

**Untersuchungen zur molekularen Funktion und biologischen
Rolle der mitochondrialen CLXP-Protease in dem
filamentösen Ascomyceten *Podospora anserina***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Fabian Fischer
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2015
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. Meike Piepenbring

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz

2. Gutachter: Dr. Christian Behrends

Datum der Disputation: 02.06.2016

„Knowledge is a function of being. When there is a change in the being of the knower, there is a corresponding change in the nature and amount of knowing.“

Aldous Huxley – *The Perennial Philosophy*

Konventionen zur Schreibweise von Genen, Proteinen und Stämmen:

Gene werden kursiv geschrieben (z. B. *ClpX*, *ClpP*). Soll ein Gen einer bestimmten Art bezeichnet werden, so wird der Artnamenname als Abkürzung vorangestellt. So wird z. B. *Podospira anserina ClpX* als *PaClpX* und *Homo sapiens ClpP* als *HsClpP* bezeichnet.

Proteine werden groß und nicht kursiv geschrieben (z. B. CLPX, CLPP). Soll ein Protein einer bestimmten Art bezeichnet werden, so wird auch hier der Artnamenname als Abkürzung vorangestellt (z. B. PaCLPX, HsCLPP).

Mutierte Varianten von Genen oder Proteinen bzw. Fusionsgene und -proteine werden durch eine hochgestellte Abkürzung bezeichnet, deren Bedeutung an geeigneter Stelle im Text erläutert wird. So wird z. B. die mutierte Variante von *H. sapiens* CLPP, bei der das katalytische Serin an Aminosäureposition 153 des Prä-Proteins durch ein Alanin ersetzt wurde, als HsCLPP^{S153A} und das dafür kodierende Gen als *HsClpP*^{S153A} bezeichnet.

Deletionsstämme werden nach dem deletierten Gen benannt (z. B. *PaClpP*-Deletionsstamm) oder in Kurzform durch den griechischen Buchstaben Δ gekennzeichnet, welcher der Bezeichnung des deletierten Gens vorangestellt wird (z. B. Δ*PaClpP*).

Die Bezeichnung für Stämme, die eine Expressionskassette für ein bestimmtes rekombinantes Gen enthalten, setzt sich aus den jeweiligen Bezeichnungen des Stammes und des Gens zusammen, die voneinander durch einen Querstrich getrennt werden. So wird z. B. der *PaClpP*-Deletionsstamm, welcher eine Expressionskassette für *HsClpP*^{S153A} enthält, als Δ*PaClpP*/*HsClpP*^{S153A} bezeichnet. In einigen Fällen wird durch die nachstehende Abkürzung „_OEx“ zusätzlich gekennzeichnet, dass es sich um eine Überexpression des betreffenden Gens handelt (z. B. Δ*PaClpP*/*HsClpP*_OEx).

Soll ein spezifisches Isolat eines *P. anserina*-Stammes eindeutig benannt werden, so wird dessen Identifikationsnummer und Kreuzungstyp angegeben. So wird etwa das Isolat F81571 des *PaClpP*-Deletionsstammes mit dem Kreuzungstyp „-“ als Δ*PaClpP* F81571 bezeichnet.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mitochondrien als „zelluläre Kraftwerke“	1
1.2	Die Bedeutung von Mitochondrien für Organismen	3
1.2.1	Mitochondrien und Altern	3
1.2.2	Mitochondrien und ihre Rolle für Krankheiten	6
1.3	Mitochondriale Qualitätskontrolle.....	9
1.4	Mitochondriale Proteasen	12
1.5	CLP-Proteasen	15
1.5.1	Allgemeiner Aufbau und Funktionsmechanismus von CLP-Proteasen	15
1.5.2	Bekannte Aufgaben bakterieller CLP-Proteasen	18
1.5.3	Bekannte Aufgaben eukaryotischer CLP-Proteasen.....	20
1.6	<i>Podospora anserina</i> als eukaryotischer Modellorganismus	25
1.7	Mitochondriale Proteasen in <i>P. anserina</i>	27
2	PROBLEMSTELLUNG	29
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Material	31
3.1.1	Geräte.....	31
3.1.2	Sonstige Materialien	32
3.1.3	Chemikalien und Stoffe	32
3.1.4	Puffer und Lösungen	33
3.1.5	Anzuchtmedien	37
3.1.6	Stämme	39
3.1.7	Plasmide und Cosmide	39
3.1.8	Oligonukleotide	40
3.1.9	Enzyme	41
3.1.10	Kits.....	41
3.1.11	Antikörper	41
3.1.12	Größenstandards.....	42
3.1.13	Computerprogramme	42
3.2	Methoden	43
3.2.1	<i>Escherichia coli</i> -spezifische Methoden.....	43
3.2.2	<i>Podospora anserina</i> -spezifische Methoden	43
3.2.3	DNA-spezifische Methoden.....	47
3.2.4	Protein-spezifische Methoden	54
3.2.5	<i>In silico</i> -Methoden	63
4	ERGEBNISSE	65
4.1	Herstellung und Charakterisierung von <i>P. anserina</i> CLP-Protease-Mutanten.....	65
4.1.1	Zusätzliche Charakterisierungen des <i>PaClpP</i> -Deletionsstammes	65
4.1.2	Herstellung eines <i>PaClpX</i> -Deletionsstammes und eines <i>PaClpP/PaClpX</i> -Doppeldeletionsstammes	68

Inhaltsverzeichnis

4.1.3	Charakterisierung von $\Delta PaClpX$ und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$	72
4.1.4	Komplementation von $\Delta PaClpX$ mit dem menschlichem CLPX-Homolog	73
4.2	Etablierung einer Methode für Identifizierung von Substraten und Interaktionspartnern der CLPXP-Protease in <i>P. anserina</i>	74
4.2.1	Herstellung und Charakterisierung von <i>PaClpP</i> -Deletionsstämmen mit katalytisch inaktiven CLPP-Varianten	76
4.2.2	Aufreinigung verschiedener CLPP-Varianten aus <i>P. anserina</i> Mitochondrien	80
4.3	Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in <i>P. anserina</i>	98
4.4	Potenzielle Interaktionspartner und Substrate der mitochondrialen CLPXP-Protease in <i>P. anserina</i>	103
5	DISKUSSION	113
5.1	Die Abwesenheit von PaCLPP führt zu keinen auffallend negativen Effekten	115
5.2	Das Chaperon PaCLPX hat vermutlich PaCLPP-unabhängige Funktionen	117
5.3	Das menschliche CLPX-Chaperon ist nicht in der Lage $\Delta PaClpX$ zu komplementieren	118
5.4	HsCLPP erfüllt, im Gegensatz zu PaCLPP, die Voraussetzungen für einen CLPP „Substrat-trapping Assay“ in <i>P. anserina</i>	118
5.5	Der CLPP „Substrat-trapping Assay“ konnte erfolgreich durchgeführt werden	120
5.6	Die Mehrheit der potenziellen Interaktionspartner und Substrate der mitochondrialen CLPXP-Protease in <i>P. anserina</i> sind Komponenten des Energiestoffwechsels	122
5.7	Relevanz der Ergebnisse als Ansatz für eine mechanistische Erklärung der Langlebigkeit infolge der <i>PaClpP</i> -Deletion	128
5.8	Mögliche Implikationen der Ergebnisse für menschliche Krankheiten	131
6	AUSBLICK	135
7	ZUSAMMENFASSUNG	137
8	LITERATURVERZEICHNIS	139
9	ANHANG	157
9.1	Ergänzende Tabellen	157
9.2	Abkürzungsverzeichnis	173
9.3	Abbildungsverzeichnis	174
9.4	Tabellenverzeichnis	175
10	DANKSAGUNG	177
11	PUBLIKATIONSLISTE	179
12	LEBENS LAUF	181

1 EINLEITUNG

Mitochondrien sind semiautonome Organellen, die sich in den meisten Zellen nahezu aller eukaryotischen Organismen finden (Ernster und Schatz 1981). Sie sind beteiligt an einer ganzen Reihe essentieller zellulärer Vorgänge. Dazu gehören etwa die Synthese von Fettsäuren (Hiltunen et al. 2009), Aminosäuren (Alberts et al. 2014) und Eisen-Schwefel-Clustern (Lill 2009, Lill et al. 2012). Des Weiteren spielen Mitochondrien als Speicherorganellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der intrazellulären Calciumhomöostase (Duchen 2000). Zu den durch Mitochondrien regulierten Signalwegen (Chandel 2014) gehören neben der Apoptose (Giorgi et al. 2008), einer bestimmten Form des programmierten Zelltods, auch verschiedene Stressantworten, wie z. B. die mitochondriale ungefaltete Proteinantwort (engl. „mitochondrial unfolded protein response“ UPR^{mt}), die zu einer Veränderung der Genexpression im Zellkern führen (Pellegrino et al. 2013). Die wohl zentralste Funktion der Mitochondrien, aufgrund derer sie häufig sinnbildlich als „zelluläre Kraftwerke“ bezeichnet werden, ist ihre Beteiligung am zellulären Energiestoffwechsel.

1.1 Mitochondrien als „zelluläre Kraftwerke“

Der Großteil des für nahezu alle lebensnotwendigen Vorgänge benötigten universellen Energieüberträgers Adenosintriphosphat (ATP) wird in Eukaryoten in der Regel durch den Prozess der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS; Mitchell 1961), welcher an der inneren der beiden mitochondrialen Membranen abläuft, gewonnen (Erecińska und Wilson 1982, Hatefi 1985, Saraste 1999). Im Rahmen der OXPHOS werden energiereiche Elektronen über die Komplexe I–IV der mitochondrialen Elektronentransportkette (engl. „electron transport chain“, ETC; synonym auch als Atmungskette bezeichnet) auf molekularen Sauerstoff als finalen Elektronenakzeptor übertragen. Die dabei freiwerdende Energie wird von den Komplexen I, III und IV aufgewendet, um Protonen aus der mitochondrialen Matrix (MM), dem von der inneren mitochondrialen Membran (IMM) umschlossenen Reaktionsraum, in den mitochondrialen Intermembranraum (engl. „intermembrane space“, IMS) zwischen innerer und äußerer mitochondrialer Membran (engl. „outer mitochondrial membrane“, OMM) zu transportieren. Dadurch wird ein elektrochemischer Protonengradient über der IMM erzeugt (Hatefi 1985, Saraste 1999). Das membranständige Enzym ATP-Synthase, auch als Komplex V der ETC bezeichnet, durchspannt die IMM und erlaubt einen kontrollierten Fluss von Protonen in Richtung ihres elektrochemischen Gradienten zurück in die mitochondriale Matrix. Dieser Protonenfluss wird von der ATP-Synthase genutzt, um die energetisch ungünstige Synthese von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat durchzuführen (Hatefi 1985, Boyer 1997, Alberts et al. 2014).

Einleitung

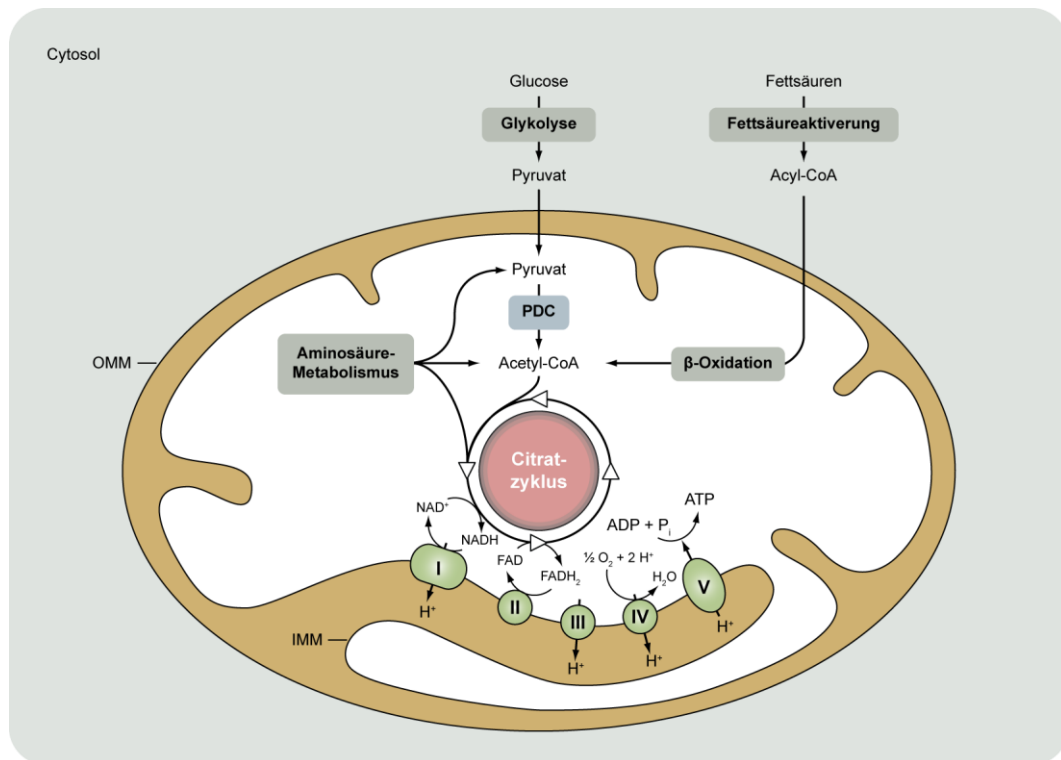


Abbildung 1 | **Mitochondrien als „zelluläre Kraftwerke“**. Schematische Übersicht der Hauptwege des mitochondrialen Energiestoffwechsels. Im Cytosol entsteht aus Glucose durch Glykolyse der C3-Körper Pyruvat. Freie Fettsäuren werden durch Fettsäure-CoA-Ligasen mit Coenzym A (CoA) zu Acyl-CoA verbunden und dadurch aktiviert. Mit Hilfe spezieller Transporter werden Pyruvat und Acyl-CoA über die äußere (OMM) und innere mitochondriale Membran (IMM) in die mitochondriale Matrix transportiert. Pyruvat wird dort durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex (engl. „pyruvate dehydrogenase complex“, PDC) oxidativ decarboxyliert und an CoA gebunden, wodurch Acetyl-CoA entsteht. Acyl-CoA wird durch die Reaktionen der β -Oxidation ebenfalls zu mehreren Molekülen Acetyl-CoA umgewandelt. Im Citratzyklus wird Acetyl-CoA weiter zu H_2O und CO_2 abgebaut, wobei die Trägermoleküle NAD^+ und FAD durch Übertragung energiereicher Elektronen zu $NADH$ bzw. $FADH_2$ reduziert werden. Über Komplex I oder II der Atmungskette werden diese Elektronen der oxidativen Phosphorylierung zugeführt und weiter über Komplex III und IV unter Bildung von Wasser auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die durch die Elektronenübertragung auf O_2 freiwerdende Energie wird von den Komplexen I, III und IV genutzt, um Protonen (H^+) in den mitochondrialen Intermembranraum zu transportieren, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient über der IMM entsteht. Die ATP-Synthase (auch als Komplex V der Atmungskette bezeichnet) nutzt schließlich die im Protonengradient gespeicherte Energie für die energetisch ungünstige Synthese von ATP aus ADP und Phosphat (P_i).

Voraussetzung für den Ablauf der OXPHOS in Mitochondrien ist somit das Vorhandensein energiereicher Elektronen als treibende Kraft. Diese stammen letztlich aus dem Abbau organischer Verbindungen, hauptsächlich von Glucose und anderen Kohlenhydraten sowie Fetten (Wallace 2005, Alberts et al. 2014). Kohlenhydrate werden zunächst im Cytosol durch die Reaktionen der Glykolyse in Pyruvat umgewandelt, während Fette von Lipasen in Glycerin und freie Fettsäuren gespalten werden. Sowohl Pyruvat als auch an Coenzym A (CoA) gebundene und damit aktivierte Fettsäuren können in die mitochondriale Matrix transportiert werden, wo ihre weitere Umwandlung in das Stoffwechselintermediat Acetyl-CoA erfolgt. Auch der Abbau bestimmter Aminosäuren kann, direkt oder über weitere Reaktionsschritte, zur Bildung von Acetyl-CoA führen (Alberts et al. 2014). Im Citratzyklus (Krebs 1970), einem komplexen Stoffwechselweg in der mitochondrialen Matrix, wird die Acetylgruppe von Acetyl-

CoA zu dem Abfallprodukt CO_2 oxidiert, wobei mehrere energiereiche Elektronen auf die oxidierten Formen der Trägermoleküle Nicotinamadenindinukleotid (NAD^+) und Flavinadenindinukleotid (FAD) übertragen werden. Diese werden dadurch zu NADH bzw. FADH_2 reduziert und können die energiereichen Elektronen schließlich über die Atmungskettenkomplexe I und II der oxidativen Phosphorylierung zuführen.

1.2 Die Bedeutung von Mitochondrien für Organismen

Betrachtet man die in den Mitochondrien ablaufenden essentiellen Vorgänge, so ist ihre Relevanz für die einzelne eukaryotische Zelle wie auch für den Gesamtorganismus unmittelbar einsichtig. Einige Wissenschaftler vertreten gar den Standpunkt, dass die endosymbiontische Entstehung von Mitochondrien (Gray 2012) und die dadurch ermöglichte effiziente Energieumwandlung eine notwendige Vorbedingung für die Entwicklung der Komplexität eukaryotischen Lebens war (Lane und Martin 2010).

Die 1970 von der US-amerikanischen Biologin Lynn Margulis in ihrem Buch *Origin of Eukaryotic Cells* wiederbelebte und in Folge dessen bis heute mit großem Interesse bedachte Endosymbiontentheorie besagt, dass sich Mitochondrien und Plastiden aus einst frei lebenden Bakterien entwickelt haben, die von einer prä-eukaryotischen Wirtszelle symbiotisch aufgenommen wurden (Margulis 1970, Gray 2012). Durch die Endosymbiontentheorie lassen sich viele Eigenschaften von Mitochondrien erklären. So besitzen diese Organellen etwa ein eigenes zirkuläres Genom, die mitochondriale DNA (Gray 2012). Außerdem findet sich in Mitochondrien eine der von Bakterien ähnliche Transkriptions- und Translationsmaschinerie (Gray und Doolittle 1982, Kutschera und Niklas 2005) und sie sind von zwei Membranen umschlossen, von denen die innere bezüglich ihrer Lipidzusammensetzung einer bakteriellen Membran entspricht (Kutschera und Niklas 2005). Phylogenetische Studien legen einen Vertreter der α -Proteobakterien (*Alphaproteobacteria*) als wahrscheinlichsten Urahn der Mitochondrien nahe. Jedoch sind nur schätzungsweise 10 – 20 % des mitochondrialen Proteoms mit Sicherheit dieses Ursprungs. Ein Großteil dieser von α -Proteobakterien abstammenden Proteine wird von Genen in der genomischen DNA des Zellkerns kodiert, welche vermutlich durch endosymbiotischen Gentransfer dorthin gelangt sind. Die Mehrheit mitochondrialer Proteine besitzt entweder prokaryotische Homologe, die sich nicht eindeutig einer bestimmten bakteriellen Abstammungslinie zuordnen lassen, oder scheint während der Evolution spezifisch in Eukaryoten entstanden zu sein (Gray 2015).

Ungeachtet der Entstehungsgeschichte von Mitochondrien und des Ausmaßes ihrer Rolle in der Evolution eukaryotischer Organismen lässt sich ihre Wichtigkeit konkret vor allem an den Folgen ihrer Schädigung und Fehlfunktion erkennen.

1.2.1 Mitochondrien und Altern

Der wohl grundlegendste degenerative Prozess biologischer Systeme, welcher in nahezu allen bekannten Organismen scheinbar unweigerlich stattfindet und bei Eukaryoten spezifisch mit Mitochondrien in Verbindung gebracht wird, ist das Altern (Finkel und Holbrook 2000, López-Otín et al. 2013, Riera und Dillin 2015). Möglichst umfassend lässt sich das Altern von Organismen als die Gesamtheit der sie betreffenden, nicht-pathologischen Vorgänge definieren, die in letzter Konsequenz zu ihrem Tode führen. Diese Vorgänge bewirken, ausgehend von einem angenommenen optimalen Funktions- und Ordnungszustand des

Einleitung

betroffenen Organismus, eine zeitabhängige und unter normalen Umständen irreversible Verschlechterung physiologischer Funktionen. Dies führt zu einer Zunahme der Krankheitsanfälligkeit und Mortalität sowie meist einer Abnahme der Fertilität des betroffenen Organismus (vergleiche Kirkwood und Austad 2000, López-Otín et al. 2013).

Der russische Biochemiker Zhores A. Medvedev zählte in seiner 1990 erschienen Publikation *An Attempt at a Rational Classification of Theories of Ageing* mehr als 300 verschiedene Alternstheorien (Medvedev 1990). Dieser Umstand ist, wenn sich auch die Anzahl ernsthaft diskutierter Theorien des Alterns in den letzten Jahrzehnten deutlich reduziert hat, sinnbildlich für die beeindruckende Komplexität und enorme Bedeutung des zugrundeliegenden Problems. Die heute vorherrschende Ansicht in der Wissenschaft ist, dass es sehr wahrscheinlich keine monokausale, allgemeingültige Ursache des Alterns gibt. Vielmehr ist biologisches Altern als multifaktorieller Prozess zu betrachten, der von der genetischen Beschaffenheit eines Organismus, in- und extrinsischen schädigenden Einflüssen sowie von molekularen, zellulären und systemischen Mechanismen und Signalwegen abhängt (Kirkwood 2011). Besonders das graduelle Versagen von Qualitätskontrollmechanismen gilt als vermutlich kritisches und konserviertes Ereignis des Alterns (Holliday 2006, Hayflick 2007, Kirkwood 2011, López-Otín et al. 2013). Qualitätskontrollmechanismen haben die Aufgabe Schäden zu verhindern bzw. entstandene Schäden zu reparieren und sind somit entscheidend, um den optimalen Funktions- und Ordnungszustand eines Organismus aufrechtzuerhalten. Sie benötigen, wie auch die zu einem optimalen Funktions- und Ordnungszustand überhaupt erst hinführenden Entwicklungsvorgänge, meist Energie in Form von ATP. Daraus folgt, dass der metabolische Zustand eines Organismus und seine zelluläre Energieversorgung entscheidende Faktoren für den Alterungsprozess sein sollten (Finkel und Holbrook 2000, López-Otín et al. 2013, Riera und Dillin 2015). Interessanterweise ist diese Einsicht keineswegs neu, sondern wurde in abstrakter Form von dem österreichischen Physiker Erwin Schrödinger bereits 1944 in seinem Buch *What is Life?* dargelegt (Schrödinger 1944). Dieser verwendete zwar den Begriff der „negativen Entropie“ anstelle von „Energie“, griff davon abgesehen aber viele grundlegende Vorstellungen und Konzepte der Alternsforschung vorweg.

„What then is that precious something contained in our food which keeps us from death? That is easily answered. Every process, event, happening – call it what you will; in a word, everything that is going on in nature means an increase of the entropy of the part of the world where it is going on. Thus a living organism continually increases its entropy – or, as you may say, produces positive entropy – and thus tends to approach the dangerous state of maximum entropy, which is of death. It can only keep aloof from it, i.e. alive, by continually drawing from its environment negative entropy – which is something very positive as we shall immediately see. What an organism feeds upon is negative entropy. Or, to put it less paradoxically, the essential thing in metabolism is that the organism succeeds in freeing itself from all the entropy it cannot help producing while alive.“

Erwin Schrödinger – *What is Life?*

Tatsächlich untermauern zahlreiche Studien, dass der Stoffwechsel im Allgemeinen und Mitochondrien als bioenergetische Organellen im Speziellen eine wichtige Rolle für die Regulation des Alterungsprozesses in verschiedensten eukaryotischen Modellorganismen, von simplen Einzellern wie der Hefe (Lin et al. 2000, Lin et al. 2004, Hughes und Gottschling 2012, Ocampo et al. 2012) bis hin zu Säugern (Weindruch et al. 1986, Trifunovic et al. 2004, Schriener et al. 2005, Colman et al. 2009, Colman et al. 2014), spielen.

Ein besonderes Augenmerk bei der Untersuchung des Einflusses von Mitochondrien auf den Alterungsprozess lag dabei lange Zeit auf der Tatsache, dass sie einerseits essentielle Organellen des Energiestoffwechsels, aber andererseits gleichzeitig auch die Hauptquelle für oxidativen Stress in der Zelle sind (Bratic und Trifunovic 2010). Verantwortlich für letzteres ist die verfrühte und unvollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid-Anionen insbesondere an den Atmungskettenkomplexen I und III, die auch bei normaler Funktion der Atmungskette scheinbar permanent und unweigerlich durch ein „Entweichen“ eines Teils der Elektronen stattfindet (Lenaz 2001, Turrens 2003, Murphy 2009). In starkem Übermaße vorhanden können Superoxid-Anionen und von ihnen abgeleitete reaktive Sauerstoffspezies (engl. „reactive oxygen species“, ROS) Proteine, Nukleinsäuren und Lipide direkt schädigen (Halliwell 2001, Turrens 2003, Brand et al. 2004). Bezeichnenderweise machen ROS mitochondrialen Ursprungs schätzungsweise 90 % der gesamten in der Zelle produzierten reaktiven Sauerstoffspezies aus (Bratic und Trifunovic 2010).

Die sich daraus ergebenden Implikationen führten bereits Anfang der 1970er Jahre zur Formulierung der „Mitochondrialen freien Radikaltheorie des Alterns“ (engl. „mitochondrial free radical theory of ageing“, MFRTA) durch den US-amerikanischen Biogerontologen Denham Harman (Harman 1972). Die Kernaussage dieser Theorie ist, dass durch mitochondriale ROS verursachte molekulare Schäden biologischer Makromoleküle eine konservierte Ursache mitochondrialer Fehlfunktion und damit auch des Alterungsprozesses eukaryotischer Organismen sind. Zweifelsohne bestätigt eine Vielzahl experimenteller Befunde eine Korrelation zwischen ROS, oxidativen Molekülschäden, der Fehlfunktion von Mitochondrien und dem Altern von Organismen (Finkel und Holbrook 2000, Navarro und Boveris 2007), jedoch ist nicht immer ein klarer kausaler Zusammenhang im Sinne der MFRTA zu finden (Lapointe und Hekimi 2010, Stuart et al. 2014, Riera und Dillin 2015). So konnte etwa beobachtet werden, dass vermehrte ROS-induzierte oxidative Schäden in Mäusen zwar die Entstehung bestimmter Krankheiten befördern, aber nicht zwangsläufig in einer verkürzten Lebensspanne resultieren (Van Remmen et al. 2003, Zhang et al. 2009). Im Gegensatz dazu führt eine Mutation der katalytischen Untereinheit POLG der mitochondrialen DNA-Polymerase in Mäusen zu vermehrten Schäden der mitochondrialen DNA (mtDNA), einer eingeschränkten Funktion der Mitochondrien und beschleunigter Alterung, jedoch scheinbar

Einleitung

ohne dass ROS daran wesentlich beteiligt sind (Trifunovic et al. 2004, Vermulst et al. 2008, Edgar et al. 2009). In *C. elegans* konnte gar gezeigt werden, dass ein Anstieg von ROS sowohl infolge einer Inhibierung (Lee et al. 2010b) wie auch Aktivierung der mitochondrialen Atmung (Schulz et al. 2007) notwendig für die Vermittlung eines lebensverlängernden Effekts ist.

Zum Teil mögen diese Phänomene darin begründet sein, dass mitochondriale ROS nicht nur ungewollte toxische Nebenprodukte des Stoffwechsels sind, sondern auch eine wichtige Rolle als zelluläre Signalmoleküle spielen können. (D'Autréaux und Toledano 2007, Schieber und Chandel 2014, Yee et al. 2014). Nichtsdestotrotz manifestiert sich die generell zu beobachtende altersabhängige Abnahme der mitochondrialen Integrität und Funktion in der Regel, ähnlich wie bei pathologischen Störungen der Mitochondrien, in einer verminderten ATP-Synthese und einer gesteigerten ROS-Produktion. Inwiefern diese Phänomene jedoch natürlicherweise Ursache oder Folge des Alterungsprozesses sind, ist noch unklar (López-Otín et al. 2013, Riera und Dillin 2015). Interessanterweise gibt es offensichtlich auch weitreichende Beziehungen zwischen Altern, mitochondrialer Fehlfunktion und Krankheiten. Dies bedeutet konkret, dass das Auftreten von Krankheiten mit mitochondrialer Ätiologie, z. B. verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen (Lin und Beal 2006) und vieler Krebsarten (Finkel et al. 2007), mit zunehmendem Alter immer wahrscheinlicher wird (Wallace 2005, Niccoli und Partridge 2012).

1.2.2 Mitochondrien und ihre Rolle für Krankheiten

Begründet wurde das Forschungsgebiet der mitochondrialen Medizin, d. h. die Untersuchung der Rolle von Mitochondrien für die Entstehung, Progression und Behandlung von Krankheiten, im Jahre 1959 durch den schwedischen Endokrinologen Rolf Luft. Dieser beschrieb gemeinsam mit Kollegen den Fall einer jungen Frau welche, bei normaler Schilddrüsenfunktion, einen massiv gestörten Stoffwechsel aufwies. Zu den beobachtbaren Symptomen zählten u. a. übermäßiges Schwitzen und ein fortschreitender Gewichtsverlust trotz hoher Kalorienzufuhr. Eine Muskelbiopsie mit anschließender Analyse mitochondrialer Enzyme führte zu dem Schluss, dass der einzige festzustellende Unterschied, im Vergleich zu Mitochondrien eines gesunden Patienten, eine Entkopplung der Atmung von der ATP-Synthese war (Ernster et al. 1959, Luft et al. 1962).

Aus heutiger Sicht lassen sich die beschriebenen Symptome am wahrscheinlichsten durch einen Zusammenbruch des elektrochemischen Protonengradienten über der IMM erklären. Ein solcher Zustand könnte etwa durch eine krankhaft gesteigerte Aktivität mitochondrialer Entkopplerproteine verursacht werden. Diese sind in der Lage, die innere mitochondriale Membran für Protonen durchlässig zu machen (Rousset et al. 2004). Dadurch ist der Elektronentransport entlang der Atmungskettenkomplexe I–IV nicht mehr auf die, normalerweise den elektrochemischen Protonengradienten abbauende, Funktion der ATP-Synthase angewiesen (Sjöstrand 1999, Fosslien 2001). Dies hat zur Folge, dass der Elektronentransport von der ATP-Synthese entkoppelt wird, dadurch beschleunigt ablaufen und somit zur übermäßigen Wärmebildung im Organismus beitragen kann (Rousset et al. 2004).

In den mehr als 50 Jahren seit dieser Entdeckung, die man ohne Zweifel als Lehrstück für translationale Forschung an der Schnittstelle zwischen Klinik und Laborbank betrachten kann, ist das verfügbare Wissen über den Zustand von Mitochondrien bei verschiedensten Krankheiten rasant angewachsen. Insbesondere seit Ende der 1980er Jahre ist, ermöglicht durch moderne Methoden der Molekularbiologie sowie Techniken zur Nukleinsäure-Sequenzierung und Hochdurchsatz-Proteinanalyse, die Struktur, Funktionsweise und Dynamik von gesunden und geschädigten Mitochondrien, wie auch die Komposition ihres Genoms und Proteoms, intensiv untersucht worden. Es gilt daher heute als experimentell gesichert, dass eine Fehlfunktion von Mitochondrien bedeutend und zum Teil wohlmöglich sogar ursächlich für eine ganze Reihe degenerativer Prozesse ist (Abbildung 2; Calvo und Mootha 2010, DiMauro 2011).

Insgesamt sind bereits über 150 distinkte mitochondriale Syndrome beschrieben, deren Ursprung meist in der Mutation von Kerngenen, kodierend für mitochondriale Proteine, vermutet wird (Vafai und Mootha 2012). Auffallend häufig ist hierbei, ähnlich wie im oben beschriebenen Fall, eine krankhaft veränderte Funktion der Atmungskette festzustellen (DiMauro und Schon 2003, Vafai und Mootha 2012). Dies kann als direkte Folge zu einer verminderten ATP-Synthese und damit zu einer negativen Beeinträchtigung der zellulären Energieversorgung führen. Des Weiteren wird angenommen, dass eine Störung der ETC mit gesteigertem oxidativen Stress in den Mitochondrien einhergeht (Turrens 2003, Brand et al. 2004).

Eine viel beachtete Gruppe von Störungen, deren typische Vertreter sich trotz ihrer Verschiedenartigkeit häufig durch mitochondriale Dysfunktion auszeichnen, wird gebildet durch neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer- und Parkinson-Krankheit oder die Amyotrophe Lateralsklerose (Lin und Beal 2006). Die diesen Erkrankungen zugrundeliegenden Mechanismen werden bereits seit längerem intensiv untersucht. Besonders bei der Alzheimer-Krankheit sprechen viele Befunde dafür, dass eine gesteigerte mitochondriale ROS-Produktion eines der Schlüsselereignisse für den Ausbruch dieser weltweit verbreiteten Demenzerkrankung ist (Moreira et al. 2010, Wang et al. 2014).

Ebenso spielen fehlerhafte Mitochondrien eine wichtige Rolle für die Entstehung verschiedener metabolischer und muskulärer Erkrankungen (McInnes 2013), darunter von Diabetes mellitus Typ 2 und dem MELAS-Syndrom (engl. „mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes“, MELAS). Bei Diabetes mellitus Typ 2 wird angenommen, dass Störungen im mitochondrialen Stoffwechsel, u. a. in der β -Oxidation von Fettsäuren und in der Funktion der Atmungskette, an der Entwicklung der zellulären Insulinresistenz beteiligt sind (Petersen et al. 2003, Lowell und Shulman 2005). Das MELAS-Syndrom manifestiert sich hauptsächlich in Form von Muskelschwäche und durch das

Einleitung

Auftreten Schlaganfall-ähnlicher Episoden. Betroffene Patienten, die genetisch untersucht wurden, wiesen nahezu ausnahmslos Punktmutationen in ihrer mtDNA auf, meist in dem tRNA-kodierenden Gen *Mtt1* oder in Genen, die für Untereinheiten von Komplex I kodieren (Kirby et al. 2004, McInnes 2013).

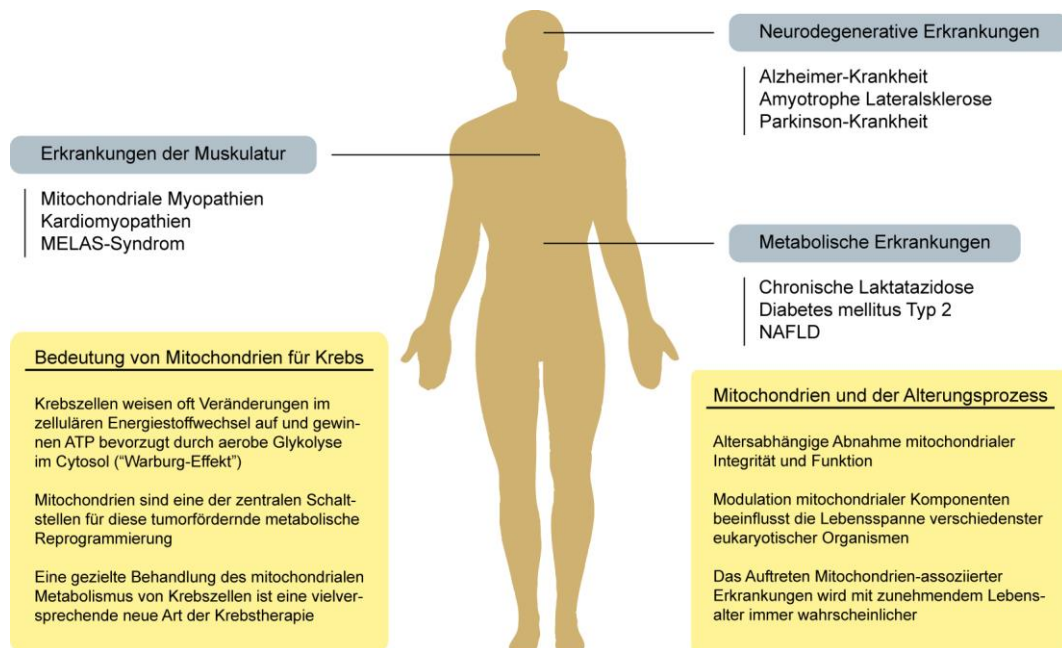


Abbildung 2 | **Mitochondrien-assoziierte Erkrankungen und degenerative Prozesse.** Zahlreiche Studien belegen, dass eine genetisch bedingte oder durch Schädigungen hervorgerufene Fehlfunktion von Mitochondrien die Entstehung verschiedenster Krankheiten begleitet, begünstigt oder diese gar hauptsächlich verursacht. Dazu gehören neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer- und die Parkinson-Krankheit (Lin und Beal 2006) und Erkrankungen der Muskulatur, etwa das MELAS-Syndrom (engl. „mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes“, MELAS; McInnes 2013) oder bestimmte Kardiomyopathien (Vafai und Mootha 2012), die im schlimmsten Falle zum Tod durch Herzversagen führen können. Bei der sicherlich am weitesten verbreiteten metabolischen Erkrankung, die mit einer gestörten mitochondrialen Funktion in Verbindung gebracht wird, handelt es sich um Diabetes mellitus Typ 2 (Lowell und Shulman 2005). Auch bei Patienten mit nichtalkoholischer Fettlebererkrankung (engl. „non-alcoholic fatty liver disease“, NAFLD) lassen sich krankhafte und fortschreitende Veränderungen in der Funktion der Mitochondrien, besonders bei der oxidativen Phosphorylierung, beobachten (Wei et al. 2008, Koliaki et al. 2015). Darüber hinaus spielen Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der tumorfördernden metabolischen Reprogrammierung von Krebszellen (Gaude und Frezza 2014) und werden grundsätzlich mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht.

Seit einigen Jahren geraten Mitochondrien auch wieder verstärkt in den Fokus der Krebsforschung (Goard und Schimmer 2014, Gaude und Frezza 2014, Bhat et al. 2015, Weinberg und Chandel 2015). Trotz der Tatsache, dass es sich bei Krebs um eine überaus heterogene Gruppe von Krankheiten handelt, gibt es einige Kennzeichen, die sich bei fast allen der mehr als 200 bekannten Krebsarten finden (Hanahan und Weinberg 2011). Eines davon ist die stark gesteigerte Aufnahme von Glucose durch Krebszellen. Diese ist gekoppelt mit einer, im relativen Vergleich zu normalen Zellen, verstärkten ATP-Synthese durch Glykolyse im Cytoplasma gegenüber der eigentlich effizienteren mitochondrialen ATP-Synthese. Interessanterweise ist diese metabolische Veränderung von Krebszellen selbst bei ausreichender Verfügbarkeit von Sauerstoff für die mitochondriale Atmung zu beobachten

(Vander Heiden et al. 2009, Cairns et al. 2011). Zu Ehren seines Entdeckers, des deutschen Biochemikers und Nobelpreisträgers Otto Warburg, wird dieser bereits in den 1920er Jahren beschriebene Zustand anhaltender aerober Glykolyse in Tumoren auch als „Warburg-Effekt“ bezeichnet (Warburg et al. 1927, Koppenol et al. 2011). Die Mehrheit neuerer Arbeiten spricht dafür, dass dieser Effekt nicht, entgegen anfänglich formulierter Hypothesen, eine irreversible Schädigung mitochondrialer Funktionen widerspiegelt. Vielmehr scheint es sich dabei um eine gezielte Reprogrammierung des Energiestoffwechsels von Krebszellen zu handeln (Cairns et al. 2011, Hanahan und Weinberg 2011, Hanahan und Weinberg 2011). Die Bedeutung dieses Phänomens bei der Entstehung von Tumoren ist noch nicht im Detail verstanden. Nichtsdestotrotz kristallisiert sich eine gezielte Behandlung des mitochondrialen Metabolismus von Krebszellen momentan als vielversprechende neue Methode zur Krebstherapie heraus (Gaude und Frezza 2014, Bhat et al. 2015, Weinberg und Chandel 2015).

Wie in diesem und dem vorigen Abschnitt beschrieben, spielt die Fehlfunktion von Mitochondrien ohne Zweifel, vermutlich als direkte Folge ihrer essentiellen Bedeutung für verschiedene Lebensvorgänge und vor allem aufgrund ihres Wirkens als „zelluläre Kraftwerke“, bei vielen degenerativen Prozessen in Eukaryoten eine Schlüsselrolle. Konsequenterweise existieren zahlreiche Qualitätskontrollmechanismen, deren Hauptaufgabe die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität und Funktion ist (Fischer et al. 2012, Quirós et al. 2015, Scheibye-Knudsen et al. 2015).

1.3 Mitochondriale Qualitätskontrolle

Aufgrund der großen Vielfalt der verschiedenen Mechanismen mitochondrialer Qualitätskontrolle ist es sinnvoll, diese in distinkte Kategorien einzuteilen (Fischer et al. 2012). Eine Möglichkeit der Einteilung ist zu unterscheiden in:

1. Mechanismen, welche die Entstehung von Schäden verhindern. Die übermäßige und damit gefährliche Entstehung von ROS beruht meist auf einer fehlerhaften Funktion der Atmungskette. Die korrekte Assemblierung der Atmungskette und die Aufrechterhaltung ihrer strukturellen und funktionellen Integrität sind somit entscheidend, um die Produktion von ROS zu kontrollieren und der Entstehung von ROS-induzierten Schäden vorzubeugen. Dies wird vor allem durch Mechanismen der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle gewährleistet, welche außerdem grundsätzlich wichtig für die Kontrolle der Proteinhomöostase in Mitochondrien sind (Quirós et al. 2015). ROS können außerdem durch bestimmte ROS-entgiftende Enzyme, wie die mitochondriale Superoxid-Dismutase (Fridovich 1995, Van Remmen et al. 2003, Holley et al. 2011) und verschiedene Peroxidasen (Mari et al. 2009, Cox et al. 2010), abgebaut werden. Diese Enzyme wirken somit einem unkontrollierten Anstieg der Konzentration

Einleitung

von reaktiven Sauerstoffspezies entgegen und können dadurch Proteine, Nukleinsäuren und Lipide vor oxidativen Schäden schützen.

2. Mechanismen, welche entstandene Schäden reparieren. In den Mitochondrien existieren u. a. verschiedene DNA-Reparaturwege, durch die Schäden und Mutationen in der mitochondrialen DNA erkannt und behoben werden können (Kazak et al. 2012). Des Weiteren gibt es eine ganze Reihe mitochondrialer Chaperone, die fehlgefalteten Proteinen dabei helfen, sich zurück in ihre native Struktur zu falten (Ryan et al. 1997, Voos 2013). Auf Ebene des gesamten Organells trägt auch die Dynamik von Mitochondrien zu ihrer Qualitätskontrolle bei. So kann die Funktionalität geschädigter Teile des mitochondrialen Netzwerks durch Verschmelzung mit gesunden Abschnitten wiederhergestellt werden (Twig et al. 2008, Mishra und Chan 2014).
3. Mechanismen, welche irreparabel geschädigte Komponenten entfernen. Terminal fehlgefaltete oder anderweitig definitiv geschädigte mitochondriale Proteine werden i. d. R. durch Proteasen degradiert (Quirós et al. 2015). Ebenso können geschädigte Teile des mitochondrialen Netzwerks durch generelle Autophagie oder Mitophagie, eine bestimmte Form der selektiven Autophagie, abgebaut werden (Mishra und Chan 2014).

Die oben aufgeführten Mechanismen laufen entweder auf molekularer Ebene ab und betreffen hauptsächlich biologische Makromoleküle, z. B. die mtDNA, Matrix-lokalisierte Enzyme oder die Komplexe der Atmungskette, oder aber ganze mitochondriale Teilabschnitte als funktionelle Einheiten (Abbildung 3). In multizellulären eukaryotischen Organismen kann darüber hinaus der intrinsische Signalweg der Apoptose als höchste Stufe der mitochondrialen Qualitätskontrolle angesehen werden (Giorgi et al. 2008, Fischer et al. 2012). Ausgelöst wird dieser Signalweg durch die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem IMS stark geschädigter Mitochondrien. Da dies letztlich zum Tod der betroffenen Zelle führt, werden dadurch ihre vollständige Entartung, wie auch eine weitere Schädigung umliegender Zellen, verhindert.

Eine wichtige zukünftige Aufgabe wird die genaue Untersuchung der Regulation und des Zusammenspiels verschiedener mitochondrialer Qualitätskontrollmechanismen sein. Dies sollte dabei helfen zu entschlüsseln wie, in Abhängigkeit von Art und Ausmaß der vorhandenen Schäden, zelluläre „Entscheidungen“ getroffen werden. Es ist derzeit größtenteils noch unklar, wie und wann Mitochondrien oder ganze Zellen als unwiederbringlich geschädigt bzw. entartet erkannt und in Folge dessen entfernt werden. Um Mitochondrien-assoziierte Krankheiten und degenerative Prozesse besser zu verstehen und behandeln zu können, ist es vor allem wichtig zu klären, warum und unter welchen Umständen Mechanismen der Qualitätskontrolle in ihrer Kapazität überwältigt werden und versagen und wie dies verhindert werden könnte.

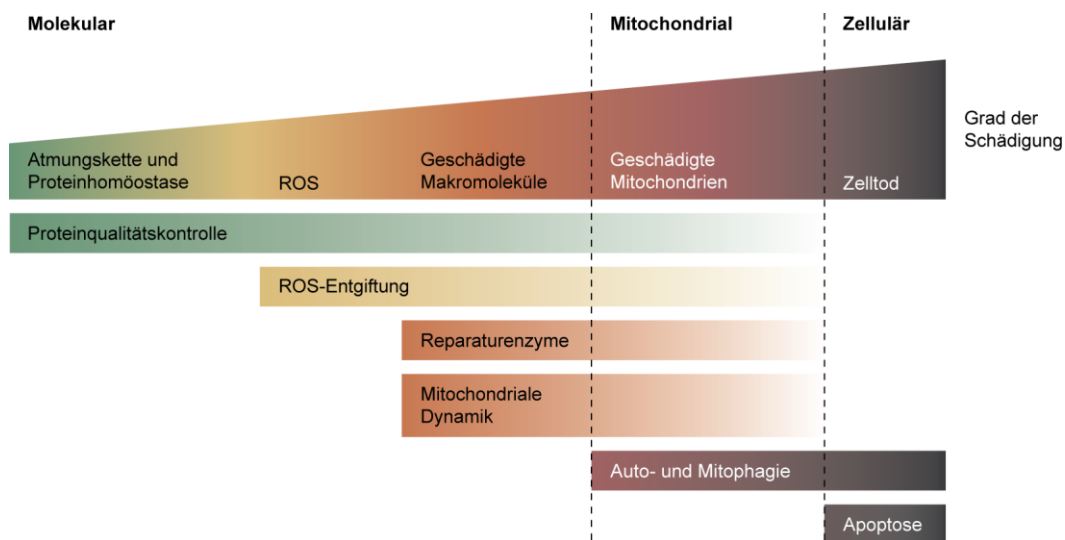


Abbildung 3 | **Die verschiedenen Ebenen der mitochondrialen Qualitätskontrolle.** Die mitochondriale Proteinqualitätskontrolle beruht hauptsächlich auf verschiedenen Chaperonen und Proteasen. Diese sind verantwortlich für die Kontrolle des Imports und/oder der korrekten Prozessierung und Faltung von Proteinen und gegebenenfalls ihrer anschließenden Assemblierung zu funktionellen Einheiten, z. B. in den Komplexen der Atmungskette. Proteasen führen darüber hinaus auch den gezielten Abbau ausgewählter Proteine durch. Dadurch können verschiedenste mitochondriale Abläufe, wie etwa bestimmte Signal- und Stoffwechselwege, reguliert werden. All diese Vorgänge sind notwendig, um auf molekularer Ebene die mitochondriale Proteinhomöostase und die strukturelle und funktionelle Integrität der Mitochondrien, insbesondere der mitochondrialen Atmungskette, aufrechtzuerhalten. Kommt es trotz dieser grundlegenden Qualitätskontrollmechanismen zu einem übermäßigen und gefährlichen Anstieg der ROS-Konzentration, können verschiedene ROS-entgiftende Enzyme diesem aktiv entgegenwirken. ROS-induzierte Schäden an biologischen Makromolekülen, etwa an der mtDNA, können z. T. gezielt durch Reparaturenzyme behoben werden. Bei irreparablen Schäden oder dem Fehlen eines gezielten Reparaturmechanismus erfolgt, sofern möglich, der Abbau der betroffenen Makromoleküle. Zusätzlich ermöglicht die Dynamik von Mitochondrien eine Vermischung gesunder und schadhafter Teile des mitochondrialen Netzwerks, wodurch eine „Verdünnung“ von molekularen Schäden ermöglicht wird. Stark geschädigte mitochondriale Teilabschnitte können zudem abgeschnürt und durch Auto- oder Mitophagie vollständig abgebaut werden. Wenn auch dieser Weg der Qualitätskontrolle überlastet ist und geschädigte Mitochondrien nicht rechtzeitig abgebaut werden, kommt es zu einer Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Dadurch wird der intrinsische Signalweg der Apoptose als die Ultima Ratio der mitochondrialen und zellulären Qualitätskontrolle ausgelöst, wodurch verhindert werden kann, dass sich die Schäden auf benachbarte Zellen ausbreiten. Verändert nach Andreux et al. 2013.

Voraussetzung für das Verständnis dieser komplexen Zusammenhänge und die Beantwortung übergeordneter Fragen ist eine detaillierte Kenntnis der einzelnen Teilmechanismen. Einer der grundlegendsten Mechanismen ist die mitochondriale Proteinqualitätskontrolle (Tatsuta und Langer 2008, Fischer et al. 2012). Hierzu gehören nicht nur die Reparatur und Degradation von Proteinen, sondern im weiteren Sinne auch ihr Import sowie ihre Prozessierung, funktionale Assemblierung und proteolytische Regulation. Neben der mitochondrialen Proteintranslokationsmaschinerie und verschiedenen Chaperonen sind in erster Linie strukturell und funktionell diverse mitochondriale Proteasen, im Folgenden synonym auch als „Mitoproteasen“ bezeichnet, an all diesen Vorgängen beteiligt (Baker und Haynes 2011, Fischer et al. 2012, Quirós et al. 2015).

1.4 Mitochondriale Proteasen

Bisher existieren recht wenige systematische und übersichtliche Katalogisierungen von mitochondrialen Proteasen in unterschiedlichen eukaryotischen Organismen. Eine erst kürzlich erschienene Arbeit zählte, unter Zuhilfenahme von Informationen aus mehreren Datenbanken (Degradome: <http://degradome.uniovi.es>; MEROPS: <http://merops.sanger.ac.uk>; MitoCarta: <http://broadinstitute.org/pubs/MitoCarta>), in humanen Mitochondrien mindestens 20 intrinsische Proteasen, also solche, die ausschließlich oder hauptsächlich in einem der mitochondrialen Kompartimente bzw. in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind (Quirós et al. 2015). Nimmt man des Weiteren noch die sogenannten Pseudo-Mitoproteasen, die strukturelle Ähnlichkeiten zu Proteasen aufweisen aber scheinbar katalytisch inaktiv sind, und Proteasen, die nur transient zu Mitochondrien lokalisieren, hinzu, so erhöht sich die Anzahl humaner mitochondrialer Proteasen auf 45 (Quirós et al. 2015). Aufgrund des gemeinsamen evolutionären Ursprungs von Mitochondrien in verschiedenen Organismen (Gray 2012) liegt es nahe, dass sich eine ähnliche Anzahl von Mitoproteasen auch in anderen Eukaryoten findet. In der Tat ist vor allem die Mehrheit der intrinsischen Mitoproteasen hochkonserviert (Koppen und Langer 2007). Es wäre auch wenig verwunderlich, wenn in Zukunft noch weitere mitochondriale Proteasen entdeckt werden würden.

Eine erschöpfende Darstellung bekannter Mitoproteasen ist angesichts ihrer Diversität und der, zumindest in einigen Fällen, Fülle bereits vorhandener Informationen offensichtlich im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Daher wird hier nur eine ausgewählte Übersicht gegeben, mit besonderem Fokus auf Proteasen, die an der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind (Abbildung 4). Ähnlich wie auch bei den mitochondrialen Qualitätskontrollmechanismen ist eine Einteilung mitochondrialer Proteasen in distinkte Kategorien sinnvoll. Es bietet sich an nach ihrer Lokalisation zu unterscheiden in:

1. Proteasen der äußeren mitochondrialen Membran. Diese lokalisieren meist nur transient zur OMM und beeinflussen primär die mitochondriale Dynamik, Mitophagie und Apoptose-Induktion. Häufig handelt es sich bei diesen Proteasen um Deubiquitinasen (Schwickart et al. 2010, Cornelissen et al. 2014, Durcan et al. 2014), welche zusammen mit E3-Ubiquitin-Ligasen die Ubiquitinierung von Proteinen der äußeren Membran regulieren (Karbowski und Youle 2011). Der eigentliche Abbau von ubiquitinierten Proteinen der OMM erfolgt durch das cytosolische Proteasom, welches somit streng genommen auch Teil der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle ist (Karbowski und Youle 2011, Taylor und Rutter 2011). Durch das Proteasom können außerdem kernkodierte mitochondriale Proteine bereits vor ihrem Import abgebaut werden (Wright et al. 2001, Baker et al. 2011).

2. Proteasen des mitochondrialen Intermembranraums. Im IMS finden sich einige Serin- und Metalloproteasen, die u. a. an der Degradation ROS-geschädigter Proteine und der Prozessierung von Vorläuferproteinen beteiligt sind (Quirós et al. 2015). Ein Beispiel für eine konservierte IMS-Protease ist ATP23 (Osman et al. 2007), welche spezifisch mit der Qualitätskontrolle der ATP-Synthase in Verbindung gebracht wird.
3. Proteasen der inneren mitochondrialen Membran. Bei diesen handelt es sich ebenfalls um verschiedene Serin- und Metalloproteasen (Quirós et al. 2015). Zwei wichtige, konservierte IMM-Proteasen sind die ATP-abhängige iAAA- und mAAA-Protease (engl. „ATPase associated with diverse cellular activities“, AAA), deren aktive Zentren entweder zum IMS (iAAA-Protease) oder zur Matrix (mAAA-Protease) hin ausgerichtet sind (Leonhard et al. 1996). Beide sind hauptsächlich an der Qualitätskontrolle und Assemblierung von membranständigen und membrangebundenen Untereinheiten der ETC-Komplexe beteiligt (Arlt et al. 1998, Atorino et al. 2003, Stiburek et al. 2012).
4. Proteasen der mitochondrialen Matrix. Diese Proteasen vermitteln, zusammen mit mitochondrialen Chaperonen, eine Reihe von essentiellen Funktionen, wie den Import sowie die Prozessierung kernkodierter mitochondrialer Proteine (Quirós et al. 2015). Eine zentrale Rolle dabei spielt die aus zwei Untereinheiten bestehende mitochondriale Prozessierungspeptidase MPP (Gakh et al. 2002, Teixeira und Glaser 2013). Die vermutlich wichtigsten Proteasen für die Qualitätskontrolle und proteolytische Regulation von Proteinen der mitochondrialen Matrix sind die löslichen Serinproteasen LON und CLXP (Baker et al. 2011, Fischer et al. 2012, Quirós et al. 2015).

Mitochondriale Proteasen wurden, wie zelluläre Proteasen allgemein, lange Zeit als reine Degradations- und Prozessierungs-Maschinen betrachtet. Diese vereinfachende Sichtweise scheint jedoch zunehmend unzulänglich. Offensichtlich sind Mitoproteasen, wie in der obigen Zusammenfassung bereits angedeutet, in so unterschiedliche Prozesse wie die mitochondriale Biogenese, die Funktion der Atmungskette und die Dynamik von Mitochondrien involviert (Quirós et al. 2015). Dies ist zwar sicherlich zumindest teilweise auf den generellen Abbau oxidativ oder anderweitig geschädigter Proteine im Rahmen der „klassischen“ Qualitätskontrolle zurückzuführen, darüber hinaus häufen sich aber auch experimentelle Hinweise für eine proteolytische Kontrolle mitochondrialer Komponenten als essentieller Regulationsmechanismus für die Funktion von Mitochondrien. Interessanterweise scheinen einige Mitoproteasen beide Aufgaben, d. h. sowohl die allgemeine „Wartung“ wie auch eine gezielte proteolytische Kontrolle von Proteinen, gleichzeitig zu übernehmen. So wurden mehrere Substrate der LON-Protease (Venkatesh et al. 2012) in Säugern identifiziert, die sowohl in geschädigter Form als auch unter Normalbedingungen von ihr abgebaut werden.

Einleitung

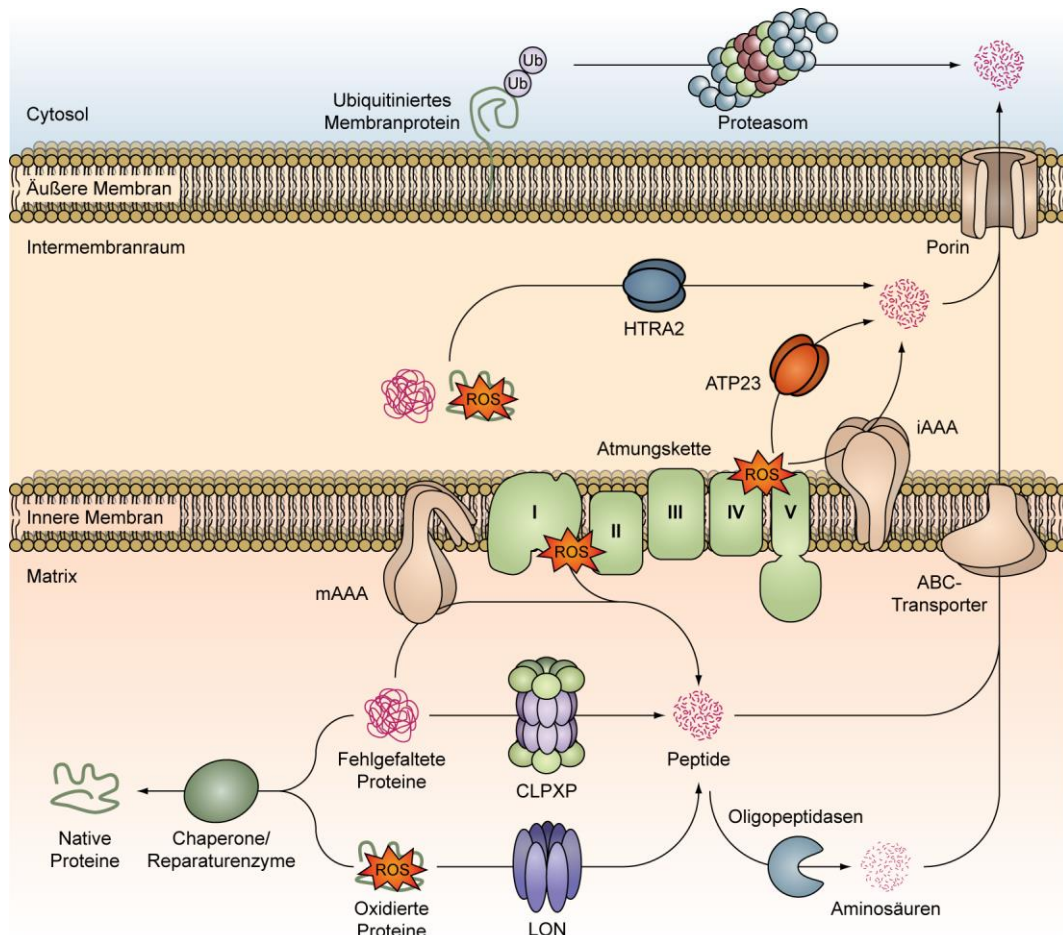


Abbildung 4 | **Proteasen und Proteinqualitätskontrolle in Mitochondrien.** Schematische Übersicht ausgewählter Mitoproteasen und einiger weiterer Komponenten, die an der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle in Säugern beteiligt sind. Fehlgefaltete Proteine in der mitochondrialen Matrix werden durch Chaperone bei ihrer korrekten Faltung unterstützt. In einigen Fällen können oxidative Proteinschäden auch gezielt behoben werden, z. B. können oxidierte Methionine durch die Reparaturenzyme MSRA oder MSRB wieder reduziert werden. Die vermutlich wichtigsten Proteasen für die Qualitätskontrolle von Matrixproteinen sind die beiden Serinproteasen CLPXP und LON. Während das Substratspektrum der CLPXP-Protease noch unbekannt ist, konnte für die LON-Protease gezeigt werden, dass diese neben löslichen oxidierten Proteinen auch Untereinheiten von Komplexen der Atmungskette abbaut und zusätzlich eine ganze Reihe weiterer Proteine proteolytisch reguliert. Auch die in der inneren Membran lokalisierte mAAA-Protease kann sowohl Matrixproteine wie auch Proteine der Atmungskette degradieren. Die bei der Proteolyse entstehenden Peptide können entweder über die innere und äußere Membran in das Cytosol transportiert oder durch Oligopeptidasen weiter zu Aminosäuren abgebaut werden. Fehlgefaltete, geschädigte oder oxidierte Proteine im Intermembranraum werden durch die Protease HTRA2 abgebaut, während die membranständige iAAA-Protease vermutlich zusammen mit der Protease ATP23 ebenfalls für die Wartung und Qualitätskontrolle der Atmungskette verantwortlich ist. Einige Proteine in der äußeren Membran von Mitochondrien können, ähnlich wie cytosolische Proteine oder solche des endoplasmatischen Retikulums, ubiquitiniert und, wahrscheinlich unter Beteiligung des Chaperons CDC48, durch das Proteasom abgebaut werden. Verändert nach Fischer et al. 2012 und Quirós et al. 2015.

Dazu gehören z. B. die Aconitase des Citratzyklus (Bota und Davies 2002), Untereinheiten der ETC-Komplexe II (Bezawork-Geleta et al. 2014) und IV (Fukuda et al. 2007) und der mitochondriale Transkriptionsfaktor TFAM (Matsushima et al. 2010). Konsequenterweise beeinflusst eine Modulation des LON-kodierenden Gens den mitochondrialen Metabolismus von Tumorzellen (Bernstein et al. 2012, Cheng et al. 2013, Quirós et al. 2014) bzw. die mtDNA-Propagation in *Drosophila melanogaster*-Zellen (Matsushima et al. 2010). Dank dieser und

ähnlicher Befunde in unterschiedlichen eukaryotischen Modellorganismen ist die LON-Protease eine der insgesamt am besten untersuchten mitochondrialen Proteasen. Im Gegensatz dazu ist über die Funktion der mitochondrialen CLPXP-Protease, die wie die LON-Protease in der Matrix lokalisiert ist (Gottesman 2003, Yu und Houry 2007), noch recht wenig bekannt.

1.5 CLP-Proteasen

Die mitochondriale CLPXP-Protease gehört zu den CLP-Proteasen (engl. „caseinolytic protease“, CLP) und besteht, wie prinzipiell alle anderen CLP-Proteasen auch, aus zwei verschiedenen Komponenten (Yu und Houry 2007). Eine dieser Komponenten ist die eigentliche Serinprotease, CLPP (engl. „caseinolytic protease P“, CLPP), und die andere das AAA+-Chaperon CLPX.

In dieser Arbeit wird bei der Benennung von CLP-Proteasen grundsätzlich wie im vorigen Absatz verfahren. Dies bedeutet, dass unter CLP-Proteasen im Allgemeinen eine Gesamtheit aus Serinprotease CLPP und AAA+-Chaperon zu verstehen ist. Konkrete Vertreter der CLP-Proteasen werden entsprechend ihrer Chaperon-Komponente z. B. als CLPXP- oder CLPAP-Protease bzw. verkürzt nur als CLPXP oder CLPAP bezeichnet. Dies ist insofern potenziell missverständlich, als dass von einigen Autoren die Serinprotease CLPP alleine als „CLP-Protease“ und die Gesamtheit aus Serinprotease CLPP und Chaperon alternativ auch als „CLPXP-Komplex“ (Grimaud et al. 1998) oder „CLPXP-System“ (Kim et al. 2000) bezeichnet wird. Die Abkürzung „CLP“ selbst steht, je nach Quelle, für „caseinolytic peptidase“ oder „caseinolytic protease“. Diese Uneinheitlichkeit in der Bezeichnung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Serinprotease CLPP ohne Beteiligung eines Chaperons normalerweise nur kleinere Peptide abbauen kann (Thompson und Maurizi 1994, Gottesman et al. 1997, Grimaud et al. 1998). Erst durch Interaktion mit der Chaperon-Komponente und deren ATP-abhängiger Aktivität können auch komplexere, gefaltete Proteine durch CLPP abgebaut werden (Gottesman et al. 1997). Ein weiterer irreführender Umstand ist, dass die bakterielle Protease HSLV (engl. „heat shock locus gene V“) und die dazugehörige Chaperon-Komponente HSLU (engl. „heat shock locus gene U“) alternativ auch als CLPQ und CLPY bezeichnet werden, obwohl keine direkte Verwandtschaft zwischen CLPP und HSLV/CLPQ besteht (Grimaud et al. 1998). Der Begriff „CLP-Proteasen“ bezieht sich daher in dieser Arbeit ausschließlich auf Zusammenfügungen, welche die Serinprotease CLPP enthalten.

CLP-Proteasen existieren in nahezu allen diesbezüglich untersuchten Bakterien, in den Mitochondrien der meisten Eukaryoten und zusätzlich in den Plastiden von Pflanzen und Algen. Bakterielle und eukaryotische CLP-Proteasen sind evolutionär eng verwandt und es wird daher angenommen, dass mitochondriale und plastidäre CLP-Proteasen bakteriellen Ursprungs sind (Yu und Houry 2007, Voos 2013).

1.5.1 Allgemeiner Aufbau und Funktionsmechanismus von CLP-Proteasen

Der Aufbau und Funktionsmechanismus bakterieller CLP-Proteasen, besonders der CLPXP-Protease in dem gramnegativen Bakterium *Escherichia coli*, wird bereits seit Anfang der 1990er Jahre intensiv untersucht (Baker und Sauer 2012). Dank der hohen Konservierung der Komponenten sind die dadurch gewonnenen Erkenntnisse zum größten Teil auf die CLP-Proteasen anderer Organismen übertragbar (Yu und Houry 2007, Baker und Sauer 2012). Somit

Einleitung

beziehen sich die nachfolgenden Beschreibungen zwar in erster Linie auf *E. coli* CLPXP, gelten aber grundsätzlich auch für andere bakterielle und eukaryotische CLP-Proteasen.

Jeweils sieben Untereinheiten der Serinprotease CLPP lagern sich zu einem heptameren Ring zusammen und zwei dieser Ringe bilden den aus 14 Untereinheiten bestehenden CLPP-Kernzylinder. Dieser hat einen Außendurchmesser und eine Höhe von $\sim 90 \text{ \AA}$ und eine innere Kammer, die näherungsweise sphärisch mit einem Durchmesser von $\sim 50 \text{ \AA}$ ist. Der Zugang zur inneren Kammer erfolgt über die zwei axialen Poren des CLPP-Kernzylinders. Diese erlauben wegen ihrer geringen Größe von $\sim 10 \text{ \AA}$ im Durchmesser lediglich die Aufnahme von kurzen Peptiden. Die aktiven Zentren aller 14 CLPP-Untereinheiten, charakterisiert durch die für Serinproteasen typische katalytische Aminosäuren-Triade aus Serin, Histidin und Aspartat, sind der inneren Kammer zugewandt und folglich findet dort die eigentliche Spaltung von Peptidbindungen statt (Wang et al. 1997, Baker und Sauer 2012).

Die oligomeren Strukturen von CLPP aus verschiedenen bakteriellen Spezies, darunter aus *E. coli* (Wang et al. 1997), *Bacillus subtilis* (Lee et al. 2011), *Streptococcus pneumoniae* (Gribun et al. 2005), *Staphylococcus aureus* (Geiger et al. 2011), *Listeria monocytogenes* (Zeiler et al. 2011) und *Mycobacterium tuberculosis* (Ingvarsson et al. 2007), wie auch die von CLPP aus *Plasmodium falciparum* (Vedadi et al. 2007, El Bakkouri et al. 2010) und aus menschlichen Mitochondrien (Kang et al. 2004) sind bereits bekannt und zeigen alle eine große Ähnlichkeit.

Jedes der aktiven Zentren in der inneren proteolytischen Kammer ist $\sim 25 \text{ \AA}$ von drei weiteren entfernt (Wang et al. 1997, Baker und Sauer 2012). Durch die hohe lokale Konzentration und räumliche Nähe der aktiven Zentren können Polypeptide mit hoher Geschwindigkeit gespalten werden. Die dabei entstehenden Peptidfragmente haben eine durchschnittliche Länge von etwa 6 – 10 Aminosäuren (Choi und Licht 2005, Aubin-Tam et al. 2011, Baker und Sauer 2012). Als möglicher Mechanismus zur Freisetzung der Spaltprodukte wird eine Konformationsänderung des gesamten CLPP-Kernzylinders angenommen (Sprangers et al. 2005, Kimber et al. 2010). Aufgrund der molekularen Architektur des CLPP-Kernzylinders können längere Polypeptide oder gar gefaltete Proteine nicht effizient von alleine, sondern nur unter Beteiligung von spezialisierten Chaperonen aufgenommen und degradiert werden. Diese Chaperone sind Teil der AAA+-Superfamilie (Neuwald et al. 1999, Ogura und Wilkinson 2001, Snider et al. 2008) und werden auch als CLP-ATPasen bezeichnet (Gottesman et al. 1997).

Die Proteine, welche die AAA+-Superfamilie bilden, sind funktionell äußerst divers und finden sich in Eukaryoten, Bakterien und Archaeen (Neuwald et al. 1999, Ogura und Wilkinson 2001, Snider et al. 2008). Es handelt sich bei diesen Proteinen per Definition um NTPasen, die eine hochkonservierte katalytische AAA+-Domäne mit einer Länge von meist 200 – 250 Aminosäuren besitzen. Typischerweise bilden die Mitglieder der AAA+-Superfamilie ringförmige Hexamere und nutzen die durch ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie zur Remodellierung von biologischen Makromolekülen. CLP-ATPasen weisen all diese grundlegenden Eigenschaften auf und können daher mit Recht als klassische AAA+-Proteine bezeichnet werden.

Im Kontext der CLP-Proteasen sind die Aufgaben von CLP-ATPasen die Erkennung und Bindung von Substratproteinen sowie deren Entfaltung und die daran gekoppelte Translokation in die

proteolytische Kammer des CLPP-Kernzylinders (Kim et al. 2000, Baker und Sauer 2012). CLPX ist vermutlich die in Bakterien am häufigsten vorkommende CLP-ATPase und fungiert auch als Chaperon-Komponente aller bekannten mitochondrialen CLP-Proteasen (Yu und Houry 2007). In Bakterien und Chloroplasten von Pflanzen und Algen können zusätzlich noch weitere CLP-ATPasen vorkommen (z. B. CLPA, CLPC oder CLPE; Yu und Houry 2007, Kress et al. 2009, Olinares et al. 2011). Alle CLP-ATPasen besitzen eine, wahrscheinlich an der Erkennung von Substraten beteiligte, N-terminale Domäne (Singh et al. 2001, Wojtyra et al. 2003, Baker und Sauer 2012), gefolgt von einer (CLPX) oder zwei (CLPA, CLPC und CLPE) AAA+-Domänen (Baker und Sauer 2012). Diese enthalten als charakteristische Elemente konservierte Sequenzmotive (u. a. Walker-A, Walker-B, Arginin-Finger und Sensor-2), die alle an der Bindung von ATP im katalytischen Zentrum beteiligt sind (Hanson und Whiteheart 2005, Glynn et al. 2009). Für bakterielle CLP-ATPasen ist bereits detailliert gezeigt, dass diese ihre Substratproteine anhand einer Reihe spezifischer C- oder N-terminaler Sequenzen von nur wenigen Aminosäuren Länge erkennen (Flynn et al. 2003, Baker und Sauer 2012). Die Erkennung und Bindung von Proteinen kann außerdem durch substratspezifische Adapterproteine zusätzlich moduliert bzw. unterstützt werden (Levchenko et al. 2000, Zhou et al. 2001, Flynn et al. 2004, Roman-Hernandez et al. 2011).

Um mit dem CLPP-Kernzylinder interagieren zu können, müssen sich die CLP-ATPasen zunächst unter Beteiligung von ATP zu hexameren Ringen zusammenlagern. Die Bindung eines Chaperon-Hexamers an den CLPP-Kernzylinder im Bereich seiner axialen Poren wird durch die sogenannten IGF-Schleifen (IGF steht für das Tripeptid aus Isoleucin-Glycin-Phenylalanin) der CLP-ATPasen einerseits (Kim et al. 2001, Joshi et al. 2004) und durch flexible Schleifen der CLPP-Untereinheiten, gebildet durch ihre an der Oberfläche exponierten N-Termini (Gribun et al. 2005), andererseits ermöglicht (Baker und Sauer 2012). Ein einzelner CLPP-Kernzylinder kann ein bis zwei Chaperon-Hexamere, maximal je eines pro Ende, binden. Da bei der Bindung zweier Chaperon-Hexamere die Translokation von Substratproteinen in den CLPP-Kernzylinder zu einem gegebenen Zeitpunkt aber scheinbar immer nur durch eines von beiden erfolgen kann, ist die Signifikanz der jeweiligen Stöchiometrie, wie auch die physiologische Regulation dieses Vorgangs, noch unklar (Baker und Sauer 2012). Eine vollständige CLP-Protease, bestehend aus dem 14-mer der Serinprotease CLPP und ein bis zwei Hexameren einer CLP-ATPase, ist in der Lage komplexe Substratproteine zu erkennen, zu entfalten, in die proteolytische Kammer zu translozieren, dort abzubauen und die Spaltprodukte freizusetzen (Abbildung 5). Biochemische Studien *in vitro* konnten zeigen, dass ungefaltete Modellsubstrate mit einer Geschwindigkeit von bis zu 400 Aminosäuren pro Minute in die proteolytische Kammer transloziert werden (Kenniston et al. 2005, Martin et al. 2005). Hingegen liegt die maximal beobachtete Spaltungsrate von Peptidbindungen einfacher Peptide bei 800 – 900 pro

Einleitung

Minute und CLPP-Untereinheit, für ein vollständiges CLPP 14-mer also bei mehr als 10.000 pro Minute (Thompson und Maurizi 1994). Somit sind die geschwindigkeitslimitierenden und gleichzeitig energieaufwendigsten Schritte der Degradation von Proteinen durch CLP-Proteasen ihre durch die CLP-ATPasen katalysierte Denaturierung und Translokation.

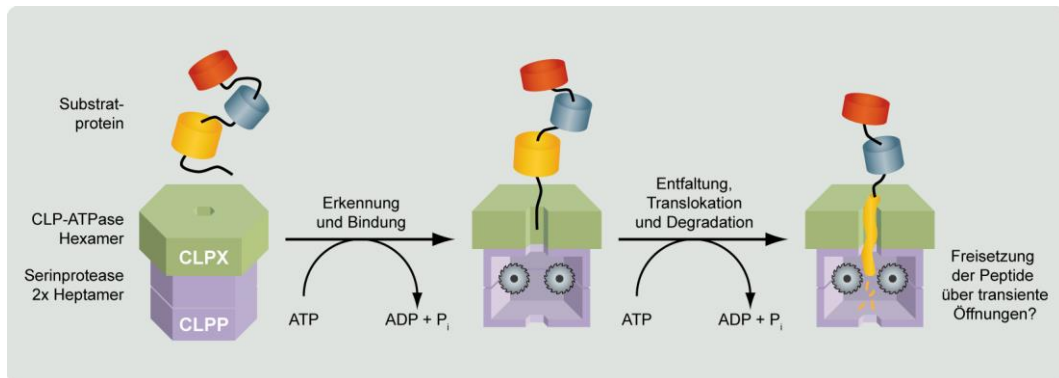


Abbildung 5 | **Aufbau und Funktionsmechanismus von CLP-Proteasen.** Vereinfachte schematische Darstellung am Beispiel der CLXP-Protease. Die Serinprotease CLPP bildet zwei heptamere Ringe, die sich zum vollständigen CLPP-Kernzylinder zusammenlagern. Dieser interagiert im Bereich seiner axialen Poren mit ein bis zwei Hexameren einer CLP-ATPase (hier: ein CLPX-Hexamere), wodurch eine vollständige, funktionsfähige CLP-Protease ausgebildet wird. Die Erkennung der Substratproteine durch die Chaperon-Komponente erfolgt anhand spezifischer, exponierter Sequenzen, welche in Abhängigkeit von ATP gebunden werden. Anschließend werden die Substratproteine unter ATP-Verbrauch entfaltet und dabei gleichzeitig in die proteolytische Kammer des CLPP-Kernzylinders transloziert, wo sie in kurze Peptidfragmente mit einer Länge von ca. 6 – 10 Aminosäuren gespalten werden (die beiden Zahnräder symbolisieren die proteolytische Aktivität in der inneren Kammer des CLPP-Zylinders). Der Mechanismus zur Freisetzung der Spaltprodukte ist noch nicht völlig verstanden, es wird aber angenommen, dass dies über transiente Öffnungen an der Kontaktstelle zwischen den beiden CLPP-Heptameren bewerkstelligt wird. Verändert nach Baker und Sauer 2012.

Ein einzelner Translokationsschritt umfasst etwa 5 – 8 Aminosäuren und es wird angenommen, dass die Denaturierung gefalteter Proteindomänen durch das mechanische „Ziehen“ der CLP-ATPase am Substratprotein, gekoppelt mit einer transienten Reduzierung der Proteinstabilität, erfolgt (Martin et al. 2008, Aubin-Tam et al. 2011, Cordova et al. 2014, Iosefson et al. 2015). Insgesamt sind der Aufbau und die Funktionsweise von CLP-Proteasen also bereits eingehend beschrieben und neuere strukturelle, biochemische und biophysikalische Studien decken diesbezüglich immer noch weitere molekulare Details auf. Um die biologische Rolle von CLP-Proteasen und ihre physiologische Funktion in verschiedenen Organismen zu verstehen, ist es aber mindestens ebenso wichtig zu untersuchen, wie sich ihre genetische Manipulation auswirkt, welche Proteine von ihnen abgebaut und welche zellulären Signalwege und Vorgänge dadurch von ihnen beeinflusst werden und welche Rolle sie z. B. unter Stressbedingungen oder bei Krankheiten spielen.

1.5.2 Bekannte Aufgaben bakterieller CLP-Proteasen

Die biologische Rolle bakterieller CLP-Proteasen ist, ähnlich wie ihre oben beschriebenen strukturellen und biochemischen Eigenschaften, seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung und dementsprechend ebenfalls gut charakterisiert. Auch hier stammen zahlreiche

Erkenntnisse aus Untersuchungen der prototypischen CLXP-Protease in *E. coli*. Darüber hinaus sind aber auch die CLP-Proteasen vieler weiterer bakterieller Spezies analysiert worden. Als eine grundlegende und konservierte physiologische Funktion bakterieller CLP-Proteasen hat sich dabei ihre Beteiligung an verschiedenen Stressantworten und an der allgemeinen Qualitätskontrolle von Proteinen herausgestellt (Porankiewicz et al. 1999, Jenal und Hengge-Aronis 2003, Frees et al. 2007, Raju et al. 2012a). Dies bedeutet konkret, dass bakterielle CLP-Proteasen oft fehlerhaft translatierte oder z. B. in Folge von Hitzestress fehlgefaltete oder aggregierte Proteine abbauen (Raju et al. 2012a). Konsequenterweise wurde CLPP in *E. coli* als wichtige Komponente des Hitzeschock-Regulons identifiziert (Fredriksson et al. 2005). Ebenso wird in weiteren Bakterien die Expression von CLPP-kodierenden Genen bei unterschiedlichen Stressbedingungen induziert und entsprechend führt eine Deletion von *ClpP* in diesen Organismen zu einer verminderten Stressresistenz und Wachstumsdefiziten der jeweiligen Mutante gegenüber dem Wildtyp (Porankiewicz et al. 1998, Fedhila et al. 2002, Cohn et al. 2007, Gómez-Baena et al. 2009, Frees et al. 2012, Xie et al. 2013).

Ein Beispiel für einen allgemeinen, durch bakterielle CLP-Proteasen vermittelten, Qualitätskontrollmechanismus ist der Abbau von Proteinen mit einem C-terminalen *ssrA*-Marker. Dieser Mechanismus wurde zunächst für die *E. coli* CLPAP- und CLXP-Proteasen beschrieben (Gottesman et al. 1998), später aber auch für CLP-Proteasen anderer bakterieller Spezies (Wiegert und Schumann 2001, Ahlawat und Morrison 2009, Tao und Biswas 2015) und scheint in Bakterien allgemein weit verbreitet zu sein. Wenn ein Ribosom während der Translation blockiert, z. B. aufgrund eines Kodierungsfehlers in der translatierten mRNA oder durch Einwirkung von Antibiotika, wird der *ssrA*-Marker durch eine tmRNA (ein Hybridmolekül aus tRNA und mRNA) an den C-Terminus des neu entstehenden Polypeptids angehängt (Tu et al. 1995, Keiler 2008). Die Sequenz des *ssrA*-Markers (AANDENYALAA) wird als Degradationssignal von CLPAP oder CLXP erkannt und führt damit zum Abbau des markierten Proteins. In *E. coli* kann der *ssrA*-Marker zusätzlich durch das Adapterprotein SSPB gebunden werden, wodurch die Bindung an die CLP-ATPase CLPX verstärkt wird (Levchenko et al. 2000, Flynn et al. 2001).

Durch eine Reihe von biochemischen und proteomischen Studien konnten außerdem spezifische Substrate mehrerer bakterieller CLP-Proteasen identifiziert werden. Eine spezielle Methode, die sich dafür besonders bewährt hat, wird als CLPP „Substrat-trapping Assay“ bezeichnet. Entwickelt wurde dieser Assay Anfang der 2000er Jahre in den Laboren von Robert T. Sauer und Tania A. Baker am „Massachusetts Institute of Technology“ für die möglichst umfassende und unvoreingenommene Identifizierung von Substraten der *E. coli* CLXP-Protease (Flynn et al. 2003; detaillierte Erklärung siehe Abschnitt 4.2). Insgesamt wurden mittlerweile bereits, hauptsächlich durch Anwendung des CLPP „Substrat-trapping Assay“, mehr als 100 intrazelluläre Substrate der *E. coli* CLXP-Protease (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006) und auch zahlreiche Substrate von anderen CLP-Proteasen, z. B. von CLXP aus *Caulobacter crescentus* (Bhat et al. 2013) sowie CLPCP aus *B. subtilis* (Kock et al. 2004) und *S. aureus* (Feng et al. 2013), identifiziert.

Einleitung

Das Spektrum der durch die bakteriellen CLP-Proteasen abgebauten Proteine ist äußerst divers und umfasst etwa transkriptionelle Regulatoren, ribosomale Untereinheiten sowie metabolische oder detoxifizierende Enzyme. Folglich werden zahlreiche Prozesse durch CLP-Proteasen beeinflusst bzw. proteolytisch reguliert. So konnte in *B. subtilis* gezeigt werden, dass die CLPCP-abhängige Proteolyse von Enzymen eine essentielle Funktion in der Herunterregulierung des zellulären Metabolismus bei Nährstoffmangel hat (Gerth et al. 2008). Die *E. coli* CLPXP-Protease ist u. a. an der Kontrolle der Zellteilung durch Degradation des Cytoskelett-Proteins FTSZ beteiligt (Camberg et al. 2009) und steuert die Aktivität eines bestimmten DNA-Reparaturmechanismus, der Nukleotid-Exzisions-Reparatur, durch Abbau der darin involvierten DNA-bindenden ATPase UVRA (Pruteanu und Baker 2009).

Die hier beschriebene und nicht annähernd vollständige Auswahl von Befunden macht deutlich, dass bakterielle CLP-Proteasen eine beeindruckende Bandbreite von Aufgaben übernehmen, die sich von allgemeinen Formen der Proteinqualitätskontrolle, über die Adaption an veränderte Umweltbedingungen, bis hin zur proteolytischen Regulation spezifischer molekularer Mechanismen und Entwicklungsprozesse erstreckt. Wegen ihrer essentiellen Funktionen scheinen bakterielle CLP-Proteasen auch für die Pathogenität verschiedener menschlicher Krankheitserreger von Bedeutung zu sein (El Bakkouri et al. 2010, Park et al. 2010, Raju et al. 2012b, Knudsen et al. 2013) und werden daher verstärkt als mögliche Ziele für neuartige Antibiotika untersucht (Raju et al. 2012a, Compton et al. 2013, Brotz-Oesterhelt und Sass 2014).

1.5.3 Bekannte Aufgaben eukaryotischer CLP-Proteasen

Eukaryotische CLP-Proteasen sind bezüglich ihrer biologischen Rolle, im Gegensatz zu ihren bakteriellen Pendanten, weniger gut untersucht und folglich noch vergleichsweise unvollständig verstanden. Nichtsdestotrotz wurden gerade in den letzten Jahren mehrere Studien veröffentlicht, die wenigstens einige grundlegende Einsichten in ihre zellulären Funktionen zulassen.

Die, gemessen an der verfügbaren Literatur, vermutlich am besten untersuchten Vertreter der eukaryotischen CLP-Proteasen finden sich in Chloroplasten von Algen und Pflanzen. Ihr Aufbau ist meist deutlich komplexer als der von bakteriellen und auch mitochondrialen CLP-Proteasen. Insbesondere höhere Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* besitzen meist mehrere Isoformen von CLPP und unterschiedlicher CLP-ATPasen, die alle vorwiegend im Stroma der Chloroplasten lokalisiert sind (Olinares et al. 2011, Nishimura und van Wijk 2015). Im Einklang mit dieser großen strukturellen Diversität scheint das Aufgabenspektrum plastidärer CLP-Proteasen dem von bakteriellen CLP-Proteasen in wenig nachzustehen. So konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass plastidäre CLP-Proteasen u. a. ebenfalls eine wichtige Rolle für die Qualitätskontrolle von Proteinen (Ramundo et al. 2014, Nishimura und van Wijk 2015, Rochaix und

Ramundo 2015) und bei der Adaption an Stressbedingungen spielen (Ostersetzer und Adam 1996, Nakashima et al. 1997, Clarke et al. 1998), essentiell für die Kontrolle von Entwicklungsprozessen sind (Shikanai et al. 2001, Kuroda und Maliga 2003, Rudella et al. 2006, Kim et al. 2009) sowie die zelluläre Eisen- und Kupferhomöostase beeinflussen (Wu et al. 2010, Tapken et al. 2015). Durch vergleichende Proteomanalysen wurden außerdem bereits mehrere mögliche Substratproteine plastidärer CLP-Proteasen, darunter Chaperone, RNA-Bindeproteine, transkriptionelle Regulatoren und metabolische Enzyme, identifiziert, die ihre Bedeutung für die Biogenese von Chloroplasten und die Regulation des plastidären Stoffwechsels weiter unterstreichen (Sjögren et al. 2006, Stanne et al. 2009, Kim et al. 2013).

In der mitochondrialen Matrix der meisten Eukaryoten finden sich die Serinprotease CLPP und das Chaperon CLPX. So wurden etwa beide Komponenten in murinen (Andresen et al. 2000, Corydon et al. 2000) und menschlichen (Corydon et al. 1998, de Sagarra et al. 1999, Corydon et al. 2000) Mitochondrien identifiziert. Für CLPP und CLPX des Menschen konnte *in vitro* die Bildung von funktionellen proteolytischen Komplexen bestätigt werden, die jedoch im Gegensatz zu bakteriellen CLP-Proteasen nicht in der Lage sind, mit dem *ssrA*-Marker versehene Proteine zu erkennen und abzubauen (Kang et al. 2002, Kang et al. 2005). Eine Ausnahme bezüglich des Vorhandenseins einer mitochondrialen CLPXP-Protease stellen einige Hefen, darunter der weit verbreitete eukaryotische Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*, dar (Yu und Houry 2007). Diese besitzen interessanterweise zwar ein CLPX- (in *S. cerevisiae* auch als MCX1 bezeichnet; van Dyck et al. 1998), aber kein CLPP-Homolog und damit auch keine vollständige CLPXP-Protease. Dies legt offensichtlich eine CLPP-unabhängige Funktion von *S. cerevisiae* CLPX als Chaperon nahe. Dementsprechend zeigt eine vor Kurzem veröffentlichte Arbeit, dass ScCLPX für die Stimulierung eines Enzyms der Häm-Biosynthese, der ALA-Synthase (engl. „5-amino-levulinic acid“, ALA), durch Katalyse des Einbaus seines Kofaktors verantwortlich ist. Diese CLPP-unabhängige Funktion von ScCLPX ist auch bei CLPX-Homologen aus Säugern konserviert (Kardon et al. 2015). Für das menschliche CLPX-Chaperon konnte außerdem eine Rolle bei der Propagation und Aufrechterhaltung der Integrität der mtDNA, vermutlich vermittelt durch Interaktion mit dem mitochondrialen Transkriptionsfaktor TFAM, beobachtet werden (Kasashima et al. 2012). Diese Befunde zeigen, dass CLPX in Eukaryoten offensichtlich eine duale Aufgabe, sowohl als eigenständiges Chaperon wie auch als Komponente der CLPXP-Protease, erfüllt.

Einen der frühesten Hinweise auf eine mögliche proteolytische Funktion von CLPXP in Mitochondrien lieferte die Entdeckung der UPR^{mt}, einer spezifischen mitochondrialen Stressantwort (Pellegrino et al. 2013, Schulz und Haynes 2015). Die Pionierarbeiten aus dem Labor von Nicholas J. Hoogenraad zeigten dabei, dass die Akkumulation fehlgefalteter Proteine in der mitochondrialen Matrix von Säugerzellen zu einer vom CHOP-Transkriptionsfaktor

Einleitung

abhängigen transkriptionellen Heraufregulierung kernkodierter mitochondrialer Proteine, darunter mehrerer Chaperone (DNAJ, HSP10/HSP110 und HSP60/HSPD1; engl. „heat shock protein“, HSP) und CLPP, führt (Zhao et al. 2002). Dies lässt vermuten, dass die CLPP-Protease ein wichtiger Faktor der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle und insbesondere für den Abbau fehlgefalteter Proteine unter Stressbedingungen ist. Einige Jahre später folgende Arbeiten in *C. elegans* konnten zeigen, dass *ClpP* dort nicht nur ebenfalls Zielgen des UPR^{mt}-Signalwegs, sondern auch selbst essentiell für die Induktion dieser Stressantwort ist (Haynes et al. 2007, Haynes et al. 2010).

Neben CLPP besitzt *C. elegans* zwei CLPX-Homologe mit vorhergesagten mitochondrialen Zielsequenzen, so dass von der Existenz einer vollständigen CLPP-Protease in den Mitochondrien dieses Organismus auszugehen ist. In der ursprünglichen Arbeit, die CLPP als wichtige Komponente der UPR^{mt} in *C. elegans* identifizierte, konnte durch RNAi-vermittelte Herunterregulierung der CLPX-Homologe zunächst keine Beteiligung dieser Chaperone an der UPR^{mt}-Signaltransduktion festgestellt werden (Haynes et al. 2007). Dies erscheint paradox, da CLPP ohne Beteiligung einer Chaperon-Komponente nicht in der Lage sein sollte Proteine effizient abzubauen. Eine nachfolgende Studie konnte jedoch zeigen, dass bei vollständiger Deletion des einen CLPX-Homologs und gleichzeitiger RNAi-vermittelter Herunterregulierung des anderen sehr wohl eine Abschwächung der UPR^{mt}-Induktion unter Stressbedingungen zu verzeichnen ist (Haynes et al. 2010). Darüber hinaus wurde vor Kurzem gezeigt, dass eine *ClpX*-Überexpression in Säugerzellen eine UPR^{mt}-ähnliche Antwort auslöst (Al-Furoukh et al. 2015). Auch wenn noch viele Fragen diesbezüglich offenbleiben ist also möglich, dass tatsächlich die vollständige CLPP-Protease und nicht CLPP alleine für die Degradation fehlgefalteter Proteine im Rahmen der UPR^{mt} verantwortlich ist.

Es existiert bereits ein sehr elegantes und durch mehrere Studien gut ausgearbeitetes Modell für den Signaltransduktionsmechanismus der UPR^{mt} in *C. elegans* (Pellegrino et al. 2013, Jovaisaite und Auwerx 2015), an dem neben CLPP u. a. auch noch der Matrix-Peptidexporter HAF-1 (Haynes et al. 2010) und der Transkriptionsfaktor ATFS-1 (Nargund et al. 2012, Nargund et al. 2015) beteiligt sind. Konkret wird angenommen, dass akkumulierende ungefaltete Proteine in *C. elegans* Mitochondrien CLPP-abhängig abgebaut und die resultierenden Peptide durch HAF-1 in das Cytosol transportiert werden. Diese Peptide unterbinden vermutlich, durch einen noch nicht näher spezifizierten Mechanismus, den Import mitochondrialer Proteine. Infolgedessen gelangt der Transkriptionsfaktor ATFS-1, welcher normalerweise bevorzugt in die Mitochondrien transloziert und dort durch die LON-Protease abgebaut wird, in den Kern und aktiviert dort zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Transkription der UPR^{mt}-Zielgene. Obwohl ursprünglich in Säugerzellen entdeckt, sind dort die molekularen Details der UPR^{mt} weniger gut verstanden (Schulz und Haynes 2015). So ist noch weitestgehend unklar, ob sich ein vergleichbarer CLPP- bzw. CLPP-vermittelter Mechanismus der UPR^{mt}-Signaltransduktion wie in *C. elegans* auch in Säugern findet.

Abgesehen von der implizierten allgemeinen Beteiligung mitochondrialer CLPP-Proteasen am Abbau fehlgefalteter und oxidativ geschädigter Proteine unter Stressbedingungen ist ihr Substratspektrum noch sehr unzulänglich charakterisiert. Bisher wurde nur für ein einzelnes

mitochondriales Protein, die in der Matrix lokalisierte GTPase NOA1 (engl. „nitric oxide associated 1“, NOA1), ein CLXP-abhängiger Abbau gezeigt (Al-Furoukh et al. 2014). Die Autoren der entsprechenden Studie identifizierten drei C-terminale Sequenzen in NOA1, die allesamt Ähnlichkeiten zu CLXP-Erkennungssequenzen aus *E. coli* aufwiesen, und überprüften daher gezielt den CLXP-abhängigen Abbau von NOA1. Tatsächlich führte eine Überexpression von *ClpX* in C2C12 Maus-Myoblasten in diesen Zellen zu einer verminderten Menge von NOA1. In einem zusätzlich durchgeführten *in vitro* Degradations-Assay wurde rekombinantes NOA1 von einer chimären Säuger CLXP-Protease, bestehend aus *Homo sapiens* CLPP und *Mus musculus* CLPX, und auch, interessanterweise deutlich effizienter, von der *E. coli* CLXP-Protease abgebaut.

Von diesem Einzelfall abgesehen gibt es bisher nur spärliche Hinweise in der Literatur, dass erfolgreiche Versuche unternommen wurden eine grundlegende und unvoreingenommene Bestimmung von Substraten und/oder spezifischen physischen Interaktionspartnern mitochondrialer CLXP-Proteasen, z. B. durch Anwendung des in Bakterien bewährten CLPP „Substrat-trapping Assay“, durchzuführen. In einer der wenigen Studien mit entsprechendem Anspruch wurde eine mutierte Variante des menschlichen CLPX-Chaperons eingesetzt, um damit mögliche CLXP-Substratproteine aus murinen mitochondrialen Proteinextrakten einzufangen (Lowth et al. 2012). Durch diese Herangehensweise konnten drei Proteine identifiziert werden (Carbamoylphosphat-Synthetase I, CPS1; Polymerase- δ interagierendes Protein 2, POLDIP2; engl. „complement component 1 Q subcomponent-binding protein“, C1QBP), von denen CPS1 und POLDIP2 als mögliche CLXP-Substratproteine und C1QBP als mögliches CLXP-Adapterprotein angenommen wurden.

Eine weitere erst kürzlich durchgeführte Studie verwendete eine als BioID (engl. „proximity-dependent biotin identification“; BioID) bezeichnete Methode, um Proteine in räumlicher Nähe zu humaner CLPP in einer menschlichen Zellkulturlinie zu markieren (Cole et al. 2015).

Die BioID-Methode basiert auf der Fusion einer Biotin-Ligase aus *E. coli* an ein Zielprotein, dessen mögliche Interaktionspartner identifiziert werden sollen (Roux et al. 2012). Die rekombinante Biotin-Ligase ist dabei durch eine Mutation so modifiziert, dass sie die aktivierte Form des Biotin (Biotinoyl-5'-AMP, bioAMP) vorzeitig freisetzt. Aufgrund seiner hohen Reaktivität kann freigesetztes bioAMP direkt mit primären Aminogruppen, z. B. solchen in den Lysin-Seitenketten von benachbarten Proteinen, reagieren und diese dadurch biotinylieren. Da bioAMP sehr instabil ist, werden bevorzugt Proteine in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Fusionsprotein mit Biotin markiert (Choi-Rhee et al. 2004). Durch eine anschließende Affinitätsaufreinigung der biotinylierten Proteine mittels dem Biotin-Bindeprotein Streptavidin können die markierten Proteine gezielt angereichert und anschließend ihre Identität durch eine massenspektrometrische Analyse bestimmt werden.

Unter Verwendung geeigneter Kontrollen wurden dadurch, neben dem CLPX-Chaperon als einzigem bekannten Interaktionspartner von CLPP, insgesamt 48 weitere Proteine als mögliche HsCLPP-Interaktionspartner gefunden. Hauptsächlich handelte es sich dabei um Komponenten

Einleitung

der ETC und um mitochondriale metabolische Enzyme. Dies lässt die Vermutung zu, dass die CLPXP-Protease in menschlichen Mitochondrien wichtig für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Metabolismus ist (Cole et al. 2015). Es sollte jedoch angemerkt werden, dass durch die BioID-Methode nicht zwischen physischen Interaktionspartnern des Zielproteins und Proteinen, die sich lediglich in seiner räumlichen Nähe befinden, differenziert werden kann. Die Autoren der Studie verwendeten für die BioID-Methode außerdem sowohl eine Wildtyp- wie auch eine katalytisch inaktive Variante von HsCLPP, konnten jedoch damit bezüglich der gefundenen Proteine keine auffälligen Unterschiede feststellen. Somit scheint die BioID-Methode eher nicht zur Identifizierung von Substraten der CLPXP-Protease geeignet zu sein.

Neben den beschriebenen Erkenntnissen zur molekularen Funktion mitochondrialer CLPXP-Proteasen gibt es einige Studien, welche auf die Bedeutung von CLPXP für menschliche Krankheiten hinweisen. Ein Beispiel dafür ist eine bestimmte Form der hereditären spastischen Paraplegie, einer genetisch heterogenen neurodegenerativen Erkrankung. Diese als SPG13 klassifizierte Form (engl. „spastic paraplegia gene“, SPG) ist durch eine Mutation im Gen *Hspd1* charakterisiert, welche zu einer verminderten Aktivität des davon kodierten mitochondrialen Chaperons HSP60 führt (Hansen et al. 2002). In den Zellen eines betroffenen Patienten wurde damit einhergehend eine verminderte LON- und CLPP-Proteinmenge festgestellt (Hansen et al. 2008). Dies wurde von den Autoren der entsprechenden Arbeit als eine gezielte Ko-Regulation verschiedener Mechanismen der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle interpretiert. So könnten Proteine, die sowohl Substrate von HSP60 wie auch von LON oder CLPXP sind, mehrere Faltungsversuche durchlaufen und liefern nicht Gefahr vorzeitig abgebaut zu werden. Eine weitere neurodegenerative Erkrankung, bei der korrelative Beobachtungen auf eine mögliche Beteiligung von CLPXP hindeuten, ist die Friedreich-Ataxie (engl. „Friedreich’s ataxia“, FRDA). Der FRDA liegt eine Mutation in dem mitochondrialen Eisen-Chaperon Frataxin zugrunde (Campuzano et al. 1996), was zu einer fehlerhaften Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern, einer Störung der Eisenhomöostase und gesteigertem oxidativem Stress in Mitochondrien führt (Puccio und Koenig 2002). In einem FRDA-Mausmodell nimmt die CLPP-Proteinmenge im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf zu, während gleichzeitig Eisen-Schwefel-Proteine abnehmen (Guillon et al. 2009). Daraus lässt sich die Annahme folgern, dass CLPXP im Rahmen der FRDA geschädigte bzw. unvollständige mitochondriale Eisen-Schwefel-Proteine abbaut.

Beim Perrault-Syndrom (PS), das sich durch Hörverlust und eine verminderte weibliche Fertilität auszeichnet (Pallister und Opitz 1979), wurden in zwei unabhängigen Studien autosomal-rezessiv vererbte *ClpP*-Mutationen bei blutsverwandten PS-Patienten als wahrscheinliche genetische Ursache identifiziert (Jenkinson et al. 2013, Ahmed et al. 2015). Die zum PS führenden molekularen Vorgänge sind zwar noch unklar, jedoch konnte bereits gezeigt

werden, dass auch *ClpP*-Knockout-Mäuse einen PS-ähnlichen Phänotyp aufweisen (Gispert et al. 2013). Daher wird eine Störung der mitochondrialen Proteinhomöostase in Folge eines CLPP-Funktionsverlusts als eine mögliche Krankheitsursache angenommen.

Von großer klinischer Relevanz scheint die mitochondriale CLXP-Protease auch bei einer Reihe von Krebsarten zu sein (Goard und Schimmer 2014). Durch proteomische Analysen wurden z. B. Veränderungen der CLPP-Proteinmenge in Gewebeproben von Patienten mit Darm- oder Magenkrebs festgestellt (Roblick et al. 2004, Nishigaki et al. 2005). Weiter konnte eine kürzlich erschienene Studie zeigen, dass *ClpP* in 45 % der 511 untersuchten Proben von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), einer Krebserkrankung des blutbildenden Systems, überexprimiert war (Cole et al. 2015). Die Herunterregulierung von *ClpP* in AML-Zelllinien mit einer gesteigerten *ClpP*-Expression führte zu einer selektiven Einschränkung des Wachstums und Überlebens dieser Zellen. In einer der untersuchten Zelllinien, bezeichnet als OCI-AML2, wurde außerdem eine Störung der OXPHOS nach *ClpP*-Herunterregulierung beobachtet. Von den Autoren der Studie wurde daher spekuliert, dass CLPP für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Metabolismus von AML-Zellen benötigt werden könnte.

Die Gesamtheit dieser Befunde unterstreicht die Notwendigkeit eines detaillierten Verständnisses der molekularen Funktion der mitochondrialen CLXP-Protease. Entscheidend dafür ist vor allem die Identifizierung ihrer bisher noch unbekanntem physiologischen Substrate und spezifischen Interaktionspartner. Nur mit dieser Kenntnis der molekularen Funktion und durch zusätzliche gezielte Studien kann es gelingen zu verstehen, welche biologische Rolle diese Protease in Mitochondrien im Allgemeinen und bei der Entstehung bestimmter Krankheiten im Speziellen spielt. Eine übliche Herangehensweise zur Gewinnung basaler Erkenntnisse ist die Durchführung initialer Analysen in einfachen Modellorganismen. Wie oben erwähnt besitzt *S. cerevisiae*, der für solche Zwecke am häufigsten eingesetzte und wohl am besten untersuchte Eukaryot, keine vollständige mitochondriale CLXP-Protease und kann folglich für entsprechende Untersuchungen nicht verwendet werden. Als mögliche Alternative bietet sich der Pilz *Podospira anserina* an. Dieser wird bereits seit vielen Jahrzehnten als einfacher eukaryotischer Modellorganismus in der Grundlagenforschung verwendet (Osiewicz et al. 2010), ist experimentell gut zugänglich und besitzt ein mitochondriales CLPP- und CLPX-Homolog (Fischer 2011).

1.6 *Podospira anserina* als eukaryotischer Modellorganismus

Der filamentöse Ascomycet *P. anserina* wächst in der Natur in Form eines Hyphengeflechts, das in seiner Gesamtheit als Myzel bezeichnet wird, auf dem Dung von Herbivoren. Das Myzel eines einzelnen Individuums dieses sekundär homothallischen Pilzes ist in der Regel heterokaryotisch und besitzt zwei unterschiedliche Arten von haploiden Kernen, die von verschiedenen Meioseprodukten abstammen. Dadurch sind im Normalfall die

Einleitung

Informationen zweier verschiedener Kreuzungstypen (in *P. anserina* als „+“ und „-“ bezeichnet) im selben Myzel vorhanden, welches somit selbstfertil ist. Nach einer Phase des vegetativen Wachstums kommt es unter geeigneten Bedingungen zur sexuellen Reproduktion, die in der Ausbildung von Perithezien endet. Die zahlreichen im Inneren eines solchen Fruchtkörpers gebildeten Asci enthalten meist vier dikaryotische Sporen. Diese Sporen werden von den reifen Perithezien in die Umgebung ausgeschleudert und können im Idealfalle, abhängig von den gegebenen Umweltbedingungen, jeweils erneut ein heterokaryotisches Myzel ausbilden. Gelegentlich werden durch eine Störung des an der Kernteilung beteiligten Spindelapparates jedoch anstelle einer dikaryotischen Spore zwei monokaryotische Sporen gebildet. Die aus den monokaryotischen Sporen entstehenden homokaryotischen Individuen eignen sich aufgrund ihres eindeutig definierten Genotyps besonders gut für genetische und phänotypische Analysen. Da sie nicht mehr selbstfertil sind können sie außerdem, z. B. für die Erzeugung von Doppel- oder Mehrfachmutanten, gezielt mit anderen homokaryotischen Individuen gegensätzlichen Kreuzungstyps und abweichenden Genotyps gekreuzt werden.

Im Gegensatz zu den meisten Ascomyceten und anderen Pilzen haben alle bekannten Wildstammisolate von *P. anserina* eine begrenzte Lebensspanne (Osiewacz et al. 2013). Dieses Phänomen wurde erstmals von dem französischen Genetiker George Rizet in den 1950er Jahren als „Seneszenz-Syndrom“ von *P. anserina* beschrieben (Rizet 1953a). Nach einer Phase des linearen Wachstums, die i. d. R. nur wenige Wochen beträgt (Rizet 1953b), kommt es bei alternden Individuen zu einer Abnahme der Wuchsrates, verminderter Fertilität, zunehmender Pigmentierung des Myzels und letztlich zu einem Absterben der peripheren Hyphen (Rizet 1953a, Esser und Tudzynski 1980). Diese gut zu beobachtenden und messbaren Eigenschaften machen *P. anserina* zu einem wichtigen Modellorganismus für die Altersforschung (Osiewacz et al. 2010). Darüber hinaus ist das Genom von *P. anserina* vollständig sequenziert und zum größten Teil annotiert (Espagne et al. 2008). Zusätzlich lässt sich dieser Organismus unter Laborbedingungen leicht kultivieren und es sind bereits viele grundlegende molekularbiologische und genetische Methoden für die Anwendung in *P. anserina* etabliert (Osiewacz et al. 2013).

Klassische genetische Analysen wiesen bereits frühzeitig darauf hin, dass genetische Merkmale die Kontrolle der Lebensspanne von *P. anserina* beeinflussen können (Osiewacz 2011). Seit Ende der 1970er Jahre liegt der Fokus der Altersforschung in *P. anserina* hauptsächlich auf der Rolle der Mitochondrien. Zu dieser Zeit wurde erstmals beobachtet, dass es in Wildstammisolen von *P. anserina* zu einer altersabhängigen Reorganisation der mtDNA kommt (Stahl et al. 1978). Dieser Vorgang korreliert mit einer vermehrten Freisetzung der sogenannten pDNA. Diese ist identisch mit dem ersten Intron von *PaCox1*, kodierend für die erste Untereinheit von Komplex IV der Atmungskette (Osiewacz und Esser 1984). Im Zuge der Akkumulation der

pDNA kommt es außerdem zu einem fortschreitenden Verlust essentieller mitochondrialer Gene (Kück et al. 1985, Albert und Sellem 2002). Da mehrere langlebige Mutanten von *P. anserina* gleichzeitig auch eine verzögerte pDNA-abhängige Reorganisation ihrer mtDNA zeigen wurde zunächst angenommen, dass die Instabilität der mtDNA und die dadurch bedingte mitochondriale Fehlfunktion dem Alterungsprozess bzw. dem „Seneszenz-Syndrom“ von *P. anserina* zugrunde liegen (Osiewacz und Borghouts 2000). Tatsächlich existieren jedoch auch mehrere langlebige Mutanten, die keine pDNA-Akkumulation zeigen und trotzdem sterblich sind (Borghouts et al. 1997, Dufour et al. 2000, Stumpferl et al. 2004). Somit spielen Reorganisationen der mtDNA zwar offensichtlich eine wichtige Rolle für den Alterungsprozess in *P. anserina*, sind für diesen aber nicht zwangsläufig ursächlich (Scheckhuber und Osiewacz 2008, Osiewacz et al. 2010).

Durch mehr als 50 Jahre intensiver Grundlagenforschung steht trotz allem außer Frage, dass der Alterungsprozess in *P. anserina* eine klare mitochondriale Ätiologie hat (Osiewacz 2011). So konnte etwa in mehreren unabhängigen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Deletion von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe III und/oder IV zu einer Aktivierung der sogenannten alternativen Atmung, infolge dessen zu einer verminderten Generierung mitochondrialer ROS und zu einer verlängerten Lebensspanne der betreffenden Mutanten führt. Ebenso beeinflussen verschiedene Systeme der mitochondrialen Qualitätskontrolle offensichtlich den Alterungsprozess in *P. anserina* (Osiewacz et al. 2010, Osiewacz 2011). Beispielsweise resultiert die Deletion von *PaDnm1*, kodierend für ein konserviertes Protein der mitochondrialen Teilung, in einer veränderten mitochondrialen Dynamik und der bevorzugten Ausbildung langgestreckter und verzweigter mitochondrialer Netzwerke. Damit einhergehend zeigt die Mutante $\Delta PaDnm1$ eine verlängerte Lebensspanne, ohne dass ihr Wachstum oder ihre Fertilität negativ beeinflusst sind (Scheckhuber et al. 2007). Darüber hinaus zeigt eine wachsende Anzahl von Studien, dass die mitochondriale Proteinqualitätskontrolle in *P. anserina* eine bedeutende, wenn auch nicht immer intuitiv verständliche, Rolle für den Alterungsprozess spielt.

1.7 Mitochondriale Proteasen in *P. anserina*

Neuere Arbeiten belegen, dass die Modulation verschiedener mitochondrialer Proteasen einen Einfluss auf die Regulation der Lebensspanne in *P. anserina* hat. So führt etwa eine Überexpression des Gens kodierend für die Matrix-lokalisierte Protease PaLON zu einer Mutante mit verlängerter Lebensspanne, die keine feststellbaren Beeinträchtigungen ihrer vitalen Funktionen zeigt (Luce und Osiewacz 2009). Konsequenterweise ist der *PaLon*-Deletionsstamm kurzlebig und außerdem sehr anfällig für Temperaturstress (Adam et al. 2012). Diese Befunde sind im guten Einklang mit einer auch aus anderen eukaryotischen Organismen bekannten zentralen Rolle von LON-Proteasen in der Qualitätskontrolle und dem

Einleitung

Abbau fehlgefalteter Matrixproteine (Venkatesh et al. 2012). Jedoch sind nicht alle experimentellen Beobachtungen derartig eindeutig und direkt nachvollziehbar. So führt eine Deletion von *Palap*, kodierend für das *P. anserina* Homolog der membranständigen iAAA-Protease, überraschenderweise zu einer Verlängerung der Lebensspanne des Deletionsstammes unter Normalbedingungen. Erst bei erhöhter Temperatur zeigen sich nachteilige Effekte der *Palap*-Deletion, darunter eine verminderte weibliche Fertilität, ein eingeschränktes Wachstum und die Kurzlebigkeit der Mutante im Vergleich zum Wildstamm (Weil et al. 2011). In einer vorangegangenen Diplomarbeit wurde auch bereits damit begonnen, die Bedeutung der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina* durch Deletion des Gens *PaClpP*, kodierend für die proteolytische Komponente, zu untersuchen (Fischer 2011). Ähnlich wie der *Palap*-Deletionsstamm ist $\Delta PaClpP$ unter Normalbedingungen langlebig, zeigt aber eine weniger deutlich ausgeprägte Hitzesensitivität. Bemerkenswerterweise ist nach heterologer Expression der menschlichen *ClpP*-cDNA im *PaClpP*-Deletionsstamm ein vollständiger 14-mer HsCLPP-Kernzylinder in den Mitochondrien der transgenen Mutante nachweisbar und ihr Phänotyp entspricht wieder dem des Wildstammes. Dies beweist, dass die Serinproteasen CLPP des Menschen und von *P. anserina* funktionell homolog sind. Dadurch eröffnet sich die Perspektive diesen Pilz als einfachen eukaryotischen Modellorganismus zu verwenden, um Erkenntnisse bezüglich der biologischen Rolle mitochondrialer CLPXP-Proteasen zu gewinnen, welche sich möglicherweise auch auf höhere Eukaryoten, inklusive des Menschen, übertragen lassen.

2 PROBLEMSTELLUNG

Der ausgeprägte Phänotyp des *P. anserina* *ClpP*-Deletionsstammes, d. h. die beobachtbare deutliche Lebensverlängerung unter nicht-stressenden Laborbedingungen ohne offensichtliche Einschränkungen, entspricht nicht den Erwartungen. Intuitiv würde man als Resultat der Ablation oder Störung einer Komponente der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle mit negativen Effekten für den Organismus rechnen. Tatsächlich wirkt sich die Deletion von *ClpP* in Mäusen auch stark nachteilig auf deren Gesundheit aus (Gispert et al. 2013). Ebenfalls stehen beim Menschen *ClpP*-Mutationen nachweislich in direkter Verbindung mit der Entstehung mindestens einer erblichen Krankheit, dem Perrault-Syndrom (Jenkinson et al. 2013, Ahmed et al. 2015). Gleichzeitig konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass das CLPP-Homolog des Menschen vollständig den *PaClpP*-Deletionsstamm komplementieren kann (Fischer 2011). Somit führt die Abwesenheit bzw. Mutation der proteolytischen Komponente CLPP, trotz ihrer funktionellen Konservierung in Eukaryoten, in einem niederen Organismus wie *P. anserina* zu einem anderen Ergebnis als in höheren Eukaryoten wie Maus oder Mensch. Diese scheinbar widersprüchlichen Befunde führen zu der Frage nach den Ursachen, d. h. allgemein der Bedeutung von CLXP-Proteasen in Mitochondrien. Um sich dieser Fragestellung gezielt anzunähern, bietet es sich an zu untersuchen, welche Proteine von mitochondrialen CLXP-Proteasen in verschiedenen Organismen als Substrate erkannt und abgebaut werden. Nur durch die Kenntnis der Substratspektren dieser Proteasen ist es möglich ihre biologische Rolle zu verstehen, also konkret welche Signalwege und Prozesse von ihnen auf molekularer Ebene beeinflusst oder reguliert werden. Dies wiederum ist Voraussetzung zur Entschlüsselung der Vorgänge, welche den unterschiedlichen Phänotypen eukaryotischer CLP-Protease Mutanten und der Rolle von CLPP bzw. CLXP im Rahmen von Krankheiten zugrunde liegen. Bis dato ist noch keine Studie publiziert, die das Substratspektrum einer mitochondrialen CLXP-Protease umfassend analysiert hat und es sind auch noch keinerlei *in vivo* Substrate von CLXP-Proteasen in Eukaryoten bekannt.

Ziel des in dieser Dissertation beschriebenen Forschungsprojektes war die Verwendung von *P. anserina* als einfachen eukaryotischen Modellorganismus zur detaillierten Untersuchung der biologischen Bedeutung einer mitochondrialen CLXP-Protease. Dafür sollten zunächst weiterführende phänotypische Charakterisierungen des *PaClpP*-Deletionsstammes sowie eines *PaClpX*-Deletionsstammes und eines *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstammes durchgeführt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob ebenfalls eine funktionelle Homologie zwischen *P. anserina* CLPX und dem CLXP-Homolog des Menschen gegeben und damit eine vollständige Rekonstitution der menschlichen CLXP-Protease in *P. anserina* möglich ist. Dies würde erlauben eine unmittelbare Analyse der menschlichen Protease in diesem einfachen und zugänglichen System durchzuführen.

Problemstellung

Schwerpunkt der Arbeit war die Identifizierung potenzieller Substrate und Interaktionspartner von CLPXP in *P. anserina*. Dafür sollten zunächst die notwendigen Voraussetzungen für die Durchführung eines CLPP „Substrat-trapping Assay“ in diesem Organismus erarbeitet werden. Anschließend sollte diese in Bakterien gut bewährte Methode zur Identifizierung von CLP-Protease Substraten (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006, Bhat et al. 2013, Feng et al. 2013) auf die mitochondriale CLPXP-Protease in *P. anserina* angewandt werden, um damit die notwendige Grundlage für ein tiefergehendes Verständnis ihrer molekularen Funktion und biologischen Rolle *in vivo* zu schaffen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1 | **Verwendete Geräte.**

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	GE 446 EC-1	Getinge
Binokular	GZ6	Leica
Brutschränke	KBW 400 und KBW 720	Binder
Bunsenbrenner	GASI	Schütt
Elektrophorese-Kammern	Mini-Sub® Cell	Bio-Rad
	Wide Mini-Sub® Cell	
	Mini-Protean® II	
	Mini-Protean® Tetra Cell	
	Mini Trans-Blot® Cell	
Elektroporator	EasyjecT Prima	EquiBio
Folienschweißgerät	300 FJR-2	Audion Elektro
Geldokumentationssystem	IP-CF01.SD	Peqlab
	inklusive Digitalkamera und UV-Transilluminator	
	Thermodrucker P93	Mitsubishi
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf
	Dri-Block DB 3	Techne
Homogenisatoren	BeadBeater™	Carl Roth
	Waring Blender	Waring
Hybridisierungsöfen	Hybridization Oven/Shaker	Amersham
Infrarotscanner	Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR
Kühlschrank	profi line (4 – 8 °C)	Liebherr
	Economic-froster (-20 °C)	Bosch
	Ultra Low (-80 °C)	SANYO
Laborabzug	VARIOLAB Mobilien W90	Waldner
Magnet	DynaMag™-2 Magnet	Thermo Fisher Scientific
Magnetrührer	yellow MAG HS 7	yellowline
	MR Hei-Mix S	Heidolph
	MR 3000	
	Ikameg Reo	Ikameg
Mikrowelle	-	Panasonic
Netzgeräte	Power Pack 3000	Bio-Rad
	EV202	Peqlab
	GPS 200/400	GE Healthcare
	EPS200	Pharmacia Biotech
PCR-Geräte	TGradient 96	Biometra
	T1 Thermocycler 96	
pH-Meter	Calimatic 761	Knick
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Pharmacia
Pipetten	1000 µl, 200 µl, 20 µl, 2 µl	Gilson
Röntgenfilm-entwicklungsmaschine	ECOMAX	PROTEC
Rotator	VWR Rotator EU-Stecker	VWR
Schüttler	Rocking Platform	Biometra
	Promax 1020	Heidolph
Spektralphotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	NSF 49; LF 460 EC	Clean Air
Trockenschrank	TKE 117	EHRET
UV-Crosslinker	Stratalinker® UV Crosslinker 1800	Stratagene
Vakuum-Transferapparatur	VacuGene XL Vacuum Blotting System	GE Healthcare

Material und Methoden

Vakuumentrifugen	SpeedVac Plus SC 110A	Savant
Vortex	Vortex-Genie 2 VM-300	Scientific Ind. Neolab
Waagen	PB 303 LC 82 M-power	Mettler Toledo Sartorius
Wasseraufbereitung	Milli-Q Plus	Millipore
Wasserbad	U3 1083	Julabo GFL
Zentrifugen	5415 C mit F-45-18-11 5417 R mit FA-45-24-11 5804 R mit A-4-44 Sorvall RC5B mit Super-Lite gSA SLA-1500 bzw. Sorvall SS34 Sorvall WX 80 mit AH 650	Eppendorf DuPont Thermo Fisher Scientific

3.1.2 Sonstige Materialien

Tabelle 2 | Sonstige verwendete Materialien.

Material	Modell	Hersteller
Beads für Immunpräzipitation	Dynabeads® Protein G for Immunoprecipitation	Thermo Fisher Scientific
Cellophanfolie	-	Bio-Rad
Filterpapier	Whatman® 3MM	GE Healthcare
FLAG-Affinitätsbeads	ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads	Sigma-Aldrich
Glasperlen	0,5 mM	Biospec Products
His-Affinitätsbeads	Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown	Thermo Fisher Scientific
Hybridisierungsmembran	Hybond-N	GE Healthcare
Hybridisierungsröhren	-	GE Healthcare
PVDF-Membran	Millipore Immobilon-P	Carl Roth
Röntgenfilm	Universalfilm Super RX	Fujifilm
Röntgenfilmkassetten	Suprema	Dr. Goos
Strep-Affinitätsbeads	Strep-Tactin Magnetic Beads	QIAGEN
Strep-Affinitätssäulen	Gravity flow Strep-Tactin® Superflow® Columns	IBA

3.1.3 Chemikalien und Stoffe

Tabelle 3 | Verwendete Chemikalien und Stoffe.

Artikel	Hersteller	Artikel	Hersteller
3X FLAG® Peptide	Sigma-Aldrich	Bromphenolblau	SERVA
Acrylamid	Carl Roth	BSA	Sigma-Aldrich
Agar	Thermo Fisher Scientific	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck Millipore
Agarose	Thermo Fisher Scientific	Casaminsäuren	BD
Ameisensäure	Carl Roth	Chloroform	Merck Millipore
Ammoniumacetat	Merck Millipore	Coomassie Blue G250	Carl Roth
Ammoniumchlorid	Merck Millipore	CSPD	Roche
Antifoam	Sigma-Aldrich	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Merck Millipore
APS	Sigma-Aldrich	D(+)-Saccharose	Carl Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Desthiobiotin	Sigma-Aldrich
BCIP®	Sigma-Aldrich	Dextrin (gelb)	Carl Roth
Biomalz	Carl Roth	Digitonin	Sigma-Aldrich
Biotin	SERVA	dNTPs	Thermo Fisher Scientific
Bisacrylamid	Carl Roth	DTT	Thermo Fisher Scientific
BIS-TRIS	Carl Roth	ε-Aminocaprinsäure	Carl Roth
Blockierungsreagenz	Roche	EDTA	Merck Millipore

Essigsäure	Merck Millipore	Na ₂ CO ₃	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck Millipore
Ethidiumbromid	Merck Millipore	NaCl	Carl Roth
FeCl ₂	Merck Millipore	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Merck Millipore
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Merck Millipore	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	Merck Millipore
Formaldehyd	Sigma-Aldrich	NaOH	Merck Millipore
Glucanex	Novo Nordisk Pharma	Natriumacetat	Merck Millipore
Glucose	SERVA	Natriumcitrat	Sigma-Aldrich
Glycerin	Carl Roth	Natriumthiosulfat	Carl Roth
Glycin	Carl Roth	NBT	Sigma-Aldrich
H ₃ BO ₃	Carl Roth	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	Carl Roth
H ₃ PO ₄	Carl Roth	N-Lauroylsarcosin	Merck Millipore
Harnstoff	Merck Millipore	Pefabloc®	Carl Roth
HCl	BD	PEG 4000	SERVA
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich	Phenol	Carl Roth
HEPES	SERVA	Phleomycin	Genaxxon
Heringsperma-DNA	Roche	Protease Inhibitor Cocktail Set IV	Merck Millipore
Hygromycin B	Merck Millipore	Roti®-Nanoquant	Carl Roth
Imidazol	Carl Roth	Saccharose	Carl Roth
Isoamylalkohol	Carl Roth	SDS	SERVA
Isopropanol	Merck Millipore	Silbernitrat	Carl Roth
K ₂ HPO ₄	Carl Roth	Sorbitol	Merck Millipore
KCl	Merck Millipore	Strep-tag® II Peptide	IBA
KH ₂ PO ₄	Merck Millipore	TEMED	Sigma-Aldrich
KOH	Sigma-Aldrich	Thiamin	SERVA
Maismehl	Merck Millipore	Tricin	Carl Roth
Maleinsäure	Carl Roth	TRIS	Thermo Fisher Scientific
Methanol	Thermo Fisher Scientific	Triton X-100	SERVA
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Carl Roth	Trypton	BD
Milchpulver	Merck Millipore	Tween 20	Sigma-Aldrich
MnCl	Merck Millipore	Xylencyanol	SERVA
MnSO ₄ ·2H ₂ O	Merck Millipore	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Merck Millipore

3.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4 | **Verwendete Puffer und Lösungen**

Puffer oder Lösung	Zusammensetzung
Ampicillin-Lösung	50 mg ml ⁻¹ in H ₂ O sterilfiltrieren
Biotin-Stammlösung	50 µg ml ⁻¹ in H ₂ O sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße)
Blasticidin-Lösung	50 mg ml ⁻¹ in H ₂ O sterilfiltrieren
Blotting-Puffer für Western Blot	3 g TRIS 14 g Glycin 200 ml Methanol ad 1 l mit H ₂ O
BNP-Anodenpuffer	25 mM Imidazol pH 7,0 (HCl)
BNP-Kathodenpuffer	50 mM Tricin 7,5 mM Imidazol pH 7,0 (nicht einstellen) 500 mM ε-Aminocaprinsäure
BNP-Ladepuffer	50 mM BIS-TRIS 5 % (w/v) Coomassie Blue G 250 pH 7,0 (HCl) Aliquots bei -20°C lagern

Material und Methoden

BNP-Puffer (3×)	1,5 M ε-Aminocapronsäure 75 mM Imidazol pH 7,0 (HCl)
BNP-Sammelgel (3,5 %ig)	7,385 ml H ₂ O 5 ml 3× BNP-Puffer 1,7 ml 30 % Acrylamid 787,5 µl 2 % Bisacrylamid 11,9 µl TEMED 119 µl 10 %iges APS
BNP-Solubilisierungspuffer	33,33 mM HEPES 166,67 mM Kaliumacetat 11,11 % (v/v) Glycerin pH 7,4 (NaOH)
BNP-Trenngel (13 %ig)	4,94 ml 3× BNP-Puffer 2,96 g 86 % Glycerin 4,28 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 713,6 µl 30 % Acrylamid ad 14,78 ml H ₂ O 4,1 µl TEMED 41 µl 10 %iges APS
BNP-Trenngel (4 %ig)	7 ml H ₂ O 4,94 ml BNP-Puffer 1,92 ml 30 % Acrylamid 889 µl 2 % Bisacrylamid 6,8 µl TEMED 68 µl 10 %iges APS
Chloramphenicol-Lösung	10 mg ml ⁻¹ in Ethanol sterilfiltrieren
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	96 % (v/v) Chloroform 4 % (v/v) Isoamylalkohol
Denaturierungslösung für Southern Blot	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH autoklavieren
DIG-Hybridisierungspuffer („High-SDS“)	7 % (w/v) SDS 5× SSC 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin 2 % (w/v) Blockierungsreagenz 50 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,0)
Digitonin-Lösung (10 %ig)	100 mg ml ⁻¹ Digitonin 15 min bei 99 °C abkühlen lassen, lagern bei 4 °C
DIG-Puffer 1	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5 (NaOH) autoklavieren
DIG-Puffer 2	0,5 % (w/v) Blockierungsreagenz in DIG-Puffer 1 bei 60°C lösen
DIG-Puffer 3	0,1 M TRIS 0,1 M NaCl pH 9,5 (HCl) autoklavieren
DIG-Waschpuffer	0,3 % (v/v) Tween 20 in DIG-Puffer 1
DNA-Ladepuffer (6x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 50 % (w/v) Saccharose 0,1 M EDTA (pH 8,0)
DTT-Lösung (1 M)	1 M DTT in 0,01 M NaAc (pH 5,2) sterilfiltrieren

FLAG-TAP-Bindepuffer	300 mM KCl 20 mM HEPES-KOH (pH 7,4) 10 % (v/v) Glycerin 1 mM EDTA (pH 8,0) 1× Protease Inhibitor Cocktail Set IV
FLAG-TAP-Elutionspuffer	300 mM KCl 20 mM HEPES-KOH (pH 7,4) 10 % (v/v) Glycerin
FLAG-TAP-Waschpuffer	0,01 % (w/v) Digitonin 300 mM KCl 20 mM HEPES-KOH (pH 7,4) 10 % (v/v) Glycerin
Görg-Coomassie-Entfärbelösung	20 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O 25 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure in H ₂ O
Görg-Coomassie-Färbelösung	20 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O 45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,15 % (w/v) Coomassie Blue G250 in H ₂ O
His-Bindepuffer	0,01 % (v/v) Tween 20 300 mM NaCl 20 mM HEPES-KOH (pH 7,4) 20 mM Imidazol (pH 7,4)
His-Elutionspuffer	0,01 % (v/v) Tween 20 300 mM NaCl 20 mM HEPES-KOH (pH 7,4) 300 mM Imidazol (pH 7,4) 0,01 % (v/v) Tween 20
His-TAP-Waschpuffer	300 mM KCl 20 mM HEPES-KOH (pH 7,4) 20 mM Imidazol (pH 7,4) 10 % (v/v) Glycerin
IP-Puffer	150 mM NaCl 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA (pH 8,0)
Isotonischer Mitochondrienpuffer	0,6 M Sorbitol 20 mM HEPES-KOH (pH 7,4) autoklavieren
Laufpuffer (10x) für SDS-PAGE	0,1 % (w/v) SDS 0,25 M TRIS 1,9 M Glycin pH 8,3 (HCl)
Mitochondrien-Isolationspuffer 1	10 mM TRIS 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,33 M Saccharose pH 7,5 (HCl)
NBT/BCIP-Lösung	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid- (NBT) und BCIP®- Fertigtabletten nach Herstellerangaben (Sigma- Aldrich) gelöst
Neutralisierungslösung für Southern Blot	2 M NaCl 1 M TRIS pH 5,5 (HCl)
PBS nach Tropix (10x)	0,68 M NaCl 0,58 M Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 0,17 M NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O

Material und Methoden

PEG-Lösung	60 % (w/v) PEG 4000 50 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O 10 mM TRIS pH 7,5 (HCl) autoklavieren
Phleomycin-Lösung	10 mg ml ⁻¹ in H ₂ O sterilfiltrieren
Polyacrylamid-Sammelgel (5 %ig)	1,24 ml H ₂ O 500 µl 4x Sammelgelpuffer 250 µl 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 1,2 µl TEMED 12 µl 10 %iges APS
Polyacrylamid-Trenngel 12 ml (12 %ig)	5,34 ml H ₂ O 3 ml 4x Trenngel-Puffer 3,6 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 6 µl TEMED 60 µl 10 %iges APS
Proteinextraktionspuffer	50 mM HEPES 100 mM NaCl pH 7,4 (HCl) autoklavieren 1 mM DTT
RNase A-Lösung	11 mg RNase A in 1 ml 0,01 M NaAc (pH 5,2) 15 min aufkochen, auf RT abkühlen lassen + 100 µl 1 M TRIS-HCl (pH 7,4)
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8) 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Ladepuffer (5x)	7,5 g Glycerin 7,5 ml 20 % (w/v) SDS-Lösung 9,375 ml Sammelgelpuffer (4x) 1,5 ml β-Mercaptoethanol ad 25 ml H ₂ O
SOC-Lösung	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl pH 7,0 (NaOH) autoklavieren 20 mM Glucose 20 mM MgCl ₂ -Lösung
Spurenelementlösung	25 mM Citronensäure 17,4 mM ZnSO ₄ ·7H ₂ O 2,5 mM (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O 1 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,3 mM MnSO ₄ ·H ₂ O 0,8 mM H ₃ BO ₃ 0,2 mM NaMoO ₄ ·2H ₂ O autoklavieren
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 (HCl)
Stammlösung 1 (50x für Transformationsmedium)	7,5 % (w/v) KH ₂ PO ₄ 2,5 % (w/v) KCl 2,7 % (w/v) MgSO ₄ ·H ₂ O autoklavieren
Stammlösung 2 (50x für Transformationsmedium)	0,005 % (w/v) ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0,005 % (w/v) FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,005 % (w/v) CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,005 % (w/v) MnSO ₄ ·2H ₂ O autoklavieren

Stammlösung A (100x, für CM-Medium)	0,1 % (w/v) ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0,1 % (w/v) FeCl ₂ 0,1 % (w/v) MnCl in H ₂ O autoklavieren
STC	1 M Sorbitol 10 mM TRIS 50 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O pH 7,5 (1 N HCl)
STET	8% (w/v) Saccharose 10 mM TRIS 50 mM EDTA (pH 8,0) 5% (v/v) Triton X-100 pH 8,0 (HCl) autoklavieren
Strep-Puffer	150 mM NaCl 100 mM TRIS-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)
TAE-Puffer (50× TRIS-Acetat-EDTA)	2 M TRIS 57,1 ml Eisessig/l 50 mM Na ₂ EDTA (pH 8,0) autoklavieren
TENS-Puffer	10 mM TRIS 1 mM EDTA (pH 8,0) 100 mM NaCl 2 % (w/v) SDS pH 8,0 (HCl)
TE-Puffer	10 mM TRIS 1 mM EDTA (pH 8,0) pH 8,0 (HCl) autoklavieren
Thiamin-Stammlösung	25 g Thiamin ad 100 ml H ₂ O sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße)
TPS	20 % (w/v) Saccharose 45 mM KH ₂ PO ₄ 5 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O pH 5,5 (H ₃ PO ₄) autoklavieren
Trenngel-Puffer (4×)	1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8) 0,4 % (w/v) SDS

3.1.5 Anzuchtmedien

Tabelle 5 | **Verwendete Anzuchtmedien.**

Anzuchtmedium	Zusammensetzung
Ammoniumacetat-Medium	60 mM Ammoniumacetat in BMM 2 % (w/v) Agar autoklavieren
BMM (Biomalz-Mais-Medium)	250 g Maismehl in ca. 5 l Wasser lösen über Nacht bei 60 °C quellen lassen filtrieren über Handtuch, danach: 8 g l ⁻¹ Biomalz pH 6,5 (KOH) ad 5 l H ₂ O autoklavieren Festmedium: 2 % (w/v) Agar autoklavieren

Material und Methoden

CM (engl. „complete medium“)	1 g KH_2PO_4 0,5 g KCl 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g Glucose 3,7 g NH_4Cl 2 g Trypton 2 g Hefeextrakt 1 ml Stammlösung A ad 1 l H_2O pH 6,5 (KOH) autoklavieren
LB (engl. „lysogeny broth“)	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,2 (NaOH) Festmedium: 2 % (w/v) Agar autoklavieren nach dem Autoklavieren gegebenenfalls hinzufügen: LBA: $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin LBAB: $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin und $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Blastidicin Medium pH 7,0 LBAC: $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin und $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol LBC: $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol
M2 (Medium 2)	0,25 g KH_2PO_4 0,3 g K_2HPO_4 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g Harnstoff 10 g Dextrin (gelb) 20 g Agar ad 1 l H_2O autoklavieren nach dem Autoklavieren hinzufügen: 50 μl Biotin-Stammlösung 200 μl Thiamin-Stammlösung 100 μl Spurenelementlösung
Transformationsmedium	3,7 g Ammoniumchlorid 2 g Trypton 1 g Casaminosäuren 1 g Hefeextrakt 10 g Glucose 342,3 g Saccharose 20 ml Stammlösung 1 20 ml Stammlösung 2 ad 1 l H_2O pH 7,5 (KOH) Grundmedium: 1,2 % (w/v) Agar Überschichtungsmedium: 0,5 % (w/v) Agar autoklavieren nach dem Autoklavieren gegebenenfalls hinzufügen: $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ Hygromycin oder $6 \mu\text{g ml}^{-1}$ Phleomycin

3.1.6 Stämme

Tabelle 6 | Verwendete Stämme.

Organismus	Stamm und gegebenenfalls Isolat*	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i>	KS272	Chaverroche et al. 2000
	XL1-Blue	Stratagene
<i>Podospora anserina</i> [†]	Wildstamm s	Esser 1974
	F18260 ⁺ und F18261 ⁻	
	$\Delta PaClpP$ F135001 ⁺	Fischer 2011
	$\Delta PaClpP$ F81571 ⁻	K. Luce, Ak Osiewacz
	$\Delta PaClpP/HsClpP_OEx2$ F135420 ⁺ und F135411 ⁻	Fischer 2011
	$\Delta PaClpX$ F143722 ⁺ und F143721 ⁻	Diese Arbeit
	$\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ F156541 ⁺ und F156540 ⁻	Diese Arbeit
	$\Delta PaClpP/PaClpPS^{135A}$ F158570 ⁺ und F158572 ⁻	Diese Arbeit
	$\Delta PaClpP/HsClpPS^{153A}$ F158860 ⁺ und F158861 ⁻	Diese Arbeit
	$\Delta PaClpP/HsClpPTS$ F185381 ⁺ und F185381 ⁻	Diese Arbeit
	$\Delta PaClpP/HsClpPS^{153A-TS}$ F201540 ⁻ und F201541 ⁻	Diese Arbeit
	$\Delta PaClpP/HsClpPL^{3F6H}$ F185560 ⁺ und F185561 ⁻	Diese Arbeit
	$\Delta PaClpP/HsClpPS^{153A-L3F6H}$ F201371 ⁺ und F201370 ⁻	Diese Arbeit

*Für die verwendeten *P. anserina*-Stämme sind immer spezifische homokaryotische Isolate unter Angabe ihrer Identifikationsnummer und ihres Kreuzungstyps („+“ oder „-“) gelistet.

[†]Spezifische homokaryotische Isolate einiger *P. anserina*-Stämme standen zu Beginn dieser Doktorarbeit bereits zur Verfügung. Diese dienten etwa als Ausgangspunkt für die Erzeugung neuer Stämme oder wurden in verschiedenen Experimenten als Kontrollen eingesetzt. Von den in dieser Doktorarbeit neu hergestellten Stämmen sind hier nur solche aufgeführt, deren spezifische homokaryotische Isolate tatsächlich für weiterführende Experimente eingesetzt und in die Stammsammlung des Arbeitskreises überführt wurden.

3.1.7 Plasmide und Cosmide

Tabelle 7 | Verwendete Plasmide, die zu Beginn dieser Doktorarbeit bereits vorhanden waren.

Plasmid	Eigenschaften/Verwendung	Quelle/Referenz
pAN7-1	Vermittelt Hygromycin-Resistenz Positivkontrolle für Transformation von <i>P. anserina</i>	Punt et al. 1987
pClpXKO1	<i>PaClpX</i> -Deletionsplasmid Herstellung der <i>PaClpX</i> -Deletionscosmide	Fischer 2011
pExMtterhph	Konstruktion verschiedener Plasmide	A. Hamann, Ak Osiewacz
phph-1	Negativkontrolle für Transformation von <i>P. anserina</i>	Roche
pHsClpPEX1	<i>HsClpP</i> -Überexpressionsplasmid Konstruktion verschiedener Plasmide Herstellung von <i>HsClpP</i> -spezifischer Hybridisierungssonde	Fischer 2011
pKO4	Vermittelt Phleomycin-Resistenz Positivkontrolle für Transformation von <i>P. anserina</i> Herstellung von <i>ble</i> -spezifischer Hybridisierungssonde	Grief 2007
pKO7	Konstruktion verschiedener Plasmide	Kunstmann und Osiewacz 2009
pPaClpPEX2	<i>PaClpP</i> -Expressionsplasmid Konstruktion verschiedener Plasmide Herstellung von <i>PaClpP</i> -spezifischer Hybridisierungssonde	K. Luce, Ak Osiewacz
pHsClpX (SC115941)	Enthält ORF der menschlichen <i>ClpX</i> -cDNA Konstruktion pHsClpXEx1	OriGene
pSM4	Herstellung von <i>hph</i> -spezifischer Hybridisierungssonde	Scheckhuber et al. 2009

Material und Methoden

Tabelle 8 | **Verwendete Plasmide, die in dieser Doktorarbeit neu hergestellt wurden.**

Plasmid	Eigenschaften/Verwendung
pHsClpXEx1	<i>HsClpX</i> -Überexpressionsplasmid Komplementation des <i>PaClpX</i> -Deletionsstammes Herstellung von <i>HsClpX</i> -spezifischer Hybridisierungssonde
pPaClpP ^{S135A} Ex1	Expressionsplasmid für katalytisch inaktive PaCLPP-Variante
pHsClpP ^{S153A} Ex1	Überexpressionsplasmid für katalytisch inaktive HsCLPP-Variante
pPaClpP ^{6HTS} Ex1	Expressionsplasmid für rekombinante, aktive PaCLPP-Variante mit C-terminalen 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker
pPaClpP ^{S135A-6HTS} Ex1	Expressionsplasmid für rekombinante, inaktive PaCLPP-Variante mit C-terminalen 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker
pHsClpP ^{6HTS} Ex1	Überexpressionsplasmid für rekombinante, aktive HsCLPP-Variante mit C-terminalen 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker
pHsClpP ^{S153A-6HTS} Ex1	Überexpressionsplasmid für rekombinante, inaktive HsCLPP-Variante mit C-terminalen 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker
pHsClpP ^{TS} Ex1	Überexpressionsplasmid für rekombinante, aktive HsCLPP-Variante mit C-terminalen Twin-Strep-tag®
pHsClpP ^{ΔC-TS} Ex1	Überexpressionsplasmid für rekombinante, aktive HsCLPP-Variante mit verkürztem C-Terminus und C-terminalen Twin-Strep-tag®
pHsClpP ^{S153A-TS} Ex1	Überexpressionsplasmid für rekombinante, inaktive HsCLPP-Variante mit C-terminalen Twin-Strep-tag®
pHsClpP ^{3F6H} Ex1	Überexpressionsplasmid für rekombinante, aktive HsCLPP-Variante mit C-terminalen 3xFLAG-6xHis-Marker
pHsClpP ^{L3F6H} Ex1	Überexpressionsplasmid für rekombinante, aktive HsCLPP-Variante mit C-terminalen 3xFLAG-6xHis-Marker inkl. (GGGGS) ₂ -Linker
pHsClpP ^{S153A-L3F6H} Ex1	Überexpressionsplasmid für rekombinante, inaktive HsCLPP-Variante mit C-terminalen 3xFLAG-6xHis-Marker inkl. (GGGGS) ₂ -Linker

Tabelle 9 | **Verwendete Cosmide.**

Cosmid	Eigenschaften/Verwendung	Quelle/Referenz
4G8	Enthält <i>PaClpX</i> -Gen im genomischen Kontext Herstellung von <i>PaClpX</i> -spezifischer Hybridisierungssonde	Osiewacz 1994
Δ4G8-9	<i>PaClpX</i> -Gen ist gegen Phleomycin-Resistenzkassette ausgetauscht Eingesetzt für <i>PaClpX</i> -Deletion in <i>P. anserina</i>	Diese Arbeit
Δ4G8-10	<i>PaClpX</i> -Gen ist gegen Phleomycin-Resistenzkassette ausgetauscht Eingesetzt für <i>PaClpX</i> -Deletion in <i>P. anserina</i>	Diese Arbeit

3.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 10 | **Verwendete Oligonukleotide.**

Oligonukleotid	Basensequenz (5'→3')*	Verwendung
HsClpP_for	ATGTGGCCCGAATATTG	Herstellung <i>HsClpP</i> -Sonde
HsClpP_rev	GCGAGTAGATGTCATAGG	
HsClpX_for	CTGCAAAGAGCTCCTCTTAG	Herstellung <i>HsClpX</i> -Sonde
HsClpX_rev	ACGGGTGGATGATACAAAGG	
PaClpX_for	TTTGAGCGCACAGGTTAC	Herstellung <i>PaClpX</i> -Sonde
PaClpX_rev	CGTCGAGGACAATGATTC	
HsClpX-BamHI_for	TATAATAAGGATCCATGCCAGCTGCGGTG	Konstruktion pHsClpXEx1
HsClpX-XbaI_rev	CGGTCTAGATTAGCTGTTTGACAGCATC	
PaClpP-HindIII_for	GTAAGCTTTGTGTATCGCCCGTCCC	
PaClpP-KpnI_rev	CCGGTACCTTTATTGGTCCAGCAGC	
PaClpP-S135A_for	P-ATGGCGGCTATTCTCCTG	Konstruktion pPaClpP ^{S135A} Ex1
PaClpP-S135A_rev	P-GGCTGCGGCGCCACCAACGCAC	
HsClpP-BamHI_for	TAGGATCCATGTGGCCCGGAATATTG	Konstruktion pHsClpP ^{S153A} Ex1
HsClpP-S153A_rev	P-GGCGGCGCCTGGCCACGCA	
HsClpP-XbaI_rev	ATTCTAGATCAGGTGCTAGCTGGGAC	
HsClpP-S153A_for	P-ATGGGCTCCCTGCTTCTC	Konstruktion diverse Plasmide mit <i>HsClpP^{S153A}</i>

PaClpP-6HTS_for	P-GCCTACACCAGCTGGAGCCACCCCCAGTTCG AGAAGTAAGGCGTTCTAGTTGTACGAAGG	Konstruktion pPaClpP ^{6HTS} Ex1 und pPaClpP ^{S135A-6HTS} Ex1
PaClpP-6HTS_rev	P-GCCCTGGAAGTAGAGGTTCTCGCCGCCGTGA TGGTGATGGTGATGGCTGCGATGCTTCCC	
PaClpP-Bsp119I_for PaClpP-KpnI_rev2	GGCTTCGAAAAGTACGACATGC TGGGTACCTTTCATTGGTCCAG	Konstruktion diverse Plasmide mit <i>HsClpP</i> Affinitätsmarker
HsClpP-NotI_for TPaMT1-HindIII_rev	CAGCGGCCGCCGACGCGG CGCCAAGCTTACATTTGATCC	
HsClpP-6HTS_for	P-GCCTACACCAGCTGGAGCCACCCCCAGTTCGA GAAGTGATCTAGAGTTATCCCTACTC	Konstruktion pHsClpP ^{6HTS} Ex1 und pHsClpP ^{S153A-6HTS} Ex1
HsClpP-6HTS_rev	P-GCCCTGGAAGTAGAGGTTCTCGCCGCCGTGAT GGTGATGGTGATGGCTGCGGGTGCTAGC	
HsClpP-TS_for	P-GGCAGCGGCGGCAGCGCCTGGAGCCACCCCCA GTTTCGAGAAGTAATCTAGAGTTATCCC	Konstruktion pHsClpP ^{TS} Ex1 und pHsClpP ^{ΔC-TS} Ex1
HsClpP-TS_rev	P-GCCGCCGCTGCCGCCCTTCTCGAACTGGGG GTGGCTCCAGGCGCTGGTCTAGCTGG	Konstruktion pHsClpP ^{TS} Ex1
HsClpP-ΔC-TS_rev	P-GCCGCCGCTGCCGCCCTTCTCGAACTGGGG GTGGCTCCAGGCGCTGGTCCGGTGAC	Konstruktion pHsClpP ^{ΔC-TS} Ex1
HsClpP-3F6H_for	P-GACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGA CAAGCACCACCACCACCACCTAATCT	Konstruktion pHsClpP ^{L3F6H} Ex1 und pHsClpP ^{3F6H} Ex1
HsClpP-L3F6H_rev	P-CTTGATGTCGCCGTCGTGGTCTTGTAGTCGCTG CCGCCGCCGCTGCCGCCGCC	Konstruktion pHsClpP ^{L3F6H} Ex1
HsClpP-3F6H_rev	P-CTTGATGTCGCCGTCGTGGTCTTGTAGTCGCTG CCGGTGCTAGCTGGGACAGG	Konstruktion pHsClpP ^{3F6H} Ex1
TPaMT1_rev	ACCCTAACCGACTAACAGAC	Konstruktion pHsClpP ^{S153A-TS} Ex1 und pHsClpP ^{S153A-L3F6H} Ex1

*Ist der Sequenz des Oligonukleotids ein „P-“ vorangestellt, so bedeutet dies, dass es an seinem 5'-Ende phosphoryliert war und das entsprechende PCR-Amplifikat demnach für eine Ligation mit glatten Enden eingesetzt werden konnte

3.1.9 Enzyme

Tabelle 11 | **Verwendete Enzyme.**

Enzym	Hersteller
Klenow-Enzym	Thermo Fisher Scientific
Lysozym	Merck Millipore
Phusion-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Restriktionsendonukleasen: BamHI, Bsp119I, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, MnlI, NotI, PvuI, PvuII, XbaI, XhoI	Thermo Fisher Scientific
RNase A	Roche
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
Taq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific

3.1.10 Kits

Tabelle 12 | **Verwendete Kits.**

Bezeichnung des Kits	Hersteller
DIG-DNA labeling and detection kit	Roche
Dynabeads® Protein G Immunoprecipitation Kit	Thermo Fisher Scientific
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN

3.1.11 Antikörper

Tabelle 13 | **Verwendete Primärantikörper.**

Antikörper gegen	Verdünnung oder Konzentration	Hersteller	Katalognummer
3xFLAG-Marker	1 µg ml ⁻¹	Sigma-Aldrich	F1804
6xHis-Marker	1:1.000	Abcam	ab9136
Digoxigenin	1:10.000	Roche	11093274910
<i>H. sapiens</i> CLPP	1 µg ml ⁻¹	Abcam	ab56455
	1:1.000	Abcam	ab124822

Material und Methoden

	1 µg ml ⁻¹	Santa Cruz Biotechnology	sc-47845
	1 µg ml ⁻¹	Santa Cruz Biotechnology	sc-47846
<i>H. sapiens</i> CLPX	1:250	Abcam	ab122644
<i>P. anserina</i> CLPP	1:400	New England Peptide	-
<i>P. anserina</i> Porin	1:5.000	New England Peptide	-
Strep-tag II-Marker	1 µg ml ⁻¹	Abcam	ab76949

Tabelle 14 | **Verwendete Sekundärantikörper von LI-COR.**

Bezeichnung	Verdünnung	Katalognummer
IRDye® 680LT Goat anti-Rabbit	1:20.000	926-68021
IRDye® 680RD Goat anti-Mouse	1:15.000	926-68070
IRDye® 800CW Donkey anti-Goat	1:15.000	925-32214
IRDye® 800CW Goat anti-Mouse	1:15.000	926-32210
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit	1:15.000	926-32211

3.1.12 Größenstandards

Tabelle 15 | **Verwendete Größenstandards.**

Größenstandard	Verwendung	Hersteller
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus	DNA-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific
Lambda DNA/HindIII Marker	DNA-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific
DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled	DNA-Größenstandard	Roche
NativeMark™ Unstained Protein Standard	Protein-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Protein-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific

3.1.13 Computerprogramme

Tabelle 16 | **Verwendete Computerprogramme.**

Programm	Verwendung	Hersteller
Adobe Photoshop und Illustrator CS3	Bildbearbeitung	Adobe Systems
Clone Manager Professional 8	<i>in silico</i> DNA-Analysen	Sci-Ed Software
Microsoft Office 2010	Bildbearbeitung, Tabellenkalkulation	Microsoft
Quantity One® 1-D Analysis Software	Analyse von DNA-Gelen	Bio-Rad
R	Datenanalyse	The R Foundation
RStudio Desktop	Datenanalyse	RStudio

3.2 Methoden

3.2.1 *Escherichia coli*-spezifische Methoden

Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte entweder in LB-Flüssigmedium unter Schütteln oder auf LB-Festmedium mit 2 % (w/v) Agar, jeweils bei 30 °C (Stamm KS272) oder 37 °C (Stamm XL1-Blue). Gegebenenfalls wurde dem Medium als Selektionsmarker ein Antibiotikum in definierter Konzentration zugegeben. Für die langfristige Lagerung ausgewählter *E. coli*-Kulturen bei -80 °C wurden diese mit 15 % (v/v) Glycerin versetzt.

Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Pro Transformationsansatz wurde ein 50 µl Aliquot elektrokompetenter Zellen des Stammes KS272 auf Eis aufgetaut und mit 1 µg des zu transformierenden, zweifach dialysierten DNA-Fragments vermischt. Die Ansätze wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in eisgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Für die Elektroporation wurde eine Spannung von 2.500 V angelegt und danach sofort 1 ml SOC-Lösung je Transformationsansatz zugegeben. Danach wurden die Transformationsansätze in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und im Heizblock für 1 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurden verschiedene Verdünnungen der Transformationsansätze auf LB-Festmedium mit geeigneten Selektionsmarkern ausplattiert und für 1 – 2 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

Transformation Hitzeschock-kompetenter *E. coli*-Zellen

Pro Transformationsansatz wurde ein 300 µl Aliquot Hitzeschock-kompetenter Zellen des Stammes XL1-Blue auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA eines Ansatzes wurde mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und vorsichtig mit einer Portion der aufgetauten Zellen vermischt. Die Transformationsansätze wurden für 40 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 3 min bei 42 °C im Wasserbad oder im Heizblock. Danach wurde sofort 1 ml LB-Medium je Transformationsansatz hinzugegeben und die Ansätze im Heizblock für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurden verschiedene Verdünnungen der Transformationsansätze auf Platten mit geeigneten Selektionsmarkern ausplattiert und für 1 – 2 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.2 *Podospora anserina*-spezifische Methoden

Anzucht von *P. anserina*

Allgemein erfolgte die Anzucht der verschiedenen *P. anserina*-Stämme entweder auf BMM- oder M2-Festmedium mit 2 % (v/v) Agar und gegebenenfalls verschiedenen Selektionsmarkern oder anderen Zusätzen. Als „Standardbedingung“ ist in dieser Arbeit die Anzucht bei 27 °C und Dauerlicht definiert. Zusätzlich erfolgte die Anzucht bei einigen Experimenten bei 37 °C bzw. im Dunklen. Zur Gewinnung größerer Myzelmengen, etwa für die Isolation von Mitochondrien,

Material und Methoden

wurde die Anzucht in Weithalskolben mit CM-Flüssigmedium bei Standardbedingungen unter Schütteln durchgeführt. Details sind der Beschreibung der jeweiligen Methode zu entnehmen.

Protoplastierung von Myzel

Um die effiziente Aufnahme von Fremd-DNA in *P. anserina* zu ermöglichen, muss zunächst die Zellwand des Pilzes entfernt werden, um transformierbare Protoplasten zu erhalten. Dies erfolgte in dieser Arbeit durch eine Behandlung des entsprechenden Myzels mit dem Glucanase-Enzymgemisch Glucanex. Da bei dieser Art der Protoplastierung die Zellwand meist nicht restlos entfernt wird, handelt es sich bei den so gewonnenen Zellen streng genommen um Sphäroplasten.

Zur Transformation des gewünschten Pilzstammes wurde 6 – 8 BMM-Platten (ohne Cellophan) mit je etwa 30 Myzelstückchen dieses Stammes angeimpft und für 2 – 3 Tage bei Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Myzel je einer Platte in einen Weithalskolben mit CM-Flüssigmedium überführt und für weitere drei Tage bei Standardbedingungen unter Schütteln angezogen. Nach erfolgter Anzucht wurde das gesamte Myzel über zwei Lagen Mull abfiltriert, mit TPS-Puffer gespült und sein Feuchtgewicht bestimmt. Pro g Myzel wurden 5 ml Glucanexsuspension (20 mg ml⁻¹ Glucanex in TPS) hergestellt. Für eine Protoplastierung wurden maximal 20 g Myzel verwendet und mit der Glucanexsuspension auf ein Gesamtvolumen von 100 ml eingestellt.

Das Myzel-Glucanex-Gemisch wurde im „Waring-Blendor“ (Waring) für je 2 × 5 s auf niedriger und anschließend auf hoher Stufe zerkleinert, in einen sterilen Weithalskolben überführt und für 1,5 h bei 35 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Der Fortschritt der Protoplastierung wurde nach etwa einer Stunde durch eine mikroskopische Kontrolle überprüft. Nach erfolgter Inkubation wurde das Myzel-Glucanex-Gemisch über zwei Lagen Mull und anschließend durch einen Glaswolltrichter filtriert. Die erhaltene Lösung wurde auf mehrere Falcon-Gefäße verteilt und für 10 min bei 4.000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden in insgesamt 1 ml TPS resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Das Abstoppen der Protoplastierung erfolgte durch mehrere Waschschrte. Dazu wurden die in TPS gelösten Protoplasten noch insgesamt viermal für 10 min bei 4.000 rpm und RT zentrifugiert und das Protoplastenpellet jedes Mal erneut in 1 ml TPS rückgelöst. Abschließend wurde eine 1:100 Verdünnung der Protoplasten-Lösung hergestellt und ihre Anzahl der mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Protoplasten wurden entweder direkt für eine Transformation eingesetzt werden oder aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Transformation von Protoplasten

Pro Transformationsansatz wurden 1×10^7 Protoplasten in 200 μl STC aufgenommen und auf Eis gehalten. Jeweils 10 μg der zu transformierenden DNA eines Ansatzes wurde mit Millipore- H_2O auf ein Gesamtvolumen von 40 μl aufgefüllt. Als Positivkontrolle dienten entweder 10 μg des Plasmids pAN7-1 (vermittelt Hygromycin-Resistenz) oder 10 μg des Plasmids pKO4 (vermittelt Phleomycin-Resistenz). Als Negativkontrolle wurden immer 10 μg des Plasmids phph-1 (vermittelt keine Resistenz) verwendet. Zur Überprüfung der Regenerationsfähigkeit der Protoplasten wurde bei jeder Transformation noch ein Kontrollansatz mit 40 μl Millipore- H_2O ohne DNA mitgeführt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Schritte auf Eis ausgeführt. Die DNA bzw. das Wasser wurden zu je einem Aliquot Protoplasten in STC gegeben und die Transformationsansätze für 30 min inkubiert. Danach wurden 50 μl PEG zu jedem Ansatz gegeben und diese für weitere 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in Polypropylen-Röhrchen überführt und jeweils insgesamt 2 ml PEG in drei Schritten à $\sim 666 \mu\text{l}$ zugegeben und vorsichtig gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 min und eine abschließende Inkubation für 10 min bei RT. Am Ende wurden zu jedem Ansatz 4 ml STC zugegeben und vorsichtig gemischt.

Danach erfolgte das Ausplattieren der Transformationsansätze. Bis auf die Regenerationskontrolle wurden alle Ansätze in Portionen à 800 μl zu je 4 ml Überschichtungsmedium mit Hygromycin bzw. Phleomycin gegeben und auf Platten mit Hygromycin bzw. Phleomycin ausplattiert. Von der Regenerationskontrolle wurden zwei Verdünnungsreihen (10^{-1} bis 10^{-6}) in STC oder Wasser angelegt und jeweils 1 ml jeder Verdünnungsstufe in 4 ml Überschichtungsmedium ohne Selektionsmarker auf Platten ohne Selektionsmarker ausplattiert.

Die Auswertung der Regenerationskontrolle erfolgte nach Inkubation für 4 Tage bei Standardbedingungen, wodurch die Regenerationsrate der Protoplasten (d. h. der prozentuale Anteil der Protoplasten, welche nach der Transformation grundsätzlich noch über die Fähigkeit verfügen Myzel zu bilden) ermittelt wurde. Die eigentlichen Transformationsansätze (d. h. abgesehen von Positiv- und Negativkontrolle) wurden mindestens 12 – 14 Tage inkubiert und gewachsene Transformanten zur Sicherung und Verifizierung ihrer Resistenz BMM-Platten \pm Selektionsmarker überimpft.

Isolation von Sporen

Zur Sporenisolation wurden i. d. R. zwei monokaryotische Individuen gegensätzlichen Kreuzungstyps miteinander gekreuzt. Dazu wurde je ein Myzelstückchen zweier Isolate des gewünschten Genotyps (identisch oder unterschiedlich) im Abstand von etwa 5 cm voneinander auf einer M2-Platte angeimpft und diese unter Standardbedingungen inkubiert.

Material und Methoden

Nach etwa 8 – 10 Tagen hatten sich die Myzelien der beiden Isolate getroffen und in der Kontaktzone Perithezien ausgebildet. Diese Fruchtkörper enthalten größtenteils Asci mit je vier dikaryotischen Sporen. Gelegentlich werden durch eine Störung des an der Kernteilung beteiligten Spindelapparates jedoch anstelle einer dikaryotischen Spore zwei monokaryotische Sporen gebildet. Diese monokaryotischen Sporen lassen sich aufgrund ihrer geringeren Größe optisch gut von den normalen dikaryotischen Sporen unterscheiden. Für die meisten Experimente, etwa die Bestimmung der Wachsrates und Lebensspanne eines Stammes, wird aufgrund ihres eindeutig definierten Genotyps bevorzugt mit monokaryotischen Sporen bzw. den aus ihnen erwachsenden homokaryotischen Isolaten gearbeitet. In dieser Arbeit wurden lediglich für die Erzeugung einer *PaClpP-PaClpX*-Doppelmutante dikaryotische Sporen isoliert (siehe Abschnitt 4.1.2).

Demnach wurde bei der Isolation von Sporen meist nach Asci gesucht, welche anstelle der normalerweise vier Sporen tatsächlich fünf oder mehr enthielten. Das Auskeimen der Sporen erfolgte in jedem Falle auf BMM-Platten mit 60 mM Ammoniumacetat und durch Inkubation für zwei Tage bei 27 °C im Dunklen. Die gewachsenen Myzelien der ausgekeimten Sporen wurden entweder sofort für entsprechende Experimente verwendet oder bei 4 °C im Kühlraum bis zur weiteren Verwendung gelagert. Durch Testkreuzungen mit einem monokaryotischen Wildstammisolat bekannten Kreuzungstyps wurde der Kreuzungstyp der gewonnenen Isolate bestimmt und gleichzeitig verifiziert, dass die vermutlich von kleinen Sporen abstammenden Isolate tatsächlich homokaryotisch waren.

Bestimmung der Wachsrates und Lebensspanne unter Standardbedingungen

Für die Bestimmung der Wachsrates und Lebensspannen der untersuchten Stämme wurden ausschließlich ihre zwei Tage ausgekeimten, monokaryotischen Isolate verwendet. Dazu wurde je individuellem monokaryotischen Isolat ein mit 50 ml M2-Medium befülltes „Rennrohr“ (hohles und an beiden Enden ungefähr im 45° Winkel abgeknicktes Glasrohr) mit einem Myzelstückchen dieses Isolats angeimpft und unter Standardbedingungen inkubiert.

Das Wachstum der Myzelien in den Rennrohren wurde täglich markiert. War bei einem Isolat ein deutlicher Einbruch seines Wachstums sowie eine sichtbare Pigmentierung seiner Wuchsfront zu verzeichnen, wurde es als tot bewertet. Somit entspricht die Lebensspanne eines Isolats der Dauer des konstanten Wachstums seines Myzels in Tagen. Seine Wachsrates in cm pro Tag wurde durch Messung der täglichen Wuchsstrecke seines Myzels innerhalb eines Zeitraums mit konstantem Wachstum bestimmt.

Bestimmung der Wachsrates unter Stressbedingungen

Um die Anfälligkeit von $\Delta PaClpP$ für verschiedene oxidative Stressoren und Dithiothreitol (DTT) zu bestimmen, wurden ebenfalls ausschließlich zwei Tage ausgekeimte, monokaryotische

Isolate verwendet. Myzelstückchen dieser Isolate wurden, zusammen mit solchen von entsprechenden Isolaten des Wildstammes als Kontrolle, auf Platten mit 30 ml M2-Medium gesetzt. Das verwendete M2-Medium enthielt dabei unterschiedliche Konzentrationen Paraquat (0, 20, 80 oder 150 μM), CuSO_4 (0, 100, 200 oder 400 μM), H_2O_2 (0, 0,04, 0,06 oder 0,1 %) oder DTT (0, 0,5, 5 oder 10 mM). Platten die M2-Medium mit H_2O_2 enthielten wurden bei 27 °C im Dunklen (da Wasserstoffperoxid stark lichtempfindlich ist) und alle anderen Platten unter Standardbedingungen inkubiert. Das Wachstum der Myzelien wurde für vier Tage markiert und dadurch die Wachsraten der Isolate in cm pro Tag bestimmt.

Bestimmung der Fertilität

Zur Bestimmung der weiblichen Fertilität unter Standardbedingungen wurden erneut zwei Tage ausgekeimte, monokaryotische Isolate von $\Delta PaClpP$ und des Wildstammes verwendet. Je ein Myzelstückchen eines Isolats wurde in die Mitte einer Platte mit 30 ml M2-Medium gesetzt und für 13 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Um die weibliche Fertilität bei Hitzestress zu bestimmen, erfolgte die Anzucht der Isolate für acht Tage bei 27 °C und dann für weitere fünf Tage bei 37 °C.

Nach 13 Tagen erfolgte die Spermatisierung aller Isolate mit Spermastien von Wildstammisolaten gegensätzlichen Kreuzungstyps. Zur Gewinnung dieser Spermastien wurden ebenfalls 13 Tage unter Standardbedingungen auf M2-Platten gewachsene Myzelien verwendet. Diese wurden jeweils mit 5 ml sterilem Millipore- H_2O überschichtet. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde das Millipore- H_2O , welches nun die Spermastien des jeweiligen Wildstammisolats enthielt, abgenommen und in sterile Falcon-Gefäße überführt.

Auf das Myzel jedes zu spermatisierenden Isolats wurde je $3 \times 300 \mu\text{l}$ der Spermastienlösung eines Wildstammisolats mit gegensätzlichem Kreuzungstyp pipettiert, diese für 5 min bei RT einwirken lassen und anschließend wieder abgenommen. Danach wurden alle spermatisierten Isolate für weitere drei Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Abschließend die durchschnittlich gewachsene Anzahl von Perithezien je Isolat pro $300 \mu\text{l}$ Spermastienlösung bestimmt. Als Maß für die weibliche Fertilität eines Stammes nach Anzucht unter Standardbedingungen oder Hitzestress wurde die mittlere Perithezienanzahl pro $300 \mu\text{l}$ Spermastienlösung aller Isolate dieses Stammes bei 27 °C oder 37 °C ermittelt. Die weibliche Fertilität des Wildstammes bei 27 °C oder 37 °C wurde gleich 100 % gesetzt.

3.2.3 DNA-spezifische Methoden

Isolation von Plasmiden und Cosmiden aus *E. coli*

Um Plasmid- oder Cosmid-DNA von hoher Reinheit und Konzentration aus *E. coli*-Kulturen zu isolieren, wurde das „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ (QIAGEN) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei erfolgte die Anzucht der Vor- und Hauptkulturen für die Isolation von Plasmid-DNA bei

Material und Methoden

37 °C, Dauerlicht und 180 rpm. Zur Erhöhung der Ausbeute bei der Isolation von Cosmid-DNA wurde die Anzucht bei 30 °C, Dauerlicht und 250 – 300 rpm durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in 50 – 100 µl Millipore-H₂O aufgenommen.

Zur schnellen Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen für Restriktionsanalysen, etwa um den Erfolg einer Transformation von *E. coli* mit einem durch Ligation neu hergestellten Plasmid zu überprüfen, wurde die STET-Minipräp Methode angewandt.

Dafür wurde je Ansatz 5 ml LB-Medium, welches einen geeigneten Selektionsmarker enthielt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C, Dauerlicht und 180 rpm inkubiert. Die gewachsenen Zellen wurden für 10 min bei 3.500 rpm und RT abzentrifugiert. Die resultierenden Zellpellets wurden vollständig in je 150 µl STET rückgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 12 µl Lysozym je Ansatz (frisch angesetzt, 10 mg ml⁻¹ in H₂O), wobei kurz gemischt wird (Vortex). Anschließend wurden die Reaktionsgefäße sofort für 60 – 90 s im Heizblock inkubiert und dann für 10 min bei 15.000 rpm und RT zentrifugiert. Die dadurch pelletierten Zelltrümmer und sonstige unlösliche Bestandteile wurden entfernt. Zu den Überständen wurden zur Fällung der DNA 150 µl Isopropanol (µl -20 °C) gegeben und die Ansätze für 5 min bei -80 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets mit 150 µl 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen und für 5 min bei 15.000 rpm und 4 °C erneut zentrifugiert. Nachdem abermals die Überstände entfernt wurden erfolgte die Trocknung der Pellets unter Vakuum. Ihre Rücklösung erfolgte in je 50 µl Millipore-H₂O mit 0,2 mg ml⁻¹ RNase A durch Inkubation für 15 – 30 min im Heizblock bei 37 °C unter Schütteln.

Isolation von genomischer DNA aus *P. anserina*

Von jedem eingesetzten *P. anserina*-Isolat wurden etwa 30 Myzelstückchen auf einer BMM-Platte mit Cellophan verteilt und diese unter Standardbedingungen für 2 – 3 Tage inkubiert. Das Myzel je einer Platte wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml frisch angesetztem TENS-Puffer versetzt. Die Isolation genomischer DNA (gDNA) wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion nach dem Protokoll von Lecellier und Silar (1994) durchgeführt. Die so erhaltene DNA wurde je Ansatz abschließend in 25 – 50 µl Millipore-H₂O rückgelöst.

Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA wurden die beiden Elektrophorese-Systeme „Mini-Sub® Cell“ und „Wide Mini-Sub® Cell“ (Bio-Rad) nach Herstellerangaben eingesetzt. Dafür wurden die aufzutrennenden DNA-Proben mit je einem Fünftel ihres Volumens 6× DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem geeigneten Größenstandard auf, je nach erwarteter Größe der zu untersuchenden oder zu präparierenden DNA-Fragmente, auf 0,8 – 1,5 %ige TAE-

Agarosegele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 1× TAE-Laufpuffer bei 80 – 100 V für 1 – 1,5 h. Zur Sichtbarmachung der aufgetrennten DNA wurden die TAE-Agarosegele nach dem Lauf für 10 – 20 min in einem Ethidiumbromidbad ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) inkubiert. Das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurde in einem Transilluminator unter UV-Licht detektiert und die Gelbilder digital abgespeichert.

Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder sonstiger DNA-Fragmente wurde das „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“-Kit (MACHERY-NAGEL) nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der DNA erfolgte in 15 – 50 μl Elutionspuffer oder Millipore- H_2O .

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Oligonukleotiden, DNA-Fragmenten, Plasmid- und Cosmid-DNA wurde i. d. R. mit dem „NanoDrop 1000“-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben bestimmt. Für die Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden wurde die Extinktion bei 260 nm (E_{260}) gemessen und in folgende Gleichung eingesetzt:

$$c \text{ in mol} \times l^{-1} = \frac{E_{260}}{\varepsilon}$$

Dabei ist ε der molare, dekadische Extinktionskoeffizient, der sich wie folgt errechnet:

$$\varepsilon = A \times 16.000 + T \times 9.600 + G \times 12.000 + C \times 7.000$$

Mit A, T, G und C entsprechend der Anzahl der jeweiligen Nukleotide im Oligonukleotid.

Für die Konzentrationsbestimmung von aus *P. anserina* isolierter gDNA wurde von dieser je Ansatz 1 μl auf einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich wurden 250 ng des λ -HindIII-Markers auf das Gel mit aufgetragen. Nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid wurden die Intensitäten der Markerbanden bekannter DNA-Mengen mit Hilfe des Programms „Quantity One 1-D Analysis Software“ (Bio-Rad) mit den Intensitäten der gDNA-Banden verglichen und dadurch die Konzentration der eingesetzten genomischen DNA bestimmt.

Amplifikation von DNA

Die schnelle und selektive Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mittels der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (engl. „polymerase chain reaction“, PCR) durchgeführt. Dafür wurde entweder die *Taq*- oder die Phusion-DNA-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 25 – 50 μl in einem Thermozykler nach Herstellerangaben eingesetzt. Die *Taq*-DNA-Polymerase wurde für analytische Experimente eingesetzt und die Phusion-DNA-Polymerase zur Amplifikation von Fragmenten für die Vektorkonstruktion. Typische Reaktionsansätze sind Tabelle 17 und das typische Reaktionsprofil Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 17 | **Typischer Reaktionsansatz einer PCR mit der Taq- oder Phusion-DNA-Polymerase**

Komponente	Taq-DNA-Polymerase	Phusion-DNA-Polymerase
	Konzentration/Menge	Konzentration
10× Taq-Puffer / 5× Phusion-HF-Puffer	1×	1×
50 mM MgCl ₂	1,5 mM	-
10 mM dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
Oligonukleotid 1	12,5 pmol	25 pmol
Oligonukleotid 2	12,5 pmol	25 pmol
Matrize	100 ng gDNA bzw. 5 ng Plasmid oder Cosmid	5 ng Plasmid oder Cosmid
DNA-Polymerase	0,05 U µl ⁻¹	0,02 U µl ⁻¹
H ₂ O	ad 25 µl	ad 50 µl

Tabelle 18 | **Typisches Reaktionsprofil einer PCR mit der Taq- oder Phusion-DNA-Polymerase**

Reaktionsschritt	Taq-DNA-Polymerase		Phusion-DNA-Polymerase	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	98 °C	30 s
Denaturierung	95 °C	60 s	98 °C	10 s
Anlagerung	48-68 °C *	60 s	48-68 °C *	20 s
Elongation	72 °C	60 s kbp ⁻¹	72 °C	20 s kbp ⁻¹
Nachsynthese	72 °C	6 min	72 °C	6 min

Restriktion von DNA

Für die Restriktion von Plasmid-DNA oder gDNA wurden typischerweise, abhängig von den Anforderungen der nachfolgenden Anwendung, 500 – 1000 ng der zu verdauenden DNA pro 20 µl Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes eingesetzt. Die Inkubation mit der oder den Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Herstellerangaben, meist für 16 h bei 37 °C.

Ligation von DNA

Zur Konstruktion neuer Plasmide wurden in dieser Arbeit jeweils zwei oder mehr DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden mittels einer T4-DNA-Ligase verknüpft. Für einen typischen Reaktionsansatz mit 10 µl Gesamtvolumen wurden 100 ng des jeweiligen Vektor-Rückgrats mit den gewünschten Insertionsfragmenten, welche im 6-fachen molaren Überschuss zugegeben wurden, nach Herstellerangaben zusammengefügt und der Ansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die T4-DNA-Ligase im Reaktionsansatz am nächsten Tag für 10 min bei 65 °C im Heizblock inaktiviert wurde, konnten die Ligationsprodukte direkt für eine Transformation von *E. coli* verwendet oder für längere Zeit bei -20 °C gelagert werden.

Konstruktion von Plasmiden

In der nachfolgenden Tabelle ist jeweils zusammenfassend beschrieben, wie die verschiedenen in dieser Doktorarbeit neu hergestellten Plasmide, unter Verwendung der in Tabelle 7 gelisteten bereits vorhandenen Plasmide und der in Tabelle 10 gelisteten Oligonukleotide, konstruiert wurden.

Tabelle 19 | Konstruktion der in dieser Doktorarbeit neu hergestellten Plasmide.

pHsClpXEx1
Amplifikation des <i>HsClpX</i> -cDNA ORF aus pHsClpX mit den Oligonukleotiden HsClpX-BamHI_for und HsClpX-XbaI_rev; Ligation des amplifizierten Fragments in das pExMtterhph-Rückgrat (BamHI/XbaI-verdaut)
pPaClpP^{S135A}Ex1
Amplifikation des <i>PaClpP</i> -Promotors und eines Teils des <i>PaClpP</i> -Gens aus pPaClpPEX2 mit den Oligonukleotiden PaClpP-HindIII_for und PaClpP-S135A_rev (dieses führt dabei zu einem Austausch des Codons, welches für das katalytische Serin an Aminosäureposition 135 des PaCLPP Prä-Proteins kodiert, gegen ein Alanin-kodierendes Codon); Amplifikation des restlichen <i>PaClpP</i> -Gens sowie des <i>PaClpP</i> -Terminators mit den Oligonukleotiden PaClpP-S135A_for und PaClpP-KpnI_rev ebenfalls aus pPaClpPEX2; Ligation der amplifizierten Fragmente in das pK07-Rückgrat (HindIII/KpnI-verdaut)
pHsClpP^{S153A}Ex1
Amplifikation des 5'-Bereichs des <i>HsClpP</i> -cDNA ORF aus pHsClpPEX1 mit den Oligonukleotiden HsClpP-BamHI_for und HsClpP-S153A_rev (dieses führt dabei zu einem Austausch des Codons, welches für das katalytische Serin an Aminosäureposition 153 des Prä-Proteins kodiert, gegen ein Alanin-kodierendes Codon); Amplifikation des 3'-Bereichs des <i>HsClpP</i> -cDNA ORF mit den Oligonukleotiden HsClpP-S153A_for und HsClpP-XbaI_Rev ebenfalls aus pHsClpPEX1; Ligation der amplifizierten Fragmente in das pExMtterhph-Rückgrat (BamHI/XbaI-verdaut)
pPaClpP^{6HTS}Ex1
Amplifikation des <i>PaClpP</i> -Promotors und des <i>PaClpP</i> -Gens aus pPaClpPEX2 mit den Oligonukleotiden PaClpP-HindIII_for und PaClpP-6HTS_rev (dieses kodiert für den 5'-Teil des 6xHis-TEV-Strep-tag II-Markers, welcher an den C-Terminus von PaCLPP angefügt werden soll); Amplifikation der restlichen kodierenden Sequenz des Affinitätsmarkers sowie des <i>PaClpP</i> -Terminators mit den Oligonukleotiden PaClpP-6HTS_for (dieses kodiert für den 3'-Teil des 6xHis-TEV-Strep-tag II-Markers) und PaClpP-KpnI_rev2 ebenfalls aus pPaClpPEX2; Ligation der amplifizierten Fragmente in das pK07-Rückgrat (HindIII/KpnI-verdaut)
pPaClpP^{S135A-6HTS}Ex1
Amplifikation eines Teils des 3'-Bereichs von <i>PaClpP</i> sowie der darauf folgenden Sequenz, kodierend für den 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker, und des <i>PaClpP</i> -Terminators aus pPaClpP ^{6HTS} Ex1 mit den Oligonukleotiden PaClpP-Bsp119I_for und PaClpP-KpnI_rev2; Ligation des amplifizierten Fragments in das pHsClpP ^{S153A} Ex1-Rückgrat (Bsp119I/KpnI-verdaut)
pHsClpP^{6HTS}Ex1
Amplifikation eines Teils des <i>HsClpP</i> -cDNA ORF aus pHsClpPEX1 mit den Oligonukleotiden HsClpP-NotI_for und HsClpP-6HTS_rev (dieses kodiert für den 5'-Teil des 6xHis-TEV-Strep-tag II-Markers, welcher an den C-Terminus von HsCLPP angefügt werden soll); Amplifikation der restlichen kodierenden Sequenz des Affinitätsmarkers sowie des <i>PaMt1</i> -Terminators mit den Oligonukleotiden HsClpP-6HTS_for (dieses kodiert für den 3'-Teil des 6xHis-TEV-Strep-tag II-Markers) und TPAMT1-HindIII_rev ebenfalls aus pHsClpPEX1; Ligation der amplifizierten Fragmente in das pHsClpPEX1-Rückgrat (NotI/HindIII verdaut)
pHsClpP^{S153A-6HTS}Ex1
Konstruktion wie für pHsClpP ^{6HTS} Ex1, aber mit pHsClpP ^{S153A} Ex1 anstelle pHsClpPEX1 als Matrize für die Amplifikation der Fragmente
pHsClpP^{TS}Ex1
Amplifikation eines Teils des <i>HsClpP</i> -cDNA ORF aus pHsClpPEX1 mit den Oligonukleotiden HsClpP-NotI_for und HsClpP-TS_rev (dieses kodiert für den 5'-Teil des Twin-Strep-tag®, welcher an den C-Terminus von HsCLPP angefügt werden soll); Amplifikation der restlichen kodierenden Sequenz des Affinitätsmarkers sowie des <i>PaMt1</i> -Terminators mit den Oligonukleotiden HsClpP-TS_for (dieses kodiert für den 3'-Teil des Twin-Strep-tag®) und TPAMT1-HindIII_rev ebenfalls aus pHsClpPEX1; Ligation der amplifizierten Fragmente in das pHsClpPEX1-Rückgrat (NotI/HindIII verdaut)
pHsClpP^{ΔC-TS}Ex1
Konstruktion wie für pHsClpP ^{TS} Ex1, aber mit HsClpP-ΔC-TS_rev anstelle HsClpP-TS_rev für die Amplifikation des 5'-Fragmentes (im amplifizierten Fragment ist die Sequenz kodierend für die 28 C-terminalen Aminosäuren des <i>HsClpP</i> -cDNA ORF deletiert)
pHsClpP^{S153A-TS}Ex1
Amplifikation 5'-Bereichs des <i>HsClpP</i> -cDNA ORF wie für pHsClpP ^{S153A} Ex1; Amplifikation des 3'-Bereichs des <i>HsClpP</i> -cDNA ORF inklusive Twin-Strep-tag® aus pHsClpP ^{TS} Ex1 mit den Oligonukleotiden HsClpP-S153A_for und TPAMT1_rev; Ligation der amplifizierten Fragmente in das pExMtterhph-Rückgrat (BamHI/XbaI-verdaut)

pHsClpP^{3F6H}Ex1

Amplifikation eines Teils des *HsClpP*-cDNA ORF aus pHsClpPEx1 mit den Oligonukleotiden HsClpP-NotI_for und HsClpP-3F6H_rev (dieses kodiert für den 5'-Teil des 3xFLAG-6xHis-Marker, welcher an den C-Terminus von HsCLPP angefügt werden soll); Amplifikation der restlichen kodierenden Sequenz des Affinitätsmarkers sowie des *PaMt1*-Terminators mit den Oligonukleotiden HsClpP-3F6H_for (dieses kodiert für den 3'-Teil des 3xFLAG-6xHis-Marker) und TPaMT1-HindIII_rev ebenfalls aus pHsClpPEx1; Ligation der amplifizierten Fragmente in das pHsClpPEx1-Rückgrat (NotI/HindIII verdaut)

pHsClpP^{L3F6H}Ex1

Konstruktion wie für pHsClpP^{3F6H}Ex1 aber mit HsClpP-L3F6H_rev anstelle HsClpP-3F6H_rev für die Amplifikation des 5'-Fragmentes (die an den C-Terminus des *HsClpP*-cDNA ORF angefügte Sequenz kodiert zusätzlich noch für einen (GGGGS)₂-Linker)

pHsClpP^{S153A-L3F6H}Ex1

Amplifikation 5'-Bereichs des *HsClpP*-cDNA ORF wie für pHsClpP^{S153A}Ex1; Amplifikation des 3'-Bereichs des *HsClpP*-CDNA ORF inklusive Linker-3xFLAG-6xHis-Marker aus pHsClpP^{L3F6H}Ex1 mit den Oligonukleotiden HsClpP-S153A_for und TPaMT1_rev; Ligation der amplifizierten Fragmente in das pExMtterhph-Rückgrat (BamHI/XbaI-verdaut)

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils 500 ng des zu sequenzierenden Plasmids mit 25 pmol eines geeigneten Oligonukleotids in einem Gesamtvolumen von 10 µl Millipore-H₂O in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bereitgestellt.

Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Für die Detektion eines bestimmten DNA-Abschnittes im Rahmen einer Southern-Blot-Analyse, z. B. der Teilsequenz eines Gens, dessen Vorhandensein in der genomischen DNA geprüft werden soll, werden mit Digoxigenin (DIG) markierte, spezifische DNA-Fragmente benötigt, die man auch als Sonden bezeichnet.

Die zur gewünschten Zielsequenz homologen DNA-Fragmente wurden durch Restriktion oder eine PCR gewonnen und nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe des „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“-Kit (MACHEREY-NAGEL) aus dem verwendeten TAE-Agarosegel aufgereinigt. Jeweils 500 – 1000 ng eines spezifischen DNA-Fragments wurden mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben mit DIG-markiert.

Vor der Verwendung als Sonde für eine Southern-Blot-Analyse wurde die Markierungseffizienz der eingesetzten DNA-Fragmente durch Vergleich mit einer DIG-markierten Kontroll-DNA überprüft. Zu diesem Zweck wurden sowohl definierte Mengen der Kontroll-DNA als auch definierte Verdünnungen der markierten DNA-Fragmente gemeinsam auf eine Nylonmembran aufgetragen und diese zur Fixierung der DNA beidseitig im „UV-Stratalinker 1800“ (Stratagene) mit 120 mJ behandelt. Die Detektion der DIG-markierten DNA erfolgte prinzipiell wie im folgenden Abschnitt für eine Southern-Blot-Analyse beschrieben, als Farbsubstrat der an den

DIG-Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase wurde jedoch NBT/BCIP anstelle von CSPD verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Sonden finden sich in Tabelle 20.

Tabelle 20 | Liste der hergestellten und verwendeten Sonden.

Sonde	Größe in bp	Herstellung
<i>ble</i> -Sonde	1293	BamHI-Fragment aus pKO4
<i>hph</i> -Sonde	736	XhoI-Fragment aus pSM4
<i>HsClpP</i> -Sonde	232	Amplifikat einer PCR mit den Oligonukleotiden HsClpP_for und HsClpP_rev und pHsClpPEX1 als Matrize
<i>HsClpX</i> -Sonde	225	Amplifikat einer PCR mit den Oligonukleotiden HsClpX_for und HsClpX_rev und pHsClpXEX1 als Matrize
<i>PaClpP</i> -Sonde	634	PstI-Fragment aus pPaClpPEX2
<i>PaClpX</i> -Sonde	530	Amplifikat einer PCR mit den Oligonukleotiden PaClpX_for und PaClpX_rev und Cosmid 4G8 als Matrize

Southern-Blot-Analyse

Je Ansatz wurden 500 – 1000 ng der zu analysierenden genomischen DNA mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease geschnitten und auf einem 0,8 – 1,5 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Pro Gel wurde eine Nylonmembran (Hybond-N; GE Healthcare) auf die entsprechende Größe zugeschnitten mit 2× SSC angefeuchtet. Die Nylonmembran wurde auf die Vakuum-Transferapparatur (Bestandteil des VacuGene XL Vacuum Blotting System; GE Healthcare) gelegt und das Gel luftblasenfrei auf der Nylonmembran platziert.

Anschließend wurde das Gel mit 0,25 N HCl-Lösung überschichtet und ein Vakuum von 50 mbar angelegt. Nach 20 - 30 min Inkubation (abhängig von Dicke und Prozentanteil Agarose des verwendeten Gels) wurde die verbleibende Lösung entfernt und das Gel im Folgenden für jeweils 20 – 30 min zunächst mit Denaturierungslösung und dann mit Neutralisierungslösung überschichtet.

Der eigentliche DNA-Transfer auf die Nylonmembran erfolgte durch Überschichten des Gels mit 20× SSC und 1,5 – 2 h Inkubation. Nach dieser Zeit wurden die Geltaschen auf der Nylonmembran markiert und das Gel unter Vakuum entfernt. Die Membran wurde kurz in 2× SSC inkubiert und nach dem Trocknen beidseitig in einem UV-Crosslinker (Stratalinker® UV Crosslinker 1800, Stratagene) mit UV-Licht (254 nm) einer Energie von 120.000 $\mu\text{J cm}^{-2}$ bestrahlt, um die DNA auf der Nylonmembran zu fixieren. Anschließend konnte die Nylonmembran für mehrere Tage bei RT gelagert oder direkt für eine Hybridisierung eingesetzt werden. Die Hybridisierung der auf der Nylonmembran fixierten DNA mit einer DIG-markierten Sonde in Hybridisierungsröhren (GE Healthcare) umfasste folgende Inkubationsschritte:

1. Absättigung: 1 h bei RT in 6× SSC mit 0,5 % Blocking-Reagenz
2. Prähybridisierung: 3 h bei 55 °C in High-SDS-Puffer mit 1/100 Volumen denaturierter Heringssperma-DNA

Material und Methoden

3. Hybridisierung: Über Nacht bei 55 °C in High-SDS-Lösung mit 1/100 Volumen denaturierter Heringssperma-DNA und 25 ng ml⁻¹ denaturierter Sonde

Das Abwaschen der überschüssigen, ungebundenen DIG-markierten Sonde nach erfolgter Hybridisierung wurde durch Inkubation der Nylonmembran für 2 × 5 min bei RT in 2× SSC mit 0,1 % SDS und 2 × 15 min bei 68 °C in 0,1× SSC mit 0,1 % SDS erreicht. Die eigentliche Detektion der gebundenen DIG-markierten Sonde erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei RT.

Die Nylonmembran wurde kurz mit DIG-Waschpuffer gewaschen und dann für 30 min in DIG-Puffer 2 inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 30 min in verdünnter Anti-DIG-Antikörper-Lösung (1:10.000 in DIG-Puffer 2). Anschließend wurde der überschüssige, ungebundene Anti-DIG-Antikörper durch Inkubation für 3 × 10 min in DIG-Waschpuffer entfernt. Dann wurde die Nylonmembran kurz in DIG-Puffer 3 inkubiert, auf eine Einschweißfolie gelegt und mit 250 - 500 µl verdünnter CSPD-Substratlösung (1:100 in DIG-Puffer 3) überschichtet. Nach einer kurzen Einwirkungszeit von 1 - 2 min wurde diese durch Ausstreichen entfernt. Die Nylonmembran wurde in der Folie eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die eingeschweißte Nylonmembran in eine Röntgenfilmkassette eingelegt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Röntgenfilm wurde i. d. R. für mindestens 3 h exponiert und anschließend mit der Entwicklungsmaschine ECOMAX (PROTEC) entwickelt.

Um eine Nylonmembran mit einer weiteren DIG-markierten Sonde zu hybridisieren, wurde die bereits gebundene Sonde entfernt. Dazu wurde die Nylonmembran aus der Einschweißfolie entfernt und für 5 min bei RT mit H₂O gewaschen. Dann wurde die Nylonmembran für 2 × 10 min bei 37 °C in 0,2 N NaOH mit 0,1 % SDS und für 2 × 15 min bei 37 °C in 2× SSC inkubiert. Anschließend konnte die Nylonmembran abermals prähybridisiert und hybridisiert werden.

3.2.4 Protein-spezifische Methoden

Isolation von Mitochondrien aus *P. anserina*

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden (insbesondere für die Affinitätsaufreinigung von CLPP) hauptsächlich Mitochondrien von 11 d alten Individuen der verschiedenen verwendeten *P. anserina*-Stämme isoliert. Dafür wurden zwei Tage alte monokaryotische Individuen zunächst für vier Tage unter Standardbedingungen auf M2-Platten angezogen. Dann wurden pro Probe auf acht M2-Platten (+ Cellophan) jeweils ~30 Myzelstückchen desselben Individuums verteilt. Diese M2-Platten wurden für drei Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das gewachsene Myzel je einer Platte in einen Weithalskolben mit 200 ml CM-Medium überführt und für weitere zwei Tage ebenfalls unter Standardbedingungen und Schütteln inkubiert. Das gesamte gewachsene Myzel einer Probe wurde über

zwei Lagen Mull abfiltriert und dann sofort auf Eis gelagert. Alle weiteren Schritte erfolgten im Kühlraum bei 4 °C.

Zusammen mit dem Mitochondrien-Isolationspuffer 1 + 0,2 % BSA wurde das Myzel je einer Probe in Portionen à ~2,5–5 g unter Verwendung von Glasperlen mit Hilfe des „BeadBeater®“-Homogenisators (Carl Roth) mechanisch aufgeschlossen. Um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden wurden jeder Portion einige Tropfen „Antifoam“ hinzugegeben. Die erhaltenen Homogenisate wurden über Nesseltücher gefiltert. Das Filtrat je einer Probe wurde auf zwei GSA-Becher verteilt und für 10 min bei 2.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden über Glaswolle gefiltert, das Filtrat je einer Probe erneut auf zwei GSA-Becher verteilt und für 20 min bei 11.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die resultierenden Pellets je einer Probe wurden gemeinsam in insgesamt 2 ml Mitochondrien-Isolationspuffer 1 resuspendiert und in ein SS34-Röhrchen überführt. Die SS34-Röhrchen wurden zu 2/3 mit Mitochondrien-Isolationspuffer 1 aufgefüllt und für 20 min bei 11.500 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Die Überstände wurden verworfen, die Pellets (je nach Größe) in 1–1,5 ml Mitochondrien-Isolationspuffer 1 resuspendiert und jeweils auf einen 20-36-50 % Saccharose-Gradienten aufgetragen. Anschließend wurden die Proben in einer Ultrazentrifuge (Sorvall WX 80 mit AH 650; Thermo Fisher Scientific) für 60 min bei 25.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Banden, welche sich an den Phasengrenzen zwischen den 20 und 36 %igen Lösungen des Saccharose-Gradienten gebildet hatten und hauptsächlich intakte Mitochondrien enthielten, wurde abgenommen und in SS34-Röhrchen überführt. Diese wurden zu 2/3 mit Mitochondrien-Isolationspuffer 1 aufgefüllt und für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde, je nach Größe, in 100–300 µl Mitochondrien-Isolationspuffer 1 mit 1:100 Proteinase-Inhibitor-Cocktail aufgenommen. Die Proben wurden entweder direkt weiterverwendet oder konnten für längere Zeit bei -80 °C gelagert werden. Für die Verwendung der isolierten Mitochondrien im Rahmen einer Immunpräzipitation oder Affinitätsaufreinigung von CLPP wurden diese i. d. R. in Portionen à 500–1000 µg in jeweils 1 ml isotonischem Mitochondrienpuffer für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Mitochondrienpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung mitochondrialer Proteinextrakte erfolgte mit Hilfe des Roti-Nanoquant-Reagenz (Carl Roth) nach dem Prinzip von Bradford (Bradford 1976). Für die Erstellung einer Eichgerade wurden 0, 5, 10 und 20 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg ml⁻¹) mit je 10 µl Mitochondrien-Isolationspuffer 1 versetzt und mit Millipore-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 800 µl einer 1:5

Material und Methoden

Verdünnung des Roti®-Nanoquant-Reagenz hinzugegeben und die Extinktion der Eichproben bei 450 nm und 590 nm gemessen. Die Eichgerade ergab sich als lineare Regression durch die Quotienten der Messwerte der Eichproben. Um die Konzentration eines mitochondrialen Proteinextraktes zu bestimmen, wurden von diesem jeweils 1 und 2 µl mit Mitochondrien-Isolationspuffer 1 auf 10 µl aufgefüllt. Im Weiteren wurde mit diesen Ansätzen wie für die Eichproben beschrieben verfahren. Anhand der zuvor erstellten Eichgerade konnte aus den Quotienten der Messwerte der Probe ihre Proteinkonzentration bestimmt werden.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die denaturierende gelelektrophoretische Auftrennung mitochondrialer Proteine wurden die Elektrophorese-Kammern „Mini-Protean® II“ und „Mini-Protean® Tetra Cell“ (Bio-Rad) nach Herstellerangaben eingesetzt. Es wurden meist 12 %ige Polyacrylamid-Trenngele mit 5 %igen Polyacrylamid-Sammelgelen verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 50 – 100 µg eines mitochondrialen Proteinextraktes mit Proteinextraktionspuffer auf 16 µl aufgefüllt, mit 8 µl eines 3× SDS-Ladepuffer versetzt und die Ansätze für 10 min bei 95 – 99 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben für mindestens 5 min auf Eis inkubiert und dann in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Als Größenstandard wurden i. d. R. 1,5 µl „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei 100 - 200 V für 1 – 2 h in Anwesenheit von 1× Laufpuffer mit 0,1 % SDS. Gegebenenfalls wurden die aufgetrennten Proteine nach dem Gellauf mit Görg-Coomassie-Färbelösung für 30 – 60 min angefärbt und das Gel danach mit Görg-Coomassie-Entfärbelösung und H₂O zur bis zur möglichst vollständigen Reduktion des Hintergrundes wieder entfärbt.

Blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Für die native gelelektrophoretische Auftrennung mitochondrialer Proteine wurde die Methode der blau-nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE; Wittig et al. 2006) angewandt. Dafür kam die Elektrophorese-Kammer „Protean® II“ (Bio-Rad) nach Herstellerangaben zum Einsatz. Es wurden 4 – 13 %ige biphasische BN-Trenngele und 3,5 %ige BN-Sammelgele verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden die mitochondrialen Proteine zunächst durch Zugabe von Digitonin im Verhältnis 4:1 (w/w) solubilisiert. Dafür wurden pro Probe 300 µg mitochondrialer Proteinextrakt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit 1 ml 4 °C-kaltem BNP-Solubilisierungspuffer vermischt und für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Mitochondrienpellets wurden in 108 µl BN-Solubilisierungspuffer mit 1× Protease Inhibitor Cocktail Set IV resuspendiert und je 12 µl einer 10 %igen Digitonin-Stammlösung (100 µg µl⁻¹) zugegeben. Danach wurden die Proben kurz gemischt (Vortex) und für 30 min auf Eis inkubiert.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der die Proben für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C. Die Überstände mit den solubilisierten mitochondrialen Proteinen wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und mit jeweils 6 µl BNP-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurden zusammen mit den Proben 7 µl „NativeMark™ Unstained Protein Standard“ (Thermo Fisher Scientific) auf das Gel aufgetragen.

Die eigentliche gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte im Kühlraum bei 4 °C. Der Kathodentank der Elektrophorese-Kammer wurde vollständig mit BNP-Kathodenpuffer + 0,02 % (w/v) Coomassie Blue G250 und der Anodentank mit 3 l BNP-Anodenpuffer befüllt. Zunächst wurde für 1 - 1,5 h eine Spannung von 100 V bei einer Stromstärke von maximal 10 mA pro Gel angelegt. Danach wurde der bisher verwendete Kathodenpuffer gegen BNP-Kathodenpuffer + 0,002 % (w/v) Coomassie Blue G250 getauscht die Spannung auf 500 V bei einer Stromstärke von maximal 15 mA pro Gel erhöht. Nach weiteren 1,5 – 2 h, sobald die Coomassie-Front etwa 2/3 der Gesamtlänge des Trenngels durchschritten hatte, wurde der Kathodenpuffer gegen BNP-Kathodenpuffer ohne Coomassie getauscht. Die Auftrennung erfolgte solange, bis die Coomassie-Front am unteren Ende des Gels austrat.

Abschließend wurde das Gel aus den Glasplatten gelöst und für 10 – 15 min bei RT in BNP-Kathodenpuffer ohne Coomassie inkubiert. Dies war notwendig, um vor der anschließenden Western-Blot-Analyse möglichst viel Coomassie zu entfernen (da dieser Farbstoff bei der verwendeten Detektionsmethode ein starkes Hintergrundsignal verursacht). Der Transfer der Proteine aus dem BN-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte prinzipiell wie im folgenden Abschnitt beschrieben. Der verwendete Blotting-Puffer enthielt jedoch zusätzlich noch 0,05 % SDS und der erfolgte Transfer für 2 h bei 75 V und 4 °C. Nach dem Transfer musste die PVDF-Membran mindestens für 3 × 5 min in 100 % Methanol gewaschen werden, um noch vorhandenes Coomassie zu entfernen.

Western-Blot-Analyse

Um eine Immundetektion gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine im Rahmen einer Western-Blot-Analyse durchzuführen, wurden diese zunächst aus dem verwendeten Gel auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen. Dies erfolgte mit Hilfe des „Wet/Tank-Blot“-Verfahrens unter Verwendung der „Mini Trans-Blot® Cell“ (Bio-Rad) nach Herstellerangaben. Nach Zusammenbau der Apparatur und Befüllung mit Blotting-Puffer erfolgte der Transfer im Normalfall (SDS-PAGE) für 1 h bei 100 V und 4 °C. Anschließend wurde die PVDF-Membran erneut kurz in Methanol inkubiert und mit H₂O gewaschen. Die Blockierung der Membran sowie ihre Inkubation mit geeigneten Primär- und Sekundäntikörpern für die Immundetektion wurden wie im „Odyssey® Western Blot Analysis“-Handbuch (LI-COR) beschrieben mit dem „Odyssey® Blocking Buffer (PBS)“ (LI-COR) durchgeführt. Die Detektion der membrangebundenen, fluoreszenzmarkierten Sekundär-

Material und Methoden

antikörper erfolgte mit dem „Odyssey® Infrared Imaging System“ (LI-COR) ebenfalls nach Herstellerangaben.

Silberfärbung von SDS-Gelen

Für die Silberfärbung von SDS-Gelen wurde die von Blum et al. (Blum 1987) entwickelte und nach Rais et al. (Rais et al. 2004) modifizierte Methode angewandt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT unter Schütteln. Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel zunächst für 30 min in 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure inkubiert, um die Proteine zu fixieren. Danach wurde das Gel für zweimal 30 min in H₂O gewaschen, anschließend für 30 min in 0,005 %iger (w/v) Natriumthiosulfat-Lösung sensibilisiert und für weitere 30 min in einer 0,1 %igen (w/v) Silbernitratlösung inkubiert. Nach kurzem Spülen der Geloberfläche mit H₂O erfolgte schließlich die Entwicklung in 0,036 % (v/v) Formaldehyd mit 2 % (w/v) Na₂CO₃ für 1 – 2 min. Die Reaktion wurde durch Inkubation des Gels für 15 min in 50 mM EDTA (pH 8,0) abgestoppt.

Immunpräzipitation von Proteinen

Für die versuchte Immunpräzipitation (IP) von humaner CLPP aus isolierten *P. anserina* Mitochondrien kamen insgesamt vier verschiedene Antikörper (Santa Cruz Biotechnology: sc-47845 und sc-47846; Abcam: ab56455 und ab124822) zum Einsatz. Diese wurden zunächst unter Verwendung des „Dynabeads® Protein G Immunoprecipitation Kit“ (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben an die verwendeten „Dynabeads® Protein G for Immunoprecipitation“ (im Folgenden als „IP-Beads“ bezeichnet) gebunden. Typischerweise wurden dafür 1 - 10 µg des jeweiligen Antikörpers mit 1,5 mg der IP-Beads inkubiert. Für die Arbeit mit den magnetischen IP-Beads wurde, wie auch bei allen folgenden Schritte, der „DynaMag™-2“-Magnet (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden pro Ansatz 500 - 1000 µg isolierte und pelletierte Mitochondrien (siehe Abschnitt „Isolation von Mitochondrien aus *P. anserina*“) zu 2 µg µl⁻¹ in IP-Puffer mit 1 mM Pefabloc® SC (Sigma-Aldrich) ± 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Lyse erfolgte entweder durch 1 % (v/v) Triton X-100 oder Digitonin für 30 min auf Eis. Danach wurde die Probe für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das geklärte Lysat für die eigentliche IP verwendet. Dazu wurde der Überstand der Zentrifugation mit 1,5 mg der jeweiligen vorbereitenden Antikörper-Beads gemischt und mit diesen über Nacht bei Rotation und 4 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand entfernt, die IP-Beads mit 3 × 200 µl IP-Buffer gewaschen, nach dem letzten Waschschrift in 100 µl IP-Puffer aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die denaturierende Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 20 µl Elutionspuffer des Herstellers + 10 µl 3× SDS-Ladepuffer für 10 min bei 800 rpm und 70 °C im Heizblock. Die so gewonnenen Eluate wurden entweder direkt für eine SDS-PAGE und

anschließende Western-Blot-Analyse verwendet oder konnten für längere Zeit bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Affinitätsaufreinigung von Proteinen über den 6xHis-Marker

Für die einfache Aufreinigung von CLPP-Varianten über einen angefügten 6xHis-Marker unter nativen Bedingungen wurden die „Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown“ (im Folgenden als „His-Beads“ bezeichnet; Thermo Fisher Scientific) weitestgehend nach Herstellerangaben eingesetzt. Für die Arbeit mit den magnetischen His-Beads wurde der „DynaMag™-2“-Magnet (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden pro Ansatz 500 - 1000 μg isolierte und pelletierte Mitochondrien in 700 μl His-Bindepuffer mit 1 mM Pefabloc® SC (Sigma-Aldrich) und 1 % (v/v) Triton X-100 aufgenommen und zur Lyse für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe für 10 min bei 15.000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und das geklärte Lysat für die eigentliche Affinitätsaufreinigung verwendet. Dazu wurde der Überstand der Zentrifugation mit 50 μl ($\pm 2\text{ mg}$) His-Beads für 30 min bei Rotation und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, erfolgten insgesamt vier Waschschriffe mit jeweils 300 μl His-Bindepuffer ohne Triton X-100. Für die native Elution wurden die His-Beads für 5 min bei Rotation und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 100 μl His-Elutionspuffer, welcher 300 mM Imidazol enthielt, inkubiert. Die so gewonnen Eluate konnten entweder für längere Zeit bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden oder wurden, nach Zugabe geeigneter Mengen eines 3 \times SDS-Ladepuffers und entsprechender Vorbereitung der Proben, direkt für eine SDS-PAGE und anschließende Western-Blot-Analyse verwendet.

Affinitätsaufreinigung von Proteinen über den Strep-tag II-Marker/Twin-Strep-tag®

Für die einfache Aufreinigung von CLPP-Varianten über einen angefügten Strep-tag II-Marker oder einen Twin-Strep-tag® (zwei aufeinanderfolgende, durch einen (GGGS)₂-Linker getrennte Strep-tag-II-Marker) wurden entweder „Strep-Tactin Magnetic Beads“ (im Folgenden als „Strep-Beads“ bezeichnet; QIAGEN) oder „Gravity flow Strep-Tactin® Superflow® Columns“ (im Folgenden als „Strep-Säulen“ bezeichnet; IBA) unter weitestgehend identischen Bedingungen verwendet. Für die Arbeit mit den magnetischen Strep-Beads wurde der „DynaMag™-2“-Magnet (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden bei Verwendung der Strep-Beads pro Ansatz 250 – 500 μg isolierte und pelletierte Mitochondrien zu $1 - 2\text{ }\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ in Strep-Puffer mit 1 \times Protease Inhibitor Cocktail Set IV und 0,5 % Triton X-100 aufgenommen und zur Lyse für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe für 10 min bei 15.000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und das geklärte Lysat für die eigentliche Affinitätsaufreinigung verwendet. Dazu wurde der Überstand der Zentrifugation mit 50 μl der 10 %igen Strep-Bead-Lösung des Herstellers für 1 h bei Rotation und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Da die Strep-Beads nur für die schnelle Analyse der Bindefähigkeit von

Material und Methoden

CLPP-Varianten mit dem Strep-tag II-Marker an Strep-Tactin verwendet wurden, erfolgten danach keine weiteren Aufreinigungsschritte mehr.

Bei Verwendung der Strep-Säulen wurden pro Ansatz 1000 µg isolierte und pelletierte Mitochondrien zu 5 µg µl⁻¹ in Strep-Puffer mit 1× Protease Inhibitor Cocktail Set IV und 0,5 % Triton X-100 aufgenommen und bis einschließlich des Zentrifugationsschrittes wie im vorigen Absatz beschrieben behandelt. Soweit nicht anders erwähnt wurden alle folgenden Schritte im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Die verwendete Strep-Säule wurde vor der Verwendung mit 400 µl Strep-Puffer äquilibriert und dann mit dem geklärten Lysat (200 µl) beladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und die Strep-Säule anschließend mit 5 × 200 µl Strep-Puffer gereinigt um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Abschließend erfolgte die Elution mit 6 × 100 µl Strep-Puffer, welcher 1× Protease Inhibitor Cocktail Set IV und 10 mM Desthiobiotin enthielt. Die so gewonnen Eluate konnten entweder für längere Zeit bei -20 °C gelagert werden oder wurden, nach Zugabe geeigneter Mengen eines 3× SDS-Ladepuffers und entsprechender Vorbereitung der Proben, direkt für eine SDS-PAGE und anschließende Western-Blot-Analyse verwendet.

„One-TAP“-Affinitätsaufreinigung Proteinen über den Twin-Strep-tag®

Für die sogenannte „One-TAP“-Aufreinigung von humaner CLPP mit Twin-Strep-tag® wurde das entsprechende Protein zunächst, wie im Abschnitt „Affinitätsaufreinigung von Proteinen über den Strep-tag II-Marker/Twin-Strep-tag®“ beschrieben, unter Verwendung der „Gravity flow Strep-Tactin® Superflow® Columns“ aufgereinigt. Anschließend wurde das gesamte Eluat der ersten Aufreinigung (600 µl) auf eine mit 400 µl Strep-Puffer äquilibrierte „Gravity flow StrepMAB-Classic MacroPrep®“-Säule (IBA) geladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und die Strep-Säule anschließend mit 5 × 200 µl Strep-Puffer gereinigt. Abschließend erfolgte die Elution mit 6 × 100 µl Strep-Puffer, welcher 1× Protease Inhibitor Cocktail Set IV und 0,5 mM „Strep-tag® II Peptide“ (IBA) enthielt. Durch den zusätzlichen Aufreinigungsschritt konnte eine deutliche Reduktion unspezifisch ko-aufgereinigter Proteine erreicht werden. Die erhaltenen Eluate konnten entweder für längere Zeit bei -20 °C gelagert werden oder wurden, nach Zugabe geeigneter Mengen eines 3× SDS-Ladepuffers und entsprechender Vorbereitung der Proben, direkt für eine SDS-PAGE und anschließende Western-Blot-Analyse verwendet.

Tandem-Affinitätsaufreinigung von Proteinen über den 3xFLAG-6xHis-Marker

Für die eine Tandem-Affinitätsaufreinigung von humaner CLPP mit 3xFLAG-6xHis-Marker wurden für den ersten Aufreinigungsschritt „ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads“ (im Folgenden als „FLAG-Beads“ bezeichnet; Sigma-Aldrich) und für den zweiten Aufreinigungsschritt „Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown“ (im Folgenden als „His-Beads“ bezeichnet; Thermo

Fisher Scientific) verwendet. Für die Arbeit mit den magnetischen FLAG- und His-Beads wurde der „DynaMag™-2“-Magnet (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden je Ansatz 1000 µg isolierte und pelletierte Mitochondrien in 180 µl FLAG-TAP-Bindepuffer aufgenommen. Anschließend wurden 20 µl einer 10 %igen Digitonin-Lösung hinzugefügt (d. h. Lyse mit Digitonin zu Protein im Verhältnis 2:1), kurz gemischt (Vortex) und die Probe zur Lyse für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das geklärte Lysat durch Zugabe von 800 µl FLAG-TAP-Bindepuffer auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Soweit nicht anders erwähnt wurden alle folgenden Schritte im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt.

Für den ersten Schritt der Affinitätsaufreinigung wurde das angepasste Lysat mit 30 µl Gelvolumen der FLAG-Beads, welche nach Herstellerangaben durch Waschen in TBS äquilibriert wurden, für 2 h bei Rotation inkubiert. Danach wurden die FLAG-Beads mit den gebundenen Proteinen mit 3 × 200 µl des FLAG-TAP-Waschpuffers gewaschen und dabei beim letzten Waschschrift in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der Proteine erfolgte durch Inkubation der FLAG-Beads für 2 × 30 min bei Rotation mit jeweils 150 µl des FLAG-TAP-Elutionspuffers, welcher 150 ng µl⁻¹ eines FLAG-Peptids (3X FLAG® Peptide, Sigma-Aldrich) enthielt. Die beiden Elutionsfraktionen wurden zusammengeführt und mit FLAG-TAP-Elutionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 700 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurde Tween 20 in einer Endkonzentration von 0,01 % und Imidazol-HCl (pH 7,4) in einer Endkonzentration von 20 mM hinzugefügt.

Das angepasste Eluat des ersten Aufreinigungsschritts wurde anschließend für 30 min bei Rotation mit 50 µl (2 mg) His-Beads inkubiert. Die His-Beads wurden mit 4 × 300 µl His-TAP-Waschpuffer gewaschen und dabei beim letzten Waschschrift in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ab diesem Punkt wurden alle resultierenden Proben auf Eis gelagert. Ihre weitere Behandlung für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse erfolgte am Max-Planck-Institut für Biophysik, Arbeitsgruppe von Julian D. Langer (siehe Beschreibung im folgenden Abschnitt).

Identifizierung von Proteinen durch „peptide mass fingerprinting“ (PMF)

Hinweis: Die exklusiv im Rahmen der am Max-Planck-Institut für Biophysik durchgeführten massenspektrometrischen Analyse verwendeten Chemikalien, Computerprogramme, Enzyme, Geräte und sonstige Materialien sind nicht gesondert im Materialteil dieser Dissertation gelistet und daher im Folgenden eindeutig, durch Angabe der Bezugsquelle bzw. des Modells und/oder Herstellers, bezeichnet. Ebenso sind in Klammern an dieser Stelle die Zusammensetzungen der ausschließlich für die massenspektrometrischen Analyse verwendeten Puffer angegeben.

Material und Methoden

Die His-Beads mit den gebundenen affinitätsgereinigten Proteinen wurden mit dem dreifachen Bettvolumen ABC-Puffer (50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5, 300 mM KCl und 10 % v/v Glycerin) gewaschen. Anschließend wurden die Proteine in ABC-Puffer mit einer Endkonzentration von 6 M Urea für 2 min bei 70 °C im Heizblock denaturiert, mit einer Endkonzentration von 5 mM TCEP (Sigma-Aldrich) für 30 min bei RT reduziert und mit einer Endkonzentration von 20 mM Iodacetamid (Thermo Fisher Scientific) für weitere 30 min bei RT alkyliert. Die Proben wurden mit der Protease Lys-C (Endkonzentration: 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Roche) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach einer 1:1 Verdünnung der Proben mit ABC-Puffer und Zusatz von CaCl_2 (Endkonzentration: 1 mM) wurden die Proben mit Trypsin (Endkonzentration: 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$; SERVA) erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 1.000 g und RT zentrifugiert, mit 1 %iger Ameisensäure angesäuert und die durch die proteolytischen Verdauung erzeugten Peptide mit C_{18} ZipTips (Merck Millipore) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Eluate (40 μl) wurden mit einer Vakuumzentrifuge getrocknet und die Peptide bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Peptide wurden in 5 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure gelöst und mit Hilfe einer nano-HPLC (Dionex - UltiMate 3000 RSLCnano, Thermo Fisher Scientific) auf eine RP-Säule (engl. „reversed-phase“, RP; „trapping column“: Partikelgröße 3 μm , C_{18} , Länge 20 mm; „analytical column“: Partikelgröße < 2 μm ; C_{18} , Länge 50 cm; PepMap-Säulen von Dionex/Thermo Fisher Scientific) geladen. Die Elution der Peptide erfolgte in einem Gradienten aus H_2O (Puffer A: H_2O mit 5 % v/v Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure) und Acetonitril (Puffer B: 20 % v/v H_2O und 80 % v/v Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure). Alle verwendeten Lösungsmittel stammten dabei von der Firma Fluka und hatten LC-MS-Qualität. Typischerweise wurden die Gradienten innerhalb von 200 min, bei einer Flussrate von 300 nl min^{-1} , von 5 % auf 70 % Puffer B gefahren. Von der RP-Säule eluierte Peptide wurden direkt mit einer „nanoFLEX ESI“-Quelle ionisiert und entweder in einem „Orbitrap Elite“ oder in einem „Q Exactive Plus“ Massenspektrometer (beide Thermo Fisher Scientific) analysiert. Massenspektren wurden in einem Massenbereich von 250 – 1.650 m z^{-1} aufgenommen. Sequenzinformationen wurden durch einen computergestützten, datenabhängigen automatisierten Wechsel zur MS/MS-Betriebsweise unter Verwendung von Kollisionsenergien basierend auf der Masse und dem Ladungszustand der ausgewählten Ionen gewonnen. Jede Probe wurde in drei technischen Replikaten vermessen.

Die erhaltenen Datensätze wurden mit der Software „Proteome Discoverer 1.4“ (Thermo Fisher Scientific) prozessiert und als Mascot-Dateien exportiert. Die Identifizierung von Proteinen erfolgte durch Abgleich der abgeleiteten Sequenzdaten mit der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32 (Quelle: <http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) auf einem lokalen Mascot-Server (Matrix Science). Allgemein wurden eine Toleranz von 2 ppm für

die Vorläufer-Ionen und 0,5 Da für die Fragmentspektren, zwei verpasste Spaltungen, Oxidation von Methionin, eine fixe Modifikation von Cystein durch Carbamidomethylierung sowie ein manuell gewählter „Mascot score“-Schwellenwert von 40 als Parameter für die Suche verwendet.

Wichtige Anmerkung: Zum Zeitpunkt der Drucklegung dieser Dissertation war die Website des „*P. anserina* Genome Projects“ (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) zumindest vorübergehend nicht mehr erreichbar. Daher ist zur eindeutigen und nachvollziehbaren Bezeichnung von *P. anserina* Proteinen zusätzlich in den entsprechenden Tabellen ihre ID entsprechend der UniProt-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) mit angegeben. Zur internen Verwendung im Arbeitskreis wurde jedoch auch die Angabe der *P. anserina* ID entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32 (Quelle: <http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) beibehalten.

3.2.5 *In silico*-Methoden

Auswertung der Massenspektrometrie-Daten

Die Auswertung der im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse erhaltenen Datensätze erfolgte mit Microsoft Excel 2010 und RStudio Desktop. Es wurden grundsätzlich nur solche Proteine für die Analyse in Betracht gezogen, die in mindestens zwei der drei unabhängigen biologischen Replikate der jeweiligen Probe ($\Delta PaClpP$, $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ oder $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$) gefunden wurden.

Zunächst wurden alle Proteine, die auch in der Probe der Hintergrundkontrolle ($\Delta PaClpP$) vorkamen, als unspezifisch aus den Sätzen der mit $HsCLPP^{L3F6H}$ bzw. $HsCLPP^{S153A-L3F6H}$ ko-aufgereinigten Proteine entfernt. Lediglich Proteine, welche in der $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ -Probe oder in der $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ -Probe gegenüber der Hintergrundkontrolle deutlich angereichert waren (Anreicherungsfaktor > 3 bei Betrachtung der dem jeweiligen Protein zugeordneten MS/MS-Spektren, d. h. der einzigartigen Peptide) wurden zusätzlich noch für die weiterführende Analyse beibehalten. Die beiden resultierenden Sätze der spezifisch mit der jeweiligen $HsCLPP$ -Variante ko-aufgereinigten Proteine wurden miteinander verglichen und die Proteine danach klassifiziert, ob sie exklusiv mit $HsCLPP^{L3F6H}$, $HsCLPP^{S153A-L3F6H}$ oder aber mit beiden $HsCLPP$ -Varianten ko-aufgereinigt werden. Zwei Proteine der $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ -Probe waren gegenüber der $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ -Probe deutlich angereichert (Anreicherungsfaktor > 3 ; siehe oben) und wurden folglich auch als spezifisch mit $HsCLPP^{S153A-L3F6H}$ ko-aufgereinigt klassifiziert. Schlussendlich wurden die erhaltenen Sätze weiter verfeinert, indem alle Proteine aus ihnen entfernt wurden, welche nicht mit mindestens

Material und Methoden

mehr als einem einzigartigen Peptid im Durchschnitt aller biologischen Replikate der jeweiligen Probe vorhanden waren.

„GO enrichment“-Analysen

Die „GO enrichment“-Analysen (engl. „gene ontology“, GO) wurden Online, unter Verwendung des offiziellen „Term Enrichment Service“ des „Gene Ontology Consortium“, durchgeführt (<http://amigo.geneontology.org/rte>). Input für die Analysen waren jeweils die Swiss-Prot IDs der menschlichen Homologe der *P. anserina* Proteine, die entweder spezifisch mit beiden HsCLPP-Varianten oder exklusiv mit HsCLPPS153A-L3F6H ko-aufgereinigt wurden. Die folgenden Parameter wurden für alle durchgeführten „GO enrichment“-Analysen verwendet:

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (release 20150430) | Annotation Version and Release Date: GO Ontology database; Released 2015-05-09 | Reference List: *Homo sapiens* (all genes in database) | Annotation Data Set: GO biological process complete | Bonferroni correction: true

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung und Charakterisierung von *P. anserina* CLP-Protease-Mutanten

Der in den folgenden Experimenten als Ausgangsstamm für die Herstellung diverser Mutanten dienende *PaClpP*-Deletionsstamm wurde in einer vorangegangenen Diplomarbeit (Fischer 2011) erstmals charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass $\Delta PaClpP$ bei Anzucht unter Standardbedingungen (Anzucht auf M2-Medium bei 27 °C und Dauerlicht) eine deutlich verlängerte Lebensspanne im Vergleich zu der des Wildstammes hat. Darüber hinaus zeigt $\Delta PaClpP$ eine normale Myzel-Morphologie und ist in seiner Wachstumsrate nicht beeinträchtigt. Der einzige beobachtete nachteilige Effekt der Deletion von *PaClpP* ist eine schwache Sensitivität von $\Delta PaClpP$ gegenüber Hitzestress (Anzucht wie oben, aber bei 37 °C). Diese Befunde waren durchaus überraschend, da nicht direkt erklärbar ist, warum die Entfernung einer vermutlich zentralen Komponente der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle ohne deutliche negative Folgen für den Organismus bleiben sollte und bei bestimmten Laborbedingungen sogar vorteilhaft ist. Interessanterweise wurde eine Verlängerung der gesunden Lebensspanne bei 27 °C auch bei $\Delta Palap$ beobachtet (Weil et al. 2011), einem Stamm in dem das für die *P. anserina* iAAA-Protease der inneren mitochondrialen Membran kodierende Gen deletiert ist.

Der *Palap*-Deletionsstamm hat einen ähnlichen Phänotyp wie $\Delta PaClpP$ (Weil et al. 2011). Unter Standardbedingungen lässt sich ebenfalls eine Verlängerung seiner gesunden Lebensspanne beobachten. Gleichzeitig ist $\Delta Palap$ anfällig für Hitzestress und weist bei 37 °C eine verkürzte Lebensspanne sowie eine Verringerung seiner Wachstumsrate und weiblichen Fertilität auf. Darüber hinaus steigt die Proteinmenge der iAAA-Protease durch Anzucht bei 37 °C stark an, d. h. es findet offensichtlich eine temperaturabhängige Regulation dieser Komponente der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle statt. Dies spricht insgesamt dafür, dass die *P. anserina* iAAA-Protease Teil eines molekularen Systems ist, welches eine Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen, wie z. B. Temperaturschwankungen, ermöglicht. Bemerkenswerterweise zeigt der $\Delta PaClpP/\Delta Palap$ -Doppeldeletionsstamm eine klare Verstärkung der positiven Effekte der jeweiligen Einzeldelation (Fischer et al. 2013). So ist $\Delta PaClpP/\Delta Palap$ bei 27 °C deutlich langlebiger im Vergleich zum Wildstamm als die individuellen Deletionsstämme. Daher lässt sich vermuten, dass die Abwesenheit der jeweiligen Protease unterschiedliche Prozesse beeinflusst, welche unabhängig voneinander zu einer Verlängerung der Lebensspanne führen.

Um genauer zu überprüfen, ob die *PaClpP*-Deletion tatsächlich zu keinen auffälligen negativen Folgen für *P. anserina* führt, wurden in dieser Doktorarbeit zunächst weitere Untersuchungen mit $\Delta PaClpP$ bei Hitzestress und unter zusätzlichen Stressbedingungen durchgeführt.

4.1.1 Zusätzliche Charakterisierungen des *PaClpP*-Deletionsstammes

Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit wurden die Wachstumsrate und die Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ bei 37 °C untersucht, um zu überprüfen, ob *PaClpP* möglicherweise eine Rolle bei der Hitzestressantwort von *P. anserina* spielt. Im Vergleich zum Wildstamm hat der *PaClpP*-Deletionsstamm unter diesen Bedingungen eine leicht verringerte Wachstumsrate und ist nicht

Ergebnisse

mehr langlebig (Fischer 2011). Der *Palap*-Deletionsstamm zeigt bei Hitzestress ebenfalls eine Verminderung seiner Wachstumsrate und darüber hinaus eine sogar verkürzte mittlere Lebensspanne verglichen mit der des Wildstammes (Weil et al. 2011). Ein weiterer sehr deutlicher negativer Effekt der bei $\Delta Palap$ beobachtet werden konnte, ist eine geringere weibliche Fertilität dieses Stammes bei 37 °C. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst überprüft, ob $\Delta PaClpP$ ähnliche Einschränkungen zeigt und die weibliche Fertilität dieses Stammes bei 27 °C und 37 °C mit der des Wildstammes verglichen (Abbildung 6).

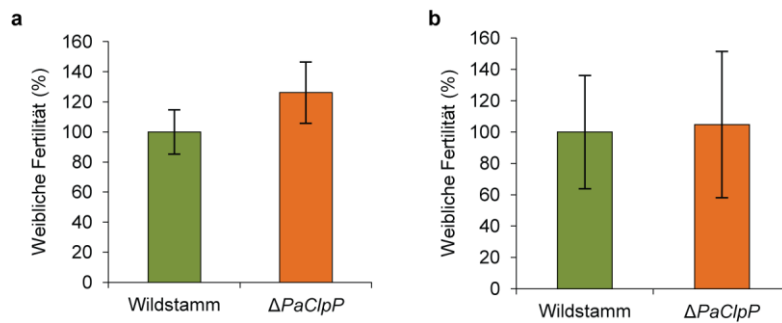


Abbildung 6 | **Weibliche Fertilität von $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildstamm bei 27 °C und 37 °C.** (a) Weibliche Fertilität des Wildstammes (n = 11) und des *PaClpP*-Deletionsstammes (n = 11) bei 27 °C. Die weibliche Fertilität von $\Delta PaClpP$ ($126 \pm 20,3$; $P = 2,8E-01$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest) war nicht signifikant verschieden von der des Wildstammes ($100 \pm 14,7$). Angegeben und dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte (engl. „standard error of the mean“, SEM) der weiblichen Fertilität in %, normiert auf die weibliche Fertilität des Wildstammes. (b) Die weibliche Fertilität von $\Delta PaClpP$ bei 37 °C ($104 \pm 46,7$; n = 11; $P = 8,3E-01$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest) war ebenfalls nicht signifikant verschieden von der des Wildstammes ($100 \pm 36,1$; n = 11). Angegebene und dargestellte Werte wie in (a).

Bei 27 °C wiesen die untersuchten monokaryotischen Isolate von $\Delta PaClpP$ (n = 11), verglichen mit denen des Wildstammes (n = 11), tendenziell eine gesteigerte weibliche Fertilität auf (126 ± 20 %; $P = 2,8E-01$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest), jedoch war dieses Ergebnis nicht signifikant (Abbildung 6a). Bei 37 °C zeigte sich keine Veränderung der weiblichen Fertilität von $\Delta PaClpP$ (Abbildung 6b). Diese Ergebnisse, wie auch die der Diplomarbeit, sprechen dafür, dass PaCLPP im Gegensatz zu PalAP (Weil et al. 2011) keine prominente Rolle für eine Hitzestressantwort spielt. Zusammen mit der Beobachtung, dass die positiven Effekte der *Palap*- und der *PaClpP*-Deletion auf die Lebensspanne bei 27 °C additiv sind (Fischer et al. 2013), weist dies auf unterschiedliche molekulare Rollen dieser beiden Mitoproteasen in *P. anserina* hin.

Neben CLXP befindet sich in der mitochondrialen Matrix nahezu aller Eukaryoten zusätzlich noch die LON-Protease, bei der es sich ebenfalls um eine lösliche Serinprotease handelt. In *P. anserina* ist diese Protease, ähnlich wie in vielen anderen Eukaryoten, bereits deutlich besser charakterisiert als die CLXP-Protease. Es scheint offensichtlich, dass PaLON und PaCLXP unterschiedliche Aufgaben haben. So führt die Deletion von *PaLon* nicht zu einer Lebensverlängerung, sondern zu einer Verkürzung der Lebensspanne bei 27 °C (Adam et al. 2012). Nichtsdestotrotz lässt sich aufgrund der gemeinsamen Lokalisation der LON- und CLXP-

Protease vermuten, dass diese zumindest in einigen Bereichen Überschneidungen, z. B. in Bezug auf ihr Substratspektrum, aufweisen.

Untersuchungen eines *PaLon*-Überexpressionsstammes (Luce und Osiewacz 2009) sowie des *PaLon*-Deletionsstammes (Adam et al. 2012) konnten zeigen, dass PaLON wichtig für die allgemeine Qualitätskontrolle mitochondrialer Proteine und vor allem für die Beseitigung von oxidativen Proteinschäden in Mitochondrien ist. Dies deckt sich weitestgehend mit den bekannten Funktionen mitochondrialer LON-Proteasen in anderen Eukaryoten (Quirós et al. 2015). Zur Überprüfung, ob PaCLXP möglicherweise auch eine wichtige Rolle insbesondere beim Abbau oxidativ geschädigter Proteine spielt, wurde das Wachstum des *PaClpP*-Deletionsstammes in Anwesenheit unterschiedlicher Stressoren analysiert (Abbildung 7).

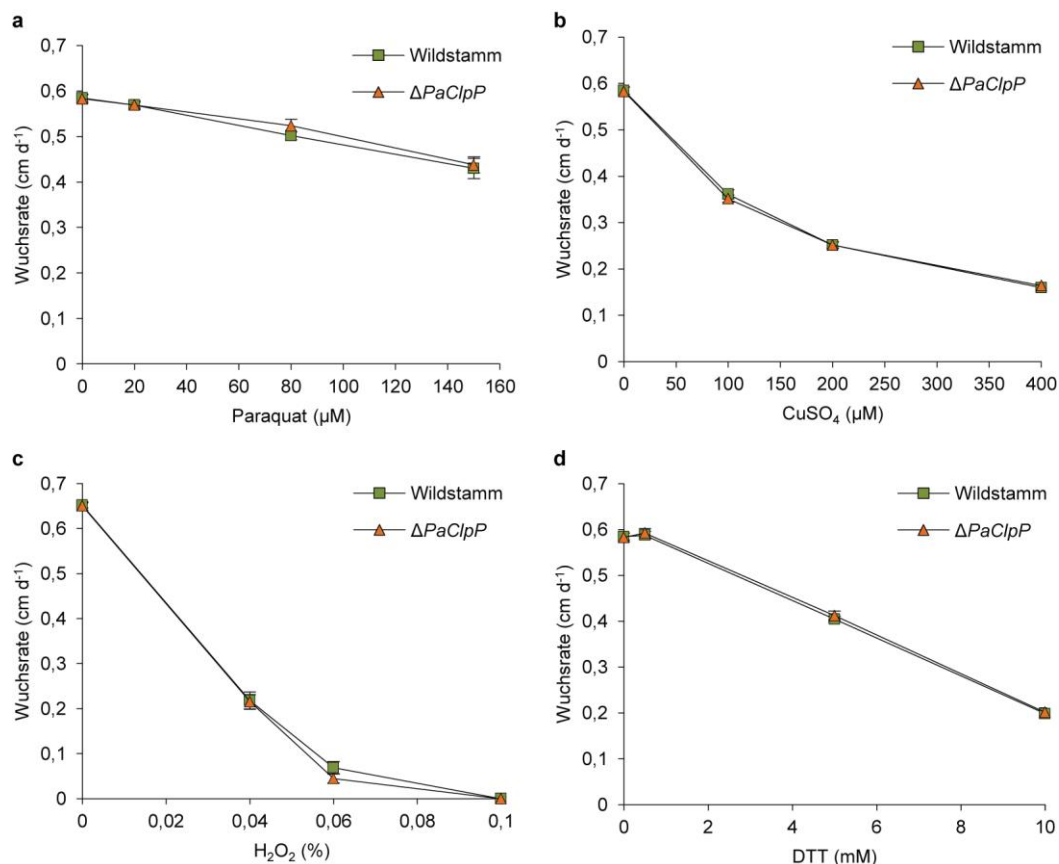


Abbildung 7 | **Wachsraten von $\Delta PaClpP$ bei verschiedenen Stressbedingungen im Vergleich zum Wildstamm.** (a) Wachsraten des Wildstammes (n = 16) und des *PaClpP*-Deletionsstammes (n = 16) auf M2-Medium mit 0, 20, 80 oder 150 μM Paraquat. Bei diesen und allen folgenden Stressbedingungen gab es keine Unterschiede in den Wachsraten des Wildstammes und des *PaClpP*-Deletionsstammes. (b) Wachsraten des Wildstammes (n = 16) und von $\Delta PaClpP$ (n = 16) auf M2-Medium mit 0, 100, 200 oder 400 μM CuSO₄. (c) Wachsraten des Wildstammes (n = 16) und von $\Delta PaClpP$ (n = 16) auf M2-Medium mit 0, 0,04, 0,06 oder 0,1 % H₂O₂. (d) Wachsraten des Wildstammes (n = 16) und von $\Delta PaClpP$ (n = 16) auf M2-Medium mit 0, 0,5, 5 oder 10 mM DTT. In allen Diagrammen sind die Mittelwerte ± SEM der Wachsraten in cm d⁻¹ dargestellt.

Zur Verwendung kamen die oxidativen Stressoren Paraquat, CuSO₄ und H₂O₂, welche Mitochondrien-spezifischen (Paraquat) bzw. mitochondrialen und cytosolischen (CuSO₄ und H₂O₂) ROS-Stress auslösen, sowie als zusätzliche Kontrolle das starke Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT), welches hauptsächlich zur Fehlfaltung von Proteinen im endo-

Ergebnisse

plasmatischen Retikulum und im Cytosol führt. Erstaunlicherweise zeigte $\Delta PaClpP$ für keinen der in unterschiedlichen Konzentrationen dem Wachstumsmedium zugegebenen Stressoren eine gesteigerte Anfälligkeit im Vergleich zum Wildstamm (Fischer et al. 2013).

Die hier beschriebenen zusätzlichen Charakterisierungen des $PaClpP$ -Deletionsstammes führen also gemeinsam mit den Beobachtungen der Diplomarbeit zu dem Fazit, dass die Abwesenheit von PaCLPP zu einer Verlängerung der Lebensspanne ohne feststellbare Beeinträchtigungen vitaler Funktionen (Wuchsrate und Fertilität) oder einer gesteigerten Stressresistenz führt. Zur Erklärung dieses Phänomens lassen sich u. a. folgende einander nicht ausschließende allgemeine Annahmen heranziehen:

1. **Die Deletion von $PaClpP$ führt indirekt zu Vorgängen, welche für die zu beobachtende Lebensverlängerung von $\Delta PaClpP$ verantwortlich sind.** Denkbar wäre etwa, dass die $PaClpP$ -Deletion zu einer Störung der mitochondrialen und/oder zellulären (Protein-)Homöostase führt, die von der Zelle wahrgenommen wird und eine kompensatorische Aktivierung alternativer Qualitätskontrollmechanismen zur Folge hat.
2. **Die Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ ist direkte Folge der proteolytischen Funktion von PaCLPXP.** So lässt sich etwa annehmen, dass diese Protease normalerweise gezielt mitochondriale (Stress-)Signalwege oder Komponenten bestimmter mitochondrialer Qualitätskontrollmechanismen negativ reguliert.

Darüber hinaus ist auch denkbar, dass die verlängerte Lebensspanne des $PaClpP$ -Deletionsstammes in erster Linie auf Eigenschaften der Chaperon-Komponente der PaCLPXP-Protease zurückzuführen ist. So ist bekannt, dass CLPX-Chaperone in anderen eukaryotischen Organismen Funktionen haben, die von ihrer Interaktion mit CLPP unabhängig sind. Sofern dies auch auf PaCLPX zutrifft, könnte der lebensverlängernde Effekt der $PaClpP$ -Deletion prinzipiell auf PaCLPXP-unabhängigen, autonomen Funktionen von PaCLPX beruhen. Eine gezielte, hypothesengetriebene Untersuchung dieser verschiedenen Annahmen setzt jedoch größtenteils zunächst eine genauere Kenntnis der biologischen Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina* voraus.

4.1.2 Herstellung eines $PaClpX$ -Deletionsstammes und eines $PaClpP/PaClpX$ -Doppeldeletionsstammes

Eine einfache Möglichkeit zur Überprüfung, ob CLPX in *P. anserina* ebenfalls PaCLPXP-unabhängige Funktionen ausübt, ist die Charakterisierung eines $PaClpX$ -Deletionsstammes im Vergleich zu $\Delta PaClpP$. Wenn das Chaperon PaCLPX und die Serinprotease PaCLPP lediglich eine biologisch relevante Funktion im Kontext der aus beiden Komponenten bestehenden PaCLPXP-Protease haben, dann sollten die beiden Deletionsstämme einen identischen Phänotyp zeigen

(da in beiden dann einzig die Störung der Funktion der PaCLPX-Protease entscheidend für die Ausprägung des beobachtbaren Phänotyps wäre). Sofern PaCLPX jedoch Funktionen ausüben kann, die keine Interaktion mit PaCLPP voraussetzen, sollte der Phänotyp des *PaClpX*-Deletionsstammes nicht mit dem des *PaClpP*-Deletionsstammes identisch sein. Ferner sollte, falls die verlängerte Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ tatsächlich durch autonome Funktionen von PaCLPX vermittelt wird, der *PaClpP/PaClpX*-Doppeldelentionsstamm keine verlängerte Lebensspanne mehr zeigen.

Um die Deletion des *PaClpX*-Gens durchzuführen, wurde ein spezielles „Zweischritt-Verfahren“ angewandt (Hamann et al. 2005). Dieses ermöglicht eine Gendeletion auf Grundlage von gezielter homologer Rekombination, obwohl dieser Vorgang normalerweise in *P. anserina* nur sehr ineffizient stattfindet. Hierfür wird zunächst ein Deletionsplasmid konstruiert. Dieses beinhaltet die für den Austausch im Genom gewünschte Resistenzkassette, umgeben von 250 – 300 bp großen Abschnitten der 3'- und 5'-Flanke des zu deletierenden Zielgens. Die aus dem Deletionsplasmid ausgeschnittene Resistenzkassette mit den entsprechenden Genflanken wird gemeinsam mit einem Cosmid, welches das Zielgen mit flankierenden Regionen einer Größe von mindestens ~3 kbp enthält, in den Zwischenwirt *E. coli* transformiert. Findet dort ein Austausch des Zielgens auf dem Cosmid gegen die Resistenzkassette statt, resultiert ein sogenanntes Deletionscosmid. Dieses besitzt nun die Resistenzkassette mit ausreichend großen Genflanken für eine effiziente homologe Rekombination in *P. anserina*. Durch Transformation des Deletionscosmids in Protoplasten des gewünschten Stammes und Selektion auf geeignetem Medium lassen sich Transformanten gewinnen, in deren Genom ein Austausch des Zielgens gegen die Resistenzkassette stattgefunden hat.

Das für die Deletion von *PaClpX* verwendete Deletionsplasmid pClpXKO1 (die Resistenzkassette dieses Plasmids enthält ein Phleomycin-Resistenzgen unter Kontrolle des konstitutiven *PaMT1*-Promotors und des *S. cerevisiae Cyc1*-Terminators), wurde in der vorangegangenen Diplomarbeit (Fischer 2011) auf Basis des Vektors pKO4 konstruiert (Hamann et al. 2005, Luce und Osiewacz 2009). Ebenso wurde im Rahmen der Diplomarbeit bereits das *PaClpX*-Deletionscosmid $\Delta 2E2$, ausgehend vom Wildtypcosmid 2E2 der *P. anserina* Cosmidbank (Osiewacz 1994), erfolgreich hergestellt (Fischer 2011). Obwohl bei mehrmaliger Transformation von $\Delta 2E2$ in Protoplasten des *P. anserina* Wildstammisolats s F18261⁻ Transformanten mit der erwarteten Resistenz erhalten wurden, hatte laut Southern-Blot-Analyse in keinem dieser Transformanten der gewünschte Austausch des *PaClpX*-Gens im Genom gegen die Resistenzkassette stattgefunden (Fischer 2011).

Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei weitere *PaClpX*-Deletionscosmide ($\Delta 4G8-9$ und $\Delta 4G8-10$), beide auf Basis des Wildtypcosmids 4G8, hergestellt und als korrekt verifiziert. Diese wurden unabhängig voneinander in Protoplasten des *P. anserina* Wildstammisolats s F18261⁻ transformiert. Insgesamt drei von elf mittels Southern-Blot-Analyse untersuchte, Phleomycin-resistente Transformanten, T9-5 (Transformante 5 mit $\Delta 4G8-9$), T10-10 (Transformante 10 mit $\Delta 4G8-10$) und T10-48 (Transformante 48 mit $\Delta 4G8-10$), zeigten den gewünschten Austausch des *PaClpX*-Gens gegen die Resistenzkassette (Abbildung 8a). Aus Kreuzungen mit dem Wildstammisolat s F18260⁺ wurden von allen drei

Ergebnisse

primären *PaClpX*-Deletionsstämmen Phleomycin-resistente, monokaryotische Nachkommen gegensätzlichen Kreuzungstyps isoliert (T9-5: $\Delta PaClpX$ F143722⁺ und $\Delta PaClpX$ F143721⁻; T10-10: $\Delta PaClpX$ F143770⁺ und $\Delta PaClpX$ F143771⁻; T10-48: $\Delta PaClpX$ F143811⁺ und $\Delta PaClpX$ F143810⁻).

Eine finale Southern-Blot-Analyse (Abbildung 8a) bestätigte die Abwesenheit des *PaClpX*-Wildtypgens und die Anwesenheit des Phleomycin-Resistenzgens in den primären *PaClpX*-Deletionsstämmen und ihren jeweiligen Nachkommen. Initiale Untersuchungen des Phänotyps der Nachkommen der drei verschiedenen *PaClpX*-Deletionsstämme zeigten, dass sie sich bezüglich ihrer Myzel-Morphologie, ihrer Wachsrates und ihrer Lebensspanne nicht auffällig voneinander unterscheiden. Daher wurde im Folgenden nur noch exemplarisch mit den Nachkommen F143722⁺ und F143721⁻ von $\Delta PaClpX$ T9-5 weitergearbeitet.

Zur Erzeugung eines *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstammes wurden die beiden Isolate $\Delta PaClpX$ F143722⁺ (ein Nachkomme von $\Delta PaClpX$ T9-5) und $\Delta PaClpP$ F81571⁻ miteinander gekreuzt. Da beim *PaClpP*-Deletionsstamm, genau wie bei $\Delta PaClpX$, das deletierte Wildtypgen gegen eine Resistenzkassette mit dem Phleomycin-Resistenzgen ausgetauscht ist, wurden die aus o. g. Kreuzung stammenden Isolate zur Identifizierung des gewünschten Doppeldeletionsstammes auf ihre Phleomycin-Resistenz überprüft. Sofern zwei der im Normalfall insgesamt vier zusammengehörigen dikaryotischen Sporen eines Ascus zu Phleomycin-resistenten Isolaten und die anderen beiden Sporen zu Phleomycin-sensitiven Isolaten führen, ist davon auszugehen, dass es sich bei den Phleomycin-resistenten Isolaten um *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstämme handelt.

Die aus den vier Sporen des analysierten Ascus Nr. 6 gewachsenen Isolate (6A – 6D) zeigten die erwartete Verteilung der Phleomycin-Resistenzen, d. h. die Isolate 6C und 6D waren Phleomycin-resistent, während die Isolate 6A und 6B Phleomycin-sensitiv waren. Daher wurden diese Isolate durch eine Southern-Blot-Analyse mit verschiedenen genspezifischen Hybridisierungssonden genauer untersucht (Abbildung 8b). Durch diese Analyse konnte bestätigt werden, dass es sich bei den Isolaten 6C und 6D tatsächlich um *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstämme handelt, die weder das *PaClpP*- noch das *PaClpX*-Wildtypgen besitzen. Aus einer Selbstung des heterokaryotischen Isolats $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ 6D wurden die Nachkommen $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ F156541⁺ und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ F156540⁻ isoliert, mit denen im Folgenden weitergearbeitet wurde. Zusätzlich wurden auch noch *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstämme aus einer Kreuzung der Isolate $\Delta PaClpX$ F143770⁺ (ein Nachkomme von $\Delta PaClpX$ T10-10) und $\Delta PaClpP$ F81571⁻ erzeugt und mittels Southern-Blot-Analyse verifiziert (Abbildung 8b), diese wurden jedoch für keine weiteren Experimente mehr eingesetzt.

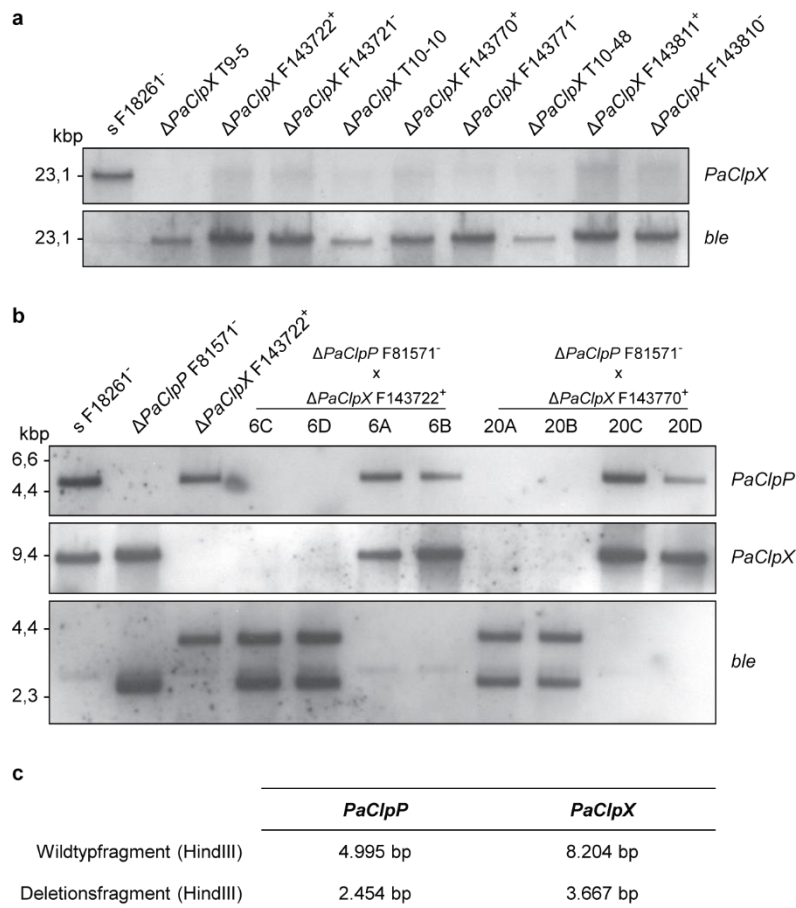


Abbildung 8 | Southern-Blot-Analysen zur Verifizierung des *PaClpX*-Deletionsstammes und des *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstammes. (a) Southern-Blot-Analyse mit je 500 ng Muni-verdauter genomischer DNA (gDNA) der angegebenen *PaClpX*-Deletionsstämme und der von ihnen abgeleiteten Isolate sowie des für die Herstellung der *PaClpX*-Deletionsstämme verwendeten Wildstammisolats s F18261⁻. Die DIG-markierte *PaClpX*-spezifische Hybridisierungssonde detektierte das 17.715 bp große *PaClpX*-Wildtypfragment nur in der gDNA des Wildstammisolats. Die DIG-markierte Hybridisierungssonde spezifisch für das Phleomycin-Resistenzgen (*ble*) der Deletionskassette detektierte wie erwartet ein 17.767 bp großes Fragment in der gDNA der verschiedenen primären *PaClpX*-Deletionsstämme und der von ihnen abgeleiteten Isolate. Dadurch wurde die Deletion von *PaClpX* in den entsprechenden Stämmen und Isolaten bestätigt. (b) Southern-Blot-Analyse mit je 1 µg HindIII-verdauter gDNA der angegebenen Isolate. Nach Detektion mit den jeweiligen DIG-markierten Hybridisierungssonden wurden die in (c) angegebenen Fragmente erwartet. Die aus der Kreuzung von $\Delta PaClpP$ F81571⁻ mit $\Delta PaClpX$ F134722⁺ gewonnenen Isolate 6C und 6D zeigten weder das *PaClpP*- noch das *PaClpX*-Wildtypfragment, dafür aber die erwarteten Deletionsfragmente mit dem Phleomycin-Resistenzgen. Damit handelt es sich bei diesen Isolaten um *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstämme. Die aus dem selben Ascus stammenden Isolate 6A und 6B wiesen entsprechend wieder beide Wildtypfragmente auf. Bei den aus der Kreuzung von $\Delta PaClpP$ F81571⁻ mit $\Delta PaClpX$ F134722⁺ gewonnenen Isolaten 20A und 20B handelt es sich ebenfalls um *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstämme.

Ergebnisse

4.1.3 Charakterisierung von $\Delta PaClpX$ und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$

Nach der erfolgreichen Herstellung von $\Delta PaClpX$ und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ wurden die Lebensspannen dieser Stämme bestimmt und mit denen des Wildstammes sowie des $PaClpP$ -Deletionsstammes verglichen (Abbildung 9a und Tabelle 21).

Tabelle 21 | **Übersicht der Lebensspannen und Wuchsraten von Wildstamm, $\Delta PaClpP$, $\Delta PaClpX$ und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$.** Angegeben sind die Mittelwerte der Lebensspannen \pm SEM in d und der Wuchsraten \pm SEM in cm d^{-1} sowie die jeweiligen P -Werte und Stichprobengrößen.

	Wildstamm	$\Delta PaClpP$	$\Delta PaClpX$	$\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$
Lebensspanne (d)	23,7 \pm 0,3	51,4 \pm 2,6	34,1 \pm 1,2	52,9 \pm 2,5
P -Wert*	-	2,3E-25	2,0E-18	3,0E-29
Wuchsrate (cm d^{-1})	0,58 \pm 0,00	0,59 \pm 0,01	0,59 \pm 0,00	0,57 \pm 0,01
P -Wert*	-	2,2E-01	2,3E-02	6,3E-01
	n = 70	n = 29	n = 46	n = 39

*Im Vergleich zum Wildstamm mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest

Dabei wurde festgestellt, dass die mittlere Lebensspanne von $\Delta PaClpX$ (34,1 \pm 1,2 d; n = 46; P = 2,0E-18 mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest) gegenüber der des Wildstammes (23,7 \pm 0,3 d; n = 70) signifikant verlängert war, jedoch war dieser lebensverlängernde Effekt nicht so ausgeprägt wie beim $PaClpP$ -Deletionsstamm (51,4 \pm 2,6 d; n = 29; P = 2,3E-25 mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest).

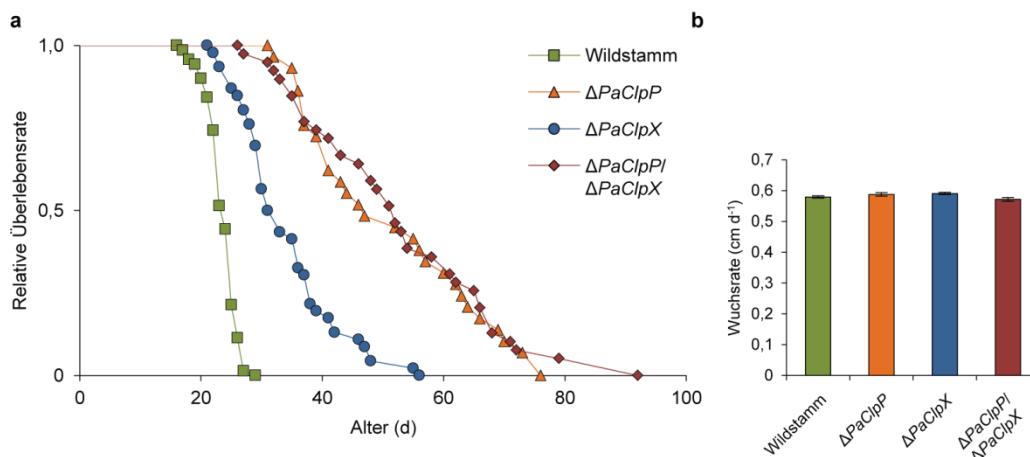


Abbildung 9 | **Lebensspannen und Wuchsraten der verschiedenen *P. anserina* CLP-Protease Mutanten im Vergleich zum Wildstamm.** (a) Lebensspannen des Wildstammes (n = 70) sowie der Deletionsstämme $\Delta PaClpP$ (n = 29), $\Delta PaClpX$ (n = 46) und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ (n = 39). Während die mittlere und maximale Lebensspanne des $PaClpX$ -Deletionsstammes (34,1 \pm 1,2; P = 2,0E-18) gegenüber denen des Wildstammes (23,7 \pm 0,3) signifikant nur leicht verlängert waren, zeigten sowohl $\Delta PaClpP$ (51,4 \pm 2,6; P = 2,3E-25) wie auch $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ (52,9 \pm 2,5; P = 3,0E-29) eine deutlicher ausgeprägte signifikante Langlebigkeit. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM der Lebensspannen in d. Die P -Werte wurden im Vergleich zum Wildstamm mit dem zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt. (b) Die Wuchsraten des Wildstammes (0,58 \pm 0,00; n = 70) sowie von $\Delta PaClpP$ (0,59 \pm 0,01; n = 29; P = 2,2E-01), $\Delta PaClpX$ (0,59 \pm 0,00; n = 46; P = 2,3E-02) und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ (0,57 \pm 0,01; n = 39; P = 6,3E-01) unterschieden sich nicht auffällig voneinander. Angegeben und dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Wuchsraten in cm d^{-1} . P -Werte wurden ermittelt wie in (a).

Der Doppeldeletionsstamm $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ hingegen hatte eine verlängerte mittlere Lebensspanne (52,9 \pm 2,5 d; n = 39; P = 3,0E-29), die nahezu identisch mit der von $\Delta PaClpP$ war. Zusätzlich wurden auch noch die Wuchsraten aller Stämme untersucht (Abbildung 9b und

Tabelle 21), diese waren jedoch nicht auffällig voneinander unterschieden. Somit hat die Abwesenheit von PaCLPX zwar einen tendenziell ähnlichen, aber nicht denselben Effekt auf die Lebensspanne von *P. anserina* wie die Abwesenheit von PaCLPP. Der naheliegende Schluss aus dieser Beobachtung ist, dass PaCLPX Funktionen hat, die von der Interaktion mit PaCLPP im Kontext der PaCLXP-Protease unabhängig sind. Ebenso könnte natürlich auch PaCLPP theoretisch Funktionen besitzen, die von PaCLPX unabhängig sind. Zusätzlich lässt sich aus den erhaltenen Ergebnissen folgern, dass die Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ nicht durch autonome Funktion von PaCLPX vermittelt wird, da die beiden Stämme $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ eine identische Lebensverlängerung aufweisen.

4.1.4 Komplementation von $\Delta PaClpX$ mit dem menschlichem CLPX-Homolog

Die heterologe Expression der menschlichen *ClpP*-cDNA in $\Delta PaClpP$ führt nachweislich zur Ausbildung des proteolytischen HsCLPP-Kernzylinders in den pilzlichen Mitochondrien des resultierenden transgenen Stammes ($\Delta PaClpP/HsClpP_OEx$) und zu einer nahezu vollständigen Reversion des ausgeprägten langlebigen Phänotyps des *PaClpP*-Deletionsstammes. Folglich sind die Serinproteasen CLPP des Menschen und von *P. anserina* funktionell homolog (Fischer 2011, Fischer et al. 2013). Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, führt auch die Deletion von *PaClpX* zu einer Verlängerung der Lebensspanne. Daraus ergab sich die Möglichkeit zu überprüfen, ob ebenfalls eine funktionelle Homologie zwischen PaCLPX und HsCLPX besteht. Sollte dies der Fall sein, so wäre eine Reversion der Langlebigkeit von $\Delta PaClpX$ in Anwesenheit des menschlichen CLPX-Chaperons zu erwarten.

Zur heterologen Expression von *HsClpX* im *PaClpX*-Deletionsstamm wurde das Plasmid pHsClpXEx1 konstruiert. Dieses enthält u. a. den vollständigen offenen Leserahmen (engl. „open reading frame“, ORF) der *HsClpX*-cDNA unter Kontrolle des *PaMT1*-Promotors und -Terminators und ein Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen zur Selektion in *P. anserina* (Abbildung 10a). Dieses Plasmid wurde in Protoplasten des Isolats $\Delta PaClpX$ F143721 transformiert. Dabei wurden insgesamt sieben Hygromycin-resistente Transformanten erhalten. Da alle Transformanten laut einer ersten vorläufigen Southern-Blot-Analyse eine Mehrfachintegration des Plasmids aufwiesen, wurden drei beliebige Transformanten ($\Delta PaClpX/HsClpX$ T4, T6 und T7) ausgewählt und weiter analysiert. Hier exemplarisch gezeigt sind nur die Ergebnisse für die Transformante $\Delta PaClpX/HsClpX$ T4. Zunächst wurde die Integration von pHsClpXEx1 in das Genom von $\Delta PaClpX/HsClpX$ T4 durch eine weitere unabhängige Southern-Blot-Analyse bestätigt (Abbildung 10b). Das Vorhandensein des HsCLPX-Proteins in den Mitochondrien von $\Delta PaClpX/HsClpX$ T4 wurde durch eine Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 10c).

Ergebnisse

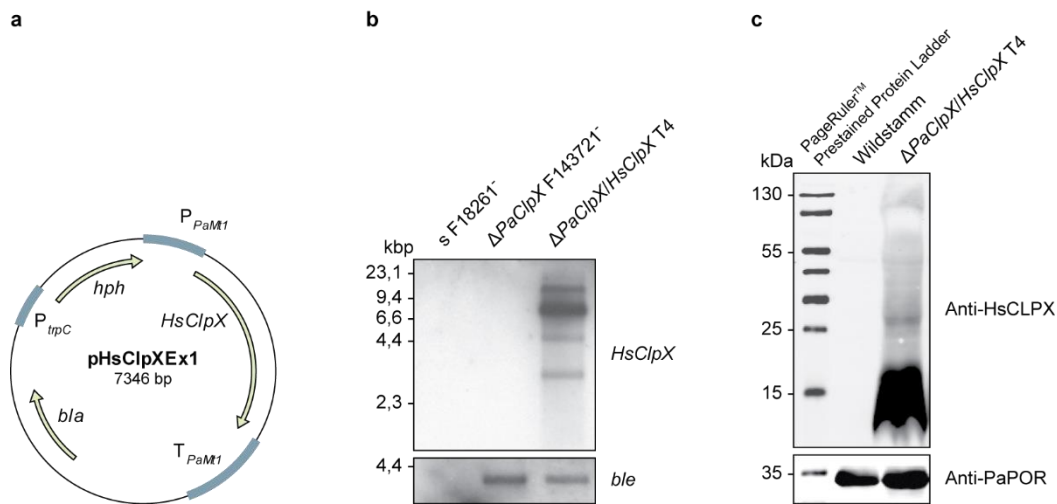


Abbildung 10 | **Expression des menschlichen *ClpX*-Gens im *PaClpX*-Deletionsstamm.** (a) Das 7346 bp große Plasmid pHsClpXEX1 wurde zur Transformation von $\Delta PaClpX$ -Protoplasten verwendet. Es enthält den vollständigen offenen Leserahmen der *HsClpX*-cDNA unter Kontrolle des konstitutiven *PaMT1*-Promotors (P_{PaMT1}) und des *PaMT1*-Terminators (T_{PaMT1}). *bla*, β -Lactamase-Gen; *hph*, Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen; P_{trpC} , *trpC*-Promotor. (b) Southern-Blot-Analyse mit je 500 ng HindIII-verdauter gDNA der angegebenen Isolate. Das Isolat $\Delta PaClpX$ F143721 diente zur Gewinnung von $\Delta PaClpX$ -Protoplasten, welche mit dem Plasmid pHsClpXEX1 transformiert wurden. Die aus dieser Transformation resultierende Primärtransformante $\Delta PaClpX/HsClpX$ T4 zeigte, nach Detektion mit einer DIG-markierten und *HsClpX*-spezifischen Hybridisierungssonde, mehrere Integrationen von pHsClpXEX1. Das vergleichsweise starke Signal zwischen 6557 bp und 9416 bp ist ein Hinweis auf eine Tandemintegration des 7346 bp großen Plasmids, welches eine HindIII-Schnittstelle besitzt. Zusätzlich wurde eine *ble*-spezifische Hybridisierungssonde verwendet, um als Kontrolle das *PaClpX*-Deletionsfragment nachzuweisen. (c) Western-Blot-Analyse nach SDS-PAGE mit je 100 μ g mitochondrialer Proteinextrakte des Wildstammes und der Primärtransformante $\Delta PaClpX/HsClpX$ T4. Der verwendete HsCLPX-Antikörper detektierte nicht, wie theoretisch erwartet, das reife HsCLPX-Protein mit einer vorhergesagten Masse von ~ 63 kDa im Extrakt aus $\Delta PaClpX/HsClpX$ T4, sondern lieferte nur Signale im Bereich von $\sim 10 - 20$ kDa. Dies weist auf einen Abbau bzw. eine grundlegende Instabilität von HsCLPX in *P. anserina* Mitochondrien hin. Das mitochondriale Membranprotein Porin (PaPOR) wurde als Ladekontrolle detektiert. Als Massestandard wurden 1,5 μ l des Markers „Pageruler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen.

Hierbei zeigte sich, dass das reife HsCLPX-Protein mit einer *in silico* vorhergesagten Masse von ~ 63 kDa in dem mitochondrialen Proteinextrakt der Transformante nicht nachzuweisen war. Tatsächlich lieferte der verwendete HsCLPX-Antikörper nur Signale in einem Bereich von $\sim 10 - 20$ kDa. Bei einer zusätzlichen Western-Blot-Analyse mitochondrialer Proteinextrakte der Transformanten $\Delta PaClpX/HsClpX$ T6 und T7 wurden identische Ergebnisse erhalten. Dies spricht dafür, dass das Chaperon HsCLPX in den Mitochondrien von *P. anserina* nicht stabil ist. Da deshalb eine Komplementation von $\Delta PaClpX$ mit HsCLPX also offensichtlich nicht möglich ist, wurden die Transformanten nicht weiter untersucht.

4.2 Etablierung einer Methode für Identifizierung von Substraten und Interaktionspartnern der CLXP-Protease in *P. anserina*

Die bisher beschriebenen Experimente dienten hauptsächlich zur Fortführung der bereits in der Diplomarbeit begonnenen Charakterisierung des *PaClpP*-Deletionsstammes und einer initialen Untersuchung der Bedeutung des PaCLPX-Chaperons. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war jedoch die Charakterisierung des Substratspektrums und Interaktoms

der mitochondrialen CLXP-Protease in *P. anserina*. Die Methode, die für diesen Zweck in *P. anserina* etabliert werden sollte, wird als CLPP „Substrat-trapping Assay“ bezeichnet und wurde bereits mehrfach erfolgreich für die Identifizierung von Substraten bakterieller CLP-Proteasen angewandt. Entwickelt wurde dieser Assay Anfang der 2000er Jahre in den Laboren von Robert T. Sauer und Tania A. Baker am „Massachusetts Institute of Technology“, um Substrate der *E. coli* CLXP-Protease zu identifizieren (Flynn et al. 2003).

Grundsätzlich basiert der CLPP „Substrat-trapping Assay“ auf der Beobachtung, dass proteolytisch inaktive CLP-Proteasen immer noch in der Lage sind Substratproteine zu erkennen, zu denaturieren und in die innere Kammer des CLPP-Kernzylinders zu translozieren. Dort können diese jedoch nicht mehr abgebaut werden und werden auch nur sehr langsam wieder retrotransloziert bzw. freigesetzt (Kim et al. 2000, Singh et al. 2000). Für die praktische Durchführung des Assay wird zunächst in eine *ClpP*-Deletionsmutante eine rekombinante CLPP-Variante eingebracht, die durch Mutation ihres katalytischen Serin inaktiviert ist und meist zusätzlich noch mit einem Affinitätsmarker für eine spätere Aufreinigung versehen ist (hier allgemein als „CLPP^{TRAP}“ bezeichnet). Wenn CLPP^{TRAP} noch in der Lage ist den 14-mer CLPP-Kernzylinder zu bilden und mit CLP-ATPase Hexameren zu interagieren, dann können Proteine *in vivo* zwar immer noch in die innere Kammer der CLP-Protease transloziert, aber dort aufgrund der katalytischen Inaktivierung von CLPP nicht mehr abgebaut werden (Abbildung 11).

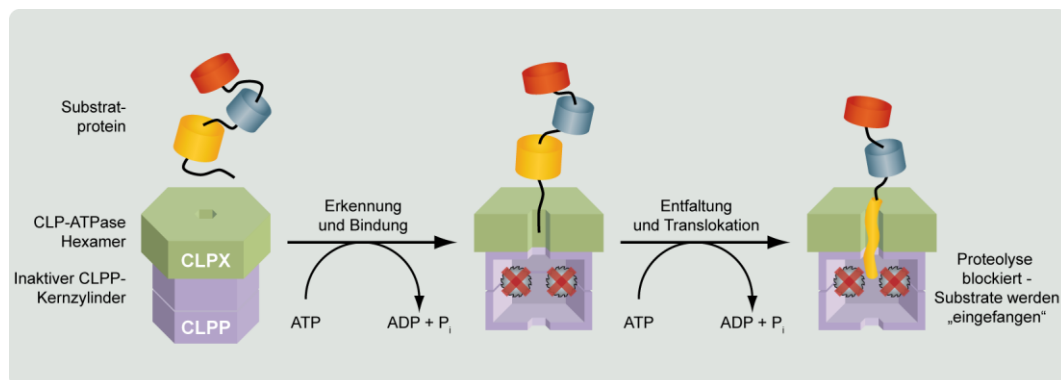


Abbildung 11 | **Allgemeines Prinzip des CLPP „Substrat-trapping Assay“.** Sofern die Mutation des katalytischen Serin von CLPP die Assemblierung des CLPP-Kernzylinders und seine Interaktion mit der Chaperon-Komponente (hier: ein CLPX-Hexamer) nicht stört, sollte weiterhin eine vollständige, jedoch proteolytisch inaktive, CLP-Protease ausgebildet werden. Diese ist immer noch in der Lage, Substratproteine zu erkennen, zu entfalten und in die innere Kammer zu translozieren. Da aber die eigentliche Proteolyse blockiert ist, werden die Substrate nicht mehr abgebaut, sondern letztlich im inaktiven CLPP-Kernzylinder „eingefangen“.

Somit werden Substratproteine also von CLPP^{TRAP} „eingefangen“, worauf sich auch die Bezeichnung dieser Methode als „Substrat-trapping Assay“ bezieht. Durch eine Aufreinigung von CLPP^{TRAP} unter nativen Bedingungen und anschließender proteomischer Analyse der ko-aufgereinigten Proteine können somit potenzielle Substratproteine von CLP-Proteasen identifiziert werden. Mit Hilfe des CLPP „Substrat-trapping Assay“ wurden bereits mehr als 100

Ergebnisse

intrazelluläre Substrate der *E. coli* CLPXP-Protease (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006) und auch zahlreiche Substrate anderer CLP-Proteasen, z. B. von CLPXP aus *C. crescentus* (Bhat et al. 2013) und CLPCP aus *S. aureus* (Feng et al. 2013), gefunden. Dass es sich bei den meisten der auf diese Weise identifizierten Proteine tatsächlich um Substrate von CLP-Proteasen handelt, wurde für ausgewählte Kandidaten durch *in vivo* oder *in vitro* Degradationsassays unabhängig validiert.

Die Implementierung dieses Assay für die mitochondriale CLPXP-Protease in *P. anserina* sollte eine umfassende und unvoreingenommene Identifizierung zumindest ihrer häufigsten Substrate ermöglichen. Zusätzlich könnten bei Verwendung geeigneter Kontrollen auch spezifische Interaktionspartner von CLPP in *P. anserina* untersucht werden. Dafür würde es sich etwa anbieten, zusätzlich eine Aufreinigung von aktiver Wildtyp-CLPP (CLPP^{WT}) durchzuführen. Durch Vergleich der jeweils spezifisch zusammen mit CLPP^{TRAP} und CLPP^{WT} ko-aufgereinigten Proteine sollten sich potenzielle CLPP-Interaktionspartner und CLPXP-Substrate differenzieren lassen (siehe auch Abschnitt 4.3 ff.). Kurz zusammengefasst sind die notwendigen Bedingungen für eine erfolgreiche Durchführung des CLPP-„Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* wie folgt:

- Die verwendete katalytisch inaktive CLPP-Variante muss weiterhin in der Lage sein den CLPP-Kernzylinder zu bilden, damit darin Substrate eingefangen werden können
- Es muss möglich sein, CLPP aus *P. anserina* Mitochondrien effizient aufzureinigen – entweder auf direktem Wege durch Immunpräzipitation oder unter Verwendung eines Affinitätsmarkers (sofern die Aufreinigung von CLPP einen Affinitätsmarker benötigt, darf dieser die Funktion von CLPP nicht stören)
- Damit eingefangene CLPXP-Substrate und/oder CLPP-Interaktionspartner durch eine massenspektrometrische Analyse zweifelsfrei identifiziert werden können, muss die Aufreinigung ausreichend spezifisch sein

Obwohl bereits viele grundlegende molekularbiologische und genetische Methoden für die Anwendung in *P. anserina* etabliert sind (Osiewacz et al. 2013), wurde eine Aufreinigung von Proteinen aus isolierten Mitochondrien dieses Organismus (weder durch Immunpräzipitation noch mittels eines Affinitätsmarkers) bisher nicht durchgeführt. Daher mussten im Folgenden zunächst die notwendigen technischen Voraussetzungen für einen CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* etabliert werden.

4.2.1 Herstellung und Charakterisierung von *PaClpP*-Deletionsstämmen mit katalytisch inaktiven CLPP-Varianten

Neben der Möglichkeit CLPP effizient aufzureinigen, ist die entscheidende Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ eine katalytische

Inaktivierung von CLPP. Daher wurden als erstes Plasmide konstruiert, welche für katalytisch inaktive Varianten von PaCLPP und HsCLPP kodieren. Das Plasmid pPaClpP^{S135A}Ex1 enthält das vollständige *PaClpP*-Gen unter Kontrolle des geneigenen Promotors und Terminators (Abbildung 12a). Die katalytische Inaktivierung von PaCLPP erfolgte durch Austausch des Codons, welches für das katalytische Serin an Aminosäureposition 135 des Prä-Proteins kodiert, gegen ein Alanin-kodierendes Codon. Das Plasmid pHsClpP^{S153A}Ex1 enthält den vollständigen ORF der *HsClpP*-cDNA unter Kontrolle des *PaMT1*-Promotors und -Terminators (Abbildung 12b). Es wurde ebenfalls das Codon kodierend für das katalytische Serin (an Aminosäureposition 153 des Prä-Proteins) gegen ein Alanin-kodierendes Codon ausgetauscht. Beide Plasmide enthalten u. a. zusätzlich noch das Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen zur Selektion in *P. anserina*.

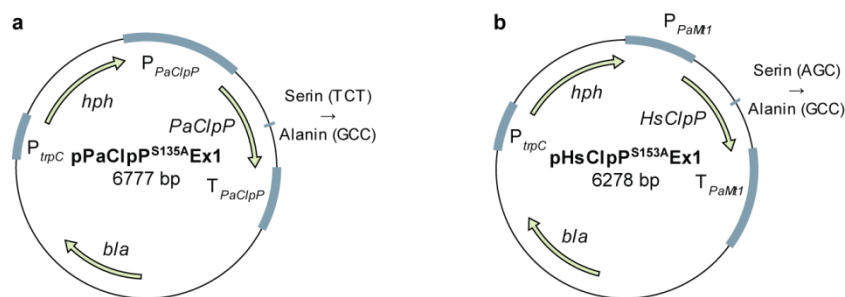


Abbildung 12 | **Plasmide kodierend für katalytisch inaktive Varianten von PaCLPP und HsCLPP.** (a) Das 6777 bp große Plasmid pPaClpP^{S135A}Ex1 enthält das vollständige *PaClpP*-Gen unter Kontrolle des geneigenen Promotors (P_{PaClpP}) und Terminators (T_{PaClpP}). Das Codon kodierend für das katalytische Serin (TCT) an der Aminosäureposition 135 wurde gegen ein Codon kodierend für Alanin (GCC) ausgetauscht. *bla*, β -Lactamase-Gen; *hph*, Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen; P_{trpC} , *trpC*-Promotor. (b) Das 6278 bp große Plasmid pHsClpP^{S153A}Ex1 enthält den vollständigen ORF der *HsClpP*-cDNA unter Kontrolle des konstitutiven *PaMT1*-Promotors (P_{PaMT1}) und des *PaMT1*-Terminators (T_{PaMT1}). Das Codon kodierend für das katalytische Serin (AGC) an der Aminosäureposition 153 wurde gegen ein Codon kodierend für Alanin (GCC) ausgetauscht.

Die Plasmide pPaClpP^{S135A}Ex1 und pHsClpP^{S153A}Ex1 wurden unabhängig voneinander in Protoplasten des Isolats $\Delta PaClpP$ F81571⁻ transformiert. Alle erhaltenen Hygromycin-resistenten Transformanten hatten laut einer ersten Southern-Blot-Analyse das jeweilige Plasmid mehrfach in ihr Genom integriert. Daher wurde je ein beliebiger Primärtransformant ($\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A}$ T8 bzw. $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A}$ T3) ausgewählt und weiter analysiert. Aus einer Kreuzung von $\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A}$ T8 bzw. $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A}$ T3 mit dem Isolat $\Delta PaClpP$ F135001⁺ wurden Hygromycin-resistente Nachkommen isoliert, die weiterhin Integrationen des jeweiligen Plasmids aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Um die Anwesenheit der jeweiligen inaktiven CLPP-Variante in den Mitochondrien der neu hergestellten Stämme zu überprüfen, wurden Western-Blot-Analysen mit mitochondrialen Proteinextrakten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass PaCLPP^{S135A} in den Mitochondrien von $\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A}$ T8 und der Nachkommen $\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A}$ F158570⁺ und $\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A}$ F158572⁻ dieser Transformante zwar durch einen PaCLPP-Antikörper

Ergebnisse

nachgewiesen werden konnte, jedoch größer als Wildtyp-PaCLPP erschien (Abbildung 13a). Da für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ die Ausbildung eines CLPP-Kernzylinders durch die inaktive CLPP-Variante entscheidend ist, wurde zusätzlich mittels BN-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse untersucht, ob PaCLPP^{S135A} noch zur Oligomerisierung fähig ist (Abbildung 13b). Während im mitochondrialen Proteinextrakt des Wildstammes zwei distinkte Oligomere von PaCLPP, das PaCLPP-Heptamer und der aus zwei Heptameren gebildete PaCLPP-Kernzylinder, vorhanden waren, ließen sich im Extrakt aus $\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A}$ T8 keinerlei Oligomere von PaCLPP^{S135A} nachweisen. Um technische Fehler auszuschließen, wurde das Experiment noch mehrmals wiederholt, jedoch immer mit dem gleichem Ergebnis. Offensichtlich ist die proteolytisch inaktive Variante von PaCLPP also nicht mehr in der Lage einen stabilen CLPP-Kernzylinder auszubilden und damit vermutlich auch nicht geeignet, um für einen CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* verwendet zu werden. Die gegenüber Wildtyp-PaCLPP gesteigerte Größe des PaCLPP^{S135A}-Monomers weist auf eine autokatalytische Prozessierung von PaCLPP hin, die möglicherweise Voraussetzung für die Oligomerisierung des Proteins ist.

Als Kontrolle für die Western-Blot-Analysen der mitochondrialen Proteinextrakte von $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A}$ T3 und der Nachkommen $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A}$ F158860⁺ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A}$ F158861⁻ dieser Transformante diente der in der Diplomarbeit hergestellte Stamm $\Delta PaClpP/HsClpP_OEx$ (Fischer 2011). Die katalytisch inaktive Variante von HsCLPP (HsCLPP^{S153A}) zeigte keine Änderung ihrer Größe verglichen mit Wildtyp-HsCLPP (Abbildung 13c). Darüber hinaus ließen sich HsCLPP^{S153A}-Oligomere nachweisen, die den von Wildtyp-HsCLPP gebildeten Oligomeren entsprachen (Abbildung 13d). Als Nachweis für die katalytische Inaktivität von HsCLPP^{S153A} wurde die Lebensspanne des Stammes $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A}$ untersucht (Abbildung 13e). Die heterologe Expression der Wildtyp-*HsClpP*-cDNA in $\Delta PaClpP$ führt, wie bereits erwähnt, im resultierenden Stamm $\Delta PaClpP/HsClpP_OEx$ zu einer nahezu vollständigen Reversion des langlebigen Phänotyps des *PaClpP*-Deletionsstammes (Fischer 2011). Im Gegensatz dazu war die mittlere Lebensspanne von $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A}$ ($70,5 \pm 12,8$ d; n = 6; $P = 3,7E-05$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest) verglichen mit der des Wildstammes ($28,2 \pm 0,7$ d; n = 15) immer noch verlängert und dies in ähnlichem Maße wie die mittlere Lebensspanne des *PaClpP*-Deletionsstammes ($61,3 \pm 4,3$ d; n = 15; $P = 1,3E-08$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest). Die Lebensspanne von $\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A}$ wurde der Vollständigkeit halber ebenfalls untersucht. Auch dieser Stamm wies eine verlängerte Lebensspanne auf ($63,9 \pm 8,8$ d; n = 8; $P = 1,2E-05$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest), die der von $\Delta PaClpP$ entsprach.

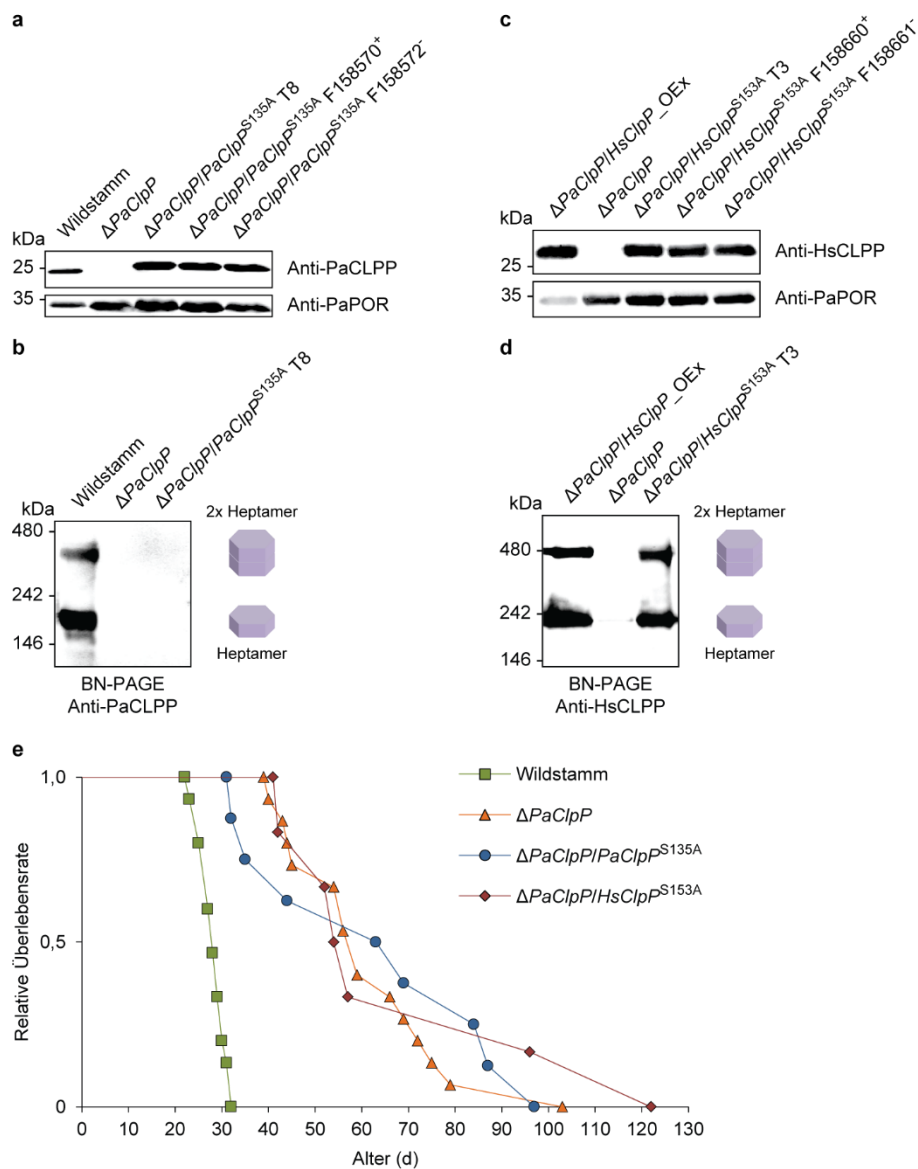


Abbildung 13 | **Analyse der Stämme $\Delta PaClp/PaClp^{S135A}$ und $\Delta PaClp/HsClp^{S153A}$.** (a) Western-Blot-Analyse nach SDS-PAGE mit je 100 μ g mitochondrialer Proteinextrakte der angegebenen Stämme und Isolate. Wildtyp-PaCLPP und PaClp^{S135A} wurden mit einem PaCLPP-Antikörper detektiert. Die vorhergesagte Masse des reifen PaCLPP-Proteins ist ~ 25 kDa. Die katalytisch inaktive PaCLPP-Variante in den Extrakten aus $\Delta PaClp/PaClp^{S135A}$ T8 und den abgeleiteten Isolaten erschien etwas größer als PaCLPP im Wildstamm-Extrakt. Porin wurde als Ladekontrolle detektiert. (b) Western-Blot-Analyse nach BN-PAGE mit je 300 μ g mitochondrialer Proteinextrakte der angegebenen Stämme. Der verwendete PaCLPP-Antikörper detektierte zwei distinkte PaCLPP-Oligomere, das PaCLPP-Heptamer (Signal bei ~ 200 kDa) und den PaCLPP-Kernzylinder aus zwei Heptameren (Signal bei ~ 400 kDa), nur im Wildstamm-Extrakt. Im Extrakt aus $\Delta PaClp/PaClp^{S135A}$ T8 waren keine entsprechenden Signale nachweisbar. (c) Western-Blot-Analyse mit den angegebenen Stämmen und Isolatene wie in (a). Wildtyp-HsCLPP und HsClp^{S153A} wurden mit einem HsCLPP-Antikörper detektiert. Die vorhergesagte Masse des reifen HsCLPP-Proteins ist ~ 24 kDa. Das tatsächliche Wildtyp-HsCLPP-Signal lag bei dieser und allen folgenden Analysen bei > 25 kDa. Es waren keine Größenunterschiede zwischen Wildtyp-HsCLPP und der katalytisch inaktiven HsCLPP-Variante zu beobachten. Porin wurde als Ladekontrolle detektiert. (d) Western-Blot-Analyse mit den angegebenen Stämmen wie in (b). Der verwendete HsCLPP-Antikörper detektierte zwei distinkte HsCLPP-Oligomere, das HsCLPP-Heptamer (Signal bei ~ 240 kDa) und den HsCLPP-Kernzylinder aus zwei Heptameren (Signal bei ~ 480 kDa), sowohl in den Extrakten aus $\Delta PaClp/HsClp$ _OEx wie auch aus $\Delta PaClp/HsClp^{S153A}$. (e) Lebensspannen des Wildstammes ($28,2 \pm 0,7$; $n = 15$) sowie von $\Delta PaClp$ ($61,3 \pm 4,3$; $n = 15$; $P = 1,3E-08$), $\Delta PaClp/PaClp^{S135A}$ ($63,9 \pm 8,8$; $n = 8$; $P = 1,2E-05$) und $\Delta PaClp/HsClp^{S153A}$ ($70,5 \pm 12,8$; $n = 6$; $P = 3,7E-05$). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM der Lebensspannen in d. Die P -Werte wurden im Vergleich zum Wildstamm mit dem zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

Ergebnisse

Zusammenfassend scheint die durch Mutation des katalytischen Serin zu Alanin inaktivierte PaCLPP-Variante PaCLPPS^{135A} nicht für einen CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* geeignet zu sein, da sie nicht mehr zum 14-mer CLPP-Kernzylinder assembliert. Die inaktive Variante der menschlichen CLPP hingegen erfüllt scheinbar alle Voraussetzungen, um für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* verwendet zu werden. So erscheint HsCLPPS^{153A} gegenüber Wildtyp-HsCLPP unverändert, assembliert weiterhin zu dem 14-mer HsCLPP-Kernzylinder und führt trotzdem nicht zu einer Reversion der Lebensspanne von $\Delta PaClpP$, wodurch der Erfolg der katalytischen Inaktivierung bestätigt ist.

4.2.2 Aufreinigung verschiedener CLPP-Varianten aus *P. anserina* Mitochondrien

Neben der katalytischen Inaktivierung von CLPP ist eine weitere unabdingbare Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung des CLPP „Substrate-trapping Assay“ die möglichst effiziente und saubere Aufreinigung von CLPP. Dies ist notwendig, um die spezifisch zusammen mit CLPP ko-aufgereinigten Substratproteine bzw. Interaktionspartner verlässlich von unspezifisch ko-aufgereinigten Hintergrundproteinen unterscheiden zu können. Im konkreten Fall sollte die Aufreinigung von CLPP aus isolierten Mitochondrien von *P. anserina* erfolgen. Die wohl direkteste Herangehensweise um ein gewünschtes Zielprotein aufzureinigen, ist dessen Immunpräzipitation mit geeigneten Antikörpern.

4.2.2.1 Immunpräzipitation von menschlicher CLPP

Wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben erfüllt HsCLPPS^{153A} scheinbar alle Voraussetzungen für den „CLPP Substrat-trapping Assay“. Außerdem sind zahlreiche HsCLPP-Antikörper kommerziell erhältlich, so dass zunächst eine Immunpräzipitation (IP) von HsCLPPS^{153A} aus *P. anserina* Mitochondrien versucht wurde. Insgesamt wurden dafür vier verschiedene HsCLPP-Antikörper getestet (Santa Cruz Biotechnology: sc-47845 und sc-47846; Abcam: ab56455 und ab124822). Hier gezeigt ist je eine exemplarische IP mit den beiden Antikörpern sc-47845 und sc-47846.

Um die IP von HsCLPP aus isolierten Mitochondrien durchzuführen, wurden die entsprechenden Antikörper zunächst an „Dynabeads® Protein G for Immunoprecipitation“ (Thermo Fisher Scientific) gebunden. Die erfolgte Bindung der Antikörper an die verwendeten Beads wurde durch eine Western-Blot-Analyse bestätigt (Abbildung 14a, c). Für die eigentliche IP wurden je Experiment 500 µg Mitochondrien des Stammes $\Delta PaClpP/HsClpPS^{153A}$ in IP-Puffer aufgenommen, mit Digitonin lysiert und mit den Antikörper-Beads gemischt (Details zur Durchführung der IP von HsCLPP aus *P. anserina* Mitochondrien sind dem Methodenteil zu entnehmen). Um die Effizienz der IP zu überprüfen wurden die verschiedenen IP-Fractionen durch eine Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 14b, d). Dabei zeigte sich, dass nahezu keine Bindung von HsCLPP an die Antikörper-Beads erfolgte.

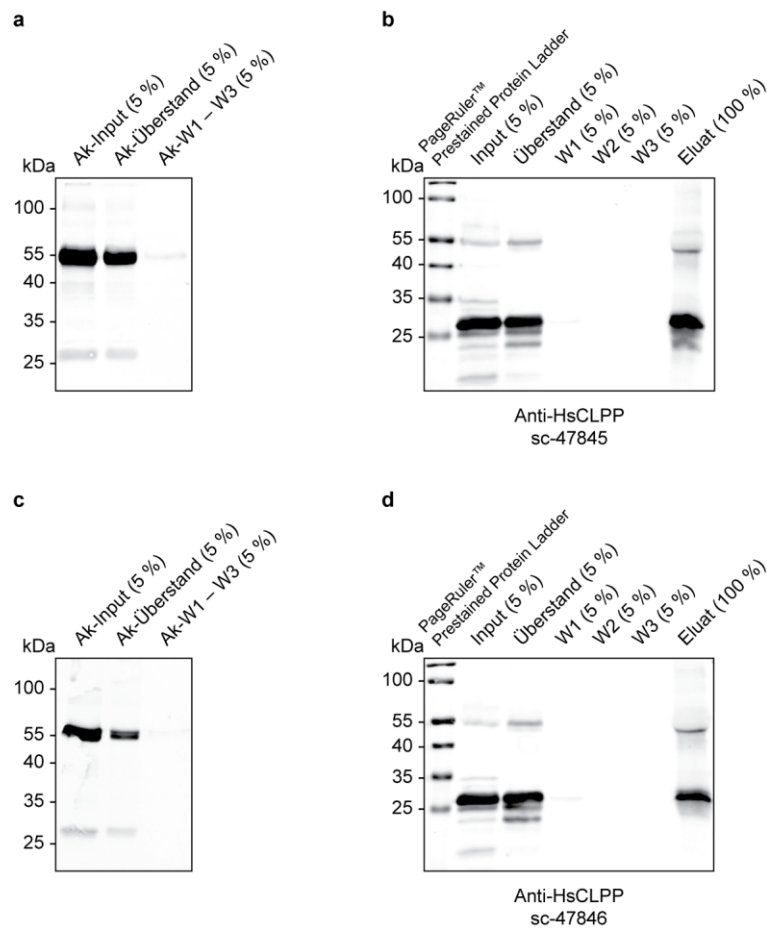


Abbildung 14 | **Immunpräzipitation von HsCLPP aus Mitochondrien.** (a) Kontrolle der Bindung des für die IP eingesetzten HsCLPP-Antikörpers an „Dynabeads® Protein g for Immunoprecipitation“ (Thermo Fisher Scientific). 15 µg des HsCLPP-Antikörpers sc-47845 (Santa Cruz Biotechnology) in einem Gesamtvolumen von 250 µl Puffer (Ak-Input) wurden mit 50 µl der verwendeten Beads für eine Stunde inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen (Ak-Überstand) und die Beads dreimal gewaschen (Ak-W1 – W3). Jeweils 5 % (v/v) von Ak-Input, Ak-Überstand und Ak-W1 – W3 wurden für eine SDS-PAGE und anschließende Western-Blot-Analyse mit einem geeigneten Sekundärantikörper eingesetzt, um die leichten (bei ~25 kDa) und schweren Ketten (bei ~50 kDa) des Antikörpers zu visualisieren. Die Signalintensität nahm in der Fraktion Ak-Überstand im Vergleich zur Fraktion Ak-Input deutlich ab, in der Fraktion AK-W1 – W3 war nur ein schwaches Signal zu beobachten. Folglich wurde der eingesetzte Antikörper an die Beads gebunden. (b) Immunpräzipitation von HsCLPP aus 500 µg mit Digitonin lysierten Mitochondrien des Stammes $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A}$ unter Verwendung der Antikörper-Beads aus (a). Jeweils 5 % (v/v) des Inputs, des Überstandes, der Waschfraktionen 1 – 3 (W1, W2 und W3) sowie 100 % des Eluats wurden für eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse mit dem HsCLPP-Antikörper sc-47845 eingesetzt. Als Massestandard wurden 1,5 µl des Markers „Pageruler™ Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. Es erfolgte nahezu keine Bindung von HsCLPP an die Beads (vergleiche Input und Überstand). Entsprechend war trotz Auftragung des gesamten Eluats in diesem nur eine verhältnismäßig geringe HsCLPP-Menge nachweisbar. (c) Bindung des für eine weitere IP eingesetzten HsCLPP-Antikörpers sc-47846 an „Dynabeads® Protein g for Immunoprecipitation“ wie in (a). Auch hier konnte eine Bindung des Antikörpers an die Beads festgestellt werden. (d) Immunpräzipitation mit den Antikörper-Beads aus (c) und anschließende Western-Blot-Analyse wie in (b) mit dem HsCLPP-Antikörper sc-47846. Es erfolgte ebenfalls nahezu keine Bindung von HsCLPP an die Beads (vergleiche Input, Überstand und Eluat).

Ergebnisse

Da auch bei Verwendung der anderen Antikörper (Abcam: ab56455 und ab124822) und/oder Abwandlung der experimentellen Bedingungen keine effiziente IP von HsCLPP erreicht werden konnte, wurde diese Herangehensweise verworfen. Als alternative Strategie zur Aufreinigung von CLPP aus isolierten Mitochondrien wurden im weiteren Verlauf mehrere rekombinante CLPP-Varianten mit unterschiedlichen C-terminalen Affinitätsmarkern bezüglich ihrer Verwendbarkeit für einen CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* geprüft.

4.2.2.2 Aufreinigung rekombinanter CLPP-Varianten mit 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker

Für den ersten in *E. coli* durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ wurde eine C-terminal mit einem 6xHis-TEV-3xMyc-Marker versehene Variante von EcCLPP verwendet (Flynn et al. 2003). Aufgrund seiner besseren Effizienz für Affinitätsaufreinigungen (Li 2010) wurde in einer Folgearbeit der Strep-tag II-Marker anstelle des 3xMyc-Markers für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ benutzt (Neher et al. 2006), d. h. es kam ein 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker (hier als „6HTS“ abgekürzt) zum Einsatz. Daher wurde zunächst die Verwendbarkeit dieses Affinitätsmarkers in *P. anserina* geprüft. Obwohl die Untersuchungen der inaktiven PaCLPP-Variante dafür sprachen, dass diese für einen CLPP „Substrat-trapping Assay“ nicht geeignet ist (siehe Abschnitt 4.2.1), wurden für die Aufreinigung von CLPP aus *P. anserina* Mitochondrien über einen 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker sowohl HsCLPP als auch PaCLPP verwendet. Da bisher in *P. anserina* noch nie erfolgreich eine Aufreinigung eines mit einem Affinitätsmarker versehenen Fusionsproteins durchgeführt wurde, sollte zur Kontrolle auch die Möglichkeit der Aufreinigung eines rekombinanten endogenen Proteins (PaCLPP) überprüft werden. Im Folgenden dargestellt sind hauptsächlich die für PaCLPP erhaltenen Ergebnisse. Die Ergebnisse für HsCLPP entsprachen diesen im Wesentlichen.

Zunächst wurden insgesamt vier Plasmide konstruiert, die für katalytisch aktive oder inaktive Varianten von PaCLPP bzw. HsCLPP mit einem C-terminalen 6HTS-Marker (Aminosäuresequenz: HHHHHH GGENLYFQGAYTS WSHPQFEK) kodieren. Das Plasmid pPaClpP^{6HTS}Ex1 enthält demnach das *PaClpP*-Wildtypgen unter Kontrolle des geeigneten Promotors und Terminators mit einer vor dem Stopp-Codon des Gens eingefügten Sequenz, die für den gewünschten Affinitätsmarker kodiert (Abbildung 15a).

Das Plasmid pPaClpP^{S135A-6HTS}Ex1 ist nahezu mit pPaClpP^{6HTS}Ex1 identisch, zusätzlich ist aber noch das Codon kodierend für das katalytische Serin an Aminosäureposition 135 des PaCLPP-Präproteins gegen ein Codon kodierend für Alanin ausgetauscht (Abbildung 15b). Die beiden Plasmide pHsClpP^{6HTS}Ex1 und pHsClpP^{S153A-6HTS}Ex1 sind analog dazu von den Plasmiden pHsClpP^{Ex1} (Fischer 2011) und pHsClpP^{S153A}Ex1 (siehe Abschnitt 4.2.1) abgeleitet und kodieren folglich für die aktive (HsCLPP^{6HTS}) bzw. inaktive (HsCLPP^{S153A-6HTS}) Variante von HsCLPP mit 6HTS-Marker (Plasmidkarten nicht gezeigt).

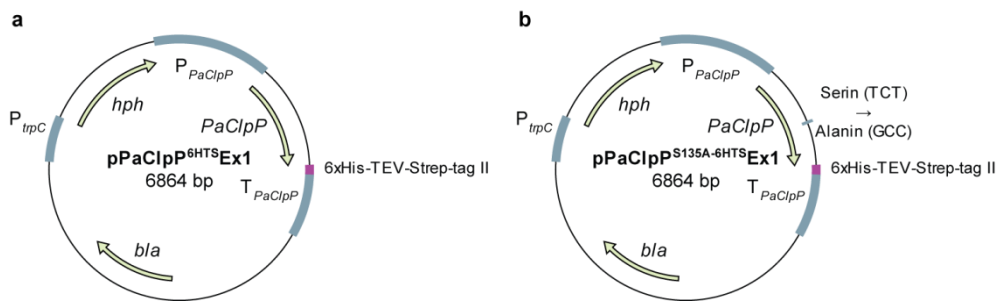


Abbildung 15 | **Plasmide kodierend für eine aktive oder inaktive PaCLPP-Variante mit C-terminalen 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker.** (a) Das 6864 bp große Plasmid pPaClpP^{6HTS}Ex1 enthält das vollständige *PaClpP*-Gen unter Kontrolle des geneigenen Promotors (P_{PaClpP}) und Terminators (T_{PaClpP}). Vor das Stopp-Codon wurde eine Sequenz eingefügt, die für einen 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker (6HTS) kodiert. *bla*, β -Lactamase-Gen; *hph*, Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen; P_{trpC} , *trpC*-Promotor. (b) Das 6864 bp große Plasmid pPaClpP^{S135A-6HTS}Ex1 ist nahezu mit dem in (a) beschriebenen Plasmid identisch, lediglich das Codon kodierend für das katalytische Serin (TCT) an der Aminosäureposition 135 des PaCLPP-Präproteins ist gegen ein Codon kodierend für Alanin (GCC) ausgetauscht.

Alle vier Plasmide wurden mehrfach in Protoplasten des Isolats $\Delta PaClpP$ F81571 transformiert. Für pHsClpP^{6HTS}Ex1 und pHsClpP^{S153A-6HTS}Ex1 konnten dabei lediglich zwei Transformanten gewonnen werden, die beide eine Einzelintegration des Plasmids pHsClpP^{S153A-6HTS}Ex1 aufwiesen ($\Delta PaClpP/PaClpP^{S153A-6HTS}$ T1.1 und T1.2). Für die beiden Plasmide pPaClpP^{6HTS}Ex1 und pPaClpP^{S135A-6HTS}Ex1 wurden im Gegensatz dazu in zwei unabhängig durchgeführten Transformationen jeweils mehrere Transformanten erhalten, die eine Integrationen des entsprechenden Plasmids aufwiesen (pPaClpP^{6HTS}Ex1: $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ T1.1, T1.2, T2.1 und T2.2; pPaClpP^{S135A-6HTS}Ex1: $\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A-6HTS}$ T1.2, T1.4, T2.4 und T2.7). Daher wurde aus praktischen Gründen vorrangig mit den affinitätsmarkierten PaCLPP-Varianten weitergearbeitet.

Das Vorhandensein der rekombinanten PaCLPP-Varianten mit 6HTS-Marker in den mitochondrialen Proteinextrakten der entsprechenden Transformanten wurde durch eine Western-Blot-Analyse mit PaCLPP-, His- und Strep-tag II-Antikörpern bestätigt (Abbildung 16a). Auch in Anwesenheit des an den C-Terminus angefügten 6HTS-Marker war, wie bereits in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, weiterhin ein Größenunterschied zwischen der aktiven und der inaktiven Variante von PaCLPP zu beobachten (möglicherweise infolge der ausbleibenden autokatalytischen Prozessierung von PaCLPP^{S135A}). Zur Überprüfung ob der angefügte 6HTS-Marker Einfluss auf die Funktion von PaCLPP nimmt, wurden Nachkommen von $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ T1.2 bezüglich ihrer Lebensspanne untersucht (Abbildung 16b). Anders als $\Delta PaClpP$ ($63,8 \pm 2,6$ d; $n = 22$; $P = 4,9E-13$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest) war $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ ($27,6 \pm 0,9$ d; $n = 19$; $P = 4,3E-06$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest) nicht mehr deutlich langlebiger als der Wildstamm ($23,6 \pm 1,4$ d; $n = 23$). Dieser Befund spricht dafür, dass die C-terminale Affinitätsmarkierung von PaCLPP die Funktion des Proteins nicht beeinträchtigt.

Ergebnisse

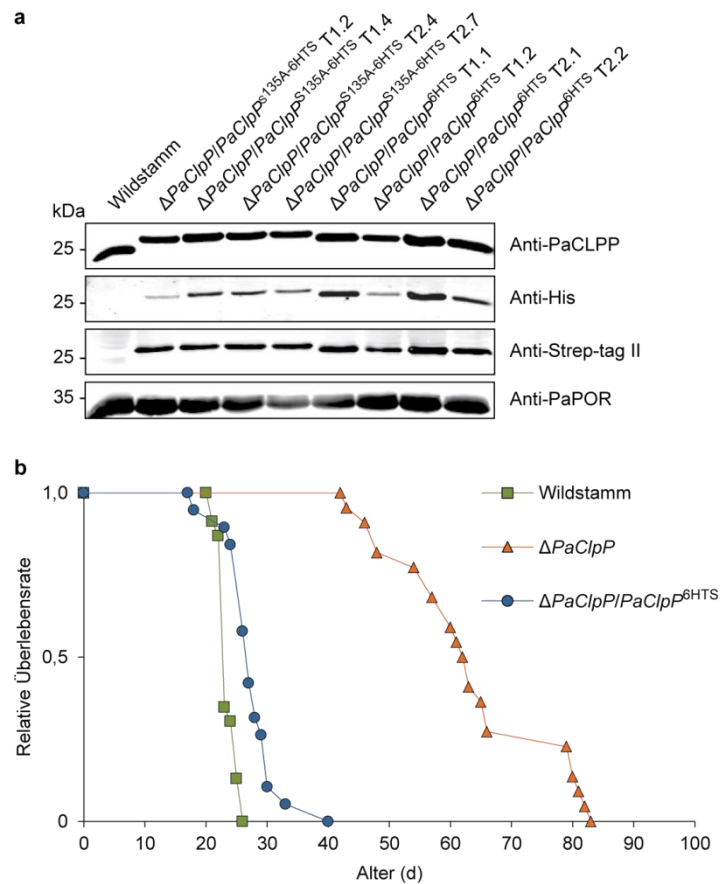


Abbildung 16 | **Analyse der Stämme $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ und $\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A-6HTS}$.** (a) Western-Blot-Analyse mit je 100 μ g mitochondrialer Proteinextrakte des Wildstammes und je vier unabhängiger Primärtransformanten von $\Delta PaClpP/PaClpP^{S135A-6HTS}$ (T1.2, T1.4, T2.4, T2.7) und $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ (T1.1, T1.2, T2.1, T2.2). Wildtyp-PaCLPP und die rekombinanten aktiven bzw. inaktiven PaCLPP-Varianten in den entsprechenden Primärtransformanten wurden mit einem PaCLPP-Antikörper detektiert. Das Vorhandensein der C-terminalen Affinitätsmarkierung 6xHis-TEV-Strep-tag II (vorhergesagte Masse: ~ 3 kDa) der rekombinanten PaCLPP-Varianten wurde zusätzlich mit einem His- und einem Strep-tag II-Antikörper verifiziert. Porin wurde als Ladekontrolle detektiert. (b) Lebensspannen des Wildstammes ($n = 23$) sowie von $\Delta PaClpP$ ($n = 22$) und $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ ($n = 19$; Nachkommen von T1.2). Während der *PaClpP*-Deletionsstamm ($63,8 \pm 2,6$; $P = 4,9E-13$) deutlich langlebiger als der Wildstamm ($23,6 \pm 1,4$) war, führte die Anwesenheit der aktiven, C-terminal mit dem 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker versehenen PaCLPP-Variante in $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ wieder zu einer Wildstamm-ähnlichen Lebensspanne ($27,6 \pm 0,9$; $P = 4,3E-06$). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM der Lebensspannen in d. Die *P*-Werte wurden im Vergleich zum Wildstamm mit dem zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

Nachfolgend wurde überprüft, ob eine Tandem-Affinitätsaufreinigung von PaCLPP^{S135A-6HTS} und HsCLPP^{S153A-6HTS} aus isolierten Mitochondrien über den 6xHis- und den Strep-tag II-Marker möglich ist. Hierbei zeigte sich, dass alle untersuchten Fusionsproteine unter nativen Bedingungen effizient über den 6xHis-Marker aus mit Triton X-100 lysierten Mitochondrien aufgereinigt werden konnten (Abbildung 17a, b). Im Gegensatz dazu war jedoch bei keiner der untersuchten CLPP-Varianten eine Aufreinigung über den Strep-tag II-Marker möglich. Trotz Verwendung unterschiedlicher Affinitätsmatrizen (QIAGEN: „Strep-Tactin Magnetic Beads“; IBA: „Gravity flow Strep-Tactin® Superflow® Columns“) und testen verschiedener Pufferbedingungen konnte keinerlei Bindung der Fusionsproteine über ihren Strep-tag II-Marker an Strep-Tactin erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

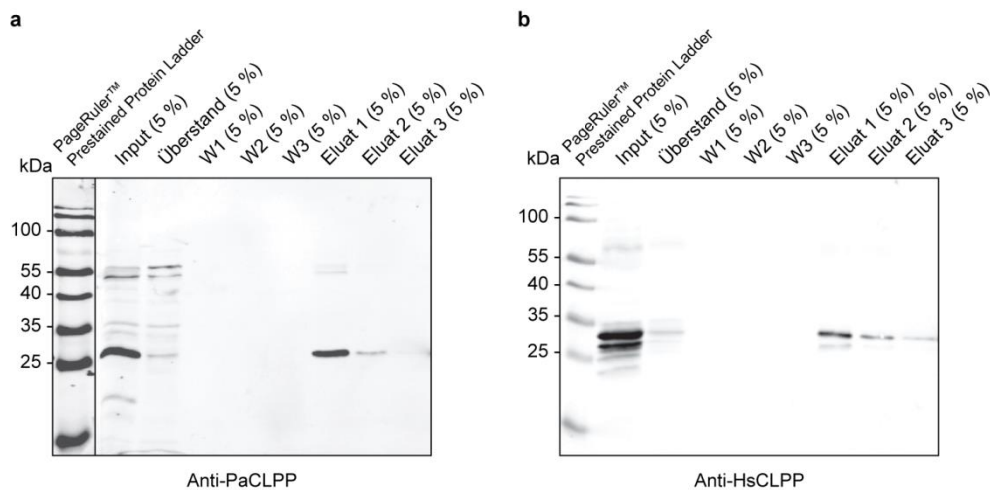


Abbildung 17 | **Aufreinigung von PaCLPPS135A-6HTS und HsCLPPS153A-6HTS aus Mitochondrien über den 6xHis-Marker.** (a) Aufreinigung von PaCLPPS135A-6HTS aus 500 μ g mit Triton X-100 lysierten Mitochondrien des Stammes $\Delta PaClpP/PaClpPS135A-6HTS$ unter Verwendung von „Dynabeads® His-Tag Isolation and Pulldown“ (Thermo Fisher Scientific). Jeweils 5% (v/v) des Inputs, des Überstandes, der Waschraktionen 1 – 3 (W1, W2 und W3) sowie der Eluate 1 – 3 wurden für eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse mit einem PaCLPP-Antikörper eingesetzt. Als Massestandard wurden 1,5 μ l des Markers „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. PaCLPPS135A-6HTS wurde nahezu vollständig an die verwendeten Beads gebunden (vergleiche Input und Überstand) und konnte mit Imidazol effizient eluiert werden. (b) Aufreinigung von HsCLPPS153A-6HTS aus Mitochondrien des Stammes $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-6HTS$ und anschließende Western-Blot-Analyse wie in (a) mit einem HsCLPP-Antikörper. HsCLPPS153A-6HTS konnte ebenfalls erfolgreich über den 6xHis-Marker aufgereinigt werden.

Damit grundlegende technische Fehler in der Handhabung definitiv ausgeschlossen werden konnten, wurden als Kontrolle für die Aufreinigung über den Strep-tag II-Marker zusätzlich isolierte Mitochondrien eines Stammes verwendet, der ein von CLPP-unabhängiges mitochondriales Fusionsprotein besitzt (PaCYPD^{6HTS}; zur Verfügung gestellt von P. Kramer, Ak Osiewicz). Dieses ist ebenfalls mit einem C-terminalen 6HTS-Marker versehen. Für das eigentliche Experiment wurden lysierte Mitochondrien der Stämme $\Delta PaClpP/PaClpPS135A-6HTS$, $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-6HTS$ sowie des Kontrollstammes mit „Strep-Tactin Magnetic Beads“ (QIAGEN) inkubiert. Durch Vergleich des jeweiligen Inputs mit dem zugehörigen Überstand nach Inkubation mit den Beads wurde die Bindung der Fusionsproteine kontrolliert (Abbildung 18). Tatsächlich band PaCYPD^{6HTS} nahezu vollständig an die verwendeten Beads (Abbildung 18c), während unter identischen Bedingungen weder eine Bindung von PaCLPPS135A-6HTS (Abbildung 18a) noch von HsCLPPS153A-6HTS (Abbildung 18b) erfolgte. Weitere übliche Fehlerquellen für die Aufreinigung von affinitätsmarkierten Fusionsproteinen, wie ein zu geringes Proteinniveau des rekombinanten Proteins oder die Instabilität des angefügten Affinitätsmarkers, konnten durch entsprechende Kontrollexperimente ebenfalls ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Befunde wurde die Tandem-Affinitätsaufreinigung von CLPP aus *P. anserina* Mitochondrien über den 6HTS-Marker als nicht praktikabel verworfen. Interessanterweise erwies sich der Strep-tag II-Marker dabei als nicht funktional, obwohl der näher am C-Terminus

Ergebnisse

gelegene 6xHis-Marker problemlos für eine Affinitätsaufreinigung angewandt werden konnte. Damit ist auszuschließen, dass der 6HTS-Marker der rekombinanten CLPP-Varianten überhaupt nicht zugänglich ist, d. h. er sollte tatsächlich an der Oberfläche des nativen Fusionsproteins exponiert sein. Trotzdem erscheint eine sterische Hinderung der Interaktion des Strep-tag II-Markers mit dem ~60 kDa Strep-Tactin-Tetramer (Voss und Skerra 1997) als wahrscheinlichste Erklärung für die ausbleibende Bindung.

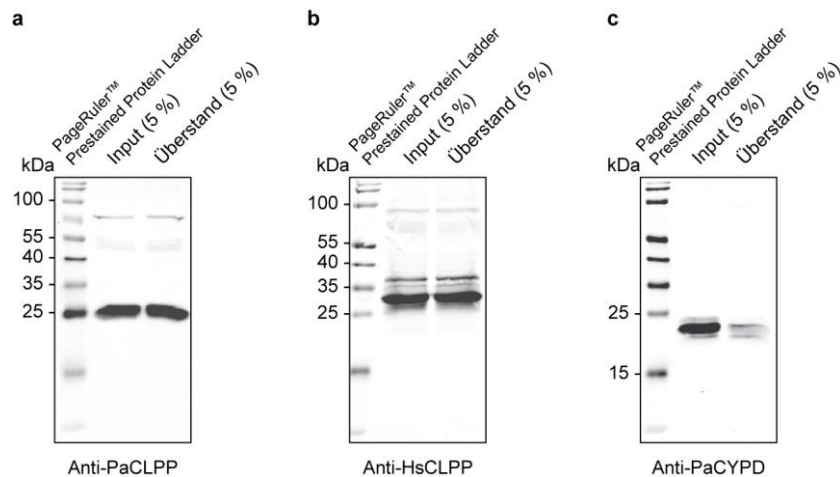


Abbildung 18 | **Aufreinigung rekombinanter Varianten von PaCLPP, HsCLPP und PaCYPD aus Mitochondrien über den Strep-tag II-Marker.** (a) Aufreinigung von PaCLPPS_{135A}-6HTS aus 250 µg mit Triton X-100 lysierten Mitochondrien des Stammes $\Delta PaClp/PaClpPS_{135A}$ -6HTS unter Verwendung von „Strep-Tactin Magnetic Beads“ (QIAGEN). Jeweils 5% (v/v) des Inputs und des Überstandes wurden für eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse mit einem PaCLPP-Antikörper eingesetzt. Als Massestandard wurden 1,5 µl des Markers „Pageruler™ Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. Es erfolgte keine Bindung von PaCLPPS_{135A}-6HTS an die Beads. (b) Aufreinigung von HsCLPPS_{153A}-6HTS aus Mitochondrien des Stammes $\Delta PaClp/HsClpPS_{153A}$ -6HTS und anschließende Western-Blot-Analyse wie in (a) mit einem HsCLPP-Antikörper. Es erfolgte ebenfalls keine Bindung von HsCLPPS_{153A}-6HTS an die Beads. (c) Aufreinigung von PaCYPD aus Mitochondrien eines Stammes der PaCYPD mit einem C-terminalen 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker besitzt (zur Verfügung gestellt von P. Kramer, Ak Osiewacz) und anschließende Western-Blot-Analyse wie in (a) mit einem PaCYPD-Antikörper. PaCYPD band nahezu vollständig an die Beads.

Es ist anzunehmen, dass für eine eindeutige Identifizierung von CLXP-Substraten und/oder CLPP-Interaktionspartnern eine einfache Aufreinigung nur über den 6xHis-Marker, aufgrund des zu starken Hintergrundes unspezifisch ko-aufgereinigter Proteine, nicht ausreicht. Um dies zu kontrollieren, wurden die Eluate der 6xHis-Aufreinigung von PaCLPP^{6HTS} bzw. PaCLPPS_{135A}-6HTS mittels einer SDS-PAGE und Silberfärbung im Vergleich zu Eluaten zweier verschiedener Hintergrundkontrollen analysiert (Abbildung 19).

Das erhaltene Ergebnis bestätigte, dass die einfache Aufreinigung der rekombinanten PaCLPP-Varianten über den 6xHis-Marker nicht ausreichend spezifisch ist. Im Vergleich zu den Eluaten der Hintergrundkontrollen (Verwendung von Mitochondrien des Wildstammes bzw. von $\Delta PaClp$ für die 6xHis-Aufreinigung) war in den Eluaten der Aufreinigung von PaCLPP^{6HTS} bzw. PaCLPPS_{135A}-6HTS jeweils nur eine zusätzliche Bande, das entsprechende aufgereinigte Fusionsprotein, im Bereich von ~25 kDa erkennbar. Für die Aufreinigung von HsCLPPS_{153A}-6HTS wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten (Daten nicht gezeigt).

Durch die in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen konnte somit bestätigt werden, dass eine Aufreinigung affinitätsmarkierter Fusionsproteine aus den Mitochondrien von *P. anserina* prinzipiell möglich ist. Leider erwies sich der zunächst verwendete 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker aber als wenig geeignet für einen CLPP „Substrat-trapping Assay“.

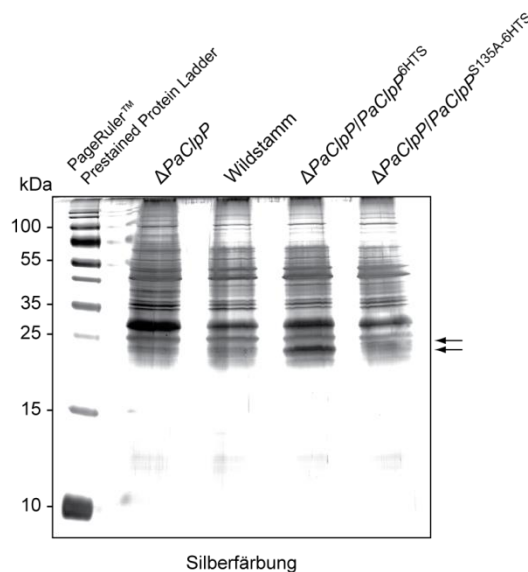


Abbildung 19 | **Silberfärbung der Eluate nach einer Aufreinigung von PaCLPP^{6HTS} und PaCLPP^{5135A-6HTS} aus Mitochondrien über den 6xHis-Marker.** Aufreinigung von PaCLPP^{6HTS} bzw. PaCLPP^{5135A-6HTS} aus je 1 mg mit Triton X-100 lysierten Mitochondrien der entsprechenden Stämme. Als Hintergrundkontrolle für unspezifisch bindende Proteine wurden zusätzlich je 1 mg Mitochondrien des Wildstammes und des *PaClpP*-Deletionsstammes für die Aufreinigungsprozedur verwendet. Jeweils 80 % des ersten Eluats wurden für eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung eingesetzt. Als Massestandard wurden 1,5 μ l des Markers „PAGERuler™ Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. In den Eluaten der Aufreinigung aus Mitochondrien von $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ und $\Delta PaClpP/PaClpP^{5135A-6HTS}$ ließ sich im Bereich von ~25 kDa je eine zusätzliche Bande (bei $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ stark, bei $\Delta PaClpP/PaClpP^{5135A-6HTS}$ nur sehr schwach; Pfeile) im Vergleich zu den Eluaten der Hintergrundkontrollen erkennen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um die aufgereinigten rekombinanten PaCLPP-Varianten. Darüber hinaus waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Eluaten sichtbar.

Nach wie vor sprach jedoch keines der bisher erhaltenen Ergebnisse gegen die grundsätzliche Durchführbarkeit des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina*. Daher wurden im Folgenden alternative Affinitätsmarker für die Aufreinigung von CLPP getestet. Aus Gründen der Praktikabilität und da die katalytische Inaktivierung von PaCLPP sehr wahrscheinlich die für den Assay notwendige Oligomerisierung des Proteins verhindert (siehe Abschnitt 4.2.1), wurde dafür nur noch mit der humanen CLPP weitergearbeitet.

4.2.2.3 Verwendung alternativer Affinitätsmarker für die Aufreinigung von HsCLPP

Zunächst wurden insgesamt vier verschiedene aktive HsCLPP-Varianten mit zwei unterschiedlichen C-terminalen Affinitätsmarkern (Abbildung 20) auf ihre Funktionalität für eine Aufreinigung aus isolierten *P. anserina* Mitochondrien getestet:

1. **HsCLPPL3F6H** (Abbildung 20a): HsCLPP mit einem C-terminalen (GGGG)₂-Linker gefolgt von einem 3xFLAG-6xHis-Marker (hier als „L3F6H“ abgekürzt).

Aminosäuresequenz: GGGGSGGGGS DYKDHDG DYKDHDI DYKDDDDK HHHHH

Ergebnisse

2. **HsCLPP^{3F6H}** (Abbildung 20b): HsCLPP mit einem C-terminalen 3xFLAG-6xHis-Marker (hier als „3F6H“ abgekürzt).

Aminosäuresequenz: GS DYKDHDG DYKDHDY DYKDDDDK HHHHH

3. **HsCLPP^{TS}** (Abbildung 20c): HsCLPP mit einem C-terminalen Twin-Strep-tag® (hier als „TS“ abgekürzt).

Aminosäuresequenz: SA WSHPQFEK GGGSGGGS GGSA WSHPQFEK

4. **HsCLPP^{ΔC-TS}** (Abbildung 20d): HsCLPP mit einem um 28 Aminosäuren verkürzten C-Terminus, gefolgt von einem Twin-Strep-tag® (hier als „ΔC-TS“ abgekürzt). Die entfernte C-terminalen Domäne ist weder essentiell für die Interaktion von HsCLPP mit der Chaperon-Komponente CLPX, noch für die Oligomerisierung und Aktivität von HsCLPP (Kang et al. 2004).

Aminosäuresequenz: SA WSHPQFEK GGGSGGGS GGSA WSHPQFEK

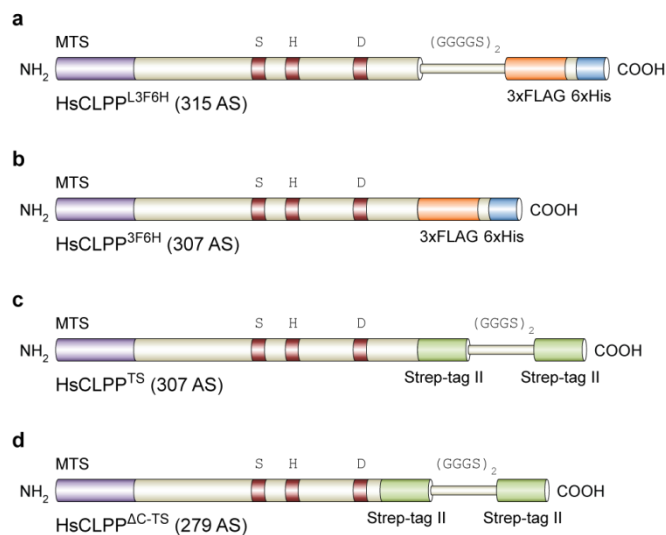


Abbildung 20 | **Schematische Übersicht verschiedener affinitätsmarkierter HsCLPP-Varianten.** (a) HsCLPP^{L3F6H} besitzt einen C-terminalen (GGGGS)₂-Linker gefolgt von einem 3xFLAG-6xHis-Marker. Das rekombinante Protein hat eine Gesamtlänge von 315 Aminosäuren (AS). Zusätzlich gekennzeichnet sind die N-terminale mitochondriale Zielsequenz (engl. „mitochondrial targeting sequence“, MTS) und die katalytischen Aminosäuren Serin (S), Histidin (H) und Aspartat (D). (b) HsCLPP^{3F6H} besitzt einen C-terminalen 3xFLAG-6xHis-Marker und hat eine Gesamtlänge von 307 AS. (c) HsCLPP^{TS} besitzt einen C-terminalen Strep-tag II gefolgt von einem (GGGGS)₂-Linker und einem weiteren Strep-tag II (insgesamt als Twin-Strep-tag® bezeichnet) und hat eine Gesamtlänge von 307 AS. (d) HsCLPP^{ΔC-TS} besitzt einen um 28 AS verkürzten C-Terminus, an den ein Twin-Strep-tag® angefügt wurde. Das resultierende Protein hat eine Gesamtlänge von 279 AS.

Die für die verschiedenen HsCLPP-Varianten kodierenden Plasmide wurden konstruiert und entsprechend als pHsClpPL^{3F6H}Ex1, pHsClpP^{3F6H}Ex1, pHsClpP^{TS}Ex1 und pHsClpP^{ΔC-TS}Ex1 bezeichnet. Jedes der Plasmide enthält die Sequenz der jeweiligen rekombinanten HsCLPP-Variante unter Kontrolle des starken, konstitutiven *PaMt1*-Promotors und -Terminators sowie zusätzlich ein Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen zur Selektion in *P. anserina* (Abbildung 21a – d). Nachdem die vier Plasmide mehrmals unabhängig voneinander in Protoplasten des Isolats $\Delta PaClpP$ F81571 transformiert wurden, wurden Hygromycin-resistente Transformanten

ausgewählt und durch eine erste Southern-Blot-Analyse überprüft. In jedem Falle wurde mindestens ein Hygromycin-resistenter Transformant mit einer Einzelintegration des jeweiligen Plasmids erhalten ($\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ T3.1; $\Delta PaClpP/HsClpP^{3F6H}$ T5.1; $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ T1.2; $\Delta PaClpP/HsClpP^{\Delta C-TS}$ T5.8).

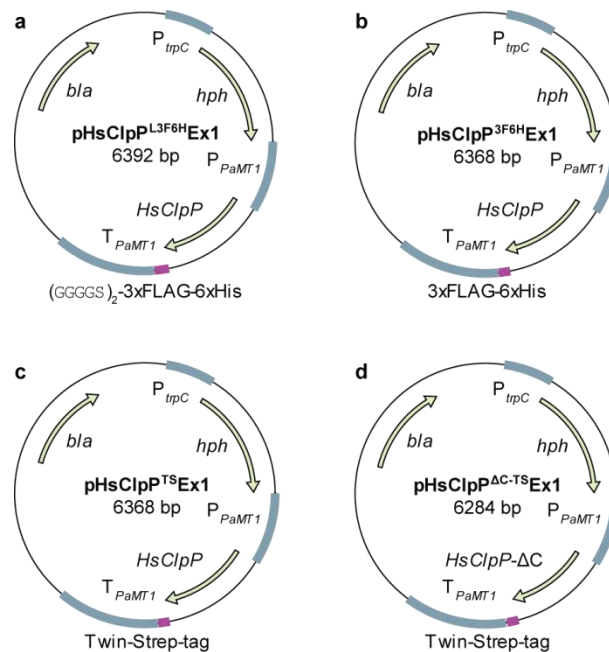


Abbildung 21 | **Plasmide kodierend für verschiedene affinitätsmarkierte HsCLPP-Varianten.** Die in a – c dargestellten Plasmide enthalten alle den vollständigen ORF der *HsClpP*-cDNA unter Kontrolle des konstitutiven *PaMT1*-Promotors (P_{PaMT1}) und des *PaMT1*-Terminators (T_{PaMT1}). Vor das Stopp-Codon der *HsClpP*-cDNA wurde im jeweiligen Plasmid zusätzlich noch eine für den entsprechenden Affinitätsmarker kodierende Sequenz eingefügt. *bla*, β -Lactamase-Gen; *hph*, Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen; P_{trpC} , *trpC*-Promotor (a) In dem 6392 bp großen Plasmid $pHsClpP^{L3F6H}Ex1$ wurde eine Sequenz eingefügt, die für einen (GGGGS)₂-Linker gefolgt von einem 3xFLAG-6xHis-Marker kodiert. (b) In dem 6368 bp großen Plasmid $pHsClpP^{3F6H}Ex1$ wurde eine Sequenz eingefügt, die für einen 2 Aminosäure-Linker gefolgt von einem 3xFLAG-6xHis-Marker kodiert. (c) In dem ebenfalls 6368 bp großen Plasmid $pHsClpP^{TS}Ex1$ wurde eine Sequenz eingefügt, die für einen Twin-Strep-tag[®] kodiert. (d) Im Gegensatz zu den Plasmiden in a – c enthält das 6284 bp große Plasmid $pHsClpP^{\Delta C-TS}Ex1$ nicht den vollständigen ORF der *HsClpP*-cDNA, sondern eine Variante, die für eine um die 28 C-terminalen Aminosäuren verkürzte Form von HsCLPP kodiert. Vor das Stopp-Codon wurde auch hier eine Sequenz eingefügt, die für einen Twin-Strep-tag[®] kodiert.

Weitere Voruntersuchungen zeigten, dass das Fusionsprotein HsCLPP^{ΔC-TS} in *P. anserina* nicht stabil ist und sich somit als ungeeignet für eine weitere Verwendung erwies. Des Weiteren wurde festgestellt, dass sich die HsCLPP-Varianten mit dem C-terminalen 3xFLAG-6xHis-Marker +/- (GGGGS)₂-Linker und ebenso die entsprechenden Transformanten nicht voneinander unterscheiden. Daher wurde für die weiteren, im Folgenden ausführlich besprochenen, Untersuchungen nur mit HsCLPP^{TS} und exemplarisch mit HsCLPP^{L3F6H} weitergearbeitet.

4.2.2.4 Aufreinigung von HsCLPP mit Twin-Strep-tag®

Als erstes wurde die Eignung von HsCLPP mit C-terminalen Twin-Strep-tag® (hier als „TS“ abgekürzt) für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* im Detail überprüft. Dafür wurde zunächst ein weiteres Plasmid (pHsClpPS153A-TSEx1) konstruiert, welches für eine katalytisch inaktive Variante von HsCLPP mit Twin-Strep-tag® (HsCLPPS153A-TS) kodiert (Daten nicht gezeigt). Dieses wurde ebenfalls in Protoplasten des Isolats $\Delta PaClpP$ F81571⁻ transformiert. Es wurden mehrere Hygromycin-resistente Transformanten erhalten, die durch eine erste Southern-Blot-Analyse bezüglich der Integration des Plasmids pHsClpPS153A-TSEx1 in ihr Genom überprüft wurden. Der Transformant $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-TS$ T2.9 wies eine Einzelintegration des Plasmids auf und wurde für die weiteren Experimente ausgewählt.

Die beiden Transformanten $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ T1.2 (siehe Abschnitt 4.2.2.3) und $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-TS$ T2.9 wurden jeweils unabhängig mit dem Isolat $\Delta PaClpP$ F135001⁺ gekreuzt. Aus diesen Kreuzungen wurden die Nachkommen $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ F185381⁺ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ F185381⁻ sowie $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-TS$ F201540⁻ und $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-TS$ F201541⁻ isoliert. Durch Southern-Blot-Analysen wurde die stabile Integration des jeweiligen Plasmids in die Genome der Transformanten bestätigt (Abbildung 22a, c). Ebenso wurde die Anwesenheit der betreffenden Fusionsproteine in den Mitochondrien der vorgenannten Isolate durch Western-Blot-Analysen überprüft (Abbildung 22b, d). Sowohl HsCLPP^{TS} als auch HsCLPPS153A-TS konnten dabei erfolgreich in den untersuchten mitochondrialen Proteinextrakten nachgewiesen werden und zeigten den erwarteten Größenunterschied im Vergleich zu Wildtyp-HsCLPP. Die Anwesenheit des Twin-Strep-tag® wurde zusätzlich durch Detektion mit einem Strep-tag II-Antikörper bestätigt.

Nachfolgend wurden die Lebensspannen von $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ und $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-TS$ untersucht (Abbildung 22e). Hierbei zeigte sich, dass die Anwesenheit der aktiven HsCLPP-Variante mit Twin-Strep-tag® in $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ zu einer mittleren Lebensspanne führte ($28,3 \pm 0,9$ d; n = 23; $P = 1,3E-08$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest), die gegenüber der des Wildstammes ($21,8 \pm 0,4$ d; n = 32) nur wenig verlängert war. Im Gegensatz dazu wies der Stamm $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-TS$, ähnlich wie $\Delta PaClpP$ ($44,4 \pm 1,0$; n = 52; $P = 1,3E-23$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest), eine starke Verlängerung seiner mittleren Lebensspanne auf ($61,8 \pm 2,6$ d; n = 9; $P = 5,7E-09$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest). Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass der Twin-Strep-tag® die Funktion von HsCLPP nicht stört (effiziente Reversion der Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ durch HsCLPP^{TS}) und verifizieren zusätzlich die erfolgte katalytische Inaktivierung von HsCLPPS153A-TS (da keine Reversion der Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ durch HsCLPPS153A-TS). Somit sollte der an HsCLPP angefügte C-terminale Twin-Strep-tag® also grundsätzlich im Rahmen des CLPP „Substrat-trapping Assay“ verwendbar sein.

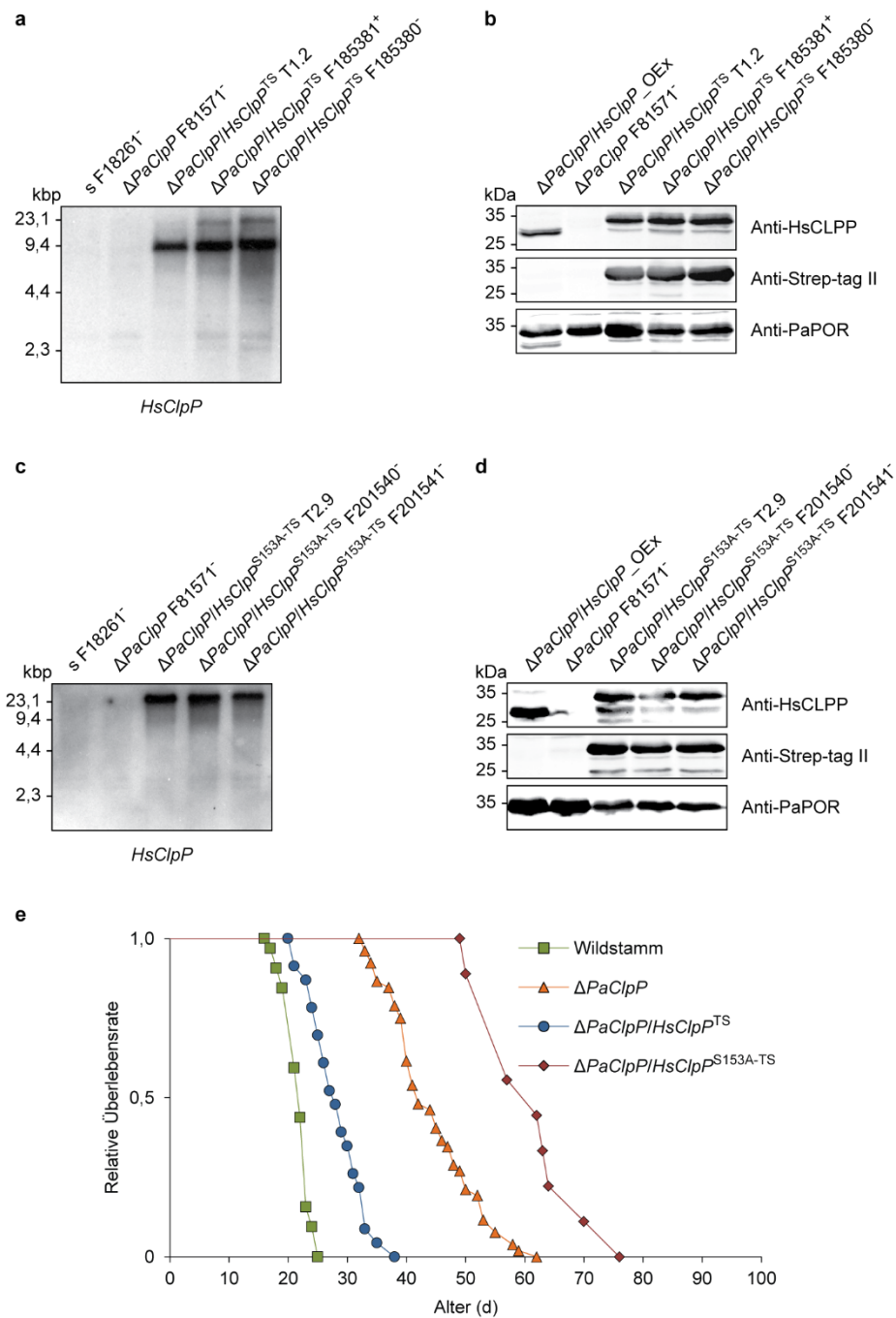


Abbildung 22 | **Analyse der Stämme $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-TS}$.** (a) Southern-Blot-Analyse mit je 500 ng HindIII-verdauter gDNA der angegebenen Isolate. Die verwendete DIG-markierte, *HsClpP*-spezifische Hybridisierungssonde bestätigte die stabile Integration des Plasmids p*HsClpP*^{TS}Ex1 in das Genom der untersuchten Transformanten. (b) Western-Blot-Analyse mit je 100 μ g mitochondrialer Proteinextrakte der angegebenen Isolate zur Bestätigung der Anwesenheit des rekombinanten HsCLPP-Proteins in den Mitochondrien der Transformanten. Der HsCLPP-Antikörper zeigte deutlich den erwarteten Größenunterschied zwischen Wildtyp-HsCLPP und HsCLPP^{TS}. Das Vorhandensein des Twin-Strep-tag[®] (vorhergesagte Masse: ~ 3 kDa) wurde zusätzlich mit einem Strep-tag II-Antikörper verifiziert. Porin wurde als Ladekontrolle detektiert. (c) Southern-Blot-Analyse wie in (a) zur Bestätigung der stabilen Integration des Plasmids p*HsClpP*^{S153A-TS} in das Genom der untersuchten Transformanten. (d) Western-Blot-Analyse wie in (b) zur Bestätigung der Anwesenheit von HsCLPP^{S153A-TS} in den Mitochondrien der untersuchten Transformanten. (e) Lebensspannen des Wildstammes ($21,8 \pm 0,4$; $n = 32$) sowie von $\Delta PaClpP$ ($44,4 \pm 1,0$; $n = 52$; $P = 1,3E-23$), $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ ($28,3 \pm 0,9$; $n = 23$; $P = 1,3E-08$) und $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-TS}$ ($61,8 \pm 2,6$; $n = 9$; $P = 5,7E-09$). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM der Lebensspannen in d. Die *P*-Werte wurden im Vergleich zum Wildstamm mit dem zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

Ergebnisse

Daher wurde anschließend geprüft, ob dieser Affinitätsmarker eine effiziente Aufreinigung von HsCLPP aus isolierten *P. anserina* Mitochondrien ermöglicht. Als Affinitätsmatrizen für die Aufreinigung wurden erneut „Gravity flow Strep-Tactin® Superflow®“-Säulen gewählt. Tatsächlich war die Aufreinigung von HsCLPP über den Twin-Strep-tag®, anders als die Aufreinigung von PaCLPP bzw. HsCLPP über den Strep-tag II des zuvor verwendeten 6HTS-Markers (siehe Abschnitt 4.2.2.1), problemlos möglich (Abbildung 23a).

Die Western-Blot-Analyse der verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung zeigte jedoch auch, dass der an HsCLPP angefügte Twin-Strep-tag® in *P. anserina* scheinbar nicht vollständig stabil ist. So waren im Input unerwarteter Weise zwei deutliche HsCLPP-Signale sichtbar. Eines davon (bei ~30 kDa) entsprach in seiner Größe HsCLPP mit dem angefügten Twin-Strep-tag®, während das andere (bei ~26 kDa) etwa die gleiche Größe wie Wildtyp-HsCLPP hatte (vergleiche auch Abbildung 22b, d). Dies spricht für eine teilweise Abspaltung des Twin-Strep-tag® während der Lyse der Mitochondrien. Beide HsCLPP-Signale waren auch in den Eluaten sichtbar. Dies lässt vermuten, dass der aus zwei aufeinanderfolgenden Strep-tag II-Markern bestehende Twin-Strep-tag® entweder nur zum Teil abgespalten wird (d. h. ein Strep-tag II-Marker verbleibt am C-Terminus von HsCLPP) oder dass sich gemischte Oligomere aus Wildtyp-HsCLPP und HsCLPP mit Twin-Strep-tag® bilden, so dass Wildtyp-HsCLPP gemeinsam mit HsCLPP^{TS} aufgereinigt wird und sich folglich auch in den Eluaten findet.

Im nächsten Schritt wurde das Eluat der Aufreinigung von HsCLPP^{TS} mit dem einer Hintergrundkontrolle ($\Delta PaClpP$) durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung verglichen (Abbildung 23b). Hierbei zeigte sich ein unerwartet starker Hintergrund der eigentlich als sehr spezifisch geltenden Twin-Strep-tag®-Aufreinigung (Schmidt et al. 2013). Daher wurde zusätzlich eine als „One-TAP“ bezeichnete Methode für die Aufreinigung über den Twin-Strep-tag® angewandt. Bei dieser wird das Eluat der ersten Aufreinigung, z. B. über die hier verwendeten „Gravity flow Strep-Tactin® Superflow®“-Säulen (IBA), für eine weitere Aufreinigung mit einer alternativen Affinitätsmatrix („Gravity flow StrepMAB-Classic MacroPrep®“-Säulen, IBA) eingesetzt. Bei „One-TAP“ handelt es sich somit prinzipiell um eine klassische Tandem-Affinitätsaufreinigung, die jedoch für beide Aufreinigungsschritte denselben Affinitätsmarker verwendet. Die Anwendung von „One-TAP“ führte zu einer deutlichen Reduktion unspezifisch aufgereinigter Proteine (Abbildung 23c). In den Eluaten der Aufreinigung von HsCLPP^{TS} waren sowohl nach einfacher Aufreinigung als auch nach „One-TAP“-Aufreinigung im Vergleich zur Hintergrundkontrolle hauptsächlich die aufgereinigten HsCLPP-Varianten als zusätzliche Banden (im Bereich zwischen 25 und 35 kDa) sichtbar (Abbildung 23b, c).

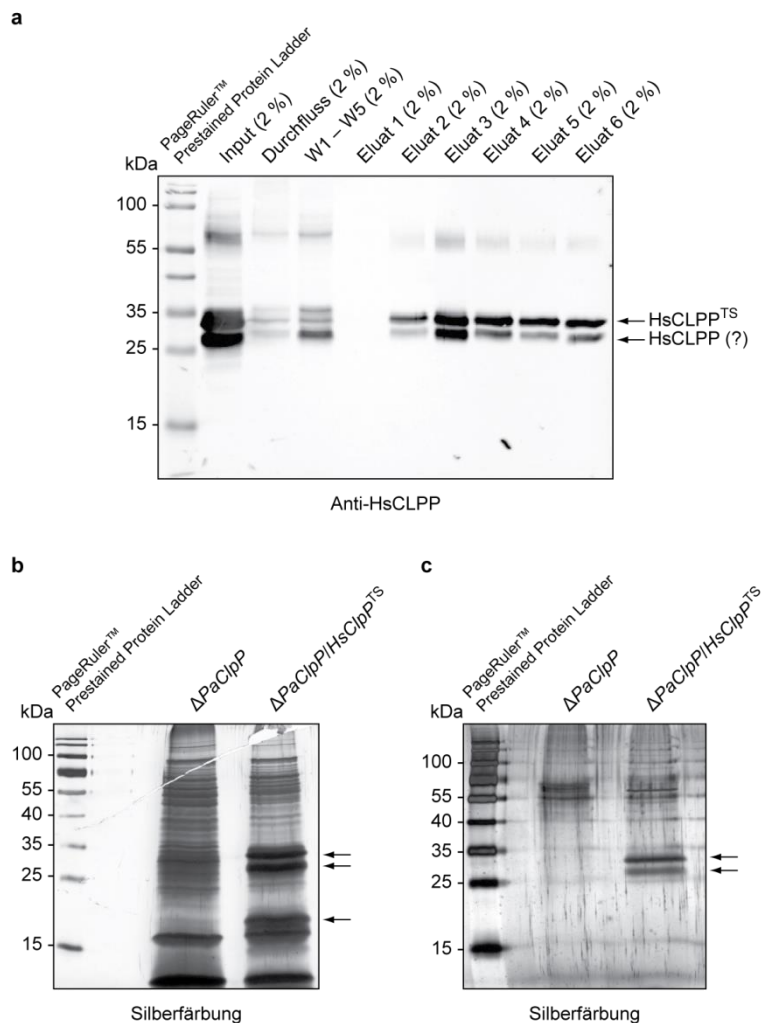


Abbildung 23 | **Aufreinigung von HsCLPP^{TS} aus Mitochondrien über den Twin-Strep-tag®.** (a) Aufreinigung von HsCLPP^{TS} aus 1 mg mit Triton X-100 lysierten Mitochondrien des Stammes $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ unter Verwendung von „Gravity flow Strep-Tactin® Superflow®“-Säulen (IBA). Je 2 % (v/v) des Inputs, des Durchflusses, der zusammengeführten Waschfraktionen 1 – 5 und der Eluate 1 – 6 wurden für eine Western-Blot-Analyse mit einem HsCLPP-Antikörper eingesetzt. Als Massestandard wurden 1,5 μ l des Markers „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. HsCLPP^{TS} band nahezu vollständig an die Säulen und konnte mit Desthiobiotin effizient eluiert werden. Auffällig war das Auftreten zweier deutlicher HsCLPP-Signale im Bereich zwischen 25 und 35 kDa, die auch in den Eluaten zu beobachten waren (Pfeile). Dies weist auf eine Instabilität des verwendeten Affinitätsmarkers hin. (b) Silberfärbung der Eluate nach Aufreinigung wie in (a) aus Mitochondrien der Stämme $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$. Die Eluate 2 – 6 der jeweiligen Aufreinigung wurden zusammengeführt (Gesamtvolumen: je 500 μ l) und mit „Amicon Ultra-0.5 3K“-Säulen (Merck Millipore) auf ein Volumen von je 48 μ l reduziert. Jeweils 50 % (v/v) des aufkonzentrierten Eluats wurde für eine SDS-PAGE und eine anschließende Silberfärbung eingesetzt. Im Vergleich zu dem Eluat der Hintergrundkontrolle ($\Delta PaClpP$) ließen sich im Eluat der Aufreinigung mit dem Extrakt aus $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ deutlich drei zusätzliche Banden im Bereich zwischen 15 und 35 kDa erkennen (Pfeile). (c) SDS-PAGE und Silberfärbung der Eluate nach Aufreinigung wie in (a) und einem zusätzlichen Aufreinigungsschritt mit „Gravity flow StrepMAB-Classic MacroPrep®“-Säulen (IBA). Die Eluate von $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ wurden wie in (b) beschrieben zusammengeführt und aufkonzentriert. Im Vergleich zu dem Eluat der Hintergrundkontrolle ($\Delta PaClpP$) ließen sich im Eluat der Aufreinigung aus Mitochondrien von $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ deutlich zwei zusätzliche Banden im Bereich zwischen 25 und 35 kDa erkennen (Pfeile).

Zusammenfassend scheint die C-terminale Affinitätsmarkierung von HsCLPP mit dem Twin-Strep-tag® prinzipiell mit dem beabsichtigten CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* kompatibel. Die aktive und inaktive Variante des entsprechenden HsCLPP-Fusionsproteins waren in den Mitochondrien der jeweiligen Transformanten vorhanden und es wurde

Ergebnisse

nachgewiesen, dass der Twin-Strep-tag® die Funktion von HsCLPP nicht entscheidend stört. Die Twin-Strep-tag®-Aufreinigung ist, zumindest mit dem „One-TAP“-Verfahren, augenscheinlich sehr spezifisch, relativ effizient und leicht zu handhaben. Somit wäre der nächste logische Schritt die vergleichende massenspektrometrische Analyse von Eluaten der Aufreinigung von HsCLPPS153A-TS, HsCLPPTS und einer Hintergrundkontrolle, um dadurch CLXP-Substrate und CLPP-Interaktionspartner zu identifizieren. Ein klarer Nachteil für die Anwendung des Twin-Strep-tag® in *P. anserina* ist jedoch seine beobachtete partielle Instabilität. Da sich, wie im Folgenden beschrieben, die HsCLPP-Variante mit dem C-terminalen (GGGGS)₂-Linker und 3xFLAG-6xHis-Marker als geeigneter für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ erwies, wurden in dieser Doktorarbeit keine weiteren Experimente mit HsCLPPS153A-TS und HsCLPPTS durchgeführt. Allgemein kann man aber an dieser Stelle festhalten, dass der Twin-Strep-tag® für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *P. anserina* Mitochondrien grundsätzlich geeignet ist und demnach für zukünftige Studien angewandt werden könnte.

4.2.2.5 Aufreinigung von HsCLPP mit Linker-3xFLAG-6xHis-Marker

Um die Eignung von HsCLPP mit dem C-terminalen 3xFLAG-6xHis-Marker inkl. Linker (hier als „L3F6H“ abgekürzt) für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ zu überprüfen, wurde analog wie für die Überprüfung des Twin-Strep-tag® verfahren. Es wurde zunächst ein Plasmid (pHsClpPS153A-L3F6HEx1) konstruiert, welches für eine katalytisch inaktive Variante von HsCLPP mit L3F6H-Marker kodiert (Daten nicht gezeigt). Dieses wurde in Protoplasten des Isolats $\Delta PaClpP$ F81571⁻ transformiert. Dabei wurde ein Hygromycin-resistenter Transformant mit Einzelintegration des Plasmids erhalten ($\Delta PaClpP/HsClpPS153A-L3F6H$ T1.14).

Die Transformanten $\Delta PaClpP/HsClpPL3F6H$ T3.1 (siehe Abschnitt 4.2.2.3) und $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-L3F6H$ T1.14 wurden mit dem Isolat $\Delta PaClpP$ F135001⁺ gekreuzt, um die Nachkommen $\Delta PaClpP/HsClpPL3F6H$ F185560⁺ und $\Delta PaClpP/HsClpPL3F6H$ F185561⁻ sowie $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-L3F6H$ F201371⁺ und $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-L3F6H$ F201370⁻ zu isolieren. Die stabile Genomintegration der Plasmide wurde durch Southern-Blot-Analysen bestätigt (Abbildung 24a, c). Western-Blot-Analysen zeigten, dass die beiden Fusionsproteine HsCLPPL3F6H und HsCLPPS153A-L3F6H in den Mitochondrien der entsprechenden Transformanten vorhanden waren (Abbildung 24b, d). Die Anwesenheit des 3xFLAG-6xHis-Markers wurde zusätzlich durch Detektion mit einem His- und einem FLAG M2-Antikörper verifiziert.

Die Untersuchung der Lebensspannen der beiden neu hergestellten Stämme $\Delta PaClpP/HsClpPL3F6H$ und $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-L3F6H$ führte zu ähnlichen Ergebnissen, wie im vorigen Abschnitt für die beiden Stämme mit der aktiven bzw. inaktiven Variante von HsCLPP mit Twin-Strep-tag® beschrieben (Abbildung 24e).

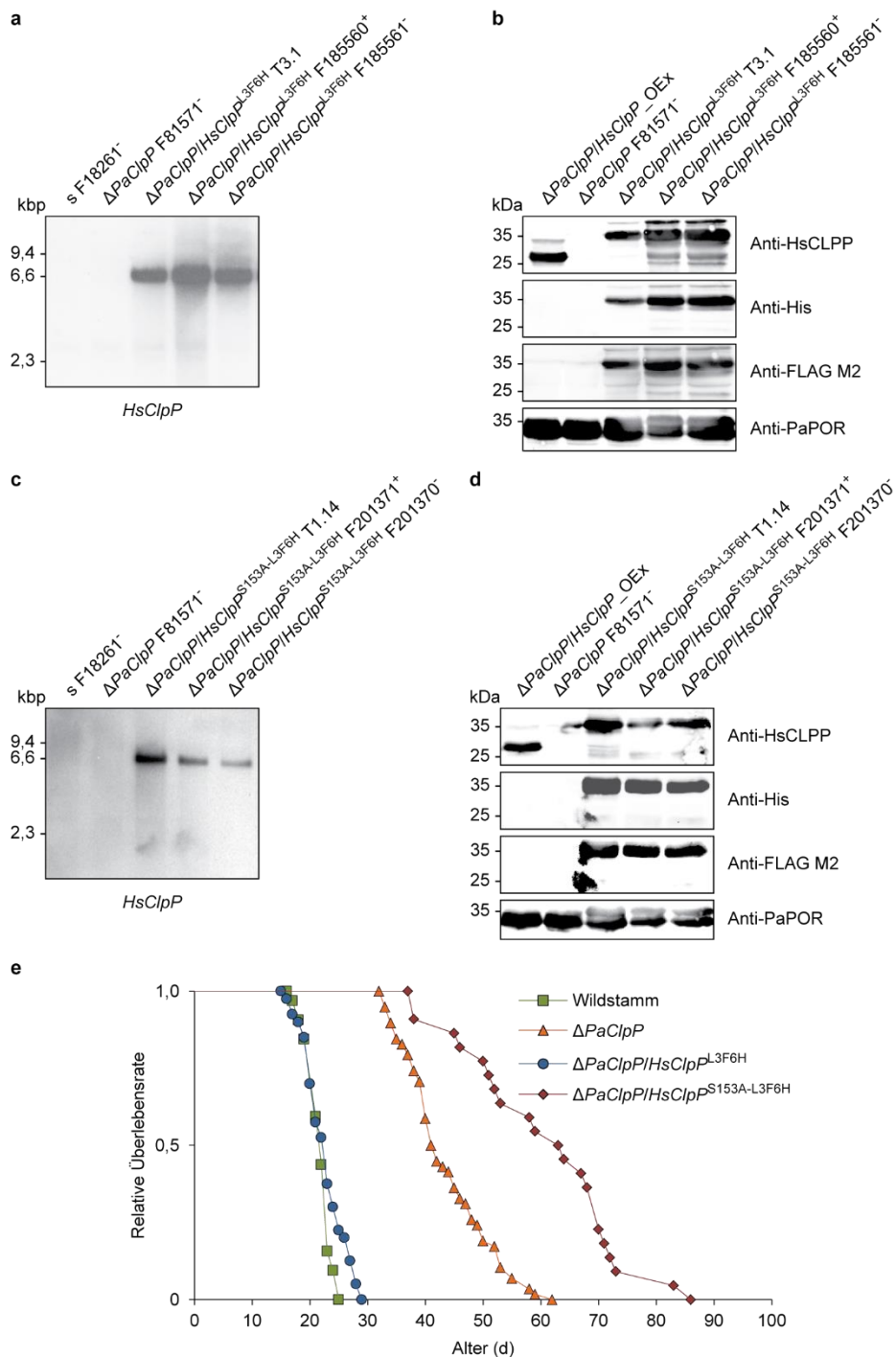


Abbildung 24 | **Analyse der Stämme $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$.** (a) Southern-Blot-Analyse mit je 500 ng HindIII-verdauter gDNA der angegebenen Isolate. Die verwendete DIG-markierte, *HsClpP*-spezifische Hybridisierungssonde bestätigte die stabile Genomintegration des Plasmids p*HsClpP*^{L3F6H}Ex1. (b) Western-Blot-Analyse mit je 100 μ g mitochondrialer Proteinextrakte der angegebenen Isolate zur Bestätigung der Anwesenheit des rekombinanten HsCLPP-Proteins in den Mitochondrien der Transformanten. Der HsCLPP-Antikörper zeigte deutlich den erwarteten Größenunterschied zwischen Wildtyp-HsCLPP und HsCLPP^{L3F6H}. Das Vorhandensein des 3xFLAG-6xHis-Markers (vorhergesagte Masse inkl. (GGGGG)₂-Linker: \sim 4 kDa) wurde zusätzlich mit einem His-Antikörper und einem FLAG M2-Antikörper verifiziert. Porin wurde als Ladekontrolle detektiert. (c) Southern-Blot-Analyse wie in (a) zur Bestätigung der stabilen Integration des Plasmids p*HsClpP*^{S153A-L3F6H} in das Genom der untersuchten Transformanten. (d) Western-Blot-Analyse wie in (b) zur Bestätigung der Anwesenheit von HsCLPP^{S153A-L3F6H} in den Mitochondrien der untersuchten Transformanten. (e) Lebensspannen des Wildstammes ($21,8 \pm 0,4$; $n = 32$) sowie von $\Delta PaClpP$ ($43,7 \pm 1,0$; $n = 58$; $P = 8,3E-25$), $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ ($22,7 \pm 0,5$; $n = 40$; $P = 3,9E-01$) und $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ ($61,2 \pm 2,8$; $n = 22$; $P = 2,6E-15$). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM der Lebensspannen in d. Die *P*-Werte wurden im Vergleich zum Wildstamm mit dem zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

Ergebnisse

So führte die Anwesenheit von HsCLPPL3F6H in $\Delta PaClpP/HsClpPL3F6H$ zu einer mittleren Lebensspanne ($22,7 \pm 0,5$ d; $n = 40$; $P = 3,9E-01$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest), die nicht mehr signifikant von der des Wildstammes ($21,8 \pm 0,4$ d; $n = 32$) unterschieden war. Hingegen wies der Stamm $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-L3F6H$ weiterhin eine stark verlängerte mittlere Lebensspanne auf ($61,2 \pm 2,8$ d; $n = 22$; $P = 2,6E-15$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest), sogar noch deutlicher als der *PaClpP*-Deletionsstamm ($43,7 \pm 1,0$ d; $n = 58$; $P = 8,3E-25$ mit zweiseitigem Wilcoxon-Rangsummentest). Daraus folgt, dass der L3F6H-Marker die Funktion von HsCLPP nicht stört (effiziente Reversion der Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ durch HsCLPPL3F6H) und das HsCLPPS153A-L3F6H tatsächlich katalytisch inaktiv ist (da keine Reversion der Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ durch HsCLPPS153A-L3F6H).

Der an HsCLPP angefügte C-terminale L3F6H-Marker erschien also als grundsätzlich geeignet für den CLPP „Substrat-trapping Assay“. Im Anschluss wurde daher kontrolliert, ob eine effiziente Tandem-Affinitätsaufreinigung von HsCLPP über den 3xFLAG- und den 6xHis-Marker möglich ist. Dafür wurde HsCLPPL3F6H zunächst aus mit Triton X-100 lysierten Mitochondrien des Stammes $\Delta PaClpP/HsClpPL3F6H$ unter Verwendung von „ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads“ (Sigma-Aldrich) aufgereinigt (Abbildung 25a). Die Western-Blot-Analyse der verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung zeigte, dass die Aufreinigung über den 3xFLAG-Marker äußerst effizient erfolgte. Das Eluat der ersten Aufreinigung wurde für einen zweiten Aufreinigungsschritt über den 6xHis-Marker eingesetzt (Abbildung 25b). Die Aufreinigung über den 6xHis-Marker war ebenfalls ohne Probleme möglich. Damit ist bestätigt, dass der 3xFLAG-6xHis-Marker für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *P. anserina* Mitochondrien verwendet werden kann und, ebenso wie der Twin-Strep-tag®, auch für zukünftige Studien zum Einsatz kommen könnte.

Abschließend wurden die Eluate einer Tandem-Affinitätsaufreinigung von HsCLPPL3F6H und HsCLPPS153A-L3F6H durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert und mit den Eluaten zweier Hintergrundkontrollen (Wildstamm und $\Delta PaClpP$) verglichen (Abbildung 25c). Die sequentielle Aufreinigung über den 3xFLAG- und den 6xHis-Marker führte zu einem sehr geringen Hintergrund unspezifisch aufgereinigter Proteine, ähnlich wie nach der oben beschriebenen „One-TAP“-Aufreinigung. Die beiden aufgereinigten HsCLPP-Fusionsproteine waren als deutliche Banden bei ~ 35 kDa sichtbar. Darüber hinaus ließen sich bereits infolge der Silberfärbung zahlreiche weitere Banden sowohl oberhalb als auch unterhalb von HsCLPPL3F6H und HsCLPPS153A-L3F6H erkennen, die nicht in den Hintergrundkontrollen sichtbar waren.

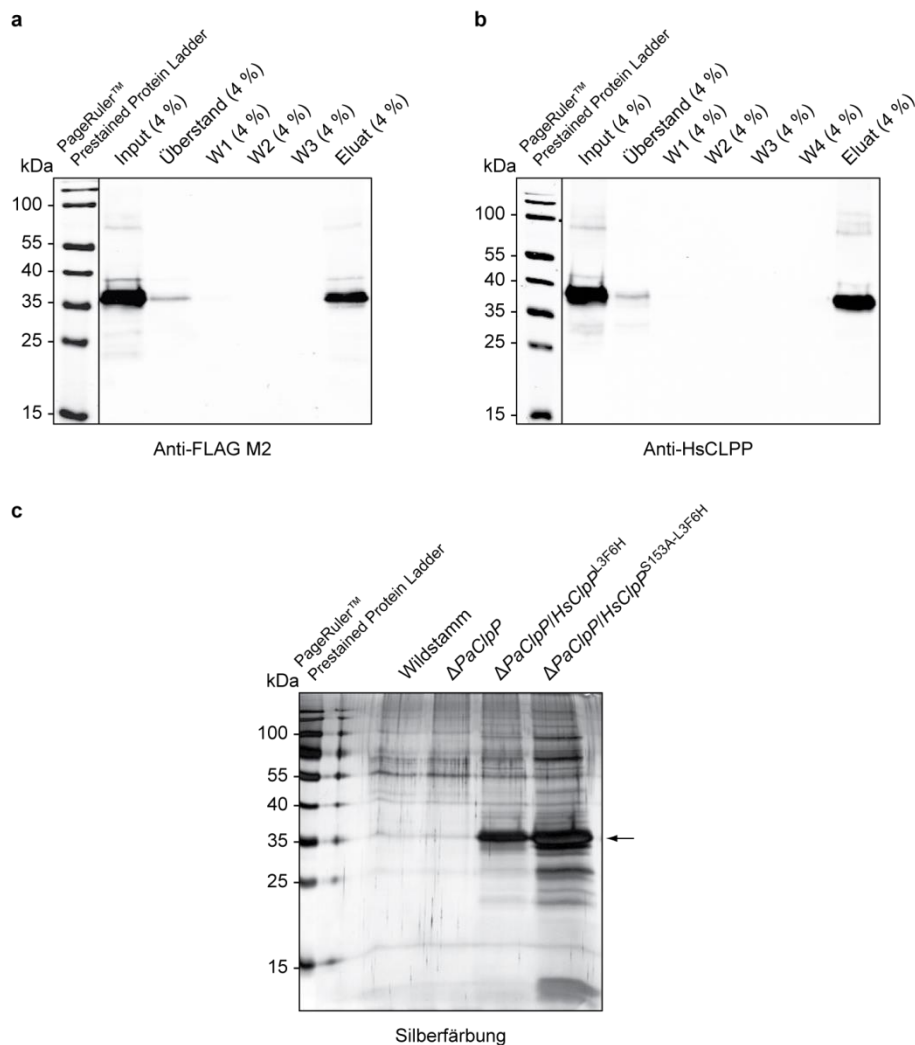


Abbildung 25 | **Aufreinigung von HsCLPPL3F6H und HsCLPPS153A-L3F6H aus Mitochondrien über den 3xFLAG-6xHis-Marker.** (a) Aufreinigung von HsCLPPL3F6H aus 600 μ g mit Triton X-100 lysierten Mitochondrien des Stammes $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ über den 3xFLAG-Marker unter Verwendung von „ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads“. Jeweils 4 % (v/v) des Inputs, des Überstandes, der Waschfraktionen W1 – 3 und des Eluats wurden für eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse mit einem HsCLPP-Antikörper eingesetzt. Als Massestandard wurden 1,5 μ l des Markers „Pageruler™ Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. HsCLPPL3F6H band nahezu vollständig an die verwendeten Beads (vergleiche Input und Überstand) und konnte mit dem „3X FLAG® Peptide“ (Sigma-Aldrich) effizient eluiert werden. (b) Das Eluat der Aufreinigung aus (a) wurde für einen zweiten Aufreinigungsschritt von HsCLPPL3F6H über den 6xHis-Marker unter Verwendung von „Dynabeads® His-Tag Isolation and Pulldown“ eingesetzt und die einzelnen Fraktionen der Aufreinigung wie in (a) mittels Western-Blot analysiert. Es erfolgte ebenfalls eine nahezu vollständige Bindung von HsCLPPL3F6H an die verwendeten Beads und das Protein konnte mit Imidazol effizient eluiert werden. (c) Silberfärbung der Eluate nach einer Tandem-Aufreinigung von HsCLPPL3F6H und HsCLPPS153A-L3F6H über den 3xFLAG- und den 6xHis-Marker wie in (a) und (b) aus je 1 mg Mitochondrien der Stämme $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$. Als Hintergrundkontrollen wurde zusätzlich noch Mitochondrien des Wildstammes und von $\Delta PaClpP$ für die Aufreinigungsprozedur verwendet. Es wurden jeweils 50 % (v/v) der mit „Amicon Ultra-0.5 3K“-Säulen aufkonzentrierten Eluate aufgetragen. Im Vergleich zu den Eluaten der Hintergrundkontrollen ließen sich in den Eluaten der Aufreinigung aus Mitochondrien von $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ deutlich weitere zusätzliche Banden erkennen, darunter in beiden Eluaten je eine starke Bande bei ~ 35 kDa (Pfeil), bei der es sich um die jeweilige aufgereinigte rekombinante HsCLPP-Variante handelt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Aufreinigung von aktiver und inaktiver HsCLPP über den L3F6H-Marker unter den gewählten Bedingungen zu einer spezifischen Ko-Aufreinigung von Proteinen führte, bei denen es sich möglicherweise um CLXP-Substrate bzw. CLPP-

Ergebnisse

Interaktionspartner handelt. Dadurch erschien die Verwendung der Stämme $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ für die Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* als sinnvoll.

4.3 Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina*

Durch die bisher beschriebenen Vorarbeiten konnten alle notwendigen Voraussetzungen für die Implementierung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* unter Verwendung der menschlichen CLPP geschaffen bzw. bestätigt werden:

- HsCLPP ist auch in seiner katalytisch inaktiven Form noch in der Lage, den HsCLPP-Kernzylinder auszubilden. HsCLPP^{S153A} sollte demnach geeignet sein, um CLPXP-Substrate einzufangen.
- Die Aufreinigung von HsCLPP aus isolierten *P. anserina* Mitochondrien ist, zumindest mit Hilfe eines Affinitätsmarkers, effizient möglich. Von den verschiedenen getesteten Varianten wurde der C-terminale 3xFLAG-6xHis-Marker (inkl. eines (GGGGS)₂-Linkers) als am geeignetsten identifiziert. Dieser hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Funktion von HsCLPP.
- Die Tandem-Affinitätsaufreinigung von HsCLPP^{L3F6H} und HsCLPP^{S153A-L3F6H} erscheint ausreichend spezifisch, um eine Identifizierung potenzieller CLPXP-Substrate und/oder CLPP-Interaktionspartner durch eine vergleichende massenspektrometrische Analyse der affinitätsgereinigten Proben zu ermöglichen.

Für die praktische Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ wurden isolierte Mitochondrien aus jeweils drei unabhängigen biologischen Replikaten (d. h. individuellen Isolaten) von $\Delta PaClpP$, $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ und $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ unter nativen Bedingungen lysiert und für eine Tandem-Affinitätsaufreinigung zunächst über den 3xFLAG- und dann über den 6xHis-Marker eingesetzt (Abbildung 26). Die Identifizierung von Proteinen durch massenspektrometrische Analyse wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Julian D. Langer am Max-Planck-Institut für Biophysik durchgeführt. Der Verdau der aufgereinigten Proteine erfolgte dabei direkt nach dem zweiten Aufreinigungsschritt in Lösung. Die Massen der resultierenden Peptide wurden durch nanoLC-ESI-MS/MS bestimmt und die zugehörigen Proteine durch Abgleich mit der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32 (Quelle: <http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) identifiziert. Die einem Protein zugeordneten einzigartigen Peptide wurden als semi-quantitatives Maß für seine relative Häufigkeit in den verschiedenen untersuchten Proben verwendet (Details zur Vorbereitung der Proben und Identifizierung der Proteine durch „Peptide mass fingerprinting“ sind dem Methodenteil zu entnehmen). Für HsCLPP-Interaktionspartner war zu erwarten, dass diese spezifisch und in gleichem Maße mit beiden HsCLPP-Varianten ko-aufgereinigt werden.

Substrate der HsCLPP/PaCLPX-Protease hingegen sollten exklusiv oder zumindest stark angereichert mit der inaktiven HsCLPP-Variante ko-aufgereinigt werden, da diese aufgrund ihrer katalytischen Inaktivierung zu einem „Einfangen“ der Substrate führt.

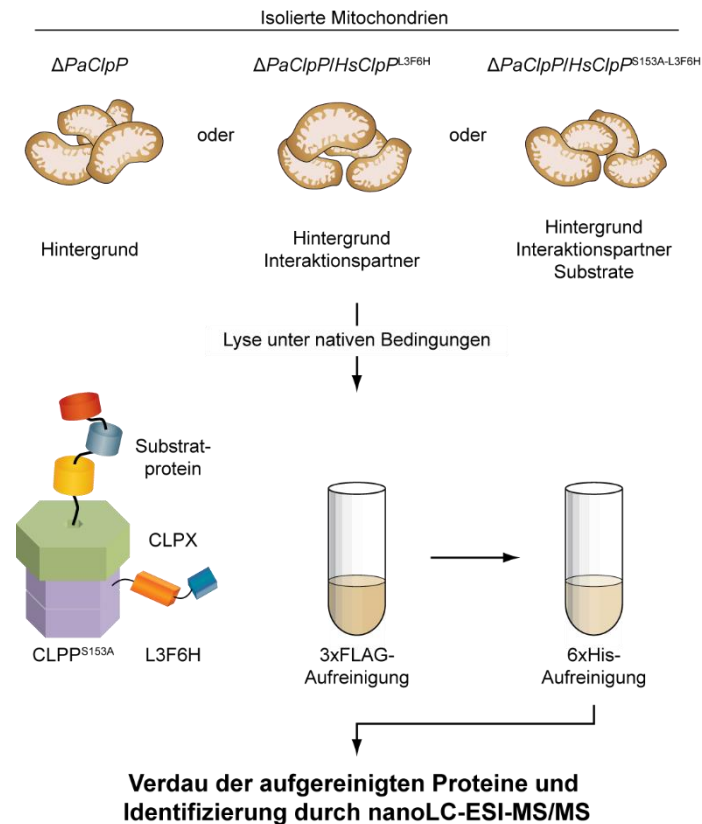


Abbildung 26 | **Schematische Übersicht der praktischen Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina*.** Für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ wurden isolierte Mitochondrien von $\Delta PaClpP$ sowie der Stämme $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ oder $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ unter nativen Bedingungen lysiert. Die mitochondrialen Lysate wurden für eine Tandem-Affinitätsaufreinigung zuerst über den 3xFLAG- und dann über den 6xHis-Marker eingesetzt. Anschließend erfolgte ein Verdau der aufgereinigten Proteine in Lösung. Die Analyse der resultierenden Peptide erfolgte über nanoLC-ESI-MS/MS und die Identifizierung der zugehörigen Proteine durch Abgleich mit der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32 (Quelle: <http://podospora.igmors.u-psud.fr/>). Im Rahmen des HsCLPP „Substrat-trapping Assay“ diente $\Delta PaClpP$ als Kontrolle für während der Tandem-Affinitätsaufreinigung unspezifisch bindende mitochondriale Proteine (Hintergrund). Die aktive, C-terminal affinitätsmarkierte HsCLPP-Variante (HsCLPP^{L3F6H}) wurde verwendet, um spezifische Interaktionspartner von HsCLPP zu identifizieren. Durch Verwendung der inaktiven, C-terminal affinitätsmarkierten HsCLPP-Variante (HsCLPP^{S153A-L3F6H}) sollten zusätzlich zu den Interaktionspartnern Substrate der chimären HsCLPP/PaCLPX-Protease identifiziert werden, die im proteolytisch inaktiven HsCLPP-Kernzylinder eingefangen werden.

Für die erste Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* entsprachen die Pufferbedingungen während der Tandem-Affinitätsaufreinigung weitestgehend den Angaben des jeweiligen Herstellers (Sigma-Aldrich/Thermo Fisher Scientific). Eine Übersicht der dabei erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 22 dargestellt. In den drei biologischen Replikaten der Probe $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ wurden 177, 181 und 142 Proteine durch die massenspektrometrische Analyse identifiziert (Rohdaten in Tabelle S1). Die biologischen Replikate der Probe $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ zeigten mit 134, 169 und 170 ähnliche Anzahlen von

Ergebnisse

identifizierten individuellen Proteinen (Rohdaten in Tabelle S2). In der Hintergrundkontrolle ($\Delta PaClpP$) wurden, den Erwartungen entsprechend, deutlich weniger Proteine gefunden (59, 48 und 57; Rohdaten in Tabelle S3).

Für die weitere Auswertung wurden nur solche Proteine in Betracht gezogen, die in mindestens zwei von drei biologischen Replikaten der jeweiligen Probe gefunden wurden. In der Probe $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ erfüllten 152 Proteine dieses Kriterium und in der Probe $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ 150. Von diesen beiden Protein-Sätzen wurden zusätzlich alle Proteine abgezogen, die auch in mindestens zwei von drei biologischen Replikaten der Hintergrundkontrolle vorkamen. Es verblieben 125 Proteine die spezifisch mit $HsCLPPL3F6H$ und 127 Proteine die spezifisch mit $HsCLPPS153A-L3F6H$ ko-aufgereinigt wurden. Diese Proteine wurden weiter danach eingeteilt, ob sie ausschließlich mit $HsCLPPL3F6H$, ausschließlich mit $HsCLPPS153A-L3F6H$ oder aber mit beiden $HsCLPP$ -Varianten ko-aufgereinigt wurden.

Tabelle 22 | Übersicht der Ergebnisse des ersten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“. Angegeben ist die Anzahl der individuellen Proteine, die nach der ersten Durchführung des $HsCLPP$ „Substrat-trapping Assay“ in dem jeweiligen unabhängigen biologischen Replikate (bRep) von $\Delta PaClpP$, $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ oder $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ identifiziert wurden (Identifizierte Proteine in bRep1 – bRep3). Die Proteine aller biologischen Replikate eines Stammes wurden zusammengefasst und für die weitere Analyse nur solche betrachtet, die in mindestens zwei von drei biologischen Replikaten zu finden waren (Proteine Gesamt). Von diesen beiden Sätzen wurden alle Proteine abgezogen, die auch in $\geq 2/3$ biologischen Replikaten der Hintergrundkontrolle zu finden waren (Abzüglich Proteine Hintergrundkontrolle).

	$\Delta PaClpP$			$\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$			$\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$		
	bRep1	bRep2	bRep3	bRep1	bRep2	bRep3	bRep1	bRep2	bRep3
Identifizierte Proteine	59	48	57	177	181	142	134	169	170
Proteine Gesamt	39			152			150		
Abzüglich Proteine Hintergrundkontrolle	0			125			127		

Um die Stringenz der Auswertung zu erhöhen und damit falsch positive Identifizierungen zu verringern, wurden aus den resultierenden Protein-Sätzen schließlich noch alle Proteine entfernt, die nicht mit mindestens mehr als einem einzigartigem Peptid im Durchschnitt aller biologischen Replikate der jeweiligen Probe gefunden wurden (Details zur Auswertung der Massenspektrometrie-Daten sind dem Methodenteil zu entnehmen).

Die erhaltenen Ergebnisse (Abbildung 27) ließen daran zweifeln, dass der durchgeführte CLPP „Substrat-trapping Assay“ tatsächlich wie beabsichtigt erfolgt war. Es wurden zwar definitiv mit beiden $HsCLPP$ -Varianten Proteine spezifisch ko-aufgereinigt, jedoch entsprachen die Verhältnisse der identifizierten Proteine nicht den Erwartungen. Insgesamt 65 Proteine, bei denen es sich theoretisch um $HsCLPP$ -Interaktionspartner handeln könnte, wurden sowohl mit $HsCLPPL3F6H$ als auch mit $HsCLPPS153A-L3F6H$ assoziiert gefunden (siehe Tabelle S4). Hauptabsicht war jedoch die Identifizierung von Substraten der CLPX-*P*rotease in *P. anserina*. Für einen erfolgreichen CLPP „Substrat-trapping Assay“ wäre zu erwarten gewesen, dass deutlich mehr Proteine mit der inaktiven CLPP-Variante (der eigentlichen „Substratfalle“) als mit der

aktiven CLPP-Variante ko-aufgereinigt werden, da mit CLPPTRAP (hier: HsCLPPS153A-L3F6H) nicht nur Interaktionspartner sondern auch zusätzlich eingefangene Substratproteine ko-aufgereinigt werden sollten. Tatsächlich waren aber jeweils 18 Proteine exklusiv mit HsCLPPL3F6H (siehe Tabelle S5) und mit HsCLPPS153A-L3F6H (siehe Tabelle S6) assoziiert. Überraschenderweise wurde in keinem Fall das PaCLPX-Chaperon, der einzige mit einiger Sicherheit zu erwartende Interaktionspartner von CLPP in *P. anserina*, gefunden.

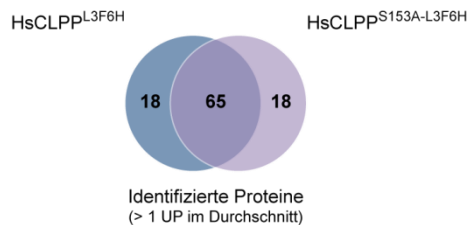


Abbildung 27 | **Venn Diagramm der mit HsCLPPL3F6H und/oder HsCLPPS153A-L3F6H assoziierten Proteine, die im ersten CLPP „Substrat-trapping Assay“ identifiziert wurden.** Die im Vergleich zur Hintergrundkontrolle spezifisch mit HsCLPPL3F6H und mit HsCLPPS153A-L3F6H ko-aufgereinigten Proteine (siehe Übersicht in Tabelle 22) wurden miteinander verglichen und die Proteine danach eingeteilt, ob sie exklusiv mit HsCLPPL3F6H, exklusiv mit HsCLPPS153A-L3F6H oder aber mit beiden HsCLPP-Varianten ko-aufgereinigt wurden. Zur Erhöhung der Stringenz wurden am Ende aus diesen Sätzen noch alle Proteine entfernt, die im Durchschnitt aller biologischen Replikate des jeweiligen Stammes nicht mit mindestens mehr als einem einzigartigen Peptid (engl. „unique peptide“, UP) gefunden wurden. Dadurch wurden jeweils 18 Proteine identifiziert, die exklusiv mit einer der beiden HsCLPP-Varianten assoziiert waren, sowie 65 Proteine, die mit beiden HsCLPP-Varianten gleichermaßen ko-aufgereinigt wurden.

Insgesamt sprachen diese Ergebnisse dafür, dass die Aufreinigung von HsCLPP unter Bedingungen erfolgt war, die für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ nicht geeignet waren und möglicherweise zu einer Dissoziation der HsCLPP-Oligomere geführt hatten. Im Folgenden wurden daher die bisher verwendeten Pufferbedingungen nach Herstellerangaben für die Tandem-Affinitätsaufreinigung von HsCLPP angepasst.

Die Anwesenheit von Glycerin kann bekannter Weise zur Stabilisierung von CLPP-Oligomeren beitragen (Lee et al. 2010a, Derrien et al. 2012). Entsprechend wurden alle Puffer für die Tandem-Affinitätsaufreinigung u. a. so modifiziert, dass sie 10 % (v/v) Glycerin enthielten. Diese Glycerin-Konzentration kam auch in mehreren bakteriellen CLPP „Substrat-trapping Assays“ zum Einsatz (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006, Bhat et al. 2013, Feng et al. 2013). Zusätzlich wurde die Lyse der Mitochondrien anstelle mit Triton X-100 mit dem milderen Detergenz Digitonin durchgeführt. Es ist anzumerken, dass für den Nachweis von PaCLPP- und HsCLPP-Oligomeren durch BN-PAGE (Abbildung 13) die Lyse der Mitochondrien auch mit Digitonin erfolgte und der Probenpuffer ebenfalls Glycerin enthielt. Demnach war davon auszugehen, dass die abgewandelten Pufferbedingungen HsCLPP-Oligomere stabilisieren und damit auch das Einfangen von CLPP-Substraten ermöglichen sollten. Abgesehen von den hier genannten Änderungen erfolgte die zweite Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ sowie die Auswertung der erhaltenen Rohdaten wie vorher beschrieben. Eine Übersicht der

Ergebnisse

beim zweiten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ erhaltenen Ergebnisse findet sich in Tabelle 23.

Tabelle 23 | **Übersicht der Ergebnisse des zweiten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“.** Im Rahmen der Durchführung des zweiten HsCLPP „Substrat-trapping Assay“ identifizierte Anzahl individueller Proteine in den verschiedenen biologischen Replikaten (bRep), Anzahl der Proteine die in insgesamt mindestens zwei von drei biologischen Replikaten des jeweiligen Stammes gefunden wurden und die Anzahl der verbleibenden Proteine abzüglich der Hintergrundkontrolle (vergl. auch Tabelle 22).

	$\Delta PaClpP$			$\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$			$\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$		
	bRep1	bRep2	bRep3	bRep1	bRep2	bRep3	bRep1	bRep2	bRep3
Identifizierte Proteine	94	48	72	96	121	166	136	146	162
Proteine Gesamt	54			125			140		
Abzüglich Proteine Hintergrundkontrolle	0			80			98		

In den biologischen Replikaten von $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ wurden 96, 121 und 166 Proteine gefunden (Rohdaten in Tabelle S7). Die biologischen Replikate von $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ wiesen mit 136, 146 und 162 insgesamt eine tendenziell leicht gesteigerte Anzahl identifizierter Proteine auf (Rohdaten in Tabelle S8). Erneut wurden in der Hintergrundkontrolle, wie erwartet, am wenigsten Proteine gefunden (94, 48 und 72; Rohdaten in Tabelle S9). In der Probe $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ kamen 125 und in der Probe $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ 140 Proteine in mindestens zwei von drei biologischen Replikaten vor. Abzüglich der Proteine der Hintergrundkontrolle verblieben 80 Proteine die spezifisch mit HsCLPP^{L3F6H} und 98 Proteine die spezifisch mit HsCLPP^{S153A-L3F6H} ko-aufgereinigt wurden.

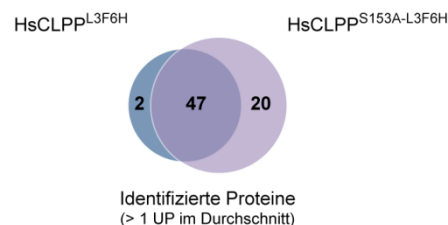


Abbildung 28 | **Venn Diagramm der mit HsCLPP^{L3F6H} und/oder HsCLPP^{S153A-L3F6H} assoziierten Proteine, die im zweiten CLPP „Substrat-trapping Assay“ identifiziert wurden.** Die im Vergleich zur Hintergrundkontrolle spezifisch mit HsCLPP^{L3F6H} und mit HsCLPP^{S153A-L3F6H} ko-aufgereinigten Proteine (siehe Übersicht in Tabelle 23) wurden miteinander verglichen. Zur Erhöhung der Stringenz wurden am Ende aus diesen Sätzen noch alle Proteine entfernt, die im Durchschnitt aller biologischen Replikate des jeweiligen Stammes nicht mit mindestens mehr als einem einzigartigen Peptid (engl. „unique peptide“, UP) gefunden wurden. Insgesamt 20 Proteine waren exklusiv oder bevorzugt mit der inaktiven und zwei Proteine bevorzugt mit der aktiven HsCLPP-Variante assoziiert. Zusätzlich wurden 47 Proteine identifiziert, die spezifisch mit beiden HsCLPP-Varianten ko-aufgereinigt wurden.

Die Proteine wurden danach eingeteilt, ob sie mit HsCLPP^{L3F6H}, mit HsCLPP^{S153A-L3F6H} oder aber mit beiden HsCLPP-Varianten ko-aufgereinigt wurden. Abschließend wurden wie vorher alle Proteine mit weniger als einem einzigartigen Peptid im Durchschnitt aller biologischen Replikate der jeweiligen Probe entfernt. Die bei der zweiten Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ beobachteten Verhältnisse der identifizierten Proteine entsprachen weitestgehend den Erwartungen (Abbildung 28). Zwar wurden immer noch zwei Proteine als spezifisch mit HsCLPP^{L3F6H} assoziiert gefunden, beide waren jedoch nur knapp über dem

angelegten Schwellenwert (> 1 einzigartiges Peptid im Durchschnitt) und kamen auch in je einem biologischen Replikat von $\Delta PaClpP/HsClpPS^{153A-L3F6H}$ vor. Im Gegensatz dazu wurden insgesamt 18 z. T. hoch abundante Proteine identifiziert, die exklusiv mit HsCLPPS^{153A-L3F6H} ko-aufgereinigt wurden. Zwei weitere Proteine kamen in der $\Delta PaClpP/HsClpPS^{153A-L3F6H}$ -Probe deutlich häufiger als in der $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ -Probe vor (Anreicherungsfaktor der einzigartigen Peptide > 3) und wurden daher ebenfalls den HsCLPPS^{153A-L3F6H}-spezifischen Proteinen zugeordnet, so dass also insgesamt 20 Proteine exklusiv bzw. bevorzugt mit der inaktiven HsCLPP-Variante assoziiert waren.

Bezeichnenderweise war eines der ausschließlich mit HsCLPPS^{153A-L3F6H} ko-aufgereinigten Proteine das Chaperon PaCLPX. Eine exklusive Assoziation von CLPX nur mit inaktiver aber nicht mit Wildtyp-CLPP nach einer vorausgegangenen Tandem-Affinitätsaufreinigung wurde bereits unabhängig in einem bakteriellen CLPP „Substrat-trapping Assay“ beobachtet (Bhat et al. 2013). Biochemische *in vitro* Studien legen nahe, dass dieser Umstand die Stabilisierung der CLPP-CLPX Interaktion in Anwesenheit von eingefangenen Substraten widerspiegelt (Joshi et al. 2004). Die verbleibenden 19 HsCLPPS^{153A-L3F6H}-spezifischen Proteine erfüllen grundsätzlich alle Kriterien, um als von CLPP^{TRAP} eingefangene Substrate zu gelten und werden aus diesem Grund im Weiteren auch als CLPXP-Substrate bezeichnet. Zusätzlich wurden insgesamt 47 Proteine identifiziert, die gegenüber der Hintergrundkontrolle spezifisch mit beiden HsCLPP-Varianten assoziiert waren und die daher im Weiteren als HsCLPP-Interaktionspartner bezeichnet werden.

Die hier in der Übersicht beschriebenen Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, dass der CLPP „Substrat-trapping Assay“ erfolgreich durchgeführt werden konnte. Der letzte Abschnitt beschäftigt sich daher mit einer detaillierten Darstellung der identifizierten potenziellen CLPXP-Substrate und HsCLPP-Interaktionspartner in *P. anserina*.

4.4 Potenzielle Interaktionspartner und Substrate der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina*

Für die folgende Auswertung wurden zunächst die menschlichen Homologe der identifizierten Proteine bestimmt. Dies war insofern notwendig, als ein Großteil der *P. anserina* Proteine noch nicht ausreichend annotiert ist. Für die Mehrzahl der potenziellen HsCLPP-Interaktionspartner (Tabelle S10) und CLPXP-Substrate (Tabelle S11) ließen sich problemlos eindeutige menschliche Homologe identifizieren. Sofern einem *P. anserina* Protein kein menschliches Homolog zugeordnet werden konnte, wurde ein homologes Protein einer anderen pilzlichen Spezies für die Annotation gewählt. Der Einfachheit halber wird in der folgenden Beschreibung für die Bezeichnung eines bestimmten *P. anserina* Proteins meist der Name des für das jeweilige Homolog kodierenden Gens verwendet. Eine zusammenfassende

Ergebnisse

Übersichtsdarstellung aller im Folgenden beschriebenen Proteine findet sich in Abbildung 29 am Ende dieses Textes, auf die daher schon an dieser Stelle verwiesen wird.

In Tabelle 24 sind alle 47 Proteine gelistet, die im CLPP „Substrat-trapping Assay“ als potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner identifiziert wurden. Diese wurden zur besseren Übersicht, entsprechend ihrer Swiss-Prot-Annotation und verfügbaren Informationen der allgemeinen Literatur, vier verschiedenen Hauptkategorien („Chaperone und Proteinimport“, „Metabolismus“, „Elektronentransportkette und Atmung“ sowie „Anderes“) zugeordnet.

Die Kategorie „Chaperone und Proteinimport“ beinhaltet 6/47 der gefundenen Proteine. Bemerkenswerterweise wurden bakterielle Homologe der beiden mitochondrialen Chaperone HSPA9 und HSPD1 auch im Rahmen des ersten in *E. coli* durchgeführten CLPP „Substrate-trapping Assay“ als wahrscheinliche Interaktionspartner identifiziert (Flynn et al. 2003). Eher unerwartet war die Identifizierung von drei Untereinheiten des am Import von mitochondrialen Proteinen beteiligten TOM-Komplexes (engl. „translocase of the outer membrane“, TOM). Der TOM-Komplex ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert (Neupert und Herrmann 2007), während bisher für die CLPXP-Protease eine Lokalisation ausschließlich in der mitochondrialen Matrix angenommen wird (Yu und Houry 2007). Es ist somit fraglich, ob HsCLPP tatsächlich direkt und physiologisch mit dem TOM-Komplex interagiert. Möglicherweise ist die beobachtete Interaktion sekundärer Natur oder auf eine teilweise Aufreinigung von HsCLPP Transportintermediaten zurückzuführen.

Der Großteil der als mögliche HsCLPP-Interaktionspartner identifizierten Proteine (32/47) wurde der Kategorie „Metabolismus“ zugeordnet. Insgesamt 15 der Proteine sind hauptsächlich in den mitochondrialen Aminosäure-Metabolismus involviert, etwa die Komponenten GLDC und GCSH des Glycin-Decarboxylase-Komplexes oder die am Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren beteiligten Enzyme AUH, ivl-2 und BCAT2. Weitere acht Proteine, u. a. ACAT1, DECR1 und ACDSB, sind primär für die β -Oxidation oder andere Aspekte des Fettsäure-Metabolismus verantwortlich. Sechs der Proteine sind konservierte Enzyme des Citratzyklus, z. B. die Citrat-Synthase (CS), die Aconitase (ACO2) und die Succinyl-CoA-Ligase (SUCLA2). Außerdem wurden zwei Enzyme des Methylcitratzyklus (mcsA und PDH1) sowie die Komponente DLAT des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes gefunden. Möglicherweise handelt es sich bei einigen dieser identifizierten metabolischen Enzyme tatsächlich um häufige und/oder stabile CLPXP-Substrate, da bei mehr als einem Drittel (z. B. CS, DLAT und SUCLA2) eine deutliche Anreicherung in der $\Delta PaClpP/HsClpPS153A-L3F6H$ -Probe im Vergleich zur $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ -Probe festgestellt wurde (Anreicherungsfaktor der einzigartigen Peptide $> 1,5$).

Tabelle 24 | **Übersicht aller Proteine, die als potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner identifiziert wurden.** Angegeben für jedes Protein ist seine *P. anserina* ID (Pa_ID, entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, die Anzahl der im Durchschnitt identifizierten einzigartigen Peptide des Proteins in der jeweiligen Probe ($\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$: WT UPs; $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$: TRAP UPs), sowie die Swiss-Prot ID und die Bezeichnung des Gens und Proteins des menschlichen Homologs (vergl. Tabelle S10). Die Zuordnung von Proteinen zu den angegebenen Kategorien (z. B. „Metabolismus“) basiert primär auf ihrer Swiss-Prot-Annotation und zusätzlich auf Informationen aus der allgemeinen Literatur. Proteine die in der $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$ -Probe im Vergleich zu der $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ -Probe um mindestens das 1,5-fache angereichert sind (HsCLPP^{S153A-L3F6H}-angereichert), sind in fett (Anreicherungsfaktor in Klammern).

Pa_ID	UniProt ID	WT UPs	TRAP UPs	Swiss-Prot ID <i>H. sapiens</i>	Gen	Protein
Chaperone und Proteinimport (6/47 Proteine)						
Pa_6_2570	B2B2N8	27,0	28,3	P38646	HSPA9	Stress-70 protein†
Pa_6_5750	B2B270	16,7	13,7	P10809	HSPD1	60 kDa heat shock protein†
Pa_2_9700	B2B728	14,3	15,3	O94826	TOMM70A	Mitochondrial import receptor subunit TOM70
Pa_2_10580	B2B7B9	9,0	9,3	O96008	TOMM40	Mitochondrial import receptor subunit TOM40
Pa_6_1920	B2B2W2	3,0	2,7	Q15388	TOMM20	Mitochondrial import receptor subunit TOM20
Pa_2_12760	B2B7Z4	1,7	1,3	P35232	PHB	Prohibitin
Metabolismus (32/47 Proteine)						
Pa_1_22300	B2AS46	12,0	15,3	P23378	GLDC	Glycine cleavage system P protein
Pa_3_10790	B2AD09	11,3	13,0	O95571	ETHE1	Persulfide dioxygenase ETHE1
Pa_5_5970	B2VLF5	10,0	9,0	Q99798	ACO2	Aconitate hydratase†‡
Pa_3_11290	B2ACV8	8,7	9,3	P00505	GOT2	Aspartate aminotransferase
Pa_6_1590	B2B2Z5	8,0	7,0	P24752	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase
Pa_3_6780	Q9HFI1	7,3	14,0 (x1,9)	O75390	CS	Citrate synthase
Pa_6_2730	B2B2M1	7,3	6,3	P50213	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha
Pa_3_2310	B2B010	6,7	12,0 (x1,8)	P10515	DLAT	Pyruvate dehydrogenase E2 component†
Pa_5_11920	B2AFL4	5,7	5,0	Q13825	AUH	Methylglutaconyl-CoA hydratase
Pa_2_1050	B2B4E9	5,7	4,3	P78827*	ilv-2	Ketol-acid reductoisomerase
Pa_6_10000	B2ANA5	5,0	3,7	C7C436*	mcsA	2-methylcitrate synthase
Pa_1_13140	B2ALX5	4,7	6,3	P31327	CPS1	Carbamoyl-phosphate synthetase I† (C-terminale Region)
Pa_3_7700	B2B0Y1	4,3	7,7 (x1,8)	Q9P2R7	SUCLA2	Succinyl-CoA ligase subunit beta†
Pa_1_3450	B2AAB2	4,0	6,0	Q92506	HSD17B8	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8
Pa_1_17280	B2ATX6	3,3	5,0	Q12428*	PDH1	Probable 2-methylcitrate dehydratase
Pa_1_14630	B2AT45	3,0	6,3 (x2,1)	Q8N159	NAGS	N-acetylglutamate synthase
Pa_4_7010	B2ARM6	3,0	3,7	Q16698	DECR1	2,4-dienoyl-CoA reductase
Pa_3_10910	B2ACZ7	3,0	3,3	P15937*	acu-8	Acetyl-CoA hydrolase
Pa_4_8600	B2AR54	3,0	3,0	O15382	BCAT2	Branched-chain-amino-acid aminotransferase
Pa_2_6200	B2B5Y8	2,3	5,0 (x2,2)	P23434	GCSH	Glycine cleavage system H protein
Pa_6_8420	B2AMZ0	2,3	4,0 (x1,7)	P45954	ACADSB	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase
Pa_2_430	B2B487	2,3	3,3	Q9Y697	NFS1	Cysteine desulfurase†
Pa_3_2600	B2AZV9	2,0	5,3 (x2,7)	P40926	MDH2	Malate dehydrogenase
Pa_1_15690	B2ATF5	2,0	3,7 (x1,9)	Q10341*	cys2	Probable serine-O-acetyltransferase cys2
Pa_2_4980	B2B5L0	2,0	3,3 (x1,7)	Q16836	HADH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase
Pa_3_1420	B2ACM0	2,0	2,0	Q9UHQ9	CYB5R1	NADH-cytochrome b5 reductase 1
Pa_3_9430	B2B162	1,7	3,0 (x1,8)	P04181	OAT	Ornithine aminotransferase†
Pa_4_3040	B2AE70	1,7	1,7	P48735	IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP]
Pa_1_7660	B2A8W9	1,7	1,3	Q02252	ALDH6A1	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
Pa_7_10210	B2AXD7	1,3	3,0 (x2,3)	P30084	ECHS1	Enoyl-CoA hydratase
Pa_1_1980	B2A9W1	1,3	1,7	P51649	ALDH5A1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase†
Pa_4_660	B2ADB9	1,3	1,3	P34897	SHMT2	Serine hydroxymethyltransferase†
Elektronentransportkette und Atmung (5/47 Proteine)						
Pa_1_14370	B2AT17	2,7	2,3	O75947	ATP5H	ATP synthase subunit d
Pa_4_7160	B2ARK6	2,0	4,7 (x2,4)	O75489	NDUFS3	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 3
Pa_1_8620	B2A972	2,0	1,7	O75306	NDUFS2	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 2‡
Pa_5_7500	B2AMC3	1,3	1,7	O14561	NDUFAB1	Acyl carrier protein
Pa_6_240	B2B3E7	1,3	1,3	P47985	UQCRCF1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske‡
Anderes (4/47 Proteine)						
Pa_2_12010	B2B7R7	8,7	10,0	P49411	TUFM	Mitochondrial elongation factor Tu†
Pa_5_8240	B2AKR1	2,0	2,7	P30044	PRDX5	Peroxiredoxin-5
Pa_4_1130	B2ADH4	2,3	2,3	-	-	-
Pa_6_8740	Q8TGH7	2,0	2,3	P10599	TXN	Thioredoxin

*Konnte dem entsprechenden *P. anserina* Protein kein eindeutiges menschliches Homolog zugeordnet werden, so wurde für die Annotation ein homologes Protein einer pilzlichen Spezies gewählt

†Protein, dessen bakterielles Homolog als Substrat der *E. coli* CLXP-Protease identifiziert wurde (mit Ausnahme von HSPA9 und HSPD1, diese wurden als wahrscheinliche Interaktionspartner eingeordnet; Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006)

‡Fe-S enthaltendes/bindendes Protein

Ergebnisse

Die bakteriellen Homologe eines Viertels (8/32) der Proteine der Kategorie „Metabolismus“, darunter ACO2, DLAT, CPS1 und SUCLA2, sind darüber hinaus bekannte Substrate der *E. coli* CLPXP-Protease (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006).

Der Kategorie „Elektronentransportkette und Atmung“ wurden 5/47 der als HsCLPP-Interaktionspartner klassifizierten Proteine zugeordnet. Dazu gehören drei Untereinheiten von Komplex I (NDUFS2, NDUFS3 und NDUFAB1), eine Untereinheit von Komplex III (UQCRCF1) und eine Untereinheit der ATP-Synthase (ATP5H). Von diesen fünf Proteinen wurde ausschließlich die Komplex I-Untereinheit NDUFS3 als angereichert in der Probe $\Delta PaClpP/HsClpPL3F6H$ gefunden.

Die verbleibenden 4/47 Proteine ließen sich keiner der vorgenannten Kategorien zuordnen. Bei diesen handelt es sich um den mitochondrialen Translations-Elongationsfaktor TUFM (dessen bakterielles Homolog als wahrscheinliches *E. coli* CLPXP-Substrat identifiziert wurde; Flynn et al. 2003) und zwei an der Redox-Homöostase beteiligte Enzyme (PRDX5, TXN). Einem weiteren Protein mit der *P. anserina* ID Pa_4_1130 (UniProt ID: B2ADH4) konnte keinerlei menschliches oder pilzliches Homolog zugeordnet werden.

Zusammenfassend sind unter den potenziellen HsCLPP-Interaktionspartnern auffallend viele metabolische Enzyme, insbesondere solcher des Aminosäure- und Fettsäure-Metabolismus sowie des Citratzyklus, vertreten. Eine weitere prominente und klar abgrenzbare Gruppe wird gebildet durch Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen. Um diese Einschätzung zu überprüfen, wurde zusätzlich eine „GO enrichment“-Analyse durchgeführt (Tabelle 25).

Tabelle 25 | „GO enrichment“-Analyse der potenziellen HsCLPP-Interaktionspartner. Ausgewählte GO-Terme, die in der Gruppe der menschlichen Homologe von Genen kodierend für potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner in *P. anserina* angereichert sind. Angegeben sind jeweils der GO-Term mit seiner zugehörigen ID (<http://geneontology.org>), die tatsächlich beobachtete Häufigkeit seines Auftretens (Beobachtet), die erwartete Häufigkeit seines Auftretens (Erwartet), der daraus resultierende Anreicherungsfaktor (Anreicherung) sowie der zugeordnete *P*-Wert für die Signifikanz der Anreicherung. Die Vollständige „GO enrichment“-Analyse findet sich in Tabelle S12.

GO-Term (ID)	Beobachtet	Erwartet	Anreicherung	<i>P</i> -Wert
cellular amino acid catabolic process (GO:0009063)	10	0,2	> 5x	1,4E-10
generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	14	0,8	> 5x	1,6E-10
tricarboxylic acid cycle (GO:0006099)	7	0,1	> 5x	1,7E-09
respiratory electron transport chain (GO:0022904)	6	0,2	> 5x	1,3E-03
fatty acid metabolic process (GO:0006631)	7	0,6	> 5x	1,2E-02

Das erhaltene Ergebnis bestätigte die signifikanten Anreicherungen (*P*-Wert < 5,0E-02) von mehreren GO-Termen innerhalb der Gruppe der potenziellen HsCLPP-Interaktionspartner („cellular amino acid catabolic process“, „generation of precursor metabolites and energy“,

„tricarboxylic acid cycle“, „respiratory electron transport chain“ und „fatty acid metabolic process“), die in Einklang mit den vorher beschriebenen Kategorisierungen sind.

Die 20 im Rahmen des CLPP „Substrat-trapping Assay“ als mögliche CLXP-Substrate klassifizierten Proteine (inkl. des Chaperons PaCLPX) sind in Tabelle 26 dargestellt. Die Unterteilung dieser Proteine in distinkte Kategorien erfolgte wie oben beschrieben. Abgesehen vom dem bekannten CLP-Protease Chaperon CLPX wurde noch ein weiteres Chaperon, ein Homolog des menschlichen ATAD1, als exklusiv mit HsCLPPS153A-L3F6H interagierend identifiziert. Interessanterweise schlagen zwei erst kürzlich erschienene Arbeiten eine Rolle von ATAD1 und seines Hefe-Homologs MSP1 bei der Qualitätskontrolle von mitochondrialen Membranproteinen vor (Chen et al. 2014, Okreglak und Walter 2014).

Tabelle 26 | Übersicht aller Proteine, die als potenzielle CLXP-Substrate identifiziert wurden. Angegeben für jedes Protein ist seine *P. anserina* ID (entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, die Anzahl der im Durchschnitt identifizierten einzigartigen Peptide (UPs i. D.) des Proteins, sowie die Swiss-Prot ID und die Bezeichnung des Gens und Proteins des menschlichen Homologs (vergl. Tabelle S11). Die Zuordnung von Proteinen zu den angegebenen Kategorien (z. B. „Metabolismus“) basiert primär auf ihrer Swiss-Prot-Annotation und zusätzlich auf Informationen aus der allgemeinen Literatur. Für die beiden auch in der $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ -Probe gefundenen Proteine ist zusätzlich noch der Anreicherungsfaktor in Klammern angegeben.

Pa_ID	UniProt ID	UPs	Swiss-Prot ID <i>H. sapiens</i>	Gen	Protein
Chaperone (2/20 Proteine)					
Pa_6_5510	B2B246	7,3	Q8NBU5	ATAD1	ATPase family AAA domain-containing protein 1
Pa_6_5590	B2B254	3,7	O76031	CLPX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like†
Metabolismus (10/20 Proteine)					
Pa_6_5560	B2B251	15,7	Q02218	OGDH	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
Pa_6_1640	B2B2Z0	7,7	P31327	CPS1	Carbamoyl-phosphate synthetase I† (N-terminale Region)
Pa_7_9520	B2AX70	7,3	O00330	PDHX	Pyruvate dehydrogenase protein X component
Pa_5_5370	B2VL95	5,0 (x3,8)	P36957	DLST	2-oxoglutarate dehydrogenase E2 component
Pa_7_10050	B2AXC0	4,0	P08559	PDHA1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha
Pa_1_13750	B2ALS4	2,7	P48728	AMT	Aminomethyltransferase
Pa_5_5810	B2VLD9	2,3	P09622	DLD	Dihydropyridine dehydrogenase†
Pa_1_15800	B2ATG7	2,0	P11177	PDHB	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta
Pa_1_20100	B2AUS2	1,3	P26440	IVD	Isovaleryl-CoA dehydrogenase
Pa_3_9520	B2B172	1,3	P35914	HMGCL	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
Elektronentransportkette und Atmung (3/20 Proteine)					
Pa_3_4870	B2AZM0	21,0	P28331	NDUFS1	NADH dehydrogenase 75 kDa subunit‡
Pa_4_7950	B2ARC6	3,7	P49821	NDUFV1	NADH dehydrogenase flavoprotein 1‡
Pa_5_9670	B2AL19	3,3	Q5T2R2	PDSS1	Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 1
Anderes (5/20 Proteine)					
Pa_3_11170	B2ACX4	10,7 (x4,0)	O59778*	bio2	Biotin synthase‡
Pa_1_18430	B2AUA0	2,7	P22626	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
Pa_2_10680	B2B7C9	2,0	Q86SX6	GLRX5	Glutaredoxin-related protein 5‡
Pa_1_6330	B2AB71	1,7	Q96RP9	GFM1	Mitochondrial elongation factor g†
Pa_5_2590	B2AEH2	1,7	G2TRP3*	ymr31	Mitochondrial 37S ribosomal protein YMR-31

*Konnte dem entsprechenden *P. anserina* Protein kein eindeutiges menschliches Homolog zugeordnet werden, so wurde für die Annotation ein homologes Protein einer pilzlichen Spezies gewählt

†Protein, dessen bakterielles Homolog als Substrat der *E. coli* CLXP-Protease identifiziert wurde (mit Ausnahme von CLPX, der Chaperon-Komponente der CLXP-Protease; Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006)

‡Fe-S enthaltendes/bindendes Protein

Auch die potenziellen CLXP-Substrate waren zum größten Teil (10/20 Proteine) der Kategorie Metabolismus zuzuordnen. Ein zentrales Ziel der mitochondrialen CLXP-Protease in *P. anserina* ist scheinbar der für die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA verantwortliche Pyruvatdehydrogenase-Komplex (engl. „pyruvat dehydrogenase complex“, PDC), der aus mehreren Kopien dreier Enzymkomponenten besteht (als E1 – E3 bezeichnet). Während die

Ergebnisse

E2-Komponente (Dihydrolipoyl-Transacetylase, DLAT) des PDC als HsCLPP-Interaktionspartner eingeordnet wurde (s. o.), wurden alle weiteren Komponenten des PDC (α - und β -Untereinheit von E1: PDHA1 und PDHB; E3: DLD; E3-Bindeprotein: PDHX) als wahrscheinliche CLPXP-Substrate identifiziert.

Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (DLD) ist ein überaus vielseitiges Stoffwechsellzym, dessen bakterielles Homolog ein bekanntes Substrat von *E. coli* CLPXP ist (Neher et al. 2006). Dieses Enzym ist nicht nur Teil des PDC, sondern fungiert u. a. auch als E3-Komponente des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (engl. „oxoglutarat dehydrogenase complex“, OGDC). Der OGDC ist ein zentraler Enzymkomplex des Citratzyklus und katalysiert die Umwandlung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. Seine weiteren Komponenten (E1: OGDH; E2: DLST) wurden ebenfalls als mögliche CLPXP-Substrate in *P. anserina* gefunden.

DLD ist darüber hinaus auch eine Komponente des Glycin-Decarboxylase-Komplexes (engl. „glycine cleavage system“, GCS). Die Aminomethyltransferase (AMT) des GCS ist ebenfalls Teil der als CLPXP-Substrate in *P. anserina* klassifizierten Proteine, während seine beiden weiteren Komponenten mögliche HsCLPP-Interaktionspartner sind (s. o.). Drei weitere der potenziellen Substrate sind ebenfalls Enzyme, die u. a. am Aminosäure-Metabolismus beteiligt sind: Die Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS1; das als Substrat gefundene Protein Pa_6_1640/B2B2Z0 ist homolog zur N-terminalen Region und das als Interaktionspartner gefundene Protein Pa_1_13140/B2ALX5 homolog zur C-terminalen Region von CPS1), das am Leucin, Isoleucin und Valin-Abbau beteiligte Enzym IVD und die Hydroxymethyl-Glutaryl-CoA-Lyase (HMGCL). HMGCL spielt nicht nur eine wichtige Rolle beim Leucin-Abbau, sondern auch bei der Ketogenese und ist somit ebenso dem Fettsäure-Metabolismus zuzuordnen.

In die Kategorie „Elektronentransportkette und Atmung“ entfallen 3/20 der potenziellen CLPXP-Substrate in *P. anserina*. Die beiden Proteine NDUFS1 und NUDFV1 sind Kern-Untereinheiten von Komplex I und vermutlich essentiell für dessen katalytische Aktivität. Bei NDUFS1 handelt es sich um die größte Untereinheit von Komplex I. Von ihr wird angenommen, dass sie Teil des aktiven Zentrums ist in dem die Oxidation von NADH stattfindet. Das Enzym PDSS1 ist nicht direkt mit der Elektronentransportkette assoziiert, jedoch wichtig für die Synthese des für den Ablauf der oxidativen Phosphorylierung notwendigen Elektronenüberträgers Ubichinon-10.

Insgesamt 5/20 der als CLPXP-Substrate klassifizierten Proteine ließen sich keiner der vorgenannten Kategorien direkt zuordnen. Dazu gehören die Biotin-Synthase (bio2), die entsprechend ihrer Namensgebung an der Synthese des Kofaktors Biotin beteiligt ist, und die Oxidoreduktase GLRX5, welche eine Rolle bei der mitochondrialen Fe-Homöostase spielt. Die verbleibenden drei sind Homologe von Proteinen, welche höchstwahrscheinlich mit der Transkription und Translation in Verbindung stehen: Die Ribonukleoproteine HNRNPA2B1

(Prozessierung von prä-mRNA) und ymr31 (ribosomale Untereinheit) sowie der Translations-Elongationsfaktor GFM1 (dessen bakterielles Homolog als *E. coli* CLXP-Substrat identifiziert wurde; Neher et al. 2006).

Die durch den CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* identifizierten potenziellen CLXP-Substrate sind also zusammenfassend, ähnlich wie die HsCLPP-Interaktionspartner, vor allem durch ein gehäuftes Auftreten zentraler Enzyme des mitochondrialen Energiestoffwechsels gekennzeichnet. Dies wurde abermals durch eine „GO enrichment“-Analyse bestätigt (Tabelle 27). Bei dieser zeigte sich eine signifikante Anreicherung der GO-Terme „tricarboxylic acid cycle“, „cellular respiration“, „cellular amino acid catabolic process“, „generation of precursor metabolites and energy“ sowie „acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate“.

Tabelle 27 | „GO enrichment“-Analyse der potenziellen CLXP-Substrate. Ausgewählte GO-Terme, die in der Gruppe der menschlichen Homologe von Genen kodierend für potenzielle CLXP-Substrate in *P. anserina* angereichert sind. Angegeben sind jeweils der GO-Term mit seiner zugehörigen ID (<http://geneontology.org>), die tatsächlich beobachtete Häufigkeit seines Auftretens (Beobachtet), die erwartete Häufigkeit seines Auftretens (Erwartet), der daraus resultierende Anreicherungsfaktor (Anreicherung) sowie der zugeordnete *P*-Wert für die Signifikanz der Anreicherung. Die Vollständige „GO enrichment“-Analyse findet sich in Tabelle S13.

GO-Term (ID)	Häufigkeit	Erwartet	Anreicherung	<i>P</i> -Wert
tricarboxylic acid cycle (GO:0006099)	5	0,0	> 5x	2,4E-07
cellular respiration (GO:0045333)	7	0,1	> 5x	3,8E-07
cellular amino acid catabolic process (GO:0009063)	6	0,1	> 5x	2,1E-06
generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	8	0,3	> 5x	3,0E-06
acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate (GO:0006086)	2	0,0	> 5x	9,5E-03

Als abschließendes Fazit lässt sich sagen, dass der CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* erfolgreich durchgeführt werden konnte. Damit ist erstmalig eine umfassende Identifizierung potenzieller *in vivo* Interaktionspartner und Substrate einer mitochondrialen CLXP-Protease gelungen. Während sich PaCLPP als ungeeignet für den Assay herausstellte, erfüllte HsCLPP alle dafür notwendigen Voraussetzungen. Die durch den CLPP „Substrat-trapping Assay“ erhaltenen Ergebnisse sprechen sehr deutlich dafür, dass die CLXP-Protease in *P. anserina* eine wichtige Rolle für die Regulation bzw. Aufrechterhaltung des Metabolismus der Mitochondrien spielen könnte. So handelt es sich bei den meisten der gefundenen potenziellen Interaktionspartner und Substrate um Enzyme bzw. Komponenten zentraler und hochkonservierter Stoffwechselwege, welche primär in die mitochondriale Kernfunktion der ATP-Generierung im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung involviert sind. Bezeichnenderweise steht die große Mehrheit der identifizierten Proteine, wie aus Abbildung 29 ersichtlich werden sollte, in direktem funktionellem Zusammenhang und spiegelt deutlich die Hauptwege des mitochondrialen Energiestoffwechsels wider.

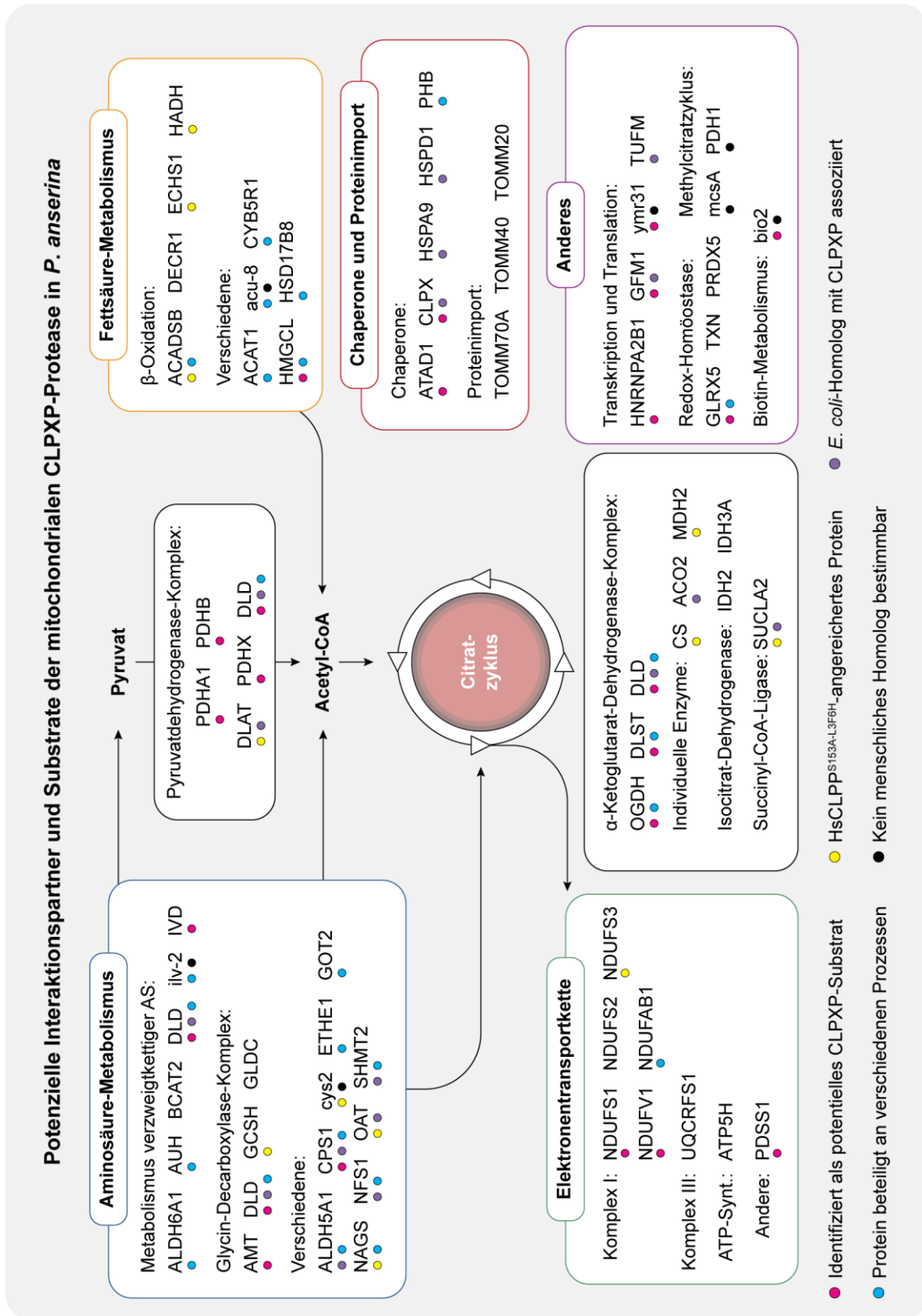


Abbildung 28 | Legende auf der folgenden Seite

Abbildung 29 | **Übersicht aller potenziellen Interaktionspartner und Substrate der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina*.** Zusammenfassende Darstellung der In *P. anserina* als potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner (Tabelle 24) oder CLPXP-Substrate (Tabelle 26) identifizierten Proteine. Die Proteine sind aus Platzgründen durch ihre jeweiligen Gennamen bezeichnet. Die Zuordnung der Proteine zu den entsprechenden Kategorien bzw. Stoffwechselwegen (z. B. „Aminosäure-Metabolismus“) basiert primär auf ihrer Swiss-Prot-Annotation und zusätzlich auf Informationen aus der allgemeinen Literatur. Die verschiedenen farbigen Kreise kennzeichnen zusätzliche Eigenschaften des entsprechenden Proteins. So wurde zum Beispiel das Enzym Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLD; Swiss-Prot ID: P09622; Tabelle 26) des Citratzyklus in dieser Arbeit als CLPXP-Substrat in *P. anserina* klassifiziert (magentafarbener Kreis), das bakterielle Homolog ist ein bekanntes Substrat der *E. coli* CLPXP-Protease (lilane Kreis) und das Enzym ist in an verschiedenen mitochondrialen Prozessen beteiligt (blauer Kreis). Proteine denen keine farbigen Kreise zugeordnet sind, z. B. das mitochondriale Peroxiredoxin-5 (PRDX5; Swiss-Prot ID: P30044; Tabelle 24), wurden in dieser Arbeits als HsCLPP-Interaktionspartner klassifiziert, aber besitzen darüber hinaus keine der zusätzlichen gekennzeichneten Eigenschaften.

5 DISKUSSION

Die in dieser Dissertation beschriebenen Untersuchungen hatten insgesamt zum Ziel, ein tiefergehendes Verständnis der biologischen Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease in dem Ascomyceten *P. anserina* zu erlangen. Ausgangspunkt dafür waren die Erkenntnisse einer vorangegangenen Diplomarbeit, im Rahmen derer eine grundlegende Charakterisierung des *PaClpP*-Deletionsstammes vorgenommen wurde. Dabei wurde entdeckt, dass die Abwesenheit der proteolytischen Komponente PaCLPP zu einer Verlängerung der gesunden Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ unter Standardbedingungen (d. h. optimalen Laborbedingungen) führt (Fischer 2011). Zur näheren Untersuchung dieses unerwarteten phänotypischen Effekts der *PaClpP*-Deletion wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst weitere Charakterisierungen des Deletionsstammes unter Stressbedingungen vorgenommen. Darüber hinaus wurde das Gen *PaClpX*, kodierend für die Chaperon-Komponente der PaCLPXP-Protease, deletiert und zusätzlich ein *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstamm erzeugt. Die daraufhin durchgeführte vergleichende Untersuchung der Lebensspannen von $\Delta PaClpP$, $\Delta PaClpX$ und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ sollte Aufschluss über die möglichen Ursachen für die infolge einer Störung bzw. Ablation der Mitoprotease CLPXP in *P. anserina* beobachtete Langlebigkeit geben.

Weiter wurde ein Stamm hergestellt, der ein Konstrukt kodierend für das menschliche CLPX-Homolog vor dem Hintergrund der *PaClpX*-Deletion exprimiert. Dieser Ansatz basierte auf Experimenten, die zeigen konnten, dass das menschliche CLPP-Homolog in der Lage ist $\Delta PaClpP$ zu komplementieren (Fischer 2011, Fischer et al. 2013). Daher wurde nun versucht, die gesamte menschliche CLPXP-Protease, d. h. sowohl ihre proteolytische als auch ihre Chaperon-Komponente, in *P. anserina* zu rekonstituieren. Dies sollte ermöglichen, eine Untersuchung dieser humanen Protease *in vivo* in einem einfachen und zugänglichen Modellorganismus durchzuführen.

Der Hauptfokus der im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen lag auf einer initialen und möglichst umfassenden Analyse des Interaktoms und insbesondere des Substratspektrums der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina*. Tatsächlich wurde bisher noch in keinem eukaryotischen Organismus eine umfangreiche Bestimmung der potenziellen *in vivo* Interaktionspartner und physiologischen Substrate einer mitochondrialen CLPXP-Protease vorgenommen. Für die Aufklärung mechanistischer Zusammenhänge und das Verständnis der biologischen Rolle einer Protease ist die Kenntnis der von ihr degradierten bzw. proteolytisch regulierten oder prozessierten Proteine jedoch absolut unabdingbar (López-Otín und Overall 2002). Daher sollte für die Identifizierung von potenziellen Interaktionspartnern und Substraten von CLPXP in *P. anserina* eine als CLPP „Substrat-trapping Assay“ bezeichnete Methode etabliert werden. Diese kombinierte biochemische und massenspektrometrische Herangehensweise wurde ursprünglich zur Identifizierung von

Diskussion

Substraten der *E. coli* CLPXP-Protease entwickelt (Flynn et al. 2003). Seitdem konnte sie bereits mehrfach erfolgreich in unterschiedlichen bakteriellen Spezies angewandt werden, um dort das Substratspektrum von CLP-Proteasen zu charakterisieren (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006, Bhat et al. 2013, Feng et al. 2013). Das bisher keine Publikation existiert, die eine Anwendung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in Eukaryoten beschreibt, mag zum Teil darauf zurückzuführen sein, dass *S. cerevisiae*, einer der am weitesten verbreiteten und experimentell zugänglichsten eukaryotischen Modellorganismen, kein CLPP-Homolog besitzt und folglich ungeeignet für solch ein Vorhaben ist (Yu und Houry 2007). *P. anserina* hingegen schien prinzipiell verwendbar, um den CLPP „Substrat-trapping Assay“ unter Verwendung von PaCLPP oder alternativ auch HsCLPP durchzuführen (Fischer et al. 2013). Daher sollten zunächst entsprechende Vorarbeiten geleistet werden, um die notwendigen technischen Voraussetzungen für die Implementierung dieses Assays in *P. anserina* zu schaffen. Ein kritischer Punkt für seine erfolgreiche Durchführung ist eine möglichst spezifische Aufreinigung von CLPP aus isolierten Mitochondrien. Zwar gehören die Immunpräzipitation bzw. Affinitätsaufreinigung von Proteinen mittlerweile bei vielen Modellorganismen zum Standardrepertoire verfügbarer Techniken, jedoch ist nicht bekannt, dass etwas Derartiges in *P. anserina* bereits erfolgreich angewandt werden konnte.

Umfassend betrachtet sollte die Analyse des Interaktoms und insbesondere des Substratspektrums der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina* Anhaltspunkte bezüglich der molekularen Mechanismen liefern, die der Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ zugrunde liegen. Darüber hinaus ist aufgrund des gemeinsamen evolutionären Ursprungs mitochondrialer CLPXP-Proteasen in eukaryotischen Organismen (Voos 2013) davon auszugehen, dass ihre Substrate und damit auch ihre Funktionen zumindest teilweise konserviert sind. Somit könnten die in *P. anserina* gewonnenen Erkenntnisse im Idealfalle auch zu einem besseren grundlegenden Verständnis der CLPXP-Protease in höheren Eukaryoten, z. B. ihrer Relevanz bei der Entstehung und Progression diverser menschlicher Krankheiten (Hansen et al. 2008, Guillon et al. 2009, Jenkinson et al. 2013, Goard und Schimmer 2014, Ahmed et al. 2015, Cole et al. 2015), beitragen. Wenigstens sollte jedoch ermöglicht werden, die identifizierten potenziellen Substrate und Interaktionspartner sowie die daraus abgeleitete biologische Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease gezielt im Rahmen zukünftiger Studien auch in anderen Organismen zu überprüfen.

Nach Schaffung der entsprechenden Voraussetzungen war es möglich, den CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit isolierten *P. anserina* Mitochondrien unter Verwendung einer chimären HsCLPP/PaCLPX-Protease durchzuführen. Dadurch konnten mehrere potenzielle *in vivo* CLPXP-Substrate und HsCLPP-Interaktionspartner identifiziert werden. Auch wenn die erhaltenen Ergebnisse offensichtlich in zukünftigen Studien noch unabhängig verifiziert bzw. vertiefend

untersucht werden müssen, liefern sie wichtige und neuartige Einsichten bezüglich der biologischen Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina* und sind hinreichend, um weiterführende Hypothesen zu generieren.

5.1 Die Abwesenheit von PaCLPP führt zu keinen auffallend negativen Effekten

Während im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit eine signifikante und deutlich ausgeprägte Verlängerung der gesunden Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ bei Wachstum unter Standardbedingungen festgestellt werden konnte (Fischer 2011), ließen die durchgeführten Untersuchungen noch weitestgehend offen, inwiefern die mitochondriale CLPXP-Protease in *P. anserina* wichtig für die Anpassung an verschiedene Stressbedingungen ist. Eine derartige Rolle war aufgrund mehrerer Beobachtungen jedoch prinzipiell zu erwarten:

1. CLP-Proteasen verschiedener bakterieller Spezies sind essentiell für die Adaption an vielfältige Stresssituationen (u. a. Hitzestress, Lichtstress, Salzstress und oxidativen Stress). Konsequenterweise führt in diesen Organismen eine *ClpP*-Deletion zu einer verminderten Stressresistenz und Wachstumsdefiziten der jeweiligen Mutante im Vergleich zum entsprechenden Wildstamm (Porankiewicz et al. 1998, Fedhila et al. 2002, Cohn et al. 2007, Gómez-Baena et al. 2009, Frees et al. 2012, Xie et al. 2013). Ähnliches trifft auch auf einige plastidäre CLP-Proteasen zu (Ostersetzer und Adam 1996, Nakashima et al. 1997, Clarke et al. 1998). Daher wäre eine vergleichbare Rolle einer mitochondrialen CLP-Protease nicht verwunderlich.
2. Aufgrund von Ähnlichkeiten der Substraterkennungsmechanismen von LON- und CLP-Proteasen kann man eine partielle Überschneidung ihrer Substratspektren und damit auch ihrer Funktionen annehmen (Smith et al. 1999, Wickner und Maurizi 1999). Für die mitochondriale LON-Protease in *P. anserina* konnte bereits gezeigt werden, dass sie wichtig für eine allgemeine Form der Proteinqualitätskontrolle und insbesondere den Abbau von oxidativ geschädigten Proteinen ist (Luce und Osiewacz 2009). Eine Überexpression von *PaLon* verbessert die Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Luce und Osiewacz 2009 Luce und Osiewacz 2009), während eine *PaLon*-Deletion zu einer verkürzten Lebensspanne führt und bei Abweichungen von der optimalen Wachstumstemperatur sogar letal ist (Adam et al. 2012).
3. Die Deletion von *Palap*, kodierend für die mitochondriale iAAA-Membranprotease in *P. anserina*, führt ebenfalls zu einer verlängerten Lebensspanne unter Standardbedingungen. Gleichzeitig ist $\Delta Palap$ aber deutlich sensitiver gegenüber Hitzestress als der Wildstamm (Weil et al. 2011). Dies weist auf eine wichtige Rolle dieser Protease unter bestimmten Stressbedingungen hin. Möglicherweise ist Ähnliches auch für PaCLPXP der Fall.

Diskussion

In der Regel ist also meist ein zumindest partiell negativer Effekt infolge der Ablation einer Komponente der zellulären bzw. mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle zu beobachten. Im Falle der *PaClpP*-Deletion wurde diese Annahme jedoch nicht bestätigt. In der Diplomarbeit konnte als einzige negative Auswirkung lediglich eine minimale Hitzesensitivität von $\Delta PaClpP$, in Form einer leicht verminderten Wachstumsrate und Aufhebung des lebensverlängernden Effekts, festgestellt werden (Fischer 2011). Die in der vorliegenden Doktorarbeit zusätzlich durchgeführten Untersuchungen der weiblichen Fertilität des *PaClpP*-Deletionsstammes bei Anzucht unter Standardbedingungen und Hitzestress zeigten ebenfalls keine auffälligen Beeinträchtigungen im Vergleich zum Wildstamm (Fischer et al. 2013). Insbesondere für einen solch energieaufwendigen und sensiblen Entwicklungsprozess hätte man eine deutlich messbare Einschränkung erwarten können. Noch überraschender war aber die Feststellung, dass die An- oder Abwesenheit von PaCLPP scheinbar keinerlei Einfluss auf die Resistenz gegenüber verschiedenen oxidativen Stressoren, darunter auch der mitochondriale Superoxidgenerator Paraquat, hat (Fischer et al. 2013).

Da sowohl Hitzestress als auch oxidativer Stress die mitochondriale Proteinhomöostase kompromittieren (Bender et al. 2010, Voos 2013), stellen die genannten Befunde insgesamt in Frage, ob die PaCLPP-Protease tatsächlich von Bedeutung für eine allgemeine Form der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle in *P. anserina* ist. Möglicherweise übernimmt sie hauptsächlich eher eine gezielte proteolytische Regulation spezifischer Substratproteine, so dass ihre Abwesenheit unter den getesteten Stressbedingungen nicht zu auffälligen globalen Effekten führt.

Darüber hinaus ist als eine weitere Möglichkeit auch gut vorstellbar, dass die Deletion von *PaClpP* und die daraus folgende Beeinträchtigung der mitochondrialen Homöostase durch eine kompensatorische Aktivierung anderer Komponenten oder Mechanismen der mitochondrialen bzw. zellulären Qualitätskontrolle ausgeglichen wird. Dass es sich dabei um die PaLON-Protease handelt, deren Steigerung zu einer verlängerten Lebensspanne der entsprechenden *P. anserina* Mutante führt (Luce und Osiewacz 2009), kann durch Untersuchungen der Diplomarbeit weitestgehend ausgeschlossen werden (Fischer 2011). Ebenso scheint es aufgrund der Befunde der vorliegenden Arbeit unwahrscheinlich, dass das Chaperon PaCLPX in Abwesenheit von PaCLPP in der Lage ist, bestimmte autonome Funktionen zu übernehmen, die maßgeblich für den langlebigen Phänotyp des *PaClpP*-Deletionsstammes sind. Eine weitere Möglichkeit, um die unerwartet positiven Effekte der *PaClpP*-Deletion zu erklären, wäre eine Aktivierung der allgemeinen und/oder Mitochondrien-spezifischen Autophagie in $\Delta PaClpP$. Von diesem Qualitätskontrollmechanismus ist bereits bekannt, dass er dazu beiträgt lebensverlängernde Effekte in *P. anserina* zu vermitteln (Knuppertz et al. 2014).

Tatsächlich konnten im Rahmen eines unabhängig durchgeführten Forschungsprojektes in diesem Arbeitskreises Hinweise dafür gesammelt werden, dass der *PaClpP*-Deletionsstamm eine gesteigerte Autophagierate aufweist und die Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ mit der Fähigkeit zur Durchführung von Autophagie in Verbindung steht (persönliche Mitteilung von L. Knuppertz, Ak Osiewacz). Dies bedeutet, dass eine Störung der mitochondrialen CLXP-*Protease* direkt oder indirekt zu einer Aktivierung der Autophagie zu führen scheint. Dadurch lässt sich möglicherweise die, zumindest unter optimalen Laborbedingungen, insgesamt positive Auswirkung der *PaClpP*-Deletion auf den Gesamtorganismus erklären. Für die Entwicklung eines hypothetischen Modells der zugrundeliegenden mechanistischen Zusammenhänge ist zusätzlich auch die Kenntnis der biologischen Rolle der CLXP-*Protease* in *P. anserina* nötig (siehe Abschnitte 5.6 und 5.7).

5.2 Das Chaperon PaCLPX hat vermutlich PaCLPP-unabhängige Funktionen

Neben der initialen Charakterisierung von $\Delta PaClpP$ wurde in der, dieser Doktorarbeit vorausgehenden, Diplomarbeit außerdem bereits versucht, das Gen *PaClpX*, kodierend für die Chaperon-Komponente der *P. anserina* CLXP-*Protease*, zu deletieren (Fischer 2011). Die vergleichende Analyse von $\Delta PaClpX$ und $\Delta PaClpP$ sollte Aufschluss darüber geben, ob PaCLPX grundsätzlich autonome, von PaCLPP-unabhängige Funktionen besitzt. Zusätzlich sollte der *PaClpX*-Deletionsstamm verwendet werden, um zu überprüfen, ob PaCLPX und die menschliche CLPX funktionell homolog sind. Während die Deletion von *PaClpX* in der Diplomarbeit noch nicht gelang, konnte sie in der vorliegenden Arbeit erfolgreich durchgeführt und zusätzlich der Doppeldeletionsstamm $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$ erzeugt werden.

Die Vermutung, dass PaCLPX Funktionen als eigenständiges Chaperon besitzen könnte, basiert hauptsächlich auf Erkenntnissen bezüglich der CLPX-Homologe anderer eukaryotischer Spezies. So besitzt *S. cerevisiae* zwar keine CLPP-Komponente und folglich auch keine vollständige CLXP-*Protease*, jedoch ein Homolog von CLPX (van Dyck et al. 1998, Yu und Houry 2007). Damit ist eine autonome Funktionsweise von CLPX als Chaperon in *S. cerevisiae* anzunehmen. Tatsächlich wurde in einer kürzlich erschienenen Arbeit der Nachweis erbracht, dass ScCLPX die Aktivierung eines Enzyms der Häm-Biosynthese durch Einbau seines Kofaktors katalysiert und dass diese Aufgabe auch von CLPX-Homologen in Säugern wahrgenommen wird (Kardon et al. 2015). Von CLPX des Menschen ist darüber hinaus bekannt, dass es vermutlich CLPP-unabhängig mit dem mitochondrialen Transkriptionsfaktor TFAM interagiert und dadurch Einfluss auf die Integrität und Propagation der mtDNA nimmt (Kasashima et al. 2012).

Die Analyse der Lebensspanne von $\Delta PaClpX$ zeigte, dass diese unter Standardbedingungen ebenfalls verlängert war. Jedoch war dieser Effekt weniger deutlich ausgeprägt als bei den beiden Stämmen $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass

Diskussion

PaCLPX tatsächlich nicht nur als Chaperon-Komponente der *P. anserina* CLXP-*Protease* fungiert, da in diesem Fall $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaClpX$ einen identischen Phänotyp zeigen müssten. Inwiefern PaCLPX ähnliche oder andersartige Funktionen als die CLPX-Homologe aus Hefe oder Säugern aufweist, ist in Anbetracht des erhaltenen Ergebnisses also eine sinnvolle Fragestellung für zukünftige Untersuchungen. Weiter lässt sich aus den Analysen der Lebensspannen auch folgern, dass die Lebensverlängerung von $\Delta PaClpP$ nicht durch autonome Funktionen des Chaperons PaCLPX vermittelt wird. Dies wird dadurch deutlich, dass auch der *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstamm weiterhin eine verlängerte Lebensspanne zeigt, die nahezu exakt der von $\Delta PaClpP$ entspricht.

5.3 Das menschliche CLPX-Chaperon ist nicht in der Lage $\Delta PaClpX$ zu komplementieren

Der *PaClpX*-Deletionsstamm wurde zusätzlich verwendet, um zu überprüfen, ob das CLPX-Chaperon des Menschen die Abwesenheit von PaCLPX kompensieren kann. Aus vorangegangenen Untersuchungen war bereits bekannt, dass HsCLPP in der Lage ist $\Delta PaClpP$ zu komplementieren (Fischer 2011, Fischer et al. 2013). Daher erschien es sinnvoll zusätzlich HsCLPX in *P. anserina* einzubringen und dadurch die gesamte menschliche CLXP-*Protease* in diesem einfachen Modellorganismus für weiterführende Untersuchungen zugänglich zu machen. Im Gegensatz zu HsCLPP ist HsCLPX in *P. anserina* jedoch offensichtlich nicht stabil vorhanden und folglich auch nicht in der Lage, die entsprechenden funktionalen Oligomere zu bilden. So konnte in den Mitochondrien des transgenen Stammes $\Delta PaClpX/HsClpX$ nicht das erwartete HsCLPX-Monomer mit einer Größe von ca. 63 kDa nachgewiesen werden. Die einzigen HsCLPX-spezifische Signale, die detektiert werden konnten, traten im Bereich von etwa 10–15 kDa auf. Möglicherweise liegt diesem Phänomen eine zum größten Teil nur unvollständige Synthese des menschlichen Proteins in *P. anserina* bzw. sein Abbau infolge einer inkorrekten Faltung oder unvollständigen posttranslationalen Modifikation zugrunde. Somit blieb für die Untersuchung der menschlichen CLPP in *P. anserina* nur die Option, diese im Kontext der chimären HsCLPP/PaCLPX-*Protease* zu betrachten.

5.4 HsCLPP erfüllt, im Gegensatz zu PaCLPP, die Voraussetzungen für einen CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina*

Der CLPP „Substrat-trapping Assay“ nutzt hauptsächlich die Tatsache, dass eine Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von CLPP in der Regel keinen Einfluss auf die Fähigkeit dieses Proteins zur Assemblierung in den aus zwei Heptameren bestehenden CLPP-Kernzylinder hat (Kim et al. 2000, Singh et al. 2000). Außerdem ist dieser katalytisch inaktive CLPP-Kernzylinder grundsätzlich weiterhin in der Lage, mit CLP-Chaperonen zu interagieren ((Kim et al. 2000, Singh et al. 2000). Dies hat zur Folge, dass Substrate einer CLP-*Protease* weiterhin durch die betreffende Chaperon-Komponente erkannt, entfaltet und in den CLPP-

Kernzylinder transloziert werden können. Da jedoch die eigentliche Proteolyse nicht mehr stattfinden kann, werden die Substrate von CLPP „eingefangen“ ((Kim et al. 2000, Singh et al. 2000, Flynn et al. 2003). Durch eine Aufreinigung von CLPP unter physiologischen, nicht-denaturierenden Bedingungen können somit neben Interaktionspartnern zusätzlich auch die normalerweise nicht persistenten Substrate ko-aufgereinigt werden. Diese Proteine können entweder gezielt durch Antikörper nachgewiesen, oder unvoreingenommen, z. B. durch eine massenspektrometrische Analyse, identifiziert werden (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006, Bhat et al. 2013, Feng et al. 2013). Zwingend erforderlich um einen CLPP „Substrat-trapping Assay“ wie beschrieben zu implementieren ist also eine katalytische Inaktivierung von CLPP und die Option CLPP möglichst spezifisch unter nativen Bedingungen aufzureinigen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Voruntersuchungen zur Etablierung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* zeigten, dass die Inaktivierung von PaCLPP durch Mutation des katalytischen Serin zu Alanin zu einer gegenüber Wildtyp-PaCLPP gesteigerten Größe des Monomers führte und darüber hinaus die Oligomerisierung zum PaCLPP-Kernzylinder verhinderte. Möglicherweise ist dafür eine, in der inaktiven Variante unterbundene, autokatalytische Prozessierung von PaCLPP verantwortlich, die notwendig für die funktionelle Assemblierung der proteolytischen Komponente ist. Tatsächlich wurde Ähnliches bereits für *E. coli* CLPP beschrieben. So besitzt EcCLPP nach der Synthese ein 14 Aminosäuren langes Propeptid, welches zunächst autokatalytisch abgespalten werden muss, um das funktionale Enzym zu erhalten. Entsprechend wurde auch bei EcCLPP beobachtet, dass eine Mutation des Serin oder Histidin der katalytischen Aminosäure-Triade zu einer gesteigerten Größe des mutierten Proteins führt. Jedoch ist EcCLPP auch ohne Abspaltung dieses Propeptides noch in der Lage zu oligomerisieren (Maurizi et al. 1990).

Da bisher noch keine autokatalytische Prozessierung einer eukaryotischen CLP-Protease beschrieben wurde und die intrazelluläre Regulation bzw. physiologische Relevanz dieses Vorgangs folglich nicht verstanden ist, könnte seine genauere Untersuchung durchaus von Interesse sein. Dafür wäre es zunächst erforderlich, die Identität des von der inaktiven PaCLPP-Variante vermutlich nicht abgespaltenen Peptids zu bestimmen. Für die beabsichtigte Identifizierung von CLPX-Substraten jedoch war PaCLPP offensichtlich ungeeignet und wurde daher nicht für entsprechende Experimente weiterverwendet.

Die katalytische Inaktivierung der menschlichen CLPP hingegen hatte keine veränderte Größe des Monomers im Vergleich zu Wildtyp-HsCLPP in *P. anserina* zur Folge. Weiterhin konnte die Ausbildung eines CLPP-Kernzylinders durch die inaktive HsCLPP-Variante bestätigt werden. Somit war die Möglichkeit gegeben, denn CLPP „Substrat-trapping Assay“ mittels einer chimären CLP-Protease, gebildet aus menschlicher CLPP und *P. anserina* CLPX, durchzuführen (Fischer et al. 2013). Außerdem war es möglich, sowohl aktive als auch inaktive HsCLPP aus

Diskussion

P. anserina Mitochondrien effizient und spezifisch aufzureinigen. Davon war nicht von vornherein auszugehen, da bisher entsprechende Methoden in *P. anserina* noch nicht etabliert waren. Während eine Aufreinigung von HsCLPP durch Immunpräzipitation nicht möglich war und der in *E. coli* für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ verwendete Affinitätsmarker (6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker; Neher et al. 2006) sich ebenfalls als ungeeignet erwies, wurden letztlich mehrere alternative Affinitätsmarker gefunden, die für eine Tandem-Affinitätsaufreinigung von HsCLPP eingesetzt werden konnten. Als am praktikabelsten und stabilsten zeigte sich hierbei ein an den C-Terminus angefügter (GGGGS)₂-Linker gefolgt von einem 3xFLAG-6xHis-Marker. Folglich wurden die entsprechende aktive und inaktive HsCLPP-Variante, HsCLPPL3F6H und HsCLPPS153A-L3F6H, für den CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* eingesetzt.

Durch biochemische *in vitro* Studien konnte bereits demonstriert werden, dass auch eine Interaktion von HsCLPP mit dem *E. coli* CLPX-Chaperon möglich ist und zu einer funktionalen Protease führt. Dadurch wurde bestätigt, dass die Substratspezifität einer chimären CLP-Protease hauptsächlich durch ihre Chaperon-Komponente bestimmt wird (Kang et al. 2002). Folglich ist davon auszugehen, dass die hier zum Einsatz kommende HsCLPP/PaCLPX-Protease dasselbe Substratspektrum wie *P. anserina* CLXP aufweist. Dies bedeutet, dass auch bei Erfolg des CLPP „Substrat-trapping Assay“ trotz der Verwendung der menschlichen CLPP keine mit Sicherheit gültige Aussage bezüglich der *in vivo* Substratspezifität der humanen CLXP-Protease getroffen werden kann. Jedoch ist von einer zumindest partiellen Konservierung des Substratspektrums und der Funktion mitochondrialer CLXP-Proteasen auszugehen (siehe Abschnitt 5.8).

5.5 Der CLPP „Substrat-trapping Assay“ konnte erfolgreich durchgeführt werden

Durch den CLPP „Substrat-trapping Assay“ konnten, nach entsprechender Anpassung der Pufferbedingungen während der nativen Tandem-Affinitätsaufreinigung, 67 *P. anserina* Proteine identifiziert werden, die potenzielle Interaktionspartner bzw. Substrate der HsCLPP/PaCLPX-Protease sind. Abgesehen vom Chaperon PaCLPX wurden zusätzlich insgesamt 19 Proteine exklusiv oder hochspezifisch mit der inaktiven HsCLPP-Variante HsCLPPS153A-L3F6H ko-aufgereinigt und entsprechend als CLXP-Substrate klassifiziert. Wie bereits an entsprechender Stelle angemerkt, wurde auch in einem bakteriellen CLPP „Substrat-trapping Assay“ beobachtet, dass die Chaperon-Komponente CLPX nach einer nativen Tandem-Affinitätsaufreinigung ausschließlich als mit der inaktiven CLPP-Variante assoziiert gefunden wurde (Bhat et al. 2013). Sehr wahrscheinlich ist dieser Befund durch eine Stabilisierung der eher labilen Interaktion von CLPP mit CLPX in Anwesenheit von eingefangenen Substraten zu

erklären und kann folglich als Bestätigung bzw. interne Kontrolle für den Erfolg des CLPP „Substrat-trapping Assay“ gewertet werden (Joshi et al. 2004).

Von den 47 Proteinen, die im Vergleich zur Hintergrundkontrolle mit beiden HsCLPP-Varianten spezifisch ko-aufgereinigt wurden, waren 12 deutlich bevorzugt mit der katalytisch inaktiven menschlichen CLPP-Variante assoziiert. Es ist somit durchaus wahrscheinlich, dass es sich auch bei diesen als CLPP-Interaktionspartnern klassifizierten Proteinen zumindest teilweise um vielversprechende CLPXP-Substratkandidaten handelt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass umgekehrt keiner der 47 Interaktionspartner bevorzugt mit der aktiven HsCLPP-Variante aufgereinigt wurde. Dies spricht dafür, dass die bevorzugte Assoziation ausgewählter Proteinen mit der inaktiven Variante der menschlichen CLPP nicht zufällig, sondern tatsächlich von physiologischer Relevanz ist.

Um mit Sicherheit zwischen CLPXP-Substraten und CLPP-Interaktionspartnern differenzieren bzw. die in dieser Doktorarbeit gefundenen Kandidaten eindeutig verifizieren zu können, ist es notwendig zusätzliche Experimente durchzuführen. Zur allgemeinen Validierung der gefundenen Protein-Protein-Interaktionen würde es sich im konkreten Falle zunächst anbieten, die als potenzielle Substrate oder Interaktionspartner identifizierten Proteine aufzureinigen (aus isolierten Mitochondrien des *P. anserina* Wildstammes und/oder der hier verwendeten transgenen Stämme) und die Eluate dieser Aufreinigung auf die Anwesenheit von PaCLPP bzw. HsCLPP zu überprüfen. Dafür erforderlich wären entweder Antikörper für eine direkte Immunpräzipitation der zu überprüfenden Proteine oder ihre, ähnlich wie für HsCLPP erfolgte, Affinitätsmarkierung und anschließende Aufreinigung. Eine definitive Bestätigung dafür, dass die als Substrate klassifizierten Proteine tatsächlich von CLPXP abgebaut werden, würde darüber hinaus die Durchführung eines Degradationsassays *in vivo* oder *in vitro* erfordern. So wurden etwa mehrere, durch einen CLPP „Substrat-trapping Assay“ initial identifizierte, Substratkandidaten der *E. coli* CLPXP-Protease durch einen *in vivo* Degradationsassay zweifelsfrei als tatsächliche Substrate dieser Protease verifiziert (Flynn et al. 2003).

Prinzipiell würden sich als einfachste und am wenigsten arbeitsintensive Überprüfungs-möglichkeiten ausgewählter potenzieller CLPXP-Substrate und CLPP-Interaktionspartner, die in der vorliegenden Doktorarbeit identifiziert wurden, ihre Immunpräzipitation aus isolierten Mitochondrien sowie gegebenenfalls die Überprüfung ihrer CLPXP-abhängigen Degradation in isolierten Mitochondrien anbieten. Beide Herangehensweisen erfordern zwingend die Verfügbarkeit geeigneter Antikörper. Jedoch existieren derzeit für keine der identifizierten prominenten Interaktionspartner oder Substrate in *P. anserina* entsprechende spezifische Antikörper. Daher müssten diese entweder zunächst hergestellt, oder Antikörper gegen homologe Proteine anderer Spezies auf ihre Verwendbarkeit in *P. anserina* getestet werden.

Diskussion

Eine weitere Möglichkeit, um CLPX-Substrate von CLPP-Interaktionspartnern zu differenzieren, wäre den CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* erneut in Abwesenheit des PaCLPX-Chaperons (d. h. vor dem Hintergrund einer *PaClpX*-Deletion) durchzuführen. Auf diese Weise sollte das „Einfangen“ von Substraten durch die inaktive HsCLPP-Variante unterbunden werden. Konkret wäre demnach zu erwarten, dass durch eine Tandem-Affinitätsaufreinigung von HsCLPPS153A-L3F6H aus isolierten Mitochondrien des durch Kreuzung herzustellenden Stamms $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX/HsClpPS153A-L3F6H$ weiterhin HsCLPP-Interaktionspartner, aber keine Substrate mehr ko-aufgereinigt werden sollten.

Die Durchführung der beschriebenen zusätzlichen validierenden Experimente war im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen zwar nicht mehr möglich, aber die erhaltenen Ergebnisse entsprachen eindeutig den Erwartungen für einen erfolgreichen CLPP „Substrat-trapping Assay“ und zeigten außerdem ein sehr deutliches und spezifisches Bild des wahrscheinlichen Interaktoms und Substratspektrums von CLPX in *P. anserina*. Daher erfolgt die verbleibende Diskussion grundsätzlich unter der Annahme, dass es sich bei der Mehrzahl der hier identifizierten Proteine tatsächlich um reelle Interaktionspartner und Substrate von CLPX handelt. Wie auch im Ergebnisteil, werden im Folgenden für die Benennung konkreter Proteine hauptsächlich die Gennamen der zugeordneten menschlichen Homologe verwendet.

5.6 Die Mehrheit der potenziellen Interaktionspartner und Substrate der mitochondrialen CLPX-Protease in *P. anserina* sind Komponenten des Energiestoffwechsels

Die meisten der in dieser Doktorarbeit identifizierten potenziellen CLPX-Substrate und HsCLPP-Interaktionspartner ließen sich zentralen mitochondrialen Stoffwechsel- und Energiewandlungswegen (Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, Metabolismus von Aminosäuren und Fettsäuren, Citratzyklus und Elektronentransportkette) zuordnen. Lediglich etwas mehr als ein Viertel (18/67) aller gefundenen Proteine steht nicht oder nur indirekt mit diesen Prozessen in Verbindung.

Dazu gehören neben CLPX vier weitere mitochondriale Chaperone, darunter die mit beiden HsCLPP-Varianten gleichermaßen assoziierten konservierten Hitzeschockproteine HSPA9 (Teil der HSP70-Familie) und HSPD1 (Teil der HSP60-Familie). Die bakteriellen Homologe dieser Proteine (HSPA9: DNAK und HSPD1: GROEL) wurden auch im Rahmen des ersten in *E. coli* durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assays“ identifiziert (Flynn et al. 2003). Anzumerken ist, dass das Chaperon DNAK in diesem System ebenfalls als CLPP-Interaktionspartner eingeordnet wurde. Eine mögliche Erklärung für die sowohl in *P. anserina* als auch in *E. coli* beobachtete Interaktion dieser Chaperone mit CLPP könnte sein, dass sie, gemäß ihrer bekannten Funktionen, an ungefaltete oder noch nicht korrekt assemblierte CLPP-

Untereinheiten binden (Mayer und Bukau 2005, Deocaris et al. 2006, Calloni et al. 2012). HSPA9 spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle beim Import von Proteinen in die Mitochondrien (Deocaris et al. 2006). Die dadurch implizierte Annahme, dass ein Teil der aus *P. anserina* aufgereinigten HsCLPP-Untereinheiten Transportintermediate darstellt, wird auch dadurch unterstützt, dass drei Kern-Untereinheiten des am Proteinimport beteiligten TOM-Komplexes in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als HsCLPP-Interaktionspartner gefunden wurden. Von den beiden weiteren identifizierten Chaperonen wurde ATAD1 exklusiv mit HsCLPPS153A-L3F6H und Prohibitin (PHB) mit beiden HsCLPP-Varianten ko-aufgereinigt. Die genaue molekulare Funktion dieser Chaperone in Eukaryoten ist nicht im Detail bekannt, jedoch wird in beiden Fällen hauptsächlich eine Beteiligung an der Qualitätskontrolle von mitochondrialen Membranproteinen angenommen (Artal-Sanz und Tavernarakis 2009, Chen et al. 2014). Möglicherweise stehen die Homologe dieser Chaperone in *P. anserina* demnach mit einer von CLPXP vermittelten Regulation von Atmungskettenkomplexen in Verbindung (s. u.). Vier der gefundenen Proteine sind in die mitochondriale Transkription und Translation involviert. Bei zweien handelt es sich um mitochondriale Translations-Elongationsfaktoren (GFM1, als potenzielles Substrat identifiziert und TUFM, als Interaktionspartner identifiziert), deren bakterielle Homologe ebenfalls beide Substrate von *E. coli* CLPXP sind (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006). Die anderen beiden sind Ribonukleoproteine – eines davon ist in die Prozessierung von prä-mRNA involviert (HNRNPA2B1) und das andere ein ribosomales Protein (ymr31). Drei weitere hier identifizierte potenzielle CLPXP-Substrate und -Interaktionspartner (GLRX5, TXN und PRDX5) sind allgemein der mitochondrialen Redox-Homöostase zuzuordnen. Für Peroxiredoxin 5 (PRDX5) des Menschen wird vornehmlich eine Rolle in der ROS-Entgiftung angenommen (Knoops et al. 2011). Die Reduktion der dabei in PRDX5 entstehenden intramolekularen Disulfidbrücke erfolgt durch das ebenfalls als HsCLPP-Interaktionspartner klassifizierte Thioredoxin (TXN; Knoops et al. 2011). Die als CLPXP-Substrat eingeordnete Oxidoreduktase Glutaredoxin 5 (GLRX5) spielt, gemeinsam mit HSPA9 und dem zusätzlich identifizierten NFS1, eine Rolle bei der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern (Rouault 2015). Fe-S-Cluster sind in Mitochondrien vor allem für den Elektronentransport innerhalb der Komplexe I – III der Atmungskette von Bedeutung und fungieren daneben auch als Kofaktoren mitochondrialer Enzyme, z. B. der Aconitase des Citratzyklus (Rouault 2012, Rouault 2015). Auch das als mögliches CLPXP-Substrat identifizierte Enzym Biotin-Synthase (bio2) enthält einen Fe-S-Cluster als Kofaktor und ist selbst wiederum an der Synthese des Kofaktors Biotin beteiligt (Picciocchi et al. 2001, Muhlenhoff et al. 2002). Darüber hinaus wurden zwei essentielle Enzyme des Methylcitratzyklus (engl. „methylcitrate cycle“, MCC), die Methylcitrat-Synthase (mcsA) und die Methylcitrat-Dehydratase (PDH1), gefunden. Der MCC ist hauptsächlich in Bakterien und Pilzen zu finden und stellt eine Möglichkeit für die Verwertung

Diskussion

von Propionyl-CoA dar, welches aus dem Abbau von ungeradzahligen Fettsäuren resultiert (Munoz-Elias et al. 2006, Upton und McKinney 2007). Durch die Reaktionen des MCC wird Propionyl-CoA zu Pyruvat oxidiert, welches wiederum nach oxidativer Decarboxylierung durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex (s. u.) als Acetyl-CoA in den Citratzyklus eintreten kann.

Die verbleibenden ca. 75 % der im Rahmen des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* identifizierten Proteine (49/67) sind nahezu ausschließlich zentrale, konservierte und essentielle Enzyme des mitochondrialen Stoffwechsels. Eine umfassende und erschöpfende Darstellung der durch sie konstituierten, miteinander verknüpften Stoffwechselwege bzw. des durch sie abgebildeten metabolischen Netzwerks ist an dieser Stelle nicht möglich. Daher wird der Fokus hauptsächlich auf die Diskussion der durch sie repräsentierten katabolen Pfade gelegt, die zur Energiekonversion in den Mitochondrien und damit letztlich zur Generierung von ATP durch den Vorgang der oxidativen Phosphorylierung beitragen. Natürlich katalysieren viele der beschriebenen Enzyme bzw. Enzymkomplexe aber nicht nur katabole sondern, in Abhängigkeit von den jeweils gegebenen zellulären Anforderungen, auch anabole Reaktionen und sind darüber hinaus häufig in mehrere Stoffwechselwege und weitere mitochondriale Prozesse gleichzeitig involviert. Zusätzlich sollte vorausschickend angemerkt werden, dass häufig mehrere oder sogar alle Komponenten bzw. Untereinheiten eines bestimmten heteromeren Enzymkomplexes als mögliche Substrate und/oder Interaktionspartner von CLPXP gefunden wurden. Dies spricht einerseits im positiven Sinne für die Spezifität der durchgeführten Analyse, andererseits erscheint es dadurch aber auch wahrscheinlich, dass insbesondere einige der als HsCLPP-Interaktionspartner klassifizierten Proteine auf indirekte Protein-Protein Interaktionen zurückzuführen sein könnten.

Insgesamt 19 der gefundenen Proteine (8 davon mögliche CLPXP-Substrate oder bevorzugt mit der inaktiven HsCLPP-Variante ko-aufgereinigte Proteine) sind in den Metabolismus von Aminosäuren involviert. Besonders hervorzuheben ist, dass alle vier Komponenten des mit der inneren mitochondrialen Membran assoziierten (Motokawa und Kikuchi 1971, Kikuchi et al. 2008) Glycin-Decarboxylase-Komplexes (engl. „glycine cleavage system“, GCS) identifiziert werden konnten. Der GCS ist Teil der wichtigsten mitochondrialen Stoffwechselwege für den Katabolismus der Aminosäure Glycin und, in Verbindung mit dem ebenfalls identifizierten Enzym Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT2), zusätzlich auch Serin (Motokawa und Kikuchi 1971, Kikuchi et al. 2008). Eine weitere distinkte Untergruppe wird gebildet durch sechs Enzyme, die vorwiegend den Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin katalysieren. Die verbleibenden zehn Enzyme lassen sich weniger klar gruppieren und besitzen zum Teil diverse Funktionen. Einige von ihnen sind für die Degradation weiterer Aminosäuren, u. a. Cystein und Aspartat, verantwortlich (ALDH5A1, ETHE1 und gOT2), während andere (cys2, OAT, CPS1) im Gegensatz dazu primär in die Aminosäuren-Biosynthese

involviert sind. Die Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS1) katalysiert darüber hinaus den ersten und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Harnstoffzyklus (Nakagawa et al. 2009), welcher die Synthese des Stoffwechselendprodukts Harnstoff aus dem u. a. beim Abbau von Aminosäuren entstehenden und potenziell toxischen Ammonium ermöglicht. Die Aktivität von CPS1 setzt das Vorhandensein des allosterischen Aktivators N-Acetylglutamin voraus, welcher durch das ebenfalls identifizierte Enzym N-Acetylglutamat-Synthetase (NAGS) synthetisiert wird (Shi et al. 2015). Zusammenfassend sind also die meisten Enzyme der Kategorie „Aminosäure-Metabolismus“ primär für den Abbau proteinogener Aminosäuren verantwortlich. Die Ergebnisse der „GO enrichment“-Analysen, welche sowohl innerhalb der Gruppe der gefundenen HsCLPP-Interaktionspartner als auch innerhalb der Gruppe der CLPXP-Substrate eine signifikante Anreicherung des GO-Terms „cellular amino acid catabolic process“ zeigten, bestätigen diese Interpretation. Die bei ausreichender Verfügbarkeit der entsprechenden Aminosäuren resultierenden verschiedenen Endprodukte ihres Abbaus (Pyruvat, Acetyl-CoA, α -Ketoglutarat, Succinyl-CoA, Fumarat und Oxalacetat) stellen allesamt mögliche Eintrittspunkte in den Citratzyklus dar.

Neben Enzymen des Aminosäure-Metabolismus wurden auch insgesamt neun Enzyme identifiziert, die hauptsächlich für den Stoffwechsel von Fettsäuren verantwortlich sind. Darunter finden sich vier Enzyme, die allesamt Schritte der β -Oxidation katalysieren. Die β -Oxidation von Fettsäuren stellt sehr wahrscheinlich ihren Hauptabbauweg in Mitochondrien dar und mündet über die Bildung des dabei entstehenden zentralen Stoffwechselintermediats Acetyl-CoA ebenfalls im Citratzyklus (Eaton et al. 1996, Houten und Wanders 2010). Das als mögliches CLPXP-Substrat identifizierte Enzym Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyase (HMGCL) ist zusammen mit der Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT1) am Metabolismus von Ketokörpern beteiligt, welche eine Transport- und Speicherform des bei der β -Oxidation entstehenden Acetyl-CoA unter Glucose-Mangelbedingungen darstellen (Laffel 1999, Fukao et al. 2004). Die verbleibenden drei Enzyme der Kategorie „Fettsäure-Metabolismus“ lassen sich funktionell weniger eindeutig zuordnen, sind aber vermutlich u. a. in die Synthese von Lipiden eingebunden (Chen et al. 2009).

Das wohl eindeutigste Ziel der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina*, welches in dieser Arbeit identifiziert werden konnte, ist der Pyruvatdehydrogenase-Komplex (engl. „pyruvate dehydrogenase complex“, PDC). Dieser bildet die Hauptverbindung zwischen dem zellulären und mitochondrialen Energiestoffwechsel, indem er die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert (Fernie et al. 2004). Pyruvat, als Endprodukt des Abbaus von Kohlenhydraten durch Glykolyse im Cytosol, gelangt vermutlich mittels passiver Diffusion durch das Membranprotein Porin/VDAC der äußeren mitochondrialen Membranraum in den Intermembranraum und wird von dort durch den MPC (engl. „mitochondrial pyruvate carrier“,

Diskussion

MPC) weiter über die innere mitochondriale Membran in die Matrix transportiert (Schell und Rutter 2013). Nach der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch den PDC erfolgt schließlich der Eintritt in den Citratzyklus, dem zentralen Stoffwechselweg der Mitochondrien. Die Aktivität des PDC kontrolliert somit den Fluss von Pyruvat in die Mitochondrien und beeinflusst dadurch u. a., ob die Erzeugung von ATP im Rahmen der Verwertung von Glucose bevorzugt durch Fermentation im Cytosol oder durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien abläuft. Aufgrund dieser zentralen Rolle als metabolischer Regulator der Zelle ist die katalytische Aktivität des PDC streng kontrolliert. Für die Regulation des PDC ist hauptsächlich seine reversible Phosphorylierung durch Pyruvatdehydrogenase-Kinasen (PDKs) und -Phosphatasen (PDPs) verantwortlich (Holness und Sugden 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden alle Komponenten dieses Enzymkomplexes (PDHA1, PDHB, DLD und PHDX) als potenzielle CLPXP-Substrate identifiziert. Dies lässt vermuten, dass in *P. anserina* die Aktivität des PDC längerfristig auch durch eine proteolytische Kontrolle seiner Komponenten gesteuert werden könnte. Interessanterweise wurden in der Hefe *S. cerevisiae*, welche keine funktionelle CLPXP-Protease besitzt, mehrere Komponenten des PDC als mögliche Substrate der ebenfalls in der mitochondrialen Matrix lokalisierten LON-Protease identifiziert (Bayot et al. 2010).

Zusammenfassend sind also jeweils Schlüsselenzyme aller drei in den Citratzyklus mündenden Hauptwege des katabolen Stoffwechsels (Abbau von Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten; siehe auch Abschnitt 1.1 und Abbildung 1) als potenzielle CLPXP-Substrate bzw. CLPP-Interaktionspartner im Rahmen des mitochondrialen CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* identifiziert worden. Passend dazu wurden auch insgesamt neun Enzyme des Citratzyklus selbst gefunden:

1. Die Citratsynthase (CS) als HsCLPPS153A-L3F6H-angereichertes Protein; katalysiert Schritt 1 des Citratzyklus
2. Die Aconitase (ACO2) als HsCLPP-interagierendes Protein, katalysiert Schritt 2 des Citratzyklus
3. Zwei Komponenten des Enzymkomplexes Isocitrat-Dehydrogenase (IDH2 und IDH3A) als HsCLPP-interagierende Proteine; katalysiert Schritt 3 des Citratzyklus
4. Alle Komponenten des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OGDH, DLST und DLD) als CLPXP-Substrate; katalysiert Schritt 4 des Citratzyklus
5. Eine Untereinheit der Succinyl-CoA-Synthetase (SUCLA2) als HsCLPPS153A-L3F6H-angereichertes Protein; katalysiert Schritt 5 des Citratzyklus
6. Die Malatdehydrogenase (MDH2) als HsCLPPS153A-L3F6H-angereichertes Protein; katalysiert den 8. und letzten Schritt des Citratzyklus

Primär findet durch die Reaktionen des Citratzyklus die Oxidation zweier, durch Acetyl-CoA zur Verfügung gestellter, Kohlenstoffatome zu CO₂ statt. Entscheidend ist, dass bei diesem Vorgang energiereiche Elektronen auf NAD⁺ und FAD übertragen werden, welche dadurch zu NADH bzw. FADH₂ reduziert werden. Diese energiereichen Elektronen werden von NADH über Komplex I bzw. von FADH₂ über Komplex II (identisch mit der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus) der mitochondrialen Elektronentransportkette zugeführt, um damit die oxidative Phosphorylierung anzutreiben. Die OXPHOS ist der terminale Schritt der Energiekonversion in Mitochondrien und resultiert letztlich in der Erzeugung von ATP durch die ATP-Synthase (Komplex V) der Atmungskette. Konsequenterweise wurden in der hier durchgeführten Analyse auch insgesamt fünf Untereinheiten von Komplex I, darunter die beiden Kern-Untereinheiten NDUFS1 und NDUFV1 als potenzielle CLPXP-Substrate, sowie jeweils eine Untereinheit von Komplex III (UQCRFS1) und der ATP-Synthase (ATP5H) detektiert. Das sich somit zusammenfassend aus dem CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* ergebende und hier dargelegte Gesamtbild lässt die Formulierung folgender Arbeitsthese zu:

Die hauptsächliche molekulare Funktion der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina* ist die Degradation von Stoffwechsellzymen und ihre biologische Rolle demnach die Kontrolle und Aufrechterhaltung des mitochondrialen und zellulären Energiestoffwechsels.

Für die Verifizierung bzw. Verfeinerung dieser Arbeitsthese ist, abgesehen von der unabhängigen Validierung der Interaktionspartner und vor allem Substrate, noch ein kritischer Punkt zu klären. So lässt sich anhand der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten noch keinerlei Aussage darüber treffen, ob die vermutlichen Substrate aufgrund von Schädigungen abgebaut werden, oder weil sie einer gezielten und konzertierten proteolytischen Regulation unterliegen. Diese Unterscheidung ist zweifelsohne notwendig für ein detailliertes Verständnis der molekularen Funktion der CLPXP-Protease.

Für die letztgenannte Annahme eines gezielten Abbaus der identifizierten Substratkandidaten spricht, dass diese mehrheitlich zu ineinandergreifenden bzw. aufeinanderfolgenden Stoffwechselwegen gehören und damit offensichtlich in einer direkten funktionellen Beziehung zueinander stehen. Dieser Umstand scheint einer eher „zufälligen“ Degradation infolge stochastischer Schädigungen zu widersprechen und lässt die gemeinsame proteolytische Regulation der Proteine sinnvoll erscheinen. Darüber hinaus konnte auch keine offensichtliche Beeinträchtigung des *PaClpP*-Deletionsstammes unter Bedingungen identifiziert werden, die bekanntermaßen zu einer verstärkten Schädigung und Fehlfaltung von Proteinen führen (oxidativer Stress und Hitzestress). Diese Beobachtungen lassen sich jedoch prinzipiell auch durch sekundäre Effekte erklären (z. B. Kompensation der Abwesenheit von PaCLPP durch

Diskussion

andere Qualitätskontrollmechanismen) und sind damit noch kein Beweis dafür, dass die Hauptaufgabe der mitochondrialen CLXP-Protease tatsächlich ein gerichteter, regulierender Abbau bestimmter Proteine und nicht doch eine eher allgemeine Form der Proteinqualitätskontrolle ist.

Eine sinnvolle Möglichkeit diesen Punkt experimentell weiter zu verfolgen besteht darin, dass Substratspektrum der CLXP-Protease in *P. anserina* unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Durch eine Analyse der Veränderungen des CLXP-Substratspektrums nach Anzucht unter ausgewählten Stressbedingungen oder bei unterschiedlichem Nahrungsangebot (z. B. Mangel oder Überschuss an Glucose) sollte es möglich sein, verschiedene Klassen von Substraten (Abbau infolge von Proteinschäden oder Abbau infolge einer Anpassung des Metabolismus) zu differenzieren. Ebenso ist von Interesse, den CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit isolierten Mitochondrien aus Stämmen verschiedenen Alters durchzuführen. Dadurch könnten altersabhängige Veränderungen des Substratspektrums der mitochondrialen CLXP-Protease in *P. anserina* untersucht werden und damit Rückschlüsse auf Substrate gezogen werden, die besonders relevant für die beobachtete CLPP-abhängige Veränderung der Lebensspanne sind. Darüber hinaus sollte obige Arbeitsthese, so sie denn grundsätzlich zutreffend ist, auch ermöglichen, einen Erklärungsansatz für die beobachtete Langlebigkeit des *PaClpP*-Deletionsstammes zu formulieren.

5.7 Relevanz der Ergebnisse als Ansatz für eine mechanistische Erklärung der Langlebigkeit infolge der *PaClpP*-Deletion

Auf Grundlage der Ergebnisse des CLPP „Substrat-trapping Assay“ und der daraus gefolgerten Rolle der *P. anserina* CLXP-Protease als regulatorische Komponente des mitochondrialen Energiestoffwechsels, lässt sich mindestens ein konkreter und überprüfbarer Ansatz zur Erklärung der Langlebigkeit des *PaClpP*-Deletionsstammes entwickeln. So ist die Vermutung naheliegend, dass die Abwesenheit von PaCLPP zu Störungen bzw. einem suboptimalen Ablauf des mitochondrialen Energiestoffwechsels führt. Eine naheliegende Möglichkeit, die dadurch beeinträchtigte zelluläre Energiehomöostase wiederherzustellen, wäre die Aktivierung des Qualitätskontrollmechanismus der Autophagie. Tatsächlich gibt es durch Untersuchungen dieses Arbeitskreises erste Hinweise darauf, dass $\Delta PaClpP$ scheinbar eine gesteigerte Autophagierate aufweist und die Fähigkeit zur Durchführung von Autophagie mit der verlängernden Lebensspanne dieses Stammes in Verbindung steht (persönliche Mitteilung von L. Knuppertz, Ak Osiewacz).

Somit ist prinzipiell denkbar, dass die Abwesenheit der proteolytischen Aktivität von CLXP in *P. anserina* zu einer Aktivierung der Autophagie führt und dass dieser Vorgang bzw. die Fähigkeit Autophagie durchzuführen für die Verlängerung der Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ zumindest notwendig und möglicherweise sogar verantwortlich ist. Diese Annahme deckt sich

mit der Beobachtung, dass Autophagie in *P. anserina* zwingend notwendig für die Vermittlung eines lebensverlängernden Effekts bei Anzucht unter Stickstoff-Mangelbedingungen ist (Knuppertz et al. 2014). Auch in anderen eukaryotischen Organismen gibt es deutliche Hinweise darauf, dass Autophagie ein zentraler Regulator des Alterungsprozesses ist. So konnte etwa in *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster* und *M. musculus* gezeigt werden, dass für die Langlebigkeit infolge bestimmter Mutationen oder pharmakologischer Interventionen Autophagie notwendig ist (Madeo et al. 2010, Madeo et al. 2015).

Womöglich könnte also die verlängerte Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ auf eine Art hormetischen Effekt zurückzuführen sein. Allgemein formuliert ist denkbar, dass die Deletion von *PaClpP* zu einer Störung der zellulären Homöostase führt, welche in einer für den Gesamtorganismus letztlich positiven gesteigerten Aktivität der Autophagie-Maschinerie resultiert. Zusammen mit der auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufgestellten Arbeitsthese, dass die biologische Rolle der mitochondrialen CLXP-*Protease* in *P. anserina* die Kontrolle und Aufrechterhaltung des mitochondrialen und zellulären Energiestoffwechsels ist (siehe Abschnitt 5.6), lassen sich folgende kausale Zusammenhänge annehmen:

1. Die Deletion von *PaClpP* (und in geringerem Maße auch *PaClpX*) führt zu einer Dysregulation des mitochondrialen und zellulären Energiestoffwechsels. Dem zugrunde liegt primär ein suboptimaler Ablauf des mitochondrialen Aminosäure- und Fettsäure-Metabolismus sowie der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex. Infolge dessen kommt es zu einer Störung des, ebenfalls durch die CLXP-*Protease* regulierten, Citratzyklus und damit im Endeffekt zu einer verminderten ATP-Generierung im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung.
2. Die durch die aberrante Mitochondrienfunktion in $\Delta PaClpP$ hervorgerufene zelluläre Energiedepression (d. h. das negativ beeinflusste ATP/ADP/AMP-Verhältnis im Cytosol) stimuliert die Aktivität der konservierten AMP-aktivierten Proteinkinase, welche ein bekannter positiver Regulator der Autophagie in Eukaryoten ist (Mao und Klionsky 2011, Egan et al. 2011, Kim et al. 2011, Galluzzi et al. 2014).
3. Durch die Steigerung der Autophagie kann, zumindest unter optimalen Laborbedingungen, die zelluläre Energiehomöostase in $\Delta PaClpP$ wiederhergestellt und damit die negativen Effekte der *PaClpP*-Deletion ausgeglichen werden. Da eine Steigerung der Autophagie ein verstärktes Recycling zellulärer Komponenten und Organellen bedingt, kommt es zusätzlich zu einer Verbesserung der zellulären Qualitätskontrolle (Murrow und Debnath 2013) und damit zu einer reduzierten Anhäufung von Schäden. Dies erklärt die intuitiv nicht zu erwartende verlängerte gesunde Lebensspanne nach genetischer Inhibierung der mitochondrialen CLXP-*Protease* in *P. anserina*.

Diskussion

Das hier aufgestellte hypothetische Modell ist in der Lage, die auf Grundlage dieser Arbeit postulierte molekulare Funktion und biologische Rolle der mitochondrialen CLXP-Protease in *P. anserina* mit dem beobachtbaren Phänotyp des *PaClpP*-Deletionsstammes und darüber hinaus den in einer unabhängigen Studie erhaltenen Hinweisen bezüglich der Bedeutung von Autophagie für die Lebensverlängerung von $\Delta PaClpP$ sinnvoll zu verknüpfen. Zu seiner Validierung bietet sich eine Reihe weiterführender Untersuchungen an. So sollte etwa eine Bestimmung verschiedener metabolischer Parameter des *PaClpP*-Deletionsstammes im Vergleich zum Wildstamm aufschlussreiche Erkenntnisse liefern. Wenn die mitochondriale CLXP-Protease in *P. anserina* tatsächlich ein physiologisch relevanter Regulator des Metabolismus im dargelegten Sinne ist, dann sollten in $\Delta PaClpP$ Änderungen im zellulären ATP/ADP/AMP-Verhältnis, in der mitochondrialen Atmungsrate und im Ablauf des Citratzyklus messbar sein. Da diese Effekte der *PaClpP*-Deletion zumindest teilweise durch die gesteigerte Autophagie maskiert sein könnten, sollten zusätzlich auch ein *PaClpP*-Deletionsstamm, welcher nicht mehr in der Lage ist Autophagie zu betreiben, für entsprechende Untersuchungen verwendet werden. Falls tatsächlich ein AMPK-abhängiger Signalweg für die verstärkte Aktivierung der Autophagie in $\Delta PaClpP$ und diese wiederum für die Langlebigkeit des Stammes verantwortlich ist, sollte eine chemische oder genetische Inhibierung der AMPK die Langlebigkeit des *PaClpP*-Deletionsstammes unterbinden.

Auch wenn natürlich davon auszugehen ist, dass nicht alle Aspekte des hier formulierten Modells im Detail zutreffend sind, erscheint der Zusammenhang **Deletion von *PaClpP* → Beeinflussung des Metabolismus → Aktivierung der Autophagie → positiver Effekt auf die Lebensspanne** äußerst plausibel. Eine stetige zunehmende Anzahl an Untersuchungen und Beobachtungen lässt wenig Zweifel daran, dass eine metabolische Kontrolle der Autophagie (Galluzzi et al. 2014) und eine Autophagie-vermittelte Regulation der Lebensspanne (Madeo et al. 2010, Madeo et al. 2015) hochkonservierte Eigenschaften von Eukaryoten sind. Die hier geschlussfolgerte Funktion der mitochondrialen CLXP-Protease in *P. anserina* als metabolischer Regulator lässt sich sinnvoll mit diesem Wissen verbinden, um dadurch zu überprüfaren Hypothesen bezüglich der molekularen Vorgänge zu gelangen, welche der Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ zugrunde liegen könnten.

Da die Abwesenheit oder Mutation von CLPP in höheren Eukaryoten wie Maus oder Mensch deutliche negative Auswirkungen auf den Organismus hat (siehe Abschnitt 1.5.3), kann obiger Zusammenhang offensichtlich aber nur auf die spezifischen Gegebenheiten in *P. anserina*, diesem eher einfachen eukaryotischen Modellorganismus, zutreffend sein. Wie im nächsten Abschnitt erörtert wird, ist trotzdem wahrscheinlich, dass die hier gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Funktion der mitochondrialen CLXP-Protease prinzipiell auch relevant für andere Eukaryoten, inklusive des Menschen, sind.

5.8 Mögliche Implikationen der Ergebnisse für menschliche Krankheiten

Da von einem endosymbiotischen Ursprung der Mitochondrien (Gray 2012) und damit auch der mitochondrialen CLPXP-Proteasen auszugehen ist (Yu und Houry 2007, Voos 2013), liegt die Vermutung nahe, dass Gemeinsamkeiten bezüglich der molekularen Funktion und biologischen Rolle bakterieller und eukaryotischer CLPXP-Proteasen zu beobachten sein sollten. Tatsächlich scheint dies zutreffend, da bakterielle CLP-Proteasen zahlreiche metabolische Enzyme als Substrate haben und an einer Regulation des Stoffwechsels beteiligt sind (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006, Bhat et al. 2013, Feng et al. 2013). Dies ist offensichtlich in guter Übereinstimmung mit der hier gezogenen Schlussfolgerung, dass die primäre biologische Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina* die Kontrolle und Aufrechterhaltung des mitochondrialen und zellulären Energiestoffwechsels ist (siehe Abschnitt 5.6). In der Tat sind die bakteriellen Homologe von 15/67 der durch den CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* identifizierten Proteine bekannte Substrate bzw. Interaktionspartner von *E. coli* CLPXP (Flynn et al. 2003, Neher et al. 2006; siehe Abschnitt 4.4). Interessanterweise wurde die Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS1), die sowohl in *E. coli* als auch in *P. anserina* als CLPXP-Substrat eingeordnet wurde, zusätzlich auch durch eine mutierte Variante des menschlichen CLPX-Chaperons aus murinen mitochondrialen Proteinextrakten eingefangen (Lowth et al. 2012). Damit ist CPS1 ein naheliegender Kandidat für ein in verschiedenen bakteriellen und eukaryotischen Spezies konserviertes CLPXP-Substrat. Darüber hinaus konnten in einer kürzlich durchgeführten Studie, abgesehen vom CLPX-Chaperon, 48 potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner in einer menschlichen Zellkulturlinie bestimmt werden (Cole et al. 2015). Die angewandte Methode war für die Identifizierung von Substraten zwar ungeeignet und ist nur begrenzt in der Lage, zwischen direkten physischen Interaktionspartnern und Proteinen in räumlicher Nähe zum Zielprotein zu differenzieren (siehe Abschnitt 1.5.3), aber die Autoren der betreffenden Studie kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass HsCLPP bevorzugt mit Komponenten der Elektronentransportkette und Enzymen des mitochondrialen Metabolismus interagiert. Diese Beobachtungen legen insgesamt nahe, dass die in der vorliegenden Dissertation postulierte biologische Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease als Regulator des mitochondrialen Energiestoffwechsels in unterschiedlichen eukaryotischen Spezies, von *P. anserina* bis zum Menschen, maßgeblich evolutionär konserviert sein könnte. Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben (siehe Abschnitt 1.5.3), wird die mitochondriale CLPXP-Protease des Menschen mit verschiedenen erblichen, neurodegenerativen Erkrankungen und auch einigen Krebsarten in Verbindung gebracht. Daher wurde abschließend überprüft, inwiefern dies mit der Funktion von CLPXP als metabolischer Regulator bzw. den hier gefundenen Substraten im Zusammenhang stehen könnte.

Diskussion

Bei der Friedreich-Ataxie (FRDA) handelt es sich um eine neurodegenerativen Erkrankung, für deren Entstehung primär eine fehlerhafte Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern infolge einer Mutation des Eisen-Chaperons Frataxin verantwortlich zu sein scheint (Puccio und Koenig 2002, Martelli et al. 2012). In einem Mausmodell dieser Krankheit konnte gezeigt werden, dass die Menge von CLPP im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf zu- und gleichzeitig die Menge von Proteinen mit Fe-S-Clustern abnimmt (Guillon et al. 2009). Aufgrund dieser Korrelation vermuteten die Autoren dieser Studie, dass die mitochondriale CLPXP-Protease möglicherweise an der Degradation von fehlgefalteten Fe-S-haltigen Proteinen im Rahmen der FRDA beteiligt ist. Die hier gemachten Beobachtungen sind mit dieser Annahme gut zu vereinbaren. So enthalten mehrere der in *P. anserina* als potenzielle CLPP-Interaktionspartner oder CLPXP-Substrate identifizierten Proteine, etwa die Aconitase, die Biotin-Synthase und die Komplex I-Untereinheit NDUFS1, Fe-S-Cluster. Darüber hinaus sind drei weitere hier gefundene Proteine, die Cystein-Desulfurase NFS1, das Chaperon HSPA9 und die Oxidoreduktase GLRX5, bekanntermaßen essentiell für die Biogenese von Fe-S-Clustern in Eukaryoten (Rouault 2015). Dies spricht insgesamt dafür, dass die mitochondriale CLPXP-Protease in *P. anserina* für die Degradation bestimmter Fe-S-haltiger Proteine verantwortlich sein und außerdem auch Einfluss auf die Fe-S-Cluster Assemblierung nehmen könnte.

Während man bei der FRDA vermuten kann, dass die CLPXP-Protease den krankheitsbedingten Symptomen durch ihre proteolytische Aktivität entgegenzuwirken versucht, konnte für das Perrault-Syndrom (PS) ein deutlicher Zusammenhang zwischen erblichen *HsClpP*-Mutationen und dem Auftreten der Krankheit gefunden werden (Jenkinson et al. 2013, Ahmed et al. 2015). Gekennzeichnet ist das PS durch Gehörverlust und eine verminderte weibliche Fertilität. Zwar sind die dazu führenden molekularen Vorgänge noch unklar, aber es besteht wenig Zweifel daran, dass eine gestörte Funktion der CLPXP-Protease wichtig für die Pathogenese ist. Bezeichnenderweise weisen *ClpP*-Knockout-Mäuse einen PS-ähnlichen Phänotyp auf, sind in ihrem Wachstum stark eingeschränkt und zeigen bioenergetische und respiratorische Defizite in einigen Geweben (Gispert et al. 2013). Diese Beobachtungen sind gut mit der hier gefolgerten Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease als metabolischer Regulator vereinbar und legen nahe, dass das PS möglicherweise durch eine Störung des Energiestoffwechsels hervorgerufen wird.

Darüber hinaus wurde in verschiedenen Tumorarten eine Veränderung in der *ClpP*-Expression bzw. CLPP-Menge festgestellt (Roblick et al. 2004, Nishigaki et al. 2005, Cole et al. 2015), was eine mögliche Verbindung zwischen der CLPXP-Protease und der Entstehung von Krebs nahelegt (Goard und Schimmer 2014). Der wohl deutlichste Hinweis dafür kommt aus einer erst kürzlich erschienen Studie, die eine Überexpression von *ClpP* in 45 % der untersuchten Fälle von akuter myeloischer Leukämie (AML) nachweisen konnte (Cole et al. 2015).

Entscheidend dabei war, dass das Wachstum und Überleben von *ClpP*-überexprimierenden AML-Zelllinien durch eine Herunterregulierung von *ClpP* selektiv eingeschränkt werden konnte. In einer der untersuchten Zelllinien ging dies mit einer Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung einher. Aus diesen Beobachtungen folgerten die Autoren, dass CLPP für die Aufrechterhaltung des veränderten mitochondrialen Metabolismus von AML-Zellen verantwortlich sein könnte. Tatsächlich wird eine Reprogrammierung des mitochondrialen und zellulären Energiestoffwechsels aufgrund neuerer Untersuchungen als einer der konservierten „Meilensteine“ bei der Entstehung von Krebs angenommen (Hanahan und Weinberg 2011). Folglich ist eine gezielte Beeinflussung des mitochondrialen Metabolismus seit einigen Jahren verstärkt im Fokus bei der Entwicklung neuartiger Therapieansätze für Krebs (Goard und Schimmer 2014, Gaude und Frezza 2014, Bhat et al. 2015, Weinberg und Chandel 2015). Die Resultate der vorliegenden Arbeit sind weitestgehend im Einklang mit der neu aufkommenden Sichtweise, dass die mitochondriale CLPXP-Protease an der tumorfördernden metabolischen Reprogrammierung zumindest einiger Krebsarten beteiligt und demnach sinnvolles Ziel für zukünftige Therapien sein könnte.

Insgesamt ist die auf Grundlage der Ergebnisse CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina* anzunehmende Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease als regulatorische Komponente des mitochondrialen Energiestoffwechsels erstaunlich gut mit Beobachtungen in anderen eukaryotischen Organismen, auch bezüglich der Relevanz von CLPXP für diverse Krankheiten, zu vereinbaren. Somit erscheint es überaus sinnvoll und vielversprechend, dass in dieser Doktorarbeit erstellte und bisher beispiellose Kompendium potenzieller *in vivo* CLPP-Interaktionspartner und CLPXP-Substrate als Referenz für zukünftige Untersuchungen auch außerhalb von *P. anserina* anzuwenden.

6 AUSBLICK

In dieser Doktorarbeit konnte die mitochondriale CLPXP-Protease des eukaryotischen Modellorganismus *Podospora anserina*, durch Identifizierung einer Reihe ihrer potenziellen Interaktionspartner und Substrate, als mögliche regulierende Komponente des Energiestoffwechsels in Mitochondrien aufgedeckt werden. Auch wenn das, sich aus den erhaltenen Ergebnissen des in *P. anserina* durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ ergebende, Gesamtbild sehr eindeutig zu dieser Schlussfolgerung zu führen scheint, sollten ausgewählte individuelle Kandidaten der identifizierten potenziellen Interaktionspartner und Substrate in zukünftigen Untersuchungen unabhängig überprüft werden. Als gängige Herangehensweise zur Validierung von Protein-Protein-Interaktionen würde sich die Aufreinigung potenzieller CLPP-Interaktionspartner aus mitochondrialen Lysaten, etwa durch eine Immunpräzipitation, anbieten. Sofern es sich tatsächlich um Interaktionspartner von CLPP handelt, sollte es grundsätzlich möglich sein CLPP dadurch ko-aufzureinigen. Zur definitiven Bestätigung, dass die als CLPXP-Substrate klassifizierten Proteine tatsächlich von dieser Protease abgebaut werden, sollte z. B. ein *in vivo* Degradationsassay durchgeführt werden. So konnten auf diese Weise mehrere Substratkandidaten der *E. coli* CLPXP-Protease zweifelsfrei bestätigt werden (Flynn et al. 2003).

Ungeachtet dieser noch ausstehenden verifizierenden Experimente ergeben sich auf Grundlage der vorliegenden Arbeit bereits viele interessante Ansatzpunkte und Perspektiven für weiterführende Untersuchungen in *P. anserina*. So besteht durch die erhaltenen Ergebnisse grundsätzlich wenig Zweifel daran, dass der CLPP „Substrat-trapping Assay“ in diesem Organismus ein praktikables Verfahren zur Identifizierung potenzieller Substrate und Interaktionspartner der mitochondrialen CLPXP-Protease ist. Da der gesamte Arbeitsablauf nun durch die vorliegende Arbeit gut etabliert ist, kann diese Methode direkt zur möglichen Beantwortung konkreter Fragestellungen angewandt werden. So wäre etwa interessant zu untersuchen, ob und wie sich das CLPXP-Substratspektrum in *P. anserina* CLPXP-bei Anzucht des Pilzes unter Stressbedingungen oder im Verlaufe seines Alterns ändert. Dadurch sollte es möglich sein zu identifizieren, welches die physiologisch hauptsächlich relevanten Substrate dieser Protease sind.

Darüber hinaus gibt es erste Hinweise, dass die Abwesenheit von PaCLPP zu einer gesteigerten Autophagierate im *PaClpP*-Deletionsstamm führt, was möglicherweise ursächlich für seine verlängerte gesunde Lebensspanne ist. Sofern die auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit postulierte biologische Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease als metabolischer Regulator zutrifft, sollte dadurch auch eine Erklärung dieser vermuteten Zusammenhänge möglich sein. Ein durch entsprechende Untersuchungen zu überprüfendes Modell ist, dass die Abwesenheit von PaCLPP zunächst in einer Dysregulation des

Ausblick

mitochondrialen und zellulären Energiestoffwechsels resultiert. Dies wiederum könnte zu einer erhöhten Aktivität der AMP-aktivierten Proteinkinase führen, einem hochkonservierten zellulären Energiesensor, der ein bekannter positiver Regulator der Autophagie in Eukaryoten ist (Mao und Klionsky 2011, Egan et al. 2011, Kim et al. 2011, Galluzzi et al. 2014). Alternativ wäre zu überprüfen, ob CLPXP in *P. anserina* möglicherweise direkt in einen Autophagie-Signalweg, etwa durch die Regulation einer hypothetischen mitochondrialen Signalkomponente, involviert sein könnte. Dafür würde es sich, ähnlich wie im vorigen Absatz bereits angeführt, anbieten zu untersuchen, wie sich das Substratspektrum der Protease unter Autophagie-induzierenden Bedingungen verändert.

Ferner gibt es gute Gründe zur Annahme, dass auch die CLPXP-Proteasen anderer Eukaryoten in die Regulation des mitochondrialen Energiestoffwechsels eingebunden sein könnten. Tatsächlich lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit etwa erstaunlich gut mit Beobachtungen bezüglich einer Rolle von CLPXP in verschiedenen menschlichen Krankheiten, z. B. dem Perrault-Syndrom oder bestimmten Krebsarten, vereinbaren. Daher erscheint es naheliegend, dass die hier gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der molekularen Funktion und biologischen Rolle der *P. anserina* CLPXP-Protease, insbesondere ihre identifizierten potenziellen Substrate und Interaktionspartner, auch für zukünftige Untersuchungen in anderen eukaryotischen Organismen, inklusive des Menschen, von großer Bedeutung sein könnten.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war, auf der vorangegangenen Diplomarbeit (Fischer 2011) aufbauend, eine genauere Untersuchung der molekularen Funktion und biologischen Rolle der mitochondrialen CLXP-*Protease* in dem filamentösen Ascomyceten *Podospora anserina* durchzuführen. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

1. In Einklang mit den Beobachtungen der Diplomarbeit konnte kein auffallend negativer Effekt infolge der *PaClpP*-Deletion festgestellt werden. Erstaunlicherweise scheint der *PaClpP*-Deletionsstamm weder anfälliger für Hitzestress noch für verschiedene oxidative Stressoren. Dies spricht dafür, dass die Hauptfunktion der mitochondrialen CLXP-*Protease* in *P. anserina* nicht eine Adaptation an Stressbedingungen bzw. eine „klassische“ Qualitätskontrolle geschädigter Proteine ist.
2. Durch die Herstellung und phänotypische Charakterisierung eines *PaClpX*- sowie eines *PaClpP/PaClpX*-Deletionsstammes konnte gezeigt werden, dass das mitochondriale CLPX-Chaperon in *P. anserina* höchstwahrscheinlich, ähnlich wie auch in anderen eukaryotischen Organismen beobachtet, teilweise von CLPP-unabhängige Aufgaben übernimmt. Gleichzeitig kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die verlängerte gesunde Lebensspanne des *PaClpP*-Deletionsstammes durch autonome Funktionen von PaCLPX vermittelt wird.
3. Der in Bakterien entwickelte CLPP „Substrat-trapping Assay“ wurde erfolgreich in *P. anserina* implementiert. Dies gelang durch Verwendung der menschlichen CLPP, welche bekanntermaßen funktionell homolog mit PaCLPP ist (Fischer 2011, Fischer et al. 2013), als Komponente einer chimären HsCLPP/PaCLPX-*Protease*. Die notwendigen technischen Voraussetzungen für den Assay, d. h. primär die effiziente und saubere Aufreinigung eines Proteins aus isolierten Mitochondrien, konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmalig für *P. anserina* etabliert werden. Dadurch steht nun auch für Untersuchungen anderer Proteine in diesem Organismus das entsprechende molekularbiologische Handwerkszeug zur Verfügung. Konkret konnten insbesondere der Twin-Strep-tag® und ein 3xFLAG-6xHis-Marker als grundsätzlich geeignet für eine Affinitätsaufreinigung von mitochondrialen Proteinen aus *P. anserina* bestätigt werden.
4. Im Rahmen des in *P. anserina* durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ wurden insgesamt 67 Proteine gefunden, die spezifisch mit der aktiven und/oder inaktiven Variante von HsCLPP ko-aufgereinigt wurden. Insgesamt ca. 20 dieser Proteine konnten dabei als potenzielle CLXP-Substrate und die verbleibenden 47 als potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner identifiziert werden.

Zusammenfassung

5. Die Klassifizierung der identifizierten potenziellen Interaktionspartner und Substrate der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina* zeigte, dass es sich bei diesen hauptsächlich um Enzyme und Komponenten verschiedener Stoffwechselwege handelt – vor allem um solche, die eine zentrale Rolle im mitochondrialen Energiestoffwechsel spielen, z. B. Komponenten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, Enzyme des Citratzyklus und essentielle Untereinheiten von Komplexen der Atmungskette.

Zusammenfassend wird auf Grundlage der Ergebnisse dieser Doktorarbeit folgende Arbeitsthese als Schlussfazit und gleichzeitig Ausgangspunkt für zukünftige Untersuchungen formuliert:

Die hauptsächlich molekulare Funktion der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina* ist die Degradation von Stoffwechsellzymen und ihre biologische Rolle demnach die Kontrolle und Aufrechterhaltung des mitochondrialen und zellulären Energiestoffwechsels.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adam C, Picard M, Dequard-Chablat M, Sellem CH, Hermann-Le-Denmat S, Contamine V (2012) Biological roles of the *Podospira anserina* mitochondrial Lon protease and the importance of its N-domain. PLoS One 7:e38138. doi:10.1371/journal.pone.0038138
- Ahlawat S, Morrison DA (2009) ClpXP degrades SsrA-tagged proteins in *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 191:2894-2898
- Ahmed S, Jelani M, Alrayes N, Mohamoud HS, Almramhi MM, Anshasi W, Ahmed NA, Wang J, Nasir J, Al-Aama JY (2015) Exome analysis identified a novel missense mutation in the CLPP gene in a consanguineous Saudi family expanding the clinical spectrum of Perrault Syndrome type-3. J Neurol Sci 353:149-154
- Al-Furoukh N, Ianni A, Nolte H, Holper S, Kruger M, Wanrooij S, Braun T (2015) ClpX stimulates the mitochondrial unfolded protein response (UPR) in mammalian cells. Biochim Biophys Acta 1853:2580-2591
- Al-Furoukh N, Kardon JR, Kruger M, Szibor M, Baker TA, Braun T (2014) NOA1, a novel ClpXP substrate, takes an unexpected nuclear detour prior to mitochondrial import. PLoS One 9:e103141. doi:10.1371/journal.pone.0103141
- Albert B, Sellem CH (2002) Dynamics of the mitochondrial genome during *Podospira anserina* aging. Curr Genet 40:365-373
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group
- Andresen BS, Corydon TJ, Wilsbech M, Bross P, Schroeder LD, Hindkjaer TF, Bolund L, Gregersen N (2000) Characterization of mouse Clpp protease cDNA, gene, and protein. Mamm Genome 11:275-280
- Andreux PA, Houtkooper RH, Auwerx J (2013) Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. Nat Rev Drug Discov 12:465-483
- Arlt H, Steglich G, Perryman R, Guiard B, Neupert W, Langer T (1998) The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. EMBO J 17:4837-4847
- Artal-Sanz M, Tavernarakis N (2009) Prohibitin and mitochondrial biology. Trends Endocrinol Metab 20:394-401
- Atorino L, Silvestri L, Koppen M, Cassina L, Ballabio A, Marconi R, Langer T, Casari G (2003) Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. J Cell Biol 163:777-787
- Aubin-Tam ME, Olivares AO, Sauer RT, Baker TA, Lang MJ (2011) Single-molecule protein unfolding and translocation by an ATP-fueled proteolytic machine. Cell 145:257-267
- Baker BM, Haynes CM (2011) Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging. Trends Biochem Sci 36:254-261
- Baker MJ, Tatsuta T, Langer T (2011) Quality control of mitochondrial proteostasis. Cold Spring Harb Perspect Biol 3:a007559. doi:10.1101/cshperspect.a007559
- Baker TA, Sauer RT (2012) ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. Biochim Biophys Acta 1823:15-28
- Bayot A, Gareil M, Rogowska-Wrzęsinska A, Roepstorff P, Friguet B, Bulteau AL (2010) Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1. J Biol Chem 285:11445-11457

Literaturverzeichnis

- Bender T, Leidhold C, Ruppert T, Franken S, Voos W (2010) The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics* 10:1426-1443
- Bernstein SH, Venkatesh S, Li M, Lee J, Lu B, Hilchey SP, Morse KM, Metcalfe HM, Skalska J, Andreeff M, Brookes PS, Suzuki CK (2012) The mitochondrial ATP-dependent Lon protease: a novel target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives. *Blood* 119:3321-3329
- Bezawork-Geleta A, Saiyed T, Dougan DA, Truscott KN (2014) Mitochondrial matrix proteostasis is linked to hereditary paraganglioma: LON-mediated turnover of the human flavinylation factor SDH5 is regulated by its interaction with SDHA. *FASEB J* 28:1794-1804
- Bhat NH, Vass RH, Stoddard PR, Shin DK, Chien P (2013) Identification of ClpP substrates in *Caulobacter crescentus* reveals a role for regulated proteolysis in bacterial development. *Mol Microbiol* 88:1083-1092
- Bhat TA, Kumar S, Chaudhary AK, Yadav N, Chandra D (2015) Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discov Today* 20:635-643
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99
- Borghouts C, Kimpel E, Osiewacz HD (1997) Mitochondrial DNA rearrangements of *Podospora anserina* are under the control of the nuclear gene *grisea*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10768-10773
- Bota DA, Davies KJ (2002) Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol* 4:674-680
- Boyer PD (1997) The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66:717-749
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37:755-767
- Brotz-Oesterhelt H, Sass P (2014) Bacterial caseinolytic proteases as novel targets for antibacterial treatment. *Int J Med Microbiol* 304:23-30
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11:85-95
- Calloni G, Chen T, Schermann SM, Chang HC, Genevoux P, Agostini F, Tartaglia GG, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2012) DnaK functions as a central hub in the *E. coli* chaperone network. *Cell Rep* 1:251-264
- Calvo SE, Mootha VK (2010) The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:25-44
- Camberg JL, Hoskins JR, Wickner S (2009) ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10614-10619
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Canizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De MG, Filla A, De FR, Palau F, Patel PI, Di DS, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271:1423-1427
- Chandel NS (2014) Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol* 12:34. doi:10.1186/1741-7007-12-34
- Chaverocche MK, Ghigo JM, d'Enfert C (2000) A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28:E97. doi:10.1093/nar/28.22.e97

- Chen YC, Umanah GK, Dephoure N, Andrabi SA, Gygi SP, Dawson TM, Dawson VL, Rutter J (2014) Msp1/ATAD1 maintains mitochondrial function by facilitating the degradation of mislocalized tail-anchored proteins. *EMBO J* 33:1548-1564
- Chen Z, Kastaniotis AJ, Miinalainen IJ, Rajaram V, Wierenga RK, Hiltunen JK (2009) 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 8 and carbonyl reductase type 4 assemble as a ketoacyl reductase of human mitochondrial FAS. *FASEB J* 23:3682-3691
- Cheng CW, Kuo CY, Fan CC, Fang WC, Jiang SS, Lo YK, Wang TY, Kao MC, Lee AY (2013) Overexpression of Lon contributes to survival and aggressive phenotype of cancer cells through mitochondrial complex I-mediated generation of reactive oxygen species. *Cell Death Dis* 4:e681. doi:10.1038/cddis.2013.204
- Choi KH, Licht S (2005) Control of peptide product sizes by the energy-dependent protease ClpAP. *Biochemistry* 44:13921-13931
- Choi-Rhee E, Schulman H, Cronan JE (2004) Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Sci* 13:3043-3050
- Clarke AK, Schelin J, Porankiewicz J (1998) Inactivation of the clpP1 gene for the proteolytic subunit of the ATP-dependent Clp protease in the cyanobacterium *Synechococcus* limits growth and light acclimation. *Plant Mol Biol* 37:791-801
- Cohn MT, Ingmer H, Mulholland F, Jorgensen K, Wells JM, Brondsted L (2007) Contribution of conserved ATP-dependent proteases of *Campylobacter jejuni* to stress tolerance and virulence. *Appl Environ Microbiol* 73:7803-7813
- Cole A, Wang Z, Coyaud E, Voisin V, Gronda M, Jitkova Y, Mattson R, Hurren R, Babovic S, Maclean N, Restall I, Wang X, Jeyaraju DV, Sukhai MA, Prabha S, Bashir S, Ramakrishnan A, Leung E, Qia YH, Zhang N, Combes KR, Ketela T, Lin F, Houry WA, Aman A, Al-Awar R, Zheng W, Wienholds E, Xu CJ, Dick J, Wang JC, Moffat J, Minden MD, Eaves CJ, Bader GD, Hao Z, Kornblau SM, Raught B, Schimmer AD (2015) Inhibition of the Mitochondrial Protease ClpP as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 27:864-876
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325:201-204
- Colman RJ, Beasley TM, Kemnitz JW, Johnson SC, Weindruch R, Anderson RM (2014) Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun* 5:3557. doi:10.1038/ncomms4557
- Compton CL, Schmitz KR, Sauer RT, Sello JK (2013) Antibacterial activity of and resistance to small molecule inhibitors of the ClpP peptidase. *ACS Chem Biol* 8:2669-2677
- Cordova JC, Olivares AO, Shin Y, Stinson BM, Calmat S, Schmitz KR, Aubin-Tam ME, Baker TA, Lang MJ, Sauer RT (2014) Stochastic but highly coordinated protein unfolding and translocation by the ClpXP proteolytic machine. *Cell* 158:647-658
- Cornelissen T, Haddad D, Wauters F, Van Humbeek C, Mandemakers W, Koentjoro B, Sue C, Gevaert K, De SB, Verstreken P, Vandenberghe W (2014) The deubiquitinase USP15 antagonizes Parkin-mediated mitochondrial ubiquitination and mitophagy. *Hum Mol Genet* 23:5227-5242
- Corydon TJ, Bross P, Holst HU, Neve S, Kristiansen K, Gregersen N, Bolund L (1998) A human homologue of *Escherichia coli* ClpP caseinolytic protease: recombinant expression, intracellular processing and subcellular localization. *Biochem J* 331 (Pt 1):309-316
- Corydon TJ, Wilsbech M, Jespersgaard C, Andresen BS, Borglum AD, Pedersen S, Bolund L, Gregersen N, Bross P (2000) Human and mouse mitochondrial orthologs of bacterial ClpX. *Mamm Genome* 11:899-905

Literaturverzeichnis

- Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB (2010) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J* 425:313-325
- D'Autréaux B, Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:813-824
- de Sagarra MR, Mayo I, Marco S, Rodriguez-Vilarino S, Oliva J, Carrascosa JL, Casta n JG (1999) Mitochondrial localization and oligomeric structure of HClpP, the human homologue of *E. coli* ClpP. *J Mol Biol* 292:819-825
- Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R (2006) On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones* 11:116-128
- Derrien B, Majeran W, Effantin G, Ebenezer J, Friso G, van Wijk KJ, Steven AC, Maurizi MR, Vallon O (2012) The purification of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ClpP complex: additional subunits and structural features. *Plant Mol Biol* 80:189-202
- DiMauro S (2011) A history of mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis* 34:261-276
- DiMauro S, Schon EA (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348:2656-2668
- Duchen MR (2000) Mitochondria and Ca²⁺ in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* 28:339-348
- Dufour E, Boulay J, Rincheval V, Sainsard-Chanet A (2000) A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4138-4143
- Durcan TM, Tang MY, Perusse JR, Dashti EA, Aguilera MA, McLelland GL, Gros P, Shaler TA, Faubert D, Coulombe B, Fon EA (2014) USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *EMBO J* 33:2473-2491
- Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M (1996) Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* 320:345-357
- Edgar D, Shabalina I, Camara Y, Wredenberg A, Calvaruso MA, Nijtmans L, Nedergaard J, Cannon B, Larsson NG, Trifunovic A (2009) Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metab* 10:131-138
- Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan KL (2011) The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* 7:643-644
- El Bakkouri M, Pow A, Mulichak A, Cheung KL, Artz JD, Amani M, Fell S, de Koning-Ward TF, Goodman CD, McFadden GI, Ortega J, Hui R, Houry WA (2010) The Clp chaperones and proteases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 404:456-477
- Erecinska M, Wilson DF (1982) Regulation of cellular energy metabolism. *J Membr Biol* 70:1-14
- Ernster L, Ikkos D, Luft R (1959) Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature* 184:1851-1854
- Ernster L, Schatz G (1981) Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 91:227-255
- Espagne E, Lespinet O, Malagnac F, Da Silva C, Jaillon O, Porcel BM, Couloux A, Aury JM, Segurens B, Poulain J, Anthouard V, Grossetete S, Khalili H, Coppin E, Dequard-Chablat M, Picard M, Contamine V, Arnais S, Bourdais A, Berteaux-Lecellier V, Gautheret D, de Vries RP, Battaglia E, Coutinho PM, Danchin EG, Henrissat B, Khoury RE, Sainsard-Chanet A, Boivin A, Pinan-Lucarre B, Sellem CH, Debuchy R, Wincker P, Weissenbach J, Silar P (2008) The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol* 9:233. doi:10.1186/gb-2008-9-5-r77
- Esser K (1974). *Podospora anserina*. In: King RC (ed) Handbook of Genetics, Vol 1. Plenum Press, New York, p 531-551

- Esser K, Tudznyski P (1980). Senescence in fungi. In: Thimann KV (ed) Senescence in plants. CRC Press, Boca Raton, p 67-83
- Fedhila S, Msadek T, Nel P, Lereclus D (2002) Distinct clpP genes control specific adaptive responses in *Bacillus thuringiensis*. J Bacteriol 184:5554-5562
- Feng J, Michalik S, Varming AN, Andersen JH, Albrecht D, Jelsbak L, Krieger S, Ohlsen K, Hecker M, Gerth U, Ingmer H, Frees D (2013) Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in *Staphylococcus aureus*. J Proteome Res 12:547-558
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. Curr Opin Plant Biol 7:254-261
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408:239-247
- Finkel T, Serrano M, Blasco MA (2007) The common biology of cancer and ageing. Nature 448:767-774
- Fischer F (2011). Untersuchungen zur Rolle der CLP-Proteasen bei Alterungsprozessen des Ascomyceten *Podospora anserina*. Diplomarbeit, Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Fischer F, Hamann A, Osiewacz HD (2012) Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. Trends Biochem Sci 37:284-292
- Fischer F, Weil A, Hamann A, Osiewacz HD (2013) Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal ClpP deletion strain. Nat Commun 4:1397. doi:10.1038/ncomms2397
- Flynn JM, Levchenko I, Sauer RT, Baker TA (2004) Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. Genes Dev 18:2292-2301
- Flynn JM, Levchenko I, Seidel M, Wickner SH, Sauer RT, Baker TA (2001) Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. Proc Natl Acad Sci U S A 98:10584-10589
- Flynn JM, Neher SB, Kim YI, Sauer RT, Baker TA (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. Mol Cell 11:671-683
- Fosslien E (2001) Mitochondrial medicine - molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. Ann Clin Lab Sci 31:25-67
- Fredriksson A, Ballesteros M, Dukan S, Nystrom T (2005) Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon. J Bacteriol 187:4207-4213
- Frees D, Andersen JH, Hemmingsen L, Koskenniemi K, Baek KT, Muhammed MK, Gudeta DD, Nyman TA, Sukura A, Varmanen P, Savijoki K (2012) New insights into *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence regulation from an analysis of the role of the ClpP protease in the strains Newman, COL, and SA564. J Proteome Res 11:95-108
- Frees D, Savijoki K, Varmanen P, Ingmer H (2007) Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. Mol Microbiol 63:1285-1295
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem 64:97-112
- Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA (2004) Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 70:243-251
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. Cell 129:111-122
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. Biochim Biophys Acta 1592:63-77
- Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G (2014) Metabolic control of autophagy. Cell 159:1263-1276

Literaturverzeichnis

- Gaude E, Frezza C (2014) Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab* 2:10
- Geiger SR, Bottcher T, Sieber SA, Cramer P (2011) A conformational switch underlies ClpP protease function. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:5749-5752
- Gerth U, Kock H, Kusters I, Michalik S, Switzer RL, Hecker M (2008) Clp-dependent proteolysis down-regulates central metabolic pathways in glucose-starved *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 190:321-331
- Giorgi C, Romagnoli A, Pinton P, Rizzuto R (2008) Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med* 8:119-130
- Gispert S, Parganlija D, Klinkenberg M, Droese S, Wittig I, Mittelbronn M, Grzmil P, Koob S, Hamann A, Walter M, Buchel F, Adler T, Hrabe de AM, Busch DH, Zell A, Reichert AS, Brandt U, Osiewacz HD, Jendrach M, Auburger G (2013) Loss of mitochondrial peptidase Clpp leads to infertility, hearing loss plus growth retardation via accumulation of CLPX, mtDNA and inflammatory factors. *Hum Mol Genet* 22:4871-4887
- Glynn SE, Martin A, Nager AR, Baker TA, Sauer RT (2009) Structures of asymmetric ClpX hexamers reveal nucleotide-dependent motions in a AAA+ protein-unfolding machine. *Cell* 139:744-756
- Goard CA, Schimmer AD (2014) Mitochondrial matrix proteases as novel therapeutic targets in malignancy. *Oncogene* 33:2690-2699
- Gómez-Baena G, Rangel OA, Lopez-Lozano A, Garcia-Fernandez JM, Diez J (2009) Stress responses in *Prochlorococcus* MIT9313 vs. SS120 involve differential expression of genes encoding proteases ClpP, FtsH and Lon. *Res Microbiol* 160:567-575
- Gottesman S (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:565-587
- Gottesman S, Maurizi MR, Wickner S (1997) Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell* 91:435-438
- Gottesman S, Roche E, Zhou Y, Sauer RT (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* 12:1338-1347
- Gray MW (2012) Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a011403. doi:10.1101/cshperspect.a011403
- Gray MW (2015) Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:10133-10138
- Gray MW, Doolittle WF (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev* 46:1-42
- Gribun A, Kimber MS, Ching R, Sprangers R, Fiebig KM, Houry WA (2005) The ClpP double ring tetradecameric protease exhibits plastic ring-ring interactions, and the N termini of its subunits form flexible loops that are essential for ClpXP and ClpAP complex formation. *J Biol Chem* 280:16185-16196
- Grief (2007) Untersuchungen zur molekularen Kontrolle der Kupferhomöostase in dem Ascomyceten *Podospora anserina*. Dissertation, Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Grimaud R, Kessel M, Beuron F, Steven AC, Maurizi MR (1998) Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J Biol Chem* 273:12476-12481
- Guillon B, Bulteau AL, Wattenhofer-Donze M, Schmucker S, Friguet B, Puccio H, Drapier JC, Bouton C (2009) Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins. *FEBS J* 276:1036-1047
- Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685-716
- Hamann A, Krause K, Werner A, Osiewacz HD (2005) A two-step protocol for efficient deletion of genes in the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. *Curr Genet* 48:270-275

- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674
- Hansen J, Corydon TJ, Palmfeldt J, Durr A, Fontaine B, Nielsen MN, Christensen JH, Gregersen N, Bross P (2008) Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13). *Neuroscience* 153:474-482
- Hansen JJ, Durr A, Cournu-Rebeix I, Georgopoulos C, Ang D, Nielsen MN, Davoine CS, Brice A, Fontaine B, Gregersen N, Bross P (2002) Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet* 70:1328-1332
- Hanson PI, Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:519-529
- Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20:145-147
- Hatefi Y (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54:1015-1069
- Hayflick L (2007) Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 1100:1-13
- Haynes CM, Petrova K, Benedetti C, Yang Y, Ron D (2007) ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell* 13:467-480
- Haynes CM, Yang Y, Blais SP, Neubert TA, Ron D (2010) The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol Cell* 37:529-540
- Hiltunen JK, Schonauer MS, Autio KJ, Mittelmeier TM, Kastaniotis AJ, Dieckmann CL (2009) Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids. *J Biol Chem* 284:9011-9015
- Holley AK, Bakthavatchalu V, Velez-Roman JM, St Clair DK (2011) Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *Int J Mol Sci* 12:7114-7162
- Holliday R (2006) Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Ann N Y Acad Sci* 1067:1-9
- Holness MJ, Sugden MC (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 31:1143-1151
- Houten SM, Wanders RJ (2010) A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inher Metab Dis* 33:469-477
- Hughes AL, Gottschling DE (2012) An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature* 492:261-265
- Ingvarsson H, Mate MJ, Hogbom M, Portnoi D, Benaroudj N, Alzari PM, Ortiz-Lombardia M, Unge T (2007) Insights into the inter-ring plasticity of caseinolytic proteases from the X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63:249-259
- Iosefson O, Nager AR, Baker TA, Sauer RT (2015) Coordinated gripping of substrate by subunits of a AAA+ proteolytic machine. *Nat Chem Biol* 11:201-206
- Jenal U, Hengge-Aronis R (2003) Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr Opin Microbiol* 6:163-172
- Jenkinson EM, Rehman AU, Walsh T, Clayton-Smith J, Lee K, Morell RJ, Drummond MC, Khan SN, Naeem MA, Rauf B, Billington N, Schultz JM, Urquhart JE, Lee MK, Berry A, Hanley NA, Mehta S, Cilliers D, Clayton PE, Kingston H, Smith MJ, Warner TT, Black GC, Trump D, Davis JR, Ahmad W, Leal SM, Riazuddin S, King MC, Friedman TB, Newman WG (2013) Perrault syndrome is caused by recessive mutations in CLPP, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease. *Am J Hum Genet* 92:605-613
- Joshi SA, Hersch GL, Baker TA, Sauer RT (2004) Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nat Struct Mol Biol* 11:404-411

Literaturverzeichnis

- Jovaisaite V, Auwerx J (2015) The mitochondrial unfolded protein response-synchronizing genomes. *Curr Opin Cell Biol* 33:74-81
- Kang SG, Dimitrova MN, Ortega J, Ginsburg A, Maurizi MR (2005) Human mitochondrial ClpP is a stable heptamer that assembles into a tetradecamer in the presence of ClpX. *J Biol Chem* 280:35424-35432
- Kang SG, Maurizi MR, Thompson M, Mueser T, Ahvazi B (2004) Crystallography and mutagenesis point to an essential role for the N-terminus of human mitochondrial ClpP. *J Struct Biol* 148:338-352
- Kang SG, Ortega J, Singh SK, Wang N, Huang NN, Steven AC, Maurizi MR (2002) Functional proteolytic complexes of the human mitochondrial ATP-dependent protease, hClpXP. *J Biol Chem* 277:21095-21102
- Karbowski M, Youle RJ (2011) Regulating mitochondrial outer membrane proteins by ubiquitination and proteasomal degradation. *Curr Opin Cell Biol* 23:476-482
- Kardon JR, Yien YY, Huston NC, Branco DS, Hildick-Smith GJ, Rhee KY, Paw BH, Baker TA (2015) Mitochondrial ClpX Activates a Key Enzyme for Heme Biosynthesis and Erythropoiesis. *Cell* 161:858-867
- Kasashima K, Sumitani M, Endo H (2012) Maintenance of mitochondrial genome distribution by mitochondrial AAA+ protein ClpX. *Exp Cell Res* 318:2335-2343
- Kazak L, Reyes A, Holt IJ (2012) Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:659-671
- Keiler KC (2008) Biology of trans-translation. *Annu Rev Microbiol* 62:133-151
- Kenniston JA, Baker TA, Sauer RT (2005) Partitioning between unfolding and release of native domains during ClpXP degradation determines substrate selectivity and partial processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1390-1395
- Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K (2008) Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84:246-263
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13:132-141
- Kim J, Olinares PD, Oh SH, Ghisaura S, Poliakov A, Ponnala L, van Wijk KJ (2013) Modified Clp protease complex in the ClpP3 null mutant and consequences for chloroplast development and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162:157-179
- Kim J, Rudella A, Ramirez Rodriguez V, Zybailov B, Olinares PD, van Wijk KJ (2009) Subunits of the plastid ClpPR protease complex have differential contributions to embryogenesis, plastid biogenesis, and plant development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:1669-1692
- Kim YI, Burton RE, Burton BM, Sauer RT, Baker TA (2000) Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol Cell* 5:639-648
- Kim YI, Levchenko I, Fraczkowska K, Woodruff RV, Sauer RT, Baker TA (2001) Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* 8:230-233
- Kimber MS, Yu AY, Borg M, Leung E, Chan HS, Houry WA (2010) Structural and theoretical studies indicate that the cylindrical protease ClpP samples extended and compact conformations. *Structure* 18:798-808
- Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, Ketteridge D, Turnbull DM, Thorburn DR, Taylor RW (2004) Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J Med Genet* 41:784-789
- Kirkwood TB (2011) Systems biology of ageing and longevity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366:64-70
- Kirkwood TB, Austad SN (2000) Why do we age? *Nature* 408:233-238

- Knoops B, Goemaere J, Van der Eecken V, Declercq JP (2011) Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin. *Antioxid Redox Signal* 15:817-829
- Knudsen GM, Olsen JE, Aabo S, Barrow P, Rychlik I, Thomsen LE (2013) ClpP deletion causes attenuation of *Salmonella Typhimurium* virulence through mis-regulation of RpoS and indirect control of CsrA and the SPI genes. *Microbiology* 159:1497-1509
- Knuppertz L, Hamann A, Pampaloni F, Stelzer E, Osiewacz HD (2014) Identification of autophagy as a longevity-assurance mechanism in the aging model *Podospora anserina*. *Autophagy* 10:822-834
- Kock H, Gerth U, Hecker M (2004) The ClpP peptidase is the major determinant of bulk protein turnover in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186:5856-5864
- Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, Herder C, Carstensen M, Krausch M, Knoefel WT, Schlensak M, Roden M (2015) Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab* 21:739-746
- Koppen M, Langer T (2007) Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42:221-242
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV (2011) Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11:325-337
- Krebs HA (1970) Rate control of the tricarboxylic acid cycle. *Adv Enzyme Regul* 8:335-353
- Kress W, Maglica Z, Weber-Ban E (2009) Clp chaperone-proteases: structure and function. *Res Microbiol* 160:618-628
- Kück U, Osiewacz HD, Schmidt U, Kappelhoff B, Schulte E, Stahl U, Esser K (1985) The onset of senescence is affected by DNA rearrangements of a discontinuous mitochondrial gene in *Podospora anserina*. *Curr Genet* 9:373-382
- Kunstmann B, Osiewacz HD (2009) Assessing organismal aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Methods Mol Biol* 965:439-462
- Kuroda H, Maliga P (2003) The plastid clpP1 protease gene is essential for plant development. *Nature* 425:86-89
- Kutschera U, Niklas KJ (2005) Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci* 124:1-24
- Laffel L (1999) Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15:412-426
- Lane N, Martin W (2010) The energetics of genome complexity. *Nature* 467:929-934
- Lapointe J, Hekimi S (2010) When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67:1-8
- Lecellier G, Silar P (1994) Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr Genet* 25:122-123
- Lee BG, Kim MK, Song HK (2011) Structural insights into the conformational diversity of ClpP from *Bacillus subtilis*. *Mol Cells* 32:589-595
- Lee BG, Park EY, Lee KE, Jeon H, Sung KH, Paulsen H, Rubsamen-Schaeff H, Brotz-Oesterhelt H, Song HK (2010a) Structures of ClpP in complex with acyldepsipeptide antibiotics reveal its activation mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 17:471-478
- Lee SJ, Hwang AB, Kenyon C (2010b) Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr Biol* 20:2131-2136
- Lenaz G (2001) The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 52:159-164

Literaturverzeichnis

- Leonhard K, Herrmann JM, Stuart RA, Mannhaupt G, Neupert W, 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
- Levchenko I, Seidel M, Sauer RT, Baker TA (2000) A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine. *Science* 289:2354-2356
- Li Y (2010) Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnol Appl Biochem* 55:73-83
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460:831-838
- Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Muhlenhoff U (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1823:1491-1508
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289:2126-2128
- Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L (2004) Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev* 18:12-16
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-1217
- López-Otín C, Overall CM (2002) Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:509-519
- Lowell BB, Shulman GI (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384-387
- Lowth BR, Kirstein-Miles J, Saiyed T, Brotz-Oesterhelt H, Morimoto RI, Truscott KN, Dougan DA (2012) Substrate recognition and processing by a Walker B mutant of the human mitochondrial AAA+ protein CLPX. *J Struct Biol* 179:193-201
- Luce K, Osiewacz HD (2009) Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat Cell Biol* 11:852-858
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962) A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41:1776-1804
- Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G (2010) Can autophagy promote longevity? *Nat Cell Biol* 12:842-846
- Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G (2015) Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest* 125:85-93
- Mao K, Klionsky DJ (2011) AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1. *Circ Res* 108:787-788
- Margulis L (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, New Haven, CT
- Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 11:2685-2700
- Martelli A, Napierala M, Puccio H (2012) Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis Model Mech* 5:165-176
- Martin A, Baker TA, Sauer RT (2005) Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* 437:1115-1120
- Martin A, Baker TA, Sauer RT (2008) Protein unfolding by a AAA+ protease is dependent on ATP-hydrolysis rates and substrate energy landscapes. *Nat Struct Mol Biol* 15:139-145

- Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS (2010) Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18410-18415
- Maurizi MR, Clark WP, Kim SH, Gottesman S (1990) Clp P represents a unique family of serine proteases. *J Biol Chem* 265:12546-12552
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670-684
- McInnes J (2013) Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress. *Nutr Metab (Lond)* 10:63
- Medvedev ZA (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65:375-398
- Mishra P, Chan DC (2014) Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:634-646
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148
- Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, Smith MA, Perry G (2010) Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1802:2-10
- Motokawa Y, Kikuchi G (1971) Glycine metabolism in rat liver mitochondria. V. Intramitochondrial localization of the reversible glycine cleavage system and serine hydroxymethyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 146:461-464
- Muhlenhoff U, Richhardt N, Gerber J, Lill R (2002) Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *J Biol Chem* 277:29810-29816
- Munoz-Elias EJ, Upton AM, Cherian J, McKinney JD (2006) Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol Microbiol* 60:1109-1122
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1-13
- Murrow L, Debnath J (2013) Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol* 8:105-137
- Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L (2009) SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 137:560-570
- Nakashima K, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 12:851-861
- Nargund AM, Fiorese CJ, Pellegrino MW, Deng P, Haynes CM (2015) Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Mol Cell* 58:123-133
- Nargund AM, Pellegrino MW, Fiorese CJ, Baker BM, Haynes CM (2012) Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* 337:587-590
- Navarro A, Boveris A (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C670-C686
- Neher SB, Villen J, Oakes EC, Bakalarski CE, Sauer RT, Gygi SP, Baker TA (2006) Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon. *Mol Cell* 22:193-204

Literaturverzeichnis

- Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:723-749
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 9:27-43
- Niccoli T, Partridge L (2012) Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol* 22:R741-R752
- Nishigaki R, Osaki M, Hiratsuka M, Toda T, Murakami K, Jeang KT, Ito H, Inoue T, Oshimura M (2005) Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics* 5:3205-3213
- Nishimura K, van Wijk KJ (2015) Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plastids. *Biochim Biophys Acta* 1847:915-930
- Ocampo A, Liu J, Schroeder EA, Shadel GS, Barrientos A (2012) Mitochondrial respiratory thresholds regulate yeast chronological life span and its extension by caloric restriction. *Cell Metab* 16:55-67
- Ogura T, Wilkinson AJ (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure - diverse function. *Genes Cells* 6:575-597
- Okreglak V, Walter P (2014) The conserved AAA-ATPase Msp1 confers organelle specificity to tail-anchored proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:8019-8024
- Olinares PD, Kim J, van Wijk KJ (2011) The Clp protease system; a central component of the chloroplast protease network. *Biochim Biophys Acta* 1807:999-1011
- Osiewacz HD (1994) A versatile shuttle cosmid vector for the efficient construction of genomic libraries and for the cloning of fungal genes. *Curr Genet* 26:87-90
- Osiewacz HD (2011) Mitochondrial quality control in aging and lifespan control of the fungal aging model *Podospora anserina*. *Biochem Soc Trans* 39:1488-1492
- Osiewacz HD, Borghouts C (2000) Cellular copper homeostasis, mitochondrial DNA instabilities, and lifespan control in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Exp Gerontol* 35:677-686
- Osiewacz HD, Brust D, Hamann A, Kunstmann B, Luce K, Muller-Ohldach M, Scheckhuber CQ, Servos J, Strobel I (2010) Mitochondrial pathways governing stress resistance, life, and death in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Ann N Y Acad Sci* 1197:54-66
- Osiewacz HD, Esser K (1984) The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: A mobile intron of a mitochondrial gene. *Curr Genet* 8:299-305
- Osiewacz HD, Hamann A, Zintel S (2013) Assessing organismal aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Methods Mol Biol* 965:439-462
- Osman C, Wilmes C, Tatsuta T, Langer T (2007) Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F1Fo-ATP synthase. *Mol Biol Cell* 18:627-635
- Ostersetzer O, Adam Z (1996) Effects of light and temperature on expression of ClpC, the regulatory subunit of chloroplastic Clp protease, in pea seedlings. *Plant Mol Biol* 31:673-676
- Pallister PD, Opitz JM (1979) The Perrault syndrome: autosomal recessive ovarian dysgenesis with facultative, non-sex-limited sensorineural deafness. *Am J Med Genet* 4:239-246
- Park CY, Kim EH, Choi SY, Tran TD, Kim IH, Kim SN, Pyo S, Rhee DK (2010) Virulence attenuation of *Streptococcus pneumoniae* clpP mutant by sensitivity to oxidative stress in macrophages via an NO-mediated pathway. *J Microbiol* 48:229-235
- Pellegrino MW, Nargund AM, Haynes CM (2013) Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta* 1833:410-416

- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI (2003) Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300:1140-1142
- Picciochi A, Douce R, Alban C (2001) Biochemical characterization of the *Arabidopsis* biotin synthase reaction. The importance of mitochondria in biotin synthesis. *Plant Physiol* 127:1224-1233
- Porankiewicz J, Schelin J, Clarke AK (1998) The ATP-dependent Clp protease is essential for acclimation to UV-B and low temperature in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol Microbiol* 29:275-283
- Porankiewicz J, Wang J, Clarke AK (1999) New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol Microbiol* 32:449-458
- Pruteanu M, Baker TA (2009) Controlled degradation by ClpXP protease tunes the levels of the excision repair protein UvrA to the extent of DNA damage. *Mol Microbiol* 71:912-924
- Puccio H, Koenig M (2002) Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases. *Curr Opin Genet Dev* 12:272-277
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH, van den Hondel CA (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56:117-124
- Quirós PM, Espanol Y, Acin-Perez R, Rodriguez F, Barcena C, Watanabe K, Calvo E, Loureiro M, Fernandez-Garcia MS, Fueyo A, Vazquez J, Enriquez JA, López-Otín C (2014) ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity. *Cell Rep* 8:542-556
- Quirós PM, Langer T, López-Otín C (2015) New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:345-359
- Rais I, Karas M, Schagger H (2004) Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics* 4:2567-2571
- Raju RM, Goldberg AL, Rubin EJ (2012a) Bacterial proteolytic complexes as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 11:777-789
- Raju RM, Unnikrishnan M, Rubin DH, Krishnamoorthy V, Kandror O, Akopian TN, Goldberg AL, Rubin EJ (2012b) *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1 and ClpP2 function together in protein degradation and are required for viability in vitro and during infection. *PLoS Pathog* 8:e1002511
- Ramundo S, Casero D, Muhlhaus T, Hemme D, Sommer F, Crevecoeur M, Rahire M, Schroda M, Rusch J, Goodenough U, Pellegrini M, Perez-Perez ME, Crespo JL, Schaad O, Civic N, Rochaix JD (2014) Conditional Depletion of the *Chlamydomonas* Chloroplast ClpP Protease Activates Nuclear Genes Involved in Autophagy and Plastid Protein Quality Control. *Plant Cell* 26:2201-2222
- Riera CE, Dillin A (2015) Tipping the metabolic scales towards increased longevity in mammals. *Nat Cell Biol* 17:196-203
- Rizet G (1953a) [Impossibility of obtaining uninterrupted and unlimited multiplication of the ascomycete *Podospora anserina*]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 237:838-840
- Rizet G (1953b) [Longevity of strains of *Podospora anserina*]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 237:1106-1109
- Roblick UJ, Hirschberg D, Habermann JK, Palmberg C, Becker S, Kruger S, Gustafsson M, Bruch HP, Franzen B, Ried T, Bergmann T, Auer G, Jornvall H (2004) Sequential proteome alterations during genesis and progression of colon cancer. *Cell Mol Life Sci* 61:1246-1255
- Rochaix JD, Ramundo S (2015) Conditional repression of essential chloroplast genes: Evidence for new plastid signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1847:986-992
- Roman-Hernandez G, Hou JY, Grant RA, Sauer RT, Baker TA (2011) The ClpS adaptor mediates staged delivery of N-end rule substrates to the AAA+ ClpAP protease. *Mol Cell* 43:217-228

Literaturverzeichnis

- Rouault TA (2012) Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis Model Mech* 5:155-164
- Rouault TA (2015) Mammalian iron-sulphur proteins: novel insights into biogenesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:45-55
- Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D (2004) The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1:S130-S135
- Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* 196:801-810
- Rudella A, Friso G, Alonso JM, Ecker JR, van Wijk KJ (2006) Downregulation of ClpR2 leads to reduced accumulation of the ClpPRS protease complex and defects in chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:1704-1721
- Ryan MT, Naylor DJ, Hoj PB, Clark MS, Hoogenraad NJ (1997) The role of molecular chaperones in mitochondrial protein import and folding. *Int Rev Cytol* 174:127-193
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283:1488-1493
- Scheckhuber CQ, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nystrom T, Osiewacz HD (2007) Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat Cell Biol* 9:99-105
- Scheckhuber CQ, Osiewacz HD (2008) *Podospora anserina*: a model organism to study mechanisms of healthy ageing. *Mol Genet Genomics* 280:365-374
- Scheckhuber CQ, Grief J, Boilan E, Luce K, Debaq-Chainiaux F, Rittmeyer C, Gredilla R, Kolbesen BO, Toussaint O, Osiewacz HD (2009) Age-related cellular copper dynamics in the fungal ageing model *Podospora anserina* and in ageing human fibroblasts. *PLoS One* 4:e4919. doi:10.1371/journal.pone.0004919
- Scheibye-Knudsen M, Fang EF, Croteau DL, Wilson DM 3rd, Bohr VA (2015) Protecting the mitochondrial powerhouse. *Trends Cell Biol* 25:158-170
- Schell JC, Rutter J (2013) The long and winding road to the mitochondrial pyruvate carrier. *Cancer Metab* 1:6
- Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24:453-462
- Schmidt TG, Batz L, Bonet L, Carl U, Holzapfel G, Kiem K, Matulewicz K, Niermeier D, Schuchardt I, Stanar K (2013) Development of the Twin-Strep-tag®(R) and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expr Purif* 92:54-61
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308:1909-1911
- Schrödinger E (1944) *What is Life?* Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Schulz AM, Haynes CM (2015) UPR-mediated cytoprotection and organismal aging. *Biochim Biophys Acta*
- Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6:280-293

- Schwickart M, Huang X, Lill JR, Liu J, Ferrando R, French DM, Maecker H, O'Rourke K, Bazan F, Eastham-Anderson J, Yue P, Dornan D, Huang DC, Dixit VM (2010) Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463:103-107
- Shi D, Allewell NM, Tuchman M (2015) The N-Acetylglutamate Synthase Family: Structures, Function and Mechanisms. *Int J Mol Sci* 16:13004-13022
- Shikanai T, Shimizu K, Ueda K, Nishimura Y, Kuroiwa T, Hashimoto T (2001) The chloroplast clpP gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol* 42:264-273
- Singh SK, Grimaud R, Hoskins JR, Wickner S, Maurizi MR (2000) Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8898-8903
- Singh SK, Rozycki J, Ortega J, Ishikawa T, Lo J, Steven AC, Maurizi MR (2001) Functional domains of the ClpA and ClpX molecular chaperones identified by limited proteolysis and deletion analysis. *J Biol Chem* 276:29420-29429
- Sjögren LL, Stanne TM, Zheng B, Sutinen S, Clarke AK (2006) Structural and functional insights into the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:2635-2649
- Sjöstrand FS (1999) Molecular pathology of Luft disease and structure and function of mitochondria. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31:41-50
- Smith CK, Baker TA, Sauer RT (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6678-6682
- Snider J, Thibault G, Houry WA (2008) The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol* 9:216
- Sprangers R, Gribun A, Hwang PM, Houry WA, Kay LE (2005) Quantitative NMR spectroscopy of supramolecular complexes: dynamic side pores in ClpP are important for product release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16678-16683
- Stahl U, Lemke PA, Tudzynski P, Kück U, Esser K (1978) Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet* 162:341-343
- Stanne TM, Sjögren LL, Koussevitzky S, Clarke AK (2009) Identification of new protein substrates for the chloroplast ATP-dependent Clp protease supports its constitutive role in *Arabidopsis*. *Biochem J* 417:257-268
- Stiburek L, Cesnekova J, Kostkova O, Fornuskova D, Vinsova K, Wenchich L, Houstek J, Zeman J (2012) YME1L controls the accumulation of respiratory chain subunits and is required for apoptotic resistance, cristae morphogenesis, and cell proliferation. *Mol Biol Cell* 23:1010-1023
- Stuart JA, Maddalena LA, Merilovich M, Robb EL (2014) A midlife crisis for the mitochondrial free radical theory of aging. *Longev Healthspan* 3:4
- Stumpferl SW, Stephan O, Osiewacz HD (2004) Impact of a disruption of a pathway delivering copper to mitochondria on *Podospora anserina* metabolism and life span. *Eukaryot Cell* 3:200-211
- Tao L, Biswas I (2015) Degradation of SsrA-tagged proteins in streptococci. *Microbiology* 161:884-894
- Tapken W, Kim J, Nishimura K, van Wijk KJ, Pilon M (2015) The Clp protease system is required for copper ion-dependent turnover of the PAA2/HMA8 copper transporter in chloroplasts. *New Phytol* 205:511-517
- Tatsuta T, Langer T (2008) Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* 27:306-314
- Taylor EB, Rutter J (2011) Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system. *Biochem Soc Trans* 39:1509-1513

Literaturverzeichnis

- Teixeira PF, Glaser E (2013) Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1833:360-370
- Thompson MW, Maurizi MR (1994) Activity and specificity of *Escherichia coli* ClpAP protease in cleaving model peptide substrates. *J Biol Chem* 269:18201-18208
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly Y, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429:417-423
- Tu GF, Reid GE, Zhang JG, Moritz RL, Simpson RJ (1995) C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide. *J Biol Chem* 270:9322-9326
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335-344
- Twig G, Hyde B, Shirihai OS (2008) Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 1777:1092-1097
- Upton AM, McKinney JD (2007) Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 153:3973-3982
- Vafai SB, Mootha VK (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491:374-383
- van Dyck L, Dembowski M, Neupert W, Langer T (1998) Mcx1p, a ClpX homologue in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 438:250-254
- Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, Alderson NL, Baynes JW, Epstein CJ, Huang TT, Nelson J, Strong R, Richardson A (2003) Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 16:29-37
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029-1033
- Vedadi M, Lew J, Artz J, Amani M, Zhao Y, Dong A, Wasney GA, Gao M, Hills T, Brox S, Qiu W, Sharma S, Diassiti A, Alam Z, Melone M, Mulichak A, Wernimont A, Bray J, Loppnau P, Plotnikova O, Newberry K, Sundararajan E, Houston S, Walker J, Tempel W, Bochkarev A, Kozieradzki I, Edwards A, Arrowsmith C, Roos D, Kain K, Hui R (2007) Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. *Mol Biochem Parasitol* 151:100-110
- Venkatesh S, Lee J, Singh K, Lee I, Suzuki CK (2012) Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochim Biophys Acta* 1823:56-66
- Vermulst M, Wanagat J, Kujoth GC, Bielas JH, Rabinovitch PS, Prolla TA, Loeb LA (2008) DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat Genet* 40:392-394
- Voos W (2013) Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1833:388-399
- Voss S, Skerra A (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* 10:975-982
- Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39:359-407
- Wang J, Hartling JA, Flanagan JM (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 91:447-456
- Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842:1240-1247

- Warburg O, Wind F, Negelein E (1927) The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 8:519-530
- Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA (2008) Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 14:193-199
- Weil A, Luce K, Droese S, Wittig I, Brandt U, Osiewacz HD (2011) Unmasking a temperature-dependent effect of the *P. anserina* i-AAA protease on aging and development. *Cell Cycle* 10:4280-4290
- Weinberg SE, Chandel NS (2015) Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol* 11:9-15
- Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D (1986) The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* 116:641-654
- Wickner S, Maurizi MR (1999) Here's the hook: similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8318-8320
- Wiegert T, Schumann W (2001) SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:3885-3889
- Wittig I, Braun HP, Schagger H (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1:418-428
- Wojtyra UA, Thibault G, Tuite A, Houry WA (2003) The N-terminal zinc binding domain of ClpX is a dimerization domain that modulates the chaperone function. *J Biol Chem* 278:48981-48990
- Wright G, Terada K, Yano M, Sergeev I, Mori M (2001) Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. *Exp Cell Res* 263:107-117
- Wu H, Ji Y, Du J, Kong D, Liang H, Ling HQ (2010) ClpC1, an ATP-dependent Clp protease in plastids, is involved in iron homeostasis in *Arabidopsis* leaves. *Ann Bot* 105:823-833
- Xie F, Zhang Y, Li G, Zhou L, Liu S, Wang C (2013) The ClpP protease is required for the stress tolerance and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *PLoS One* 8:e53600. doi:10.1371/journal.pone.0053600
- Yee C, Yang W, Hekimi S (2014) The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans*. *Cell* 157:897-909
- Yu AY, Houry WA (2007) ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Lett* 581:3749-3757
- Zeiler E, Braun N, Bottcher T, Kastenmuller A, Weinkauff S, Sieber SA (2011) Vibrilactone as a tool to study the activity and structure of the ClpP1P2 complex from *Listeria monocytogenes*. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:11001-11004
- Zhang Y, Ikeno Y, Qi W, Chaudhuri A, Li Y, Bokov A, Thorpe SR, Baynes JW, Epstein C, Richardson A, Van Remmen H (2009) Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64:1212-1220
- Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT, Hoogenraad NJ (2002) A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J* 21:4411-4419
- Zhou Y, Gottesman S, Hoskins JR, Maurizi MR, Wickner S (2001) The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev* 15:627-637

9 ANHANG

9.1 Ergänzende Tabellen

Tabelle S1 | Übersicht aller im ersten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit HsCLPLP^{3F6H} ko-aufgereinigten Proteine. Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID, entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, sowie die Anzahl der identifizierten einzigartigen Peptide (engl. „unique peptides“, UPs) des Proteins im jeweiligen biologischen Replikat (bRep). Die Proteine sind aufsteigend nach ihrer Pa_ID gelistet, wobei zunächst alle Proteine aufgeführt werden, die in allen drei biologischen Replikaten vorkommen, dann alle Proteine, die in zwei biologischen Replikaten vorkommen und zum Schluss die Proteine, welche nur in einem biologischen Replikat gefunden wurden. Am Ende der Tabelle ist in fett die Gesamtzahl der individuellen Proteine im jeweiligen biologischen Replikat genannt.

Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups	Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups
Pa_1_10210	B2AY83	1,0	2,0	2,0	Pa_3_9430	B2B162	3,0	1,0	1,0
Pa_1_12550	B2AYX5	3,0	7,0	4,0	Pa_3_9520	B2B172	2,0	3,0	1,0
Pa_1_13140	B2ALX5	14,0	16,0	8,0	Pa_4_1130	B2ADH4	1,0	2,0	2,0
Pa_1_14370	B2AT17	2,0	5,0	2,0	Pa_4_3040	B2AE70	3,0	2,0	1,0
Pa_1_14430	B2AT23	2,0	2,0	1,0	Pa_4_6250	B2APU5	3,0	2,0	1,0
Pa_1_14630	B2AT45	7,0	10,0	5,0	Pa_4_7010	B2ARM6	5,0	7,0	4,0
Pa_1_15350	B2ATC1	1,0	5,0	1,0	Pa_4_7160	B2ARK6	2,0	3,0	2,0
Pa_1_15690	B2ATF5	3,0	3,0	1,0	Pa_4_7790	B2ARE2	2,0	3,0	2,0
Pa_1_17000	B2ATU6	2,0	6,0	3,0	Pa_4_8600	B2ARS4	3,0	5,0	2,0
Pa_1_17280	B2ATX6	4,0	10,0	3,0	Pa_4_8840	B2AR28	2,0	1,0	1,0
Pa_1_17630	B2AU12	3,0	3,0	3,0	Pa_5_11920	B2AF14	3,0	9,0	2,0
Pa_1_19590	B2AUM2	1,0	2,0	2,0	Pa_5_12270	B2AFQ4	1,0	1,0	1,0
Pa_1_19720	Q01520	4,0	6,0	5,0	Pa_5_1240	B2AEX2	3,0	5,0	3,0
Pa_1_20110	B2AUS3	1,0	1,0	1,0	Pa_5_12810	B2AFG3	1,0	1,0	1,0
Pa_1_22300	B2AS46	7,0	18,0	10,0	Pa_5_5390	Q875B8	2,0	2,0	2,0
Pa_1_3450	B2AAB2	3,0	5,0	3,0	Pa_5_5410	Q875B7	1,0	1,0	1,0
Pa_1_4100	B2AAI3	1,0	3,0	1,0	Pa_5_5970	B2VLF5	11,0	17,0	10,0
Pa_1_4450	B2AAL7	2,0	6,0	5,0	Pa_5_7380	B2AMA8	1,0	2,0	1,0
Pa_1_4520	B2AAM4	2,0	3,0	1,0	Pa_5_8240	B2AKR1	1,0	4,0	3,0
Pa_1_5850	B2AB15	9,0	14,0	10,0	Pa_5_9750	B2AL63	2,0	4,0	2,0
Pa_1_6520	B2AB90	10,0	16,0	12,0	Pa_6_1590	B2B2Z5	8,0	10,0	4,0
Pa_1_6830	B2ABC2	2,0	3,0	3,0	Pa_6_1920	B2B2W2	4,0	5,0	4,0
Pa_1_6960	B2ABD6	6,0	7,0	7,0	Pa_6_240	B2B3E7	8,0	11,0	5,0
Pa_1_6980	B2ABD8	4,0	7,0	2,0	Pa_6_2570	B2B2N8	12,0	18,0	15,0
Pa_1_740	B2A9C8	1,0	1,0	1,0	Pa_6_2730	B2B2M1	6,0	8,0	3,0
Pa_1_7990	B2A903	1,0	1,0	1,0	Pa_6_3510	B2B2D7	1,0	4,0	1,0
Pa_1_8390	B2A947	26,0	28,0	22,0	Pa_6_4730	B2B1X0	12,0	11,0	8,0
Pa_1_8920	B2AXV1	3,0	4,0	4,0	Pa_6_4750	B2B1X2	2,0	4,0	1,0
Pa_1_9290	B2AXY9	18,0	21,0	17,0	Pa_6_5140	B2B209	13,0	13,0	10,0
Pa_1_9450	B2AY05	6,0	8,0	4,0	Pa_6_5340	B2AVL3	1,0	1,0	1,0
Pa_2_1050	B2B4E9	8,0	10,0	9,0	Pa_6_5350	B2B230	2,0	2,0	3,0
Pa_2_10580	B2B7B9	12,0	11,0	13,0	Pa_6_5480	B2B244	1,0	2,0	2,0
Pa_2_10680	B2B7C9	1,0	2,0	1,0	Pa_6_5560	B2B251	14,0	9,0	7,0
Pa_2_11200	B2B7I2	8,0	7,0	8,0	Pa_6_5610	B2B256	14,0	20,0	15,0
Pa_2_11540	B2B7L7	1,0	1,0	1,0	Pa_6_5750	B2B270	26,0	31,0	27,0
Pa_2_12010	B2B7R7	4,0	14,0	12,0	Pa_6_6040	B2B2A3	2,0	2,0	3,0
Pa_2_12760	B2B7Z4	4,0	8,0	1,0	Pa_6_8420	B2AMZ0	6,0	5,0	2,0
Pa_2_13410	B2B859	1,0	1,0	1,0	Pa_6_8740	Q8TGH7	1,0	3,0	2,0
Pa_2_14090	B2AC36	1,0	1,0	1,0	Pa_7_11550	B2AXS5	1,0	1,0	1,0
Pa_2_2290	B2B4S5	1,0	2,0	1,0	Pa_7_4870	B2AUW6	1,0	1,0	1,0
Pa_2_3290	B2B523	3,0	3,0	3,0	Pa_7_5390	B2AVZ3	3,0	3,0	3,0
Pa_2_3760	B2B577	1,0	1,0	1,0	Pa_7_570	B2AP47	3,0	3,0	2,0
Pa_2_430	B2B487	2,0	4,0	3,0	Pa_7_6480	B2AWA3	1,0	2,0	2,0
Pa_2_4980	B2B5L0	2,0	5,0	1,0	Pa_7_6790	B2AWD5	1,0	1,0	1,0
Pa_2_5010	B2B5L3	1,0	2,0	2,0	Pa_7_9950	B2AXB1	3,0	2,0	1,0
Pa_2_6200	B2B5Y8	3,0	4,0	3,0	Pa_mito_cox2	P20682	2,0	1,0	1,0
Pa_2_7880	B2B6I4	2,0	4,0	1,0	Pa_1_13750	B2ALS4	1,0	2,0	-
Pa_2_9700	B2B728	16,0	18,0	21,0	Pa_1_14830	B2AT67	1,0	1,0	-
Pa_2_9780	B2B736	7,0	12,0	7,0	Pa_1_15800	B2ATG7	1,0	2,0	-
Pa_3_10150	B2B1H6	11,0	14,0	12,0	Pa_1_1800	B2A9U2	1,0	1,0	-
Pa_3_10790	B2AD09	6,0	14,0	7,0	Pa_1_18430	B2AUAO	-	2,0	1,0
Pa_3_10800	B2AD08	14,0	17,0	16,0	Pa_1_19670	B2AUN0	1,0	2,0	-
Pa_3_11170	B2ACX4	3,0	7,0	5,0	Pa_1_1980	B2A9W1	1,0	7,0	-
Pa_3_11290	B2ACV8	8,0	13,0	4,0	Pa_1_20100	B2AUS2	1,0	1,0	-
Pa_3_1420	B2ACM0	2,0	4,0	4,0	Pa_1_22220	B2AS38	-	1,0	1,0
Pa_3_2310	B2B010	2,0	7,0	6,0	Pa_1_24160	B2ASP1	-	3,0	2,0
Pa_3_2340	B2B013	1,0	1,0	1,0	Pa_1_7345	AOA090CCU8	1,0	1,0	-
Pa_3_2600	B2AZV9	1,0	6,0	1,0	Pa_1_7660	B2A8W9	3,0	1,0	-
Pa_3_3200	B2AZC0	4,0	4,0	2,0	Pa_1_7770	B2A8Y0	3,0	2,0	-
Pa_3_3470	B2AZF0	1,0	2,0	1,0	Pa_1_8620	B2A972	-	2,0	2,0
Pa_3_4170	B2AZ54	3,0	4,0	1,0	Pa_1_8820	B2AXU0	1,0	-	2,0
Pa_3_4870	B2AZM0	1,0	3,0	2,0	Pa_2_6600	B2B636	1,0	1,0	-
Pa_3_6450	B2B064	8,0	8,0	12,0	Pa_3_10115	B2B1H2	1,0	-	1,0
Pa_3_6770	B2B0N8	2,0	1,0	1,0	Pa_3_1045	B2ACH8	1,0	-	1,0
Pa_3_6780	Q9HFI1	5,0	14,0	6,0	Pa_3_10910	B2ACZ7	1,0	3,0	-
Pa_3_6820	B2B0P3	2,0	7,0	4,0	Pa_3_7060	B2BOR6	-	1,0	1,0
Pa_3_7700	B2B0Y1	8,0	12,0	8,0	Pa_3_7390	B2B0V0	-	1,0	1,0
Pa_3_8090	B2B122	4,0	2,0	2,0	Pa_4_150	B2AD57	1,0	1,0	-

Anhang

Pa_4_660	B2ADB9	1,0	4,0	-	Pa_2_5030	B2B5L5	-	1,0	-
Pa_5_10260	B2APG7	1,0	1,0	-	Pa_2_6510	B2B627	4,0	-	-
Pa_5_13020	B2AFE0	1,0	-	1,0	Pa_2_9940	B2B753	1,0	-	-
Pa_5_5190	Q875D2	-	2,0	1,0	Pa_3_10160	B2B1H7	-	1,0	-
Pa_5_5370	B2VL95	-	2,0	3,0	Pa_3_2810	B2AZT4	1,0	-	-
Pa_5_7500	B2AMC3	-	1,0	1,0	Pa_3_3765	A0A090CFP7	1,0	-	-
Pa_5_9300	B2AKY2	1,0	1,0	-	Pa_3_4700	B2AZK3	-	1,0	-
Pa_6_10000	B2ANA5	2,0	3,0	-	Pa_3_5110	B2AZP5	-	1,0	-
Pa_6_1640	B2B2Z0	2,0	-	1,0	Pa_3_6410	B2B060	1,0	-	-
Pa_6_6190	B2B2B8	4,0	1,0	-	Pa_3_6560	B2B0L7	1,0	-	-
Pa_6_8800	B2AN29	1,0	1,0	-	Pa_3_680	B2ACD3	1,0	-	-
Pa_7_10050	B2AXC0	1,0	1,0	-	Pa_3_6870	B2B0P8	2,0	-	-
Pa_7_10210	B2AXD7	1,0	3,0	-	Pa_3_7870	B2B100	-	-	1,0
Pa_7_2780	B2AVJ0	1,0	1,0	-	Pa_3_8430	B2B0A0	1,0	-	-
Pa_7_6980	B2AWF5	1,0	1,0	-	Pa_4_3858	B2AQK7	1,0	-	-
Pa_7_9830	B2AXA0	1,0	1,0	-	Pa_4_4035	B2AQI4	-	-	1,0
Pa_1_10590	B2AYB9	-	2,0	-	Pa_4_460	B2AD94	-	2,0	-
Pa_1_11430	B2AYK7	1,0	-	-	Pa_4_7950	B2ARC6	1,0	-	-
Pa_1_13390	B2AM00	-	1,0	-	Pa_4_9290	B2AQY4	-	1,0	-
Pa_1_13550	B2ALR1	1,0	-	-	Pa_4_9690	B2AE86	-	1,0	-
Pa_1_15480	B2ATD4	-	1,0	-	Pa_5_130	B2AF97	1,0	-	-
Pa_1_16800	B2ATS4	-	-	1,0	Pa_5_13080	B2AFD3	1,0	-	-
Pa_1_17130	B2ATW0	-	1,0	-	Pa_5_7530	B2AMC6	-	-	1,0
Pa_1_17870	B2AU39	-	1,0	-	Pa_5_8000	B2AKK6	-	1,0	-
Pa_1_18120	B2AU68	-	-	1,0	Pa_5_8230	B2AKR0	-	1,0	-
Pa_1_19320	B2AUJ3	-	1,0	-	Pa_6_10810	B2ANH3	1,0	-	-
Pa_1_20260	B2AUT8	-	1,0	-	Pa_6_10820	B2ANL0	1,0	-	-
Pa_1_20270	B2AUT9	1,0	-	-	Pa_6_160	B2B3F5	-	-	1,0
Pa_1_20760	B2ABI2	1,0	-	-	Pa_6_2210	B2B2S7	-	1,0	-
Pa_1_2100	B2A9X4	-	-	1,0	Pa_6_310	B2B3E0	1,0	-	-
Pa_1_2150	B2A9X9	1,0	-	-	Pa_6_4100	B2B1Q5	1,0	-	-
Pa_1_22480	B2AS63	-	2,0	-	Pa_6_4720	B2B1W9	-	-	1,0
Pa_1_2480	B2AA13	-	1,0	-	Pa_6_6860	B2B3P5	1,0	-	-
Pa_1_4030	B2AAH6	-	1,0	-	Pa_6_7173	B2B3T1	-	1,0	-
Pa_1_4260	B2AAJ8	1,0	-	-	Pa_6_9340	B2AN97	-	1,0	-
Pa_1_5890	B2AB20	-	1,0	-	Pa_6_9500	B2ANT3	1,0	-	-
Pa_1_6140	B2AB51	-	1,0	-	Pa_6_9840	B2ANR5	1,0	-	-
Pa_1_890	B2A9B3	-	-	1,0	Pa_7_10070	B2AXC2	-	1,0	-
Pa_1_9390	B2AXZ9	-	-	1,0	Pa_7_2210	B2AVP7	-	-	1,0
Pa_2_11810	B2B7P7	-	-	1,0	Pa_7_2240	B2AVP2	-	1,0	-
Pa_2_11850	B2B7Q1	-	1,0	-	Pa_7_2370	B2AVN1	1,0	-	-
Pa_2_12340	B2B7V0	1,0	-	-	Pa_7_3080	B2AVG0	1,0	-	-
Pa_2_12730	B2B7Z1	-	1,0	-	Pa_7_5140	B2AVW9	-	1,0	-
Pa_2_12750	B2B7Z3	-	1,0	-	Pa_7_5680	B2AW22	-	1,0	-
Pa_2_1690	B2B4L4	-	-	1,0	Pa_7_6250	B2AW80	-	-	1,0
Pa_2_1920	B2B4N9	1,0	-	-	Pa_7_7210	B2AWH7	1,0	-	-
Pa_2_2560	B2B4V1	1,0	-	-	Pa_7_7700	B2AWM8	-	2,0	-
Pa_2_3370	B2B535	1,0	-	-	Pa_7_7950	B2AWQ3	1,0	-	-
Pa_2_4110	B2B5B2	-	2,0	-	Pa_7_9300	B2AX48	-	1,0	-
					177 181 142				

Tabelle S2 | Übersicht aller im ersten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit HsCLPPS153A-L3F6H ko-aufgereinigten Proteine. Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID, entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, sowie die Anzahl der identifizierten einzigartigen Peptide (engl. „unique peptides“, UPs) des Proteins im jeweiligen biologischen Replikat (bRep). Die Proteine sind aufsteigend nach ihrer Pa_ID gelistet, wobei zunächst alle Proteine aufgeführt werden, die in allen drei biologischen Replikaten vorkommen, dann alle Proteine, die in zwei biologischen Replikaten vorkommen und zum Schluss die Proteine, welche nur in einem biologischen Replikat gefunden wurden. Am Ende der Tabelle ist in fett die Gesamtzahl der individuellen Proteine im jeweiligen biologischen Replikat genannt.

Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups	Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups
Pa_1_10210	B2AY83	1,0	1,0	1,0	Pa_5_1240	B2AEX2	3,0	4,0	3,0
Pa_1_11330	B2AYJ7	1,0	1,0	1,0	Pa_5_12810	B2AFG3	1,0	1,0	1,0
Pa_1_12550	B2AYX5	1,0	3,0	5,0	Pa_5_1740	B2AER6	1,0	3,0	1,0
Pa_1_13140	B2ALX5	1,0	7,0	9,0	Pa_5_2590	B2AEH2	2,0	2,0	1,0
Pa_1_13750	B2ALS4	3,0	3,0	5,0	Pa_5_5370	B2VL95	1,0	2,0	3,0
Pa_1_14430	B2AT23	3,0	4,0	4,0	Pa_5_5390	Q875B8	2,0	2,0	2,0
Pa_1_14630	B2AT45	2,0	3,0	5,0	Pa_5_5410	Q875B7	1,0	1,0	1,0
Pa_1_15690	B2ATF5	4,0	6,0	6,0	Pa_5_5810	B2VLD9	1,0	2,0	2,0
Pa_1_17280	B2ATX6	8,0	15,0	13,0	Pa_5_5970	B2VLF5	13,0	19,0	16,0
Pa_1_18430	B2AUA0	2,0	4,0	3,0	Pa_5_7500	B2AMC3	1,0	2,0	1,0
Pa_1_19320	B2AUJ3	1,0	2,0	1,0	Pa_5_9670	B2AL19	2,0	3,0	3,0
Pa_1_19590	B2AUM2	1,0	2,0	3,0	Pa_6_10000	B2ANA5	5,0	8,0	5,0
Pa_1_19670	B2AUN0	1,0	1,0	1,0	Pa_6_1590	B2B2Z5	5,0	6,0	4,0
Pa_1_19720	Q01520	3,0	2,0	3,0	Pa_6_1640	B2B2Z0	6,0	8,0	8,0
Pa_1_22220	B2AS38	1,0	1,0	1,0	Pa_6_1920	B2B2W2	5,0	6,0	6,0
Pa_1_22300	B2AS46	10,0	18,0	15,0	Pa_6_240	B2B3E7	6,0	7,0	6,0
Pa_1_3450	B2AAB2	2,0	6,0	6,0	Pa_6_2570	B2B2N8	17,0	28,0	25,0
Pa_1_4100	B2AAI3	1,0	3,0	2,0	Pa_6_2730	B2B2M1	5,0	7,0	8,0
Pa_1_4920	B2AAR4	1,0	1,0	1,0	Pa_6_4730	B2B1X0	4,0	8,0	10,0
Pa_1_5850	B2AB15	4,0	6,0	7,0	Pa_6_4750	B2B1X2	1,0	2,0	2,0
Pa_1_6330	B2AB71	1,0	2,0	2,0	Pa_6_5140	B2B209	8,0	10,0	7,0
Pa_1_6520	B2AB90	6,0	12,0	13,0	Pa_6_5350	B2B230	4,0	2,0	1,0
Pa_1_6830	B2ABC2	2,0	2,0	2,0	Pa_6_5560	B2B251	9,0	15,0	17,0
Pa_1_6960	B2ABD6	3,0	7,0	7,0	Pa_6_5610	B2B256	9,0	15,0	14,0
Pa_1_6980	B2ABD8	2,0	4,0	4,0	Pa_6_5750	B2B270	17,0	22,0	22,0
Pa_1_7345	A0A090CCU8	1,0	1,0	1,0	Pa_6_6190	B2B2B8	1,0	2,0	2,0
Pa_1_7660	B2ABW9	2,0	1,0	1,0	Pa_6_8740	Q8TGH7	2,0	3,0	3,0
Pa_1_8390	B2A947	14,0	22,0	22,0	Pa_7_10050	B2AXC0	1,0	1,0	2,0
Pa_1_9290	B2AXY9	10,0	18,0	18,0	Pa_7_11550	B2AXS5	1,0	1,0	1,0
Pa_1_9450	B2AY05	3,0	6,0	6,0	Pa_7_5390	B2AVZ3	1,0	2,0	2,0
Pa_2_1050	B2B4E9	6,0	8,0	9,0	Pa_7_570	B2AP47	1,0	2,0	1,0
Pa_2_10580	B2B7B9	9,0	10,0	12,0	Pa_7_6790	B2AWD5	3,0	7,0	6,0
Pa_2_10680	B2B7C9	2,0	4,0	3,0	Pa_7_7700	B2AWM8	1,0	3,0	1,0
Pa_2_11200	B2B7I2	9,0	4,0	3,0	Pa_1_11430	B2AYK7	-	1,0	1,0
Pa_2_11540	B2B7L7	1,0	1,0	2,0	Pa_1_14540	B2AT34	-	2,0	1,0
Pa_2_12010	B2B7R7	7,0	12,0	11,0	Pa_1_15800	B2ATG7	-	1,0	2,0
Pa_2_12760	B2B7Z4	1,0	3,0	2,0	Pa_1_17000	B2ATU6	-	3,0	3,0
Pa_2_13410	B2B859	1,0	1,0	1,0	Pa_1_17630	B2AU12	-	1,0	3,0
Pa_2_14090	B2AC36	1,0	1,0	1,0	Pa_1_20110	B2AUS3	1,0	-	1,0
Pa_2_4110	B2B5B2	1,0	1,0	2,0	Pa_1_2150	B2A9X9	1,0	-	1,0
Pa_2_430	B2B487	2,0	2,0	4,0	Pa_1_4450	B2AAL7	-	3,0	5,0
Pa_2_4710	B2B5H6	1,0	1,0	1,0	Pa_1_5890	B2AB20	1,0	1,0	-
Pa_2_4980	B2B5L0	3,0	7,0	5,0	Pa_1_740	B2A9C8	-	1,0	1,0
Pa_2_6200	B2B5Y8	3,0	4,0	4,0	Pa_1_7895	B2A8Z3	1,0	1,0	-
Pa_2_9700	B2B7Z8	19,0	24,0	24,0	Pa_1_7990	B2A903	-	1,0	1,0
Pa_2_9780	B2B736	5,0	5,0	7,0	Pa_1_8920	B2AXV1	-	1,0	3,0
Pa_3_10115	B2B1H2	1,0	1,0	1,0	Pa_2_1920	B2B4N9	1,0	-	1,0
Pa_3_10150	B2B1H6	9,0	14,0	11,0	Pa_2_2660	B2B4W1	1,0	1,0	-
Pa_3_10790	B2AD09	6,0	13,0	9,0	Pa_2_3890	B2B590	-	2,0	1,0
Pa_3_10800	B2AD08	14,0	18,0	14,0	Pa_2_7880	B2B6I4	1,0	1,0	-
Pa_3_11170	B2ACX4	9,0	12,0	12,0	Pa_3_10910	B2ACZ7	-	3,0	3,0
Pa_3_11290	B2ACV8	8,0	13,0	10,0	Pa_3_4750	B2AZK8	-	2,0	2,0
Pa_3_1420	B2ACM0	5,0	3,0	7,0	Pa_3_6770	B2B0N8	2,0	1,0	-
Pa_3_2310	B2B010	1,0	4,0	3,0	Pa_3_6820	B2B0P3	-	4,0	5,0
Pa_3_2600	B2AZV9	3,0	10,0	7,0	Pa_3_7060	B2B0R6	-	1,0	3,0
Pa_3_3200	B2AZC0	2,0	4,0	5,0	Pa_3_8090	B2B122	-	1,0	1,0
Pa_3_3470	B2AZF0	1,0	3,0	3,0	Pa_3_9400	B2B159	-	1,0	1,0
Pa_3_4170	B2AZ54	1,0	3,0	2,0	Pa_3_9430	B2B162	-	1,0	1,0
Pa_3_4870	B2AZM0	6,0	19,0	7,0	Pa_4_3040	B2AE70	-	1,0	1,0
Pa_3_6450	B2B064	4,0	7,0	10,0	Pa_4_460	B2AD94	-	3,0	1,0
Pa_3_6780	Q9HFI1	9,0	18,0	15,0	Pa_5_10260	B2APG7	-	1,0	1,0
Pa_3_7700	B2B0Y1	6,0	9,0	10,0	Pa_5_5190	Q875D2	-	1,0	2,0
Pa_3_9520	B2B172	3,0	2,0	3,0	Pa_5_8230	B2AKR0	-	4,0	2,0
Pa_4_1130	B2ADH4	1,0	1,0	1,0	Pa_5_8550	B2AL32	-	2,0	2,0
Pa_4_150	B2AD57	1,0	1,0	1,0	Pa_5_9300	B2AKY2	1,0	-	1,0
Pa_4_660	B2ADB9	1,0	4,0	3,0	Pa_5_9750	B2AL63	-	2,0	3,0
Pa_4_7010	B2ARM6	2,0	5,0	6,0	Pa_6_10820	B2ANL0	-	1,0	2,0
Pa_4_7160	B2ARK6	1,0	3,0	2,0	Pa_6_3510	B2B2D7	-	1,0	2,0
Pa_4_7790	B2ARE2	3,0	3,0	3,0	Pa_6_6040	B2B2A3	1,0	-	3,0
Pa_4_7950	B2ARC6	2,0	3,0	2,0	Pa_6_6860	B2B3P5	-	1,0	1,0
Pa_4_8600	B2ARS4	3,0	5,0	4,0	Pa_6_750	B2B386	-	1,0	2,0
Pa_4_8840	B2AR28	2,0	1,0	2,0	Pa_6_8420	B2AMZ0	-	2,0	2,0
Pa_5_11920	B2AFL4	3,0	8,0	9,0	Pa_6_8800	B2AN29	-	2,0	1,0

Anhang

Pa_7_10210	B2AXD7	-	8,0	3,0	Pa_2_7130	B2B696	-	1,0	-
Pa_7_6400	B2AW95	-	1,0	1,0	Pa_3_10160	B2B1H7	-	1,0	-
Pa_7_6480	B2AWA3	-	1,0	1,0	Pa_3_11090	B2ACY2	-	-	1,0
Pa_7_6980	B2AWF5	1,0	1,0	-	Pa_3_2420	B2AZT9	1,0	-	-
Pa_1_10590	B2AYB9	-	1,0	-	Pa_3_5300	B2B0D3	-	-	1,0
Pa_1_10920	B2AYF4	-	-	1,0	Pa_3_6530	B2B0L4	-	1,0	-
Pa_1_13390	B2AM00	-	-	2,0	Pa_3_7690	B2B0Y0	-	1,0	-
Pa_1_14370	B2AT17	-	-	1,0	Pa_3_8430	B2B0A0	1,0	-	-
Pa_1_14530	B2AT33	-	-	1,0	Pa_3_9860	B2B1E5	1,0	-	-
Pa_1_14830	B2AT67	-	-	1,0	Pa_4_3910	B2AQK0	-	-	1,0
Pa_1_15350	B2ATC1	-	-	3,0	Pa_4_6250	B2APU5	-	1,0	-
Pa_1_1760	B2A9T8	-	1,0	-	Pa_4_8340	B2AR82	-	-	1,0
Pa_1_1800	B2A9U2	-	-	1,0	Pa_4_9690	B2AE86	-	1,0	-
Pa_1_18200	B2AU76	1,0	-	-	Pa_5_12270	B2AFQ4	-	-	1,0
Pa_1_1980	B2A9W1	-	-	1,0	Pa_5_1300	B2AEW6	1,0	-	-
Pa_1_20100	B2AUS2	-	1,0	-	Pa_5_7530	B2AMC6	-	1,0	-
Pa_1_20270	B2AUT9	1,0	-	-	Pa_5_8240	B2AKR1	-	-	1,0
Pa_1_21240	B2ABL4	-	-	1,0	Pa_6_10010	B2ANA6	-	1,0	-
Pa_1_22480	B2AS63	-	-	1,0	Pa_6_1340	B2B320	-	1,0	-
Pa_1_4030	B2AAH6	-	-	2,0	Pa_6_310	B2B3E0	1,0	-	-
Pa_1_4400	B2AAL2	-	1,0	-	Pa_6_4100	B2B1Q5	1,0	-	-
Pa_1_4520	B2AAM4	-	-	2,0	Pa_6_5340	B2AVL3	1,0	-	-
Pa_1_6013	B2AB35	1,0	-	-	Pa_6_5480	B2B244	-	-	1,0
Pa_1_7470	B2A8V1	1,0	-	-	Pa_6_5590	B2B254	1,0	-	-
Pa_1_7610	B2A8W4	-	-	1,0	Pa_6_6120	B2B2B1	-	1,0	-
Pa_1_7770	B2A8Y0	-	1,0	-	Pa_6_7340	B2B3U7	-	1,0	-
Pa_1_8620	B2A972	-	1,0	-	Pa_7_2070	B2AVR3	-	1,0	-
Pa_2_1090	B2B4F3	1,0	-	-	Pa_7_4670	B2AU7	-	1,0	-
Pa_2_1168	B2B4G1	1,0	-	-	Pa_7_7210	B2AWH7	1,0	-	-
Pa_2_12730	B2B7Z1	-	-	1,0	Pa_7_8630	B2AWX7	1,0	-	-
Pa_2_12970	B2B815	-	1,0	-	Pa_7_9060	B2AX21	-	1,0	-
Pa_2_2290	B2B4S5	-	-	1,0	Pa_7_9830	B2AXA0	-	1,0	-
Pa_2_3290	B2B523	-	-	1,0	Pa_7_990	B2ANY8	-	-	1,0
Pa_2_3760	B2B577	1,0	-	-	Pa_7_9950	B2AXB1	-	-	1,0
Pa_2_5010	B2B5L3	-	1,0	-	Pa_mito_cox2	P20682	-	-	1,0
Pa_2_6680	A7IQW1	-	1,0	-					
					134	169	170		

Tabelle S3 | **Übersicht aller im ersten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ in der Hintergrundkontrolle identifizierten Proteine.** Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID, entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, sowie die Anzahl der identifizierten einzigartigen Peptide (engl. „unique peptides“, UPs) des Proteins im jeweiligen biologischen Replikat (bRep). Die Proteine sind aufsteigend nach ihrer Pa_ID gelistet, wobei zunächst alle Proteine aufgeführt werden, die in allen drei biologischen Replikaten vorkommen, dann alle Proteine, die in zwei biologischen Replikaten vorkommen und zum Schluss die Proteine, welche nur in einem biologischen Replikat gefunden wurden. Am Ende der Tabelle ist in fett die Gesamtzahl der individuellen Proteine im jeweiligen biologischen Replikat genannt.

Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups	Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups
Pa_1_13340	Q8WZP5	2,0	1,0	3,0	Pa_2_11790	B2B7P5	-	-	1,0
Pa_1_17000	B2ATU6	2,0	3,0	3,0	Pa_2_12340	B2B7V0	-	1,0	-
Pa_1_19590	B2AUM2	1,0	1,0	2,0	Pa_2_1420	B2B4I7	1,0	-	-
Pa_1_19720	Q01520	3,0	6,0	3,0	Pa_2_1920	B2B4N9	-	-	1,0
Pa_1_5850	B2AB15	4,0	4,0	5,0	Pa_2_5010	B2B5L3	-	1,0	-
Pa_1_6980	B2ABD8	1,0	2,0	1,0	Pa_2_5030	B2B5L5	-	-	1,0
Pa_1_8390	B2A947	17,0	19,0	22,0	Pa_2_5260	B2B5N7	-	1,0	-
Pa_1_9290	B2AXY9	5,0	4,0	5,0	Pa_2_5600	B2B5S2	-	1,0	-
Pa_1_9450	B2AY05	3,0	4,0	3,0	Pa_2_6600	B2B636	1,0	-	-
Pa_2_11200	B2B7I2	10,0	7,0	9,0	Pa_3_10160	B2B1H7	1,0	-	-
Pa_2_13410	B2B859	1,0	1,0	1,0	Pa_3_1240	B2ACK1	-	1,0	-
Pa_2_3760	B2B577	1,0	1,0	1,0	Pa_3_2600	B2AZV9	-	-	4,0
Pa_2_7880	B2B6I4	3,0	4,0	1,0	Pa_3_5110	B2AZP5	-	1,0	-
Pa_2_9780	B2B736	3,0	7,0	6,0	Pa_3_6770	B2B0N8	1,0	-	-
Pa_3_10150	B2B1H6	10,0	10,0	10,0	Pa_3_6870	B2B0P8	1,0	-	-
Pa_3_10800	B2AD08	9,0	12,0	10,0	Pa_3_7700	B2B0Y1	-	-	1,0
Pa_3_7390	B2B0V0	1,0	1,0	1,0	Pa_3_7720	B2B0Y3	1,0	-	-
Pa_4_7630	B2ARF9	1,0	1,0	1,0	Pa_3_9670	B2B187	-	1,0	-
Pa_4_7790	B2ARE2	2,0	2,0	2,0	Pa_3_9750	B2B195	1,0	-	-
Pa_5_12810	B2AFG3	1,0	3,0	3,0	Pa_4_3858	B2AQK7	1,0	-	-
Pa_5_5390	Q875B8	2,0	2,0	2,0	Pa_4_4590	B2AQC7	1,0	-	-
Pa_6_4730	B2B1X0	1,0	1,0	1,0	Pa_4_9290	B2AQY4	1,0	-	-
Pa_6_5140	B2B209	6,0	7,0	7,0	Pa_4_9600	B2AQV2	-	1,0	-
Pa_6_5340	B2AVL3	1,0	1,0	1,0	Pa_4_9800	B2AE97	-	-	1,0
Pa_6_5350	B2B230	3,0	3,0	2,0	Pa_5_5080	Q86ZM8	-	1,0	-
Pa_6_5610	B2B256	4,0	2,0	3,0	Pa_5_5410	Q875B7	-	-	1,0
Pa_7_570	B2AP47	1,0	1,0	1,0	Pa_5_7650	B2AKM2	-	1,0	-
Pa_7_6980	B2AWF5	1,0	1,0	1,0	Pa_5_9310	B2AKY3	1,0	-	-
Pa_1_15350	B2ATC1	2,0	-	3,0	Pa_5_9750	B2AL63	1,0	-	-
Pa_1_20110	B2AUS3	3,0	-	2,0	Pa_6_240	B2B3E7	1,0	-	-
Pa_1_22220	B2AS38	1,0	1,0	-	Pa_6_310	B2B3E0	1,0	-	-
Pa_1_8820	B2AXU0	2,0	-	2,0	Pa_6_3170	B2B2H4	-	-	1,0
Pa_1_890	B2A9B3	1,0	-	1,0	Pa_6_3510	B2B2D7	-	-	2,0
Pa_2_12970	B2B815	-	1,0	1,0	Pa_6_4100	B2B1Q5	1,0	-	-
Pa_2_5130	B2B5M4	1,0	-	1,0	Pa_6_4720	B2B1W9	-	1,0	-
Pa_3_10790	B2AD09	-	1,0	1,0	Pa_6_4930	B2B1Z2	-	-	1,0
Pa_5_1240	B2AEX2	-	3,0	1,0	Pa_6_5480	B2B244	-	-	1,0
Pa_6_2570	B2B2N8	2,0	-	1,0	Pa_6_5560	B2B251	-	-	1,0
Pa_1_13540	B2ALR0	1,0	-	-	Pa_6_5830	B2B281	-	-	1,0
Pa_1_18200	B2AU76	-	1,0	-	Pa_6_6730	B2B3N0	-	1,0	-
Pa_1_1980	B2A9W1	1,0	-	-	Pa_6_8560	B2AN04	-	1,0	-
Pa_1_20760	B2ABI2	1,0	-	-	Pa_7_10630	B2AXI1	-	-	1,0
Pa_1_23200	B2ASE0	-	-	1,0	Pa_7_11340	B2AXQ4	-	-	1,0
Pa_1_23750	B2ASK1	1,0	-	-	Pa_7_1640	B2AVV8	1,0	-	-
Pa_1_3450	B2AAB2	-	-	1,0	Pa_7_3080	B2AVG0	1,0	-	-
Pa_1_6720	B2ABB1	-	-	1,0	Pa_7_500	B2AP57	-	1,0	-
Pa_2_10630	B2B7C4	1,0	-	-	Pa_7_7210	B2AWH7	-	-	1,0
Pa_2_1070	B2B4F1	-	1,0	-	Pa_7_8595	B2AWX3	1,0	-	-
Pa_2_11540	B2B7L7	1,0	-	-	Pa_mito_cox2	P20682	-	-	1,0
							59	48	57

Anhang

Tabelle S4 | **Übersicht aller Proteine, die im ersten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit beiden HsCLPP-Varianten spezifisch ko-aufgereinigt wurden.** Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID), seine Annotation (beide entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, sowie die Anzahl der im Durchschnit identifizierten einzigartigen Peptide (engl. „unique peptides“, UPs) des Proteins in der jeweiligen Probe ($\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$: WT UPs; $\Delta PaClpP/HsClpP^{S153A-L3F6H}$: TRAP UPs).

Pa_ID	Annotation	UniProt ID	WT UPs	TRAP UPs
Pa_6_5750	Putative Mitochondrial precursor of Heat shock protein 60	B2B270	28,0	20,3
Pa_2_9700	PaTOM70 mitochondrial precursor proteins import receptor encoded by the PaTom70 gene	B2B728	18,3	22,3
Pa_6_2570	Putative Mitochondrial of precursor Heat shock protein SSC1	B2B2N8	15,0	23,3
Pa_1_9290	Putative mitochondrial succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit precursor	B2AXY9	18,7	15,3
Pa_6_5610	Putative Mitochondrial precursor of ATP synthase subunit beta	B2B256	16,3	12,7
Pa_5_5970	Putative aconitate hydratase	B2VLF5	12,7	16,0
Pa_1_22300	Putative glycine dehydrogenase	B2AS46	11,7	14,3
Pa_6_5560	Putative Mitochondrial precursor of 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	B2B251	10,0	13,7
Pa_1_6520	Putative mitochondrial-processing peptidase subunit beta precursor	B2AB90	12,7	10,3
Pa_2_10580	Putative Mitochondrial import receptor subunit TOM40	B2B7B9	12,0	10,3
Pa_3_6780	citrate synthase mitochondrial precursor encoded by the cit1 gene	Q9HFI1	8,3	14,0
Pa_2_12010	Putative Elongation factor Tu, mitochondrial precursor	B2B7R7	10,0	10,0
Pa_3_11290	Putative Aspartate aminotransferase mitochondrial precursor	B2ACV8	8,3	10,3
Pa_3_10790	Putative Beta-lactamase hydrolase-like protein	B2AD09	9,0	9,3
Pa_1_13140	Putative carbamoyl-phosphate synthase arginine-specific large chain	B2ALX5	12,7	5,7
Pa_1_17280	Putative 2-methylcitrate dehydratase	B2ATX6	5,7	12,0
Pa_3_7700	Putative mitochondrial succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain precursor	B2B0Y1	9,3	8,3
Pa_6_4730	Putative Mitochondrial precursor of Cytochrome b-c1 complex subunit 2	B2B1X0	10,3	7,3
Pa_2_1050	Putative Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial recursor	B2B4E9	9,0	7,7
Pa_3_6450	Putative mitochondrial acetolactate synthase small subunit precursor	B2B064	9,3	7,0
Pa_3_11170	Putative Biotin synthase	B2ACX4	5,0	11,0
Pa_6_240	Putative Mitochondrial precursor of Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	B2B3E7	8,0	6,3
Pa_1_6960	Putative mitochondrial cytochrome c peroxidase precursor	B2ABD6	6,7	5,7
Pa_6_2730	Putative Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 2	B2B2M1	5,7	6,7
Pa_6_1590	Putative Mitochondrial precursor of Acetyl-CoA acetyltransferase	B2B2Z5	7,3	5,0
Pa_5_11920	Putative methylglutaconyl-CoA hydratase	B2AFL4	4,7	6,7
Pa_1_14630	Putative mitochondrial protein arg-6 precursor [Contains: N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase]	B2AT45	7,3	3,3
Pa_6_1920	Putative Mitochondrial import receptor subunit TOM20	B2B2W2	4,3	5,7
Pa_4_7010	Putative dehydrogenase	B2ARM6	5,3	4,3
Pa_3_2600	Putative Malate dehydrogenase	B2AZV9	2,7	6,7
Pa_1_3450	Putative D-arabinitol 2-dehydrogenase [ribulose-forming]	B2AAB2	3,7	4,7
Pa_3_1420	Putative ADH-cytochrome b5 reductase	B2ACM0	3,3	5,0
Pa_1_12550	Cytochrome c& encoded by the cyc1 gene	B2AYX5	4,7	3,0
Pa_1_15690	Putative homoserine O-acetyltransferase	B2ATF5	2,3	5,3
Pa_2_4980	Putative 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	B2B5L0	2,7	5,0
Pa_3_2310	Putative mitochondrial dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex precursor	B2B010	5,0	2,7
Pa_4_8600	Putative Branched-chain-amino-acid aminotransferase	B2AR54	3,3	4,0
Pa_3_6820	Putative type IIIA plasma membrane ATPase	B2B0P3	4,3	3,0
Pa_1_4450	Putative protein of unknown function	B2AAL7	4,3	2,7
Pa_2_6200	Putative glycine cleavage system H protein	B2B5Y8	3,3	3,7
Pa_3_3200	Putative Acetolactate synthase catalytic subunit, mitochondrial precursor	B2AZC0	3,3	3,7
Pa_2_12760	Putative Prohibitin-1	B2B7Z4	4,3	2,0
Pa_2_430	Putative cysteine desulfurase, mitochondrial precursor	B2B487	3,0	2,7
Pa_1_14430	Putative protein of unknown function	B2AT23	1,7	3,7
Pa_1_8920	Putative mitochondrial succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit precursor	B2AXV1	3,7	1,3
Pa_7_10210	ECHA mitochondrial enoyl-CoA hydratase precursor encoded by the echA gene	B2AXD7	1,3	3,7
Pa_7_5390	Putative external mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 precursor	B2AVZ3	3,0	1,7
Pa_1_6830	Putative phosphate carrier protein	B2ABC2	2,7	2,0
Pa_3_4170	Putative Lon protease, mitochondrial precursor	B2AZ54	2,7	2,0
Pa_3_9520	Putative mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA lyase precursor	B2B172	2,0	2,7
Pa_6_8740	PaTrx2 thioredoxin encoded by the Patrx2 gene	Q8TGH7	2,0	2,7
Pa_4_7160	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase	B2ARK6	2,3	2,0
Pa_1_17630	Putative mitochondrial ATP synthase subunit 4 precursor	B2AU12	3,0	1,3
Pa_2_10680	Putative Monothiol glutaredoxin-5, mitochondrial precursor	B2B7C9	1,3	3,0
Pa_4_660	Putative Serine hydroxymethyltransferase	B2ADB9	1,7	2,7
Pa_5_9750	Putative protein of unknown function	B2AL63	2,7	1,7
Pa_6_4750	Putative Mitochondrial carrier protein YHM1/SHM1	B2B1X2	2,3	1,7
Pa_1_4100	Putative protein of unknown function	B2AAI3	1,7	2,0
Pa_3_3470	Putative 10 kDa heat shock protein, mitochondrial	B2AZF0	1,3	2,3
Pa_5_5370	Putative dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase	B2VL95	1,7	2,0
Pa_6_6040	Putative GTP-binding protein	B2B2A3	2,3	1,3
Pa_6_6190	Putative Mitochondrial precursor Ferrochelatase	B2B2B8	1,7	1,7
Pa_3_10910	Putative Acetyl-CoA hydrolase	B2ACZ7	1,3	2,0
Pa_4_8840	Putative mitochondrial 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta precursor	B2AR28	1,3	1,7
Pa_1_7660	Putative mitochondrial methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating] precursor	B2A8W9	1,3	1,3

Tabelle S5 | **Übersicht aller Proteine, die im ersten CLPP „Substrat-trapping Assay“ nur mit HsCLPPL3F6H spezifisch ko-aufgereinigt wurden.** Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID), seine Annotation (beide entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, sowie die Anzahl der im Durchschnitt identifizierten einzigartigen Peptide (engl. „unique peptides“, UPs).

Pa_ID	Annotation	UniProt ID	UPs
Pa_1_6980	Putative prohibitin-2	B2ABD8	4,3
Pa_6_8420	SCDA mitochondrial precursor Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase encoded by the scdA gene	B2AMZ0	4,3
Pa_1_14370	Putative mitochondrial ATP synthase D chain	B2AT17	3,0
Pa_2_3290	Putative calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	B2B523	3,0
Pa_3_8090	Putative mitochondrial ATP synthase subunit 5 precursor	B2B122	2,7
Pa_1_1980	Putative succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	B2A9W1	2,7
Pa_5_8240	Putative peroxisomal membrane protein (PMP20) prx5-like peroxiredoxin	B2AKR1	2,7
Pa_1_4520	Putative mitochondrial heat shock protein 78 precursor	B2AAM4	2,0
Pa_4_6250	Putative 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	B2APU5	2,0
Pa_7_9950	Putative D-lactate dehydrogenase [cytochrome] 2, mitochondrial precursor	B2AXB1	2,0
Pa_1_24160	Putative mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit F Atp17	B2ASP1	1,7
Pa_1_7770	Putative protein of unknown function	B2A8Y0	1,7
Pa_2_5010	Putative mitochondrial respiratory chain complexes assembly protein	B2B5L3	1,7
Pa_6_5480	cytochrome c oxidase polypeptide 5 encoded by the cox5 gene	B2B244	1,7
Pa_1_8620	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit	B2A972	1,3
Pa_2_2290	Putative dynamin-like GTPase, mitochondrial precursor	B2B4S5	1,3
Pa_5_7380	Putative protein of unknown function	B2AMA8	1,3
Pa_mito_cox2	Cytochrome c oxidase subunit 2	P20682	1,3

Tabelle S6 | **Übersicht aller Proteine, die im ersten CLPP „Substrat-trapping Assay“ nur mit HsCLPPS153A-L3F6H spezifisch ko-aufgereinigt wurden.** Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID), seine Annotation (beide entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, sowie die Anzahl der im Durchschnitt identifizierten einzigartigen Peptide (engl. „unique peptides“, UPs).

Pa_ID	Annotation	UniProt ID	UPs
Pa_3_4870	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase 78 kDa subunit mitochondrial precursor	B2AZM0	10,7
Pa_6_1640	Putative Mitochondrial precursor of Carbamoyl-phosphate synthase arginine-specific small chain	B2B2Z0	7,3
Pa_6_10000	Putative Mitochondrial precursor of 2-methylcitrate synthase	B2ANA5	6,0
Pa_7_6790	Putative carboxypeptidase Y precursor	B2AWD5	5,3
Pa_1_13750	Putative aminomethyltransferase	B2ALS4	3,7
Pa_5_9670	Putative mitochondrial hexaprenyl pyrophosphate synthetase precursor	B2AL19	2,7
Pa_4_7950	Putative mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit precursor	B2ARC6	2,3
Pa_5_8230	Putative succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	B2AKR0	2,0
Pa_1_6330	Putative mitochondrial elongation factor G precursor	B2AB71	1,7
Pa_5_1740	Putative superoxide dismutase [Mn]	B2AER6	1,7
Pa_5_2590	Putative protein of unknown function	B2AEH2	1,7
Pa_5_5810	Putative dihydrolipoyl dehydrogenase, E3 subunit of pyruvate dehydrogenase	B2VLD9	1,7
Pa_7_7700	Putative 4-aminobutyrate aminotransferase	B2AWM8	1,7
Pa_1_19320	Putative mitochondrial fumarate hydratase precursor	B2AUJ3	1,3
Pa_2_4110	Putative protein of unknown function	B2B5B2	1,3
Pa_3_4750	Putative protein of unknown function	B2AZK8	1,3
Pa_4_460	Putative Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	B2AD94	1,3
Pa_5_8550	Putative mitochondrial acidic protein MAM33	B2AL32	1,3

Anhang

Tabelle S7 | **Übersicht aller im zweiten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit HsCLPP1^{3F6H} ko-aufgereinigten Proteine.** Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID, entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, sowie die Anzahl der identifizierten einzigartigen Peptide (engl. „unique peptides“, UPs) des Proteins im jeweiligen biologischen Replikat (bRep). Die Proteine sind aufsteigend nach ihrer Pa_ID gelistet, wobei zunächst alle Proteine aufgeführt werden, die in allen drei biologischen Replikaten vorkommen, dann alle Proteine, die in zwei biologischen Replikaten vorkommen und zum Schluss die Proteine, welche nur in einem biologischen Replikat gefunden wurden. Am Ende der Tabelle ist in **fett** die Gesamtzahl der individuellen Proteine im jeweiligen biologischen Replikat genannt.

Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups	Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups
Pa_1_10210	B2AY83	1,0	1,0	1,0	Pa_1_19320	B2AUJ3	-	1,0	2,0
Pa_1_13140	B2ALX5	2,0	7,0	5,0	Pa_1_1980	B2A9W1	-	2,0	2,0
Pa_1_13390	B2AM00	5,0	1,0	4,0	Pa_1_4100	B2AAI3	2,0	-	2,0
Pa_1_14370	B2AT17	2,0	2,0	4,0	Pa_1_6520	B2AB90	2,0	-	2,0
Pa_1_14630	B2AT45	2,0	3,0	4,0	Pa_1_6960	B2ABD6	2,0	-	2,0
Pa_1_17000	B2ATU6	1,0	6,0	7,0	Pa_1_7660	B2A8W9	-	3,0	2,0
Pa_1_17280	B2ATX6	1,0	6,0	3,0	Pa_2_12660	B2B7Y4	-	1,0	1,0
Pa_1_17630	B2AU12	4,0	2,0	6,0	Pa_2_12760	B2B7Z4	1,0	-	4,0
Pa_1_19590	B2AUM2	1,0	2,0	4,0	Pa_2_12970	B2B815	2,0	-	1,0
Pa_1_19720	Q01520	1,0	2,0	1,0	Pa_2_13410	B2B859	1,0	1,0	-
Pa_1_20110	B2AUS3	1,0	1,0	2,0	Pa_2_1420	B2B4I7	-	2,0	3,0
Pa_1_22300	B2AS46	9,0	13,0	14,0	Pa_2_2670	B2B4W2	1,0	-	1,0
Pa_1_3450	B2AAB2	4,0	4,0	4,0	Pa_2_4980	B2B5L0	-	2,0	4,0
Pa_1_3970	B2AAG9	1,0	1,0	1,0	Pa_2_5010	B2B5L3	-	1,0	1,0
Pa_1_4450	B2AAL7	1,0	1,0	1,0	Pa_3_10910	B2ACZ7	-	5,0	4,0
Pa_1_5850	B2AB15	6,0	11,0	10,0	Pa_3_11310	B2ACV6	-	2,0	6,0
Pa_1_6980	B2ABD8	1,0	1,0	3,0	Pa_3_2600	B2AZV9	-	3,0	3,0
Pa_1_7770	B2A8Y0	1,0	2,0	6,0	Pa_3_4100	B2AZ47	-	1,0	2,0
Pa_1_8390	B2A947	16,0	14,0	17,0	Pa_3_4170	B2AZ54	-	1,0	2,0
Pa_1_8620	B2A972	1,0	2,0	3,0	Pa_3_4870	B2AZM0	3,0	-	8,0
Pa_1_9290	B2AXY9	6,0	6,0	11,0	Pa_3_5815	B2B0L1	-	1,0	1,0
Pa_1_9450	B2AY05	2,0	2,0	4,0	Pa_3_6770	B2B0N8	-	1,0	2,0
Pa_2_1050	B2B4E9	2,0	6,0	9,0	Pa_3_7700	B2B0Y1	-	6,0	7,0
Pa_2_10580	B2B7B9	12,0	9,0	6,0	Pa_3_8780	B2B1B1	1,0	-	2,0
Pa_2_11540	B2B7L7	2,0	2,0	4,0	Pa_4_150	B2AD57	-	2,0	1,0
Pa_2_12010	B2B7R7	6,0	9,0	11,0	Pa_4_3040	B2AE70	-	1,0	4,0
Pa_2_12340	B2B7V0	1,0	1,0	2,0	Pa_4_5910	B2APY0	-	1,0	2,0
Pa_2_430	B2B487	1,0	3,0	3,0	Pa_4_660	B2ADB9	-	1,0	3,0
Pa_2_6200	B2B5Y8	1,0	3,0	3,0	Pa_4_7010	B2ARM6	-	4,0	5,0
Pa_2_9700	B2B728	14,0	9,0	20,0	Pa_4_7790	B2ARE2	-	1,0	1,0
Pa_2_9780	B2B736	10,0	6,0	11,0	Pa_4_7950	B2ARC6	1,0	-	1,0
Pa_3_10150	B2B1H6	9,0	10,0	11,0	Pa_4_8840	B2AR28	-	1,0	2,0
Pa_3_10790	B2AD09	8,0	12,0	14,0	Pa_5_5190	Q875D2	-	1,0	2,0
Pa_3_10800	B2AD08	18,0	12,0	18,0	Pa_5_5580	B2VLB6	-	1,0	2,0
Pa_3_11170	B2ACX4	2,0	1,0	5,0	Pa_5_8240	B2AKR1	-	3,0	3,0
Pa_3_11290	B2ACV8	4,0	12,0	10,0	Pa_5_9750	B2AL63	1,0	-	2,0
Pa_3_1420	B2ACM0	3,0	2,0	1,0	Pa_6_10000	B2ANAS	-	6,0	5,0
Pa_3_2310	B2B010	6,0	4,0	10,0	Pa_6_10010	B2ANA6	-	1,0	1,0
Pa_3_3200	B2AZC0	2,0	2,0	2,0	Pa_6_240	B2B3E7	3,0	-	1,0
Pa_3_6450	B2B064	4,0	5,0	6,0	Pa_6_5560	B2B251	-	2,0	1,0
Pa_3_6780	Q9HFI1	5,0	8,0	9,0	Pa_6_6040	B2B2A3	2,0	1,0	-
Pa_3_6870	B2B0P8	1,0	1,0	2,0	Pa_6_6190	B2B2B8	-	1,0	1,0
Pa_3_7390	B2B0V0	1,0	1,0	1,0	Pa_7_10210	B2AXD7	-	2,0	2,0
Pa_3_8090	B2B122	4,0	2,0	3,0	Pa_7_11550	B2AXS5	-	1,0	1,0
Pa_3_9080	B2B1E3	1,0	1,0	2,0	Pa_7_2170	B2AVQ2	1,0	-	2,0
Pa_3_9430	B2B162	1,0	3,0	1,0	Pa_7_2690	B2AVJ9	-	1,0	1,0
Pa_4_1130	B2ADH4	3,0	3,0	1,0	Pa_7_4870	B2AUW6	-	1,0	2,0
Pa_4_7160	B2ARK6	1,0	2,0	3,0	Pa_7_6480	B2AWA3	1,0	-	2,0
Pa_4_8600	B2AR54	1,0	4,0	4,0	Pa_7_7700	B2AWM8	-	2,0	1,0
Pa_5_11920	B2AFL4	2,0	8,0	7,0	Pa_7_8595	B2AWX3	-	1,0	2,0
Pa_5_5370	B2VL95	1,0	2,0	1,0	Pa_7_9520	B2AX70	2,0	-	1,0
Pa_5_5380	B2VL96	1,0	1,0	1,0	Pa_7_9830	B2AXA0	-	1,0	1,0
Pa_5_5970	B2VLF5	4,0	13,0	13,0	Pa_0_1350	B2AFW3	-	1,0	-
Pa_5_7500	B2AMC3	1,0	1,0	2,0	Pa_0_1600	B2AFB2	-	-	1,0
Pa_5_9300	B2AKY2	1,0	1,0	1,0	Pa_1_13750	B2ALS4	-	3,0	-
Pa_6_1590	B2B2Z5	6,0	8,0	10,0	Pa_1_1530	B2A9R4	-	-	1,0
Pa_6_1920	B2B2W2	5,0	3,0	1,0	Pa_1_16650	B2ATQ8	-	-	1,0
Pa_6_2570	B2B2N8	23,0	24,0	34,0	Pa_1_18430	B2AUAO	-	-	1,0
Pa_6_2730	B2B2M1	4,0	9,0	9,0	Pa_1_19670	B2AUN0	-	-	1,0
Pa_6_3510	B2B2D7	1,0	3,0	8,0	Pa_1_20100	B2AUS2	-	1,0	-
Pa_6_4730	B2B1X0	7,0	5,0	6,0	Pa_1_20570	B2ABG3	-	1,0	-
Pa_6_5140	B2B209	7,0	5,0	8,0	Pa_1_24160	B2ASP1	-	-	1,0
Pa_6_5480	B2B244	1,0	1,0	2,0	Pa_1_24170	B2ASP2	-	-	2,0
Pa_6_5610	B2B256	17,0	8,0	15,0	Pa_1_6830	B2ABC2	-	-	3,0
Pa_6_5750	B2B270	21,0	11,0	18,0	Pa_1_7895	B2A8Z3	-	-	1,0
Pa_6_8420	B2AMZ0	2,0	1,0	4,0	Pa_1_8920	B2AXV1	-	-	1,0
Pa_6_8690	B2AN17	11,0	7,0	8,0	Pa_1_9080	B2AXW8	-	-	1,0
Pa_6_8740	Q8TGH7	2,0	2,0	2,0	Pa_2_10610	B2B7C2	-	1,0	-
Pa_7_570	B2AP47	1,0	2,0	4,0	Pa_2_10650	B2B7C6	-	-	1,0
Pa_mito_cox2	P20682	1,0	1,0	1,0	Pa_2_10680	B2B7C9	-	1,0	-
Pa_1_12550	B2AYX5	2,0	-	2,0	Pa_2_10880	B2B7F0	1,0	-	-
Pa_1_15690	B2ATF5	2,0	-	4,0	Pa_2_11850	B2B7Q1	-	-	1,0
Pa_1_16630	B2ATQ6	1,0	-	1,0	Pa_2_12750	B2B7Z3	1,0	-	-

Anhang

Pa_2_4110	B2B5B2	-	-	1,0	Pa_4_6250	B2APU5	1,0	-	-
Pa_2_4680	B2B5H3	-	1,0	-	Pa_5_1240	B2AEX2	-	-	1,0
Pa_2_4710	B2B5H6	-	-	1,0	Pa_5_12810	B2AFG3	-	1,0	-
Pa_2_5030	B2B5L5	-	1,0	-	Pa_5_13020	B2AFE0	-	-	1,0
Pa_2_5970	B2B5W4	-	1,0	-	Pa_5_5310	Q875C2	-	-	1,0
Pa_2_6510	B2B627	-	-	1,0	Pa_5_6010	B2VLF9	-	-	1,0
Pa_2_6600	B2B636	1,0	-	-	Pa_5_7380	B2AMA8	1,0	-	-
Pa_2_7520	B2B6E0	-	-	1,0	Pa_5_7510	B2AMC4	-	-	1,0
Pa_3_3070	B2AZA6	-	-	1,0	Pa_5_8550	B2AL32	1,0	-	-
Pa_3_3280	B2AZD1	-	1,0	-	Pa_5_9940	B2AL90	-	-	1,0
Pa_3_3650	B2AZG8	-	-	1,0	Pa_6_1640	B2B2Z0	1,0	-	-
Pa_3_3765	A0A090CFP7	-	-	1,0	Pa_6_4720	B2B1W9	-	-	1,0
Pa_3_5750	B2B0K3	-	-	1,0	Pa_6_4750	B2B1X2	-	-	1,0
Pa_3_6150	B2B032	-	1,0	-	Pa_6_9410	B2AN67	-	-	1,0
Pa_3_6320	B2B051	-	-	1,0	Pa_7_2200	B2AVP8	-	-	1,0
Pa_3_6820	B2B0P3	-	-	1,0	Pa_7_2370	B2AVN1	-	-	1,0
Pa_3_6950	B2B0Q6	-	-	1,0	Pa_7_350	B2AP95	-	1,0	-
Pa_3_7060	B2B0R6	-	-	1,0	Pa_7_5140	B2AVW9	-	-	1,0
Pa_3_7690	B2B0Y0	-	-	1,0	Pa_7_5390	B2AVZ3	-	-	2,0
Pa_3_8970	B2B1E1	-	-	1,0	Pa_7_6660	B2AWC1	-	-	1,0
Pa_3_9030	B2B1D5	-	-	1,0	Pa_7_9950	B2AXB1	-	-	1,0
							96	121	166

Anhang

Tabelle S8 | Übersicht aller im zweiten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit HsCLPPS153A-L3F6H ko-aufgereinigten Proteine. Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID, entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, sowie die Anzahl der identifizierten einzigartigen Peptide (engl. „unique peptides“, UPs) des Proteins im jeweiligen biologischen Replikat (bRep). Die Proteine sind aufsteigend nach ihrer Pa_ID gelistet, wobei zunächst alle Proteine aufgeführt werden, die in allen drei biologischen Replikaten vorkommen, dann alle Proteine, die in zwei biologischen Replikaten vorkommen und zum Schluss die Proteine, welche nur in einem biologischen Replikat gefunden wurden. Am Ende der Tabelle ist in fett die Gesamtzahl der individuellen Proteine im jeweiligen biologischen Replikat genannt.

Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups	Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups
Pa_1_12550	B2AYX5	2,0	1,0	1,0	Pa_5_5380	B2VL96	1,0	1,0	1,0
Pa_1_13140	B2ALX5	2,0	9,0	8,0	Pa_5_5810	B2VLD9	2,0	1,0	4,0
Pa_1_13390	B2AM00	6,0	4,0	3,0	Pa_5_5970	B2VLF5	9,0	8,0	10,0
Pa_1_13750	B2ALS4	4,0	2,0	2,0	Pa_5_7500	B2AMC3	2,0	1,0	2,0
Pa_1_14370	B2AT17	3,0	2,0	2,0	Pa_5_8240	B2AKR1	1,0	3,0	4,0
Pa_1_14430	B2AT23	1,0	1,0	1,0	Pa_5_9300	B2AKY2	1,0	1,0	1,0
Pa_1_14630	B2AT45	3,0	8,0	8,0	Pa_5_9670	B2AL19	3,0	3,0	4,0
Pa_1_15690	B2ATF5	5,0	2,0	4,0	Pa_6_10000	B2ANA5	6,0	4,0	5,0
Pa_1_17000	B2ATU6	2,0	4,0	7,0	Pa_6_1590	B2B2Z5	7,0	6,0	8,0
Pa_1_17280	B2ATX6	6,0	6,0	3,0	Pa_6_1640	B2B2Z0	7,0	4,0	12,0
Pa_1_17630	B2AU12	4,0	2,0	3,0	Pa_6_1920	B2B2W2	5,0	2,0	1,0
Pa_1_18430	B2AUA0	3,0	1,0	4,0	Pa_6_2570	B2B2N8	32,0	24,0	29,0
Pa_1_19320	B2AUJ3	1,0	1,0	1,0	Pa_6_2730	B2B2M1	5,0	7,0	7,0
Pa_1_19590	B2AUM2	1,0	3,0	3,0	Pa_6_3510	B2B2D7	1,0	5,0	7,0
Pa_1_19670	B2AUN0	1,0	1,0	1,0	Pa_6_4730	B2B1X0	9,0	1,0	2,0
Pa_1_19720	Q01520	1,0	2,0	1,0	Pa_6_5140	B2B209	6,0	6,0	6,0
Pa_1_1980	B2A9W1	1,0	1,0	3,0	Pa_6_5480	B2B244	3,0	1,0	1,0
Pa_1_20100	B2AUS2	2,0	1,0	1,0	Pa_6_5510	B2B246	3,0	7,0	12,0
Pa_1_20570	B2ABG3	1,0	1,0	1,0	Pa_6_5560	B2B251	13,0	20,0	14,0
Pa_1_22300	B2AS46	13,0	17,0	16,0	Pa_6_5590	B2B254	3,0	3,0	5,0
Pa_1_3450	B2AAB2	7,0	5,0	6,0	Pa_6_5610	B2B256	21,0	13,0	10,0
Pa_1_5850	B2AB15	5,0	11,0	9,0	Pa_6_5750	B2B270	17,0	11,0	13,0
Pa_1_6330	B2AB71	1,0	2,0	2,0	Pa_6_8420	B2AMZ0	4,0	3,0	5,0
Pa_1_6830	B2ABC2	1,0	1,0	1,0	Pa_6_8690	B2AN17	2,0	4,0	5,0
Pa_1_7660	B2ABW9	2,0	1,0	1,0	Pa_6_8740	Q8TGH7	3,0	2,0	2,0
Pa_1_7770	B2A8Y0	2,0	2,0	3,0	Pa_7_10050	B2AXC0	5,0	2,0	5,0
Pa_1_8390	B2A947	12,0	11,0	15,0	Pa_7_10210	B2AXD7	3,0	1,0	5,0
Pa_1_8620	B2A972	2,0	2,0	1,0	Pa_7_11550	B2AXS5	1,0	1,0	1,0
Pa_1_9080	B2AXW8	1,0	1,0	1,0	Pa_7_2170	B2AVQ2	1,0	2,0	1,0
Pa_1_9290	B2AXY9	6,0	6,0	8,0	Pa_7_4530	B2AV02	1,0	1,0	1,0
Pa_1_9450	B2AY05	3,0	2,0	2,0	Pa_7_570	B2AP47	3,0	2,0	4,0
Pa_2_1050	B2B4E9	3,0	2,0	8,0	Pa_7_9520	B2AX70	8,0	5,0	9,0
Pa_2_10580	B2B7B9	10,0	12,0	6,0	Pa_mito_cox2	P20682	1,0	2,0	1,0
Pa_2_10680	B2B7C9	3,0	1,0	2,0	Pa_1_10210	B2AY83	-	2,0	1,0
Pa_2_11540	B2B7L7	4,0	2,0	4,0	Pa_1_14290	B2AM52	-	1,0	1,0
Pa_2_12010	B2B7R7	9,0	10,0	11,0	Pa_1_15800	B2ATG7	5,0	-	1,0
Pa_2_12340	B2B7V0	1,0	1,0	1,0	Pa_1_24160	B2ASP1	1,0	-	1,0
Pa_2_12760	B2B7Z4	1,0	2,0	1,0	Pa_1_4100	B2AAI3	-	1,0	1,0
Pa_2_430	B2B487	2,0	4,0	4,0	Pa_1_4450	B2AAL7	-	2,0	1,0
Pa_2_4980	B2B5L0	4,0	2,0	4,0	Pa_1_6520	B2AB90	1,0	-	1,0
Pa_2_6200	B2B5Y8	5,0	5,0	5,0	Pa_1_6980	B2ABD8	1,0	3,0	-
Pa_2_9700	B2B7Z8	17,0	12,0	17,0	Pa_1_7895	B2A8Z3	1,0	-	2,0
Pa_2_9780	B2B736	10,0	7,0	8,0	Pa_1_9500	B2AY10	-	1,0	2,0
Pa_3_10150	B2B1H6	7,0	11,0	10,0	Pa_2_11200	B2B7I2	1,0	-	1,0
Pa_3_10790	B2AD09	13,0	12,0	14,0	Pa_2_12660	B2B7Y4	-	1,0	1,0
Pa_3_10800	B2AD08	22,0	15,0	19,0	Pa_2_12970	B2B8I5	2,0	1,0	-
Pa_3_10910	B2ACZ7	3,0	4,0	3,0	Pa_2_13410	B2B859	-	1,0	1,0
Pa_3_11170	B2ACX4	9,0	9,0	14,0	Pa_2_1420	B2B4I7	-	1,0	4,0
Pa_3_11290	B2ACV8	8,0	10,0	10,0	Pa_2_4710	B2B5H6	1,0	-	1,0
Pa_3_1420	B2ACM0	3,0	2,0	1,0	Pa_3_4750	B2AZK8	-	1,0	1,0
Pa_3_2310	B2B010	14,0	10,0	12,0	Pa_3_6770	B2B0N8	-	2,0	1,0
Pa_3_2600	B2AZV9	8,0	3,0	5,0	Pa_3_9110	B2B130	2,0	-	1,0
Pa_3_3200	B2AZC0	1,0	6,0	4,0	Pa_3_9520	B2B172	2,0	2,0	-
Pa_3_4170	B2AZ54	1,0	1,0	1,0	Pa_4_150	B2AD57	-	2,0	2,0
Pa_3_4870	B2AZM0	19,0	24,0	20,0	Pa_4_3040	B2AE70	-	3,0	2,0
Pa_3_6450	B2B064	2,0	3,0	6,0	Pa_4_5910	B2APY0	1,0	1,0	-
Pa_3_6780	Q9HF11	17,0	14,0	11,0	Pa_4_8840	B2AR28	-	2,0	1,0
Pa_3_6870	B2B0P8	1,0	2,0	1,0	Pa_5_1740	B2AER6	1,0	-	2,0
Pa_3_7390	B2B0V0	1,0	1,0	1,0	Pa_5_5580	B2VLB6	-	1,0	2,0
Pa_3_7700	B2BOY1	6,0	9,0	8,0	Pa_5_8230	B2AKR0	1,0	-	1,0
Pa_3_8090	B2B122	3,0	3,0	2,0	Pa_5_8550	B2AL32	2,0	-	1,0
Pa_3_9080	B2B1E3	1,0	1,0	3,0	Pa_6_240	B2B3E7	3,0	1,0	-
Pa_3_9430	B2B162	1,0	6,0	2,0	Pa_6_4750	B2B1X2	1,0	-	1,0
Pa_4_1130	B2ADH4	2,0	2,0	3,0	Pa_6_6040	B2B2A3	-	1,0	1,0
Pa_4_660	B2ADB9	2,0	1,0	1,0	Pa_7_6480	B2AWA3	-	1,0	3,0
Pa_4_7010	B2ARM6	5,0	2,0	4,0	Pa_7_7700	B2AWM8	1,0	-	1,0
Pa_4_7160	B2ARK6	4,0	6,0	4,0	Pa_7_8595	B2AWX3	-	1,0	2,0
Pa_4_7950	B2ARC6	4,0	3,0	4,0	Pa_0_1030	B2ABT2	-	-	5,0
Pa_4_8600	B2AR54	2,0	5,0	2,0	Pa_0_1350	B2AFW3	1,0	-	-
Pa_5_11920	B2AFL4	5,0	5,0	5,0	Pa_1_12770	B2AYZ7	-	1,0	-
Pa_5_2590	B2AEH2	1,0	2,0	2,0	Pa_1_13900	B2AM12	-	-	2,0
Pa_5_5190	Q875D2	1,0	1,0	2,0	Pa_1_14540	B2AT34	-	3,0	-
Pa_5_5370	B2VL95	3,0	4,0	8,0	Pa_1_16630	B2ATQ6	1,0	-	-

Anhang

Pa_1_17250	B2ATX2	-	1,0	-	Pa_3_5750	B2B0K3	-	-	1,0
Pa_1_18470	B2AUA4	1,0	-	-	Pa_3_5815	B2B0L1	-	1,0	-
Pa_1_1880	B2A9V1	-	1,0	-	Pa_3_5960	B2B0J2	-	-	1,0
Pa_1_20110	B2AUS3	-	1,0	-	Pa_3_9400	B2B159	1,0	-	-
Pa_1_21300	B2ABM0	-	1,0	-	Pa_3_9470	B2B166	-	-	1,0
Pa_1_2160	B2A9Y0	-	-	2,0	Pa_4_3610	B2AQN7	-	-	1,0
Pa_1_3920	B2AAG4	-	-	1,0	Pa_4_3858	B2AQK7	1,0	-	-
Pa_1_3970	B2AAG9	-	-	1,0	Pa_4_460	B2AD94	-	-	2,0
Pa_1_6120	B2AB49	-	1,0	-	Pa_4_6250	B2APU5	1,0	-	-
Pa_1_6960	B2ABD6	2,0	-	-	Pa_4_7790	B2ARE2	-	1,0	-
Pa_1_8260	B2A932	-	1,0	-	Pa_5_410	B2AF64	1,0	-	-
Pa_2_10880	B2B7F0	1,0	-	-	Pa_6_6190	B2B2B8	-	-	1,0
Pa_2_11180	B2B7I0	-	1,0	-	Pa_6_6850	B2B3P4	-	-	2,0
Pa_2_12750	B2B7Z3	1,0	-	-	Pa_6_8800	B2AN29	-	-	1,0
Pa_2_13170	B2B835	1,0	-	-	Pa_7_2200	B2AVP8	-	-	1,0
Pa_2_4110	B2B5B2	-	-	2,0	Pa_7_2690	B2AVJ9	-	1,0	-
Pa_2_5010	B2B5L3	-	1,0	-	Pa_7_350	B2AP95	-	-	1,0
Pa_2_8880	B2B6T8	-	1,0	-	Pa_7_4870	B2AUW6	-	-	3,0
Pa_2_9080	B2B6W1	-	-	1,0	Pa_7_5390	B2AVZ3	-	1,0	-
Pa_3_10020	B2B1G1	-	-	1,0	Pa_7_5590	B2AW14	-	-	1,0
Pa_3_11310	B2ACV6	-	-	6,0	Pa_7_5810	B2AW35	-	-	1,0
Pa_3_3170	B2AZB7	-	-	1,0	Pa_7_5900	B2AW44	1,0	-	-
Pa_3_3765	A0A090CFP7	-	1,0	-	Pa_7_6660	B2AWC1	-	-	1,0
Pa_3_4030	B2AZ40	-	-	1,0	Pa_7_9450	B2AXG3	1,0	-	-
Pa_3_4100	B2AZ47	-	1,0	-	Pa_7_9830	B2AXA0	-	-	1,0
Pa_3_4270	B2AZ64	-	1,0	-	Pa_7_9950	B2AXB1	-	-	1,0
					136 146 162				

Anhang

Tabelle S9 | Übersicht aller im zweiten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ in der Hintergrundkontrolle identifizierten Proteine. Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID, entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, sowie die Anzahl der identifizierten einzigartigen Peptide (engl. „unique peptides“, UPs) des Proteins im jeweiligen biologischen Replikat (bRep). Die Proteine sind aufsteigend nach ihrer Pa_ID gelistet, wobei zunächst alle Proteine aufgeführt werden, die in allen drei biologischen Replikaten vorkommen, dann alle Proteine, die in zwei biologischen Replikaten vorkommen und zum Schluss die Proteine, welche nur in einem biologischen Replikat gefunden wurden. Am Ende der Tabelle ist in fett die Gesamtzahl der individuellen Proteine im jeweiligen biologischen Replikat genannt.

Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups	Pa_ID	UniProt ID	bRep1 Ups	bRep2 Ups	bRep3 Ups
Pa_1_13340	Q8WZP5	1,0	1,0	1,0	Pa_1_16950	B2ATU0	-	-	1,0
Pa_1_17000	B2ATU6	2,0	4,0	3,0	Pa_1_1880	B2A9V1	-	-	1,0
Pa_1_19590	B2AUM2	1,0	1,0	2,0	Pa_1_20110	B2AUS3	-	-	1,0
Pa_1_5850	B2AB15	8,0	6,0	6,0	Pa_1_20570	B2ABG3	1,0	-	-
Pa_1_7770	B2A8Y0	2,0	1,0	4,0	Pa_1_2160	B2A9Y0	-	-	1,0
Pa_1_8390	B2A947	14,0	10,0	15,0	Pa_1_22280	B2AS44	1,0	-	-
Pa_1_9290	B2AXY9	6,0	5,0	6,0	Pa_1_3450	B2AAB2	-	-	1,0
Pa_1_9450	B2AY05	2,0	2,0	2,0	Pa_1_3970	B2AAG9	-	-	1,0
Pa_2_11540	B2B7L7	5,0	2,0	1,0	Pa_1_4100	B2AAI3	1,0	-	-
Pa_2_12010	B2B7R7	3,0	1,0	1,0	Pa_1_6360	B2AB74	1,0	-	-
Pa_2_12340	B2B7V0	1,0	1,0	1,0	Pa_1_6830	B2ABC2	1,0	-	-
Pa_2_1420	B2B4I7	2,0	2,0	6,0	Pa_1_6960	B2ABD6	3,0	-	-
Pa_2_9780	B2B736	10,0	7,0	6,0	Pa_1_7990	B2A903	1,0	-	-
Pa_3_10150	B2B1H6	8,0	9,0	10,0	Pa_1_8620	B2A972	2,0	-	-
Pa_3_10800	B2AD08	19,0	12,0	11,0	Pa_1_8920	B2AXV1	1,0	-	-
Pa_3_3200	B2AZC0	5,0	1,0	3,0	Pa_1_9080	B2AXW8	1,0	-	-
Pa_3_4870	B2AZM0	6,0	1,0	1,0	Pa_2_12210	B2B7T7	1,0	-	-
Pa_3_6870	B2B0P8	1,0	1,0	1,0	Pa_2_12660	B2B7Y4	2,0	-	-
Pa_3_7390	B2B0V0	1,0	1,0	1,0	Pa_2_12750	B2B7Z3	1,0	-	-
Pa_3_8090	B2B122	5,0	1,0	2,0	Pa_2_12760	B2B7Z4	2,0	-	-
Pa_3_9080	B2B1E3	1,0	1,0	2,0	Pa_2_12970	B2B815	1,0	-	-
Pa_5_5380	B2VL96	1,0	1,0	1,0	Pa_2_13410	B2B859	1,0	-	-
Pa_5_9300	B2AKY2	1,0	1,0	1,0	Pa_2_3290	B2B523	4,0	-	-
Pa_6_2570	B2B2N8	1,0	3,0	3,0	Pa_2_4110	B2B5B2	-	-	2,0
Pa_6_3510	B2B2D7	2,0	2,0	2,0	Pa_2_5010	B2B5L3	1,0	-	-
Pa_6_4730	B2B1X0	9,0	1,0	2,0	Pa_2_6600	B2B636	1,0	-	-
Pa_6_5140	B2B209	5,0	5,0	8,0	Pa_2_8680	B2B653	-	-	1,0
Pa_6_5480	B2B244	3,0	1,0	1,0	Pa_3_10020	B2B1G1	-	-	1,0
Pa_6_5610	B2B256	19,0	5,0	2,0	Pa_3_1400	B2ACL8	-	-	1,0
Pa_6_8690	B2AN17	13,0	2,0	7,0	Pa_3_2310	B2B010	3,0	-	-
Pa_7_570	B2AP47	3,0	1,0	3,0	Pa_3_4650	B2AZJ8	-	-	1,0
Pa_7_8595	B2AWX3	2,0	1,0	1,0	Pa_3_5380	B2B0E2	-	-	1,0
Pa_mito_cox2	P20682	1,0	1,0	1,0	Pa_3_5750	B2B0K3	-	-	1,0
Pa_1_10210	B2AY83	2,0	-	1,0	Pa_3_5870	B2B0I1	-	-	1,0
Pa_1_12550	B2AYX5	2,0	-	1,0	Pa_3_7700	B2B0V1	-	-	2,0
Pa_1_13390	B2AM00	8,0	-	1,0	Pa_3_8780	B2B1B1	2,0	-	-
Pa_1_17630	B2AU12	4,0	-	2,0	Pa_3_9430	B2B162	-	-	1,0
Pa_1_19720	Q01520	1,0	2,0	-	Pa_3_9970	B2B1F6	-	1,0	-
Pa_1_4450	B2AAL7	2,0	1,0	-	Pa_4_3040	B2AE70	1,0	-	-
Pa_1_6520	B2AB90	5,0	-	1,0	Pa_4_3858	B2AQK7	-	1,0	-
Pa_1_6980	B2ABD8	2,0	2,0	-	Pa_4_570	B2ADA8	-	1,0	-
Pa_2_11200	B2B7I2	-	2,0	1,0	Pa_4_6250	B2APU5	1,0	-	-
Pa_2_4980	B2B5L0	-	1,0	1,0	Pa_4_660	B2ADB9	1,0	-	-
Pa_3_10790	B2AD09	2,0	-	2,0	Pa_4_7010	B2ARM6	-	-	1,0
Pa_3_11310	B2ACV6	-	2,0	4,0	Pa_4_7160	B2ARK6	1,0	-	-
Pa_3_4100	B2AZ47	2,0	1,0	-	Pa_4_7950	B2ARC6	1,0	-	-
Pa_3_6450	B2B064	1,0	-	4,0	Pa_5_11200	B2APQ8	1,0	-	-
Pa_3_6770	B2B0N8	1,0	-	1,0	Pa_5_1240	B2AEX2	2,0	-	-
Pa_4_5910	B2APY0	3,0	-	1,0	Pa_5_13020	B2AFE0	2,0	-	-
Pa_4_7790	B2ARE2	-	1,0	1,0	Pa_5_5580	B2VLB6	-	1,0	-
Pa_5_6010	B2VLF9	3,0	-	1,0	Pa_5_7380	B2AMA8	1,0	-	-
Pa_6_2730	B2B2M1	1,0	-	1,0	Pa_5_7500	B2AMC3	1,0	-	-
Pa_7_2170	B2AVQ2	1,0	-	1,0	Pa_5_9540	B2AL06	1,0	-	-
Pa_0_660	B2ABV9	1,0	-	-	Pa_5_9750	B2AL63	1,0	-	-
Pa_1_12850	B2ALQ6	-	1,0	-	Pa_6_1590	B2B2Z5	-	-	1,0
Pa_1_12970	B2ALV8	1,0	-	-	Pa_6_240	B2B3E7	3,0	-	-
Pa_1_13140	B2ALX5	-	-	2,0	Pa_6_4930	B2B1Z2	1,0	-	-
Pa_1_13900	B2AM12	1,0	-	-	Pa_6_5120	B2B208	-	-	1,0
Pa_1_14370	B2AT17	2,0	-	-	Pa_7_10960	B2AXL4	1,0	-	-
Pa_1_14630	B2AT45	2,0	-	-	Pa_7_350	B2AP95	1,0	-	-
Pa_1_1530	B2A9R4	-	-	1,0	Pa_7_4050	B2AV54	-	-	1,0
Pa_1_16310	B2ATL8	-	1,0	-	Pa_7_6660	B2AWC1	1,0	-	-
Pa_1_16330	B2ATM0	-	-	1,0	Pa_7_8800	A8HR89	-	1,0	-
Pa_1_16630	B2ATQ6	2,0	-	-	Pa_mito_nad3	P15580	1,0	-	-
							94	48	72

Tabelle S10 | **Bestimmung der menschlichen Homologe aller Proteine, die als potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner identifiziert wurden.** Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID, entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, der Prozentsatz identischer und ähnlicher Aminosäuren bezogen auf den übereinstimmenden Bereich des zugeordneten menschlichen Homologs, der E-Wert der durchgeführten BLAST-Suche (<http://www.uniprot.org/blast/>) sowie die Swiss-Prot ID und die Bezeichnung des Gens des menschlichen Homologs. Die Zuordnung von Proteinen zu den angegebenen Kategorien (z. B. „Metabolismus“) basiert primär auf ihrer Swiss-Prot-Annotation und zusätzlich auf Informationen aus der allgemeinen Literatur.

Pa_ID	UniProt ID	Identische/ähnliche Aminosäuren in %	E-Wert	Swiss-Prot ID <i>H. sapiens</i>	Gen
Chaperone und Proteinimport (6/47 Proteine)					
Pa_6_2570	B2B2N8	66/81	0,0	P38646	HSPA9
Pa_6_5750	B2B270	57/75	0,0	P10809	HSPD1
Pa_2_9700	B2B728	29/47	2,8E-71	O94826	TOMM70A
Pa_2_10580	B2B7B9	30/48	1,5E-25	O96008	TOMM40
Pa_6_1920	B2B2W2	25/42	1,9E-7	Q15388	TOMM20
Pa_2_12760	B2B7Z4	57/76	3,8E-102	P35232	PHB
Metabolismus (32/47 Proteine)					
Pa_1_22300	B2AS46	52/66	0,0	P23378	GLDC
Pa_3_10790	B2AD09	29/44	6,6E-19	O95571	ETHE1
Pa_5_5970	B2VLF5	68/81	0,0	Q99798	ACO2
Pa_3_11290	B2ACV8	63/77	1,1E-175	P00505	GOT2
Pa_6_1590	B2B2Z5	53/72	1,9E-136	P24752	ACAT1
Pa_3_6780	Q9HF11	65/81	0,0	O75390	CS
Pa_6_2730	B2B2M1	62/76	3,4E-137	P50213	IDH3A
Pa_3_2310	B2B010	47/63	1,8E-121	P10515	DLAT
Pa_5_11920	B2AFL4	35/52	1,7E-47	Q13825	AUH
Pa_2_1050	B2B4E9	90/96	0,0	P78827*	ilv-2
Pa_6_10000	B2ANA5	90/95	0,0	C7C436*	mcsA
Pa_1_13140	B2ALX5	53/72	0,0	P31327	CPS1
Pa_3_7700	B2B0Y1	59/76	6,6E-172	Q9P2R7	SUCLA2
Pa_1_3450	B2AAB2	32/49	1,7E-28	Q92506	HSD17B8
Pa_1_17280	B2ATX6	58/73	0,0	Q12428*	PDH1
Pa_1_14630	B2AT45	25/45	4,1E-25	Q8N159	NAGS
Pa_4_7010	B2ARM6	31/51	1,9E-30	Q16698	DECR1
Pa_3_10910	B2ACZ7	86/92	0,0	P15937*	acu-8
Pa_4_8600	B2AR54	44/61	4,4E-91	O15382	BCAT2
Pa_2_6200	B2B5Y8	38/60	4,2E-25	P23434	GCSH
Pa_6_8420	B2AMZ0	52/72	4,0E-137	P45954	ACADSB
Pa_2_430	B2B487	71/86	0,0	Q9Y697	NFS1
Pa_3_2600	B2AZV9	57/71	9,9E-117	P40926	MDH2
Pa_1_15690	B2ATF5	54/65	0,0	Q10341*	cys2
Pa_2_4980	B2B5L0	39/51	2,3E-54	Q16836	HADH
Pa_3_1420	B2ACM0	34/51	2,4E-34	Q9UHQ9	CYB5R1
Pa_3_9430	B2B162	31/48	1,8E-56	P04181	OAT
Pa_4_3040	B2AE70	63/75	0,0	P48735	IDH2
Pa_1_7660	B2A8W9	58/72	0,0	Q02252	ALDH6A1
Pa_7_10210	B2AXD7	54/72	3,7E-87	P30084	ECHS1
Pa_1_1980	B2A9W1	55/70	0,0	P51649	ALDH5A1
Pa_4_660	B2ADB9	57/74	0,0	P34897	SHMT2
Elektronentransportkette und Atmung (5/47 Proteine)					
Pa_1_14370	B2AT17	26/50	2,1E-11	O75947	ATP5H
Pa_4_7160	B2ARK6	57/71	1,3E-75	O75489	NDUFS3
Pa_1_8620	B2A972	72/86	0,0	O75306	NDUFS2
Pa_5_7500	B2AMC3	42/65	5,5E-17	O14561	NDUFAB1
Pa_6_240	B2B3E7	56/73	4,2E-74	P47985	UQCRCF1
Anderes (4/47 Proteine)					
Pa_2_12010	B2B7R7	55/73	3,2E-160	P49411	TUFM
Pa_5_8240	B2AKR1	nhd	-	P30044	PRDX5
Pa_4_1130	B2ADH4	47/59	2,1E-38	-	-
Pa_6_8740	Q8TGH7	41/55	2,9E-15	P10599	TXN

*Konnte dem entsprechenden *P. anserina* Protein kein eindeutiges menschliches Homolog zugeordnet werden, so wurde für die Annotation ein homologes Protein einer pilzlichen Spezies gewählt

Anhang

Tabelle S11 | **Bestimmung der menschlichen Homologe aller Proteine, die als potenzielle CLPXP-Substrate identifiziert wurden.** Angegeben für jedes Protein ist jeweils seine *P. anserina* ID (Pa_ID, entsprechend der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank Version 6.32) und seine UniProt ID, der Prozentsatz identischer und ähnlicher Aminosäuren bezogen auf den übereinstimmenden Bereich des zugeordneten menschlichen Homologs, der E-Wert der durchgeführten BLAST-Suche (<http://www.uniprot.org/blast/>) sowie die Swiss-Prot ID und die Bezeichnung des Gens des menschlichen Homologs. Die Zuordnung von Proteinen zu den angegebenen Kategorien (z. B. „Metabolismus“) basiert primär auf ihrer Swiss-Prot-Annotation und zusätzlich auf Informationen aus der allgemeinen Literatur.

Pa_ID	UniProt ID	Identische/ähnliche Aminosäuren in %	E-Wert	Swiss-Prot ID <i>H. sapiens</i>	Gen
Chaperone (2/20 Proteine)					
Pa_6_5510	B2B246	38/54	5,0E-45	Q8NBU5	ATAD1
Pa_6_5590	B2B254	36/52	2,5E-76	O76031	CLPX
Metabolismus (10/20 Proteine)					
Pa_6_5560	B2B251	46/64	0,0	Q02218	OGDH
Pa_6_1640	B2B220	42/63	5,8E-93	P31327	CPS1
Pa_7_9520	B2AX70	32/46	1,3E-29	O00330	PDHX
Pa_5_5370	B2VL95	54/67	3,6E-126	P36957	DLST
Pa_7_10050	B2AXC0	54/70	4,7E-123	P08559	PDHA1
Pa_1_13750	B2ALS4	46/61	1,6E-94	P48728	AMT
Pa_5_5810	B2VLD9	58/73	0,0	P09622	DLD
Pa_1_15800	B2ATG7	63/80	1,0E-141	P11177	PDHB
Pa_1_20100	B2AUS2	60/72	7E-144	P26440	IVD
Pa_3_9520	B2B172	45/61	1,6E-88	P35914	HMGCL
Elektronentransportkette und Atmung (3/20 Proteine)					
Pa_3_4870	B2AZM0	64/69	0,0	P28331	NDUFS1
Pa_4_7950	B2ARC6	75/86	0,0	P49821	NDUFV1
Pa_5_9670	B2AL19	41/57	2,9E-91	Q5T2R2	PDSS1
Anderes (5/20 Proteine)					
Pa_3_11170	B2ACX4	61/78	5,4E-142	O59778*	bio2
Pa_1_18430	B2AUA0	30/45	3,0E-19	P22626	HNRNPA2B1
Pa_2_10680	B2B7C9	52/74	5,9E-37	Q86SX6	GLRX5
Pa_1_6330	B2AB71	54/72	0,0	Q96RP9	GFM1
Pa_5_2590	B2AEH2	46/69	2,7E-5	G2TRP3*	yvr31

*Konnte dem entsprechenden *P. anserina* Protein kein eindeutiges menschliches Homolog zugeordnet werden, so wurde für die Annotation ein homologes Protein einer pilzlichen Spezies gewählt

Tabelle S12 | **Vollständige „GO enrichment“-Analyse der potenziellen HsCLPP-Interaktionspartner.** Die „GO enrichment“-Analyse wurde Online durchgeführt (<http://amigo.geneontology.org/rte>). Input waren die Swiss-Prot IDs aller 41 feststellbaren menschlichen Homologe der *P. anserina* Proteine, die als potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner identifiziert wurden (siehe Tabelle S10). Angegeben sind jeweils der GO-Term, die tatsächlich beobachtete Häufigkeit seines Auftretens (Beobachtet), die erwartete Häufigkeit seines Auftretens (Erwartet), der daraus resultierende Anreicherungsfaktor (Anreicherung) sowie der zugeordnete *P*-Wert für die Signifikanz der Anreicherung. Ausgewählte repräsentative bzw. deskriptive GO-Terme, die in Tabelle 25 des Haupttextes übernommen wurden, sind in fett.

GO-Term (ID)	Beobachtet	Erwartet	Anreicherung	<i>P</i> -Wert
carboxylic acid metabolic process	27	1,7	> 5	4,4E-24
small molecule metabolic process	34	4,4	> 5	6,1E-23
oxoacid metabolic process	27	1,9	> 5	1,3E-22
organic acid metabolic process	27	1,9	> 5	2,2E-22
oxidation-reduction process	25	2,0	> 5	4,1E-19
single-organism metabolic process	37	8,5	4,4	1,6E-17
cellular respiration	13	0,3	> 5	9,7E-14
organic acid catabolic process	13	0,4	> 5	4,8E-13
carboxylic acid catabolic process	13	0,4	> 5	4,8E-13
cellular amino acid metabolic process	15	0,7	> 5	7,7E-13
organonitrogen compound metabolic process	22	2,7	> 5	6,7E-12
energy derivation by oxidation of organic compounds	14	0,7	> 5	1,2E-11
small molecule catabolic process	13	0,5	> 5	1,7E-11
cellular metabolic process	40	16,6	2,4	3,8E-11
primary metabolic process	40	16,8	2,4	6,0E-11
cellular amino acid catabolic process	10	0,2	> 5	1,4E-10
generation of precursor metabolites and energy	14	0,8	> 5	1,6E-10
organic substance metabolic process	40	17,4	2,3	2,6E-10
alpha-amino acid metabolic process	12	0,5	> 5	3,6E-10
metabolic process	41	19,6	2,1	5,4E-10
tricarboxylic acid cycle	7	0,1	> 5	1,7E-09
citrate metabolic process	7	0,1	> 5	4,1E-09
tricarboxylic acid metabolic process	7	0,1	> 5	9,1E-09
aerobic respiration	7	0,1	> 5	1,1E-07
single-organism catabolic process	15	1,6	> 5	1,2E-07
small molecule biosynthetic process	11	0,8	> 5	1,8E-06
branched-chain amino acid catabolic process	5	0,0	> 5	3,5E-06
organonitrogen compound catabolic process	10	0,6	> 5	3,9E-06
branched-chain amino acid metabolic process	5	0,1	> 5	9,1E-06
single-organism process	41	24,9	1,7	9,9E-06
organic acid biosynthetic process	9	0,5	> 5	2,1E-05
carboxylic acid biosynthetic process	9	0,5	> 5	2,1E-05
single-organism cellular process	39	22,3	1,8	6,1E-05
cellular amino acid biosynthetic process	6	0,2	> 5	1,5E-04
cellular catabolic process	15	2,7	> 5	1,9E-04
alpha-amino acid catabolic process	6	0,2	> 5	2,1E-04
dicarboxylic acid metabolic process	6	0,2	> 5	2,2E-04
monocarboxylic acid metabolic process	10	1,0	> 5	2,7E-04
single-organism biosynthetic process	14	2,6	> 5	8,4E-04
respiratory electron transport chain	6	0,2	> 5	1,3E-03
electron transport chain	6	0,3	> 5	1,4E-03
glutamine family amino acid metabolic process	5	0,1	> 5	1,7E-03
catabolic process	15	3,3	4,5	2,7E-03
alpha-amino acid biosynthetic process	5	0,2	> 5	3,1E-03
organic substance catabolic process	14	2,9	4,9	3,1E-03
monocarboxylic acid catabolic process	5	0,2	> 5	5,4E-03
nucleobase-containing small molecule metabolic process	9	1,1	> 5	6,7E-03
serine family amino acid metabolic process	4	0,1	> 5	9,9E-03
nitrogen compound metabolic process	25	10,4	2,4	1,1E-02
fatty acid metabolic process	7	0,6	> 5	1,2E-02
cellular process	40	27,7	1,4	1,7E-02
organonitrogen compound biosynthetic process	9	1,2	> 5	1,7E-02
protein targeting to mitochondrion	4	0,1	> 5	3,7E-02
establishment of protein localization to mitochondrion	4	0,1	> 5	4,6E-02

Anhang

Tabelle S13 | **Vollständige „GO enrichment“-Analyse der potenziellen CLXP-Substrate.** Die „Go enrichment“-Analyse wurde Online durchgeführt (<http://amigo.geneontology.org/rte>). Input waren die Swiss-Prot IDs aller 18 feststellbaren menschlichen Homologe der *P. anserina* Proteine, die als potenzielle CLXP-Substrate identifiziert wurden (siehe Tabelle S11/Tabelle S10). Angegeben sind jeweils der GO-Term, die tatsächlich beobachtete Häufigkeit seines Auftretens (Beobachtet), die erwartete Häufigkeit seines Auftretens (Erwartet), der daraus resultierende Anreicherungsfaktor (Anreicherung) sowie der zugeordnete *P*-Wert für die Signifikanz der Anreicherung. Ausgewählte repräsentative bzw. deskriptive GO-Terme, die in Tabelle 27 des Haupttextes übernommen wurden, sind in fett.

GO-Term (ID)	Beobachtet	Erwartet	Anreicherung	<i>P</i> -Wert
tricarboxylic acid cycle	5	0,0	> 5	2,4E-07
cellular respiration	7	0,1	> 5	3,8E-07
citrate metabolic process	5	0,0	> 5	4,6E-07
alpha-amino acid catabolic process	6	0,1	> 5	6,3E-07
energy derivation by oxidation of organic compounds	8	0,3	> 5	6,8E-07
tricarboxylic acid metabolic process	5	0,0	> 5	8,2E-07
carboxylic acid metabolic process	10	0,7	> 5	1,4E-06
regulation of acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate	4	0,0	> 5	2,0E-06
cellular amino acid catabolic process	6	0,1	> 5	2,1E-06
small molecule metabolic process	13	1,8	> 5	2,6E-06
regulation of acyl-CoA biosynthetic process	4	0,0	> 5	2,7E-06
generation of precursor metabolites and energy	8	0,3	> 5	3,0E-06
alpha-amino acid metabolic process	7	0,2	> 5	4,5E-06
aerobic respiration	5	0,0	> 5	4,9E-06
oxoacid metabolic process	10	0,8	> 5	5,0E-06
organic acid metabolic process	10	0,8	> 5	6,0E-06
oxidation-reduction process	10	0,8	> 5	7,1E-06
regulation of sulfur metabolic process	4	0,0	> 5	1,2E-05
acyl-CoA metabolic process	5	0,1	> 5	1,3E-05
thioester metabolic process	5	0,1	> 5	1,3E-05
pyruvate metabolic process	5	0,1	> 5	2,2E-05
single-organism metabolic process	15	3,5	4,3	3,8E-05
cellular amino acid metabolic process	7	0,3	> 5	4,8E-05
organic acid catabolic process	6	0,2	> 5	6,0E-05
carboxylic acid catabolic process	6	0,2	> 5	6,0E-05
organonitrogen compound metabolic process	10	1,1	> 5	1,6E-04
coenzyme metabolic process	6	0,2	> 5	2,2E-04
regulation of coenzyme metabolic process	4	0,0	> 5	2,9E-04
regulation of cofactor metabolic process	4	0,0	> 5	2,9E-04
small molecule catabolic process	6	0,2	> 5	3,2E-04
lysine catabolic process	3	0,0	> 5	4,2E-04
lysine metabolic process	3	0,0	> 5	4,2E-04
single-organism catabolic process	8	0,7	> 5	6,7E-04
cofactor metabolic process	6	0,3	> 5	8,1E-04
organonitrogen compound catabolic process	6	0,3	> 5	1,1E-03
sulfur compound metabolic process	6	0,3	> 5	1,3E-03
aspartate family amino acid catabolic process	3	0,0	> 5	2,8E-03
purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	5	0,2	> 5	3,2E-03
regulation of fatty acid metabolic process	4	0,1	> 5	3,3E-03
purine nucleoside monophosphate metabolic process	5	0,2	> 5	3,3E-03
acetyl-CoA metabolic process	3	0,0	> 5	3,9E-03
branched-chain amino acid catabolic process	3	0,0	> 5	3,9E-03
ribonucleoside monophosphate metabolic process	5	0,2	> 5	4,3E-03
organic substance catabolic process	9	1,2	> 5	4,6E-03
nucleoside monophosphate metabolic process	5	0,2	> 5	5,6E-03
branched-chain amino acid metabolic process	3	0,0	> 5	6,9E-03
acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate	2	0,0	> 5	9,5E-03
catabolic process	9	1,4	> 5	1,5E-02
purine ribonucleoside metabolic process	5	0,2	> 5	1,6E-02
purine nucleoside metabolic process	5	0,2	> 5	1,7E-02
nucleobase-containing small molecule metabolic process	6	0,4	> 5	2,2E-02
ribonucleoside metabolic process	5	0,2	> 5	2,4E-02
purine ribonucleotide metabolic process	5	0,3	> 5	2,7E-02
metabolic process	17	8,1	2,1	2,7E-02
ribonucleotide metabolic process	5	0,3	> 5	3,4E-02
nucleoside metabolic process	5	0,3	> 5	3,5E-02
purine nucleotide metabolic process	5	0,3	> 5	3,7E-02
cellular catabolic process	8	1,1	> 5	3,9E-02
ribose phosphate metabolic process	5	0,3	> 5	4,0E-02
glycosyl compound metabolic process	5	0,3	> 5	4,6E-02
phosphorus metabolic process	9	1,6	> 5	4,7E-02

9.2 Abkürzungsverzeichnis

In diesem Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt sind SI-Einheiten und -Präfixe, mathematische Symbole, Gennamen (mit Ausnahme solcher, deren Abkürzung im Haupttext erläutert wurde) und Abkürzungen, die auch im Duden stehen.

μM	Mikromolar	LBAC	„lysogeny broth“-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol
A	Adenin-Nukleotid		
Å	Ångström	LBC	„lysogeny broth“-Medium mit Chloramphenicol
AAA/AAA+	„ATPase associated with diverse cellular activities“	LC	„liquid chromatography“
ADP	Adenosindiphosphat	M	molar
ALA	„5-amino-levulinic acid“	M2	Medium 2
APS	Ammoniumpersulfat	MCC	„methylcitrate cycle“
ATP	Adenosintriphosphat	MELAS	„mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes“
BioID	„proximity-dependent biotin identification“	MFRTA	„mitochondrial free radical theory of ageing“
<i>bla</i>	β-Lactamase-Gen	min	Minute
<i>ble</i>	Phleomycin-Resistenzgen	mM	Millimolar
BMM	Biomalz-Mais-Medium	MM	mitochondriale Matrix
BNP	BN-PAGE; blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	MPC	„mitochondrial pyruvate carrier“
bp	Basenpaar	mRNA	„messenger RNA“
BSA	„bovine serum albumin“	MS	Massenspektrometrie
C	Cytosin-Nukleotid	MTS	„mitochondrial targeting sequence“
C1QBP	„complement component 1 Q subcomponent-binding protein“	NAFLD	„non-alcoholic fatty liver disease“
<i>Clp/CLP</i>	„caseinolytic protease“	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
CM	„complete medium“	NOA1	„nitric oxide associated 1“
CoA	Coenzym A	OGDC	„oxoglutarat dehydrogenase complex“
CSPD	„chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate“	OMM	„outer mitochondrial membrane“
d	Tag	ORF	„open reading frame“
DIG	Digoxigenin	OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>P</i>	„probability“
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	Pa	<i>Podospora anserina</i>
DTT	Dithiothreitol	PBS	„phosphate buffered saline“
Ec	<i>Escherichia coli</i>	PCR	„polymerase chain reaction“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PDC	„pyruvate dehydrogenase complex“
engl.	englisch	PEG	Polyethylenglykol
ESI	Elektrospray-Ionisation	pH	„potentia Hydrogenii“
ETC	„electron transport chain“	<i>P_{PaMt1}</i>	<i>P. anserina</i> Metallothionein-Promotor
FRDA	„Friedreich's ataxia“	<i>P_{trpc}</i>	<i>A. nidulans</i> Tryptophan-Synthesegen-Promotor
G	Guanin-Nukleotid	PVDF	Polyvinylidenfluorid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	RNA	Ribonukleinsäure
GCS	„glycine cleavage system“	RNAi	RNA-Interferenz
GO	„gene ontology“	ROS	„reactive oxygen species“
GTP	Guanosintriphosphat	RP	„reversed-phase“
h	Stunde	rpm	„rounds per minute“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	RT	Raumtemperatur
<i>hph</i>	Hygromycin-Resistenzgen	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>	SDS	„sodium dodecyl sulfate“
HSLU	„heat shock locus gene U“	SEM	„standard error of the mean“
HSLV	„heat shock locus gene V“	SOC	„super optimal broth with catabolite repression“
HSP	„heat shock protein“	SPG	„spastic paraplegia gene“
IMM	innere mitochondriale Membran	SSC	„saline-sodium citrate“
IMS	„intermembrane space“	STC	Sorbitol-Tris-Calciumchlorid
kbp	Kilobasenpaar	STET	Saccharose-Tris-EDTA-Triton X-100
kDa	Kilodalton	T	Thymin-Nukleotid
LB	„lysogeny broth“-Medium	TAE	Tris-Acetat-EDTA
LBA	„lysogeny broth“-Medium mit Ampicillin	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
LBAB	„lysogeny broth“-Medium mit Ampicillin und Blastidicin	TE	Tris-EDTA
		TEMED	Tetramethylethylendiamin
		TENS	Tris-EDTA-NaCl-SDS

Anhang

TOM	„translocase of the outer membrane“	UP	„unique peptide“
T _{PaMt1}	<i>P. anserina</i> Metallothionein-Terminator	UPR ^{mt}	„mitochondrial unfolded protein response“
TPS	Transformations-Phosphat-Saccharose-Puffer	UV	Ultraviolett
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	v	„volume“
tRNA	„transfer-RNA“	w	„weight“
U	„enzyme unit“; Einheit der Enzymaktivität		

9.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 | Mitochondrien als „zelluläre Kraftwerke“.
- Abbildung 2 | Mitochondrien-assoziierte Erkrankungen und degenerative Prozesse.
- Abbildung 3 | Die verschiedenen Ebenen der mitochondrialen Qualitätskontrolle.
- Abbildung 4 | Proteasen und Proteinqualitätskontrolle in Mitochondrien.
- Abbildung 5 | Aufbau und Funktionsmechanismus von CLP-Proteasen.
- Abbildung 6 | Weibliche Fertilität von $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildstamm bei 27 °C und 37 °C.
- Abbildung 7 | Wuchsraten von $\Delta PaClpP$ bei verschiedenen Stressbedingungen im Vergleich zum Wildstamm.
- Abbildung 8 | Southern-Blot-Analysen zur Verifizierung des *PaClpX*-Deletionsstammes und des *PaClpP/PaClpX*-Doppeldeletionsstammes.
- Abbildung 9 | Lebensspannen und Wuchsraten der verschiedenen *P. anserina* CLP-Protease Mutanten im Vergleich zum Wildstamm.
- Abbildung 10 | Expression des menschlichen *ClpX*-Gens im *PaClpX*-Deletionsstamm.
- Abbildung 11 | Allgemeines Prinzip des CLPP „Substrat-trapping Assay“.
- Abbildung 12 | Plasmide kodierend für katalytisch inaktive Varianten von PaCLPP und HsCLPP.
- Abbildung 13 | Analyse der Stämme $\Delta PaClpP/PaClpPS^{135A}$ und $\Delta PaClpP/HsClpPS^{153A}$.
- Abbildung 14 | Immunpräzipitation von HsCLPP aus Mitochondrien.
- Abbildung 15 | Plasmide kodierend für eine aktive oder inaktive PaCLPP-Variante mit C-terminalen 6xHis-TEV-Strep-tag II-Marker.
- Abbildung 16 | Analyse der Stämme $\Delta PaClpP/PaClpP^{6HTS}$ und $\Delta PaClpP/PaClpPS^{135A-6HTS}$.
- Abbildung 17 | Aufreinigung von PaCLPPS^{135A-6HTS} und HsCLPPS^{153A-6HTS} aus Mitochondrien über den 6xHis-Marker.
- Abbildung 18 | Aufreinigung rekombinanter Varianten von PaCLPP, HsCLPP und PaCYPD aus Mitochondrien über den Strep-tag II-Marker.
- Abbildung 19 | Silberfärbung der Eluate nach einer Aufreinigung von PaCLPP^{6HTS} und PaCLPPS^{135A-6HTS} aus Mitochondrien über den 6xHis-Marker.
- Abbildung 20 | Schematische Übersicht verschiedener affinitätsmarkierter HsCLPP-Varianten.
- Abbildung 21 | Plasmide kodierend für verschiedene affinitätsmarkierte HsCLPP-Varianten.
- Abbildung 22 | Analyse der Stämme $\Delta PaClpP/HsClpP^{TS}$ und $\Delta PaClpP/HsClpPS^{153A-TS}$.
- Abbildung 23 | Aufreinigung von HsCLPP^{TS} aus Mitochondrien über den Twin-Strep-tag®.
- Abbildung 24 | Analyse der Stämme $\Delta PaClpP/HsClpP^{L3F6H}$ und $\Delta PaClpP/HsClpPS^{153A-L3F6H}$.

Abbildung 25 | Aufreinigung von HsCLPPL^{3F6H} und HsCLPPS^{153A-L3F6H} aus Mitochondrien über den 3xFLAG-6xHis-Marker.

Abbildung 26 | Schematische Übersicht der praktischen Durchführung des CLPP „Substrat-trapping Assay“ in *P. anserina*.

Abbildung 27 | Venn Diagramm der mit HsCLPPL^{3F6H} und/oder HsCLPPS^{153A-L3F6H} assoziierten Proteine, die im ersten CLPP „Substrat-trapping Assay“ identifiziert wurden.

Abbildung 28 | Venn Diagramm der mit HsCLPPL^{3F6H} und/oder HsCLPPS^{153A-L3F6H} assoziierten Proteine, die im zweiten CLPP „Substrat-trapping Assay“ identifiziert wurden.

Abbildung 29 | Übersicht aller potenziellen Interaktionspartner und Substrate der mitochondrialen CLPXP-Protease in *P. anserina*.

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 | Verwendete Geräte.

Tabelle 2 | Sonstige verwendete Materialien.

Tabelle 3 | Verwendete Chemikalien und Stoffe.

Tabelle 4 | Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 5 | Verwendete Anzuchtmedien.

Tabelle 6 | Verwendete Stämme.

Tabelle 7 | Verwendete Plasmide, die zu Beginn dieser Doktorarbeit bereits vorhanden waren.

Tabelle 8 | Verwendete Plasmide, die in dieser Doktorarbeit neu hergestellt wurden.

Tabelle 9 | Verwendete Cosmide.

Tabelle 10 | Verwendete Oligonukleotide.

Tabelle 11 | Verwendete Enzyme.

Tabelle 12 | Verwendete Kits.

Tabelle 13 | Verwendete Primärantikörper.

Tabelle 14 | Verwendete Sekundärantikörper von LI-COR.

Tabelle 15 | Verwendete Größenstandards.

Tabelle 16 | Verwendete Computerprogramme.

Tabelle 17 | Typischer Reaktionsansatz einer PCR mit der *Taq*- oder Phusion-DNA-Polymerase

Tabelle 18 | Typisches Reaktionsprofil einer PCR mit der *Taq*- oder Phusion-DNA-Polymerase

Tabelle 19 | Konstruktion der in dieser Doktorarbeit neu hergestellten Plasmide.

Tabelle 20 | Liste der hergestellten und verwendeten Sonden.

Tabelle 21 | Übersicht der Lebensspannen und Wuchsraten von Wildstamm, $\Delta PaClpP$, $\Delta PaClpX$ und $\Delta PaClpP/\Delta PaClpX$.

Tabelle 22 | Übersicht der Ergebnisse des ersten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“.

Tabelle 23 | Übersicht der Ergebnisse des zweiten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“.

Tabelle 24 | Übersicht aller Proteine, die als potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner identifiziert wurden.

Tabelle 25 | „GO enrichment“-Analyse der potenziellen HsCLPP-Interaktionspartner.

Tabelle 26 | Übersicht aller Proteine, die als potenzielle CLPXP-Substrate identifiziert wurden.

Anhang

Tabelle 27 | „GO enrichment“-Analyse der potenziellen CLXP-Substrate.

Tabelle S1 | Übersicht aller im ersten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit HsCLPPL3F6H ko-aufgereinigten Proteine.

Tabelle S2 | Übersicht aller im ersten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit HsCLPPS153A-L3F6H ko-aufgereinigten Proteine.

Tabelle S3 | Übersicht aller im ersten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ in der Hintergrundkontrolle identifizierten Proteine.

Tabelle S4 | Übersicht aller Proteine, die im ersten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit beiden HsCLPP-Varianten spezifisch ko-aufgereinigt wurden.

Tabelle S5 | Übersicht aller Proteine, die im ersten CLPP „Substrat-trapping Assay“ nur mit HsCLPPL3F6H spezifisch ko-aufgereinigt wurden.

Tabelle S6 | Übersicht aller Proteine, die im ersten CLPP „Substrat-trapping Assay“ nur mit HsCLPPS153A-L3F6H spezifisch ko-aufgereinigt wurden.

Tabelle S7 | Übersicht aller im zweiten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit HsCLPPL3F6H ko-aufgereinigten Proteine.

Tabelle S8 | Übersicht aller im zweiten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ mit HsCLPPS153A-L3F6H ko-aufgereinigten Proteine.

Tabelle S9 | Übersicht aller im zweiten durchgeführten CLPP „Substrat-trapping Assay“ in der Hintergrundkontrolle identifizierten Proteine.

Tabelle S10 | Bestimmung der menschlichen Homologe aller Proteine, die als potenzielle HsCLPP-Interaktionspartner identifiziert wurden.

Tabelle S11 | Bestimmung der menschlichen Homologe aller Proteine, die als potenzielle CLXP-Substrate identifiziert wurden.

Tabelle S12 | Vollständige „GO enrichment“-Analyse der potenziellen HsCLPP-Interaktionspartner.

Tabelle S13 | Vollständige „GO enrichment“-Analyse der potenziellen CLXP-Substrate.

10 DANKSAGUNG

Mein größter Dank an dieser Stelle gilt Herrn Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz, in dessen Arbeitskreis ich nicht nur diese Doktorarbeit, sondern auch bereits meine Diplomarbeit anfertigen durfte. Er hat mir jederzeit seine größtmögliche Unterstützung für meine Forschungsvorhaben zuteilwerden lassen. In jeglicher Hinsicht konnte ich vieles von ihm lernen.

Herrn Dr. Christian Behrends danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation.

Ganz großen Dank an Herrn Dr. Julian D. Langer und alle Mitglieder seiner Arbeitsgruppe. Ohne ihn wäre meine Doktorarbeit in dieser Form wohl nie zustande gekommen. Seine enorme fachliche Kompetenz und stets freundliche und offene Art werden mir lange in Erinnerung bleiben.

Bei allen alten und neuen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit. Besonders möchte ich Frau Dr. Andrea Hamann für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft danken und dafür, dass sie mich immer an ihrem umfangreichen Wissen und ihrer Erfahrung teilhaben lassen.

Evelyn danke ich für ihre große Geduld, ihre Liebe und Loyalität und für ihre Nachsicht aller meiner Schwächen und Fehler. Meiner Familie, insbesondere natürlich meinen Eltern Christa und Eberhard, danke ich für ihr außerordentliches Verständnis, ihre andauernde Unterstützung und ihre immerwährende Liebe.

11 PUBLIKATIONSLISTE**Originalarbeiten**

Fischer F, Weil A, Hamann A, Osiewacz HD (2013) Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal *ClpP* deletion strain. *Nat Commun* 4:1397. doi:10.1038/ncomms2397

Fischer F, Filippis C, Osiewacz HD (2015) RCF1-dependent respiratory supercomplexes are integral for lifespan-maintenance in a fungal ageing model. *Sci Rep* 5:12697. doi:10.1038/srep12697

Fischer F, Langer JD, Osiewacz HD (XXXX) Identification of potential mitochondrial CLPXP protease interactors and substrates reveal its central role in energy metabolism. In Revision

Übersichtsartikel

Fischer F, Hamann A, Osiewacz HD (2012) Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem Sci* 37:284-292

