

Zelluläre Integrität

Mitochondrien unter Stress: Die Rolle der Präsequenzprotease MPP

F.-NORA VÖGTLE

ZENTRUM FÜR MOLEKULARE BIOLOGIE DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG (ZMBH) UND NETZWERK ALTERNSFORSCHUNG (NAR), UNIVERSITÄT HEIDELBERG

The majority of mitochondrial proteins are encoded in the nuclear genome, so that the nearly entire proteome is assembled by post-translational preprotein import from the cytosol. Proteomic imbalances are sensed and induce cellular stress response pathways to restore proteostasis. Here, the mitochondrial presequence protease MPP serves as example to illustrate the critical role of mitochondrial protein biogenesis and proteostasis on cellular integrity.

DOI: 10.1007/s12268-021-1589-1
© Die Autorin 2021

Der Aufbau des mitochondrialen Proteoms erfordert die koordinierte Expression von Proteinen, die in zwei verschiedenen Genomen codiert werden. Während der Hauptteil des Proteoms im Zellkern codiert ist, befindet sich die Information für acht Pro-

teine (Hefe) bzw. 13 Proteine (Mensch) in der mitochondrialen DNA (mtDNA) (**Abb. 1**). Die Expression beider Genome wird durch eine rege Kommunikation zwischen den Organellen aufeinander abgestimmt. Die Synthese mitochondrialer Präproteine an cytosolischen Ribosomen birgt dabei einige Herausforderungen, da die Vorstufenproteine zum Organell und dort an die richtige Stelle transportiert werden müssen [1]. Mitochondrien bestehen aus zwei Lipiddoppelschichten, der äußeren und inneren Membran, die den Intermembranraum und die Matrix begrenzen. Transportsignale in den Vorstufenproteinen vermitteln den Import und die Sortierung in das richtige Subkompartiment [1]. Hierfür besitzen Mitochondrien mehrere komplexe Proteinimportmaschinerien, die für die Translokation über – bzw. die Assemblierung in – die Membran benötigt werden (**Abb. 1**). Die Mehrheit der Vorstufenproteine wird entlang des Präsequenzimportwegs importiert. Als Signal dient eine N-terminale Sequenz (Präsequenz), die von den Translokasen der Außen- und Innenmembran (TOM und TIM23) erkannt wird und das Protein in die Matrix schleust. Hier trifft das Vorstufenprotein auf ein komplexes Netzwerk an Proteasen, die neu importierte Proteine prozessieren und somit ihre Funktionalität und Stabilität mitbestimmen [2, 3]. Eine zentrale Rolle nimmt die essenzielle mitochondriale Präsequenzprotease (MPP) ein. MPP ist ein Heterodimer, das aus zwei miteinander strukturell verwandten Proteinen besteht: Die β -Untereinheit (PMPCB in humanen Zellen, Mas1 in Hefe), in der sich das aktive Zentrum befindet und die α -Untereinheit (PMPCA, bzw. Mas2), die vermutlich eine Rolle bei der Substraterkennung spielt [2, 4]. MPP ist eine zinkabhängige Metalloprotease und die Struktur des Hefeenzym konnte zeigen, dass eine flexible glycinreiche Schleife in der α -Untereinheit bei der Substratbindung bzw. dem Freisetzen des reifen Proteins eine wichtige Rolle spielt [5].

Während weitere mitochondriale Proteasen ebenfalls an der Prozessierung von Präproteinen beteiligt sind, dabei allerdings

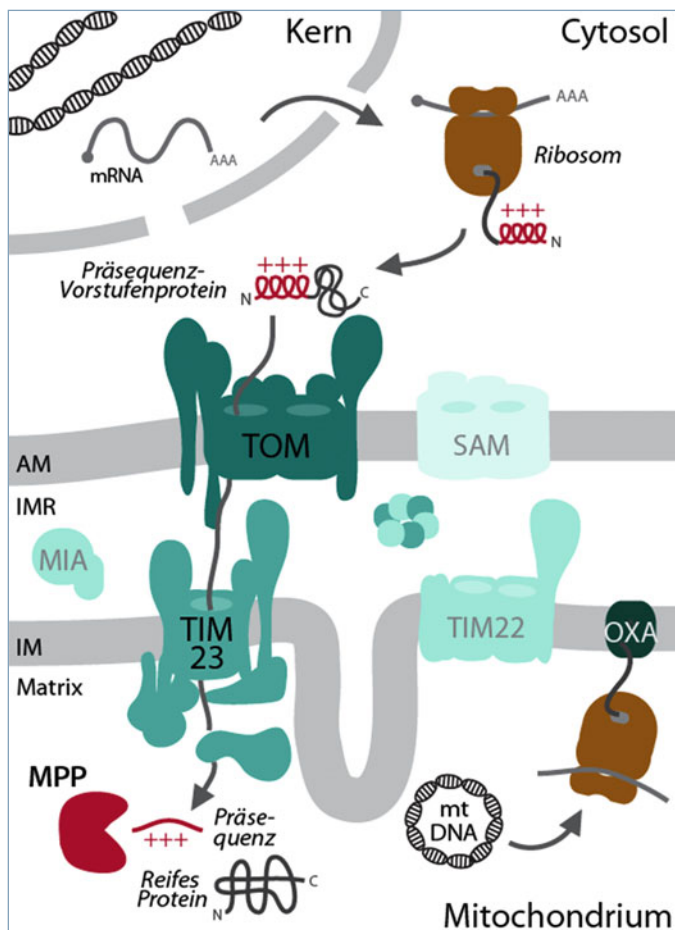


Abb. 1: Mitochondriale Proteinbiogenese. Mitochondriale Proteine sind sowohl im Zellkern als auch im mitochondrialen Genom (mtDNA) codiert. Für den Import von Präproteinen aus dem Cytoplasma besitzen Mitochondrien Importmaschinerien, die die Translokation und Sortierung in die verschiedenen mitochondrialen Subkompartimente ausführen. Zentral für die Biogenese der meisten mitochondrialen Präproteine ist die mitochondriale Prozessierungsprotease MPP, die die Signalsequenzen nach dem Import in der Matrix abspaltet. AM: Außenmembran; IMR: Intermembranraum; IM: Innenmembran.

nur eine sehr geringe Anzahl an Substraten haben, gilt MPP als die Hauptpräsequenzprotease [2, 6]. Studien aus der Bäckerhefe legen nahe, dass ca. 70 Prozent aller mitochondrialen Vorstufenproteine eine spaltbare Präsequenz als Importsignal verwenden und dass MPP die Mehrheit dieser Proteine nach dem Import prozessiert [7].

Da nach der Spaltung durch MPP häufig Phenylalanin, Tyrosin oder Leucin als N-terminale Aminosäure vorliegt, was mit einer verringerten Proteinhalbwertszeit korreliert, werden diese Proteine ein zweites Mal prozessiert: Die Entfernung einer weiteren einzelnen Aminosäure durch die *intermediate cleaving peptidase* Icp55 oder von acht Aminosäuren durch die *mitochondrial intermediate protease* MIP/Oct1 bildet reife Proteine, die mit einer stabilisierenden Aminosäure (meist Serin oder Alanin) beginnen (mitochondriale *N-end*-Regel) [2, 6, 7]. Das System aus MPP, Icp55 und MIP/Oct1 bildet so eine zentrale proteolytische Qualitätskontrolle beim Aufbau eines funktionellen mitochondrialen Proteoms.

MPP-Mutationen führen zu schweren neurologischen Erkrankungen

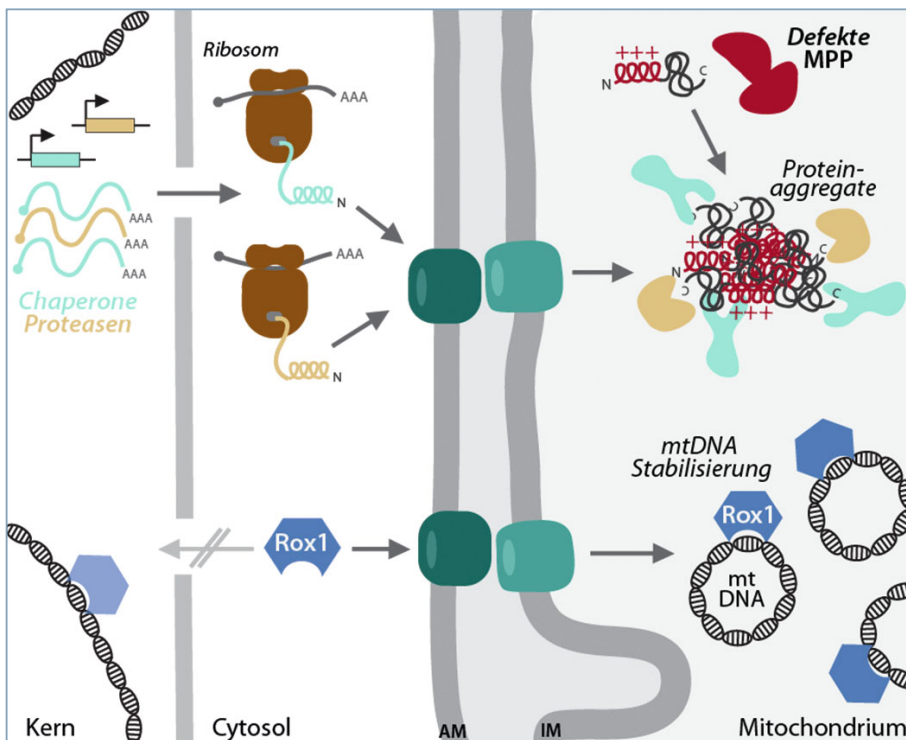
MPP kommt eine essenzielle Rolle beim Aufbau des mitochondrialen Proteoms zu. Deutlich wird dies auch durch Punktmutationen in MPP, die in beiden Untereinheiten des humanen Enzyms in Patienten mit schweren neurologischen Symptomen identifiziert wurden [8-10]. Diese umfassen Störungen der Bewegungskoordination (cerebelläre Ataxie), Epilepsie und Neurodegeneration, die sich bereits im frühen Kindesalter entwickeln. Patienten mit Mutationen in der katalytischen Untereinheit PMPCB scheinen schwerere Krankheitsverläufe zu entwickeln, während bei PMPCA die Nähe der Mutation zu der für die Substraterkennung wichtigen glycinreichen Schleife mit einem schwereren Krankheitsbild korreliert [8-10]. Während die Menge der mutierten PMPCA- oder PMPCB-Proteine meist stark reduziert ist, konnte bei der Analyse von MPP-Substraten bisher nur eine aberrante Prozessierung von Frataxin (FXN) entdeckt werden. FXN ist ein besonderes MPP-Substrat, da es zweimal hinterein-

ander von MPP gespalten wird. In den Patienten konnte eine Akkumulation des intermediären und eine Verringerung des reifen FXN detektiert werden. FXN spielt eine Rolle bei der Synthese von Eisen-Schwefel-Zentren und Analysen von Patientenproben konnten eine verminderte Aktivität von Proteinen, die Fe-S-Zentren besitzen (beispielsweise der mitochondrialen Atmungskette), im Muskel nachweisen [10]. Defekte in der Synthese von Fe-S-Zentren haben auch Auswirkungen auf andere Zellkompartimente, da diese Ko-Faktoren aus den Mitochondrien exportiert und in viele extra-mitochondriale Proteine eingebaut werden [11]. Dadurch können die Mutationen in MPP auch zelluläre Funktionen in anderen Kompartimenten beeinträchtigen. Zwar konnten bisher nur FXN-Prozessierungsdefekte in humanen Patientenproben identifiziert werden, es ist allerdings unwahrscheinlich, dass keine weiteren MPP-Substrate betroffen sind. Hierfür spricht auch eine Analyse im Modellorganismus Bäckerhefe, in der Patientenmutationen in das homologe Mas1 eingefügt wurden und zu einer defekten Prozessierung aller getesteten MPP-Substrate führte [10]. Es ist anzunehmen, dass FXN aufgrund der zweifachen MPP-Spaltung besonders sensitiv auf Dysfunktionen reagiert und Prozessierungsdefekte daher am frühesten zu detektieren sind.

MPP kann auch in der Pathogenese von humanen Erkrankungen eine Rolle spielen, bei denen im Enzym selbst keine Mutationen oder Defekte vorliegen. So kann es durch Punktmutationen in der Präsequenz zu einem Verlust der MPP-Prozessierung kommen, die dann nur dieses einzelne Präprotein betrifft. Ein Beispiel hierfür ist YME1L: Bei Patienten mit einer Mitochondriopathie wurde entdeckt, dass eine Punktmutation in der Präsequenz zu einer verminderten MPP-Prozessierung führt [12]. Die Aktivität von MPP kann auch durch Störungen in der Präsequenzprozessierung nachgeschalteten Prozessen beeinträchtigt werden. Fehlt beispielsweise die mitochondriale Präsequenzpeptidase PreP, die abgespaltene Präsequenzen abbaut, können die akkumulierenden Signalpeptide eine rückwärtige Inhibition von MPP auslösen [13, 14]. Die Funktionalität von MPP ist

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 2:** Zelluläre Stressantwort auf MPP-Dysfunktion. Defekte in MPP führen zur Akkumulation von nicht prozessierten Vorstufenproteinen in der Matrix, die rasch aggregieren. Die Zelle antwortet mit der vermehrten Transkription von mitochondrialen Chaperonen und Proteasen (*mitochondrial unfolded protein response*). Zudem wird der Transkriptionsfaktor Rox1 nicht mehr in den Zellkern, sondern in die Mitochondrien transportiert, wo er an die mitochondriale DNA (mtDNA) bindet und die Expression des mitochondrialen Genoms aufrechterhält.

damit an den Präsequenzpeptidabbau gekoppelt. Dieser Mechanismus ist von der Hefe bis zu humanen Zellen konserviert und könnte auch bei der Alzheimer Erkrankung eine Rolle spielen, bei der die Aktivität von PreP herabgesetzt ist [13].

Zelluläre Stressantwort auf MPP-Dysfunktion

Eine verminderte MPP-Aktivität hat schwerwiegende Konsequenzen für den Organismus. Was passiert auf molekularer Ebene, wenn die Präsequenzen mitochondrialer Vorstufenproteine nicht effizient abgespalten werden? Versuche im Modellsystem Bäckerhefe, in dem eine Punktmutation in *Mas1* (*mas1^{ts}*) eingefügt wurde, geben hier erste Erkenntnisse [10, 15]. Der Austausch von nur einer Aminosäure resultierte in einem temperatursensitiven Phänotyp: Bei niedriger Temperatur wachsen die *mas1^{ts}*-Zellen wie der Wildtyp. Erhöht man die Temperatur, wird die MPP-Funktion inaktiviert und das Zellwachstum wird stark verlangsamt. Eine Temperaturänderung ermöglicht somit ein direktes An- bzw. Ausschalten der MPP-Aktivität und damit die Analyse der direkten

Konsequenzen von MPP-Dysfunktion auf molekularer Ebene [10, 15].

Aufgrund von Studien an einzelnen MPP-Substraten ging man davon aus, dass Präproteine nicht funktionell sind und schnell abgebaut werden. Mit der *mas1^{ts}*-Variante konnten nun die Eigenschaften von unreifen Vorstufenproteinen global untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass nicht prozessierte Präproteine direkt nach ihrem Import in die Matrix aggregieren (**Abb. 2**). Diese Aggregate sind nicht funktionell und mit der Zeit kommt es zu einer Abnahme an reifen Proteinen. Überraschenderweise wurden die aggregierten Präproteine aber nicht schneller, sondern deutlich langsamer als prozessierte reife Proteine abgebaut und bildeten größere Verklumpungen [15].

Wie reagiert die Zelle auf diese Matrixaggregate und den Verlust an funktionellen Proteinen? Studien im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* und in humanen Zellen zeigen, dass mitochondriale Dysfunktionen an den Zellkern signalisiert werden und eine transkriptionelle Änderung auslösen, die *mitochondrial unfolded protein response* (mtUPR) genannt wird [16, 17]. Als Folge

werden vor allem mitochondriale Proteasen und Chaperone verstärkt transkribiert, um so die aus der Balance geratene mitochondriale Proteostase wieder herzustellen. Eine globale Analyse konnte starke transkriptionelle Veränderungen bereits nach sehr kurzer MPP-Inaktivierung auch in der Hefe messen (frühe mtUPR) [15].

Während noch unklar ist, wie der MPP-Defekt an den Zellkern gemeldet wird, brachte die Analyse nukleärer Transkriptionsfaktoren eine überraschende Entdeckung. Der normalerweise im Zellkern lokalisierte Transkriptionsfaktor Rox1 wird nach der MPP-Inaktivierung in die Mitochondrien transportiert [15]. Rox1 bindet an die mtDNA, stabilisiert sie und hält die Transkription und so die Synthese der in der mtDNA codierten Proteine aufrecht (**Abb. 2**). Bei mitochondrialem Stress ist Rox1 damit essenziell für das Überleben der Zellen: Normalerweise wird die mtDNA von einem Protein der TFAM-Familie bedeckt, das in Hefe Abf2 heißt. Abf2 besitzt eine klassische Präsequenz und wird nach dem Import von MPP prozessiert. Ist MPP inaktiv, kann kein neues funktionelles Abf2 mehr gebildet werden. Genau hier liegt der Unterschied zu Rox1: Wie Abf2 wird es zwar entlang des Präsequenzweges in die Matrix importiert, seine Signalsequenz wird aber nicht von MPP abgespalten, sondern ist Bestandteil des reifen funktionellen Proteins [15]. Rox1 ist also MPP-unabhängig und kann so unter Stressbedingungen Abf2 ersetzen und die Expression der mtDNA aufrechterhalten.

Während nukleäre Transkriptionsfaktoren in der mtUPR in anderen Organismen ebenfalls eine zentrale Rolle spielen, überrascht die Relokalisierung von Rox1 vom Kern in die Mitochondrien, denn bisher war für die bislang bekannten Transkriptionsfaktoren das Gegenteil beschrieben worden: Die duale Lokalisierung wurde hier in die andere Richtung verschoben, so wird beispielsweise ATFS-1 in *C. elegans* aufgrund eines verminderten mitochondrialen Imports statt in die Mitochondrien in den Zellkern importiert, um die Transkriptionsänderungen auszulösen [16, 17]. Eine mögliche Erklärung für diese entgegengesetzten Beobachtungen könnte eine stufenweise zeitliche Abfolge in der mtUPR sein, bei der Rox1 in einer frühen Phase und ATFS-1 in einer späteren Phase relokalisiert wird. Neben der Frage nach der zeitlichen Abfolge in der mtUPR sind auch noch viele andere Fragen in diesem noch relativ jungen Forschungsgebiet offen: Wie

wird der Defekt festgestellt und dem Kern signalisiert? Sind die Prozesse von der Hefe hin zu humanen Zellen konserviert? Unterscheiden sich Stressantworten in verschiedenen Geweben? Und spielen zelluläre Stressantworten eine Rolle bei der Pathogenese von humanen Erkrankungen?

Danksagung

Die Arbeit in meiner Gruppe wird durch die DFG im Rahmen des Emmy-Noether-Programms, der Exzellenzstrategie CIBSS (EXC-2189 – Project ID 390939984), und des SFB 1381 (Project-ID 403222702) gefördert. ■

Literatur

- [1] Hansen KG, Herrmann JM (2019) Transport of proteins into mitochondria. *Protein J* 38: 330–342
- [2] Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1592: 63–77
- [3] Gomez-Fabra Gala M, Vögtle FN (2021) Mitochondrial proteases in human diseases. *FEBS Lett*, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14039>
- [4] Witte C, Jensen RE, Yaffe MP et al. (1988) MAS1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease. *EMBO J* 7: 1439–1447
- [5] Taylor AB, Smith BS, Kitada S et al. (2001) Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure* 9: 615–625
- [6] 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
- [7] Vögtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP et al. (2009) Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139: 428–439
- [8] Jobling RK, Assoum M, Gakh O et al. (2015) PMPCA mutations cause abnormal mitochondrial protein processing

in patients with non-progressive cerebellar ataxia. *Brain* 138: 1505–1517

- [9] Joshi M, Anselm I, Shi J et al. (2016) Mutations in the substrate binding glycine-rich loop of the mitochondrial processing peptidase- α protein (PMPCA) cause a severe mitochondrial disease. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2: a000786
- [10] Vögtle FN, Brändl B, Larson A et al. (2018) Mutations in PMPCB encoding the catalytic subunit of the mitochondrial presequence protease cause neurodegeneration in early childhood. *Am J Hum Genet* 102: 557–573
- [11] Braymer JJ, Lill R (2017) Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem* 292: 12754–12763
- [12] Sprenger HG, Wani G, Hesselting A et al. (2019) Loss of the mitochondrial i-AAA protease YME1L leads to ocular dysfunction and spinal axonopathy. *EMBO Mol Med* 11: e9288
- [13] Mossmann D, Vögtle FN, Taskin AA et al. (2014) Amyloid- β peptide induces mitochondrial dysfunction by inhibition of preprotein maturation. *Cell Metab* 20: 662–669
- [14] Kücükköse C, Taskin AA, Marada A et al. (2021) Functional coupling of presequence processing and degradation in human mitochondria. *FEBS J* 288: 600–613
- [15] Poveda-Huertes D, Matic S, Marada A, et al. (2020) An early mtUPR: redistribution of the nuclear transcription factor Rox1 to mitochondria protects against intramitochondrial proteotoxic aggregates. *Mol Cell* 77: 180–188
- [16] Callegari S, Dennerlein S (2018) Sensing the stress: a role for the UPRmt and UPRam in the quality control of mitochondria. *Front Cell Dev Biol* 6: 31
- [17] Vögtle FN (2021) Open questions on the mitochondrial unfolded protein response. *FEBS J* 288: 2856–2869

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. F.-Nora Vögtle
 Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH)
 Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
 Im Neuenheimer Feld 282
 D-69 120 Heidelberg
 n.voegtle@zmbh.uni-heidelberg.de
 www.voegtlelab.org

AUTORIN



F.-Nora Vögtle

2002–2007 Studium der Molekularen Medizin an der Universität Freiburg. 2007–2011 Promotion am Institut für Biochemie (Freiburg). 2011–2016 Postdoktorandin am Institut für Biochemie an der Universität Freiburg. 2016–2021 Emmy-Noether-Gruppenleiterin. Seit April 2021 Professorin (W3) am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH).

Hier steht eine Anzeige.



Springer