *et al*., 1993).

Für Vielzeller wurde eine Gliederung der AAA-Proteasen aufgrund phylogenetischer Untersuchungen vorgeschlagen (Juhola *et al*., 2000). Demnach lassen sich die mitochondrialen AAA-Proteasen in drei Gruppen unterteilen. Die erste, und zu den übrigen am wenigsten verwandte Gruppe, enthält alle Yme1-ähnlichen Proteine (Klasse I-Proteine). Die zweite Gruppe wird durch das menschliche Paraplegin vertreten (Klasse II-Protein), während die dritte Gruppe Yta10-ähnliche Polypeptide enthält (Klasse II-Proteine). Proteine mit einer für die Klasse II typischen Membrantopologie scheinen sich demnach in höheren Eukaryonten nochmals in zwei Untergruppen zu gliedern.

Am besten charakterisiert wurden bisher die Vertreter der AAA-Proteasen in *S. cerevisiae* und *E. coli*. Zunehmend werden aber aufgrund der Genomprojekte auch Homologe in höheren Organismen gefunden. Von besonderem Interesse ist das menschliche Paraplegin. Es wurde gezeigt, daß das Auftreten einer neurodegenerativen Erkrankung, der autosomal rezessiven Form der »hereditären spastischen Paraplegie« (HSP), in mehreren Patientenfamilien auf Mutationen im Gen Paraplegin zurückzuführen ist (Casari *et al*., 1998). Spastische Paraplegie ist durch eine fortschreitende, spastische Lähmung der unteren Gliedmaßen gekennzeichnet. Die progressive Natur dieser Erkrankung kann auf eine zunehmende Akkumulation nicht-nativer Proteine und einer damit einhergehenden Beeinträchtigung der Atmungsaktivität der Mitochondrien mit steigendem Alter erklärt werden. Alternativ könnten aber auch die Hemmung der Proteolyse regulatorischer Proteine für diese Defekte verantwortlich sein (Langer, 2000).

AAA-Proteasen in Mitochondrien von S. cerevisiae

Mitochondrien von *S. cerevisiae* enthalten zwei AAA-Protease-Komplexe, die beide in der Innenmembran verankert sind, aber Unterschiede in ihrer Topologie aufweisen. Während die *m*-AAA-Protease ihre katalytisch aktiven Domänen in der *M*atrix exponiert, sind diese bei der *i*-AAA-Protease im *I*ntermembranraum lokalisiert (Arlt *et al*., 1996; Leonhard *et al*., 1996). Beide Proteasen vermitteln den Abbau nicht assemblierter Membranproteine und bilden ein hocheffizientes Qualitätskontrollsystem der Innenmembran. Interessanterweise besitzen sie, trotz der Unterschiede in ihrer Topologie, eine überlappende Substratspezifität (Leonhard *et al*., 2000). Modellproteine, die Domänen auf beiden Seiten der Membran exponieren, können sowohl durch die *m*- wie durch die *i*-AAA-Protease abgebaut werden. Voraussetzung scheint lediglich eine ungefaltete Struktur der Substrate, wie auch eine ausreichende Länge der exponierten terminalen Endigungen von ~20 Aminosäuren zu sein (Leonhard *et al*., 2000). Auch genetische Befunde weisen auf eine Substratüberlappung der beiden Proteasen hin. Im Gegensatz zu Deletionen von nur einer Protease sind Zellen in Abwesenheit beider Proteasen nicht lebensfähig (Lemaire *et al*., 2000; Leonhard *et al*., 2000)

Die *m*-AAA-Protease bildet ATP-abhängig einen hochmolekularen Komplex von ~850 kDa aus zwei homologen Untereinheiten, Yta10 (Afg3) und Yta12 (Rca1) (Sequenzidentität über 50%) (Arlt *et al*., 1996). Jede Untereinheit ist mit zwei Transmembranregionen in der Membran verankert. Sowohl die N-terminale, wie auch die C-terminale Domäne, die die katalytisch aktiven Zentren enthält, sind in der Matrix lokalisiert (Arlt *et al*., 1996).

Mutanten mit Deletionen von *YTA10* oder *YTA12* oder Punktmutationen in den proteolytischen Zentren zeigen pleiotrope Phänotypen. So ist der Abbau nicht-assemblierter Proteine der Atmungskette (Cox1, Cox2,

Cytb2) und der F_1F_0-ATPase (Untereinheit 6, 8, 9) unterdrückt (Arlt *et al*., 1996 Guélin *et al*., 1996). Außerdem ist ein Defekt beim Spleißen der Transkripte der mitochondrialen Gene *COX1* und *COB* beobachtet worden (Arlt *et al*., 1998). Im Gegensatz zur Pim1-Protease wird die *m*-AAA-Protease jedoch nicht für die Translation der mRNA benötigt (Arlt *et al*., 1998 van Dyck *et al*., 1998b). Ein weiterer Phänotyp ist ein Defekt bei der Assemblierung der Cytochrom-*c*-Oxidase, des Cytochrom-bc_1-Komplexes und der F_1F_o-ATPase (Arlt *et al*., 1998; Paul und Tzagoloff, 1995). Zumindest für erstere könnte dieser Phänotyp durch die Defekte beim Spleißen der Gene *COX1* und *COB* und den dadurch bedingten Verlust der entsprechenden Untereinheiten erklärt werden. Jedoch ist die Assemblierung der Komplexe auch in einem Deletionsstamm der *m*-AAA-Protease, der intronlose mitochondriale DNA enthält, unterdrückt (Arlt *et al*., 1998). Die *m*-AAA-Protease scheint vielmehr eine posttranslationale Funktion bei der Assemblierung dieser Komplexe zu übernehmen. Interessanterweise kann eine Überexpression der löslichen Protease Pim1 die Defekte einer Disruption der *m*-AAA-Protease supprimieren (Rep *et al*., 1996). Dies deutet auf zumindest teilweise gleiche Substrate der beiden Proteasen hin.

Die Aktivität der *m*-AAA-Protease wird durch zwei weitere Proteine, die Prohibitine Phb1 und Phb2, reguliert. Diese beiden Proteine befinden sich mit der Protease in einem Superkomplex, und zeigen inhibitorische Effekte auf die Proteolyse von nicht-assemblierten Membranproteinen (Steglich *et al*., 1999). Darüber hinaus führt eine gleichzeitige Überexpression von Phb1 und Phb2 zur Stabilisierung neu synthetisierter mitochondrialer Translationsprodukte (Nijtmans *et al*., 2000).

Auch die *i*-AAA-Protease bildet einen hochmolekularen Komplex von >1 000 kDa (Leonhard *et al*., 1996), dessen Zusammensetzung aber noch nicht vollständig geklärt ist. Die bisher einzige in *S. cerevisiae* bekannte Untereinheit ist Yme1 (Osd1 oder auch Yta11), das eine Sequenzidentität

von ~30% zu Yta10 und Yta12 aufweist. Es ist mit einer Transmembranregion in der inneren Membran verankert. Eine N-terminale Domäne von ~170 Aminosäuren ist in der Matrix, die ATPase-Domäne und die proteolytische Domäne sind im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert (Leonhard *et al*., 1996). Eine Deletion von *YME1*, wie auch Punktmutationen in der ATPase oder proteolytischen Domäne, führen zu verschiedenen zellulären Defekten. So ist das Zellwachstum auf Glukose bei 15°C und auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffen bei 37°C inhibiert (Thorsness *et al*., 1993). Darüber hinaus kommt es bei gleichzeitiger Abwesenheit von *YME1* und mitochondrialer DNA zu einer starken Reduktion des Wachstums auf Glukosemedien. Ein weiterer Phänotyp ist eine Veränderung der mitochondrialen Morphologie. Während in Wildtypzellen Mitochondrien ein feines Netzwerk über die ganze Zelle ausbilden, können in Abwesenheit von *YME1* nur wenige große und abgerundete Organellen beobachtet werden (Campbell *et al*., 1994). Es wird vermutet, daß dieser Phänotyp zu einem verstärkten Abbau der Mitochondrien in den Lysosomen führt (Campbell und Thorsness, 1998). Dies wiederum gäbe eine mögliche Erklärung für den verstärkten Transport mitochondrialer DNA in den Nukleus, eine Eigenschaft, die ursprünglich zur Identifizierung des *YME1*-Gens führte (Thorsness und Fox, 1990). Ein endogenes Substrat der *i*-AAA-Protease ist die nicht assemblierte Form des mitochondrial kodierten Proteins Cox2, eine Untereinheit der Cytochrom-*c*-Oxidase (Nakai *et al*., 1995; Pearce und Sherman, 1995; Weber *et al*., 1996).

1.3 Zielsetzungen der Arbeit

1.3.1 Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Tcm62, einem Protein mit Sequenzähnlichkeit zu mitochondrialen Chaperoninen von *S. cerevisiae*

Im Rahmen der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *S. cerevisiae* wurde ein Gen identifiziert, dessen Translationsprodukt eine schwache aber doch deutliche Sequenzähnlichkeit zur Klasse I der Chaperonine aufwies (YBRO44C; *TCM62*). In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion dieses Proteins, besonders im Hinblick auf eine mögliche Chaperonaktivität hin, untersucht werden. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

(1) Es sollte die zelluläre Lokalisierung, das native Molekulargewicht und eine mögliche Komplexbildung mit dem Chaperonin Hsp60 bestimmt werden.

(2) Um Informationen über die Funktion von Tcm62 zu bekommen, sollte das Gen in *S. cerevisiae* deletiert und Phänotypen des resultierenden Stamms untersucht werden. Aus den Ergebnissen sollten Rückschlüsse auf eine mögliche Chaperonaktivität von Tcm62 gezogen werden.

1.3.2 Identifizierung neuer AAA-Proteasen in *N. crassa*

Das Verständnis der Rolle der AAA-Proteasen in Mitochondrien beruht ausschließlich auf Untersuchungen am Modellorganismus *S. cerevisiae*. In der vorliegenden Arbeit sollten daher neue AAA-Proteasen in *N. crassa* identifiziert werden, um Einblicke in die Bedeutung dieser Proteasefamilie auch in Mitochondrien eines weiteren eukaryontischen Organismus zu

ermöglichen. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

(1) Zunächst sollten Gene, die für Untereinheiten von AAA-Proteasen kodieren, durch Absuchen des Genoms von *N. crassa* mit Hilfe der PCR-Technik unter Verwendung degenerierter Primer identifiziert werden.

(2) Die identifizierten Proteine sollten auf ihre Lokalisierung, ihr natives Molekulargewicht und eine mögliche Komplexbildung untereinander untersucht werden.

(3) Um die Rolle der neu identifizierten Proteine in der Zelle zu bestimmen, sollte von einem der Gene ein Disruptionsstamm in *N. crassa* hergestellt und dieser hinsichtlich seiner Phänotypen untersucht werden.

(4) Um die Frage zu klären, ob es sich bei den AAA-Proteasen von *N. crassa* und *S. cerevisiae* um funktionelle Orthologe handelt, sollte ein Stamm von *S. cerevisiae* hergestellt werden, der das *N. crassa*-Homolog der AAA-Protease anstelle des endogenen Proteins exprimiert. Dieser Stamm sollte hinsichtlich der Komplementation der Phänotypen des Deletionsstamms in *S. cerevisiae* untersucht werden.

1.3.3 Untersuchungen zur Bedeutung der Oligomerisierung der AAA-Proteasen für die Funktion der ATPase am Beispiel von Yme1 aus *S. cerevisiae*

Um ein besseres Verständnis für die Rolle der Oligomerisierung der AAA-Proteasen zu erhalten, sollten Untersuchungen am isolierten Komplex durchgeführt werden. Folgende Fragen sollten geklärt werden:

(1) Welchen Einfluß hat die Oligomerisierung auf die ATPase-Aktivität? Yme1 sollte zunächst in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe chromatographischer Methoden isoliert werden. Anschließend sollte das native Molekulargewicht bestimmt und die Funktionsfähigkeit des isolierten

Komplexes durch Messung der enzymatischen Aktivitäten gezeigt werden. Um den Einfluß der Oligomerisierung auf die ATPase-Aktivität zu untersuchen, sollte anschließend die AAA-Domäne von Yme1 in verschiedenen oligomeren Zuständen gewonnen werden. Hierzu sollten C- und N-terminal verkürzte Yme1-Varianten in *E. coli* exprimiert und chromatographisch aufgereinigt werden. Von diesen Yme1-Varianten sollten die Molekulargewichte bestimmt, die ATPase-Aktivität gemessen und mit der Aktivität des oligomeren Komplexes verglichen werden.

(2) Welche Domänen von Yme1 vermitteln die Oligomerisierung? Zur Klärung dieser Frage sollten Yme1-Varianten, in denen mögliche Assemblierungsdomänen deletiert waren, *in vivo* exprimiert und ihre nativen Molekulargewichte bestimmt werden. Diese Yme1-Varianten sollten gegebenenfalls auf ihre korrekte Lokalisierung in den Mitochondrien und der Komplementation des Wachstumsphänotyps des *Δyme1*-Stamms untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Präparation von DNA

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

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach alkalischer Lyse der Zellen (Birnboim und Doly, 1979) durch Ethanolfällung (siehe 2.1.3.3), gegebenenfalls mit anschließender Reinigung durch Anionenaustauscherchromatographie.

Schnellpräparation

Zur raschen Isolierung von Plasmid-DNA wurden Zellen aus 1,5 ml einer über Nacht in LB^{Amp}-Medium (siehe 2.6.1.1) gewachsenen Kultur bei Raumtemperatur 30 sec bei 15 000 *g* in einer Tischzentrifuge sedimentiert und in 100 µl GTE-Lösung (25 mM Tris/HCl,, pH 8,0; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl 1% (m/v) SDS, 0,2 M NaOH wurden die Zellen lysiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit 150 µl 3 M Kaliumazetat,, pH 4,8 neutralisiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 3 min bei 15 000 *g* zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA aus dem Überstand durch Ethanolfällung gereinigt (siehe 2.1.3.3) und in 30 µl TE-Puffer (siehe 2.6.2) oder destilliertem Wasser resuspendiert. Um störende RNA zu entfernen, wurden die Proben 10 min bei 37°C mit RNase (30 µg/ml) inkubiert. Zur Inaktivierung der RNase wurden die Ansätze anschließend nochmals 10 min auf 65°C erhitzt.

Präparation in großem Maßstab

Die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (bis zu ca. 0,5 mg) erfolgte mit Hilfe des »Jetstar« Kits (Genomed). Die Bakterien aus 100 ml einer über Nacht in LB^{Amp}-Medium (siehe 2.6.1.1) gewachsenen Kultur wurden durch Zentrifugation geerntet (3 000 *g*; 5 min; RT) und in 10 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl,, pH 8,0; 10 mM EDTA) resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Lösung E2 [1% (m/v) SDS; 0,2 M NaOH] wurden die Zellen 5 min bei Raumtemperatur lysiert, das Zelllysat durch Zugabe von 10 ml Lösung E3 (3,2 M Kac,, pH 5,5) neutralisiert und 10 min bei 15 000 *g* zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand auf eine Anionenaustauschersäule geladen, die zuvor mit 30 ml Lösung E4 [0,15% (v/v) Triton X-100; 0,6 M NaCl; 100 mM NaAc,, pH 5,0] äquilibriert wurde. Die Säule wurde mit 60 ml Lösung E5 (0,8 M NaCl; 100 mM NaAc,, pH 5,0) gewaschen und das Plasmid mit 15 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl; 100 mM Tris/HCl,, pH 8,5) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation (15 000 *g*; 30 min; 4°C) aus dem Eluat gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 µl TE-Puffer (siehe 2.6.2) resuspendiert.

Präparation im kleinen Maßstab

Die Präparation kleiner Mengen DNA, die für weitere Klonierungsschritte verwendet werden sollte, wurde mit dem Mini-Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Protokoll entsprach der Methode im großen Maßstab.

2.1.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Isolierung chromosomaler DNA und Plasmid-DNA

1 ml einer Hefekultur (OD_{578} ~1) wurde in einem Eppendorfreaktionsgefäß abzentrifugiert und in 500 µl Wasser aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl Zymolyasepuffer (50 mM Tris/HCl,, pH 7,5; 25 mM EDTA; 5 mg/ml Zymolyase) resuspendiert. Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer [1% (m/v) SDS; 0,2 M NaOH] zugegeben und die Proben 30 min auf 65°C erwärmt. Zellwände und Membranen wurden durch Zugabe von 150 µl 3 M Natriumazetat,, pH 4,5 und anschließender Inkubation bei 4°C (30 min) ausgefällt und 15 min bei 20 000 *g* abzentrifugiert. Dem Überstand wurde 1 ml 96%iger (v/v) Ethanol (-20°C) zugegeben. Nach 15 min bei 20°C wurde erneut 15 min bei 20 000 *g* zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und in 40 µl Wasser resuspendiert.

Schnellpräparation von DNA aus Hefezellen

Um die Integration von Disruptionskonstrukten in das gewünschte Gen mittels PCR (siehe 2.1.1.4) zu überprüfen, wurde eine Schnellmethode zum Aufschluß der entsprechenden Hefezellen angewandt. Dazu wurden mit einem sterilen Zahnstocher Hefezellen von einer Platte in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, 1 min mit offenem Deckel in der Mikrowelle erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Zur Durchführung der PCR wurden Reagenzien und DNA-Polymerase direkt zu den lysierten Zellen gegeben.

2.1.1.3 Isolierung von DNA aus *N. crassa*

Genomische DNA aus *N. crassa* wurde weitgehend wie bei Lee *et al.* (1988) beschrieben isoliert. 0.5-1 g Hyphen einer Übernachtkultur wurden geerntet und in einen Mörser überführt. Durch übergießen der Hyphen mit flüssigem Stickstoff wurden diese schockgefroren und konnten so mit einem Pistill zu einem groben Pulver verrieben werden. Dieses Pulver wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 750 µl Lysepuffer [3% (m/v) SDS; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 1% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0.1 mg/ml RNAse] 1 h bei 65°C erhitzt. Zur Abtrennung der Proteine wurde der Ansatz zunächst mit 700 µl Chloroform/Phenol (1:1) versetzt und anschließend die wäßrige Phase nochmals mit 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe des 0.7-fachen Volumens an Isopropanol ausgefällt. Nach kurzer Zentrifugation wurde die DNA in 300 µl TE-Puffer (siehe 2.6.2), dem RNAse (0.1 mg/ml) zugesetzt war, resuspendiert und 10 min bei 65°C inkubiert. Zur weiteren Reinigung wurde die DNA nochmals durch Zugabe von 30 µl 3 M Natriumazetat und 600 µl Ethanol (-20°C) ausgefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen. 5-10 µl dieser Lösung waren in der Regel für einen Testverdau (siehe 2.1.2.1) der DNA ausreichend.

2.1.1.4 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit hitzebeständigen DNA-Polymerasen in einem programmierbaren Thermostaten vervielfältigt (Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985). Dazu wurde das PrimeZyme^{TM}-Kit (Biometra) verwendet. In einem Ansatz von 100 µl waren folgende Reagenzien enthalten: 1-2 U DNA-Polymerase, 10 µl 10x PCR-Puffer [1% (v/v) Triton X-100; 100 mM Tris/HCl, pH 8,8;

500 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$], 1,2 µl dNTPs (je 10 mM), je 50 pmol der entsprechenden Primer und ~200 ng Plasmid-DNA bzw. 1 µg genomische DNA als Matrize. Zur Synthese von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke wurde *Taq*-Polymerase, für Klonierungen *Pfu*-Polymerase, verwendet. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen von Wasser zu verhindern. Die PCR wurde mit dem folgenden Programm durchgeführt:

1) 3 min	94°C	Inaktivierung von Nukleasen und vollständige Denaturierung der DNA
2) 20-30 Zyklen:		
1 min	94°C	Denaturierung der DNA
1 min	45-62°C	Binden der Oligonukleotide
1-6 min	68-72°C	Synthese der neuen DNA; die Zeiten wurden nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments bestimmt: Taq-Polymerase: ~1 min/1 kb; Pfu-Polymerase: ~2,5 min/1 kb;
3) 5-20 min	68-72°C	Vervollständigung der letzten Reaktion
4) Abkühlung auf 4°C		

Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mittels Gelelektrophorese (siehe 2.1.3.1) analysiert. Für weitere Klonierungsschritte wurden die Ansätze mit Hilfe des PCR-Reinigungskits der Firma Qiagen durch Anionenaustauschchromatographie nach Angaben des Herstellers gereinigt, um Salze und Primerdimere abzutrennen.

2.1.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.1.2.1 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Gibco/BRL, New England Biolabs, Boehringer Mannheim) (2-3 U/µg DNA) in den vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen inkubiert. Dabei wurde Plasmid-DNA bei 25°C oder 37°C 1 h, PCR-Produkte mindestens 3 h verdaut. Die geschnittene DNA wurde zur Analyse oder weiteren Aufreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.1.3.1) aufgetrennt.

2.1.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase

Um zwei DNA-Fragmente mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zu verknüpfen, wurde der folgende Reaktionsansatz (20 µl) hergestellt: 2 µl 10x Ligationspuffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 10 mM $MgCl_{2;}$ 5% (m/v) PEG-8 000; 1 mM DTT; 1 mM ATP], 1 U T4-DNA-Ligase (Gibco/BRL), 50-200 ng DNA des linearisierten Vektors und im 2-5-fachen molaren Überschuß DNA des Inserts. Der Ansatz wurde 2 h bei 25°C oder über Nacht bei 14°C inkubiert. Zur Aufkonzentrierung der DNA wurde diese mit Ethanol ausgefällt (siehe 2.1.3.3) und in 10 µl sterilem Wasser resuspendiert.

2.1.2.3 TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die geringe Aktivität einiger Restriktionsenzyme an Enden von durch PCR erzeugten DNA-Fragmenten führt häufig zu unvollständigen Schnitten,

was die Klonierungseffizienz drastisch reduziert. PCR-Produkte wurden daher ohne Restriktionsverdau in die kommerziell erhältlichen, linearisierten Vektoren pCR2.1, pCRII-TOPO (Invitrogen) oder pGEM-T (Promega) kloniert, die an den 3´-Enden ungepaarte Thymidinnukleotide enthalten. Durch *Taq*-Polymerase erzeugte DNA-Fragmente tragen an den 5´-Enden häufig überhängende Adenosinnukleotide und können deshalb direkt in diese Plasmide eingesetzt werden. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben für 5-60 min bei Raumtemperatur. Bei durch *Pfu*-Polymerase erzeugten PCR-Fragmenten wurde an die 5´-Enden zusätzlich Adenosinnukleotide durch eine Nachbehandlung mit 1 U *Taq*-Polymerase für 10 bis 30 min bei 72°C angehängt.

2.1.2.4 Präparation von kompetenten *E. coli* Zellen

E. coli Zellen wurden in LB-Medium (siehe 2.6.1.1) (1 l) bei 37°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD_{578} ~0,5) kultiviert und anschließend 30 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4 400 *g*; 5 min; 2°C) geerntet und das Zellpellet im Kühlraum mit 500 ml, 250 ml und schließlich mit 50 ml kaltem 10%igem (v/v) Glyzerin gewaschen. Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden in 500 µl 10%igem (v/v) Glyzerin resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.1.2.5 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

1-5 µl Ligationsansatz (siehe 2.1.2.2) oder 1 ng Plasmid-DNA wurden mit 40 µl auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* Zellen (siehe 2.1.2.4) gemischt und 30 sec bei 4°C inkubiert, um eine effiziente Bindung der

DNA an die Bakterienoberfläche zu gewährleisten. Die Bakteriensuspension wurde in eine vorgekühlte Transformationsküvette überführt und in einem Elektroporationsgerät transformiert (Einstellung: 2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, Zeitkonstante 8-9 ms). Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml SOC-Medium [2% (m/v) Trypton, 0,5% (m/v) Hefeextrakt, 0,058% (m/v) NaCl, 0,019% (m/v) KCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM Glukose] gemischt und 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden durch Zentrifugation isoliert, in 100 µl SOC-Medium aufgenommen und auf LB^{Amp}-Platten (siehe 2.6.1.1) bei 37°C inkubiert.

2.1.3 Reinigung und Analyse von DNA

2.1.3.1 Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen (je nach Größe der Fragmente 0,7-2% (m/v) Agarose) nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Hierzu wurden die Proben mit Auftragspuffer [4% (m/v) Saccharose; 0.025% (m/v) Bromphenolblau; 2 mM EDTA, pH 8,0] gemischt und anschließend geladen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer [4,8 g/l Tris; 1,15% (v/v) Eisessig; 1 mM EDTA, pH 8,0] bei einer Feldstärke von bis zu 13 V/cm. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde der Agaroselösung vor der Polymerisation Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt.

2.1.3.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die durch Restriktionsverau (siehe 2.1.2.1) oder PCR (siehe 2.1.1.4) erzeugt worden waren, wurden zunächst durch Gelelektrophorese (siehe 2.1.3.1) aufgetrennt und die entsprechende DNA-

Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus der Agarose erfolgte anschließend mit Hilfe des Gelextraktionskits der Firma Qiagen durch Anionenaustauschchromatographie nach Angaben des Herstellers.

2.1.3.3 Phenolextraktion und Ethanolfällung von DNA

Verunreinigungen von DNA-Präparationen durch Proteine wurden durch Phenolextraktion entfernt. Dazu wurde die Probe mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt. Nach einer anschließenden Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurde die wässrige Phase abgenommen und die DNA durch Ethanolfällung (siehe unten) weiter gereinigt.

Eine Fällung von DNA mit Ethanol wurde auch zur Konzentrierung und Entsalzung von DNA-Proben durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 0,3 M Natriumazetat, pH 5,2 eingestellt, mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt und 30 min bei -80°C inkubiert. Gefällte DNA wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 15 000 *g* und 4°C isoliert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und bei 37°C kurz getrocknet. Die DNA wurde anschließend in einem geeigneten Volumen destilliertem Wasser, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 oder TE-Puffer (siehe 2.6.2) resuspendiert.

2.1.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml Oligonukleotiden (linearer Bereich:

0,1-1 OD_{260}). Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Präparation. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.3.5 Nachweis spezifischer DNA-Fragmente mittels Hybridisierungssonden (Southern Blot)

2.1.3.5.1 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Nitrozellulose

Zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente in einem komplexen DNA-Gemisch wurde das Verfahren nach Southern (1975) verwendet. Genomische DNA wurde durch geeignete Restriktionsenzyme verdaut (siehe 2.1.2.1) und das entstandene Fragmentgemisch auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.1.3.1). Zum Transfer dieser Fragmente auf Nitrozellulose wurde das Gel zunächst 10 min in 0.25% (v/v) Salzsäure und anschließend zweimal je 20 min in 1,5 M NaCl und 0,5 M Natronlauge inkubiert. Nach Neutralisation mit 1,5 M NaCl, 1 M Tris, pH 8,0 (zweimal 20 min) wurde das Agarosegel auf ein feuchtes Whatman Papier, das Verbindung zur einer 2x SSC-Pufferlösung (siehe 2.6.2) hat, gelegt. Auf das Gel wurde eine Nitrozellulose-Membran und ein Stapel Papierhandtücher geschichtet und 16 bis 20 h mit einem Gewicht beschwert. Durch Kapillarkräfte wird der Puffer durch das Gel in die trockenen Papierhandtücher gesaugt und dabei die DNA aus dem Gel herausgelöst. Diese bindet durch elektrostatische Wechselwirkungen an die Nitrozellulose. Durch Erhitzen der Nitrozellulose-Membran (2 h, 80°C) wurde die DNA darauf fixiert. Der Nachweis der Fragmente erfolgte anschließend durch DNA-Hybridisierung (siehe 2.1.3.5.4).

2.1.3.5.2 Lyse einzelner *E. coli* Kolonien und Fixierung der DNA auf Nitrozellulose (Koloniehybridisierung)

Zur schnellen Analyse von gDNA-Banken wurde die Technik der Koloniehybridisierung verwendet, wie sie im »Dig DNA Labeling and Detection Kit« der Firma Boehringer-Mannheim beschrieben ist. Zunächst wurden die Kolonien der gDNA-Banken auf LB^{Amp}-Platten (siehe 2.6.1.1) gestempelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch zweiminütiges Auflegen einer Nitrozellulosemembran auf die Platten wurden die Kolonien auf diese übertragen. Zur Lyse der *E. coli* Zellen wurde die Membran zweimal für 5 min mit Lösung I (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), anschließend zur Neutralisation zweimal für 5 min mit Lösung II (1 M Tris/HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) und einmal mit 2x SSC (siehe 2.6.2) inkubiert. Um ein Abschwemmen der Kolonien während der Lyse zu vermeiden, wurde die Membran auf Whatman Papier gelegt, das mit dem jeweiligen Puffer getränkt war. Zur Fixierung der DNA wurde die Nitrozellulose 2 h auf 80°C erhitzt. Anschließend wurde eine DNA-Hybridisierung durchgeführt.

2.1.3.5.3 Gewinnung einer digoxigeninmarkierten DNA-Sonde

Die Hybridisierungssonde wurde durch Polymerasekettenreaktion (siehe 2.1.1.4) in Gegenwart digoxigeningekoppelten dUTPs mit Hilfe des »Dig Luminescent Detection Kit« der Firma Boehringer-Mannheim gewonnen. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 100 µl dieses PCR-Ansatzes in 50 ml Hybridisierungspuffer [7% (m/v) SDS; 50% (v/v) Formamid; 5x SSC (siehe 2.6.2); 2% (m/v) Blockreagenz der Firma Boeringer Mannheim, gelöst als 10%ige Stammlösung in 100 mM Maleinsäure; 50 mM Natrium-phosphatpuffer, pH 7.0; 0.1% (m/v) N-Lauroylsarcosin] verdünnt, anschließend 10 min auf 95°C erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt, um die Doppelstränge der DNA zu denaturieren.

2.1.3.5.4 Nachweis von Genfragmenten durch DNA-Hybridisierung

Die Analyse der auf Nitrozellulose fixierten DNA erfolgte mit Hilfe des »Dig Luminescent Detection Kit« der Firma Boehringer Mannheim. Zunächst wurde die Membran (siehe 2.1.3.5.1 oder 2.1.3.5.2) 2 h bei 39°C in Hybridisierungspuffer (siehe 2.1.3.5.3) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht mit Hilfe einer digoxigeninmarkierten Sonde (siehe 2.1.3.5.3) bei der selben Temperatur. Anschließend wurde zweimal mit 2x Waschpuffer [2x SSC; 0.1% (m/v) SDS] bei Raumtemperatur und zweimal bei 68°C mit 0.5x Waschpuffer gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Sonde, wurde die Membran zunächst 30 min in Blockpuffer [1% (m/v) Blockreagenz der Firma Boeringer Mannheim; 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl, pH 7.5] abgesättigt und weitere 30 min mit einer Anti-Digoxigeninlösung (α-Digoxigenin 1:10 000 in Blockpuffer) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Membran mit CSPD^{R}-detection-Puffer benetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Durch die ablaufende Chemolumineszenz-Reaktion konnten mit Digoxigenin markierte Banden auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

2.1.4 Klonierungen

2.1.4.1 Plasmide und *E. coli* Stämme

Für die Transkription und Translation mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro* wurden Plasmide der pGEM Reihe (Promega) verwendet, in die die betreffende cDNA unter Kontrolle des SP6-Promotors kloniert war. Die ligierten Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert.

Die Expression von Proteinen in *E. coli* erfolgte mit Hilfe der Vektoren

pQE9 (Qiagen) und pMAL-cRI (BioLab), die eine Klonierung des gewünschten Gens unter Kontrolle des *Lac*-Promotors ermöglichten. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropylthiogalaktosid (IPTG) in die *E. coli* Kultur induziert. Durch eine Klonierung der entsprechenden Gene in den Vektor pQE9 wurde Proteinen eine N-terminale Hexahistidinsequenz (HIS-tag) angehängt. Zur Expression eines Fusionsproteins aus dem *M*altose*b*indungs*p*rotein (MBP) und Yme1 wurde der Vektor pMAL-cRI (BioLab) verwendet. Dadurch konnte das Protein nach der Expression mit Hilfe einer Amylose-Matrix (BioLab) aufgereinigt werden.

Die Transformation von Expressionsplasmiden erfolgte in den *E. coli* Stamm XL1-Blue, der den *Lac*-Repressor *LacI* exprimiert. Dadurch war die Expression des rekombinanten Proteins in Abwesenheit von IPTG weitestgehend unterdrückt.

Zur Expression von Proteinen in Hefe wurden die Vektoren pRS314 (BioLab) und pVTU100 (Vernet *et al*., 1987) verwendet. Der Vektor pRS314 enthält Centromer (CEN) und Replikationsursprung (ARS1) der Hefe und kodiert zudem für ein Enzym der Tryptophanbiosynthese (TRP1), um auf dieses Plasmid selektionieren zu können. Zur stärkeren Expression von IAP-1* wurde das entsprechende Gen unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors des *ADH1*-Gens in den 2µ-Vektor pVTU100 kloniert. Dieser Vektor kodiert für ein Enzym der Uracilbiosynthese (URA3). Hefeexpressionsplasmide wurden entweder in den *E. coli* Stamm DH5α oder MH1 transformiert.

Für die Expression von IAP-1 in *N. crassa* wurde der Vektor pCB1179 (Prokisch *et al*., 2000) verwendet. Dieser Vektor enthält den *N. crassa* Chinasäurepromotor *qa2* (Geever *et al*., 1989) und, zur Selektion auf das Plasmid, zusätzlich das Hygromycin-Resistenz-Gen.

2.1.4.2 Klonierungsstrategien

2.1.4.2.1 Klonierung von pGEM4-*TCM62*

Für die *in vitro* Synthese von Tcm62 wurde das entsprechende Gen mittels PCR mit den folgenden Primern aus genomischer DNA amplifiziert:

5'-Primer: 5'-CCC GGA TCC ATG CTG AGG AAT TGT TTG-3'

3'-Primer: 5'-CCC GTC GAC TTA TCT AGG CTT TGT GCC-3'

Das PCR-Produkt wurde zunächst in den Vektor pCR^{TM}2.1 (Invitrogen) mit Hilfe der TA-Klonierungstechnik kloniert (siehe 2.1.2.3). Aus dem erhaltenem Plasmid wurde das *TCM62* Gen durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I (Gibco) reisoliert und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pGEM4 gesetzt. Nach der Ligation wurde das Plasmid in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert.

2.1.4.2.2 Klonierung von pGEM4-*iap-1* und pGEM4-*iap-1ΔN33*

Für die *in vitro* Synthese der Proteine IAP-1 und IAP-1ΔN33 wurden die entsprechenden Genfragmente mittels PCR (siehe 2.1.1.4) mit den folgenden Primern unter Verwendung des Cosmids G9:G8 (siehe 3.2.1.2) als Matrize amplifiziert:

für IAP-1:

5'-Primer: 5'-TAA TGA ATT CAC CAT GTC TTC CCG CCA GCT CG-3'

für IAP-1ΔN33:

5'-Primer: 5'-TTT AAT GAA TTC ACC ATG AGC ACC CAC CAG CCC G-3'

3'-Primer: 5'-TTA TTG GAT CCT CAG TGA TGG TGA TGG TGG TGC GCG GGC ACA GGC GGC-3'

pGEM-Plasmide	**Referenz**
pGEM4-*TCM62*	Klanner *et al*., 2000; diese Arbeit
pGEM4-*YME1*	T. Langer (unveröffentlicht)
pGEM4-*iap-1* (gDNA)	diese Arbeit
pGEM4-*iap-1ΔN33* (gDNA)	diese Arbeit
pGEMT-*iap-1** (Yme1-Präsequenz; cDNA)	diese Arbeit
pGEM4-*map-1* (gDNA)	diese Arbeit
pGEM4-*yme2ΔN33*	Leonhard *et al*., 2000
pGEM4-*yme2ΔC23*	Leonhard *et al*., 2000

Expressionsplasmide für *E. coli*	**Referenz**
pQE9-*TCM62*	diese Arbeit
pQE60-AAA	Leonhard *et al*., 1999
pQE60-IMD	Leonhard *et al*., 1999
pMAL-cRI-*YME1*	diese Arbeit
pMAL-cRI-*yme1ΔPD*	diese Arbeit

Expressionsplasmide für *S. cerevisiae*	**Referenz**
pRS314-*iap-1** (cDNA)	diese Arbeit
pVTU100-*iap-1** (cDNA)	diese Arbeit
pRS314-*yme1ΔN*	B. Guiard (unveröffentlicht)
pVTU100-*mtGFP*	Westermann und Neupert, 2000

Expressionsplasmide für *N. crassa*	**Referenz**
pCB1179-*iap-1* (gDNA)	diese Arbeit

Tabelle 1: Verwendete Plasmide
Die Klonierungsstrategien für die in dieser Arbeit erstellten Plasmide sind unter Abschnitt 2.1.4.2 beschrieben.

Die PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Bam*HI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pGEM4 gesetzt. Nach der Ligation wurden die Plasmide in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert. Beide Konstrukte enthalten ein Intron von 66 bp, was zu einem vorzeitigen Kettenabbruch der Translationsprodukte führt.

2.1.4.2.3 Klonierung von pGEMT-*iap-1**

Für die *in vitro* Synthese von IAP-1* wurde das entsprechende Gen mittels PCR mit den folgenden Primern unter Verwendung des Plasmid pRS314-*iap-1** als Matrize (siehe 2.1.4.2.7) amplifiziert:

5'-Primer: 5'-CCC TTT CTG CAG ATG AAC GTT TCA AAA ATA CTT G-3'

3'-Primer: 5'-AAA TTT AAG CTT TCA CCT TTG CTC CTT GCT CTC ACC-3'

Das PCR-Fragment wurde mit Hilfe der TA-Klonierungstechnik (siehe 2.1.2.3) in den Vektor pGEMT (Promega) gesetzt und das erhaltene Plasmid in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert.

2.1.4.2.4 Klonierung von pGEM4-*map-1*

Für die *in vitro* Synthese von MAP-1 wurde das entsprechende Gen mittels Polymerasekettenreaktion mit den folgenden Primern aus genomischer DNA amplifiziert:

5'-Primer: 5'-TTT AAA TCT AGA ATG GCG GTC AGA TTT CGC CAA TCG-3'

3'-Primer: 5'-AAA TTT AAG CTT TCA CCT TTG CTC CTT GCT CTC ACC-3'

Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hin*dIII

verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pGEM4 gesetzt. Das erhaltene Plasmid wurde in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert.

2.1.4.2.5 Klonierung von pQE9-*TCM62*

Für die Expression von Tcm62 in *E. coli* (siehe 2.5.1.1.1) wurde das entsprechende Gen in den Expressionsvektor pQE9 (Qiagen) kloniert. Dazu wurde das Plasmid pGEM4-*TCM62* (siehe 2.1.4.2.1) mit den Enzymen *Bam*HI und *Hin*dIII verdaut und das erhaltene 1.6 kb Fragment in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pQE9 gesetzt. Das erhaltene Plasmid wurde in den *E. coli* Stamm XL1-Blue transformiert.

2.1.4.2.6 Klonierung von pMal-cRI-*YME1* und pMal-cRI-*yme1ΔPD*

Für die Expression der Fusionsproteine MBP-Yme1 und MBP-Yme1ΔPD in *E. coli* wurden die entsprechenden Gene in den Expressionsvektor pMAL-cRI (BioLab) kloniert. Die Gene wurden durch PCR mit den folgenden Primern aus genomischer DNA gewonnen:

5'-Primer: 5'-GGG GAA TTC TAT TCT GAA AAG AAT AGC GGT GAA ATG C-3'

für Yme1:

3'-Primer: 5'-CCC AGA TCT AAG CTT TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TGC ATT TAA CAT TGT AGG AAT TTT GG-3'

für Yme1ΔPD:

3'-Primer: 5'-AAA CCC GTC GAC TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CTT TCT CTC AGC ACC CAT C3'

Beide 3'-Primer enthalten sechs Histidin kodierende Tripletts. Die PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Hin*dIII (für *YME1*) bzw. *Sal*I (für *yme1ΔPD*) verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pMAL-cRI kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm XL1-Blue transformiert.

2.1.4.2.7 Klonierung von pRS314-*iap-1**

Für Komplementationsstudien in *S. cerevisiae* wurde das Hybridprotein IAP-1* verwendet, um einen effizienten Import in Mitochondrien zu erreichen. IAP-1* setzt sich aus der Präsequenz und zwei weiteren Aminosäuren von Yme1 (Aminosäuren 1-49) und dem reifen IAP-1 (Aminosäuren 62-738) zusammen. Die beiden Polypeptidabschnitte werden durch die Aminosäuren Alanin und Cystein verbunden. Das entsprechende Genfragment *iap-1** enthält die intronlose Sequenz. In dem Plasmid pRS314-*iap-1** wird das Protein unter der Kontrolle des endogenen *YME1*-Promotors exprimiert.

Die Klonierung des Plasmids pRS314-*iap-1** erfolgte in mehreren Schritten: Zunächst wurde das Intron von *iap-1* entfernt und so eine *iap-1*-cDNA gewonnen. Anschließend wurde dieses Konstrukt, ohne die DNA-Sequenz, die für die Präsequenz kodiert, unter die Kontrolle des endogenen *YME1*-Promotors in den Vektor pRS314 gesetzt, der die DNA-Sequenz der Präsequenz von Yme1 enthielt.

Klonierung von iap-1-*cDNA* (*pGEM4*-iap-1):

Da aus der *N. crassa*-cDNA-Bibliothek (siehe 3.2.1.2) nur ein am 5´-Ende verkürztes DNA-Fragment von *iap-1* identifiziert werden konnte (CK2), wurde die vollständige *iap-1*-cDNA erst durch einen zusätzlichen

Klonierungsschritt gewonnen. Dazu wurde ein das Intron enthaltendes DNA-Fragment von *iap-1* (gDNA) durch eine intronlose Sequenz ersetzt. Das entsprechende DNA-Fragment wurde durch PCR mit den folgenden Primern unter Verwendung des cDNA-Plasmids CK2 als Matrize amplifiziert.

5'-Primer: 5'-TTT GGA TCC GGC TTG AGC AGC ATC AAG-3'

3'-Primer: 5'-TTT AAA AAG CCT TCA CGC GGG CAC AGG CGG CGG-3'

Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Sac*II und *Pst*I verdaut und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pGEM4-*iap-1* (gDNA) gesetzt.

Gewinnung der Promotorregion und DNA-Sequenz der Präsequenz von Yme1:

Durch »Exsite-PCR« wurde ein 6,2 kb Fragment von dem Plasmid pRS314-A6p (Weber *et al*., 1996) amplifiziert, das die komplette Sequenz des Vektors pRS314 (Sikorski und Hieter, 1989), die endogene Promotorregion (bp -764-1) und die für die mitochondriale Präsequenz von Yme1 kodierende DNA-Sequenz (bp1-49) erhielt (pRS314-Pro+Prä). Die PCR wurde mit einer Mischung aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase (2:1) unter Verwendung der folgenden Primer durchgeführt:

5'-Primer: 5'-GGG AAA TTT CAT ATG ACG TAT GAA GGA ACC TAC CTC AAG ACC-3'

3'-Primer. 5'-AAA CTT GGG GCA TGC AGA ATA AAA ACG GTA GAA CTT CTT TGA-3'

Folgendes Programm wurde verwendet:

1)	2 min	94°C
2) 30 Zyklen:	1 min	94°C
	45 sec	62°C
	6 min	68°C
3)	10 min	68°C

Klonierung von iap-1* *in den Vektor pRS314 unter die Kontrolle des endogenen YME1-Promotors:*

Aus dem oben erhaltenem Konstrukt pGEM4-*iap-1* (cDNA) wurde das Gen *iap-1*, ohne die für die mitochondriale Präsequenz kodierende DNA-Sequenz, durch PCR mit den folgenden Primern gewonnen:

5'-Primer: 5'-TTT GGG TTT GCA TGC TTT GGA AAC GGT GGT CTC TCG C-3'

3'-Primer: 5'-AAA TTT AAA CAT ATG TCA CGC GGG CAC AGG CGG CGG CGG-3'

Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Sph*I verdaut und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pRS314-Pro+Prä (siehe oben) kloniert. Das erhaltene Konstrukt pRS314-*iap-1** wurde in den *E. coli* Stamm MH1 transformiert.

2.1.4.2.8 Klonierung von pVTU100-*iap-1**

Für eine stärkere Expression von IAP-1* (siehe 2.1.4.2.7) in *S. cerevisiae* wurde das Protein unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors des *ADH1*-Gens kloniert. Dazu wurde das entsprechende Gen *iap-1** mittels PCR mit den folgenden Primern aus dem Plasmid pRS314-*iap-1**(siehe 2.1.4.2.7) amplifiziert:

5'-Primer: 5'-CCC TTT CTG CAG ATG AAC GTT TCA AAA ATA CTT G-3'

3'-Primer: 5'-CCC AAA GGA TCC GAG GTA GGT TCC TTC ATA CG-3'

Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Bam*HI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pVTU100 gesetzt. Das erhaltene Plasmid wurde in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert.

2.1.4.2.9 Klonierung von pCB1179-*iap-1*

Für die Expression von *iap-1* in *N. crassa* wurde das Gen unter die Kontrolle des Promotors des *qa2*-Gens, der durch Chinasäure induziert wird, in den Vektor pCB1179 kloniert. Dazu wurde das Plasmid pGEM4-*iap-1* (siehe 2.1.4.2.2) mit den Enzymen *Eco*RI und *Bam*HI verdaut. Das resultierende 2.1 kb Fragment wurde in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pCB1179 gesetzt und das erhaltene Plasmid in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert.

2.2 Genetische Methoden

2.2.1 Hefegenetik

2.2.1.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von Hefekulturen erfolgte standardmäßig nach Sambrook *et al*. (1989) entweder auf YP-Vollmedien oder, falls eine Selektion auf Auxotrophiemarker erforderlich war, auf SC-Medien (siehe 2.6.1.2). Für die Isolierung von Mitochondrien wurden die Hefen unter respiratorischen

Bedingungen auf Laktatmedium kultiviert (siehe 2.6.1.2). Als Kohlenstoffquellen dienten entweder 2% (m/v) Glukose, 2% (m/v) Galaktose oder 3% (m/v) Glyzerin, die den jeweiligen Medien zugesetzt wurden. Die Anzucht erfolgte bei 30°C. Eine Ausnahme bildete der thermosensitive Stamm *Δtcm62*, der, wenn nicht anders angegeben, bei 24°C inkubiert wurde. Die Kultivierung in flüssigen Medien erfolgte unter Schütteln (120-160 Upm) in großvolumigen Erlenmeyerkolben.

Um die Atmungsaktivität der Mitochondrien verschiedener Stämme zu untersuchen (*petite*-Phänotyp), wurden Verdünnungsreihen verschiedener Kulturen auf Agarplatten aufgetropft. Die Stämme wurden hierzu zunächst in dem gewünschten Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Flüssigkulturen angezogen. 0.5 OD-Einheiten jeder Kultur wurden isoliert und in 500 µl sterilem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden diese Kulturen 5 mal je 1:10 mit Wasser verdünnt und von jeder Verdünnung je 3 µl auf die Platte getropft. Die Ergebnisse konnten nach 4 Tagen Inkubation bei 30°C oder 37°C oder nach 7 Tagen bei 15°C ausgewertet werden.

2.2.1.2 Transformation von *S. cerevisiae*

2.2.1.2.1 Transformation Lithiumazetat-konditionierter Hefezellen mit rekombinanter DNA

Die Transformation von Hefezellen mit Lithiumazetat wurde nach Gietz *et al*. (1992) durchgeführt. Eine Kultur (50 ml) in YP- oder SC-Medium (siehe 2.6.1.2) mit 2% (m/v) Glukose wurde bis zu einer OD_{578} von 0,5 unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 000 *g;* 5 min; RT) geerntet, mit 25 ml H_2O gewaschen und in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert. Nachdem der Ansatz in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt worden war, wurden die Hefen

durch erneute Zentrifugation in der Tischzentrifuge (15 000 *g*; 30 sec; RT) gesammelt, nochmals in 500 µl 100 mM LiAc resuspendiert, zu 50 µl portioniert und erneut reisoliert. Auf das Zellpellet wurde 250 µl Transformationslösung [50% (m/v) PEG 3350; 36 µl 1 M LiAc; 25 µl einzelsträngige, denaturierte DNA (2 mg/ml) (unmittelbar vor Zugabe 5 min bei 95°C inkubieren, dann schnelle Abkühlung auf 4°C); 1-5 µg des gewünschten Plasmids bzw. PCR-Fragments in 50 µl H_2O] gegeben. Die Hefezellen wurden durch starkes Schütteln resupendiert und 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock von 20 min bei 42°C wurden die Zellen durch eine kurze Zentrifugation gesammelt, in 200 µl H_2O aufgenommen und auf SC-Medium (siehe 2.6.1.2) ausplattiert.

Für die Deletion von *TCM62* durch homologe Rekombination wurden die transformierten Zellen nach dem Hitzeschock zunächst in 200 µl YPD-Medium (siehe 2.6.1.2) 2-3 h bei 24°C inkubiert, um die Expression des Kanamycinresistenzgens zu ermöglichen. Anschließend wurden die Hefen auf YP-Platten, denen 500 µg/ml Geneticin (G418) zugesetzt waren, ausgestrichen.

2.2.1.2.2 Disruption der Gene *TCM62* und *YME1* in *S. cerevisiae*

Die Gendisruption in *S. cerevisiae* erfolgte durch homologe Rekombination nach der Methode von Wach *et al.* (1994). Zunächst wurden Disruptionskassetten durch PCR mit den angegebenen Primerpaaren (siehe Tabelle 2) amplifiziert, die entweder ein Kanamycinresistenzgen (zur Disruption von *TCM62*) bzw. den Histidinauxotrophiemarker *HIS3* (zur Disruption von *YME1*) enthielten. Durch die Primer wurde den Disruptionskassetten während der PCR an ihren 5´ und 3´-Enden kurze DNA-Sequenzen angehängt, die den Regionen unmittelbar vor und nach dem jeweiligen Gen im Genom

entsprachen. Als PCR-Template dienten die Plasmide pFA6a-*KanMX4* bzw. pFA6a-*HIS3MX6* (Wach *et al*., 1994).

Rekombinationskassette	**Primer**
Tcm62-KAN1	5'-Primer: 5'-CAC ACT ACT GTA AAC ATA AAA CTC TCT TAT GCT TTA ACG AGT ATG CGT ACG CTG CAG GTC GAC-3' 3'-Primer: 5'-TTA CAA TGA CTC ATT CTG ACT ATT TAA AAG TAT GTA AGG GCT TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G-3'
Yme1-HIS3	5'-Primer: 5'-ATG AAC GTT TCA AAA ATA CTT GTG TCG CCC ACG GTC ACG ACA AAT CGT ACG CTG CAG GTC GAC-3' 3'-Primer: 5'-TGC ATT TAA CAT TGT AGG AAT TTT GGG TTT ATC ATC GCC TAT ATA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G-3'

Tabelle 2: Verwendete DNA-Primer zur Gewinnung der Rekombinationskassetten zur Disruption der Gene *TCM62* und *YME1* in *S. cerevisiae*

Die PCR-Fragmente wurden anschließend in Hefezellen des Wildtypstammes W303-1A transformiert (siehe 2.2.1.4). Aufgrund der flankierenden Regionen wurden die Disruptionskassetten durch homologe Rekombination stabil in den genomischen Ziel-Lokus integriert, was zur vollständigen Deletion der Gene *TCM62* bzw. *YME1* führte. Die Selektion der Transformanden erfolgte auf YPD-G418- bzw. SC-Medium, ohne Histidin (siehe 2.6.1.2). Positive Klone wurden zusätzlich durch PCR überprüft.

2.2.1.3 Kreuzen und Sporulation von Hefezellen

Zum Kreuzen zweier Stämme mit unterschiedlichen Paarungstyp wurden diese frisch auf Agarplatten angezogen. Zellen beider Stämme wurden anschließend auf einer YPD-Platte (siehe 2.6.1.2) mit der Impföse

gemischt und 4-8 h bei 30°C inkubiert. Durch Ausstreichen auf SC-Platten (siehe 2.6.1.2) konnte über je einen Auxotrophiemarker der beiden Stämme auf diploide Hefezellen selektioniert werden. Nach einem Reinigungsausstrich auf einer entsprechenden SC-Platte wurden die diploiden Zellen auf nährstoffarmen Platten [1% (m/v) KAc; 2% (m/v) Agar] zur Sporulation angeregt. Die Platten wurden eine Woche bei 30°C inkubiert und die Sporen der einzelnen Tetraden anschließend mit einem Mikromanipulator getrennt. Die Sporen wurden zunächst auf YPD-Platten angezogen. Die gewünschten haploiden Stämme wurden nachfolgend mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Auxotrophiemarker auf SC-Medium isoliert.

2.2.1.4 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Alle in dieser Arbeit konstruierten und verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* sind von dem haploiden Wildtypstamm W303-1A (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen) abgeleitet (Tabelle 3). Die Disruption der Gene *TCM62* bzw. *YME1* erfolgte wie unter Kapitel 2.2.1.2.2 beschrieben. Zur Herstellung der Stämme *yme1ΔN*, *Δyme1-iap-1**, *Δyme1-ADH1-iap-1** wurden die entsprechenden Plasmide in den angegebenen Disruptionsstamm transformiert. Die Gewinnung dieser Plasmide ist im Kapitel 2.1.4.2 beschrieben.

Stamm	**Genotyp**	**Referenz**
W303-1A	*MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100*	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
W303-1B	*MATα ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100*	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
Δtcm62	*MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 tcm62::KAN1*	Klanner *et al*., 2000 diese Arbeit
Δyme1-ADE2	*MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 yme1::ADE2*	A. Tzagoloff
Δyme1-HIS3	*MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3*	diese Arbeit
yme1ΔN	*MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 yme1::ADE2* pRS314-*yme1ΔN*	diese Arbeit
*Δyme1-iap-1**	*MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3* pRS314-*iap-1**	diese Arbeit
*Δyme1-ADH1-iap-1**	*MATa ade2-1 his3-11,15 leu2,112 trp1 ura3-52 can1-100 yme1::HIS3* pVTU100-*iap-1**	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete Hefestämme

2.2.2 *N. crassa* Genetik

2.2.2.1 Kultivierung von *N. crassa*

Die Kultivierung von *N. crassa* erfolgte im Wesentlichen nach Davis und de Serres (1970).

2.2.2.1.1 Gewinnung der Konidien

Die Anzucht der Konidien erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben auf Vollmedium (siehe 2.6.1.3) mit 2% (m/v) Agar, so daß ein Wachstum des Myzels nach oben ermöglicht wurde. Zunächst wurde mit einigen silikatgetrockneten Hyphen (siehe 2.2.2.1.3) das Medium angeimpft und 3-7 Tage bei 30°C im Dunklen inkubiert. Um die Ausbildung der Konidien anzuregen, wurden die Kulturen anschließend für weitere 3-5 Tage bei Raumtemperatur und Tageslicht kultiviert. Das Ernten der Konidien erfolgte durch Abschwemmen mit 50 ml sterilem Wasser. Um abgelöste Hyphen von den Konidien abzutrennen, wurde die Suspension durch sterile Watte filtriert. Die Konzentration der Konidien wurde durch Auszählen unter einem Lichtmikroskop bestimmt.

2.2.2.1.2 Anzucht der Hyphen

Die Kultivierung von *N. crassa* erfolgte standardmäßig für 15 h bei 25°C in MIN-Medium (siehe 2.6.1.3), das mit $2x10^9$ Konidien/1 l Kultur angeimpft wurde. Um ein ausreichendes Wachstum zu garantieren, wurde sterile Luft in die Kulturen geblasen und diese beleuchtet (Davis und de Serres, 1970). Zur Induktion des *qa2*-Promotors wurden 0,1% (m/v) Chinasäure, pH 6,8 zugesetzt und gleichzeitig der Glukoseanteil auf 0,5% (m/v) reduziert.

Die Bestimmung des Wachstumsphänotyps wurde in sogenannten »Racingtubes« durchgeführt. Dazu wurde das entsprechende Medium [Glyzerinmedium, Azetatmedium oder MIN-Medium (siehe 2.6.1.3) mit 2% (m/v) Agar] in die liegenden Tubes gegossen, so daß diese etwa bis zur Hälfte gefüllt waren. $2x10^6$ Konidien wurden an einem Ende angeimpft und die Kulturen für mehrere Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Das Wachstum wurde durch Ausmessen der gewachsenen Strecke ermittelt.

2.2.2.1.3 Konservierung der Hyphen durch Silikattrocknung

Die aus einem Anzuchtkolben gewonnenen Konidien (siehe 2.2.2.1.1) wurden mit 10 ml steriler Milch [10% (m/v) Milchpulver in Wasser; autoklaviert] geerntet und durch sterile Watte filtriert. Anschließend wurden 3 mal je 1 ml dieser Suspension mit etwa 1 g sterilem Kieselgel vermischt und 2-3 Wochen in einem Exsikkator getrocknet. Die Kulturen wurden bei 4°C (für ein Jahr) oder bei -80°C (für mehrere Jahre) gelagert.

2.2.2.2 Transformation von *N. crassa*

2.2.2.2.1 Gewinnung transformationskompetenter Sphäroplasten

Zur Transformation der *N. crassa* Stämme wurden zunächst Sphäroplasten hergestellt. Dazu wurden $2x10^9$ Konidien (siehe 2.2.2.1.1) in MIN-Medium (siehe 2.6.1.3) bei 30°C solange inkubiert, bis etwa 90% aller Konidien ausgekeimt waren (~4-6 h). Das Auskeimen der Konidien konnte unter einem Lichtmikroskop beobachtet werden. Anschließend wurden die Konidien geerntet (480 *g;* 10 min), mit Wasser gewaschen und

in 10 ml 1 M Sorbitol resuspendiert. Zur Herstellung der Sphäroplasten wurde die Zellwand mit Novozym 234 (3 mg/ml) 30-60 min bei 30°C verdaut. Das Enzym wurde anschließend zweimal mit 1 M Sorbitol und STC-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM $CaCl_2$; 1 M Sorbitol) ausgewaschen und das Pellet in 15 ml STC, 4 ml PTC [50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM $CaCl_2$; 40% (m/v) PEG] und 200 µl DMSO resuspendiert. Die Sphäroplastensuspension wurde aliquotiert, langsam bei -20°C eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.2.2 Transformation der Sphäroplasten

Die Transformation der *N. crassa* Stämme wurden nach der Methode von Staben *et al*. (1989) und Vollmer und Yanofsky (1986) durchgeführt. Dazu wurden 100 µl Sphäroplastensuspension mit einer Mischung aus 5 µl DNA (entspricht etwa 1-5 µg), 2 µl Spermidin/HCl (50 mM) und 5 µl Heparin (5 mg/ml in STC) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde mit 1 ml PTC-Puffer (siehe 2.6.2) heftig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur belassen. Dieser Transformationsansatz wurde in Top-Agar [1x Vogel (siehe 2.6.1.3), 18% (m/v) Sorbitol, 3% (m/v) Agar] aufgenommen und auf FIGS-Agar-Platten [2% (m/v) Sorbose, 0,05% (m/v) Fruktose, 0,05% (m/v) Glukose, 2% (m/v) Agar] mit 200 µg/ml Hygromycin zur Selektion ausgegossen. Die Platten wurden 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.2.2.3 Gewinnung von Mikrokonidien zur Herstellung homokaryontischer Stämme

Nach einer Transformation enthalten Hyphen von *N. crassa* wegen ihrer Mehrkernigkeit neben transformierten auch nicht transformierte Kerne.

Durch Wachstum dieser heterokaryontischer Stämme auf einem iodoazetathaltigen Medium wurden die Hyphen zur Ausbildung einkerniger Mikrokonidien angeregt, aus denen dann homokaryontische Stämme angezogen werden konnten (Ebbole und Sachs, 1990). Die Ausbildung der Mikrokonidien erfolgte für 7-10 Tage bei 25°C auf Mikrokonidien-Medium (siehe 2.6.1.3) bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von jeweils 12 h. Das Ernten erfolgte durch Abschwemmen mit sterilem Wasser. Zur Abtrennung der Makrokonidien wurde durch ein steriles Duraporfilter (Porengröße: 5 µm) filtriert und anschließend die Konzentration der Mikrokonidien im Durchlauf durch Auszählen unter einem Lichtmikroskop bestimmt. Zur Gewinnung homokaryontischer Stämme wurden etwa 2 000 Mikrokonidien 2-3 Tage bei 30°C auf einer Sorbose^{Hyg}-Platte (siehe 2.6.1.3) inkubiert.

2.2.2.3 Gendisruption in *N. crassa* durch »*r*epeat-*i*nduced *p*oint mutation« (RIP)

Eine typische Eigenschaft des Genoms von *N. crassa* ist die Erkennung und Veränderung duplizierter DNA-Sequenzen während des sexuellen Vermehrungszykluses. Durch den Mechanismus der »repeat-induced point mutation« (Cambareri *et al*., 1989; Selker, 1990) kommt es spontan zum Austausch von GC zu AT Paaren in beiden vorliegenden Kopien des entsprechenden Gens, was in der Regel zu Kettenabbrüchen des Translationsprodukts führt. Dieser Mechanismus kann zur Inaktivierung spezifischer Gene genutzt werden. Hierzu wird zunächst ein Plasmid, das das gewünschte Gen enthält, in Wildtypzellen transformiert (siehe 2.2.2.2), mit einem zweitem Wildtypstamm des komplementären Paarungstyps gekreuzt (siehe 2.2.2.4) und die entstandenen Ascosporen isoliert. Durch Western-Blot Analyse und Sequenzierung des entsprechenden DNA-Abschnitts wird die Disruption des Gens überprüft.

2.2.2.4 Kreuzung und Sporulation von *N. crassa* Zellen

Zur Kreuzung zweier *N. crassa* Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp wurde zunächst ein Elternstamm auf stickstoffarmem MM-X-Medium (siehe 2.6.1.3) für 5-10 Tage bei 24°C im Dunklen kultiviert, um den sexuellen Vermehrungszyklus zu induzieren. Die ausgebildeten Protoperithezien wurden mit 1 ml Konidiensuspension des reziproken Elternstammes befruchtet und weiter 10 Tage bei 24°C im Dunklen belassen. Eine Inkubation an Licht (1-72 h) stimulierte dann das Auskeimen der Ascosporen, die zunächst auf Hartagarplatten [4% (m/v) Agar] ausgestrichen wurden. Einzelne Sporen wurden auf MIN-Medium überimpft, für 1 h bei 60°C aktiviert und zum Auskeimen und weiteren Mycelwachstum 3 Tage bei 29°C inkubiert.

2.2.2.5 Verwendete Stämme von *N. crassa*

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und Klonierungen wurde der Wildtypstamm *St. Lawrence 74A K93-12A* verwendet. Die Herstellung des Stammes *iap-1*^{RIP} erfolgte durch »repeat induced point mutation« nach Transformation (siehe 2.2.2.2) des Plasmids pCB1179-*iap-1* (siehe 2.1.4.2.9) und anschließender Kreuzung und Sporulation (siehe 2.2.2.4) mit dem komplementären Wildtypstamm *St. Lawrence 74A K93-5α.* Durch Transformation von pCB1179-*iap-1* in den Stamm *iap-1*^{RIP} wurde der Stamm *iap-1*^{RIP}*-iap-1* erhalten.

Stamm	**Genotyp**	**Referenz**
St. Lawrence 74A K93-12A	Wildtyp	Fungal Genetic Stock Center, Kansas City, KS, USA
St. Lawrence 74A K93-5α	isogener Wildtyp	Fungal Genetic Stock Center, Kansas City, KS, USA
iap-1^{RIP}	*iap-1$^{E95H;H150T;P236SE250STOP}$*	dieser Arbeit
iap-1^{RIP}-iap-1	*iap-1$^{E95H;H150T;P236SE250STOP}$-iap-1*	diese Arbeit

Tabelle 4: Verwendete Stämme von *N. crassa*

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des »BioRad-Proteinassays« (Bradford, 1976). Hierzu wurde jeweils eine geeignete Verdünnung der Proteinlösung mit 1 ml einer 1:5 Verdünnung des Farbstoffkonzentrats gemischt und für mindestens 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter BSA-Konzentration (0-12 µg).

2.3.2 Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine wurden aus wäßriger Lösung durch Zugabe von 72% (m/v) TCA (Endkonzentration 12,5%) gefällt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde

10 min bei 30 000 *g* abzentrifugiert und zweimal mit -20°C kaltem Aceton gewaschen. Die gefällten Proteine wurden für 10 min bei 56°C getrocknet und in SDS-Probenpuffer (siehe 2.6.2) resuspendiert.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Folgende Lösungen wurden verwendet:

Sammelgel: 5% (w/v) Acrylamid
0,033-0,099% (w/v) Bisacrylamid
0,1% (w/v) SDS
60 mM Tris/HCl, pH 6,8
0,05% (w/v) APS
0,1% (v/v) TEMED

Trenngel: 12-16% (w/v) Acrylamid
0,075-0,1% (w/v) Bisacrylamid
0,1% (w/v) SDS
385 mM Tris/HCl, pH 8,8
0,05% (w/v) APS
0,035% (v/v) TEMED

Bodengel: 20% (w/v) Acrylamid
0,135-0,4 % (w/v) Bisacrylamid
0,1% (w/v) SDS
375 mM Tris/HCl, pH 8,8
0,05% (w/v) APS
0,25% (v/v) TEMED

Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (siehe 2.6.2) gelöst und vor dem Auftrag für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei konstanten 30 mA. Der Laufpuffer enthielt 10 g/l SDS, 144 g/l Glycin und 30 g/l Tris. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine entweder auf Nitrozellulose übertragen (siehe 2.3.5)

oder mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 angefärbt (siehe 2.3.4).

2.3.4 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Nach der SDS-PAGE (siehe 2.3.3) wurden Sammelgel und Bodengel vom Trenngel entfernt. Das Trenngel wurde in 30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% (m/v) Coomassie-Brillant-Blau R-250 bei Raumtemperatur 10 bis 30 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit 30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure entfärbt und über Nacht zwischen zwei Geltrocknungsfolien (Promega) getrocknet.

2.3.5 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot)

Durch SDS-PAGE (siehe 2.3.3) aufgetrennte Proteine wurden nach der von Towbin *et al*. (1979) und Kyshe-Anderson (1984) beschriebenen Methode elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dabei wurden die Membran und das Gel zwischen mehrere mit Blotpuffer [0,02% (m/v) SDS, 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol] getränkte Whatman-3MM-Filterpapiere gelegt und so zwischen zwei Graphitelektroden angeordnet, daß die Membran relativ zur Anode vor dem Gel zu liegen kam. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 1 mA/cm^2, wobei die Proteine aus dem Gel wanderten und auf der Membran zurückgehalten wurden. Anschließend wurden die Proteine auf der Nitrozellulose mit Ponceau S [0,2% (m/v) Ponceau S in 3% (m/v) TCA] angefärbt.

2.3.6 Quantifizierung von Proteinbanden durch Autoradiographie und Phosphorimaging

Nitrozellulose-Membranen mit radioaktiv markierten Proteinen wurden auf einem Röntgenfilm exponiert (Autoradiographie). Die auf den Röntgenfilmen sichtbaren Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Amersham) eingelesen und ihre Intensität gemessen (Densitometrie). Alternativ wurden die Nitrozellulose-Membranen nach dem Transfer der Proteine direkt auf Phosphorimaging-Platten exponiert und die Intensität der radioaktiv markierten Proteinbanden durch einen Phosphorimager der Firma Fuji bestimmt.

2.3.7 Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine *in vitro*

Die Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine erfolgte wie bei Pelham und Jackson (1976) beschrieben. Zunächst wurde das gewünschte Gen mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase in mRNA transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von [^{35}S]-Methionin translatiert. Die Gene befanden sich unter Kontrolle des SP6-Promotors auf einem Plasmid der pGEM-Reihe (siehe 2.1.4.1).

2.3.7.1 Transkription

Ein Transkriptionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 60 µl Prämix (40 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 6 mM $MgAc_2$; 2 mM Spermidin, 100 µg/ml BSA, 10 mM DTT, 100 µM GTP, je 500 µM ATP, CTP, UTP), 250 µM $m^7G(5´)ppp(5´)G$, 10-20 µg Plasmid-DNA, 200 U RNasin, 40 U SP6-Polymerase und H_2O zu einem Gesamtvolumen von 200 µl. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden 20 µl 10 M Lithiumchlorid und

600 µl 96% (v/v) Ethanol (-20°C) zugegeben, 30 min bei -70°C inkubiert und die RNA pelletiert (33 000 *g;* 15 min; 4°C). Nach Waschen mit 70% (v/v) Ethanol wurde die RNA bei 30°C für 5 min getrocknet und in 50 µl H_2O mit 25 U RNasin resuspendiert.

2.3.7.2 Translation im Retikulozytenlysat

Die Translation von Vorstufenproteinen *in vitro* erfolgte nach der Methode von Söllner *et al*. (1991). Dazu wurden 70 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 2 µl RNasin (40 U/µl), 2 µl Aminosäuregemisch (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 8 µl ^{35}[S]-Methionin (10 mCi/ml) und 16 µl mRNA (siehe 2.3.7.1) gemischt. Der Ansatz wurde 60 min bei 30°C inkubiert. Durch Zentrifugation des Translationsansatzes (100 000 *g;* 30 min; 4°C) wurden an Ribosomen gebundene unvollständig translatierte Polypeptidketten entfernt. Anschließend wurden 2,5 µl 0,2 M Methionin und 20 µl 1,5 M Saccharose zugegeben. Der Translationsansatz wurde portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.8 Gelfiltrationschromatographie

Eine Abschätzung des nativen Molekulargewichts von Proteinkomplexen erfolgte durch Gelfiltration. Dazu wurden isolierte Mitochondrien (0,6-2 mg) in einem geeigneten Lysepuffer (siehe entsprechende Figurenlegenden) 15 min unter heftigem Schütteln bei 4°C solubilisiert. Das Aufbrechen der Membranen von *E. coli* Zellen (10 OD-Einheit) erfolgte durch Beschallen in einem Ultraschallgerät (Branson) (Stufe: 3; duty cycle: 40%; 4°C; je 3x 10 sec). In beiden Fällen wurde nicht lysiertes und aggregiertes Material durch Zentrifugation (90 000 *g;* 15 min; 4°C)

abgetrennt und der Überstand auf eine mit Laufpuffer (siehe entsprechende Figurenlegenden) äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Superose 6; Amersham) geladen (Flußrate 0,3 ml/min). Die eluierten Proteine wurden in 500 µl Fraktionen gesammelt, durch TCA-Fällung (siehe 2.3.2) konzentriert und mittels SDS-PAGE (siehe 2.3.3) und Western-Blot (siehe 2.5.2) analysiert. Zur Abschätzung der molekularen Masse von Proteinkomplexen wurde das Elutionsvolumen folgender Proteine bestimmt: Hsp60 (840 kDa); Thyreoglobulin (669 kDa); Apoferritin, (443 kDa); Alkoholdehydrogenase (150 kDa); BSA (66 kDa); Carboanhydrase (29 kDa).

2.3.9 Expression und Reinigung von Yme1 und Yme1ΔPD als MBP-Fusionsproteine

Yme1 und Yme1ΔPD wurden mit Hilfe eines an den N-Terminus fusionierten Maltose-Bindungs-Proteins, das spezifische an eine Amylosematrix binden kann, gereinigt. Zusätzlich enthielten die Proteine eine C-terminale Hexahistidinsequenz, so daß in einem zweiten Schritt mit Hilfe einer Ni-NTA-Agarose-Säule am C-Terminus verkürzte Yme1-Abbauprodukte, die während der Expression der Proteine gebildet wurden, abgetrennt werden konnten (siehe 3.3.1.1).

Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in dem *E. coli* Stamm XL1-Blue (siehe 2.1.4.1) mit Hilfe der Plasmide pMAL-cRI-*YME1* bzw. pMAL-cRI-*yme1ΔPD* (siehe 2.1.4.2.6). Die transformierten Stämme wurden in LB^{Amp}-Medium (siehe 2.6.1.1) bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Phase (OD_{578} ~1) kultiviert. Die Induktion der Gene erfolgte durch Zugabe von 2 mM IPTG für 1 h bei der gleichen Temperatur. Durch Zentrifugation (4 500 *g*; 10 min; 4°C) wurden die Zellen geerntet und das erhaltene Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Zellmenge, die 2 000 OD-Einheiten entsprach, wurde in 100 ml Lysepuffer [30 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 150 mM KAc;

10% (m/v) Glyzerin; 10 mM β-Mercaptoethanol; 1 mM PMSF] resuspendiert und unter Kühlung 10 mal mit je 10 Stößen in einem Ultraschallgerät (Branson) beschallt (Stufe: 5; duty cycle: 80%), um die Zellen aufzuschließen. Unlösliche Membranbruchstücke wurden durch Zentrifugation (30 000 *g*; 20 min; 4°C) abgetrennt und der Überstand auf eine Amylose-Agarose-Säule (Gelbett 5 ml; Flußgeschwindigkeit 12 cm/h) geladen. Ungebundenes Material wurde durch Waschen mit 50 Säulenvolumen Lysepuffer entfernt (Flußgeschwindigkeit 30 cm/h). Gebundene Proteine wurden mit 25 ml Lysepuffer, dem 10 mM Maltose zugesetzt waren, eluiert. Das Eluat wurde in 2,5 ml Fraktionen gesammelt und die proteinenthaltenden Fraktionen mit Hilfe des Bradford-Assays (siehe 2.3.1) bestimmt und vereinigt.

Zur weiteren Aufreinigung wurde dieses Eluat mit 10 mM Imidazol versetzt und auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule geladen (Fluß-geschwindigkeit 15 cm/h). Die Säule wurde mit 50 Säulenvolumen Waschpuffer (Lysepuffer mit 10 mM Imidazol) gewaschen (Flußgeschwindigkeit 114 cm/h) und gebundenes Protein mit 400 mM Imidazol in Lysepuffer eluiert. Das gereinigte Protein wurde gegen 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 50 mM KAc, 10% (m/v) Glyzerin dialysiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Reinheit der Präparation wurde mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung überprüft. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch (siehe 2.3.6).

2.3.10 Messung der ATPase-Aktivität

ATPase-Aktivitäten wurde nach der Methode von Lanzetta *et al*. (1979) bestimmt. Für die Messungen wurde das folgende Farbreagenz hergestellt: 340 mg Malachitgrün wurden in 75 ml H_2O gelöst und mit einer Ammoniummolybdatlösung [10,5 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ in 250 ml 4 M HCl] gemischt. Der Ansatz wurde mit H_2O auf 1 l aufgefüllt, über Nacht bei 4°C

inkubiert und anschließend ausgefallene Salze durch Filtration entfernt. Direkt vor Gebrauch wurden der Lösung 0,1% (v/v) Triton X-100 zugesetzt.

Zur Messung der ATPase-Aktivität wurden standardmäßig 2,4 µM Enzym (berechnet als Monomer) in ATPase-Puffer [30 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 50 mM KAc; 4 mM $MgAc_2$; 10% (m/v) Glyzerin] mit 2 mM ATP versetzt und für die angegebenen Zeiten bei 30°C inkubiert. Je 50 µl dieses Ansatzes wurden anschließend mit 800 µl Farbreagenz vermischt. Die Ausbildung des Phosphormolybdatkomplexes wurde nach 1,5 min durch Zugabe von 100 µl 34% (m/v) Zitronensäure gestoppt. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Konzentration des freien Phosphates durch Absorptionsmessung bei 640 nm bestimmt. Eine Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von Proben bekannter Phosphatkonzentration (KH_2PO_4: 0-15 µM).

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellbiologische Methoden bei *S. cerevisiae*

2.4.1.1 Zellaufschluß durch alkalische Lyse (»Rödel-Aufschluß«)

Die Extraktion von Gesamtzellprotein aus Hefe für Western-Blot Analysen erfolgte durch alkalische Lyse und wurde wie bei Yaffe und Schatz (1984) beschrieben, durchgeführt. 0,5 OD-Einheiten einer logarithmisch wachsenden Kultur (OD_{578} ~1) wurden durch Zentrifugation (15 000 *g*; 30 sec; RT) geerntet, mit TE-Puffer (siehe 2.6.2) gewaschen und in 500 µl H_2O resuspendiert. Nach Zugabe von 75 µl 1,85 M NaOH, 7,5% (v/v) β–Mercaptoethanol, 10 mM PMSF und 10% (v/v) Ethanol wurde die

Probe gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 575 µl 50% (m/v) TCA gefällt (-20°C), zweimal mit 500 µl Aceton (-20°C) gewaschen, 10 min bei 56°C getrocknet, in 30 µl SDS-Probenpuffer (siehe 2.6.2) resuspendiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.4.1.2 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

2.4.1.2.1 »Schnellpräparation« von Mitochondrien oder Membranen von *S. cerevisiae*

Die schnelle Präparation kleiner Mengen an Mitochondrien oder Membranen für Western-Blot Analysen erfolgte durch Aufschluß der Zellen mit Glasperlen. Dazu wurden zunächst Hefezellen von einer auf YP- oder SC-Agarose-Platte (siehe 2.6.1.2) wachsenden Kultur abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in sterilem Wasser resuspendiert. Zur Isolation ganzer Mitochondrien wurde ein Volumen dieser Hefesuspension, das einer OD Einheit von 1 entsprach, reisoliert und in 200 µl SEMP-Puffer (siehe 2.6.2) aufgenommen; zur Extraktion von Membranen wurde die gleiche Zellmenge in dem hypotonischen Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM EDTA; 5 mM PMSF) resuspendiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen (200 µl) Glasperlen (Durchmesser 0,3 mm) zugegeben und dreimal je 30 sec mit einem Vortex-Mixer gemischt. Zwischen den Intervallen wurden die Proben zur Abkühlung jeweils 30 sec auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugation der Glasperlen (370 *g;* 10 min; 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Mitochondrien oder Membranen 10 min bei 16 000 *g*, 4°C isoliert und in 25 µl SDS-Probenpuffer gelöst. Bei der Präparation von Membranen mußte ein Erwärmen der Proben auf über 40°C vermieden werden, da dies zu einer starken Aggregation der isolierten Membranproteine führte.

2.4.1.2.2 Präparation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte nach Herrmann *et al*. (1994) und Zinser und Daum (1995). Die Zellen wurden auf Laktatmedium (siehe 2.6.1.2) bis zu einer OD_{578} von 0,8-1,5 kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (3 000 *g*; 5 min; RT). Nach Waschen mit H_2O wurde das Zellpellet gewogen und in 100 mM Tris, 10 mM DTT (2 ml/g Zellen) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 30°C (der thermosensitive Stamm Δ*tcm62* bei 24°C) unter leichtem Schütteln inkubiert, abermals zentrifugiert und mit 40-100 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen.

Zur Herstellung von Sphäroplasten wurden die Zellen in 20 mM Kaliumphosphatpuffer$_{, pH}$ 7,4, 1,2 M Sorbitol, (6,67 ml/g Zellen) mit Zymolyase (5 mg/g Zellen) resuspendiert und 30-45 min bei 30°C (der thermosensitive Stamm Δ*tcm62* bei 24°C) unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Effizienz der Zymolyasebehandlung wurde überprüft, indem 50 µl Zellsuspension in 2 ml H_2O gegeben und kurz geschüttelt wurden. Die Zymolyasebehandlung war ausreichend, wenn die Suspension nach einigen Sekunden klar wurde.

Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Geräten. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (2 500 *g*; 5 min; 4°C) gesammelt, in Homogenisierungspuffer [10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,2% (m/v) fettsäurefreies BSA] resuspendiert (6,67 ml/g Zellen) und mit einem Dounce-Homogenisator geöffnet (12 Stöße). Anschließend wurde die Suspension zweimal zentrifugiert (3 000 *g*; 5 min; 4°C), um die Mitochondrien von Zellresten zu trennen. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die darin enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (12 000 *g*; 12 min; 2°C) gesammelt und in 10 ml SEM-Puffer (siehe 2.6.2) resuspendiert. Anschließend wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (3 000 *g*; 5 min; 2°C), um noch vorhandene Zellbestandteile

abzutrennen. Nach erneuter Zentrifugation des Überstandes (12 000 *g*; 12 min; 2°C) wurden die Mitochondrien in 0,5-1 ml SEM-Puffer resuspendiert und die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt. Die Mitochondriensuspension wurde in 25-100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.1.2.3 Subfraktionierung von Hefezellen

Zur Lokalisierung von Tcm62 wurden Zellen von *S. cerevisiae* in eine mitochondriale und postmitochondriale Fraktion geteilt. Dazu wurden zunächst nach der Methode von Caplan und Douglas (1991) Hefezellen in Sphäroplasten umgewandelt (siehe 2.4.1.2.2) und mittels eines Douncer-Homogenisators aufgebrochen. Durch Zentrifugation (10 000 *g*; 10 min; 4°C) wurden Membranbruchstücke und Mitochondrien vom post-mitochondrialen Überstand abgetrennt. Zur vollständigen Abtrennung wurde die Mitochondrienfraktion erneut in Homogenisierungspuffer (siehe 2.4.1.2.2) resuspendiert, homogenisiert und zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und durch Zentrifugation ein weiteres mal gereinigt. Die Proteinkonzentration dieses postmitochondrialen Überstandes betrug ~2-5 mg/ml.

Um Membranbruchstücke, Zytosol und andere Mikrosomen vollständig von den Mitochondrien abzutrennen wurde die mitochondriale Fraktion durch eine Zentrifugation im Saccharosegradienten (20%; 30%; 40%; 50%; 60% (m/v) Saccharose in 10 mM MOPS/KOH, pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF; 240 000 *g*; 15 min; 4°C) gereinigt. Mitochondrien akkumulieren zwischen der 40%igen und 50%igen Saccharose-Phase. Sie wurden gesammelt, durch Zentrifugation konzentriert (12 000 *g*; 10 min; 4°C), mit SEM-Puffer (siehe 2.6.2) gewaschen und anschließend im gleichen Puffer resuspendiert (Konzentration ~10 mg/ml).

2.4.1.3 Gewinnung von Mitoplasten durch hypotones Schwellen

Unter hypotonen Bedingungen wird die Außenmembran der Mitochondrien selektiv geöffnet, während die Innenmembran intakt bleibt. Werden Mitochondrien in Anwesenheit von Proteinase K (PK) unter hypotonen Bedingungen geschwollen, so werden alle sich im Intermembranraum befindenden Proteine oder Proteindomänen proteolytisch abgebaut, während in der Matrix lokalisierte Proteine oder Proteindomänen vor dem proteolytischem Abbau geschützt sind. Mitochondrien (50 µg) wurden in 1 ml 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4 und 50 mM KAc resuspendiert, mit 30 µg/ml PK (40 U/ml) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Protease wurde durch Zugabe von 1,5 mM PMSF inhibiert. Anschließend wurden die Mitoplasten durch Zentrifugation isoliert (18 000 *g*; 10 min; 4°C), gewaschen und in SDS-Probenpuffer (siehe 2.6.2) lysiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die Effizienz der Schwellung wurde durch Immundekoration des Blots mit Antiseren gegen die mitochondrialen Proteine Mdj1, Mge1, Tim44, Yta10 (Matrixproteine) und Cythochrom-c-Peroxidase (CCPO) (Intermembranraumprotein) geprüft.

2.4.1.4 Translation mitochondrial kodierter Proteine *in vivo*

Zur Analyse der mitochondrialen Proteinsynthese unter Hitzestreß wurden Zellen des Wildtyp- oder *Δtcm62*-Stammes zunächst bei 30°C in SC-Glukose-Medium ohne Methionin (siehe 2.6.1.2) bis zur stationären Phase kultiviert, in SC-Glyzerin-Medium ohne Methionin verdünnt (OD_{578} ~0,15) und über Nacht bei 24°C geschüttelt. Im Anschluß wurden die Kulturen erneut verdünnt (OD_{578} ~0,5; SC-Glyzerin-Medium ohne Methionin) und eine weitere Stunde bei 24°C inkubiert, um alle Zellen in eine aktive Wachstumsphase zu überführen. Diese Kulturen wurden im

Folgenden 2 h bei 24°C, 30°C oder 37°C geschüttelt und anschließend die verbleibende mitochondriale Proteinsynthese durch radioaktive Markierung der mitochondrialen Translationsprodukte untersucht. 500 µl Kultur wurden mit 150 µg/ml Cycloheximid versetzt und 1 min inkubiert, um die zytosolische Proteinsynthese zu inaktivieren. Danach wurden 80 µCi/ml ^{35}[S]-Methionin zugegeben und 15 min bei 24°C, 30°C bzw. 37°C geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µg/ml Chloramphenicol und 4 mM nichtradioaktivem Methionin gestoppt (10 min; 24°C, 30°C bzw. 37°C). Um das Gesamtzellprotein zu isolieren, wurden 100 µl Lysepuffer [1,85 M NaOH; 7,5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 10 mM PMSF; 20 mM Methionin; 10% (v/v) Ethanol] zugesetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteine durch Zugabe von 440 µl 72% (m/v) TCA gefällt (siehe 2.3.2). Die Proben wurden zentrifugiert (30 000 *g*; 10 min; 4°C), zweimal mit Aceton gewaschen und 45 min bei 4°C in 30 µl LiDS-Puffer (siehe 2.6.2) gelöst. Um eine Aggregation der sehr hydrophoben mitochondrialen Translationsprodukte zu verhindern, wurden die Proben vor der SDS-PAGE nicht bei 95°C inkubiert.

2.4.1.5 Translation mitochondrial kodierter Proteine in isolierten Mitochondrien von *S. cerevisiae* (»*in organello* Translation«)

Die Translation mitochondrial kodierter Proteine in isolierten Mitochondrien von *S. cerevisiae* (*in organello* Translation) erfolgte wie bei Pajic *et al*. (1994) und Langer *et al*. (1995) beschrieben. Dazu wurden typischerweise 60 µg Mitochondrien in 50 µl Translationspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,2; 15 mM KH_2PO_4, pH 7,2; 150 mM KCl; 12,5 mM $MgSO_4$; 0,6 M Sorbitol; 0,3 mg/ml fettsäurefreies BSA; 0,012 mg/ml aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin; 4 mM ATP; 0,5 mM GTP; 5 mM α-Ketoglutarat; 5 mM Phosphoenolpyruvat; 24 µg/ml

Pyruvatkinase) resuspendiert. Nach einer Vorinkubation von 2 min bei 24°C wurden 100-300 µCi/ml ^{35}[S]-Methionin zugegeben und die Proben 30 min bei 24°C inkubiert. Durch Zugabe von 20 mM Methionin wurde die Translation radioaktiv markierter Proteine gestoppt.

Zur Untersuchung der Löslichkeit neu synthetisierter Translationsprodukte unter Hitzestreß wurden die Proben anschließend 30 min bei 24°C (Kontrolle) bzw. bei 37°C inkubiert und in Lysepuffer [0,1% (v/v) Triton X-100; 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 10 mM PMSF; 10 min; 4°C] lysiert. Durch Zentrifugation (30 000 *g;* 10 min; 4°C) wurden die löslichen Proteine von den Aggregaten getrennt. Der Überstand wurde mit 5% (m/v) TCA (siehe 2.3.2) gefällt. Alle Proben wurden anschließend in SDS-Puffer (siehe 2.6.2) gelöst und durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.4.2 Zellbiologische Methoden bei *N. crassa*

2.4.2.1 Schnellpräparation von Membranen

Die Extraktion von Membranen von *N. crassa* Hyphen erfolgte durch einen Gefrieraufschluß ähnlich der Isolierung genomischer DNA (siehe 2.1.1.3). 30 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden mit Hilfe einer Nutsche isoliert und in einen Mörser überführt. Durch Übergießen der Hyphen mit flüssigem Stickstoff konnten diese zusammen mit einer Spatelspitze Sand zu einem feinem Pulver verrieben werden. Dieses Pulver wurde anschließend in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und in 1 ml SEMP-Puffer (siehe 2.6.2) resuspendiert. Der Sand wurde durch Zentrifugation der Proben (1 000 *g;* 10 min; 4°C) abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Membranen durch Zentrifugation isoliert (16 000 *g*; 10 min; 4°C) und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.4.2.2 Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa*

Zur Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa* wurden Hyphen einer Über-Nacht-Kultur durch Absaugen in einer Nutsche isoliert, gewogen und in einen Mörser überführt. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Puffern und Geräten. Die Zellen wurden mit Quarzsand und SEMP-Puffer (siehe 2.6.2) (je 1 ml pro 1 g Hyphen) versetzt und unter Reiben und Drücken mit einem Pistill ihre Membranen aufgebrochen. Anschließend wurde noch zweimal die gleiche Menge SEMP-Puffer zugegeben und jeweils 1 min gemischt. Durch zwei Zentrifugationen wurde zunächst der Sand abgetrennt (je 2 000 *g*; 10 min; 4°C). Die Mitochondrien wurden aus dem Überstand durch Zentrifugation isoliert (30 000 *g*; 12 min; 4°C), in SEM-Puffer aufgenommen und eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe 2.3.1).

2.4.2.3 Submitochondriale Lokalisierung von Proteinen durch Digitoninfraktionierung

Da die Außenmembranen der Mitochondrien von *N. crassa* unter hypotonen Bedingungen intakt bleiben, wurde für die Lokalisierung der Proteine MAP-1 und IAP-1 die Methode der Digitoninfraktionierung angewendet. Durch Titration der Digitoninkonzentration konnten schrittweise zunächst die Außenmembranen, bei höheren Konzentrationen oder, durch Zugabe von 0,17% (v/v) Triton X-100, auch die Innenmembranen der Organelle lysiert werden. Je 6,5 mg/ml Mitochondrien wurden in SEMK-Puffer (siehe 2.6.2), der verschiedene Digitoninkonzentrationen (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5%) enthielt, resuspendiert und 5 min in Gegenwart von Proteinase K (100 µg/ml) bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit SEMK-Puffer verdünnt (Verhältnis 1:5) und 30 min auf Eis belassen. Durch eine weitere Verdünnung (1:8) und Zugabe von 1 mM PMSF wurde die

Proteasereaktion gestoppt. Anschließend wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation isoliert (5 000 g; 10 min; 4°C) und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.4.3 Import *in vitro* synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien

Der *in vitro* Import von Vorstufenproteinen wurde wie bei Mayer *et al*. (1995) und Wagner *et al*. (1994) beschrieben durchgeführt. Für einen Standard-Importansatz wurden je 30 µg Mitochondrien (0,2 mg/ml) von *S. cerevisiae* in Importpuffer I [50 mM HEPES/KOH, pH 7,2; 80 mM KCl; 10 mM $MgAc_2$; 0,5 M Sorbitol; 3% (m/v) BSA (fettsäurefrei)] und von *N. crassa* in Importpuffer II [10 mM MOPS/KOH, pH 7,2; 80 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 250 mM Sucrose; 3% (m/v) BSA (fettsäurefrei)] resuspendiert und mit 2 mM NADH und 2 mM ATP versetzt. Zusätzlich wurden Kreatinphosphat (15 mg/ml) und Kreatinkinase (150 µg/ml) zur Regeneration von ATP zugegeben. Dieser Ansatz wurde 3-5 min bei 25°C gemischt. Nach Zugabe der in Retikulozytenlysat synthetisierten Vorstufenproteine (0,5-10%) (siehe 2.3.7) wurden die Proben 15 min bei 25°C inkubiert und der Import anschließend durch Abkühlen der Proben auf 4°C und Zerstörung des Membranpotentials durch Zugabe des Importinhibitors (50 µM Valinomycin, 800 µM Antimycin, 2 mM Oligomycin) gestoppt. Nicht importierte Proteine wurden mittels Trypsin (100 µg/ml) oder Proteinase K (50 µg/ml) abgebaut (15 min; 4°C). Nach Beendigung des Proteaseverdaus durch Zugabe des 20-fachen molaren Überschusses an Trypsininhibitor (STI) bzw. PMSF (2 mM), wurden die Mitochondrien abzentrifugiert (4 500 *g*, 10 min; 4°C) und mit SHKCl-Puffer (siehe 2.6.2) gewaschen.

Um die Stabilität neu importierter Proteine zu untersuchen, wurden die Mitochondrien nach dem Proteaseverdau erneut durch Zentrifugation

isoliert (4 500 *g*; 10 min; 4°C), in dem entsprechenden Importpuffer mit NADH (2 mM), ATP (2 mM), Kreatinphosphat (15 mg/ml) und Kreatinkinase (150 µg/ml) aufgenommen (Proteinkonzentration: 2 mg/ml) und bei 37°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Um ein Absenken der ATP-Konzentration in den Mitochondrien zu verhindern, wurde in diesem Fall auf die Zerstörung des Membranpotentials durch den Inhibitor verzichtet. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.4.4 Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranen (Carbonatextraktion)

Durch die sogenannte Carbonatextraktion kann zwischen integralen Membranproteinen und löslichen Proteinen oder nur peripheren Membranproteinen unterschieden werden, da erstere im Gegensatz zu zweiteren unter den alkalischen Bedingungen nicht gelöst werden (Fujiki *et al*., 1982). Mitochondrien (100 µg) wurden in 0,1 M Na_2CO_3, pH 11,5 resuspendiert, 15 sec heftig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation (10 000 *g*; 30 min; 4°C) sedimentiert und in SDS-Probenpuffer (siehe 2.6.2) lysiert. Die löslichen Proteine wurden mit 24% (m/v) TCA gefällt (siehe 2.3.2) und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen

Die Gewinnung polyklonaler Antikörper erfolgte durch Injektion geeigneter Antigene in Kaninchen. Das Antiserum wurde aus dem Blut, das dem Kaninchen aus der Ohrvene entnommen wurde, hergestellt (siehe 2.5.1.2). Als Antigene dienten entweder rekombinante Proteine, die in *E. coli* exprimiert wurden oder *in vitro* synthetisierte Peptide, die zuvor an *K*eyhole-*L*impet-*H*ämocyanin aus *M. crenulata* (KLH) gekoppelt wurden (siehe 2.5.1.1.2).

2.5.1.1 Gewinnung der Antigene

2.5.1.1.1 Heterologe Expression von Tcm62 aus *S. cerevisiae* in *E. coli*

Als Antigen zur Gewinnung eines Serums gegen Tcm62 wurde das Gesamtprotein heterolog in *E. coli* von dem Plasmid pQE9-*TCM62* (siehe 2.1.4.2.5) exprimiert. Die Induktion des Gens erfolgte durch Zugabe von IPTG (1 mM) in eine logarithmisch wachsende *E. coli* Kultur bei 37°C für 5 h. Unter diesen Bedingungen bildete Tcm62 unlösliche Einschluß-körperchen (inclusion bodies), die leicht isoliert werden können. 1 l der induzierten Kultur wurde durch Zentrifugation (4 000 *g*; 15 min; 4°C) geerntet und das erhaltene Zellpellet in 8 ml Puffer S1 [50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 25% (m/v) Sucrose] resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Lysozym (1 mg/ml Lysozym; 10 min; RT) behandelt, der Ansatz mit 200 ml Lysepuffer [1% (v/v) Triton X-100; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 25% (m/v) Sucrose; 10 mM DTT; 25 mM EDTA; 1 mM PMSF] verdünnt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Der Zellaufschluß erfolgte

durch Beschallen in einem Ultraschallgerät (Stufe: 5; duty cycle: 40*%;* je 3x10 sec). Die im Detergens unlöslichen Einschlußkörperchen wurden durch Zentrifugation (31 000 *g*; 20 min; 4°C) isoliert und zweimal mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 50 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF), dem 0,1% (v/v) bzw. kein Triton X-100 zugesetzt war, gewaschen. Das Proteinpellet wurde in Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff; 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 50 mM DTT) gelöst, mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Nach Anfärbung der Membran mit Ponceau S wurden die entsprechenden Proteinbanden aus der Nitrozellulose-Membran ausgeschnitten und in 200 µl DMSO gelöst.

2.5.1.1.2 Gewinnung eines Peptidantiserums gegen IAP-1; Kopplung von Peptiden an *K*eyhole-*L*impet-*Hä*mocyanin (KLH)

Für die Gewinnung eines epitopspezifischen, gegen den C-Terminus von IAP-1 gerichteten Antikörper wurde das synthetische Peptid CKKEVERVIRGEK verwendet, das den Aminosäuren 675-686 entsprach. Dieses Oligopeptid wurden von Neosystem S.A., Straßburg, nach Merrifield (1963) chemisch synthetisiert. Über das aminoterminale Cystein, das nicht in IAP-1 vorhanden ist und zu diesem Zweck eingeführt wurde, konnte es kovalent an das Maleimid-aktivierte Trägerprotein KLH aus *M. crenulata* (Imject, Pearce) gebunden werden. Hierfür wurden KLH (2 mg) in 200 µl Wasser gelöst und mit 200 µl des Oligopeptids (Konzentration 10 mg/ml in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2) gemischt. Nach Inkubation von 2 h bei 25°C wurde das Konjugat durch Gelfiltration über eine PD 10-Säule (Amersham) in 100 mM Natriumchlorid, 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2, überführt.

2.5.1.2 Gewinnung der Antiseren

Die Gewinnung der Antiseren erfolgte nach der Methode von Sollner *et al*. (1990). 200 µg der beschriebenen Antigene wurden mit dem gleichen Volumen »Titermax« der Firma CyrRX, Norcross, USA, heftig gemischt und die entstandene homogene Emulsion subkutan an mehreren Stellen in Kaninchen injiziert. Weitere Injektionen erfolgten im Abstand von 4 Wochen, wobei Titermax durch »Freundsches Adjuvans Incomplete« (Behringwerke, Marburg) ersetzt wurde. Vor der ersten Injektion (Präimmunserum), sowie 10 bis 12 Tage nach den Injektionen wurde den Kaninchen 10-20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, das nach ca. 60 min bei Raumtemperatur vollständig geronnen war. Durch zwei Zentrifugationen (3 000 *g*; 5 min; 2°C und 12 000 *g*; 15 min; 2°C) wurde das Serum von den unlöslichen Bestandteilen getrennt und das Komplementsystem durch 30 minütiges Erhitzen auf 56°C inaktiviert. Die Antiseren wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.5.1.3 Affinitätsreinigung des Antiserums α-Tcm62

2.5.1.3.1 Kopplung von denaturiertem Tcm62 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Um eine spezifische Antigensäule zur Affinitätsreinigung des Immunserums α-Tcm62 zu erhalten, wurde das Antigen Tcm62 über freie Sulfhydrylgruppen an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham) gebunden (Harlow und Lane, 1988). Das in Harnstoff denaturierte Antigen Tcm62 (siehe 2.5.1.1.1) wurde zunächst mit 72% (m/v) TCA (siehe 2.3.2) gefällt, um den bei der Kopplung störenden Harnstoff zu entfernen. Das erhaltene Proteinsediment wurde 5 mal mit 6%iger TCA-Lösung und zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen und zentrifugiert (28 000 g; jeweils 15 min; 4°C). Anschließend wurde das Pellet in 2 ml 10% (m/v)

SDS gelöst und mit 2 ml 200 mM $NaHCO_3$, pH 8,3, verdünnt.

Die CNBr-aktivierte Sepharose wurde 15 min in 1 mM HCl gequollen und anschließend einmal mit 1 mM HCl und zweimal mit Äquilibrierungspuffer [2% (m/v) SDS; 100 mM $NaHCO_3$, pH 8,3] gewaschen. Die Antigenlösung wurde zu der aktivierten Sepharose gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplung wurde durch eine einstündige Inkubation mit 100 mM Glyzin, pH 8,0 beendet. Das nicht kovalent an die Sepharose gebundene Antigen wurde durch Waschen mit den folgenden Puffern abgetrennt: 0,1 M Natriumazetat, pH 4,0; 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,3; 0,5 M NaCl in 0,1 M Natriumazetat, pH 4,0; 0,5 M NaCl in 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,3. Die letzten beiden Waschschritte wurden wiederholt. Die Sepharosebeads wurden in eine Säule überführt (Säulenvolumen 1 ml) und in TBS/0,02% NaN_3 bei 4°C gelagert.

2.5.1.3.2 Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen (Ellman-Assay)

Da Tcm62 über freie Sulfhydrylgruppen an die CNBr-aktivierte Sepharose gebunden wird, kann die Zahl nicht gebundener SH-Gruppen als ein Maß für die Kopplungseffizienz angesehen werden. Je ein Aliquot der Proteinlösungen (80 µl) vor und nach der Kopplung (siehe 2.5.1.3.1) wurden in 1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0 zusammen mit 20 µl 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, 4 mg/ml) 15 min bei Raumtemperatur gemischt. Die Produktion von Thionitrobenzoat, das durch die Reaktion zwischen DTNB und freien Sulfhydrylgruppen entsteht, wurde bei 412 nm spektrophotometrisch gemessen (Habeeb, 1972). Zur Berechnung der Anzahl an SH-Gruppen wurde ein molarer Absorptionskoefizient von Thionitrobenzoat $E_{412}= 1{,}44 \times 10^4\ (M^{-1}cm^{-1})$ verwendet.

2.5.1.3.3 Affinitätsreinigung des Antiserums

Die Affinitätsreinigung des Antiserums α-Tcm62 wurde nach Harlow und Lane (1988) durchgeführt. Vor Beginn der Antikörperreinigung wurde zunächst die Affinitätssäule (siehe 2.5.1.3.1) mit den folgenden Puffern gewaschen (je 10 Säulenvolumina): (1) 10 mM Tris/HCl, pH 8,8; (2) 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5; (3) 150 mM Natriumchlorid in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5. 6 ml des Antiserums (siehe 2.5.1.2) wurden mit 25 ml TBS (siehe 2.6.2) verdünnt und mit Proteaseinhibitoren versetzt (1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,5 mM *o*-Phenantrolin; 1 mg/ml Leupeptin; 1 mg/ml Aprotenin). Das so verdünnte Serum wurde dreimal mit einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Affinitätssäule jeweils mit folgenden Puffer gewaschen (20 Säulenvolumina): (1) 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, (2) 500 mM Natriumchlorid in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, (3) 100 mM Zitronensäure/NaOH, pH 4,0. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 10 x1 ml 100 mM Glyzin/HCl, pH 2,5 und anschließend 10 x1 ml 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5. Fraktionen des Eluats (1 ml) wurden in vorbereiteten Reaktionsgefäßen aufgefangen, die 120 µl 1 M Tris-Base (für die Glyzinelution) bzw. 100 µl 1 M Glyzin, pH 2,5 (für die Phosphatelution) enthielten. Dadurch wurde eine schnelle Neutralisation der eluierten Fraktionen erreicht. Mit Hilfe der SDS-Page und anschließender Färbung der Proteine mit Coomassie, wurden die antikörperhaltigen Fraktionen ermittelt, vereinigt und über eine PD 10-Säule (Amersham) in 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 150 mM Kaliumazetat überführt. Das so gewonnene Serum wurde in 50% (m/v) Glyzerin aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Die Säule wurde mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen (10 ml) und in TBS und 0,02% (m/v) NaN_3 bei 4°C gelagert.

2.5.2 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Western-Blot)

Die Nitrozellulose-Membran mit den darauf fixierten Proteinen (siehe 2.3.5) wurde 30 min mit 5% (m/v) Magermilchpulver in TBS (siehe 2.6.2) abgesättigt. Die Immundekoration erfolgte für 60 min mit spezifischen Antiseren, die je nach Titer 1:200 bis 1:30 000 in Milchpulver/TBS verdünnt waren. Anschließend wurde die Membran je 5 min mit TBS, 0,01% (v/v) Triton X-100 in TBS, und erneut mit TBS gewaschen. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte durch einstündige Inkubation mit einem Konjugat aus Anti-Kaninchen-Immunglobulinen und Meerrettich-Peroxidase (HRP-Peroxidase), das 1:10 000 in 5% (m/v) Magermilchpulver/TBS verdünnt war. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TBS gewaschen und mit einem 1:1-Gemisch aus Reagenz 1 [100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 0,044% (v/v) Luminol; 0,0066% (v/v) *p*-Cumarinsäure] und Reagenz 2 [18 µl 30% (v/v) H_2O_2 in 100 ml Tris/HCl, pH 8,5] benetzt. Durch die ablaufende Chemolumineszenz-Reaktion konnten die Banden mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden.

Da das Antiserum α-Tcm62 mit Proteinen des Milchpulvers Kreuzreaktionen zeigte, wurde in diesem Fall der Western-Blot mit den folgenden Lösungen durchgeführt: Blocklösung: 3% (m/v) BSA, 0,05% Tween 20, TBS; Waschlösung: 0,05% (m/v) Tween 20, TBS. Der affinitätsgereinigte Antikörper (siehe 2.5.1.3.3) wurde 1:50 in TBS, die HRP-Peroxidase 1:50 000 in TBS verdünnt.

2.6 Medien und Puffer

2.6.1 Medien

Die angegebenen Medien wurden für die Zellzucht in Flüssigmedium verwendet. Zur Anzucht auf Platten wurden jeweils noch 2% (m/v) Bacto-Agar hinzugefügt. Bacto-Agar, Zucker und Medien wurden getrennt autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte erst, wenn das Medium auf etwa 50°C abgekühlt war.

2.6.1.1 Medien für *E. coli*

LB-Medium:	1% (m/v) Trypton; 0,5 % (m/v) Hefeextrakt; 1% (m/v) NaCl;
LB^{Amp}-Medium:	LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin

2.6.1.2 Medien für Hefe

YP-Medium:	1% (m/v) Hefeextrakt; 2% (m/v) Pepton;, pH 5 mit HCl einstellen;
YPD-Medium:	YP-Medium mit 2% (m/v) Glukose
YPG-Medium:	YP-Medium mit 3% (m/v) Glyzerin

SC-Medium:	0,17% (m/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 0,5% (m/v) Ammoniumsulfat; 1,5 g/l »Dropout Powder« (Mischung aller Aminosäuren zu gleichen Gewichtsanteilen; zur Selektion auf einen Auxotrophiemarker wurde die entsprechende Aminosäure nicht zugesetzt); 2% (m/v) Glukose bzw. 3% (m/v) Glyzerin
Laktatmedium:	3 g Hefeextrakt; 1 g Glukose; 1 g KH_2PO_4; 1 g NH_4Cl; 0,5 g $CaCl_2x2H_2O$; 0,5 g NaCl; 1,1 g $MgSO_4x6H_2O$; 0,3 ml 1% (m/v) $FeCl_3$; 22 ml 90% (v/v) Milchsäure; ad 1 l H_2O;, pH 5,5 mit KOH einstellen
Sporulationsplatten:	1% (m/v) Kaliumazetat; 2% (m/v) Agarose

2.6.1.3 Medien für *N. crassa*

Azetat-Medium:	2% Vogel's Stammlösung; 3 mg/ml Ammoniumazetat; 2% (m/v) Agar
Biotinlösung:	5 mg Biotin; ad 100 ml 50% (v/v) Ethanol
Glyzerin-Medium:	2% Vogel's Stammlösung; 2% (m/v) Glyzerin; 0,5% (m/v) L-Asparagin; 100 µg/ml Ascorbinsäure; 2% (m/v) Agar
Mikrokonidienmedium:	0,5% (m/v) Saccharose; 0,1x SC-Stammlösung; 1 mM Iodoazetat; 2% (m/v) Agar
MM-X-Medium:	0,01% (m/v) Glukose; 1,5% (m/v) Agar

SC-Stammlösung:	1 g KNO_3; 0,7 g K_2HPO_4; 0,5 g KH_2PO_4; 0,5 g $MgSO_4*7H_2O$; 0,1 g $CaCl_2$; 0,1 g NaCl; 0,1 ml Biotinlösung, 15 g Saccharose 0,1 ml Spurenelementlösung; ad 1 l H_2O,, pH 6,5
Sorbose-Platten:	2% Vogel's Stammlösung; 0,003% (m/v) Glukose; 1% (m/v) Sorbose; 2% (m/v) Agar
$Sorbose^{Hyg}$-Platten:	Sorbose-Medium; 150 µg/ml Hygromycin
Spurenelementlösung:	5 g Citrat*1H_2O; 5 g $ZnSO_4*7H_2O$; 1 g $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2*6H_2O$; 0,25 g $CuSO_4*5H_2O$; 0,05 g $MnSO_4*1H_2O$; 0,05 g H_3BO_3 Anhydrit; 0,05 g $Na_2MoO_4*2H_2O$; 10 Tropfen Chloroform; ad 100 ml H_2O
Vitamin-Stammlösung:	10 mg Thiamin; 5 mg Riboflavin; 5 mg Pydidoxin; 5 mg Aminobenzoesäure; 5 mgNicotinamid; 100 mg Colin/HCl; 1 mg Folsäure; 100 mg Inositol; 50 mg Calziumpantothenat; ad 1 l H_2O
Vogel´s MIN-Medium:	2% Vogel's Stammlösung; 2% (m/v) Glukose
Vogel's Stammlösung:	300 g tri-Natriumcitrat*2H_2O; 500 g KH_2PO_4; 200 g NH_4NO_3; 20 g $MgSO_4*7H_2O$; 10 g $CaCl_2$ Anhydrit; 10 ml Spurenelementlösung; 10 ml Biotinlösung; 10 ml Chloroform; ad 1,5 l H_2O
Vollmedium:	2% Vogel's Stammlösung; 1% (m/v) Glyzerin; 1% (m/v) Haushaltszucker; 1% Vitaminlösung; 0,25% (m/v) Hefeextrakt; 0,1% (m/v) Caseinhydrolysat

2.6.2 Puffer

Li-DS-Puffer:	2% (m/v) LiDS; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glyzerin; 5% (v/v) β–Mercaptoethanol; 0,02% (m/v) Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer:	2% (m/v) SDS; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glyzerin; 5% (v/v) β–Mercaptoethanol; 0,02% (m/v) Bromphenolblau
SEM-Puffer:	10 mM MOPS/KOH, pH 7,4; 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA
SEMK-Puffer:	SEM; 80 mM KCl
SEMP-Puffer:	SEM; 5 mM PMSF
SHKCl-Puffer:	50 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 80 mM KCl; 0,6 M Sorbitol
20xSSC:	300 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 3 M NaCl
TBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

2.7 Geräte, Chemikalien und Enzyme

2.7.1 Geräte

Abimed, Düsseldorf:	Kolbenhubpipetten
Agfa-Gevaert, München:	Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Gevamatic 60
Appligene, Heidelberg:	Imaging-System The Imager™
Beckman, München:	Hochgeschwindigkeits- und Ultrazentifugen J2 21, TL 100 und L8, Rotoren, Zentrifugationsröhrchen
Bender u. Hobein, München:	Vortex-Mixer
Branson, Heusenstamm:	Ultraschallgerät Sonifier B 15
Braun, Melsungen:	Schüttelwasserbäder, Kanülen, Spritzen
Consort, Freiburg:	Spannungsgeräte für die Elektrophorese
Eppendorf, Hamburg:	Photometer, Multipette, Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen
Fuji, Tokyo, Japan:	Phospho-Imager BAS 1500
Heraeus Christ, Osterode:	Tischzentrifuge Bactifuge$^{\hat{a}}$, Brutschränke, Inkubatoren
Ika, Staufen:	Magnetrührer
Julabo, Seelbach:	Wasserbadthermostat
Memmert, Hannover:	Wärmeschränke

Amersham, Freiburg:	Spannungsgeräte für Gelelektrophorese und Immunoblots, Densitometer Ultrascan XL, FPLC-Anlagen, Chromatographiesäulen Superose 6 und Superose 12, Ionenaustauschersäule MonoQ, PD 10-Säulen
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen, Ultrafiltrationsapparatur, Sterilfilter
Schütt, Göttingen:	Autoklav Bioclav
Shimadzu, Kyoto, Japan:	Photometer UV 120 02 und UV 240
Sigma, München:	Kühlzentrifuge MK
Werkstatt des Instituts, München:	Semi-dry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopfschüttler

2.7.2 Chemikalien und Enzyme

Agfa-Gevaert, München:	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Amersham-Buchler, Braunschweig:	ECL-Immunoblot-Detektionssystem,Kaninchen-Retikulozytenlysat
Behring-Werke, Marburg:	Freunds inkomplettes Adjuvans
Biometra, Göttingen:	Reagenzien für Polymerase-Kettenreaktion (PrimeZyme)
Biorad, München:	Reagenzien zur Proteinbestimmung, Anti-Kaninchen-IgG-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase
Biozym, Hess. Oldendorf:	SP6-Polymerase

Boehringer, Mannheim:	Complete Proteaseinhibitoren, dNTPs, Ethidiumbromid, Klenow-Fragment, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, NTPs, Oligomycin, Phosphoenolpyruvat, Proteinase K, Restriktionsenzyme, RNAse A, Tris
Clontech, Heidelberg:	*E. coli* DH5a
CyrRX, Norcross, USA:	TiterMax™
DIFCO, Detroit, USA:	Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt
Eurogentec, Seraing, Belgien:	Oligonukleotide
Fluka, Buchs, USA:	Trichloressigsäure
Fuji, Düsseldorf:	Röntgenfilme
Genomed, Bad Oeynhausen:	Jetstar-Reagenzien und -Säulen zur Plasmid-isolierung
Gerbu, Gaiberg:	Acrylamid, Ampicillin, DTT, IPTG, NADH, NADPH
GIBCO-BRL, Eggenstein:	Agarose, T4-Ligase, Restriktionsenzyme
ICN Pharmaceuticals, Eschwege:	[^{35}S]-Methionin (1100-1400 Ci/mmol), [α^{32}P]ATP (400 mCi/mmol)
Invitrogen, Groningen:	pCRII-TOPO-Vektor, pCR2.1-Vektor
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat MD
Neosystem, Straßburg, Frankreich:	Oligopeptide
Nestlé-Alete, München:	Magermilchpulver

NEB, Schwalbach:	Restriktionsenzyme
Amersham, Freiburg:	$m^7G(5´)ppp(5´)G$, Protein A-Sepharose
Pierce, Rockford, USA:	aktiviertes Ovalbumin für Peptidkopplungen
Promega, Heidelberg:	RNasin, Kaninchen-Retikulozytenlysat, pGEM-Vektoren
Qiagen, Homburg:	Gel Extraction Kit, Ni-NTA-Agarose, pQE60-Vektoren, *E. coli* XL1-Blue
Riedel de Haen, Seelze:	Kaliumacetat
Sarstedt, Bad Homburg:	Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Röhrchen
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulose-Membranen 0,2 µm, Faltenfilter, Filterpapier, Sterilfilter
Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan:	Zymolyase 20T
Serva, Heidelberg:	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brillant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, Spermidin, TEMED
Sigma, München:	Aminosäuren, Ammoniumperoxodisulfat, Apyrase, BSA (fettsäurefrei), CCCP, DHFR, Dihydrofolat, Formaldehyd, Glycerin, Lachsspermien-DNA, Leupeptin, β-Mercaptoethanol, Methothrexat, Mineralöl; Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE, Oligomycin, PMSF, Rhodanese (Rinderleber), STI, Triton X-100, Trypsin (Typ XIII, Rinderpankreas), Valinomycin A
United States Biochemical, Cleveland, Ohio, USA:	Pepton, Trypton, Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)

Whatman, Maidstone, England:	DE52-Zellulose

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

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Tcm62, eines Proteins mit Ähnlichkeiten zu Chaperoninen

3.1.1 Charakterisierung von Tcm62

3.1.1.1 Proteinsequenz

Tcm62 ist ein Protein von 572 Aminosäuren Länge (64 247 Da), das durch den offenen Leseraster YBR044c auf Chromosom II der Hefe *S. cerevisiae* kodiert wird. Die Datenbanksuche nach verwandten Proteinen mit dem Programm FASTA zeigte eine zwar schwache, aber doch signifikante Sequenzähnlichkeit zu bakteriellen und mitochondrialen Chaperoninen (Klasse I Chaperonine) (Abb. 1). Der nächste Verwandte des Tcm62 ist mit 18% Sequenzidentität und 38% Sequenzähnlichkeit das mitochondriale Hitzeschockprotein Hsp60 in *S. cerevisiae*. Weitere Homologe finden sich unter den Chaperoninen anderer Organismen wie GroEL aus *E. coli* (16% Identität) (Abb. 1) und HSPD1 aus *H. sapiens* (21% Identität). Zu Chaperoninen der Klasse II bestehen keine signifikanten Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz.

Der Vergleich der Sequenzen von Tcm62 mit Hsp60 und GroEL ergibt eine gleichmäßige Verteilung der konservierten Aminosäuren über die gesamte Länge des Proteins (Abb. 1). In keiner Region kann eine verstärkte Homologie festgestellt werden. Auch das für alle bisher bekannten Chaperonine charakteristische Motiv GDGTT (Aminosäuren 86-90 der GroEL-Sequenz), das essentielle Funktionen für die ATP-Hydrolyse-Aktivität innehat (Fenton *et al*., 1994), ist nicht konserviert.

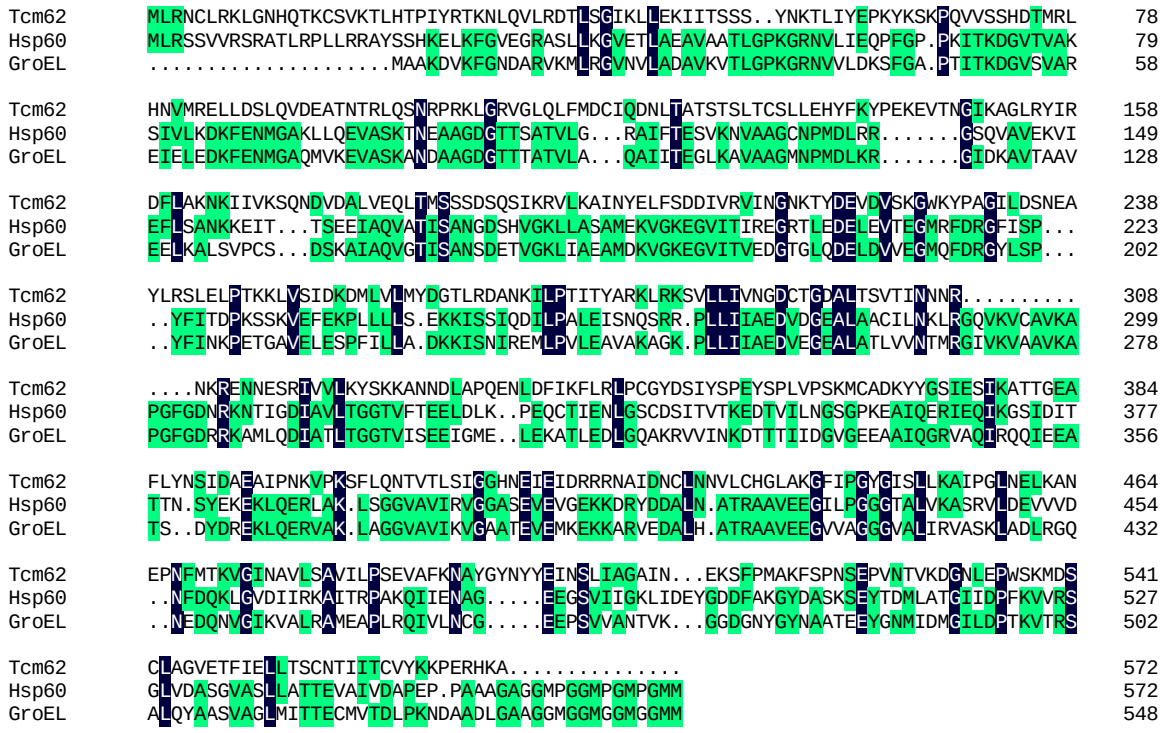

Abb. 1: Vergleich der Sequenzen von Tcm62 (S. cerevisiae), Hsp60 (S. cerevisiae) und GroEL (E. coli).
Ein Vergleich der Proteinsequenzen Tcm62, Hsp60 und GroEL wurde mit dem Programm Clustal W (Version 1.7) hergestellt. Die in allen drei Sequenzen identischen Aminosäuren sind weiß auf schwarz, die nur in zwei Polypeptiden konservierten Reste sind schwarz auf grau dargestellt. Von Tcm62 und Hsp60 sind die Sequenzen der Vorstufenproteine gezeigt.

Trotz der schwachen Homologien in der Primärstruktur bestehen jedoch offenbar deutliche Ähnlichkeiten auf der Ebene der Sekundärstruktur. Ein Vergleich der Sekundärstruktur von Tcm62, basierend auf einer Vorhersage mit dem Programm PREDATOR, zeigt auffallende Ähnllichkeiten zur bekannten Kristallstruktur von GroEL im N-terminalen Bereich (ohne Abbildung). Hier liegt bei GroEL die apikale Domäne, die sowohl die Bindung der Substrate als auch des Kochaperonins GroES vermittelt (Braig *et al*., 1994; Xu *et al*., 1997). Auch in Teilen der intermediären Domäne zeigen sich vergleichbare Sekundärstrukturen. Diese Beobachtung läßt, trotz bestehender Unterschiede in der Primärstruktur, eine ähnliche Faltung in diesen Bereichen vermuten.

3.1.1.2 Lokalisierung und Topologie

3.1.1.2.1 Lokalisierung von Tcm62 in den Mitochondrien

3.1.1.2.1.1 Subzelluläre Fraktionierung

Der N-Terminus von Tcm62 ist reich an positiv geladenen und hydroxylierten Aminosäuren, enthält aber keine negativen Ladungen (Abb. 1). Die Ausbildung einer positiv geladenen, amphiphilen Helix im N-terminalen Bereich ist typisch für Proteine, die im Kern kodiert und posttranslational in Mitochondrien importiert werden (von Heijne, 1986). Der N-Terminus von Tcm62 zeigt somit typische Eigenschaften einer mitochondrialen Präsequenz. Daher wurde eine mögliche Lokalisierung in diesem Organell untersucht.

Zellextrakte wurden durch differentiale Zentrifugation in eine mitochondriale und eine postmitochondriale Fraktion aufgetrennt, die nachfolgend durch Western-Blot analysiert wurden. Tcm62 war, wie auch das mitochondriale Protein Mge1, ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion nachweisbar (Abb. 2A). Eine Verunreinigung der mitochondrialen Fraktion durch Proteine des Zytosols konnte ausgeschlossen werden, da das zytosolische Protein Bmh2 ausschließlich in der postmitochondrialen, und nicht in der mitochondrialen Fraktion detektiert wurde (Abb. 2A).

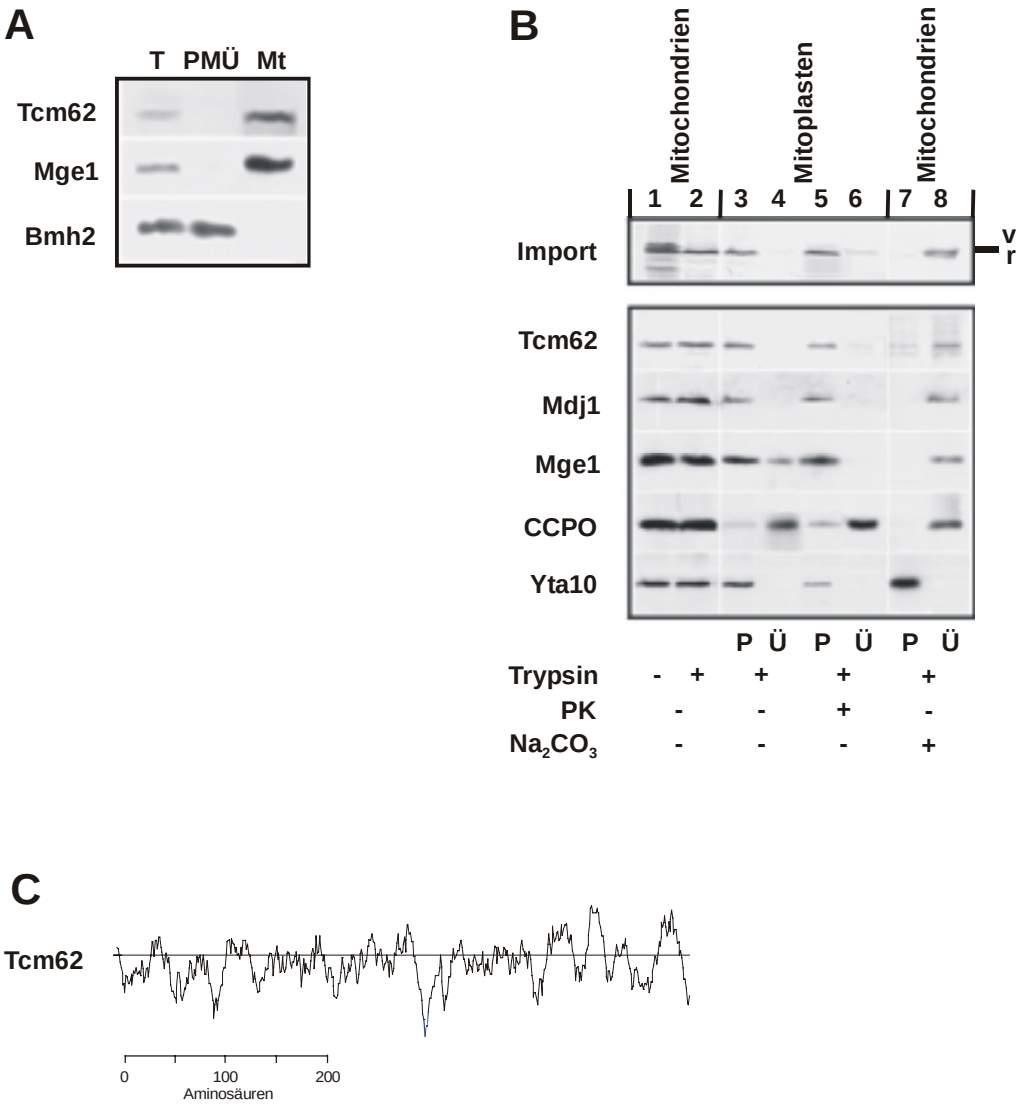

Abb. 2: Lokalisierung und Topologie von Tcm62.
(A) Subzelluläre Fraktionierung. Hefezellen wurden zunächst in Sphäroplasten überführt und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators lysiert. Mitochondrien (‘Mt’) wurden durch Zentrifugation von dem postmitochondrialen Überstand (‘PMÜ’) abgetrennt (siehe 2.4.1.2.3). Von beiden Fraktionen, sowie von einer Kontrollprobe des gesamten Zellysats (‘T’) wurden je 100 µg Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt und eine Western-Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen Tcm62, und gegen die Markerproteine Mge1 (Matrix) und Bmh2 (Zytosol) durchgeführt.

3.1.1.2.1.2 Import in isolierte Mitochondrien

Um eine mitochondriale Lokalisierung zu bestätigen, wurde Tcm62 in einem zellfreien System *in vitro* synthetisiert und in isolierte Mitochondrien aus *S. cerevisiae* importiert. Die *in vitro* Transkription erfolgte von dem Konstrukt pGEM4-*TCM62* (siehe 2.1.4.2.1) mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase. Die hierbei erhaltene mRNA wurde in der nachfolgenden Translation in Retikulozytenlysat in Gegenwart von ^{35}[S]-Methionin eingesetzt. Das radioaktiv markierte Translationsprodukt zeigte die erwartete Größe von ~64 kDa. Nach Inkubation mit isolierten Mitochondrien unter Zusatz eines ATP-regenerierenden Systems wurde dieses Vorstufenprotein in Abhängigkeit des Membranpotentials über die Innenmembran importiert, was durch die Proteaseresistenz des reifen Proteins demonstriert wurde (Abb. 2B; Spur 1 und 2; obere Teilabbildung). Die reife Form von Tcm62 mit einer molekularen Masse von ~62 kDa wird in der Matrix durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase MPP gebildet (Abb. 2B; Spur 1 und 2; obere Teilabbildung). Eine mögliche Schnittstelle befindet sich nach Aminosäure 28 (Abb. 1), was auch in etwa einer Abspaltung von 2 kDa entspricht.

Abb. 2: Lokalisierung und Topologie von Tcm62.
(B) Submitochondriale Lokalisierung. Tcm62 wurde in Retikulozytenlysat in Gegenwart von ^{35}[S]-Methionin, wie unter (siehe 2.3.7) beschrieben, synthetisiert und in isolierte Mitochondrien importiert (30 min; 25°C). Nicht importiertes Protein wurde mit Trypsin (100 µg/ml) bei 4°C verdaut ('+Trypsin'). Die Reaktion wurde nach 15 min durch Zugabe des Trypsininhibitors STI (1 mg/ml) gestoppt. Anschließend wurden die Proben halbiert und entweder durch osmotisches Schwellen der Außenmembran in Mitoplasten überführt ('Mitoplasten') oder durch alkalische Lyse fraktioniert ('Na_2CO_3') (siehe 2.4.4). Die Proteine der Mitoplastenfraktion wurden auf Proteinase K-Resistenz geprüft ('+'PK') (siehe 2.4.1.3). Die submitochondrialen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Folgende Polypeptide wurden als Marker für die verschiedenen mitochondrialen Kompartimente verwendet: Mge1 ist ein lösliches und Mdj1 ein membranassoziiertes Protein der Matrix; CCPO ist im Intermembranraum lokalisiert; Yta10 ist Bestandteil der mitochondrialen Innenmembran, seine lösliche Domäne zeigt in die Matrix. Die obere Teilabbildung zeigt die autoradiographische Analyse des Gels; die untere Teilabbildung die Western-Blot Analyse. v, Vorstufenprotein; r, reifes Protein.
(C) Hydrophobizitätsprofil von Tcm62. Das Hydrophobizitätsprofil von Tcm62 wurde mit Hilfe der DNAMAN-Software (Lynnon BioSoft; Version 4.1) analysiert. Die Fenstergröße betrug 15 Aminosäuren. Hydrophobe Bereiche sind oberhalb, hydrophile unterhalb der horizontalen Linie dargestellt.

3.1.1.2.2 Submitochondriale Lokalisierung und Topologie

Zur Untersuchung der submitochondrialen Lokalisierung und Bestimmung der Topologie von Tcm62 wurde zunächst das radioaktiv markierte Vorstufenprotein in Mitochondrien importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien durch schrittweises Öffnen der Membranen fraktioniert (siehe 2.4.1.3) und die Zugänglichkeit von Tcm62 für extern zugesetzte Proteinase K untersucht. Die Disruption der Außenmembran erfolgte durch osmotisches Schwellen (siehe 2.4.1.3); zur Lyse der Innenmembran wurden die Mitochondrien mit 1% Triton X-100 inkubiert. Der Nachweis von Tcm62 erfolgte durch Autoradiographie. Zusätzlich wurde das endogene Protein durch Immundekoration untersucht.

Sowohl in intakten Mitochondrien, wie auch nach Disruption der Außenmembran, war Tcm62 vollständig vor dem Verdau durch Proteinase K geschützt (Abb. 2B; Spur 1-6). Auch konnten unter den gewählten Bedingungen keine Fragmente des Proteins beobachtet werden (ohne Abbildung). Im Gegensatz dazu wurde das Protein des Intermembranraums Cytochrom-*c*-Peroxidase unter diesen Bedingungen freigesetzt und war somit nicht mehr in der Fraktion der Mitoplasten nachzuweisen (Abb. 2B; Spur 1-6). Nach vollständiger Lyse der Mitochondrien durch Triton X-100 wurde Tcm62 jedoch zugänglich für die Protease (ohne Abbildung). Das gleiche Verhalten zeigten die Kontrollproteine für die Matrix Mge1, Mdj1 und Yta10 (Abb. 2B; Spur 1-6). Tcm62 ist also ein Protein der mitochondrialen Matrix.

Um unterscheiden zu können, ob Tcm62 integraler Bestandteil der Innenmembran ist und dabei seine Domänen in die Matrix exponiert oder ob es sich um ein lösliches Matrixprotein handelt, wurde zunächst ein Hydrophobizitätsprofil von Tcm62 erstellt (Abb. 2C). In keinem Bereich des Proteins war eine deutliche Anreicherung hydrophober Aminosäuren zu erkennen, wie es für Transmembranregionen charakteristisch wäre (Abb. 2C). Dies weist darauf hin, daß Tcm62 ein lösliches oder peripheres

Membranprotein ist.

Um diese Vorhersage experimentell zu bestätigen, wurde eine Carbonatextraktion durchgeführt. Bei der alkalischen Lyse mit 0,1 M Na_2CO_3, pH 11,5 werden lösliche (Mge1) wie auch peripher mit der Membran assoziierte Proteine (Mdj1) extrahiert, während integrale Membranproteine (Yta10) in der unlöslichen Membranfraktion verbleiben (Abb. 2B, Spur 7 und 8). Tcm62 wurde überwiegend in der löslichen Fraktion detektiert (Abb. 2B, Spur 7 und 8). In Übereinstimmung mit der Vorhersage aus dem Hydrophobizitätsprofil ist Tcm62 demnach frei in der Matrix lokalisiert oder peripher mit der mitochondrialen Innenmembran assoziiert.

3.1.1.3 Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Tcm62

Das native Molekulargewicht von Tcm62 wurde durch Gelfiltrations-experimente bestimmt (Abb. 3). Dazu wurden Mitochondrien des Wildtypstamms in 0,1% Triton X-100 lysiert und die Extrakte durch Chromatographie über eine Superose 6-Säule fraktioniert. Tcm62 eluierte in einem einzelnen Peak in Fraktionen, in denen auch Hsp60 nachweisbar war. Dies entspricht einer molekularen Masse von ~850 kDa (Abb. 3). Auch *in vitro* synthetisiertes und in Mitochondrien importiertes Tcm62 zeigte diese molekulare Masse (ohne Abbildung).

Die Koelution von Tcm62 und dem Chaperonin Hsp60 könnte auf eine mögliche Komplexbildung beider Proteine hindeuten. Jedoch konnte weder Hsp60 mit einem Antikörper gegen Tcm62, noch Tcm62 mit einem Antikörper gegen Hsp60 koimmungefällt werden (ohne Abbildung). Offenbar handelt es sich um zwei unabhängige Proteinkomplexe mit ähnlichen Molekulargewichten.

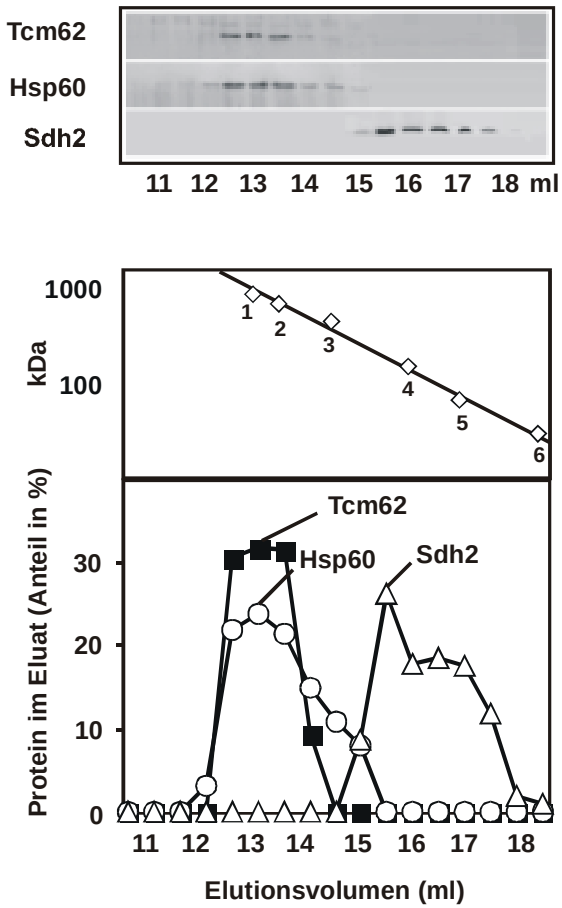

Abb. 3: Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Tcm62.
Mitochondrien (600 µg) wurden in 0,1% (v/v) Triton X-100, 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 150 mM KAc und 1 mM PMSF unter heftigem Schütteln 15 min bei 4°C lysiert (Proteinkonzentration: 2 mg/ml). Der mitochondriale Extrakt wurde mit Hilfe einer Superose 6-Gelfiltrationssäule, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war, fraktioniert. Das Eluat wurde in 0,5 ml-Fraktionen gesammelt, die Proteine mit TCA (12,5%) ausgefällt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die obere Teilabbildung zeigt den mit spezifischen Antikörpern gegen Tcm62, Hsp60 und Sdh2 dekorierten Blot. Die Menge an Protein in den einzelnen Fraktionen wurde densitometrisch bestimmt und auf die gesamte eluierte Menge des jeweiligen Proteins normiert (untere Teilabbildung). Die Eichung der Säule erfolgte mit den folgenden Markerproteinen: (1) Hsp60 (850 kDa); (2) Thyreoglobulin (669 kDa); (3) Apoferritin (443 kDa); (4) Alkoholdehydrogenase (150 kDa); (5) BSA (66 kDa) Carboanhydrase (29 kDa).

Eine direkte Interaktion von Tcm62 mit der Untereinheit 2 der Succinatdehydrogenase (Sdh2) wurde von Dibrov *et al.* (1998) beschrieben. Daher wurden die Gelfiltrationsexperimente mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Sdh2 auf eine Koelution hin untersucht. Sdh2 bildete jedoch unter den gewählten Bedingungen einen Komplex von

nur ~150 kDa. Es assembliert folglich nicht mit Tcm62.

3.1.2 Bedeutung von Tcm62 für die Biogenese von Mitochondrien

3.1.2.1 Einfluß von Tcm62 auf die Atmungskompetenz der Zellen; Wachstumsphänotyp

Zur Charakterisierung der Funktionen von Tcm62 in Mitochondrien wurde der Wachstumsphänotyp von *Δtcm62*-Zellen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Hefezellen, deren mitochondriale Atmungsfunktion beeinträchtigt ist, decken ihren Energiebedarf ausschließlich durch Fermentation. Auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffen wie Glyzerin oder Laktat können diese Stämme nicht wachsen (Tzagoloff und Dieckmann, 1990). Die Disruption von *TCM62* in *S. cerevisiae* beeinträchtigte das Zellwachstum auf glukose- oder galaktosehaltigen Medien bei allen getesteten Temperaturen nicht. Dagegen war auf glyzerinhaltigen Medien eine temperaturabhängige Wachstumshemmung zu beobachten (Abb. 4; ohne Abbildung). Während bei 24°C das Zellwachstum im Vergleich zum Wildtypstamm deutlich reduziert war, war bei 37°C kein Wachstum mehr möglich (Abb. 4). Dieses Ergebnis weist auf eine wichtige Funktion von Tcm62 für die Aufrechterhaltung der Atmungskompetenz der Zellen bei hohen Temperaturen hin.

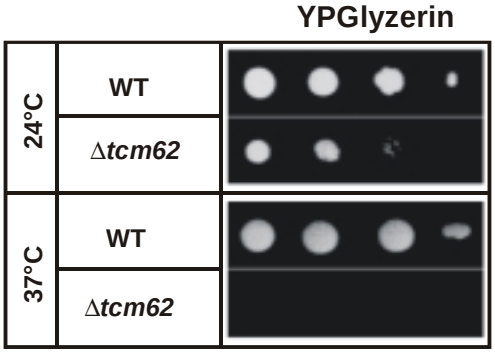

Abb. 4: Wachstumsphänotyp des *Δtcm62*-Stamms auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen.
Wildtyp- und *Δtcm62*-Zellen wurden auf YP-Medium mit 3% (m/v) Glyzerin bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase bei 24°C kultiviert, geerntet und eine Verdünnungsreihe (1:10) wie in Material und Methoden beschrieben (siehe 2.2.1.1) hergestellt. Jeweils 3 µl der Proben wurden auf eine YP-Platte mit 3% (m/v) Glyzerin aufgebracht und vier Tage bei 24°C bzw. 37°C inkubiert.

3.1.2.2 Die Bedeutung von Tcm62 für die mitochondriale Proteinsynthese

Die Synthese mitochondrial kodierter Proteine ist temperaturabhängig und wird bei erhöhten Temperaturen nur durch eine verstärkte Synthese von Hitzeschockproteinen aufrechterhalten (Schmitt *et al*., 1996). In Anbetracht der Sequenzähnlichkeit von Tcm62 zu Chaperoninen legt der beobachtete thermosensitive Wachstumsphänotyp die Vermutung nahe, daß auch Tcm62 an der Aufrechterhaltung der Proteinsynthese in Mitochondrien bei erhöhten Temperaturen beteiligt sein könnte. Um eine solche Hypothese zu untersuchen, wurden Wildtyp- und *Δtcm62*–Zellen bei 24°C, 30°C oder 37°C zwei Stunden in einem glyzerinhaltigen Medium inkubiert. Anschließend wurde die verbleibende Aktivität der mitochondrialen Proteinsynthesemaschinerie durch Zugabe von ^{35}[S]-Methionin zur Markierung der neu synthetisierten Proteine, bestimmt. In Wildtypzellen konnte ein Anstieg der Aktivität von 24°C zu 37°C auf das ungefähr 1,5-fache beobachtet werden (Abb. 5).

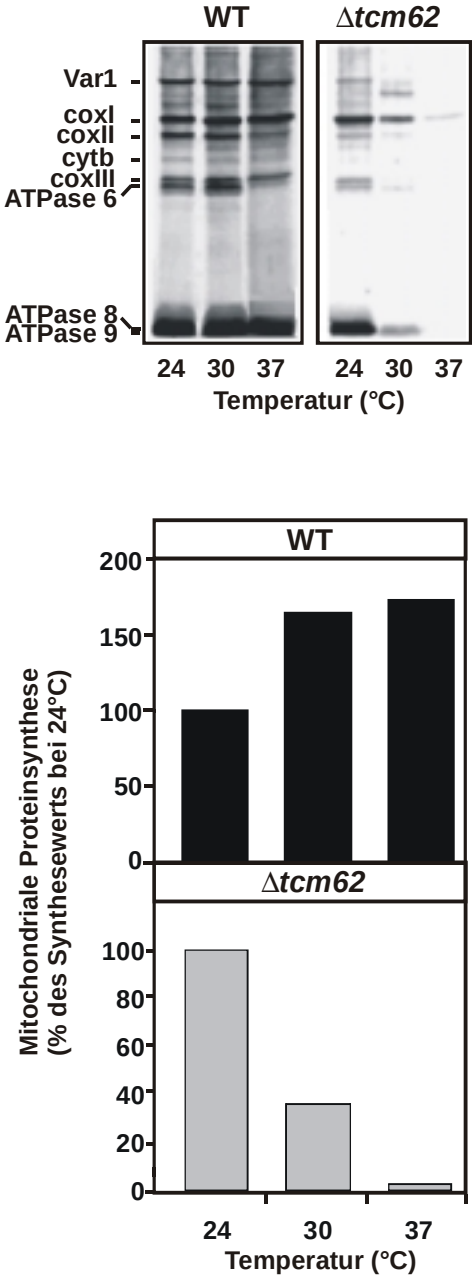

Abb. 5: Thermostabilität der mitochondrialen Proteinsynthese in Abwesenheit von Tcm62.
Wildtyp- und *Δtcm62*-Zellen wurden bei 24°C in methioninfreiem SC-Medium mit 3% (m/v) Glyzerin bis zur mittleren logarithmischen Phase kultiviert. Die Ansätze wurden geteilt und entweder bei 24°C, 30°C oder 37°C zwei Stunden lang inkubiert. Nach Zugabe von Cycloheximid (150 µg/ml) wurden die mitochondrialen Translationsprodukte in Gegenwart von ^{35}[S]-Methionin 15 min bei den angegebenen Temperaturen, wie in Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.4), radioaktiv markiert. Die Synthese der mitochondrial kodierten Proteine wurde über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (obere Teilabbildung) und mit Hilfe eines Phosphoimagersytems quantifiziert. Die Synthesewerte bei 24°C wurden auf 100% gesetzt; die Synthesewerte bei 30°C und 37°C wurden auf die Synthesewerte bei 24°C normiert (untere Teilabbildung).

Die verstärkte Proteinsynthese bei 37°C läßt sich vermutlich auf die Hitzeschockproteine zurückführen, die unter solchen Bedingungen vermehrt in der Zelle synthetisiert werden (Schmitt *et al*., 1996). Im Gegensatz zu Wildtypzellen wurde in Abwesenheit von Tcm62 eine starke Abnahme der mitochondrialen Proteinsynthese mit Zunahme der Temperatur beobachtet (Abb. 5). Bei 37°C ist sie fast vollständig gehemmt. Dieser Effekt wird nicht durch die eingeschränkte Atmungskompetenz der Zellen verursacht. Die Deletion von Yme1, die wie die Deletion von Tcm62 zu einem thermosensitiven *petite*-Phänotyp führt (Thorsness *et al*., 1993), hatte keinen Einfluß auf die Syntheseaktivität (ohne Abbildung). Tcm62 scheint demnach spezifisch an der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Proteinsynthese unter Hitzestreß beteiligt zu sein. Diese Funktion könnte auch den beobachteten Wachstumsphänotyp nach Deletion des *TCM62*-Gens erklären, da einige Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe und der F_1F_0-ATPase durch das mitochondriale Genom kodiert werden (Costanzo und Fox, 1990; Grivell, 1989)

3.1.2.3 Tcm62 verhindert die Aggregation von Var1

Die Sequenzähnlichkeit von Tcm62 zur Familie der Chaperonine legt eine Chaperonfunktion von Tcm62 unter Hitzestreß nahe. Es wurde daher die Stabilität des Modellproteins Var1 in Abwesenheit von Tcm62 untersucht. Var1 ist Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit in Mitochondrien und das einzige lösliche Protein, das in *S. cerevisiae* vom mitochondrialen Genom kodiert wird (Costanzo und Fox, 1990; Grivell, 1989). Zunächst wurden in isolierten Mitochondrien des Wildtyp- oder *Δtcm62*-Stamms die mitochondrial kodierten Proteine in Gegenwart von ^{35}[S]-Methionin bei 24°C synthetisiert. Nach Hemmung der Proteinsynthese durch Zugabe von Chloramphenicol wurden die Mitochondrien für die angegebenen Zeiten bei 24°C oder 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Löslichkeit von Var1 durch Zentrifugation der Extrakte, die durch Lyse der Mitochondrien erhalten wurden, untersucht. In Wildtypzellen wurde Var1 bei beiden getesteten Temperaturen fast ausschließlich in der löslichen Fraktion nachgewiesen (Abb. 6). Auch in dem Stamm *Δtcm62* lag das Protein in einer löslichen Form vor (Abb. 6). Bei 37°C wurde jedoch in Abwesenheit von Tcm62 eine Aggregation von Var1 beobachtet (Abb. 6). Tcm62 scheint demnach essentiell zur Aufrechterhaltung der Löslichkeit von Var1 bei erhöhten Temperaturen zu sein. Dieses Ergebnis weist auf eine Chaperonaktivität von Tcm62 hin.

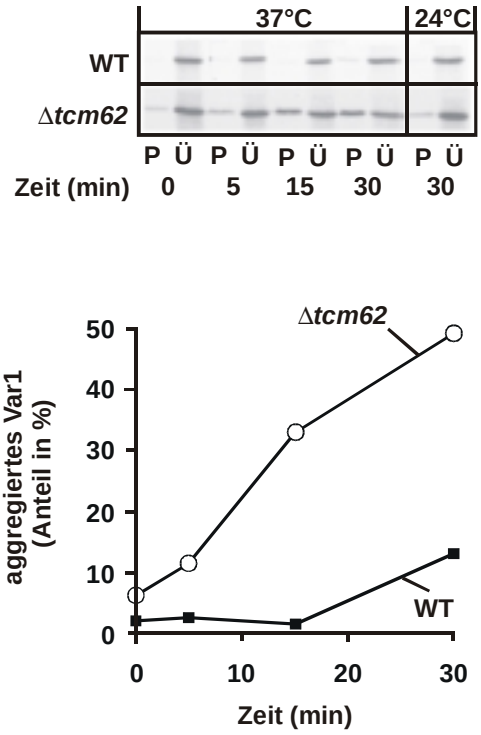

Abb. 6: Hemmung der Aggregation von Var1 unter Hitzestreß durch Tcm62.
Die mitochondrial kodierten Proteine wurde in isolierte Mitochondrien des Wildtyps- oder *Δtcm62*-Stamms 30 min bei 24°C radioaktiv markiert. Die Translation wurde durch Zugabe von 40 mM Methionin gestoppt. Die Proben wurden halbiert und entweder bei 24°C oder 37°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Um die Löslichkeit des neu synthetisierten Var1 zu überprüfen, wurden die Mitochondrien in Lysepuffer solubilisiert und durch Zentrifugation (10 min; 4°C) in eine lösliche ('Ü') und unlösliche ('P') Fraktion geteilt (siehe 2.4.1.5). Beide Fraktionen wurden über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (obere Teilabbildung). Die Menge an aggregiertem Var1 wurde mit Hilfe eines Phosphoimagersystems quantifiziert und auf die Gesamtmenge an Var1 in der löslichen und unlöslichen Fraktion normiert (untere Teilabbildung).

3.2 MAP-1 und IAP-1, zwei neue AAA-Proteasen aus *N. crassa*

Um einen besseren Einblick in die Bedeutung der AAA-Proteasen in Mitochondrien zu erhalten, wurden im Rahmen eines zweiten Themengebietes neue AAA-Proteasen in dem Fadenpilz *N. crassa* identifiziert, charakterisiert und mit den bekannten AAA-Proteasen aus *S. cerevisiae* verglichen.

3.2.1 Klonierung der Gene

3.2.1.1 *map-1*

Das Gen *map-1* wurde von H. Prokisch mit Hilfe der Kolonie-hybridisierung aus der *N. crassa* gDNA-Bank pMOcosX (Orbach, 1994) identifiziert. Das EST 4159261 (gb: AW709994) der *N. crassa*-cDNA-Bibliothek »morning« (http://www.genome.ou.edu) zeigt starke Sequenzähnlichkeit zu Yta10 aus *S. cerevisiae* (Aminosäuren 406-544). Zur Identifizierung eines Homologs in *N. crassa* wurde daher ein entsprechendes DNA-Fragment amplifiziert und als Hybridisierungssonde eingesetzt.

Das identifizierte Gen hat eine Länge von 2853 bp und wird nach Base 1959 durch ein Intron von 66 bp unterbrochen. Es kodiert ein Protein aus 928 Aminosäuren und einer geschätzten molekularen Masse von 103 kDa (Abb. 7). Das Translationsprodukt enthält eine AAA-Domäne und in der C-terminalen Domäne das Metallbindungsmotiv HEXXH, das in allen AAA-Proteasen gefunden wird (Abb. 7) (Swaffield *et al.*, 1992). Das Protein kann daher der Familie der AAA-Proteasen in *N. crassa* zugerechnet werden. Sequenzvergleiche mit bekannten Vertretern dieser Familie aus anderen Organismen bestätigen diese Vorhersage (Abb. 7).

Die größte Sequenzähnlichkeit findet sich zu Yta10 und Yta12 aus *S. cerevisiae* mit 51,8% bzw. 46,1% Identität. Aufgrund der Lokalisierung (siehe unten) wurde dieses Gen *map-1* (für *m*atrix *A*AA-*p*rotease) genannt.

3.2.1.2 *iap-1*

Um Homologe der AAA-Proteasen in *N. crassa* zu identifizieren, von denen noch keine EST-Sequenzen bekannt waren, wurde nach Proteinen gesucht, die sowohl ein Walker A Motiv als auch eine konservierte Metallbindungsstelle HEXXH enthielten. Zunächst wurde das Genom von *N. crassa* auf Sequenzabschnitte, die diese Motive kodieren, untersucht. Dazu wurde die PCR-Technik mit folgenden degenerierten Primern, die gegen diese DNA-Sequenzen gerichtet waren, angewendet:

Walker A Box: 5'-GGA CCT CCT GGT ACA GGT AAA ACT (IAP-1-1)

HEXXH: 5'-GGC ATG TCC AGC CTC GTG GAA AGC AGT (IAP-1-2)

Es wurde ein Fragment von ~600 bp amplifiziert, das durch digoxigeniertes dUTP markiert (siehe 2.1.3.5.3) und als Sonde zur Hybridisierung einer *N. crassa*-cDNA-Bibliothek, die in den Phagenvektor Lambda ZAP® II (Stratagene) kloniert war, eingesetzt wurde. Die Bibliothek wurde mir freundlicherweise von F. Nargang (Universität Edmonton, Kanada) überlassen. Zunächst wurden DH5α–*E. coli*-Zellen auf LB^{Amp}-Platten ausgestrichen und mit der Phagensuspension infiziert. Nach Übertragung der entstandenen Plaques auf eine Nylonmembran (siehe 2.1.3.5.2) wurde ihre DNA darauf fixiert und mit der Sonde hybridisiert. Die Suche ergab einen positiven Klon (CK2), der ein DNA-Fragment von 1668 bp Länge enthielt. Das Translationsprodukt dieses Fragments wies eine Sequenzähnlichkeit von 57% zu dem C-terminalen Teil von Yme1 aus *S. cerevisiae* auf. Der N-terminale Teil des

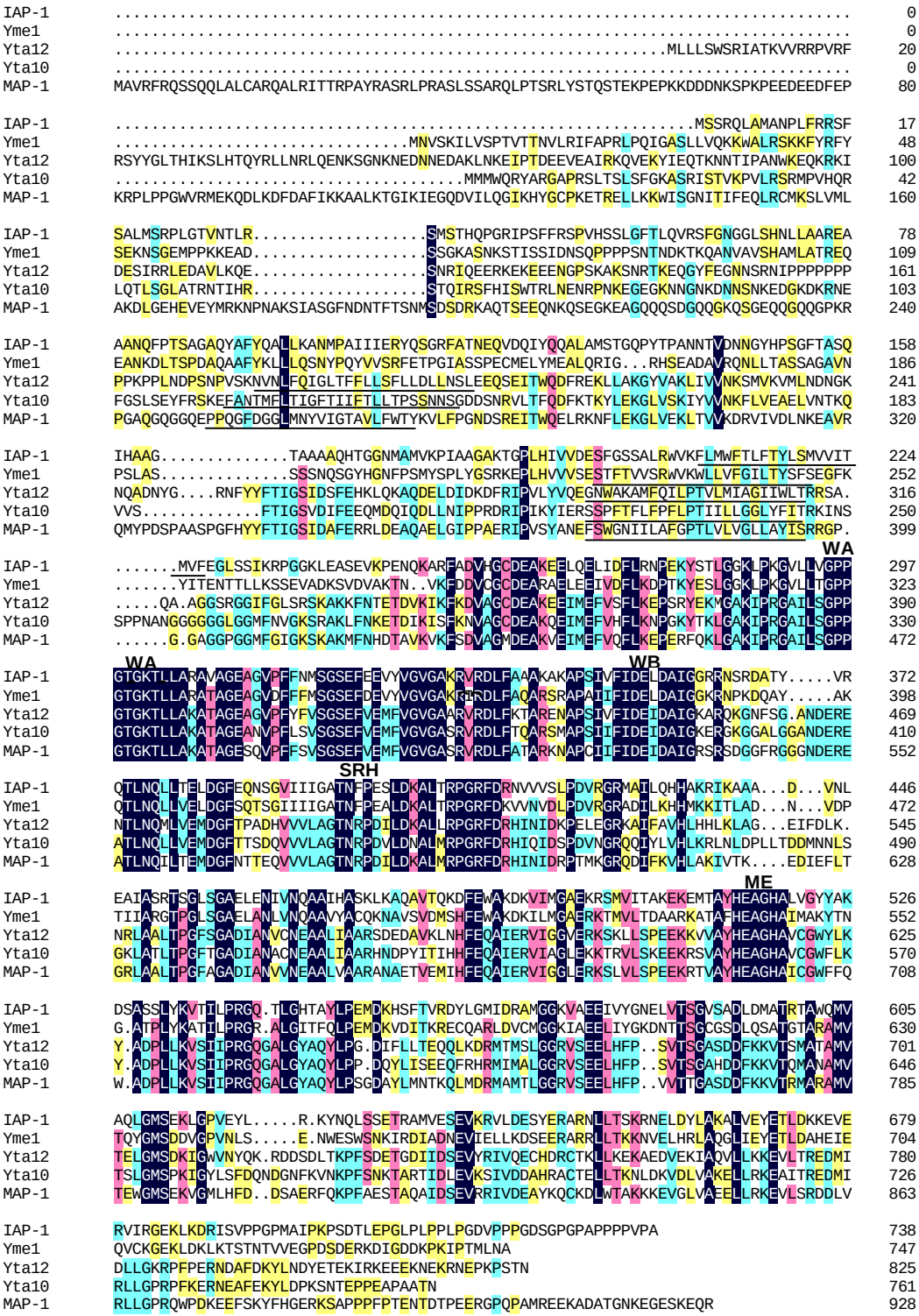

Abb. 7: Vergleich der Sequenzen der AAA-Proteasen aus *N. crassa* und *S. cerevisiae*

Translationsprodukts zeigte dagegen keine Ähnlichkeiten zu AAA-Proteasen. Das Plasmid CK2 enthielt eine unvollständige Sequenz, bei der der 5'-Bereich fehlte (Basenpaare: 549-2217 von *iap-1*) (Abb. 8).

Um das vollständige Gen zu erhalten, wurde die gDNA-Bibliothek pMOcosX (Orbach, 1994) mit Hilfe der 600 bp-Sonde untersucht. Diese Bibliothek besteht aus 30-40 kDa großen DNA-Fragmenten, die in den Vektor pMOcosX kloniert sind. Die Genbank stand bereits transformiert in *E. coli* zur Verfügung. Es wurden ungefähr 4 800 Klone untersucht, die auf LB^{Amp}-Platten ausgestrichen waren. Nach Übertragung der *E. coli*-Kolonien auf Nylonmembranen wurde ihre DNA darauf fixiert und mit der Sonde hybridisiert. Ein positiver Klon (G9:G8) konnte identifiziert werden (Abb. 8).

Zur leichteren Sequenzierung dieses Cosmids wurde zunächst der Teil des Inserts, der den gesuchten 5'-Genabschnitt enthielt, in den Vektor pBluescript II KS subkloniert. Dazu wurde das Cosmid mit den Restriktionsenzymen *SstII* und *PstI* verdaut (Abb. 8). Durch Southern-Blot Analyse (siehe 2.1.3.5) konnte mit Hilfe der Sonde ein ~2 000 bp großes DNA-Fragment isoliert werden (Abb. 8). Dieses wurde durch Ligation in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor kloniert. Das entstandene Plasmid G9:G8sub wurde sequenziert. Es enthielt die Promotorregion (Basenpaare:-612-0) wie auch den 5'- Bereich von *iap-1* (Abb. 8).

Abb. 7: Vergleich der Sequenzen der AAA-Proteasen aus *N. crassa* und *S. cerevisiae.*
Ein Sequenzvergleich von IAP-1 (gb: AF323913), MAP-1 (gb: AF323912), Yme1 (gb: 809589), Yta10 (gb: 603609) und Yta12 (gb: 807972) wurde mit Hilfe des Programms ClustalW (Version 1.8) hergestellt (gap opening penalty: 10; gap extension penalty: 0,05). Die in allen fünf Proteinsequenzen identischen Aminosäuren wurden weiß auf schwarz, die in drei oder vier Polypeptiden konservierten Aminosäuren schwarz auf grau dargestellt. Hochkonservierte Motive der AAA-Proteasen wurden wie folgt angegeben; WA: Walker A Box Region; WB: Walker B Box Region; SRH: second region of homology; ME: Metallbindungsstelle. Die auf der Grundlage von Hydrophobizitätsprofilen vorhergesagten Transmembranregionen wurden unterstrichen.

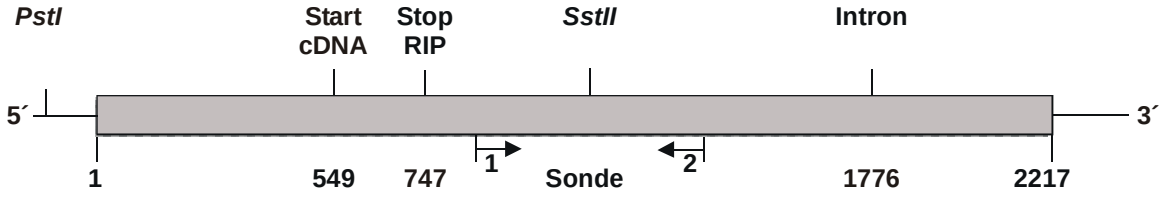

Abb. 8: Schematische Darstellung des Gens *iap-1.*
Dargestellt ist der Abschnitt aus dem Cosmid G9:G8 der *N. crassa* gDNA-Bibliothek pMOcosX, der das Protein IAP-1 kodiert. Die Lage des Introns, der Sonde, des Kettenabbruchs des Konstrukts *iap-1*^{RIP} ('Stop RIP') sowie das 5'-Ende des cDNA-Klons CK2 ('Start cDNA') sind an den entsprechenden Stellen eingezeichnet. Die Primerregionen zur Amplifizierung der Sonde für den Screen der DNA-Bibliothek sind durch Pfeile markiert ('1, 2'). (1) Primer gegen die Walker A Box Region (IAP-1-1). (2) Primer gegen die Metallbindungsstelle HEXXH (IAP-1-2). Die übrigen Zahlen geben die laufende Nummer des Basenpaars an der jeweiligen Stelle an.

Zur Charakterisierung des Gens wurde die gesamte Sequenz aus dem Cosmid G9:G8 durch PCR amplifiziert, in den Vektor pGEM4 kloniert (pGEM4-*iap-1*) und sequenziert. Das Gen enthält eine Intronsequenz von 60 bp Länge an Position 1776 bp. Es kodiert eine Polypeptidkette von 738 Aminosäuren, was einer geschätzten molekularen Masse von ~80 kDa entspricht (Abb. 7). Das Translationsprodukt enthält, wie MAP-1, eine AAA-Domäne und im C-terminalen Bereich das Metallbindungsmotiv HEXXH (Abb. 7). Auch das zweite neu identifizierte Protein kann daher der Familie der AAA-Proteasen in *N. crassa* zugerechnet werden. Sequenzvergleiche mit bekannten Mitgliedern aus anderen Organismen bestätigen diese Vorhersage (Abb 7). Die größte Sequenzähnlichkeit findet sich zu Yme1 aus *S. cerevisiae* mit 45,9% Identität (Abb. 7). In Analogie zu *map-1* wurde dieses Gen *iap-1* (für *i*ntermembranespace *A*AA-*p*rotease) genannt.

3.2.2 Charakterisierung der Proteine MAP-1 und IAP-1

3.2.2.1 Lokalisierung und Topologie

3.2.2.1.1 Import in isolierte Mitochondrien

Zur weiteren Charakterisierung der AAA-Proteasen MAP-1 und IAP-1 wurde ihre zelluläre Lokalisierung untersucht. Aufgrund der Ladungsverteilung in ihren N-terminalen Bereichen wurde für beide Proteine eine mitochondriale Präsequenz vorhergesagt. Um eine mitochondriale Lokalisierung zu bestätigen, wurden Importexperimente *in vitro* durchgeführt. MAP-1 und IAP-1 wurden *in vitro* transkribiert und in Gegenwart von ^{35}[S]-Methionin in Retikulozytenlysat translatiert (siehe 2.3.7). Die radioaktiven Translationsprodukte wurden 15 min bei 25°C in aus *N. crassa* isolierte Mitochondrien unter Zusatz eines ATP-regenerierenden Systems in Abhängigkeit des Membranpotentials importiert (Abb. 9). Dabei wurden die Vorstufenproteine, vermutlich durch MPP, zu einer reifen Form prozessiert, die vor extern zugegebener Proteinase K geschützt war (Abb. 9). MAP-1 und IAP-1 sind also beides kernkodierte Proteine, die mit Hilfe einer Präsequenz in Mitochondrien importiert werden. Eine mitochondriale Lokalisierung beider Proteine wurde auch durch Western-Blot Analysen von isolierten Mitochondrien mit spezifischen Antikörpern gegen MAP-1 und IAP-1 bestätigt (Abb. 10B, C).

Um eine Sortierungsfunktion des N-terminalen Bereichs von IAP-1 nachzuweisen, wurde auch die Importkompetenz einer verkürzten Form, IAP-1ΔN33, untersucht. Dieses Konstrukt akkumulierte auch in Gegenwart des Membranpotentials nicht in einer proteasegeschützten reifen Form. Der N-Terminus von IAP-1 enthält also eine mitochondriale Präsequenz, die offensichtlich für eine korrekte Sortierung notwendig ist (Abb. 9).

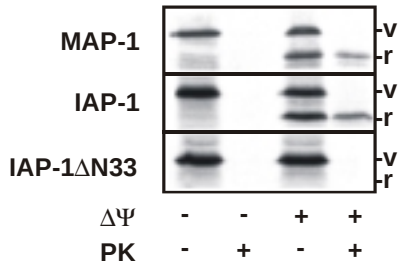

Abb. 9: Import von MAP-1 und IAP-1 in *N. crassa* Mitochondrien.
Isolierte Mitochondrien mit intaktem ('+ΔΨ') oder durch Zugabe eines Inhibitormixes (siehe 2.4.3) zerstörtem ('-ΔΨ') Membranpotential wurden 15 min bei 25°C mit den radioaktiv markierten Vorstufenproteinen MAP-1, IAP-1 und IAP-1ΔN33 inkubiert. Die Proben wurden halbiert und mit oder ohne Zusatz von Proteinase K ('-/+ PK') 30 min auf Eis belassen. Der Import der Proteine wurde anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.
v, Vorstufenprotein; r, reifes Protein.

3.2.2.1.2 Submitochondriale Lokalisierung und Topologie

Um eine Vorhersage über eine mögliche Topologie von MAP-1 und IAP-1 machen zu können, wurde zunächst das Hydrophobizitätsprofil der Polypeptide analysiert (Abb. 10A). Beide Proteine zeigen deutliche hydrophobe Abschnitte, was auf eine Lokalisierung in mitochondrialen Membranen hinweist. Im Gegensatz zu IAP-1, das nur eine hydrophobe Region im Bereich der Aminosäuren 208-227 zeigt, enthält MAP-1 zwei potentielle Transmembranregionen (Aminosäuren 251-273 und Aminosäuren 372-395) (Abb. 8, 10A). Diese Beobachtung deutet auf mögliche Unterschiede in der Topologie beider Proteine hin.

Um die Vorhersagen aus dem Hydrophobizitätsprofil zu bestätigen, wurde zunächst die Löslichkeit von MAP-1 und IAP-1 in 0,1 M Na_2CO_3, pH 11,5 untersucht (Carbonatextraktion; siehe 2.4.4). Unter diesen Bedingungen lösen sich lösliche und periphere Membranproteine, während integrale Membranproteine in der Membran verankert bleiben. MAP-1 und IAP-1, wie auch das integrale Membranprotein ADP/ATP-Carrier (AAC), konnten unter diesen Bedingungen nicht extrahiert werden und befanden sich in der unlöslichen Fraktion (Abb. 10B). Im Gegensatz dazu wurde lösliches MPP

nach der Carbonatextraktion im Überstand detektiert (Abb. 10B).

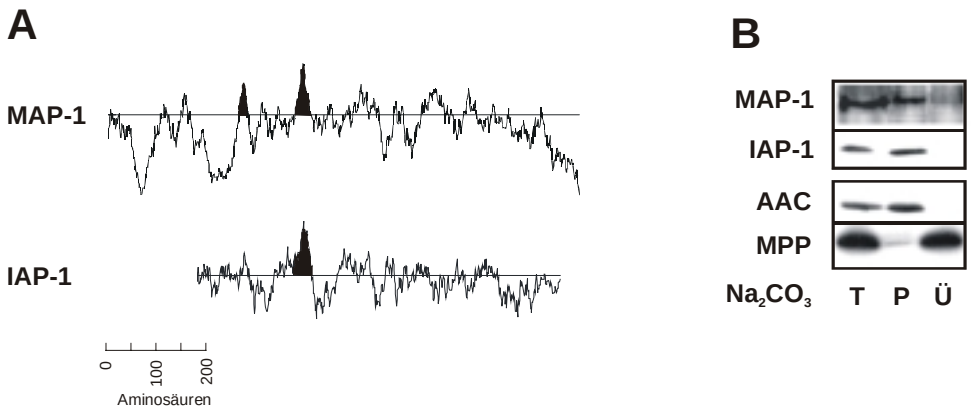

Abb. 10: Submitochondriale Lokalisierung von MAP-1 und IAP-1.
(A) Hydrophobizitätsprofil von MAP-1 und IAP-1. Das Hydrophobizitätsprofil von MAP-1 und IAP-1 wurde mit Hilfe der DNAMAN-Software (Lynnon BioSoft; Version 4.1) analysiert. Die Fenstergröße betrug 15 Aminosäurereste. Hydrophobe Bereiche, die potentielle Transmembranregionen darstellen, sind schwarz markiert.
(B) Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranen. *N. crassa* Mitochondrien (100 µg) wurden 30 min mit 0,1 M Na_2CO_3, pH 11,5 inkubiert und eine Kontrolle ('T') abgenommen. Der Rest der Probe wurde durch Zentrifugation (226 000 *g*; 30 min; 4°C) in eine lösliche ('Ü') und unlösliche ('P') Fraktion geteilt. Alle Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert. MPP und AAC wurden als Marker für lösliche bzw. membrangebundene Proteine verwendet.

Zur Bestimmung der Topologie von MAP-1 und IAP-1 wurde eine Digitoninfraktionierung durchgeführt (siehe 2.4.2.3). Hierbei wurden isolierte Mitochondrien mit ansteigenden Konzentrationen Digitonin lysiert und dadurch schrittweise zuerst die Außenmembranen und durch Zugabe von 0,17% Triton X-100 auch die Innenmembranen geöffnet. Die durch die Lyse zugänglich gemachten Proteine wurden von Proteinase K verdaut. MAP-1 und IAP-1 waren, im Gegensatz zu dem Markerprotein der Außenmembran Tom22, in intakten Mitochondrien vor dem Angriff der Protease geschützt (Abb. 10C). Erst nach Öffnung der Außenmembran konnte IAP-1, wie auch das Intermembranraumprotein Cytochrom-c_1-

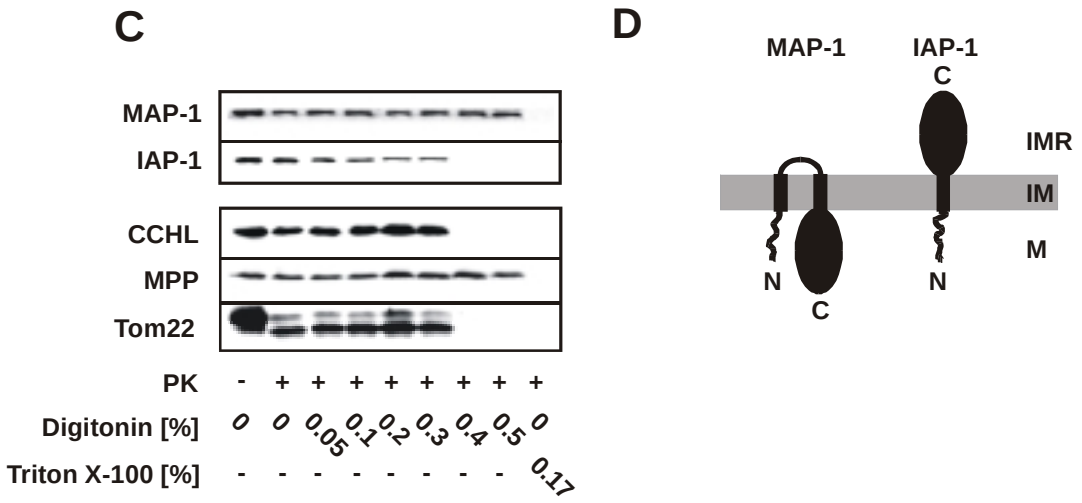

Abb. 10: Submitochondriale Lokalisierung von MAP-1 und IAP-1.
(C) Digitoninfraktionierung der Mitochondrien. Isolierte *N. crassa* Mitochondrien wurden mit ansteigenden Konzentrationen Digitonin (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5% (m/v)) oder 0,17% (v/v) Triton X-100 schrittweise fraktioniert und die Resistenz der Proteine gegenüber Proteinase K ('+PK') (100 µg/ml) untersucht (siehe 2.4.2.3). Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Folgende Markerproteine wurden verwendet: Tom22, Außenmembran; CCHL, Intermembranraum; MPP, Matrix. Dieses Experiment wurde von H. Prokisch mit dem von mir hergestellten spezifischen IAP-1 Antikörper durchgeführt.
(D) Modell für die Topologie von MAP-1 und IAP-1 in der mitochondrialen Innenmembran von *N. crassa.* N, N-Terminus; C, C-Terminus; IMR, Intermembranraum; IM, Innenmembran; M, Matrix.

Hämlyase von der Protease verdaut werden (Abb. 10C). MAP-1 dagegen wurde erst nach vollständiger Lyse der Innenmembran zugänglich für die Protease. Diese Eigenschaft zeigte auch das Matrixprotein MPP (Abb. 10C). MAP-1 und IAP-1 sind also Proteine der Innenmembran, unterscheiden sich jedoch in ihrer Topologie. IAP-1 enthält vermutlich nur eine Transmembranregion. Der C-Terminus (56 kDa) ist Bestandteil des Intermembranraums (für die Analyse der Digitoninfraktionierung wurde ein Antikörper gegen ein C-terminals Peptid verwendet). Es zeigt also eine C-*out*-N-*in* Orientierung (Abb. 10D). MAP-1 dagegen enthält vermutlich zwei Transmembrandomänen. Bei intakter Innenmembran ist es vollständig gegen Proteinase K geschützt. Der kürzere N-Terminus (28 kDa), wie auch der größere C-Terminus (59 kDa), reichen in die Matrix, wobei beide Transmembrandomänen in der Innenmembran

verankert sind (Abb. 10D).

3.2.2.2 Bestimmung der nativen Molekulargewichte

Das native Molekulargewicht der beiden neu identifizierten Proteine wurde durch Gelfiltrationsanalyse bestimmt. Dazu wurden isolierte Mitochondrien in 1% Triton X-100 solubilisiert und die Extrakte über eine Superose 6-Säule nach ihrer Größe aufgetrennt. In den eluierten Fraktionen wurden MAP-1 und IAP-1 durch Immundekoration mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. In Gegenwart von ATP eluierte MAP-1 in hochmolekularen Komplexen von ~1 000 kDa (Abb. 11A), was einem Vielfachen seines monomeren Gewichts von ~100 kDa entspricht. Die Ausbildung dieses Komplexes ist ATP-abhängig. Nach Depletion von ATP durch Zugabe von Apyrase dissoziiert er vollständig in eine kleinere oligomere Form von etwa 300 kDa (Abb. 11A). Im Gegensatz zu MAP-1 eluiert IAP-1 in zwei Peaks, die molekularen Massen von >1 000 kDa und ~300 kDa entsprechen (Abb. 11B). Auch hier kann eine Destabilisierung des >1 000 kDa Komplexes in Abwesenheit von ATP beobachtet werden (Abb. 11B). Es kommt aber, anders als bei MAP-1, zu keiner vollständigen Dissoziation. MAP-1 und IAP-1 bilden also beide hochmolekulare Komplexe von ähnlicher Größe.

Sowohl das geringfügig unterschiedliche Elutionsverhalten, wie auch die Unterschiede der Stabilität in Abwesenheit von ATP weisen darauf hin, daß beide Proteine zwei voneinander unabhängige Multimere bilden. Um diese Hypothese experimentell zu bestätigen, wurde das Molekulargewicht des MAP-1-Komplexes in Zellen einer *iap-1*-Disruptionsmutante (*iap-1*^{RIP}) (siehe 2.2.2.5) untersucht. Von diesem Stamm wurden Mitochondrien

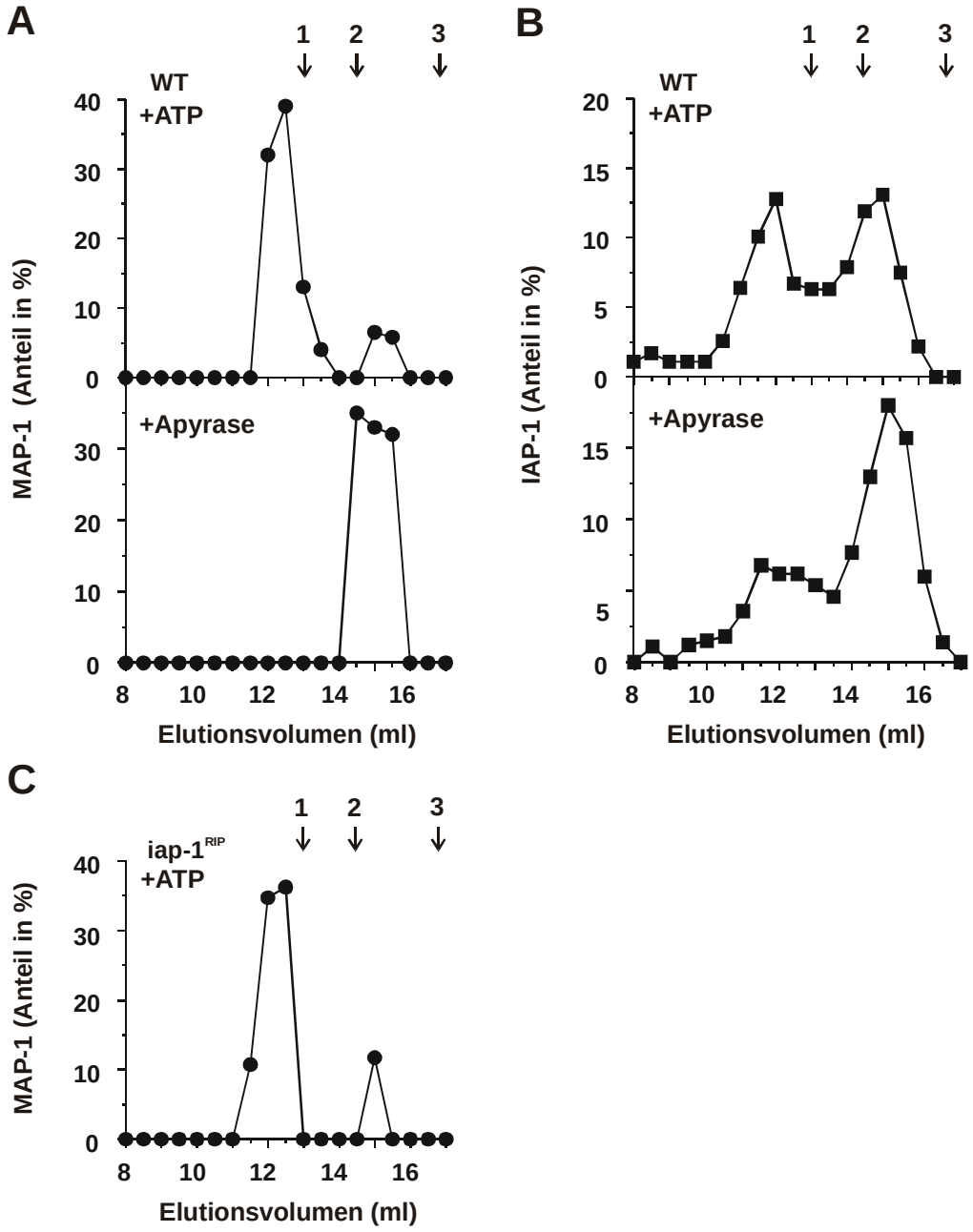

Abb. 11: Bestimmung des nativen Molekulargewichts von MAP-1 und IAP-1 in Abhängigkeit von ATP im Wildtyp- und *iap-1*^{RIP}-Stamm.
Isolierte Mitochondrien des Wildtypstamms ('WT') **(A, B)** und des *iap-1*^{RIP}- Stamms **(C)** (2 mg) wurden in 1% (v/v) Triton X-100, 30 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM KAc, 4 mM $MgAc_2$, 1 mM PMSF und, wenn angegeben, 1 mM ATP ('+ATP') unter heftigem Schütteln bei 4°C 15 min lysiert (Proteinkonzentration: 3 mg/ml). Anschließend wurden die Proben 15 min bei 25°C in Gegenwart oder Abwesenheit von Apyrase (5 U/ml) ('+Apyrase' bzw. '+ATP') inkubiert und die Proteinkomplexe mittels einer Superose 6-Gelfiltrationssäule, die mit Lysepuffer, der 0,1 % (v/v) Triton X-100 enthielt, äquilibriert war, aufgetrennt. Das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt, die Proteine mit TCA (12,5%) ausgefällt und mit Hilfe der SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die Menge an Protein wurde durch Densitometrie bestimmt und auf die gesamte eluierte Menge des jeweiligen Proteins normiert. Folgende Proteinkomplexe wurden zur Eichung der Säule verwendet: (1) Hsp60 (850 kDa); (2) Apoferritin (443 kDa), (3) Alkoholdehydrogenase (150 kDa).

isoliert und, wie oben beschrieben, Gelfiltrationsanalysen durchgeführt. MAP-1 bildete auch in Abwesenheit von IAP-1 Komplexe von ~1 000 kDa und ~300 kDa (+ATP) bzw. nur ~300 kDa (-ATP) wie in Wildtyp-mitochondrien (Abb. 11C, ohne Abb.). Diese Befunde belegen, daß die Assemblierung des MAP-1-Komplexes unabhängig von IAP-1 erfolgt.

3.2.3 Funktionen von IAP-1 in *N. crassa*

3.2.3.1 Disruption von *iap-1* durch »repeat-induced point mutation« (RIP)

Um einen Einblick in die Funktion von IAP-1 zu erhalten, wurde ein Disruptionsstamm des entsprechenden Gens hergestellt. Dazu wurde die Technik der »*r*epeat-*i*nduced *p*oint mutation« (RIP) verwendet (Cambareri *et al*., 1989; Selker, 1990). In *N. crassa* werden duplizierte DNA-Sequenzen während des sexuellen Vermehrungszyklus erkannt und verändert. Dabei kommt es spontan zum Austausch von AT- zu GC-Paaren in beiden vorliegenden Kopien der DNA, was in der Regel zu Kettenabbrüchen innerhalb des Translationsprodukts führt (Cambareri *et al*., 1989; Selker, 1990). Dieser Mechanismus kann zur Disruption von Genen eingesetzt werden.

Zunächst wurde das Plasmid pCB1179-*iap*-1 (siehe 2.1.4.2.9), das eine Kopie des Wildtypgens und ein Hygromycin-Resistenzgen zur Selektion enthielt, in den Wildtypstamm *St. Lawrence 74A* transformiert (siehe 2.2.2.5) und die positiven Klone durch Southern-Blot Analyse (siehe 2.1.3.5) identifiziert. Homokaryontische Mikrokonidien (siehe 2.2.2.2.3) eines Klons, der nun zwei Kopien des *iap*-1-Gens enthielt, wurden anschließend mit dem isogenen Wildtypstamm *K93α* gekreuzt (siehe 2.2.2.5). 60 Ascosporen wurden isoliert, auf MIN-Medium angezogen und mit Hilfe der Immundekoration auf eine Disruption von *iap-1* überprüft.

Ein positiver Klon wurde identifiziert *(iap-1^{RIP}*). Das enthaltene *iap*-1-Allel wurde über PCR amplifiziert und seine Sequenz bestimmt. Es enthielt mehrere Punktmutationen, die unter anderem zu einem Kettenabbruch des Translationsprodukts nach Aminosäure 249 (kurz nach der Transmembranregion) führten. Das Translationsprodukt des mutierten Allels enthält also weder die AAA- noch die proteolytische Domäne und kann daher als vollständige Disruption des Proteins angesehen werden.

3.2.3.2 Wachstumsphänotyp des Stamms *iap-1^{RIP}* unter Hitzestreß

Um einen ersten Hinweis auf die Funktion von IAP-1 in *N. crassa* zu erhalten, wurde zunächst das Längenwachstum der Hyphen des Wildtyp- bzw. *iap-1^{RIP}*-Stamms in geeigneten Wachstumsröhrchen (sogenannten »Racing tubes«) auf verschiedenen Kohlenstoffquellen bestimmt (Abb. 12). Auf Glukosemedien konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und der Mutante bei allen untersuchten Temperaturen festgestellt werden (ohne Abb.). Ein vergleichbares Wachstum der Hyphen zeigte sich auch bei Glyzerin- oder Azetat als Kohlenstoffquellen bei 12°C oder 20°C (Abb. 12). Eine Inkubation bei 40°C auf diesen Medien führte jedoch nach etwa zwei Tagen zu einem starken Wachstumsrückgang des mutierten Stamms (Abb. 12).

Um sicherzustellen, daß dieser Phänotyp auf den Verlust des *iap-1*-Gens zurückzuführen ist, wurde der Stamm *iap-1^{RIP}* mit dem Plasmid pCB1179-*iap-1* transformiert (siehe 2.2.2.2). Dieses Plasmid enthält das Wildtypgen unter Kontrolle des Chinasäurepromotors *qa2* von *N. crassa*. IAP-1 akkumulierte in etwa der gleichen Menge wie im Wildtypstamm und unterdrückte den Wachstumsphänotyp der *iap-1^{RIP}*-Mutante (Abb. 12). Die Hemmung des Wachstums bei 40°C auf Glyzerin- oder Azetatmedien ist somit auf den Verlust von IAP-1 zurückzuführen.

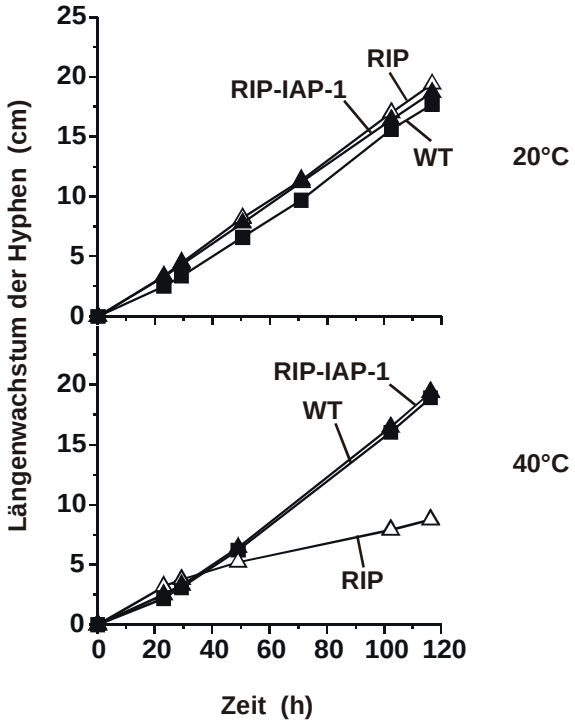

Abb. 12: Wachstumsphänotyp des *iap-1*^{RIP}-Stamms unter Hitzestreß.
Mit Azetatmedium gefüllte »Racing tubes« wurden an einem Ende mit Konidien des Wildtyp- ('WT'), *iap-1*^{RIP}- ('RIP'), oder *iap-1*^{RIP}-*iap-1* ('RIP-IAP-1') -Stamms angeimpft und bei 20°C oder 40°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils das Längenwachstum der Hyphen durch Ausmessen bestimmt.

3.2.3.3 Morphologie der Mitochondrien

Die Disruption von Yme1 in *S. cerevisiae* führt zur Veränderung der Morphologie der Mitochondrien. H. Prokisch untersuchte daher für meine Arbeit auch die Morphologie der Mitochondrien bei *N. crassa*. Dazu wurden die Hyphen eines Wildtyp- und *iap-1*^{RIP}-Stamms mit dem für Mitochondrien spezifischen Farbstoffen $DiOC_6$ und Rhodamin-B-Hexylester (Prokisch *et al.*, 2000) angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es konnte kein Unterschied in der Morphologie der Organellen zwischen den beiden Stämmen beobachtet

werden (ohne Abb.).

3.2.3.4 Abbau von Membranproteinen durch die Protease IAP-1

Die Aminosäuresequenz von IAP-1 enthält das für Metalloproteasen typische Motiv HEXXH (Abb. 8), was eine proteolytische Funktion nahelegt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Abbau zweier Modellproteine der mitochondrialen Innenmembran durch IAP-1 untersucht. Als Substrate wurden verkürzte Versionen des Proteins Yme2 aus *S. cerevisiae* verwendet. Yme2 stellt ein mitochondriales Innenmembranprotein mit einer Transmembranregion und Domänen auf beiden Seiten der Membran dar (Hanekamp und Thorsness, 1996). Die Domäne des Intermembranraums war in dem Konstrukt Yme2ΔC23, die Domäne der Matrix in dem Konstrukt Yme2ΔN33, weitestgehend deletiert (Abb. 13A) (Leonhard *et al*., 2000). In Mitochondrien von *S. cerevisiae* ist gezeigt, daß Yme2ΔN33 von beiden, der *m*- und *i*-AAA-Protease hydrolysiert wird. Im Gegensatz dazu ist die Größe der verbleibenden Intermembranraumdomäne des Konstrukts Yme2ΔC23 nicht ausreichend, um von der *i*-AAA-Protease angegriffen werden zu können. Dieses Konstrukt wird daher ausschließlich durch die *m*-AAA-Protease verdaut (Leonhard *et al*., 2000).

Beide Polypeptide wurden zunächst in Retikulozytenlysat in Gegenwart von ^{35}[S]-Methionin synthetisiert. Die Vorstufenproteine wurden nachfolgend in isolierte Mitochondrien des Wildtyp- und *iap-1*^{RIP}-Stamms 15 min bei 25°C importiert. Während einer sich anschließenden Inkubation der Proben bei 37°C wurden in Wildtypmitochondrien beide Proteine abgebaut (Abb. 13B, C). Dagegen war das Substrat Yme2ΔN33 in Abwesenheit von IAP-1 weitestgehend stabilisiert (Abb. 13B). Interessanterweise war kein Einfluß der Disruption von *iap-1* auf die

Stabilität des Substrats Yme2ΔC23 zu beobachten (Abb. 13C). Diese Experimente zeigen eine essentielle Funktion von IAP-1 für einen effizienten Abbau fehlgefalteter Innenmembranproteine, die eine Domäne im Intermembranraum exponieren.

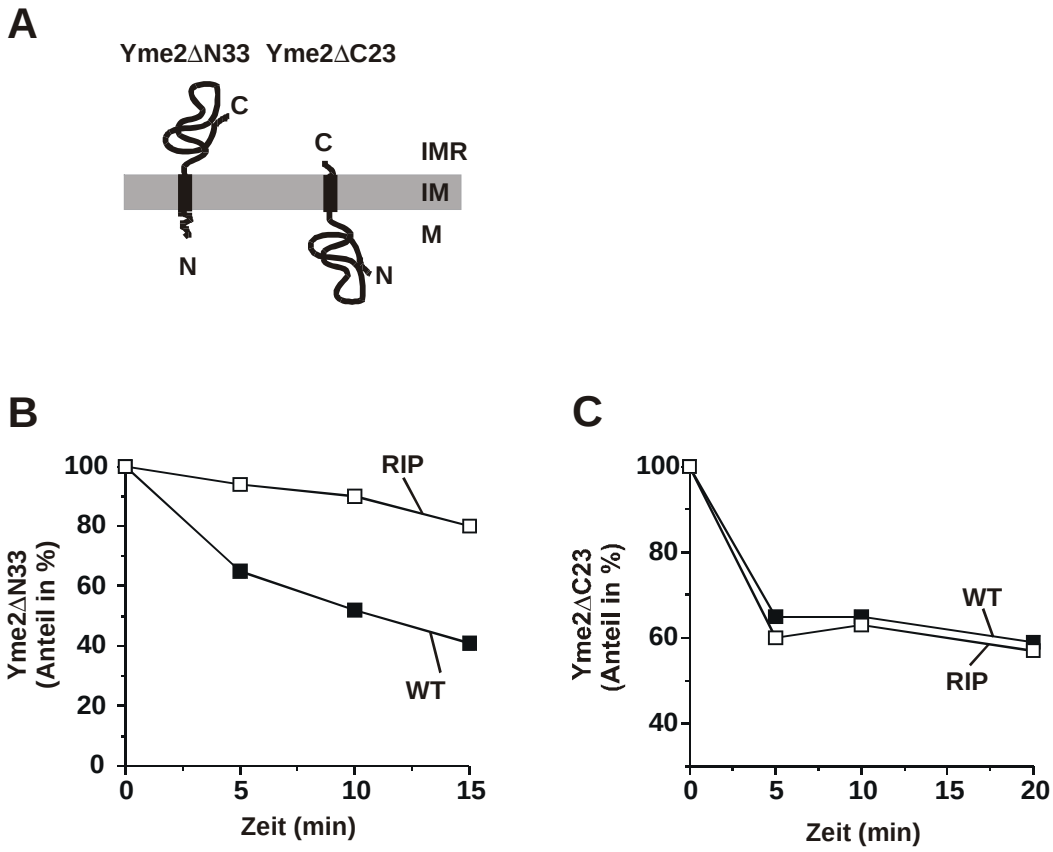

Abb. 13: Abbau der Proteine Yme2ΔN33 und Yme2ΔC23.
(A) Topologie der Proteine Yme2ΔN33 und Yme2ΔC23. N, N-Terminus, C, C-Terminus; IMR, Intermembranraum, IM, Innenmembran; M, Matrix.
(B, C) Stabilität der Innenmembranproteine Yme2ΔN33 und Yme2ΔC23 in *iap-1*^{RIP}-Mitochondrien. Radioaktiv markiertes Yme2ΔN33 **(B)** oder Yme2ΔC23 **(C)** wurden in isolierte Mitochondrien des Wildtyp- ('WT') und *iap-1*^{RIP} ('RIP') -Stamms 15 min bei 25°C importiert. Nach Verdau der nicht importierten Vorstufenproteine mit Proteinase K (50 µg/ml) wurden die Mitochondrien für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C inkubiert, um den Abbau der Modellsubstrate zu induzieren. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Menge an nicht abgebautem Substrat wurde mit Hilfe eines Phosphoimagersystems quantifiziert und auf den Nullwert normiert.

3.2.4 Komplementationsstudien von Yme1 durch IAP-1 in *S. cerevisiae*

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit und der konservierten Topologie in der Innenmembran der Mitochondrien von Yme1 aus *S. cerevisiae* (Campbell *et al*., 1994; Leonhard *et al*., 2000; Thorsness *et al*., 1993) und IAP-1 aus *N. crassa* stellte sich die Frage, inwieweit diese Proteine auch funktionelle Orthologe darstellen. Daher wurden Komplementationsstudien in Hefe durchgeführt.

3.2.4.1 Import von IAP-1 und IAP-1* in isolierte Mitochondrien von *S. cerevisiae*

Zunächst wurde untersucht, ob die Präsequenz von IAP-1 die Sortierung des Proteins zu den Mitochondrien in *S. cerevisiae* gewährleistet. Dies wurde *in vitro* durch Import der radioaktiv markierten Vorstufenproteine Yme1 und IAP-1 in isolierte Mitochondrien von *S. cerevisiae* überprüft (siehe 2.4.3). Im Gegensatz zu Yme1, das effizient in eine reife protease-geschützte Form überführt wurde, akkumulierten nur geringe Mengen an proteaseresistentem IAP-1 (Abb. 14A). Die Präsequenz von IAP-1 scheint also keine effiziente Translokation des Proteins in Mitochondrien von *S. cerevisiae* zu gewährleisten. Daher wurde ein Fusionsprotein (IAP-1*) bestehend aus dem N-Terminus von Yme1, der die Präsequenz und zwei weitere Aminosäurereste (Aminosäurereste 1-49) enthält, und dem reifen IAP-1 (Aminosäurereste 62-738), hergestellt (siehe 2.1.4.2.7). Radioaktiv markiertes IAP-1* wurde, ähnlich wie Yme1, effizient in Mitochondrien aus *S. cerevisiae* importiert und zu einer reifen Form mit einer molekularen Masse von etwa ~70 kDa prozessiert (Abb. 14A). Der Import erfolgte in Abhängigkeit des Membranpotentials über die Innenmembran.

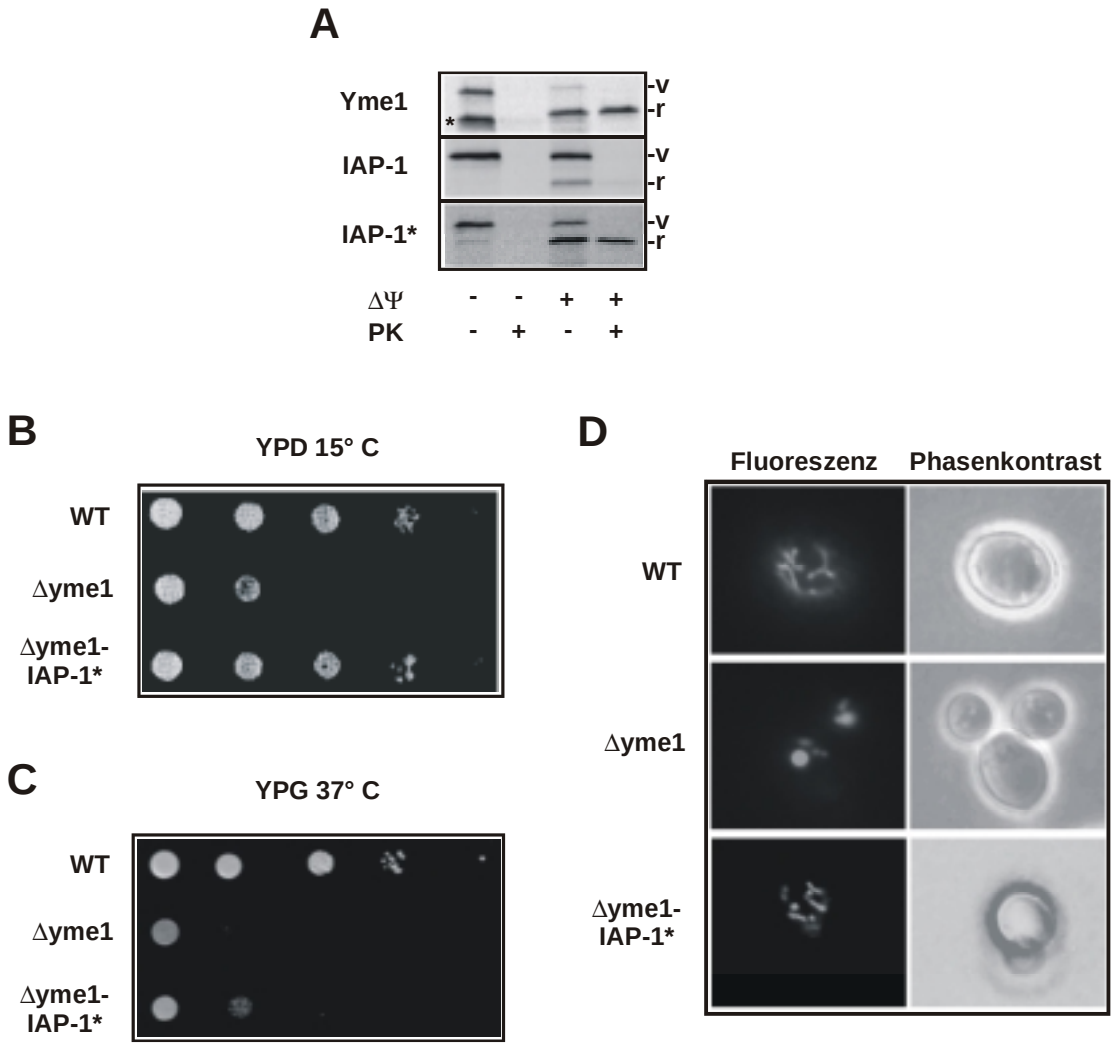

Abb. 14: Komplementation von Yme1 durch IAP-1.

(A) Import von IAP-1 und Yme1 in *S. cerevisiae* Mitochondrien. Isolierte Mitochondrien von *S. cerevisiae* wurden mit radioaktiv markiertem Yme1, IAP-1 und IAP-1* 15 min bei 25°C in Gegenwart ('+ΔΨ') oder Abwesenheit ('-ΔΨ') eines Membranpotentials inkubiert. Nicht importiertes Protein wurde durch Zugabe von PK verdaut ('+PK') und die Proben mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Ein N-terminal verkürztes Yme1-Konstrukt, das vermutlich durch ein internes Startkodon während der *in vitro* Translation gebildet wird und etwas schneller als das reife Yme1-Protein im Gel läuft, ist mit einem Stern gekennzeichnet. v, Vorstufenprotein; r, reifes Protein.
(B, C) Partielle Komplementation des Wachstumsphänotyps des *Δyme1*-Stamms durch Expression von IAP-1*. Wildtyp- ('WT'), *Δyme1*- und *Δyme1*-Zellen, die IAP-1* exprimieren (*'Δyme1-IAP-1*'*) wurden bis zur mittleren logarithmischen Phase in einer YPD-Flüssigkultur kultiviert und eine Verdünnungsreihe (1:10) hergestellt (siehe 2.2.1.1). Je 3 µl einer Probe wurden auf YP-Medium, das 2% (m/v) Glukose oder 3% (m/v) Glyzerin enthielt, aufgebracht und 7 bzw. 4 Tage bei 15°C **(B)** oder 37°C **(C)** inkubiert.
(D) Mitochondriale Morphologie des *Δyme1*-Stamms nach Expression von IAP-1*. GFP, fusioniert mit der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 der F_1F_0-ATPase, wurde in Wildtyp- ('WT'), *Δyme1*- und *Δyme1-IAP-1**-Zellen exprimiert. Die Stämme wurden auf YPD-Medium angezogen und mit Hilfe der Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Diese Bilder wurden von H. Prokisch für die vorliegende Arbeit fotografiert.

3.2.4.2 Komplementation des Wachstumsphänotyps in *S. cerevisiae*

Um eine Expression in Hefe zu ermöglichen, wurde zunächst das Fusionsprotein IAP-1* in den Vektor pRS314 unter die Kontrolle des endogenen *YME1*-Promotors kloniert (siehe 2.1.4.2.7). Dieser Expressionsvektor liegt in einfacher Kopie in der Zelle vor. Es ist daher ein Expressionsniveau des Fusionsproteins, das der endogenen Protease ähnlich ist, zu erwarten. Das Konstrukt wurde in *Δyme1*-Zellen von *S. cerevisiae* transformiert und die Expression durch Immundekoration überprüft.

Zunächst wurde die Komplementation der Wachstumsphänotypen bei 15°C auf glukosehaltigen und bei 37°C auf glyzerinhaltigen Medium untersucht. Durch die Expression von IAP-1* konnte der kältesensitive Phänotyp der *Δyme1*-Deletionsmutante unterdrückt werden (Abb. 14B). Dies zeigt eine funktionelle Konservierung der beiden Homologen. Im Gegensatz dazu wurde allerdings kein Wachstum des Stammes *Δyme1-iap-1** auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffen bei 37°C beobachtet (Abb. 14C). Möglicherweise war das Ausmaß der Expression für die Komplementation der Funktionen bei 37° in diesem Stamm zu gering. Zur stärkeren Expression wurde IAP-1* daher zusätzlich unter die Kontrolle des konstitutiven Promotors *ADH1* in den Stamm *Δyme1* transformiert (*Δyme1-ADH1-iap-1**) (siehe 2.1.4.2.8). Obwohl die Menge an exprimierter Protease in diesen Zellen ~20-fach erhöht war, wurde der thermosensitive Phänotyp der *Δyme1*-Zellen auf Glyzerin nicht unterdrückt (ohne Abb.). Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß die beiden Homologe aus *S. cerevisiae* und *N. crassa* überlappende aber nicht identische Funktionen in der Zelle innehaben.

3.2.4.3 Komplementation der mitochondrialen Morphologie in *S. cerevisiae*

Der Verlust von Yme1 in *S. cerevisiae* führt zur Veränderung der Morphologie der Mitochondrien (Campbell *et al*., 1994). In Wildtypzellen finden sich viele relativ kleine fadenförmige Organellen, die über die ganze Zelle verteilt sind (Abb. 14D). Dagegen verschmelzen in einem *Δyme1*-Stamm die Mitochondrien zu wenigen großen, runden Strukturen (Abb. 14D). In Kooperation mit H. Prokisch wurde die Komplementation dieses Phänotyps durch die Expression von IAP-1* untersucht. Zur Darstellung der Mitochondrien wurden die Zellen der Wildtyp-, *Δyme1*- und *Δyme1-iap-1**-Stämme mit dem Plasmid pVTU100-*mtGFP* transformiert, das das Fusionsprotein Su9(1-69)-GFP unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimiert (Westermann und Neupert, 2000). Aufgrund der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 der F_1F_0-ATPase wird GFP (*g*reen *f*luorsescent *p*rotein) *in vivo* in Mitochondrien importiert. Diese können dann unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Die Expression des Fusionsproteins IAP-1* zeigte eine deutliche Veränderung der Morphologie im Vergleich zum Deletionsstamm (Abb. 14D); kleine Mitochondrien verteilten sich über die ganze Zelle, jedoch ohne ein richtiges Netzwerk wie im Wildtyp auszubilden. Dieses Experiment zeigt, daß IAP-1*, zumindest teilweise, Funktionen zur Erhaltung mitochondrialer Strukturen in Hefe übernehmen kann, obwohl ein vergleichbarer Phänotyp in *N. crassa* nicht beobachtet wird.

3.3 Untersuchungen zur Oligomerisierung der *i*-AAA-Protease Yme1 aus *S. cerevisiae*

ATP-abhängige Proteasen, wie z. B. das Proteasom oder die ClpP- und HslVU-Proteasen, bilden Minikompartimente, in deren Inneren die Proteolyse der Substrate erfolgt (Schmidt *et al*., 1999). Auch AAA-Proteasen assemblieren zu hochmolekularen Komplexen. Dies läßt die Ausbildung ähnlicher proteolytischer Kompartimente vermuten. Um die Bedeutung der Oligomerisierung für diese Proteinfamilie näher zu untersuchen, wurde im Folgenden eine Struktur-Funktionsanalyse am Beispiel der *i*-AAA-Protease aus *S. cerevisiae* durchgeführt.

3.3.1 Untersuchungen zur Oligomerisierung von Yme1 am isolierten Komplex

3.3.1.1 Reinigung von Yme1 als heterolog exprimiertes MBP-Fusionsprotein

Zunächst mußte ein Expressions- und Reinigungssystem etabliert werden, das die Isolierung des aktiven Yme1-Komplexes ermöglichte. Folgende Eigenschaften des Proteins waren dabei besonders zu berücksichtigen: Zum einen wird Yme1 nur gering in der Zelle exprimiert; zum anderen ist es ein integrales Membranprotein. Beide Eigenschaften erschweren die Reinigung eines Proteins. Für eine erfolgreiche Isolierung des Komplexes war daher die Wahl eines geeigneten Organismus für die Expression von besonderer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Systeme untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei einer Reinigung von Yme1 aus *S. cerevisiae* bzw. von IAP-1 aus *N. crassa* die oben beschriebenen Probleme nicht gelöst werden konnten. Mit zunehmender Reinheit des Komplexes stieg seine Tendenz zur

Aggregation. Darüber hinaus wurde auch bei Verwendung induzierbarer Promotoren keine Überexpression erreicht.

Als ein Ausweg erwies sich die heterologe Expression von Yme1 als MBP-Fusionsprotein in *E. coli*, das zusätzlich eine Hexahistidinsequenz am C-Terminus enthielt. Die Fusion mit MBP (*M*altose-*B*indungs-*P*rotein), einem sehr gut löslichen etwa 40 kDa großen Polypeptid, ergab zwei Vorteile: zum einen zeigte sich, daß das Hybridprotein eine im Vergleich zu Yme1 erhöhte Löslichkeit aufwies; zum anderen konnte MBP-Yme1 als Hybridprotein schnell und effizient aufgereinigt werden.

Die Reinigung des Komplexes erfolgte in zwei Schritten (siehe 2.3.9): Zunächst wurde eine Affinitätschromatographie mit Hilfe einer Amylose-Matrix durchgeführt. Nach diesem Reinigungsschritt war der Komplex auf ~45%, bezogen auf die Gesamtproteinmenge im Eluat, angereichert (Abb. 15). Ein großer Teil der verbleibenden Verunreinigungen, insbesondere die Hauptbande bei ~60 kDa, reagierten mit spezifischen gegen den N-Terminus bzw. der AAA-Domänen von Yme1 gerichteten Antikörpern und stellen daher vermutlich N-terminale Abbauprodukte dar (ohne Abbildung). Diese Fragmente konnten weder durch die Verwendung des proteasedefizienten *E. coli*-Stamms BL21(DE3) noch durch veränderte Expressionsbedingungen (z. B. Erniedrigung der Wachstumstemperatur während der Expression) reduziert werden (ohne Abbildungen). Um diese Verunreinigungen abzutrennen, wurde das Eluat der Amylosesäule in einem zweiten Reinigungsschritt an eine Ni-NTA-Matrix gebunden. Da das Hexahistidinpeptid am C-terminalen Ende von MBP-Yme1 gebunden war, können Abbauprodukte mit fehlendem C-Terminus nicht mehr an dieser Matrix binden und somit leicht abgetrennt werden. Die Reinheit des Proteins wurde dadurch auf ~70% erhöht, wobei ein Großteil der verbleibenden Verunreinigungen immer noch mit den spezifischen Antikörpern gegen Yme1 reagierten.

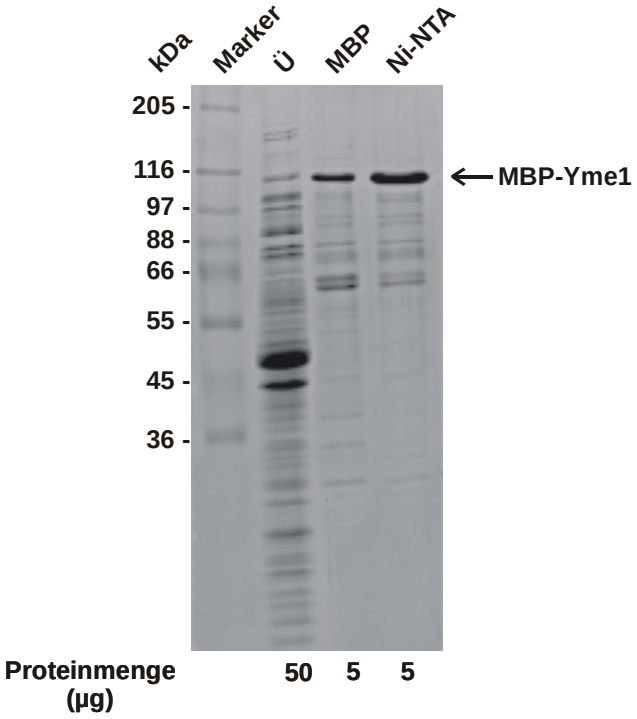

Abb. 15: Reinigung von Yme1.
E. coli-Zellen, die das Plasmid pMAL-cRI-*YME1* enthielten, wurden eine Stunde in LB-Medium, dem Ampicillin (100 µg/ml) und IPTG (2 mM) zugesetzt war, kultiviert, geerntet und die Membranen durch Beschallen aufgebrochen (siehe 2.3.9). Unlösliche Membranbruchstücke wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand auf eine Amylosematrix geladen. Das Eluat der Säule wurde in einem zweiten Schritt mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie weiter gereinigt. Das isolierte Protein wurde über Nacht gegen den Puffer 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 150 mM KAc, 10% (v/v) Glyzerin dialysiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und durch Anfärben mit Coomassie Blau analysiert. Ü, Überstand nach Lyse der Zellen; MBP, Eluat der Amylosesäule; Ni-NTA, Eluat der Ni-NTA-Säule; Proteinmenge, pro Spur geladene Proteinmenge.

3.3.1.2 Bestimmung des nativen Molekulargewichts von MBP-Yme1

Um die Oligomerisierung des heterolog exprimierten Hybridproteins zu untersuchen, wurden nach Expression von MBP-Yme1 in *E. coli*-Zellen, die löslichen Proteine eines Zellextrakts mit Hilfe einer Superose 6-Säule nach ihren nativen Molekulargewichten aufgetrennt. MBP-Yme1 eluierte in einem hochmolekularen Komplex von >1 500 kDa, ähnlich der *i*-AAA-Protease (Abb. 16A). Die etwa um 500 kDa größere molekulare Masse des

heterolog exprimierten Komplexes stimmt mit der größeren molekularen Masse von 40 kDa des Protomers von MBP-Yme1 gut überein. Offensichtlich assembliert das Hybridprotein zu einem Komplex, der die erwartete Größe der nativen *i*-AAA-Protease zeigt. Eine Oligomerisierung über das fusionierte MBP kann ausgeschlossen werden, da dieses Protein unter den angewendeten Bedingungen als Monomer vorliegt (ohne Abb.).

3.3.1.3 Charakterisierung der ATPase-Aktivität des isolierten MBP-Yme1-Komplexes

Um das isolierte Hybridprotein auf enzymatische Aktivität zu überprüfen, wurde die ATP-Hydrolyse durch MBP-Yme1 bestimmt. Hierzu wurde das Enzym in Gegenwart von 2 mM ATP bei 30°C für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert und das durch die ATPase freigesetzte Phosphat nach Zugabe eines Farbreagenz photometrisch bestimmt (siehe 2.3.10). Der isolierte MBP-Yme1-Komplex führte zu einer weitgehend linear ansteigenden Bildung von Phosphat (Abb. 16B). Die gemessene Aktivität war direkt proportional zur Enzymkonzentration (Abb. 16C). Für MBP-Yme1 lag unter diesen Bedingungen die Aktivität bei $2{,}2 \pm 1{,}2$ ATP/min/Yme1-Monomer ($n = 13$).

Um ausschließen zu können, daß die gemessenen Aktivitäten auf Kontaminationen durch nicht vollständig abgetrennte andere ATPasen zurückzuführen sind, wurde das Maltose-Bindungs-Protein (MBP) von dem Vektor pMAL-cRI exprimiert und unter den gleichen Bedingungen wie der MBP-Yme1-Komplex gereinigt (ohne Abbildung). Anschließend wurde ein ATPase-Aktivitätstest durchgeführt (Abb. 16D). Die Zugabe von MBP führt zu keiner meßbaren Freisetzung von Phosphat (Abb. 16D). Die in Gegenwart von MBP-Yme1 beobachtete ATP-Hydrolyse war demnach allein auf MBP-Yme1 zurückzuführen.

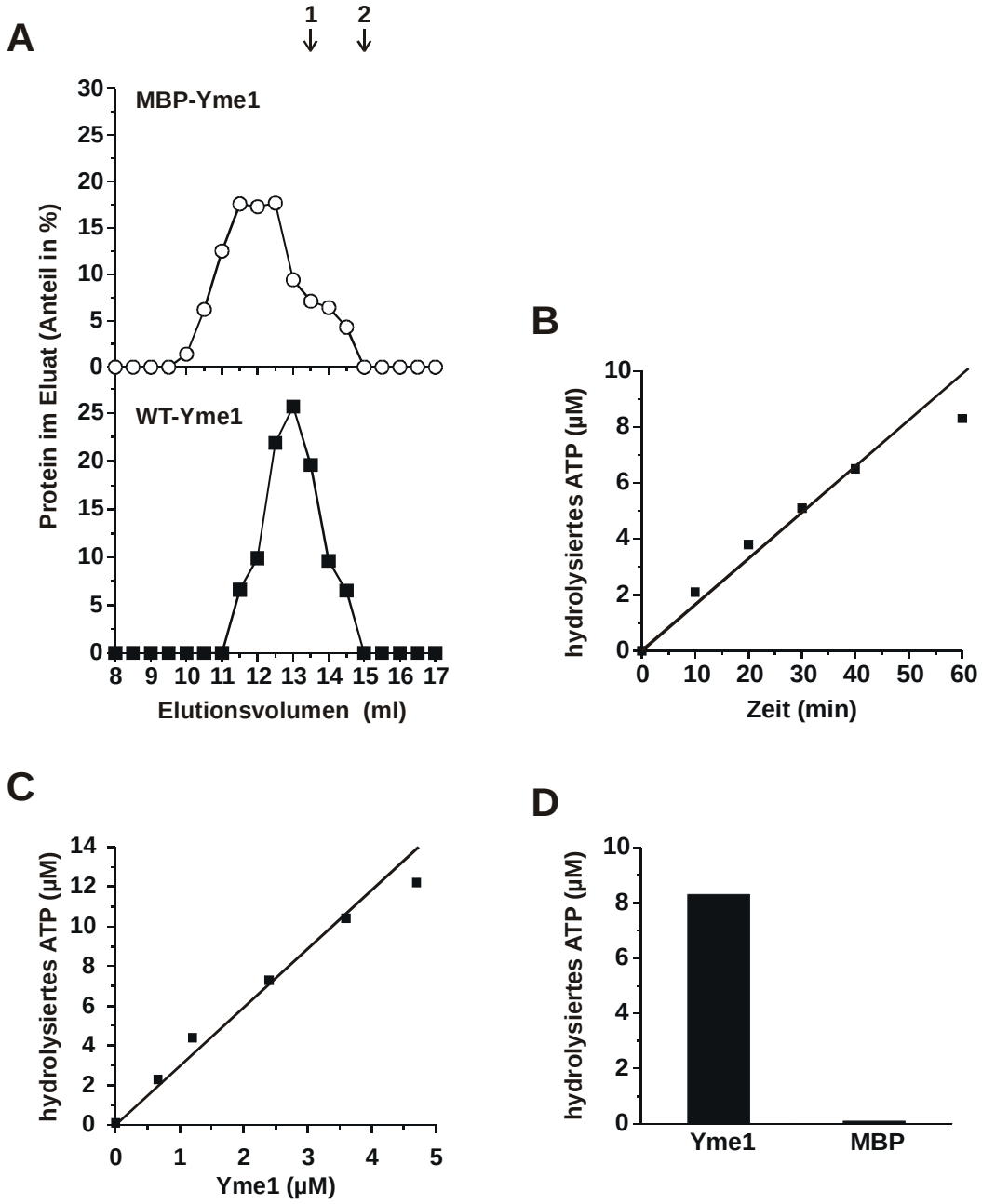

Abb. 16: Bestimmung des nativen Molekulargewichts und der ATPase-Aktivität des gereinigten Yme1-Komplexes.

3.3.1.4 Die Rolle der Oligomerisierung für die ATPase-Aktivität von Yme1

Um die Rolle der Oligomerisierung für die ATPase-Aktivität zu untersuchen, wurden verschiedene C- und N-terminal verkürzte Yme1-Varianten in *E. coli* exprimiert und sowohl ihre native molekulare Masse, wie auch ihre ATP-Hydrolyseaktivität bestimmt. Folgende Konstrukte wurden für diese Experimente verwendet (Abb. 17A): (i) MBP-Yme1 (Aminosäurereste 48-747); (ii) MBP-Yme1 ohne proteolytischer Domäne (Aminosäurereste 48-525; MBP-Yme1ΔPD); (iii) die Intermembranraum-domäne (Aminosäurereste 250-747; IMD) (iv) die AAA-Domäne (Aminosäurereste 250-525; AAA). Die IM- und AAA-Domänen enthielten eine Hexahistidinsequenz am C-Terminus und konnten über eine Ni-NTA-Affinitätssäule gereinigt werden (Leonhard *et al*., 1999).

Abb. 16: Bestimmung des nativen Molekulargewichts und der ATPase-Aktivität des gereinigten Yme1-Komplexes.
(A) *E. coli*-Zellen, die das Plasmid pMAL-cRI-*YME1* enthielten, wurden zwei Stunden in LB-Medium, dem Ampicillin (100 µg/ ml) und IPTG (2 mM) zugesetzt war, kultiviert. Eine Menge Zellen, die 10 OD-Einheiten entsprach, wurde geerntet, in Lysepuffer (30 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 150 mM KAc; 10% (m/v) Glyzerin; 10 mM β-Mercaptoethanol; 1 mM PMSF) resuspendiert und durch Beschallen die Membranen aufgebrochen (siehe 2.3.8). Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurden die Proteine des Überstands mit Hilfe einer Superose 6-Säule (äquilibriert mit Lysepuffer) nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt (obere Teilabbildung). Als Kontrolle wurden isolierte Mitochondrien von *S. cerevisiae* in 1% (v/v) Triton X-100, 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 150 mM KAc, 10% (m/v) Glyzerin, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 PMSF lysiert und die löslichen Proteine ebenfalls über die Superose 6-Säule analysiert (untere Teilabbildung). In beiden Fällen wurde das Eluat in 0,5 ml Fraktionen gesammelt, TCA gefällt und mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit einem spezifischen Antikörper gegen Yme1 untersucht. Die Menge an Protein in den Fraktionen wurde durch Densitometrie bestimmt und auf die gesamte eluierte Menge des jeweiligen Proteins normiert. Zur Eichung der Säule wurden die folgenden Proteinkomplexe verwendet: (1) Hsp60 (850 kDa), (2) Apoferritin (443 kDa).
(B, C) ATPase-Aktivität des gereinigten Yme1-Komplexes. **(B)** Kinetik der ATP-Hydrolyse. Der isolierte Yme1-Komplex (2,4 µM) wurde in ATPase-Puffer (siehe 2.3.10) in Gegenwart von ATP (2 mM) für die angegebenen Zeitintervalle bei 30°C inkubiert. Die Konzentration des hydrolysiertem Nukleotid wurde mit Hilfe des Malachitgrün-Reagenzes photometrisch bestimmt. **(C)** Titration der Yme1-Konzentration. Die Messung der ATPase-Aktivität wurde mit den angegebenen Enzymkonzentrationen für 30 min durchgeführt.
(D) Die gemessene ATPase-Aktivität ist nicht auf Verunreinigungen des isolierten Komplexes zurückzuführen. Die Expression der Gene *MBP-YME1* und *MBP* wurde von den Plasmiden pMAL-cRI-*YME1* bzw. pMAL-cRI -wie in Abb. 15 beschrieben- induziert und die exprimierten Proteine mit Hilfe einer Amylosematrix aufgereinigt. Die ATPase-Aktivität der isolierten Proteine MBP-Yme1 und MBP (jeweils 2,4 µM) wurden unter Standardbedingungen für 30 min bestimmt.

Zunächst wurden die nativen Molekulargewichte der Proteine durch Gelfiltrationsexperimente bestimmt (Abb. 17B). Im Gegensatz zu MBP-Yme1 und MBP-Yme1ΔPD, die beide in einer hochmolekularen Form (>1 500 kDa) vorlagen, bildeten die IM- und AAA-Domäne Komplexe mit einer molekularen Massen von etwa 150 kDa bzw. 100 kDa (Abb. 17B). Die Deletionen der N-terminalen Domäne und der Transmembranregion von Yme1 führen offenbar zu einer Dissoziation der *i*-AAA-Protease zu niedermolekularen Strukturen.

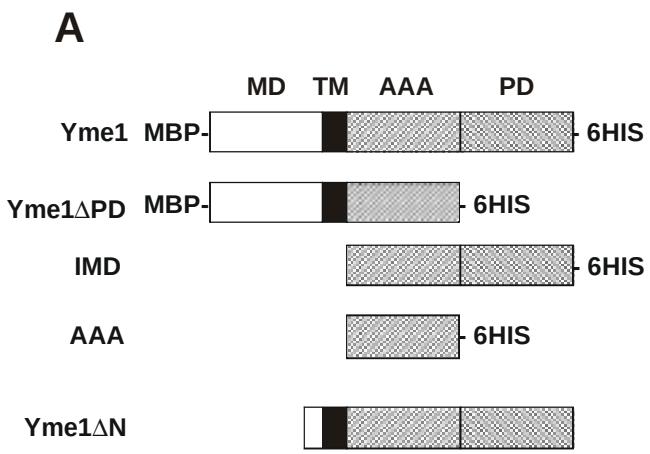

Abb. 17: Molekulargewichte und ATPase-Aktivitäten verkürzter Yme1-Varianten.
(A) Schematische Darstellung der verwendeten Yme1-Varianten. MD, Matrixdomäne; TM, Transmembranregion; AAA, AAA-Domäne; PD, proteolytische Domäne; 6HIS, Hexahistidinsequenz; MBP, Maltose-Bindungs-Protein.
(B) Bestimmung der nativen Molekulargewichte der Konstrukte MBP-Yme1, MBP-Yme1ΔPD, IMD und AAA. Die gereinigten Proteine Yme1, Yme1ΔPD, IMD und AAA, (jeweils 200 µg**)** wurden auf eine zuvor mit 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4, 150 mM KAc, 4 mM $MgAc_2$, 10% (v/v) Glyzerin, 1 mM PMSF äquilibrierten Superose 6-Gelfiltrationssäule geladen und das Eluat in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Proben wurden TCA gefällt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die Menge an Protein in den Fraktionen wurde durch Densitometrie bestimmt und auf die gesamte eluierte Menge des jeweiligen Proteins normiert. Als Standard wurden die folgenden Proteinkomplexe verwendet: (1) Hsp60 (850 kDa); (2) Apoferritin (443 kDa); (3) Alkoholdehydrogenase (150 kDa).
(C) ATPase-Aktivität der Konstrukte MBP-Yme1, MBP-Yme1ΔPD, IMD und AAA. Die Konzentration des durch die Konstrukte MBP-Yme1, MBP-Yme1ΔPD, IMD und AAA hydrolysierten ATPs wurde unter Standardbedingungen 30 min bestimmt.

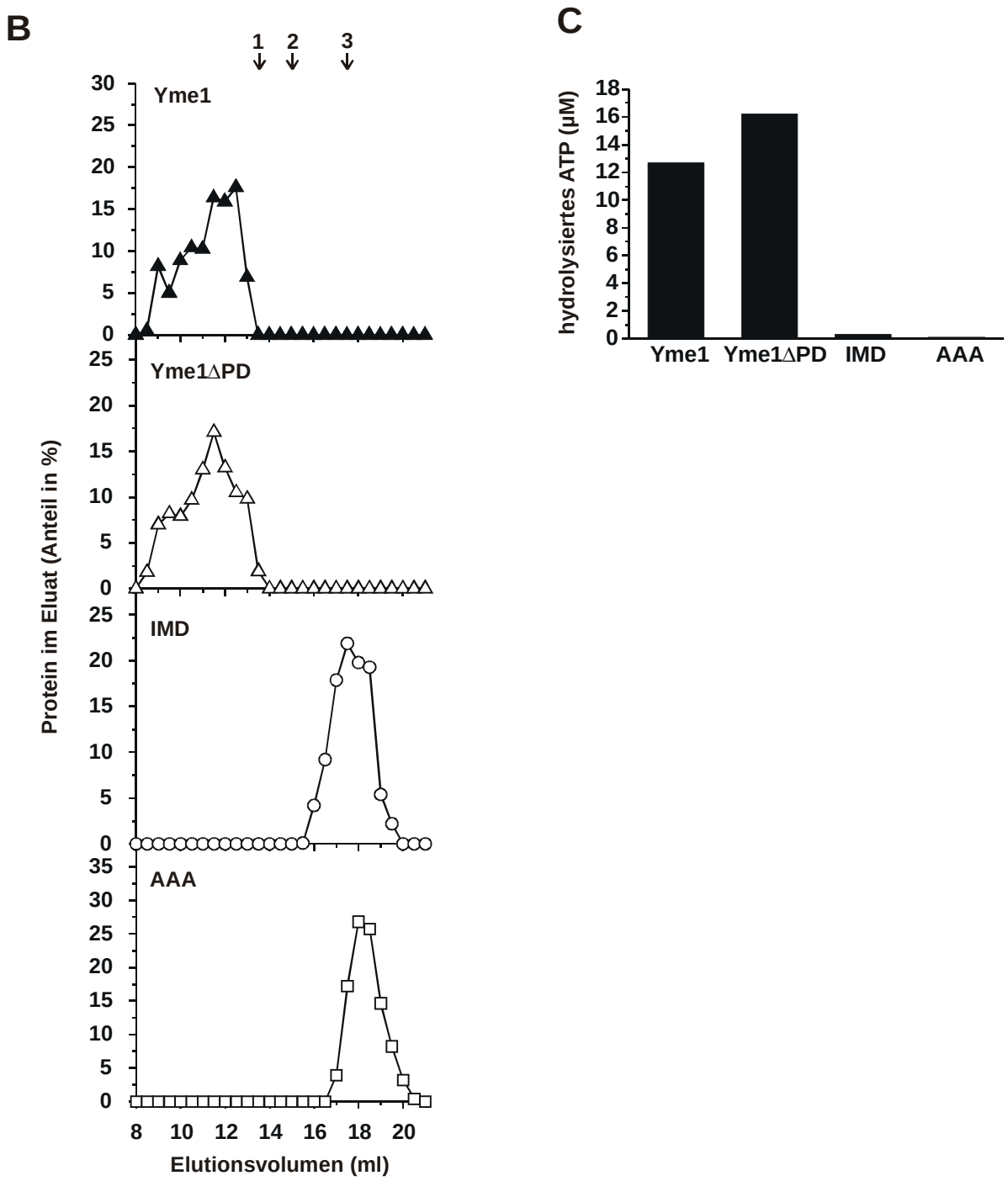

Abb. 17: Molekulargewichte und ATPase-Aktivitäten verkürzter Yme1-Varianten.

In den folgenden Experimenten wurde die ATPase-Aktivität der beschriebenen Yme1-Varianten untersucht (Abb. 17C). Im Gegensatz zu MBP-Yme1 und MBP-Yme1ΔPD konnte keinerlei ATP-Hydrolyse-aktivität der IM- und AAA-Domänen nachgewiesen werden (Abb. 17C). Diese Ergebnisse korrelieren mit den beobachteten oligomeren Zuständen der Proteine (Abb. 17B). Die Assemblierung zu multimeren Komplexen scheint demnach essentiell für die ATPase-Aktivität von Yme1 zu sein.

3.3.2 Untersuchungen zur Bedeutung der Matrixdomäne von Yme1 für die Oligomerisierung *in vivo*

Erste Hinweise auf eine Funktion der Matrixregion von Yme1 für die Oligomerisierung der Protease wurden bei der Bestimmung der Molekulargewichte der Yme1-Varianten *in vitro* erhalten (Abb. 17A, B). Die Deletion der proteolytischen Domäne zeigte sowohl bei MBP-Yme1ΔPD als auch bei der AAA-Domäne keine Veränderung des oligomeren Zustands verglichen mit den jeweiligen Yme1-Varianten, die noch die proteolytische Domäne enthielten (MBP-Yme1 bzw. IMD) (Abb. 17A, B). Im Gegensatz dazu dissoziierten die Yme1-Varianten nach Verlust der N-terminalen Region (IM- bzw. AAA-Domäne verglichen mit MBP-Yme1 bzw. MBP-Yme1ΔPD) zu niedermolekularen Komplexen. Dieser N-terminale Teil besteht aus einer Matrixdomäne von 177 Aminosäureresten (Aminosäurereste 48-224) und der Transmembranregion (Aminosäurereste 225-248). Beide Bereiche sind somit potentielle Assemblierungsdomänen. Um die für die Oligomerisierung der *i*-AAA-Protease notwendigen Bereiche genauer zu definieren wurde eine N-terminal verkürzte Variante von Yme1 hergestellt (Yme1Δ52-198; Yme1ΔN) und in Zellen des *Δyme1*-Stamms exprimiert. Nach Import in Mitochondrien enthielt diese Yme1-Variante 30 Aminosäurereste der Matrixdomäne sowie die Transmembranregion

und die vollständige Intermembranraumdomäne.

3.3.2.1 Bestimmung des Wachstumsphänotyps des Stamms *yme1ΔN*

Wildtyp-, *Δyme1*-, und *yme1ΔN*-Zellen wurden auf YPD-Medium bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend eine Verdünnungsreihe (1:10) hergestellt (siehe 2.2.1.1). Je 3 µl der Proben wurden auf eine YPD- oder YPG- Medium enthaltende Platten aufgetropft und mehrere Tage bei 15°C bzw. 37°C inkubiert. Im Gegensatz zu Wildtypzellen, die unter allen getesteten Bedingungen ein gutes Wachstum zeigten (Abb. 18A, B), konnte kein Wachstum beider Mutanten bei 37°C auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen beobachtet werden (Abb. 18B). Dagegen wurde bei 15°C auf glukosehaltigem Medium durch die Expression der N-terminal verkürzten Yme1-Variante ein Wachstum

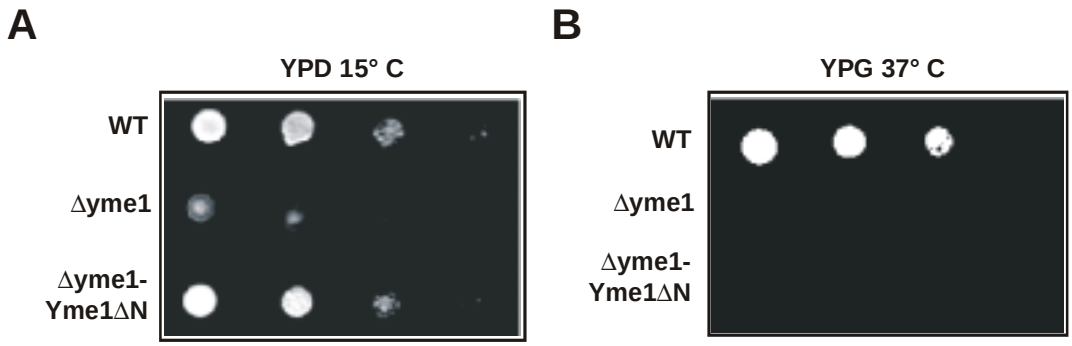

Abb. 18: Bestimmung des Wachstumsphänotyps des Stamms *yme1ΔN*.
Zellen des Wildtyp- ('WT'), *Δyme1*- und *yme1ΔN*-Stamms wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase auf YPD-Medium bei 30°C angezogen und jeweils von der gleichen Menge Zellen ein Verdünnungsreihe (1:10) hergestellt (siehe 2.2.1.1). Ein Aliquot jeder Probe wurde auf YP-Medium mit 2% (m/v) Glukose **(A)** oder 3% (m/v) Glyzerin **(B)** aufgebracht und bei 15°C **(A)** bzw. 37°C **(B)** für vier Tage inkubiert.

ähnlich dem Wildtypstamm beobachtet (Abb. 8A). Der Verlust der Matrixdomäne führt offensichtlich zu einer partiellen Inaktivierung der Protease; während Yme1ΔN bei 15°C noch die für ein Wachstum wichtigen Funktionen übernehmen kann, ist die N-terminale Domäne von Yme1 für Funktionen bei 37°C offensichtlich essentiell.

3.3.2.2 Submitochondriale Lokalisierung von Yme1ΔN

Um ausschließen zu können, daß der Verlust der Aktivität von Yme1ΔN auf eine fehlerhafte Lokalisierung des mutierten Proteins in den Mitochondrien zurückzuführen ist, wurde zunächst dessen Insertion in die Membran mittels Carbonatextraktion überprüft. Durch 30-minütige Inkubation isolierter Mitochondrien in 0,1 M Na_2CO_3 werden alle löslichen und membranassoziierten Proteine extrahiert, während integrale Membranproteine in der unlöslichen Fraktion verbleiben. Im Gegensatz zu CCPO, einem löslichen Protein des Intermembranraums, war Yme1ΔN, wie auch das Kontrollprotein der Innenmembran Yta10, ausschließlich in der unlöslichen Fraktion nachweisbar (Abb. 19A).

Zur Überprüfung der korrekten Topologie im Intermembranraum wurde die Resistenz des mutierten Proteins gegenüber Proteinase K sowohl in Mitochondrien wie auch nach osmotischer Disruption der Außenmembran in Mitoplasten untersucht. Während Yme1ΔN in intakten Organellen vollständig vor der Protease geschützt war, wurde es nach Öffnen der Außenmembran für diese zugänglich (Abb. 19B). Dieses Verhalten zeigte auch das Intermembranraumprotein CCPO (Abb. 19B). Im Gegensatz dazu war Tim44, ein Protein der mitochondrialen Matrix, nicht von der Protease angreifbar (Abb. 19B). Diese Ergebnisse belegen eine korrekte Lokalisierung und Topologie des mutierten Yme1-Proteins.

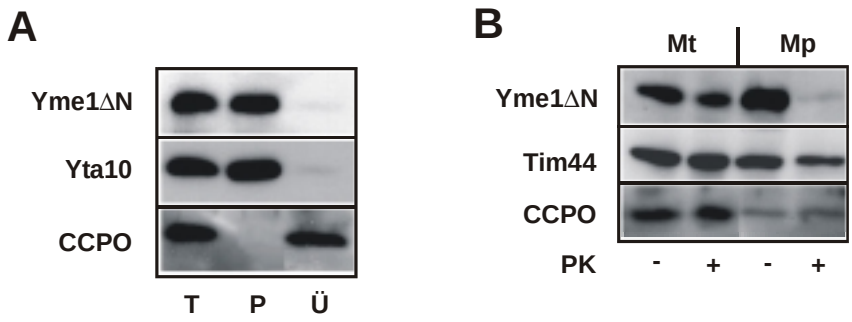

Abb. 19: Submitochondriale Lokalisierung von Yme1ΔN.
(A) Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranen. 50 µg isolierte Mitochondrien aus *S. cerevisiae* wurden in 1 ml 0,1 M Na_2CO_3, pH 11,5 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme eines Aliquots zur Kontrolle ('T') wurde durch Zentrifugation (226 000 *g*; 30 min) die Probe in eine lösliche ('Ü') und eine Membranfraktion ('P') geteilt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Kontrollprotein für die Membranfraktion wurde Yta10, und für die lösliche Fraktion, CCPO verwendet.
(B) Submitochondriale Fraktionierung. Isolierte Mitochondrien wurden in SHKCl (0,25 mg/ml) ('Mt') oder 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4 (0,1 mg/ml), zur Disruption der Außenmembran ('Mp'), in Gegenwart oder Abwesenheit von Proteinase K (50 µg/ml) (+/- PK) 30 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Folgende Marker wurden für die verschiedenen Subkompartimente verwendet: Tim44, Matrix; CCPO, Intermembranraum; Mt, Mitochondrien; Mp, Mitoplasten.

3.3.2.3 Bestimmung des oligomeren Zustands von Yme1ΔN

Um die Bedeutung der Matrixdomäne von Yme1 für die Assemblierung der *i*-AAA-Protease zu untersuchen, wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Im Gegensatz zu Yme1, das die erwartete molekulare Masse von >1 000 kDa zeigte, eluierte Yme1ΔN in Fraktionen, die einer molekularen Masse von etwa 450 kDa entsprachen (Abb. 20). Der Verlust der Matrixdomäne führt offensichtlich zur partiellen Dissoziation des Komplexes. Dieses Ergebnis zeigt eine essentielle Funktion der Matrixdomäne von Yme1 für die Oligomerisierung.

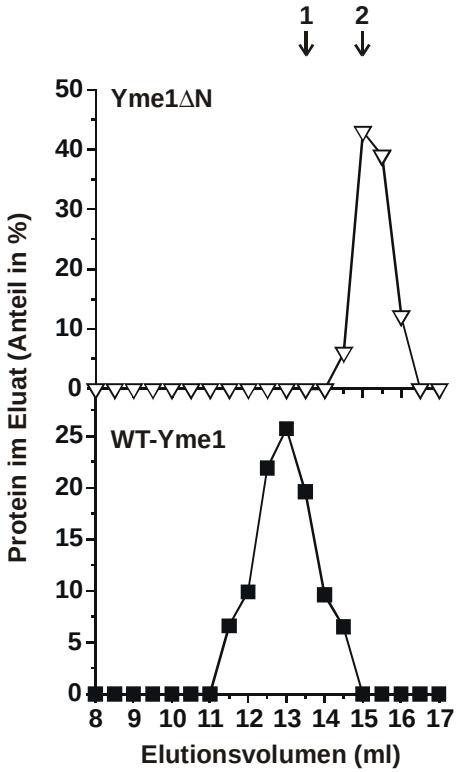

Abb. 20: Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Yme1ΔN.
Isolierte Mitochondrien des Wildtyp- oder *yme1ΔN*-Stamms wurden mit 1% (v/v) Triton X-100, 30 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM KAc, 4 mM $MgAc_2$, 0,5 mM PMSF unter heftigem Schütteln bei 4°C lysiert. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurden die Proteinkomplexe mit Hilfe einer zuvor äquilibrierten (Lysepuffer mit 0,05% (v/v) Triton X-100) Superose 6-Gelfiltrationssäule nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Die eluierten Fraktionen (0,5 ml) wurden TCA gefällt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Menge an Protein wurde durch Densitometrie bestimmt und auf das im gesamten Eluat enthaltene Yme1 bzw. Yme1ΔN normiert. Als Standard wurden die folgenden Proteinkomplexe verwendet: (1) Hsp60 (850 kDa) (2) Apoferritin (443 kDa).

4 Diskussion

4.1 Tcm62 ist ein neues, in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes Protein mit Chaperonfunktionen

Tcm62 wurde im Rahmen der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *S. cerevisiae* als Protein mit schwacher Sequenzähnlichkeit zu Chaperoninen der Klasse I identifiziert. Die Funktion des Proteins war jedoch nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Tcm62 als Protein der mitochondrialen Matrix sowohl strukturell wie auch funktionell charakteristische Chaperoneigenschaften besitzt:

(i) Die Proteinsequenz von Tcm62 zeigt eine schwache aber doch signifikante Ähnlichkeit in der Primärstruktur zu Chaperoninen der Hsp60-Familie (18% Identität; 38% Ähnlichkeit). Dabei finden sich identische Aminosäurereste gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt; es können keine Domänen oder Proteinabschnitte mit im Vergleich zu anderen Abschnitten höherer Ähnlichkeit erkannt werden. Auffälligerweise ist auch das für Chaperonine typische Motiv GDGTT (Aminosäurereste 86-90 von GroEL) (Abb. 1), das essentiell für die ATPase-Aktivität der Proteine ist, nicht konserviert. Dies könnte auf eine ATP-unabhängige Funktion von Tcm62, wie sie für einige andere Chaperone schon beschrieben wurde, hindeuten (Ellis, 1997a). Denkbar wäre aber auch eine neue ATP-Bindungsdomäne, die sich signifikant von der der bisher beschriebenen Chaperonine unterscheidet.

Ein Vergleich der vorhergesagten Sekundärstruktur von Tcm62 mit der bekannten Kristallstruktur von GroEL aus *E. coli* zeigt überraschende Ähnlichkeiten besonders im N-terminalen Bereich, der Teile der apikalen und intermediären Domäne enthält. Dies könnte auf eine ähnliche Faltung der Proteine in diesen Abschnitten hindeuten. In der apikalen Domäne von

GroEL finden sich die Helices H und I, für die eine direkte Interaktion mit einem Substrat bzw. dem Kochaperonin GroES gezeigt werden konnte (Chen und Sigler, 1999), sowie weitere Aminosäuren, die an der Bindung der Substrate beteiligt sind (Fenton *et al*., 1994). Die nach heterologer Expression in *E. coli* gereinigte apikale Domäne von GroEL ($GroEL^{191-345}$) zeigte eine dreidimensionale Struktur, wie sie auch im gesamten GroEL gefunden wird. Auch wurde für die isolierte Domäne eine dem nativen Protein vergleichbare Chaperonaktivität beschrieben (Zahn *et al*., 1996). Diese Aktivität ist jedoch unabhängig von der Hydrolyse von ATP (Zahn *et al*., 1996). Die Beobachtung, daß Tcm62 eine ähnliche Sekundärstruktur aber keine ATP-Bindungsstelle aufweist, könnte auf eine der apikalen Domäne vergleichbare Aktivität hindeuten.

(ii) Wie alle bekannten Chaperonine bildet (Hartl, 1996) auch Tcm62 einen hochmolekularen Komplex von ~850 kDa. Die Zusammensetzung des Komplexes ist nicht bekannt. Hinweise auf einen möglichen heterooligomeren Komplex gab die Beobachtung, daß in den Gelfiltrationsanalysen dieser Arbeit eine Koelution von Tcm62 mit mitochondrialem Hsp60 beobachtet wurde. Eine solche Assoziation konnte allerdings mit Koimmunfällungsexperimenten nicht nachgewiesen werden.

Parallel zur Identifizierung über die Sequenzähnlichkeit mit Chaperoninen in der vorliegenden Arbeit wurde das Gen *TCM62* von einer weiteren Arbeitsgruppe im Rahmen einer genetischen Suche nach Mutanten mit Defekten in der Biogenese der Succinatdehydrogenase (Komplex II) identifiziert (Dibrov *et al*., 1998). Von Dibrov *et al*. (1998) wurde eine heterologe Komplexbildung von Tcm62 mit Untereinheiten der Succinatdehydrogenase (SDH) vorgeschlagen (Dibrov *et al*., 1998). Diese Hypothese beruht auf folgenden Beobachtungen: Zum einen führt die Disruption von *TCM62* in Hefezellen zu einem vollständigen Verlust der Untereinheit Sdh2 und damit auch von Sdh1. Darüber hinaus konnten Dibrov *et al*. (1998) mit Hilfe der Nativgelelektrophorese eine Komigration des SDH-Komplexes mit einem geringen Teil von

überexprimiertem HA-markiertem Tcm62 zeigen. Auch das größere Molekulargewicht des HA-markierten Tcm62-Proteins in Abwesenheit der Untereinheit Sdh1, sowie die Aggregation eines C-terminal myc-markierten Tcm62-Proteins zusammen mit Sdh1 und besonders Sdh2 in den selben Einschlußkörperchen, geben weiter Hinweise für diese Hypothese (Dibrov *et al*., 1998).

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Gelfiltrationsanalysen wurde jedoch keine Interaktion zwischen Tcm62 und Untereinheiten der SDH gefunden. Tcm62 und Sdh2 koeluieren in zwei vollständig getrennten Fraktionen (850 kDa bzw. 150 kDa). Eine mögliche Erklärung für die gefundenen Unterschiede wäre eine nur transiente Wechselwirkung von Tcm62 mit Sdh1 und Sdh2 in so geringen Mengen, daß diese unter normalen Bedingungen nicht mit einem Antikörper nachgewiesen werden können. Die Überexpression eines C-terminal markierten Tcm62 könnte jedoch zur stabilen Bindung in nachweisbaren Mengen führen.

Tcm62 ist, wie sein nächster Verwandter Hsp60 aus *S. cerevisiae,* in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Auch nach Disruption der Außenmembran der Mitochondrien ist es vor extern zugegebener Protease geschützt. Dieses Ergebnis wurde sowohl für endogenes Tcm62, das mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das gesamte Protein identifiziert wurde, aber auch für radioaktiv markiertes, *in vitro* importiertes Protein erhalten. Darüber hinaus konnten keine Fragmente nach Proteasebehandlung der Mitoplasten detektiert werden, was die vollständige Lokalisierung von Tcm62 in der Matrix zeigt. In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigt auch das Hydrophobizitätsprofil von Tcm62 keine hydrophoben Regionen. Dibrov *et al.* (1998) charakterisierte Tcm62 jedoch als mitochondriales Protein der Innenmembran mit einer C-terminalen Domäne im Intermembranraum. Die hier postulierte Transmembrandomäne (Aminosäurereste 469-491) enthält allerdings drei geladene Aminosäurereste. Eine Insertion in die Membran erscheint daher sehr unwahrscheinlich. Eine möglich Erklärung für die

gefundenen Unterschiede wäre ein verändertes Expressionsniveau und die Verwendung eines C-terminal hämagglutininmarkiertem Tcm62-Derivats in den Untersuchungen von Dibrov *et al*. (1998).

(iii) Tcm62 ist essentiell an der Aufrechterhaltung der Atmungskompetenz der Zellen durch Stabilisierung der mitochondrialen Proteinsynthese unter erhöhten Temperaturen beteiligt. Der Verlust von Tcm62 führt schon nach zweistündiger Inkubation bei 37°C zu einem nahezu vollständigen Erliegen der Syntheseaktivität. Eine plausible Erklärung wäre eine Stabilisierung einer oder mehrerer an der Synthese beteiligter Enzyme durch eine Chaperonaktivität von Tcm62. Die Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese unter Hitzestreß erklärt auch den temperatursensitiven Wachstumsphänotyp auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Diese können nur durch Atmung der Zellen zur Deckung des Energiebedarfs genützt werden. Das mitochondriale Genom von *S. cerevisiae* kodiert acht Polypeptide, von denen sieben Untereinheiten der verschiedenen respiratorischen Komplexe bilden (Costanzo und Fox, 1990; Grivell, 1989). Ein Verlust dieser Proteine führt zu einer vollständigen Inaktivierung der Atmungskette.

(iv) Eine Unterdrückung der Aggregation eines Proteins durch Tcm62 konnte für das ribosomale Protein Var1 gezeigt werden. Der Verlust von Tcm62 führt zur Aggregation dieses Proteins unter Hitzestreß. Eine solche Stabilisierung ist eine charakteristische Funktion aller Chaperone.

Tcm62 zeigt offensichtlich weitreichende Funktionen sowohl unter normalen wie auch unter Hitzestreßbedingungen. Weitere Untersuchungen auf molekularer Ebene werden nicht nur zum tieferen Verständnis seiner Funktion für die mitochondriale Biogenese führen. Gerade durch seine schwache aber signifikante Konservierung zu bisher bekannten Chaperoninen könnten weiterführende Studien Einblicke in die Wirkungsweise der molekularen Chaperone geben.

4.2 MAP-1 und IAP-1, zwei neue Vertreter der AAA-Proteasen

AAA-Proteasen spielen eine bedeutende Rolle beim Abbau membrangebundener Proteine und übernehmen so eine essentielle Funktion bei der Qualitätskontrolle von Proteinen. Genauere Untersuchungen über Struktur und Funktion wurden bisher nur mit Vertretern aus *S. cerevisiae* durchgeführt. Durch die Identifizierung und Charakterisierung neuer AAA-Proteasen aus *N. crassa* konnten erstmalig AAA-Proteasen aus verschiedenen Organismen verglichen werden. Dabei zeigten sich Ähnlichkeiten, aber auch überraschende Unterschiede bei der Funktion dieser Proteine.

Die neu identifizierten Proteine MAP-1 und IAP-1 zeigen eine Sequenzidentität von 46% bzw. 51% im Vergleich mit den bekannten AAA-Proteasen in *S. cerevisiae.* Beide Proteine enthalten eine AAA-Domäne und eine C-terminal gelegene proteolytische Domäne mit der Metallbindungsstelle HEXXH. Sie stellen daher neue Vertreter dieser Proteinklasse dar.

Die biochemische Analyse der Proteine ergab über diese Sequenzähnlichkeit hinausgehende Übereinstimmungen. So bilden MAP-1 und IAP-1 zwei getrennte hochmolekulare Komplexe in der mitochondrialen Innenmembran. Während MAP-1 jedoch in Abwesenheit von ATP in eine kleinere Form dissoziiert, ist die Komplexbildung von IAP-1 ATP-unabhängig. Für die Homologe aus *S. cerevisiae* sind Multimere mit ähnlichen Molekulargewichten und Eigenschaften bei der ATP-Abhängigkeit der Komplexbildung beschrieben (Arlt *et al*., 1996; Leonhard *et al*., 1996). Ein Unterschied zwischen den AAA-Proteasen in diesen beiden Organismen scheint jedoch in der Zusammensetzung der Komplexe zu bestehen. Da in dem vor kurzem vollständig sequenzierten Genom von *N. crassa* als Mitglieder der AAA-Proteasefamilie ausschließlich MAP-1 und IAP-1 identifiziert werden konnten, muß davon

ausgegangen werden, daß beide Proteine entweder homooligomere oder heterooligomere Komplexe mit Proteinen aus anderen Familien bilden. Im Gegensatz dazu besteht die *m*-AAA-Protease von *S. cerevisiae* aus den zwei nahe verwandten AAA-Proteasen Yta10 und Yta12 (Arlt *et al*., 1996).

Weitere Ähnlichkeiten zwischen den Organismen finden sich auch beim Vergleich der Topologien der Untereinheiten der AAA-Proteasen. Yme1 und IAP-1 enthalten nur eine Transmembranregion. Beide Proteasen exponieren ihre katalytischen Domänen in den Intermembranraum (Leonhard *et al*., 1996). Im Gegensatz dazu durchspannen MAP-1, Yta10 und Yta12 die Innenmembran zweimal; ihre katalytischen Domänen zeigen in die Matrix (Arlt *et al*., 1996). In Analogie zu den Homologen aus *S. cerevisiae* können MAP-1 und IAP-1 demnach auch als *m*- bzw. *i*-AAA-Protease bezeichnet werden. Die entgegengesetzte Anordnung in der Innenmembran weist darauf hin, daß das proteolytische Kontrollsystem der mitochondrialen Innenmembran auf zwei gegenüberliegende Proteasen angewiesen ist. Eine Erklärung für diese Beobachtung gibt die Substratspezifität der Proteasen. So wird ein Modellsubstrat, das eine Domäne im Intermembranraum exponiert, von IAP-1 hydrolysiert. Ein Modellsubstrat mit deletierter Intermembranraumdomäne kann dagegen nicht mehr von der *i*-AAA-Protease angegriffen werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon für die Homologe in *S. cerevisiae* gemacht (Leonhard *et al*., 2000).

4.2.1 Die AAA-Protease IAP-1 zeigt im Vergleich mit ihrem Homolog Yme1 aus *S. cerevisiae* gleiche, aber auch unterschiedliche Funktionen

Um ein besseres Verständnis für die Funktionen und Mechanismen der AAA-Proteasen in *N. crassa* zu erhalten, wurden eine *iap-1*-

Deletionsmutante (*IAP-1*^{RIP}) auf ihren Phänotyp hin untersucht. Ein Vergleich mit dem *Δyme1*-Stamm in *S. cerevisiae* zeigte dabei neben Parallelen auch überraschende Unterschiede. In beiden Organismen führt der Verlust der *i*-AAA-Protease zu einer Hemmung des Wachstums auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen unter Hitzestreß (Thorsness *et al*., 1993). Im Gegensatz dazu finden sich ein kältesensitives Wachstum auf Glukose, wie auch eine Veränderung der mitochondrialen Morphologie nur in *S. cerevisiae* (Campbell *et al*., 1994; Thorsness *et al*., 1993). Diese Unterschiede in den Phänotypen könnten durch Unterschiede zwischen den Proteinmaschinerien der beiden Organismen, die am Wachstum unter Streßbedingungen oder an der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie beteiligt sind, erklärt werden (Prokisch *et al*., 2000). Bei der Inaktivierung der *i*-AAA-Proteasen muß man offenbar zwischen Effekten, die allgemein die Funktion der Mitochondrien beeinflussen und Phänotypen, die nur den jeweiligen Organismus betreffen, unterscheiden.

Die Komplementationsversuche in *S. cerevisiae* zeigen auch Parallelen und Unterschiede bei den Funktionen der Proteasen IAP-1 und Yme1. So wurde die Veränderung der mitochondrialen Morphologie von *Δyme1*-Zellen durch die Expression von IAP-1 zumindest teilweise unterdrückt. Darüber hinaus kann das *N. crassa* Homolog bei 15°C Funktionen der *i*-AAA-Protease aus *S. cerevisiae* übernehmen, so daß ein Wachstum der Zellen des *Δyme1-iap-1**-Stamms ähnlich dem Wildtypstamm möglich wurde. Der kältesensitive Wachstumsphänotyp des *Δyme1*-Stamms ist auf den Verlust der proteolytischen Aktivität von Yme1 zurückzuführen, da Zellen, die die proteolytisch inaktive Mutante Yme1^{E541Q} enthalten unter diesen Bedingungen nicht wachsen können (Thorsness *et al*., 1993). Die Komplementation dieses Phänotyps durch IAP-1 beweist daher die proteolytische Aktivität des Proteins in Mitochondrien von *S. cerevisiae*. Außerdem zeigt sie, daß die Proteasen aus beiden Organismen degenerierte Substratspezifität besitzen.

IAP-1 kann nicht alle Funktionen von Yme1 ersetzen. So ermöglicht auch

die Expression von IAP-1 kein Wachstum von Δ*yme1*-Zellen bei 37°C auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Ein zu geringes Expressionsniveau des heterologen Proteins konnte als mögliche Ursache ausgeschlossen werden, da auch nach 20-facher Überexpression dieser Phänotyp der *Δyme1*-Zellen nicht unterdrückt wurde. Die Lokalisierung von IAP-1 in Mitochondrien von *S. cerevisiae* wurde durch die Fusion von IAP-1 mit der *S. cerevisiae* Präsequenz garantiert. Offensichtlich zeigen IAP-1 und Yme1 weitgehende Substratüberlappungen, dennoch haben sie keine identische Substratspezifität. Andere Erklärungsmöglichkeiten wären eine Entfaltung und damit Inaktivierung von IAP-1 in der heterologen Umgebung oder auch das Fehlen eines bei diesen Temperaturen wichtigen Interaktionspartners, der nicht konserviert ist. Vorstellbar wäre auch, daß regulatorische Funktionen der *i*-AAA-Protease in den einzelnen Organismen unterschiedlich sind.

Die Charakterisierung zweier AAA-Proteasen in *N. crassa* erlaubte erstmalig einen Vergleich der Funktionen dieser Proteinfamilie in zwei verschiedenen Organismen. IAP-1 ist demnach das Ortholog von Yme1, kann aber nur partiell Funktionen der *i*-AAA-Protease aus *S. cerevisiae* übernehmen. Vor kurzem wurde eine Mutation der AAA-Protease Paraplegin (SPG7) im Menschen als Ursache für eine autosomal-rezessive Form der spastischen Paraplegie erkannt (Casari *et al*., 1998; siehe 1.2.1.2). Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede scheint für ein tiefergehendes Verständnis der Pathogenese von Mutationen in AAA-Proteasen im Menschen die Charakterisierung weiterer Homologer in einer Vielzahl anderer Organismen von erheblicher Bedeutung zu sein.

4.3 Bedeutung der Oligomerisierung für die Funktion der AAA-Protease Yme1

4.3.1 Die ATPase-Aktivität der AAA-Protease Yme1 ist abhängig von der oligomeren Struktur

Die Untersuchungen zur Rolle der Oligomerisierung für die Funktion der AAA-Protease Yme1 wurden am isolierten Komplex durchgeführt. Hierzu wurde Yme1 aus *S. cerevisiae* nach heterologer Expression in *E. coli* chromatographisch gereinigt und sowohl ATPase-, als auch proteolytische Aktivität untersucht. MBP-Yme1 zeigt eine Hydrolyserate von ~2 ATP/min/Yme1-Monomer (das entspricht einer spezifischen Aktivität von ~18 pmol ATP/min/µg Protein) (zum Vergleich: CDC48 aus *S. cerevisiae*: 1560 ATP/min/µg; 26S-Proteasom aus Kaninchenretikulozyten: 19 pmol ATP/min/µg; FtsH aus *E.coli* 100-460 ATP/min/µg; SUG1 aus Rattenleber: 7 ATP/min/µg) (Asahara *et al*., 2000; Shotland *et al*., 2000; Tomoyasu *et al*., 1995; Wolf *et al*., 1998). Eine Beeinträchtigung der ATPase-Funktion durch sterische Wechselwirkungen der Protease mit dem MBP-Protein bzw. dem Hexahistidinpeptid kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte auch erklären, warum das Hybridprotein zwar ATPase-Aktivität besaß, jedoch kein Abbau von Modellsubstraten durch MBP-Yme1 erfolgte. Diese Beobachtung zeigt jedoch, daß die ATPase-Funktion von Yme1 auch unabhängig von einer proteolytischen Aktivität erfolgen kann.

Interessanterweise wurde eine Korrelation zwischen ATPase-Funktion und Oligomerisierung festgestellt. So war bei der isolierten AAA- und Intermembranraumdomäne, die beide nicht zu hochmolekularen Komplexen assemblieren, keine ATPase-Aktivität meßbar. Diese Beobachtung ist vermutlich nicht auf das Fehlen einzelner Domänen zurückzuführen, da das Konstrukt MBP-Yme1ΔPD, das trotz Deletion der proteolytischen Domäne zu einer hochmolekularen Form assembliert, eine

dem Vollängenprotein vergleichbare ATPase-Aktivität aufweist.

Ein Zusammenhang zwischen der Assemblierung und der ATPase-Aktivität wurde auch schon für andere AAA-Proteine wie z. B. Katanin (Hartman und Vale, 1999), VPS4 (Babst *et al*., 1998), NSF (Nagiec *et al*., 1995) und für FtsH aus *E. coli* (Makino *et al*., 1999) und *T. thermophilus* (Asahara *et al*., 2000) beschrieben. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung geben die vor kurzem aufgeklärten Kristallstrukturen der D2-AAA-Domäne des NSF-Proteins (Lenzen *et al*., 1998; Yu *et al*., 1998) und der HslU-Protease (ein Protein der AAA^+-Familie) (Bochtler *et al*., 2000; Sousa *et al*., 2000). Beide Proteine bilden hexamere Ringe und zeigen auffallende Ähnlichkeiten in ihren Kristallstrukturen (Bochtler *et al*., 2000). Die ATP-Bindungsstellen liegen in unmittelbarer Nähe der Kontaktflächen zwischen den einzelnen Untereinheiten. An der Ausbildung der ATP-Bindungstasche und bei der Katalyse der Spaltung des Nukleotids scheinen Aminosäurereste benachbarter Protomere beteiligt zu sein (siehe 1.2.1.1). ATP-Bindung und -Hydrolyse wären so tatsächlich nur in einer oligomeren Struktur möglich.

4.3.2 Yme1 assembliert über die Matrixdomäne

Offensichtlich spielt die Oligomerisierung für die Funktion der AAA-Proteasen ein wichtige Rolle. Der Aufbau der in dieser Arbeit untersuchten *i*-AAA-Protease ist noch nicht bekannt. Jedoch wurden in dieser Studie Hinweise für die Ausbildung eines homooligomeren Komplexes erhalten. Nach heterologer Expression von Yme1 in *E. coli* assoziiert das Protein zu einem Komplex mit einer der endogenen Protease vergleichbaren nativen molekulare Masse, die ATPase-Aktivität besitzt. Für einen homooligomeren Komplex spricht auch die Beobachtung, daß alle bekannten AAA-Proteasen sich aus mehreren identischen oder sehr nahe verwandten Untereinheiten zusammensetzen. Neben den Untereinheiten

der *m*-AAA-Protease sind weitere, zu Yme1 homologe mögliche AAA-Protease-Untereinheiten in *S. cerevisiae* nicht vorhanden.

Als eine für die Oligomerisierung wichtige Domäne wurde die nur gering konservierte Matrixregion identifiziert. Die Deletion des N-Terminus von Yme1 (Yme1ΔN) führte *in vivo* zur Ausbildung eines Multimers von ~450 kDa, und damit zu einer Dissoziation des Komplexes, der für natives Yme1 eine molekulare Masse von ~1 000 kDa zeigt. Auch die isolierte AAA- und Intermembranraumdomänen wiesen molekulare Massen von nur etwa 100 kDa bzw. 150 kDa auf. Die beobachteten Unterschiede in der Komplexgröße sind nicht auf die verschiedenen Molekularmassen der Monomere zurückzuführen. So entspricht die molekulare Masse von 450 kDa einem hexameren Komplex von Yme1ΔN, die molekularen Massen von 100 kDa bzw. 150 kDa einem trimeren Komplex der AAA- bzw. der Intermembranraumdomäne. Offensichtlich oligomerisieren die AAA- und Intermembranraumdomänen, bei denen neben der Matrix- auch die Transmembranregionen deletiert sind, zu kleineren Multimeren als das Protein Yme1ΔN. Dies deutet auf zwei unterschiedliche Oligomerisierungsbereiche in der N-terminalen Domäne hin, von denen eine in der Matrix- und eine zweite in der Transmembranregion gelegen sind. Der N-terminale Bereich wurde auch für die bakterielle AAA-Protease FtsH als eine für die Oligomerisierung wichtige Region beschrieben (Akiyama *et al*., 1994; Akiyama *et al*., 1995). Interessanterweise wurden auch hier zwei Domänen, die eine Interaktion vermitteln, identifiziert. So scheint die zweite Transmembranregion von FtsH an der Oligomerisierung beteiligt zu sein (Makino *et al*., 1999). Außerdem ist offenbar die periplasmatische Domäne für die Oligomerisirung der bakteriellen AAA-Protease wichtig.

Um die Aktivität der mutierten Protease Yme1ΔN zu untersuchen, wurde der Wachstumsphänotyp des Stamms *yme1ΔN* bestimmt. Überraschenderweise wurde durch Expression des Proteins eine Unterdrückung des Phänotyps bei 15°C beobachtet. Es ist bekannt, daß

sowohl der Verlust der ATPase-, wie auch der proteolytischen Funktion von Yme1 zur Hemmung des Zellwachstums unter diesen Bedingungen führt (Nakai *et al*., 1995; Weber *et al*., 1996). Die Komplementation dieses Phänotyps durch Yme1ΔN weist daher darauf hin, daß Yme1ΔN offensichtlich beide enzymatische Aktivitäten besitzt. Bei 37°C auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen konnte die Funktion von Yme1 jedoch nicht durch Yme1ΔN übernommen werden. Hierfür könnten auf der einen Seite mögliche indirekte Effekte wie z. B. eine Destabilisierung des Komplexes oder das Fehlen einer Interaktion mit anderen Proteinen, die unter diesen Bedingungen essentielle Funktionen übernehmen, verantwortlich sein. Auf der anderen Seite wäre aber auch eine geringere Aktivität des Intermediats vorstellbar, die für eine Komplementation bei 15°C, nicht aber unter Hitzestreß ausreicht.

Weitere Untersuchungen zur Bestimmung von an der Oligomerisierung von Yme1 beteiligter Regionen wurden in früheren Arbeiten von K. Leonhard durchgeführt (persönliche Mitteilung). Mit Hilfe C-terminal verkürzter Yme1-Varianten konnte die N-terminale Region der AAA-Domäne als Assemblierungsdomäne identifiziert werden. Offensichtlich existiert neben den Bereichen der Matrix- und Transmembrandomänen eine weitere Region auf der gegenüberliegenden Seite der Membran, die die Oligomerisierung der Protease vermittelt. Keine der identifizierten Domänen gewährleistet offenbar alleine die vollständige Assemblierung von Yme1. Vielmehr scheint das Zusammenwirken mehrerer Regionen die Ausbildung der aktiven Protease zu bewirken.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Qualitätskontrolle von Proteinen in Mitochondrien untersucht. Die Themengebiete umfaßten die Identifizierung und Charakterisierung neuer mitochondrialer Chaperonine und AAA-Proteasen sowie Struktur-Funktionsanalysen an der *i*-AAA-Protease aus *S. cerevisiae*.

(1) Tcm62 aus *S. cerevisiae* weist eine geringe, aber signifikante Sequenzähnlichkeit zu Chaperoninen der Klasse I (z. B. GroEL aus *E. coli* oder Hsp60 aus Mitochondrien von *S. cerevisiae*) auf. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen belegen, daß Tcm62 ein neues, in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes molekulares Chaperon darstellt. Wie andere Chaperonine bildet es einen hochmolekularen Komplex von ~850 kDa. Tcm62 übt unter Hitzestreß essentielle Funktionen in der Zelle aus. Der Verlust von *TCM62* führt bei erhöhten Temperaturen zu einer Wachstumshemmung der Zellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Unter diesen Bedingungen ist Tcm62 essentiell für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Proteinsynthese und damit für die Synthese mitochondrial kodierter Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe. In Übereinstimmung mit einer Chaperonaktivität von Tcm62 wird das Protein darüber hinaus für die Unterdrückung der Aggregation des ribosomalen Proteins Var1 bei erhöhten Temperaturen benötigt.

(2) Es wurden zwei neue Vertreter der Familie der AAA-Proteasen, MAP-1 (für *m*atrix-*A*AA-*p*rotease; auch *m*-AAA-Protease) und IAP-1 (für *i*ntermembranespace *A*AA-*p*rotease; auch *i*-AAA) im Fadenpilz *N. crassa* identifiziert und charakterisiert. Die entsprechenden Gene wurden unter Verwendung von DNA-Sequenzfragmenten, die aufgrund einer EST-Datenbank bekannt waren bzw. durch experimentelles Absuchen des Genoms von *N. crass*a mit Hilfe der PCR-Technik und degenerierter

Primer erhalten. AAA-Proteasen wurden bislang in *S. cerevisiae* funktionell charakterisiert. Die Identifizierung neuer Vertreter dieser Proteasenfamilie in *N. crassa* ermöglichte erstmalig einen Vergleich der Funktionen in unterschiedlichen Organismen. Dabei ergaben sich konservierte Eigenschaften, jedoch auch funktionelle Unterschiede zwischen den orthologen Proteinen.

Biochemische Analysen zeigten, daß AAA-Proteasen aus *N. crassa*, ebenso wie diejenigen aus *S. cerevisiae*, hochmolekulare Komplexe mit ähnlichen Molekulargewichten in der mitochondrialen Innenmembran bilden. Von besonderer Bedeutung ist die Konservierung der Membrantopologie mitochondrialer AAA-Proteasen, die in beiden Organismen ihre katalytischen Domänen auf gegenüberliegenden Seiten der Membran exponieren. Untersuchungen an Modellproteinen weisen darauf hin, daß eine effiziente Qualitätskontrolle von Innenmembran-proteinen die Anwesenheit von AAA-Proteasen auf beiden Membranseiten erfordert.

Eine Phänotypanalyse eines *N. crassa*-Stamms, indem das *iap-1*-Gen disruptiert wurde, ergab Hinweise auf funktionelle Unterschiede zwischen *i*-AAA-Proteasen aus *S. cerevisiae* (Yme1) und *N. crassa* (IAP-1). In beiden Organismen führt zwar die Abwesenheit der *i*-AAA-Protease zu einer Hemmung des Zellwachstums auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffen unter Hitzestreß. Ein kältesensitives Wachstum oder eine Veränderung der mitochondrialen Morphologie, wie sie für die Disruption der *i*-AAA-Protease aus *S. cerevisiae* beschrieben ist, wurde allerdings in *iap-1*-defizienten *N. crassa*-Hyphen nicht beobachtet. Die in *S. cerevisiae* durchgeführten Komplementationsversuche belegen überlappende, jedoch nicht identische Funktionen der *i*-AAA-Proteasen in beiden Organismen. Durch die Expression von IAP-1 in *S. cerevisiae*-Zellen mit deletierten *YME1*-Gen, wurden lediglich das reduzierte Wachstum dieses Stamms bei 15°C und, zumindest teilweise, der Morphologiedefekte der Mitochondrien unterdrückt. IAP-1 konnte jedoch nicht wichtige Funktionen von Yme1 bei

37°C übernehmen. Dennoch kann aufgrund dieser Befunde IAP-1 als das Ortholog der AAA-Protease Yme1 bezeichnet werden.

(3) Um einen weiteren Einblick in den Funktionsmechanismus der AAA-Proteasen zu erlangen, wurde die Oligomerisierung der *i*-AAA-Protease aus *S. cerevisiae* näher untersucht. Dabei zeigten am isolierten Proteasekomplex durchgeführte Studien eine essentielle Funktion der Oligomerisierung für die ATPase-Aktivität der AAA-Protease. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von Deletionsanalysen die aminoterminale, in der Matrix lokalisierte Region von Yme1 als eine für die Assemblierung wichtige Domäne identifiziert. Der Verlust dieser nur gering konservierten Domäne bedingt eine teilweisen Inaktivierung der *i*-AAA-Protease *in vivo.*

6 Literaturverzeichnis

Agashe, V.R. and Hartl, F.U. (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **11**, 15-25.

Akiyama, Y., Ogura, T. and Ito, K. (1994) Involvement of FtsH in protein assembly into and through the membrane. I. Mutations that reduce retention efficiency of a cytoplasmic reporter. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5218-5224.

Akiyama, Y., Yoshihisa, T. and Ito, K. (1995) FtsH, a Membrane-bound ATPase, Forms a Complex in the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23485-23490.

Alves Rodrigues, A., Gregori, L. and Figueiredo Pereira, M.E. (1998) Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci.*, **21**, 516-520.

Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.

Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M. and White, F.H. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1309-1314.

Archibald, J.M., Logsdon, J.M. and Doolittle, W.F. (1999) Recurrent paralogy in the evolution of archaeal chaperonins. *Curr.Biol.*, **9**, 1053-1056.

Arlt, H., Steglich, G., Perryman, R., Guiard, B., Neupert, W. and Langer, T. (1998) The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *EMBO J.*, **17**, 4837-4847.

Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W. and Langer, T. (1996) The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell*, **85**, 875-885.

Asahara, Y., Atsuta, K., Motohashi, K., Taguchi, H., Yohda, M. and Yoshida, M. (2000) FtsH recognizes proteins with unfolded structure and hydrolyzes the carboxyl side of hydrophobic residues. *J. Biochem. Tokyo*, **127**, 931-937.

Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J. and Emr, S.D. (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome. function. *EMBO J.*, **17**, 2982-2993.

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367-380.

Beissinger, M. and Buchner, J. (1998) How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.*, **379**, 245-259.

Beuron, F., Maurizi, M.R., Belnap, D.M., Kocsis, E., Booy, F.P., Kessel, M. and Steven, A.C. (1998) At sixes and sevens: characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone-assisted protease. *J. Struct. Biol.*, **123**, 248-259.

Beyer, A. (1997) Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.*, **6**, 2043-2058.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. and Huber, R. (1999) The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 295-317.

Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. and Huber, R. (2000) The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature*, **403**, 800-805.

Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaup, G., Koszinowski, U. and Kloetzel, P.M. (1994) Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site

preference of 20S mouse proteasomes. *J. Exp. Med.*, **179**.

Boisvert, D.C., Wang, J., Otwinowski, Z., Horwich, A.L. and Sigler, P.B. (1996) The 2.4 A crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL complexed with ATP gamma S. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 170-177.

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

Braig, K., Otwinowski, Z., Hedge, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L. and Sigler, P.B. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8Å. *Nature*, **371**, 578-586.

Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.-M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 221-226.

Bross, P., Andresen, B.S., Knudsen, I., Kruse, T.A. and Gregersen, N. (1995) Human ClpP protease: cDNA sequence, tissue-specific expression and chromosomal assignment of the gene. *FEBS Lett.*, **377**, 249-252.

Buchberger, A., Schroder, H., Hesterkamp, T., Schonfeld, H.J. and Bukau, B. (1996) Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J. Mol. Biol.*, **261**, 328-333.

Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.

Cambareri, E.B., Jensen, B.C., Schabtach, E. and Selker, E.U. (1989) Repeat-induced G-C to A-T mutations in Neurospora. *Science*, **244**, 1571-1575.

Campbell, C.L., Tanaka, N., White, K.H. and Thorsness, P.E. (1994) Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by *yme1* are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 899-905.

Campbell, C.L. and Thorsness, P.E. (1998) Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in *yme1* yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J. Cell Sci.*, **111**, 2455-2464.

Caplan, A. and Douglas, M.G. (1991) Characterization of YDJ1: a yeast homologue of *E. coli* dnaJ gene. *J. Cell. Biol.*, **114**, 609-621.

Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Cocozza, S., Marconi, R., Durr, A., Fontaine, B. and Ballabio, A. (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*, **93**, 973-983.

Chen, L. and Sigler, P.B. (1999) The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell*, **99**, 757-768.

Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L. and Horwich, A.L. (1989) Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature*, **337**, 620-625.

Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.*, **17**, 7151-7160.

Corydon, T.J., Bross, P., Holst, H.U., Neve, S., Kristiansen, K., Gregersen, N. and Bolund, L. (1998) A human homologue of *Escherichia coli* ClpP caseinolytic protease: recombinant expression, intracellular processing and subcellular localization. *Biochem. J.*, **331**, 309-316.

Corydon, T.J., Wilsbech, M., Jespersgaard, C., Andresen, B.S., Borglum, A.D., Pedersen, S., Bolund, L., Gregersen, N. and Bross, P. (2000) Human and mouse mitochondrial

orthologs of bacterial ClpX. *Mamm Genome*, **11**, 899-905.
Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1990) Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Genet.*, **24**, 91-113.
Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847.
Davis, R.H. and de Serres, F.J. (1970) Genetic and microbial research techniques for *Neurospora crassa*. *Methodes Enzymol.*, **17A**, 79-143.
Dibrov, E., Fu, S. and Lemire, B.D. (1998) The Saccharomyces cerevisiae TCM62 gene encodes a chaperone necessary for the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase (complex II). *J. Biol. Chem.*, **273**, 32042-32048.
Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Stetter, K.O., Huber, H., Huber, R. and Steinbacher, S. (1998) Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell*, **93**, 125-138.
Dobson, C.M. and Karplus, M. (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 92-101.
Ebbole, D.J. and Sachs, M.S. (1990) A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. *Fungal Genet. Newsl.*, **37**, 17-18.
Ellis, R.J. (1997a) Do molecular chaperones have to be proteins? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **238**, 687-692.
Ellis, R.J. (1997b) Molecular chaperones: avoiding the crowd. *Curr. Biol.*, **7**, R531-533.
Ellis, R.J. (1999) Chaperonins. *Curr. Biol.*, **9**, R352.
Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A. and Hartl, F.U. (1997) In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell*, **90**, 491-500.
Farr, G.W., Scharl, E.C., Schumacher, R.J., Sondek, S. and Horwich, A.L. (1997) Chaperonin-mediated folding in the eukaryotic cytosol proceeds through rounds of release of native and nonnative forms. *Cell*, **89**, 927-937.
Fenton, W.A. and Horwich, A.L. (1997) GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci.*, **6**, 743-760.
Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K. and Horwich, A.L. (1994) Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature*, **371**, 614-619.
Fu, G.K. and Markovitz, D.M. (1998) The human Lon protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry*, **37**, 1905-1909.
Fu, G.K., Smith, M.J. and Markovitz, D.M. (1997) Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **272**, 534-538.
Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. and Lazarow, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.*, **93**, 97-102.
Gao, Y., Thomas, J.O., Chow, R.L., Lee, G.H. and Cowan, N.J. (1992) A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell*, **69**, 1043-1050.
Geever, R.F., Huiet, L., Baum, J.A., Tyler, B.M., Patel, V.B., Rutledge, B.J., Case, M.E. and Giles, N.H. (1989) DNA sequence, organization and regulation of the qa gene cluster of Neurospora crassa. *J. Mol. Biol.*, **207**, 15-34.
Geissler, S., Siegers, K. and Schiebel, E. (1998) A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *EMBO J.*, **17**, 952-966.
Georgopoulos, C. and Welch, W.J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 601-634.
Gething, M.J. (2000) Presenilin mutants subvert chaperone function. *Nat. Cell Biol.*, **2**, E21-23.

Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1425.

Glickman, M., Rubin, D., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. and Finley, D. (1998a) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to COP9-signalosome and elF3. *Cell*, **94**, 615-623.

Glickman, M., Rubin, D., Fried, V. and Finley, D. (1998b) The regulatory particle of the Saccharomyces cerevisiae proteasome. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3149-3162.

Glover, J.R. and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, **94**, 73-82.

Goldberg, A.L. (1992) The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.*, **203**, 9-23.

Gonzalez, M., Frank, E. G., Levine, A. S. and Woodgate, R. (1998) Lon-mediated proteolysis of the *Escherichia coli* UmuD mutagenesis protein: *in vitro* degradation and identification of residues required for proteolysis. *Genes Dev.*, **12**, 3889-3899.

Gottesman, S., Clark, W.P., de Crecy Lagard, V. and Maurizi, M.R. (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and *in vivo* activities. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22618-22626.

Gottesman, S. and Maurizi, M.R. (1992) Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.*, **56**, 592-621.

Gottesman, S., Maurizi, M.R. and Wickner, S. (1997) Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell*, **91**, 435-438.

Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A.C. and Maurizi, M.R. (1998) Enzymatic and structural similarities between the Escherichia coli ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J. Biol. Chem.*, **273**, 12476-12481.

Grivell, L.A. (1989) Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur. J. Biochem.*, **182**, 477-493.

Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H. and Finley, D. (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1062-1067.

Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. *Nature*, **386**, 463-471.

Guélin, E., Rep, M. and Grivell, L.A. (1996) Afg3p, a mitochondrial ATP-dependent metalloprotease, is involved in the degradation of mitochondrially-encoded Cox1, Cox3, Cob, Su6, Su8 and Su9 subunits of the inner membrane complexes III, IV and V. *FEBS Lett.*, **381**, 42-46.

Haas, A.L. and Siepmann, T.J. (1997) Pathways of ubiquitin conjugation. *FASEB J.*, **11**, 1257-1268.

Habeeb, A.F.S.A. (1972) Reaction of protein sulfhydril gruops with Ellman's reagent. *Meth. Enzymol.*, **25**, 457-463.

Hallberg, E.M., Shu, Y. and Hallberg, R.L. (1993) Loss of mitochondrial hsp60 function: nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3050-3057.

Hanekamp, T. and Thorsness, P.E. (1996) Inactivation of YME2/RNA12, which encodes an integral inner mitochondrial membrane protein, causes increased escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2764-2771.

Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press,

Cold Spring Harbor, New York.
Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-579.
Hartman, J.J. and Vale, R.D. (1999) Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. *Science*, **286**, 782-785.
Heemels, M.T. and Ploegh, H. (1995) Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 463-491.
Hendrick, J.P. and Hartl, F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 349-384.
Herrmann, J.M., Fölsch, H., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1994) Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. In Celis, D.E. (ed.) *Cell biology: A laboratory handbook.* Academic Press, San Diego, Vol. 1, pp. 538-544.
Hilt, W. and Wolf, D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 96-102.
Höhfeld, J. and Hartl, F.U. (1994) Requirement of the chaperonin cofactor HSP10 for protein folding and sorting in yest mitochondria. *J. Cell Biol.*, **126**, 305-315.
Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D. and Jentsch, S. (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*, **102**, 577-586.
Hoskins, J.R., Kim, S.Y. and Wickner, S. (2000) Substrate recognition by the ClpA chaperone component of ClpAP protease. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35361-35367.
Hoskins, J.R., Pak, M., Maurizi, M.R. and Wickner, S. (1998) The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 12135-12140.
Houry, W.A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. and Hartl, F.U. (1999) Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature*, **402**, 147-154.
Ishikawa, T., Maurizi, M.R., Belnap, D. and Steven, A.C. (2000) Docking of components in a bacterial complex. *Nature*, **408**, 667-668.
Johansson, J. and Uhlin, B.E. (1999) Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 10776-10781.
Johnson, J.L. and Craig, E.A. (1997) Protein folding in vivo: unraveling complex pathways. *Cell*, **90**, 201-204.
Johnson, R.B., Fearon, K., Mason, T. and Jindal, S. (1989) Cloning and characterization of the yeast chaperonin HSP60 gene. *Gene*, **84**, 295-302.
Jubete, Y., Maurizi, M.R. and Gottesman, S. (1996) Role of the heat shock protein DnaJ in the lon-dependent degradation of naturally unstable proteins. *J. Biol. Chem.*, **271**, 30798-30803.
Juhola, M.K., Shah, Z.H., Grivell, L.A. and Jacobs, H.T. (2000) The mitochondrial inner membrane AAA metalloprotease family in metazoans. *FEBS Lett.*, **481**, 91-95.
Karata, K., Inagawa, T., Wilkinson, A.J., Tatsuta, T. and Ogura, T. (1999) Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26225-262232.
Kessel, M., Maurizi, M.R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B.L., Singh, S.K. and Steven, A.C. (1995) Homology in Structural Organization Between *E. coli* ClpAP Protease and the Eukaryotic 26 S Proteasome. *J. Mol. Biol.*, **250**, 587-594.
Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1999) Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J.*, **18**, 2970-2981.
Kim, Y.I., Burton, R.E., Burton, B.M., Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2000) Dynamics of

substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol. Cell*, **5**, 639-648.

Kisselev, A.F., Akopian, T.N. and Goldberg, A.L. (1998) Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1982-1989.

Klanner, C., Neupert, W. and Langer, T. (2000) The chaperonin-related protein Tcm62p ensures mitochondrial gene expression under heat stress. *FEBS Lett.*, **470**, 365-369.

Klumpp, M., Baumeister, W. and Essen, L.O. (1997) Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin. *Cell*, **91**, 263-270.

Kopito, R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.*, **10**, 524-530.

Kruklitis, R., Welty, D.J. and Nakai, H. (1996) ClpX protein of *Escherichia coli* activates bacteriophage Mu transposase in the strand transfer complex for initiation of Mu DNA synthesis. *EMBO J.*, **15**, 935-944.

Kubota, H., Hynes, G., Carne, A., Ashworth, A. and Willison, K. (1994) Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin. *Curr. Biol.*, **4**, 89-99.

Kunau, W.H., Beyer, A., Franken, T., Gotte, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A. and Wiebel, F.F. (1993) Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. *Biochimie*, **75**, 209-224.

Kyshe-Anderson, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**, 203-207.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Langer, T. (2000) AAA-proteases: cellular machines for the degradation of membrane proteins. *Trends Biochem Sci.*, **25**, 247-251.

Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K. and Hartl, F.U. (1992a) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*, **356**, 683-689.

Langer, T. and Neupert, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. In Morimoto, R., Tissières, A. and Georgopoulos, C. (eds.), *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 53-83.

Langer, T. and Neupert, W. (1996) Regulated protein degradation in mitochondria. *Experientia*, **52**, 1069-1076.

Langer, T., Pajic, A., Wagner, I. and Neupert, W. (1995) Proteolytic breakdown of membrane-associated polypeptides in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth. Enzymol.*, **260**, 495-503.

Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W. and Hartl, F.U. (1992b) Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *Embo J.*, **11**, 4757-4765.

Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S. and Candia, O.A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Ana.l Biochem.*, **100**, 95-97.

Laskey RA, H.B., Mills AD, Finch JT. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, **275**, 416-420.

Lee, S.B., Milgroom, M.G. and Taylor, J.W. (1988) A rapid, high yield mini-prep method for

isolation of total genomic DNA from fungi. *N. c. Newslett.*, **35**, 23-24.

Lemaire, C., Hamel, P., Velours, J. and Dujardin, G. (2000) Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F0-ATPase subunit accumulation in an oxa1 deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23471-23475.

Lenzen, C.U., Steinmann, D., Whiteheart, S.W. and Weis, W.I. (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell*, **94**, 525-536.

Leonhard, K. (2000) *Enzyme und Mechanismen des Abbaus von Membranproteinen der Mitochondrien.* Shaker Verlag, München.

Leonhard, K., Guiard, B., Pellecchia, G., Tzagoloff, A., Neupert, W. and Langer, T. (2000) Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol. Cell.*, **5**, 629-638.

Leonhard, K., Herrmann, J.M., Stuart, R.A., Mannhaupt, G., Neupert, W. and Langer, T. (1996) AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J.*, **15**, 4218-4229.

Leonhard, K., Stiegler, A., Neupert, W. and Langer, T. (1999) Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature*, **398**, 348-351.

Leroux, M.R., Fandrich, M., Klunker, D., Siegers, K., Lupas, A.N., Brown, J.R., Schiebel, E., Dobson, C.M. and Hartl, F.U. (1999) MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. *EMBO J.*, **18**, 6730-6743.

Leroux, M.R. and Hartl, F.U. (2000) Protein folding: versatility of the cytosolic chaperonin TRiC/CCT. *Curr. Biol.*, **10**, R260-264.

Levchenko, I., Luo, L. and Baker, T.A. (1995) Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. *Genes Dev.*, **9**, 2399-2408.

Llorca, O., Smyth, M.G., Carrascosa, J.L., Willison, K.R., Radermacher, M., Steinbacher, S. and Valpuesta, J.M. (1999) 3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals the asymmetric folding conformation of a type II chaperonin. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 639-642.

Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995) Crystal Structure of the 20S Proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 A Resolution. *Science*, **268**, 533-539.

Lupas, A., Flanagan, J.M., Tamura, T. and Baumeister, W. (1997) Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 399-404.

Lupas, A., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1994) Proteasome sequences in eubacteria. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 533-534.

Makino, S., Makinoa, T., Abe, K., Hashimoto, J., Tatsuta, T., Kitagawa, M., Mori, H., Ogura, T., Fujii, T., Fushinobu, S., Wakagi, T. and Matsuzawa, H. (1999) Second transmembrane segment of FtsH plays a role in its proteolytic activity and homo-oligomerization. *FEBS Lett.*, **460**, 544-548.

Martin, J. and Hartl, F.U. (1997) Chaperone-assisted protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 41-52.

Martin, J., Horwich, A.L. and Hartl, F.U. (1992) Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60. *Science*, **258**, 995-998.

Maurizi, M.R. (1987) Degradation *in vitro* of bacteriophage lambda N protein by Lon protease in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 2696-2703.

Mayer, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995) Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and

unfolding. *Cell*, **80**, 127-37.

Mayhew, M., da Silva, A.C., Martin, J., Erdjument Bromage, H., Tempst, P. and Hartl, F.U. (1996) Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature*, **379**, 420-426.

McMullin, T.W. and Hallberg, R.L. (1987) A normal mitochondrial protein is selectively synthesized and accumulated during heat shock in Tetrahymena thermophila. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 4414-4423.

McMullin, T.W. and Hallberg, R.L. (1988) A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the Escherichia coli groEL gene. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 371-380.

Merrifield, R. (1963) Solid phase peptide synthesis. The synthesisis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154.

Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J.M., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1996) Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **15**, 6899-6909.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*, **360**, 597-599.

Nagiec, E.E., Bernstein, A. and Whiteheart, S.W. (1995) Each domain of the N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein contributes to its transport activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29182-29188.

Nakai, T., Yasuhara, T., Fujiki, Y. and Ohashi, A. (1995) Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome *c* oxidase in yeast mitochondria. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4441-4452.

Netzer, W.J. and Hartl, F.U. (1998) Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 68-73.

Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. and Koonin, E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.*, **9**, 27-43.

Nijtmans, L.G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P.J., Berden, J.A., Back, J.W., Muijsers, A.O., van der Spek, H. and Grivell, L.A. (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.*, **19**, 2444-2451.

Orbach, M.J. (1994) A cosmid with a HyR marker for fungal library construction and screening. *Gene*, **150**, 159-162.

Orlowski, M., Cardozo, C. and Michaud, C. (1993) Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry*, **32**, 1563-1572.

Ortega, J., Singh, S.K., Ishikawa, T., Maurizi, M.R. and Steven, A.C. (2000) Visualization of substrate binding and translocation by the ATP-dependent protease, ClpXP. *Mol. Cell*, **6**, 1515-1521.

Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. and Hartl, F.U. (1989) Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature*, **341**, 125-130.

Pajic, A., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W. and Langer, T. (1994) Yta10p is required for the ATP-dependent degradation of polypeptides in the inner membrane of mitochondria. *FEBS Lett.*, **353**, 201-206.

Pak, M. and Wickner, S. (1997) Mechanism of protein remodeling by ClpA chaperone. *Proc.*

Natl. Acad. Sci., **94**, 4901-4906.

Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. and Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, **78**, 773-785.

Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A. and Lindquist, S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, **372**, 475-478.

Patel, S. and Latterich, M. (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell. Biol.*, **8**, 65-71.

Paul, M.F. and Tzagoloff, A. (1995) Mutations in *RCA1* and *AFG3* inhibit F_1-ATPase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **373**, 66-70.

Pearce, D.A. and Sherman, F. (1995) Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome *c* and suppression of the degradation by mutation of *yme1*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1-4.

Pelham, H.R. and Jackson, R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247-256.

Prasad, T.K., Hack, E. and Hallberg, R.L. (1990) Function of the maize mitochondrial chaperonin hsp60: specific association between hsp60 and newly synthesized F1-ATPase alpha subunits. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 3979-3986.

Prokisch, H., Neupert, W. and Westermann, B. (2000) Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in neurospora crassa. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2961-2971.

Rasulova, F.S., Dergousova, N.I., Starkova, N.N., Melnikov, E.E., Rumsh, L.D., Ginodman, L.M. and Rotanova, T.V. (1998) The isolated proteolytic domain of *Escherichia col*i ATP-dependent protease Lon exhibits the peptidase activity. *FEBS Lett.*, **432**, 179-181.

Reading, D.S., Hallberg, R.L. and Myers, A.M. (1989) Characterization of the yeast HSP60 gene coding for a mitochondrial assembly factor. *Nature*, **337**, 655-659.

Rep, M., Nooy, J., Guélin, E. and Grivell, L.A. (1996) Three genes for mitochondrial proteins suppress null-mutations in both *AFG3* and *RCA1* when overexpressed. *Curr. Genet.*, **30**, 206-211.

Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H.C., Moerschell, R.P., Yoo, S.J., Seol, J.H., Chung, C.H. and Goldberg, A.L. (1996) HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc. Natl. Acad .Sci.*, **93**, 5808-5813.

Rohrwild, M., Pfeifer, G., Santarius, U., Muller, S.A., Huang, H.C., Engel, A., Baumeister, W. and Goldberg, A.L. (1997) The ATP-dependent HslVU protease from Escherichia coli is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 133-139.

Roseman, A.M., Chen, S., White, H., Braig, K. and Saibil, H.R. (1996) The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell*, **87**, 241-251.

Rospert, S., Glick, B.S., Jeno, P., Schatz, G., Todd, M.J., Lorimer, G.H. and Viitanen, P.V. (1993) Identification and functional analysis of chaperonin 10, the groES homolog from yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10967-10971.

Rospert, S., Looser, R., Dubaquie, Y., Matouschek, A., Glick, B.S. and Schatz, G. (1996) Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. *EMBO J.*, **15**, 764-774.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.

(1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A. and Lindquist, S. (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.*, **11**, 2357-2364.

Savel´ev, A.S., Novikova, L.A., Kovaleva, I.E., Luzikov, V.N., Neupert, W. and Langer, T. (1998) ATP-dependent proteolysis in mitochondria: *m*-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70-system. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20596-20602.

Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. and Lindquist, S. (1996) Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 289-296.

Schmidt, M., Lupas, A.N. and Finley, D. (1999) Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 584-591.

Schmitt, M., Neupert, W. and Langer, T. (1995) Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *EMBO J.*, **14**, 3434-3444.

Schmitt, M., Neupert, W. and Langer, T. (1996) The molecular chaperone Hsp78 confers compartment-specific thermotolerance to mitochondria. *J. Cell Biol.*, **134**, 1375-1386.

Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770-774.

Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. and Baumeister, W. (1995) Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease. *Science*, **268**, 579-582.

Selker, E.U. (1990) Premeiotic instability of repeated sequences in Neurospora crassa. *Annu. Rev. Genet.*, **24**, 579-613.

Seong, I.S., Oh, J.Y., Lee, J.W., Tanaka, K. and Chung, C.H. (2000) The HslU ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of SulA, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **477**, 224-228.

Sherman, M. and Goldberg, A.L. (1992) Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **11**, 71-77.

Shotland, Y., Teff, D., Koby, S., Kobiler, O. and Oppenheim, A.B. (2000) Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.*, **299**, 953-964.

Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M.R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E. and Hartl, F.U. (1999) Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *EMBO J.*, **18**, 75-84.

Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.

Smith, C.K., Baker, T.A. and Sauer, R.T. (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 6678-6682.

Sollner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell*, **62**, 107-115.

Söllner, T., Rassow, J. and Pfanner, N. (1991) Analysis of mitochondrial protein import using translocation intermediates and specific antibodies. *Methods Cell Biol.*, **34**, 345-358.

Sousa, M.C., Trame, C.B., Tsuruta, H., Wilbanks, S.M., Reddy, V.S. and McKay, D.B. (2000) Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell*, **103**, 633-643.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.

Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J. and Selker, E. (1989) Use of bacterial Hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in Neurospora crassa transformation. *Fungal Genet. Newslett.*, **36**, 79-81.

Stahlberg, H., Kutejova, E., Suda, K., Wolpensinger, B., Lustig, A., Schatz, G., Engel, A. and Suzuki, C.K. (1999) Mitochondrial Lon of Saccharomyces cerevisiae is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 6787-6790.

Steglich, G., Neupert, W. and Langer, T. (1999) Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3435-3442.

Stout, V., Torres, C.A., Maurizi, M.R., Gutnick, D. and Gottesman, S. (1991) RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J. Bacteriol.*, **173**, 1738-1747.

Suzuki, C.K., Rep, M., Van Dijl, J.M., Suda, K., Grivell, L.A. and Schatz, G. (1997) ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 118-123.

Swaffield, J.C., Bromberg, J.F. and Johnston, S.A. (1992) Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature*, **357**, 698-700.

Teter, S.A., Houry, W.A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. and Hartl, F.U. (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell*, **97**, 755-765.

Thompson, M.W. and Maurizi, M.R. (1994) Activity and specificity of *Escherichia coli* ClpAP protease in cleaving model peptide substrates. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18201-18208.

Thorsness, P.E. and Fox, T.D. (1990) Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **346**, 376-379.

Thorsness, P.E., White, K.H. and Fox, T.D. (1993) Inactivation of *YME1*, a member of the ftsH-SEC18-PAS1-CDC48 family of putative ATPase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5418-5426.

Thulasiraman, V., Yang, C.F. and Frydman, J. (1999) In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment. *EMBO J.*, **18**, 85-95.

Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., Oppenheim, A.B., Yura, T., Yamanaka, K., Niki, H., Hiraga, S. and Ogura, T. (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription. factor σ^{32}. *EMBO J.*, **14**, 2551-2560.

Tomoyasu, T., Yamanaka, K., Murata, K., Suzaki, T., Bouloc, P., Kato, A., Niki, H., Hiraga, S. and Ogura, T. (1993) Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **175**, 1352-1357.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 267-271.

Tran, P.B. and Miller, R.J. (1999) Aggregates in neurodegenerative disease: crowds and power? *Trends Neurosci.*, **22**, 194-197.

Tzagoloff, A. and Dieckmann, C.L. (1990) PET genes of Saccharomyces cerevisiae. *Microbio. .Rev.*, **54**, 211-225.

Vainberg, I.E., Lewis, S.A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H.L. and Cowan, N.J. (1998) Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic

chaperonin. *Cell*, **93**, 863-873.

van den Berg, B., Wain, R., Dobson, C.M. and Ellis, R.J. (2000) Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell. *EMBO J.*, **19**, 3870-3875.

van Dyck, L., Dembowski, M., Neupert, W. and Langer, T. (1998a) Mcx1p, a ClpX homologue in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **438**, 250-254.

van Dyck, L. and Langer, T. (1999) ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Cell Mol. Life Sci.*, **56**, 825-842.

van Dyck, L., Neupert, W. and Langer, T. (1998b) The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.*, **12**, 1515-1524.

Vernet, T., Dignard, D. and Thomas, D.Y. (1987) A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene*, **52**, 225-233.

Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 1015-1068.

Vollmer, S. and Yanofsky, C. (1986) Efficient cloning of genes of Neurospora crassa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4869-4873.

von Heijne, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J.*, **5**, 1335-1342.

Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.

Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T. and Neupert, W. (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.*, **13**, 5135-5145.

Wagner, I., van Dyck, L., Savel'ev, A.S., Neupert, W. and Langer, T. (1997) Autocatalytic processing of the ATP-dependent PIM1 protease: crucial function of a pro-region for sorting to mitochondria. *EMBO J.*, **16**, 7317-7325.

Waldmann, T., Nimmesgern, E., Nitsch, M., Peters, J., Pfeifer, G., Muller, S., Kellermann, J., Engel, A., Hartl, F.U. and Baumeister, W. (1995) The thermosome of Thermoplasma acidophilum and its relationship to the eukaryotic chaperonin TRiC. *Eur. J. Biochem.*, **227**, 848-856.

Walker, J., Saraste, M., Runswick, M. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **8**, 945-951.

Wang, J., Hartling, J.A. and Flanagan, J.M. (1997) The structure of ClpP at 2.3 A resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell*, **91**, 447-456.

Wang, J.D., Michelitsch, M.D. and Weissman, J.S. (1998) GroEL-GroES-mediated protein folding requires an intact central cavity. *Proc. Natl. Acad.Sci. U S A*, **95**, 12163-12168.

Wawrzynow, A., Banecki, B. and Zylicz, M. (1996) The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol. Microbiol.*, **21**, 895-899.

Waxman, L. and Goldberg, A.L. (1985) Protease La, the lon gene product, cleaves specific fluorogenic peptides in an ATP-dependent reaction. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12022-12028.

Weber, E.R., Hanekamp, T. and Thorsness, P.E. (1996) Biochemical and functional analysis of the YME1 gene product, an ATP and zinc-dependent mitochondrial protease from *S. cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 307-317.

Weber-Ban, E.U., Reid, B., Miranker, A.D. and Horwich, A.L. (1999) Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature*, **401**, 90-93.

Westermann, B. and Neupert, W. (2000) Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, **16**, 1421-1427.

Wickner, S., Gottesman, S., Skowyra, D., Hoskins, J., McKenney, K. and Maurizi, M.R. (1994) A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12218-12222.

Wickner, S., Maurizi, M. and Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, **286**, 1888-1893.

Wojtkowiak, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1993) Isolation and characterization of ClpX, a new ATP-dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22609-22617.

Wolf, S., Nagy, I., Lupas, A., Pfeifer, G., Cejka, Z., Muller, S.A., Engel, A., De Mot, R. and Baumeister, W. (1998) Characterization of ARC, a divergent member of the AAA ATPase family from Rhodococcus erythropolis. *J. Mol. Biol.*, **277**, 13-25.

Woo, K.M., Kim, K.I., Goldberg, A.L., Ha, D.B. and Chung, C.H. (1992) The heat-shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20429-20434.

Xu, Z., Horwich, A.L. and Sigler, P.B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex. *Nature*, **388**, 741-750.

Yaffe, M.B., Farr, G.W., Miklos, D., Horwich, A.L., Sternlicht, M.L. and Sternlicht, H. (1992) TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature*, **358**, 245-248.

Yaffe, M.P. and Schatz, G. (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4819-4823.

Yamamoto, A., Lucas, J.J. and Hen, R. (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell*, **101**, 57-66.

Yu, R.C., Hanson, P.I., Jahn, R. and Brunger, A.T. (1998) Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 803-811.

Zahn, R., Buckle, A.M., Perret, S., Johnson, C.M., Corrales, F.J., Golbik, R. and Fersht, A.R. (1996) Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15024-15029.

Zinser, E. and Daum, G. (1995) Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**, 493-536.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Klanner, C., Neupert, W. and Langer, T. (2000) The chaperonin-related protein Tcm62p ensures mitochondrial gene expression under heat stress. *FEBS Lett.*, **470**, 365-369.

Klanner, C., Prokisch, H., Langer, T. (2001) MAP-1 and IAP-1, two novel AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces in the mitochondrial inner membrane of *Neurospora crassa*; im Druck.

Danksagung:

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen. Sein großes Interesse und seine ständige Diskussionsbereitschaft trugen maßgeblich zum Erfolg meiner Dissertation bei.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. Martin Biel für die Bereitschaft meine Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Langer, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und für viele wertvolle Tipps und Anregungen.

Danken möchte ich auch Petra Robisch, die mich in einer sehr arbeitsintensiven und kritischen Phase durch unermüdliches und exzellentes Pipettiern unterstütze. Ein Dankeschön auch allen Mitarbeitern der »Langergruppe«, ganz besonders Heike Arlt, Luc van Dyck, Michael Käser, Klaus Leonhard, Matthias Schmitt, Gregor Steglich, Alexandra Stiegler und Ingrid Wagner für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Nicht zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinen nicht wissenschaftlichen Kollegen der Werkstatt, dem Computerraum, dem Hasenstall, der Neurosporazucht, des Sekretariats und der Spülküche bedanken. Durch ihre Arbeit wurde ein reibungsloser Ablauf des Laboralltags erst ermöglicht.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Carola Klanner
Geburtsdatum	24.08.1971
Geburtsort	München

Schulbildung und Hochschulstudium

1978-1982	Besuch der Grundschule an der Parkstraße in Eichenau
1982-1991	Besuch des Bertold-Brecht-Gymnasiums in München
1991	Abitur
1991-1995	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1993	1. Staatsexamen
1995	2. Staatsexamen
Nov. 1995-April 1996	Pharmaziepraktikum in der Kugel-Apotheke in München
Mai 1996-Okt. 1996	Pharmaziepraktikum bei Klinge-Pharma GmbH in München
Dez. 1996	3. Staatsexamen
Jan. 1997	Approbation als Apothekerin
	Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert am Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München