

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut
Lehrstuhl für Physiologische Chemie im Biomedizinischen Centrum
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Andreas G. Ladurner
Ehem. Vorstand: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Funktionelle Charakterisierung des mitochondrialen AAA-Proteins Msp1

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rachel Rui-Chi Zeng
aus Braunschweig

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Mitberichterstatter: PD Dr. Annette Müller-Taubenberger
PD Dr. Matthias Elstner

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiter: PD Dr. Dejana Mokranjac
Dr. Nikola Wagener

Dekan: Prof. Dr. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2018

Eidesstattliche Versicherung

Zeng, Rachel Rui-Chi

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Funktionelle Charakterisierung des mitochondrialen AAA-Proteins Msp1

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Göttingen, 12.09.2018

Ort, Datum

Zeng, Rachel

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Mitochondrien.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktionen	1
1.1.2 Importwege mitochondrialer Proteine	2
1.1.3 Qualitätskontrolle und Abbau mitochondrialer Proteine	3
1.1.3.1 Mitochondriale Chaperone und Proteasen	4
1.1.3.2 Mitochondriale Unfolded-Protein-Response (mtUPR).....	5
1.1.3.3 Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	5
1.1.3.4 Mitochondriale Dynamik und Mitophagie.....	6
1.1.4 Mitochondriale Fehlfunktion und neurodegenerative Erkrankungen	7
1.2 AAA-Proteine und ihre Funktionen in der Zelle	8
1.3 Das Protein Msp1	9
1.4 Hefe als Modellorganismus	9
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Molekularbiologische Methoden	11
2.1.1 DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	11
2.1.2 Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten	13
2.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten und Extraktion von DNA aus Gelen	13
2.1.4 Restriktionsverdau.....	14
2.1.5 Ligation von DNA	14
2.1.6 Transformation von <i>E.coli</i>	15
2.1.6.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für Transformation	15
2.1.6.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock	15
2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (<i>Mini-/ Midi-Präps</i>)	16
2.1.7.1 Mini-Präparation.....	16
2.1.7.2 Midi-Präparation.....	17
2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA	17
2.1.9 DNA-Sequenzierung.....	18
2.1.10 Klonierung von pYX242- <i>MSP1</i> zur Überexpression von <i>MSP1</i>	18
2.1.11 Weitere verwendete genetische Konstrukte	18
2.1.11.1 pVT100U-mtGFP	18
2.1.11.2 p416GPDp- <i>OM45-MYC-nonstop</i>	19
2.2 Methoden der Hefegenetik.....	19
2.2.1 Herstellung der PCR-Produkte zur homologen Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	19

2.2.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	19
2.2.3	Überprüfung der Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mittels PCR.....	20
2.2.4	Verwendete und hergestellte Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	21
2.2.5	Methoden der Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	21
2.2.6	Analyse des Wachstumsphänotyps auf fermentierbaren und nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Tüpfeltest).....	22
2.2.7	Halo-Assay zur Analyse der Auswirkung von chemischen Substanzen auf den Wachstumsphänotyp von Hefestämmen	23
2.3	Zellbiologische Methoden	23
2.3.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Morphologie	23
2.3.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Ultrastruktur	24
2.3.3	Untersuchung der Vakuolengröße in Hefezellen mittels konfokaler Lasermikroskopie.....	24
2.3.4	Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	25
2.3.4.1	Alkalische Lyse nach Yaffe und Schatz („Rödel-Aufschluss“).....	25
2.3.4.2	Einfache Alkalische Lyse nach Kushnirov	25
2.3.5	Isolation von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	26
2.3.6	Topologie-Analyse von mitochondrialen Proteinen mit Proteinase K- Behandlung.....	27
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford	28
2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.4.3	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)	29
2.5	Immunologische Methoden	30
2.5.1	Erzeugung polyklonaler Antikörper	30
2.5.2	Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	31
2.5.3	Immundekoration von Western Blots	32
2.5.4	Quantifizierung von Western Blots	33
2.6	Puffer und Medien	33
2.7	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte.....	34
3.	Ergebnisse	38
3.1	Topologie-Analyse von Msp1 mit Hilfe von Proteinase K- Behandlung.....	38
3.2	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von <i>MSP1</i> -Expressionsmutanten mittels Tüpfeltest.....	40
3.3	Mikroskopische Untersuchung der Mitochondrienmorphologie in <i>MSP1</i> - Expressionsmutanten	42
3.3.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Morphologie	42

3.3.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Ultrastruktur	43
3.4	Untersuchung des Einflusses von Msp1 auf die endogenen Proteinmengen in Mitochondrien	46
3.4.1	Msp1 beeinflusst die endogenen Proteinmengen von kleinen Intermembranraumproteinen	46
3.4.1.1	Endogene Proteinmengen in der <i>msp1</i> -Deletionsmutante	46
3.4.1.2	Endogene Proteinmengen in der <i>MSP1</i> -Überexpressionsmutante	49
3.4.2	Halo-Assay zur Analyse der Auswirkung von oxidativem und reduktivem Stress auf das Wachstum von <i>MSP1</i> -Expressionsmutanten	51
3.4.3	Untersuchung der endogenen Proteinmengen und des Zellwachstums bei <i>MSP1</i> - und <i>YME1</i> -Mutanten	53
3.5	Untersuchung des Einflusses von Msp1 auf die Mitophagie	55
3.5.1	Untersuchung zur endogenen Menge des vakuolären Proteins Vac8 in $\Delta msp1$	56
3.5.2	Untersuchung der Vakuolengröße in $\Delta msp1$ mittels konfokaler Lasermikroskopie	56
3.5.3	Untersuchung des Zellwachstums bei <i>MSP1</i> - und <i>ATG32</i> -Mutanten	58
3.5.4	Untersuchung der Mitophagie in <i>MSP1</i> - und <i>ATG32</i> -Mutanten	59
3.5.4.1	Mitophagie-Induktion durch Stickstoffmangel	59
3.5.4.2	Mitophagie-Induktion durch Rapamycin	61
3.6	Untersuchung von Msp1 im Zusammenhang mit dem Abbau mitochondrialer Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System	65
3.6.1	Msp1 wird unter Proteinfaltungsstress durch Hitze oder Zugabe von Chloramphenicol induziert	65
3.6.2	Untersuchung des proteasomabhängigen Abbaus mitochondrialer Proteine in <i>MSP1</i> -Expressionsmutanten	67
3.6.2.1	<i>MSP1</i> -Überexpression verlangsamt den Abbau von Om45-nonstop, einem Marker des proteasomabhängigen Proteinabbaus	67
3.6.2.2	Kleine Intermembranraumproteine akkumulieren bei Proteasominhibition durch MG-132 in <i>MSP1</i> -Überexpressionsmutanten	71
3.6.2.3	Deletion von <i>msp1</i> hemmt den Abbau von Tim10 über das Proteasom	73
4.	Diskussion	75
4.1	Msp1 beeinflusst die endogenen Konzentrationen von kleinen Intermembranraumproteinen	75
4.2	Msp1 beeinflusst den Abbau kleiner Intermembranraumproteine durch das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System	77
4.3	Bedeutung von Msp1 in der Proteinqualitätskontrolle in Mitochondrien und der Zelle	
	79	
5.	Zusammenfassung	81

6. Literaturverzeichnis	82
7. Abkürzungen	95
8. Danksagung.....	97

1. Einleitung

1.1 Mitochondrien

1.1.1 Aufbau und Funktionen

Mitochondrien sind als essentielle Zellorganellen in allen eukaryotischen, kernhaltigen Zellen vorzufinden. Zu den vielfältigen Funktionen im Stoffwechsel gehört in erster Linie die Bereitstellung der Energiequelle ATP durch oxidative Phosphorylierung. Darüber hinaus beherbergen sie eine Reihe von weiteren essentiellen Stoffwechselwegen. Dazu gehören der Citratzyklus, die β -Oxidation von Fettsäuren, der Harnstoffzyklus, die Synthese von Häm, Aminosäuren, Eisen-Schwefelclustern, die Regulation des intrazellulären Kalziums, sowie die Synthese und der Abbau von Proteinen¹⁻⁵. Des Weiteren spielen Mitochondrien eine entscheidende Rolle in der Regulation des programmierten Zelltods, der Apoptose, sowie in Alterungsprozessen der Zelle^{6,7}.

Der Aufbau von Mitochondrien wird wesentlich durch zwei hoch spezialisierte Doppellipidmembranen und die somit entstehenden Subkompartimente bestimmt: die Außenmembran grenzt das Zellorganell zum Zytosol ab und umschließt mit der Innenmembran den sogenannten Intermembranraum. Der von der Innenmembran gebildete Raum wird als Matrix bezeichnet. In der Matrix finden wichtige Stoffwechselwege wie beispielsweise der Citratzyklus oder der Harnstoffzyklus statt. Die Komponenten der Atmungskette sind hauptsächlich in und an der Innenmembran lokalisiert, wo durch Oxidation von NADH und FDH2 eine Elektronentransportkette entsteht, die den Protonengradienten zwischen Innenmembran und Matrix aufrechterhält. Dieser elektrochemische Gradient treibt wiederum die ATP-Synthase an, welche ATP synthetisiert⁸⁻¹⁰. Des Weiteren bildet die Innenmembran Einstülpungen, sogenannte Cristae, die zu einer Oberflächenvergrößerung führen^{11,12} und deren Morphologie stark vom Organismus, dem Gewebetyp und den Wachstumsbedingungen abhängt^{11,13-15}. An der mitochondrialen Außenmembran wiederum sind Proteine lokalisiert, die in wichtige Prozesse wie beispielsweise die Apoptose, die Autophagie von Mitochondrien (Mitophagie) und die Membranfusion und -teilung involviert sind.

1.1.2 Importwege mitochondrialer Proteine

Der Endosymbiontentheorie nach waren Vorläufer der Mitochondrien prokaryotische α -Proteobakterien, die mit eukaryotischen Vorläuferzellen eine Symbiose eingingen und somit die Vorteile der Atmungskette mitbrachten. Schließlich entwickelten sie sich zu zelleigenen, essentiellen Organellen^{16,17}. Mitochondrien besitzen weiterhin ein eigenes Genom und ein entsprechendes System für Transkription und Translation von Proteinen, jedoch wird ein Großteil der für den Aufbau und Funktion von Mitochondrien benötigten Proteine im Zellkern kodiert und nach Transkription an zytosolischen Ribosomen translatiert. Diese im Zytosol synthetisierten Proteine müssen ins Mitochondrium transportiert^{18,19} und den einzelnen Subkompartimenten richtig zugeordnet werden. Dazu existieren mehrere spezifische Transportsysteme, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen. Die genannten Proteinamen beziehen sich dabei auf die jeweiligen Proteine in *Saccharomyces cerevisiae*.

In der Außenmembran ermöglicht Porin die freie Diffusion von kleinen Molekülen bis zu einer Größe von 2-6 kDa in den Intermembranraum^{20,21}. Für den Transport größerer Proteine stehen Translokations-Komplexe zur Verfügung. Der TOM-Komplex (**T**ranslocase of the **o**uter **M**embrane) in der Außenmembran besteht aus mehreren Membranproteinen: Tom40 stellt den eigentlichen Kanal zur Passage von Proteinen dar und bildet mit dem Rezeptorprotein Tom22 und weiteren kleinen Tom-Proteinen den TOM-Kernkomplex. Tom20 und Tom70 wirken primär als Rezeptorproteine. Während Tom20 vor allem Proteine mit einem N-terminalen Sortierungssignal erkennt, dient Tom70 vorwiegend als Rezeptor für Proteine mit internen Sortierungssignalen. Beide vermitteln somit die mit mitochondrialen Sortierungssignal ausgestatteten Proteine aus dem Zytosol weiter an den TOM-Kernkomplex zum Import in den Intermembranraum oder zur Insertion in die Außenmembran^{18,22-26}. Zusätzlich zum TOM-Komplex ermöglicht der TOB-Komplex (topogenesis of mitochondrial outer-membrane beta-barrel proteins) die Insertion von β -barrel-Proteinen in die Außenmembran^{18,24,27}.

In der Innenmembran existieren zwei unterschiedliche Translokations-Komplexe: der TIM22-Komplex und der TIM23-Komplex (**T**ranslocase of the **i**nnner **M**embrane). Wie beim TOM-Komplex bestehen auch die TIM-Komplexe jeweils aus mehreren funktionellen Untereinheiten.

Der TIM22-Komplex erkennt zumeist sehr hydrophobe Proteine mit internem Sortierungssignal und inseriert diese in die Innenmembran, wobei die Untereinheiten Tim9-Tim10 und Tim8-Tim13 als Chaperone fungieren^{18,23,26,28-31}. Diese kleinen Tim-Proteine sorgen dafür, dass die Proteine beim Transport im ungefalteten Zustand bleiben und keine falschen Interaktionen ausbilden.

Der TIM23-Komplex transportiert Proteine mit N-terminalen Sortierungssignalen entweder in die Matrix oder inseriert sie lateral in die Innenmembran. Neben Tim23 gehören unter anderem Tim17, Tim50, Tim 21, das mitochondriale Chaperon mtHsp70, sowie die Proteine Tim16 (Pam16), Pam17, Tim14 (Pam18), Tim44 und Mge1 zum Translokationskomplex^{18,26,32-37}.

Um lösliche Proteine im Intermembranraum zu halten existiert ein Disulfid-Transfer-System mit den Proteinen Mia40 und Erv1. Substrate dieses Systems sind Proteine mit konservierten Cysteinmotiven, zum Beispiel Cox17, Cox19 und die kleinen Tim-Proteine (Tim 8, 9, 10, 12, 13). Beim Import in den Intermembranraum interagieren diese Proteine über ihre konservierten Cysteine mit Mia40 unter Ausbildung von Disulfidbrücken, die anschließend auf das Substrat übertragen werden. Dadurch wird die stabile Faltung dieser Proteine gewährleistet, wodurch sie den Intermembranraum nicht mehr durch den TOM-Komplex verlassen können. Erv1, ein Protein mit Sulphydryloxidase-Aktivität, wird eine Funktion zur Aufrechterhaltung von Mia40 in oxidierter Form zugeschrieben^{21,38-40}.

1.1.3 Qualitätskontrolle und Abbau mitochondrialer Proteine

Das mitochondriale Proteom unterliegt einer ständigen Dynamik von Synthese, Transport, Faltung und Abbau aller Proteine. Damit Mitochondrien einwandfrei funktionieren, muss ein Gleichgewicht zwischen diesen Prozessen bewahrt und fehlerhafte Abläufe korrigiert werden. Dabei stellen insbesondere fehlgefaltete Proteine eine Gefahr dar. Diese können zum einen ihre natürliche Funktion nicht erfüllen und zum anderen neigen sie dazu toxische Aggregate zu bilden, die die gesamte Zelle schädigen können. Als Nebenprodukt der Zellatmung und ATP-Synthese entstehen in Mitochondrien kontinuierlich auch Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS), die zusätzlich Proteine modifizieren und zur Fehlfaltung führen können. Fehlgefaltete Proteine müssen erkannt und wieder zu

ihrer richtigen Struktur verhelfen oder abgebaut werden. Dazu existiert ein komplexes System zur Proteinqualitätskontrolle, über das im Folgenden ein Überblick gegeben werden soll.

1.1.3.1 Mitochondriale Chaperone und Proteasen

Während Proteine mit mitochondrialen Sortierungssignal aus dem Zytosol in die verschiedenen mitochondrialen Kompartimente transportiert werden, müssen sie im ungefalteten Zustand gehalten werden^{18,30,41}. Erst am Ort ihrer Bestimmung erfolgt dann die Ausbildung der Tertiärstruktur und ggf. Assemblierung zu Proteinkomplexen. Um diese Prozesse sicherzustellen, agieren in Mitochondrien verschiedene Chaperone und Proteasen. Ein wichtiges Element im mitochondrialen Chaperon-System ist mtHsp70 (Ssc1 in *S. cerevisiae*), das den Proteinimport über die TOM- und TIM-Komplexe und die Proteinfaltung unterstützt^{41,42}. Bestimmte Matrixproteine erhalten zusätzliche Unterstützung durch die Chaperonine Hsp60 und Hsp10 bei der Faltung^{41,43}. Das Chaperonin Hsp78 kann aggregierte Proteine auflösen und zusammen mit mtHsp70 wieder zur richtigen Tertiärstruktur verhelfen^{44,45}.

Neben Chaperonen stellen ATP-abhängige Proteasen einen weiteren wichtigen Bestandteil des Proteinqualitätskontrollsystems dar. In der mitochondrialen Matrix sorgt die Protease Lon (Pim1 in *S. cerevisiae*) für den Abbau von denaturierten oder oxidativ geschädigten Proteinen^{41,46,47}. Dabei arbeitet Lon/Pim1 zusammen mit dem Chaperone-System, wobei letzteres die Substrate im ungefalteten Zustand hält, sodass der proteolytische Abbau durch Lon/Pim1 stattfinden kann^{48,49}. In der Innenmembran sind zwei AAA-Proteasekomplexe lokalisiert: die m-AAA Protease besteht in *S. cerevisiae* aus den Untereinheiten Yta10 und Yta12 und zeigt mit ihrer katalytischen Domäne in die Matrix; die i-AAA Protease Yme1 ist in die andere Richtung ausgerichtet und im Intermembranraum aktiv^{41,50}. Beide Proteasekomplexe sind für die Entfaltung und Abbau von Proteinen zuständig⁵¹, wobei Yme1 auch Chaperonaktivität im Intermembranraum nachgewiesen wurde⁵². Sie regeln somit die Proteinhomeostase in und um die Innenmembran, die als Sitz der Atmungskettenkomplexe und essentiellen Translokationskomplexe eine zentrale Rolle in Mitochondrien einnimmt.

1.1.3.2 Mitochondriale Unfolded-Protein-Response (mtUPR)

Als Antwort auf ausgeprägten Zellstress mit massiver Akkumulation von fehlerhaft gefalteten Proteinen wurden komplexe Signalwege u.a. für das Zytosol und endoplasmatische Retikulum identifiziert. Diese sogenannte **U**nfolded **P**rotein **R**esponse (UPR, dt. Antwort auf ungefaltete Proteine) führt mittels Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Synthese von Chaperonen und damit zur Neufaltung oder zum verstärkten Abbau fehl- oder ungefalteter Proteine und somit zur Wiederherstellung der Proteinhomöostase⁵³. Arbeiten insbesondere in *Caenorhabditis elegans* zeigen, dass eine solche UPR auch spezifisch für Mitochondrien existiert, die sogenannte mtUPR⁵⁴. Als Komponenten der mtUPR wurden bisher die Transkriptionsfaktoren DVE-1 und ATFS-1, ein Ubiquitin-ähnliches Protein UBL-5 und die mitochondrialen Proteine CLPP-1 und HAF-1 identifiziert⁵⁵⁻⁵⁷. Es wird angenommen, dass mtUPR initiiert wird, wenn die Menge ungefalteter Proteine in der Matrix die Kapazität der dortigen Chaperone überschreitet und ein Teil über die AAA+ Protease ClpXP degradiert werden. Die daraus resultierenden Peptide werden über den in der Innenmembran lokalisiertem ABC-Transporter HAF-1 bis ins Zytosol transportiert und bilden, neben dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, damit wahrscheinlich das Signal für die Aktivierung und Akkumulation des Transkriptionsfaktors ATFS-1 im Zellkern. Unterstützt wird die Transkriptionsaktivierung mitochondrialer Chaperone zusätzlich durch einen Komplex aus DVE-1 und UBL-5^{53,57}. Durch die Hochregulation von Chaperonen kann dann der Störung der Proteinhomöostase effektiv begegnet werden.

1.1.3.3 Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Neben mitochondrialen Chaperonen und Proteasen spielen neuen Erkenntnissen nach auch das zytosolische **U**biquitin-**P**roteasom-**S**ystem (UPS) eine Rolle in der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle. Das Proteasom ist ein primär im Zytosol lokalisierter Proteinkomplex und für den Abbau von Proteinen aus dem Zytosol und Endoplasmatischem Retikulum nach Konjugation an Ubiquitin zuständig⁵⁸. Neue Erkenntnisse zeigen wie das UPS auch beim Umsatz von mitochondrialen Proteinen, insbesondere Proteinen der Außenmembran involviert ist. So wurde in *S. cerevisiae* für das Außenmembranprotein Fzo1 ein UPS-abhängiger Abbauweg beschrieben, in dem Fzo1 durch die Ubiquitin-Ligase Mdm30 ubiquitinyliert und durch das Proteasom anschließend abgebaut wird⁵⁹. Weitere Ubiquitin-

Ligasen wurden ebenfalls bereits an der mitochondrialen Außenmembran identifiziert ⁶⁰. Über die Zwischenschritte zur Vermittlung von mitochondrialen Proteinen an das Proteasom zum proteolytischen Abbau ist bisher noch wenig bekannt. Für das zytosolische Protein Vms1 wurde jedoch bereits gezeigt, dass es unter oxidativem Stress die Proteine Cdc48 und Npl4 an die mitochondriale Außenmembran rekrutiert und somit eine entscheidende Rolle beim UPS-abhängigen Abbau mitochondrialer Proteine spielen könnte ⁶¹. Cdc48 und Npl4 werden bisherigem Wissen nach vor allem eine Rolle beim proteasom-abhängigen Abbau von fehlgefalteten Proteinen aus dem Endoplasmatischem Retikulum zugeschrieben ⁶². Neben dem Abbau maturierter Proteine gibt es auch Hinweise auf eine Funktion des UPS beim Abbau von mitochondrialen Proteinvorstufen. So werden möglicherweise Intermembranraumproteine, insbesondere die Mia40-Substrate, bereits vor ihrem Import vom UPS im Zytosol abgebaut und dadurch quantitativ reguliert ⁶³.

1.1.3.4 Mitochondriale Dynamik und Mitophagie

Eine weitere Möglichkeit Zellstress entgegen zu wirken liegt in der dynamischen Natur von Mitochondrien: die ständigen Fusions- und Teilungsprozesse mithilfe der mitochondrialer GTPasen Fzo1, Mgm1 und Dnm1 sowie weiterer assoziierter Proteine ^{64,65} bewirken eine Qualitätssicherung der Gesamtheit aller Mitochondrien einer Zelle. Durch Fusion von Mitochondrien entsteht eine Durchmischung des Gen- und Proteinpools, wodurch Defizite einzelner geschädigter Mitochondrien kompensiert werden können ^{66,67}. Mittels Teilung und Segregation werden wiederum stark geschädigte Organellen vom gesunden mitochondrialen Netzwerk abgespalten und der Mitophagie zugeführt ⁶⁸. Die Mitophagie beschreibt den autophagischen Prozess bei dem selektiv Mitochondrien von Vesikeln umhüllt dem Abbau durch das Lysosom oder Vakuole zugeführt werden. Neben Qualitätskontrolle wird auch die Anzahl an Mitochondrien an unterschiedliche metabolische Anforderungen durch Mitophagie stetig angepasst. So führt beispielsweise in Hefezellen der Wechsel von respiratorischen auf fermentierbaren Wachstumsmedien relativ schnell zu einer Abnahme von Mitochondrien, wobei der spezifische Abbau von Mitochondrien über Mitophagie vermutlich eine wichtige Rolle spielt ^{69,70}. In *S. cerevisiae* wurde bisher als bedeutender Faktor in der Initiierung der Mitophagie das mitochondriale Protein Atg32 identifiziert ^{71,72}. Atg32 ist ein Transmembranprotein der mitochondrialen Außenmembran

mit einer N-terminalen Domäne im Zytosol. Bei Induktion von Mitophagie wird Atg32 phosphoryliert und interagiert mit Atg11 und Atg8 zur Formation von Autophagosomen, wodurch die Mitochondrien dem phagolytischen Abbau zugeführt werden ^{73,74}.

1.1.4 Mitochondriale Fehlfunktion und neurodegenerative Erkrankungen

Mitochondrien sind in fast allen menschlichen Körperzellen vorhanden und nehmen dort vielfältige Funktionen im Stoffwechsel ein, sodass eine mitochondriale Fehlfunktion zu zahlreichen unterschiedlichen Erkrankungen führt und die verschiedensten Organsysteme betreffen kann. Aufgrund der entscheidenden Aufgabe von Mitochondrien zur Bereitstellung von Energie in Form von ATP sind bei mitochondrialer Dysfunktion jedoch insbesondere Gewebe mit hohem Energiebedarf, also Nervengewebe und Muskeln, betroffen. Neuronales Gewebe ist weiterhin durch eine geringe Regenerationsfähigkeit gekennzeichnet und somit besonders anfällig für jegliche Form von Zellstress. Für eine Reihe von neurologischen Erkrankungen wurden in den letzten Jahren mitochondriale Defekte als wichtiger Faktor in der Pathogenese identifiziert. Von hoher klinischer Relevanz sind dabei die Altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer ⁷⁵⁻⁷⁸, aber auch selteneren Erkrankungen wie die Amyotrophe Lateralsklerose ^{78,79}, Chorea Huntington ⁸⁰ und Prionenerkrankungen ⁸¹. Diese neurodegenerativen Erkrankungen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie meist erst mit zunehmendem Alter in Erscheinung treten. Während des Alterungsprozesses akkumulieren zelluläre Schäden durch Mutationen in der DNA und oxidativen Stress. Durch Defekte der mitochondrialen Atmungskette wird die Energieproduktion beeinträchtigt und vermehrt Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS) als Nebenprodukte gebildet, die wiederum schädigend auf ihre Umgebung wirken. Für die neurodegenerativen Erkrankungen wurden in Studien genetische und umweltbedingte Faktoren identifiziert, die in ihrer Konstellation mitochondriale Dysfunktion und oxidativen Stress fördern, wodurch als Folge neuronales Gewebe verfrüht und in großem Umfang zugrunde geht ^{82,83}. Eine Belastung mit ROS führt zu vermehrten Fehlbildungen von Proteinen, die akkumulieren und toxische Wirkungen entfalten können, wie z.B. in M. Alzheimer und M. Parkinson. In Anbetracht der genannten Faktoren in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen kommt der mitochondrialen Qualitätskontrolle eine

wichtige Rolle zu bei der Erhaltung der mitochondrialen Funktion, dem Abfangen von ROS und dem Abbau fehlgefalteter Proteine.

1.2 AAA-Proteine und ihre Funktionen in der Zelle

AAA-Proteine (AAA = ATPases Associated with diverse cellular Activities) bilden eine große Proteinfamilie mit vielfältigen zellulären Funktionen. Das gemeinsame Merkmal aller AAA-Proteine ist eine hoch konservierte ATP-Bindungsdomäne aus 200-250 Aminosäuren mit WALKER-A und -B-Motiven als funktional bedeutsame Proteinsequenzen. AAA-Proteine bilden Oligomere, meist in Form von Hexameren, und bilden somit ringförmige Strukturen mit einer zentralen Pore. Über diese zentrale Pore werden Substrate gebunden und prozessiert. Dabei kommt es durch Bindung und Hydrolyse von ATP zu Konformationsänderungen im Protein und diese mechanische Energie wird auf die zu bearbeitenden Substrate übertragen^{84,85}.

AAA-Proteine nehmen wichtige Rollen bei der Faltung, Entfaltung, Transport und Abbau von Proteinen sowie Assemblierung großer Proteinkomplexe ein und finden sich in den unterschiedlichsten Zellkompartimenten wieder. In Mitochondrien wurden bisher vier AAA-Proteine identifiziert, die von zentraler Bedeutung sind und in allen kernhaltigen Zellen von der Hefe bis zum Menschen konserviert sind. Die Funktionen dreier dieser AAA-Proteine sind bereits sehr gut verstanden. Die beiden AAA-Protein-Komplexe Yta10/12 und Yme1 sind ATP-abhängige Proteasen mit Lokalisation in der mitochondrialen Innenmembran und regeln dort die Proteinhomöostase (siehe auch Abschnitt 1.1.3.1.). Mutationen in den menschlichen Homologen führen zum Krankheitsbild der Spastischen Tetraplegie. So werden die Proteine auch als Paraplegin bezeichnet⁸⁶. Das dritte mitochondriale AAA-Protein Bcs1 ist ebenfalls in der Innenmembran verankert und nimmt eine wichtige Funktion in der Assemblierung der Atmungskette ein, indem es für den Transport und Insertion der essentiellen Untereinheit Rip1 in den Cytochrom-c-Reduktase-Komplex (Komplex III) verantwortlich ist⁸⁷⁻⁸⁹. Auch für Bcs1 sind Mutationen beschrieben, die genetische Erkrankungen auslösen, u.a. das GRACILE Syndrom und das Björnstad-Syndrom^{90,91}. Die Funktion eines vierten AAA-Proteins in Mitochondrien, Msp1, ist jedoch noch wenig verstanden, sodass Msp1 noch einer funktionellen und strukturellen Charakterisierung bedarf.

1.3 Das Protein Msp1

Das Gen *MSP1* wurde zuerst identifiziert im Rahmen eines Versuchs in Hefezellen zur Selektion von Komponenten, welche die Lokalisierung von mitochondrialen Proteinen zwischen Außenmembran und Intermembranraum beeinflussen⁹². Dabei wurde festgestellt, dass die Hochregulation eines bis dato nicht charakterisierten Genabschnitts zur Lokalisation eines Fusionsproteins bestehend aus der Signalsequenz von Tom70 (einem Außenmembranprotein) und dem reifen Cytochrom c_1 (einer katalytischen Untereinheit des respiratorischen Komplex III) von der Außenmembran in die Innenmembran führt. Dieses Gen wurde *MSP1* (**m**itochondrial **s**orting of **p**roteins) genannt. Weitere Analysen zeigten, dass das Genprodukt Msp1 ein hochkonserviertes Protein mit einer Molekülmasse von 40 kDa ist, das mit einer Transmembrandomäne in der Außenmembran verankert liegt und seine lösliche C-terminale Domäne zum Zytosol hin exponiert. Msp1 besitzt ein konserviertes ATP-Bindungsmotiv und gehört damit in die Gruppe der AAA-Proteine. Da AAA-Proteine bekannterweise insbesondere Funktionen in Proteinfaltung-, -abbau und -transport wahrnehmen, ist es denkbar, dass auch die Funktionsweise von Msp1 einem ähnlichen Mechanismus folgt. Msp1 selbst trägt allerdings keine Proteasedomäne. Des Weiteren ist Msp1 ein hochkonserviertes Protein, dessen kodierendes Gen sich in den Datenbanken aller total sequenzierter Genome wiederfindet, sodass eine wichtige Funktion des Proteins im zellulären Stoffwechsel angenommen werden kann.

1.4 Hefe als Modellorganismus

In dieser Arbeit dient die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus. *S. cerevisiae* gehört zu den einzelligen Pilzen und vermehrt sich durch Knospung. Als ideales Studienobjekt hat *S. cerevisiae* eine kurze Verdopplungszeit und lässt sich unter verschiedenen Wachstumsbedingungen einfach und in großen Mengen kultivieren. Besonders geeignet für die Erforschung von Mitochondrien ist die Eigenschaft von Hefezellen neben der oxidativen Phosphorylierung auch Fermentation zur ATP-Synthese zu betreiben. Damit sind viele Mutanten mit mitochondrialer Dysfunktion weiterhin überlebensfähig und einer molekulargenetischen Analyse zugänglich. Das Genom von *S.*

cerevisiae wurde als erstes aller eukaryotischen Organismen vollständig sequenziert ⁹³. Da sich die nicht-essentiellen Gene im Genom von *S. cerevisiae* relativ leicht in vivo deletieren lassen ^{94,95} und somit in experimentellen Ansätzen die Genprodukte auf ihre biologische Funktion hin untersucht werden können, existiert gegenwärtig für ca. 85% der fast 5800 Protein-codierenden Genen bereits ein grundlegendes Verständnis der Funktion ihrer Genprodukte ⁹⁶. Des Weiteren sind für ca. 1000 Gene Homologe im Menschen bekannt, die mit Erkrankungen assoziiert sind ⁹⁷. Somit können anhand von Studien an Hefe auch Rückschlüsse auf molekulare Mechanismen und biochemische Vorgänge und damit verbundene Krankheitsentstehung in menschlichen Zellen gezogen werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Über die physiologische Funktion des mitochondrialen AAA-Proteins Msp1 ist bisher nicht viel bekannt, trotz seiner hohen Konservierung von Hefe bis zum Menschen. Seine Lokalisation in der mitochondrialen Außenmembran steht im Gegensatz zu den anderen bisher bekannten membranständigen mitochondrialen AAA-Proteinen, die alle in der Innenmembran lokalisiert sind. Da AAA-Proteine generell Funktionen im Bereich der Proteinfaltung-, -abbau und -transport einnehmen, indem sie entfaltete Proteine durch ihre ATP-gesteuerte Pore translozieren und somit dem Abbau oder Assemblierung zuführen, wäre eine entsprechende Funktion von Msp1 an der Außenmembran anzunehmen. Msp1 könnte somit am Erhalt der Proteinhomöostase mitwirken, wobei eine Interaktion mit bekannten Proteinqualitätskontrollsystemen wie z.B. der Mitophagie oder dem Proteasom durch seine Lokalisation an der mitochondrialen Außenmembran denkbar wären.

Ziel dieser Arbeit ist somit die funktionelle Charakterisierung des mitochondrialen AAA-Proteins Msp1 im Modellorganismus Hefe insbesondere im Hinblick auf Funktionen im Proteintransport und des Abbaus von mitochondrialen Proteinen. Dazu sollen zunächst Deletions- und Überexpressionsmutanten von *MSP1* in Hefe generiert und deren Zellwachstum und Phänotypen charakterisiert werden. Anschließend soll untersucht werden, ob Deletion oder Überexpression von *MSP1* quantitative Veränderungen im mitochondrialen Proteom hervorrufen, um somit mögliche Substrate des AAA-Proteins zu identifizieren. Zuletzt soll noch der Einfluss von Msp1 auf die Mitophagie und den proteasomabhängigen

Abbau von mitochondrialen Proteinen analysiert werden, indem der Proteinabbau in den *MSP1*-Expressionsmutanten unter entsprechenden Bedingungen verfolgt wird.

Damit soll versucht werden die physiologische Funktion von Msp1 einzugrenzen und seine Rolle im zellulären Stoffwechsel zu verstehen.

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen durch wiederholte Denaturierung und anschließender Replikation entlang der Einzelstränge der Ziel-DNA. Dazu werden zwei verschiedene Primer benötigt. Primer sind synthetische Oligodesoxyribonukleide, deren Sequenz so gewählt wurde, dass sie komplementär zu der Sequenz jeweils eines Einzelstrangs der zu vervielfältigenden DNA ist. Nach Anlagerung an die komplementäre DNA-Sequenz werden die Primer an ihrem freien 3'-OH-Enden durch eine thermostabile DNA-Polymerase unter Einbau von Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) verlängert. Unter idealen Bedingungen verdoppelt sich somit die Anzahl an gewünschter DNA-Sequenz mit jedem Zyklus.

Als thermostabile Polymerasen kamen die *Taq*-DNA-Polymerase (NE Biolabs), die *Phusion-High-Fidelity*-DNA-Polymerase (NE BioLabs) und die *Q5-High-Fidelity*-DNA-Polymerase (NE Biolabs) zum Einsatz.

Ein typischer Reaktionsansatz für PCR:

Komponenten	50 µl Reaktionsansatz	Endkonzentration
DNA-Matrize (Template)	0,5 µl	Ca. 1 ng – 1 µg
DNA-Polymerase	0,5 µl	0,02 U/µl

100µM Forward Primer	0,3 µl	0,6 µM
100µM Reverse Primer	0,3 µl	0,6 µM
2mM dNTPs	5 µl	200 µM
5-fach Puffer (enthält MgCl ₂)	10 µl	1-fach (2mM MgCl ₂)
Nuklease-freies Wasser	auf 50 µl	

Nach vorsichtigem Mischen auf Eis und kurzem Abzentrifugieren wurde der Reaktionsansatz rasch in einen Thermocycler (Eppendorf Mastercycler gradient) transferiert, dessen Deckel bereits auf 98°C vorgeheizt wurde.

Ein typischer Ablauf für ein PCR-Programm:

Reaktionsschritte		Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung		98°C	30 sec.
30 Zyklen:	Denaturierung (=Trennung der Einzelstränge)	98°C	5-10 sec.
	Annealing (=Hybridisierung der Primer)	55-70°C	10-30 sec.
	DNA-Synthese (durch die DNA-Polymerase)	72°C	15-30 sec./kb
Abschließende DNA-Synthese		72°C	5-10 min.
Halten		4°C	

2.1.2 Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Nach Amplifikation durch PCR wurde das entstandene Reaktionsprodukts mithilfe der Agarosegelelektrophorese auf die korrekte Größe des DNA-Fragments hin untersucht. Dazu wurde zunächst das PCR-Produkt mit 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas 6x DNA Loading Dye) versetzt, der zur Markierung der Lauffront in der Gelelektrophorese anionische Farbstoffe enthält (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol FF; 60 % Glycerol und 60 mM EDTA).

Zur Herstellung der Agarosegele wurde zunächst Agarose (Serva) in TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst und bei 70°C aufbewahrt. Die Konzentration der Agarose betrug 1,5 % (w/v). Beim Gießen wurde der Gellösung ein DNA-Farbstoff (Serva DNA Stain Clear G) zur Detektion von Nukleinsäuren zugesetzt. Nach Erstarren des Gels bei Raumtemperatur wurde das Gel in eine mit TAE als Elektrodenpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingetaucht. Dann wurden die DNA-Proben aufgetragen, sowie parallel dazu eine Marker-DNA (Fermentas GeneRuler 1 kb DNA Ladder), um später die Größe der DNA-Fragmente im Vergleich mit den Standard-Bandenmuster der Marker-DNA ermitteln zu können. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 15 V/cm durchgeführt. Durch das elektrische Feld werden die negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung des Pluspols durch die Gelmaschen gezogen, wobei kürzere Fragmente schneller durchlaufen. Die DNA-Fragmente werden somit der Größe nach aufgeteilt. Das entstandene Bandenmuster konnte dann mithilfe des im Gel enthaltenen DNA-Farbstoffes und einem UV Illuminator visualisiert werden. Unter UV-Kontrolle wurde dann das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten zur weiteren Aufreinigung.

2.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten und Extraktion von DNA aus Gelen

Um PCR-Produkte direkt aufzureinigen oder um DNA-Fragmente aus Agarosegel zu extrahieren kam das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega) zur Anwendung. Dazu wurde zunächst dem ausgeschnittenem Gelfragment das 2-3fache Volumen an Bindelösung zugegeben (Membrane Binding Solution: 4,5 M Guanidinthiocyanat; 0,5 M Kaliumacetat pH 5,0) und bei 60°C für ca. 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert bis das

Gelfragment komplett aufgelöst war und kurz abzentrifugiert. Direkte PCR-Produkte wurden 1:1 mit der Bindelösung vermischt.

Zur DNA-Aufreinigung wurde das aufgelöste Gelfragment bzw. das PCR-Produkt auf ein Mikrozentrifugationssäulchen transferiert und nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min bei 16000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Dadurch wurde die DNA an das Säulenmaterial gebunden, der Durchfluss wurde verworfen. Die gebundene DNA wurde dann zuerst mit 700 µl Waschlösung (Membrane Wash Solution: 10 mM Kaliumacetat pH 5,0; 80 % Ethanol; 16,7 µM EDTA pH 8,0) und dann nochmal mit 500 µl Waschlösung gewaschen, wobei nach jedem Zentrifugationsschritt der Durchfluss verworfen wurde. Nach den Waschschritten wurde nochmals zentrifugiert, um den Puffer und darin enthaltenen Ethanol vollständig zu entfernen. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl nuklease-freiem Wasser eluiert.

2.1.4 Restriktionsverdau

Um eine bestimmte DNA-Sequenz in einen Vektor zu klonieren, müssen DNA und Vektor mit identischen Restriktionsendonukleasen behandelt werden, sodass die Restriktionsfragmente zueinander passen. Durch die Restriktionsendonukleasen erfolgt eine sequenzspezifische Spaltung von DNA. Es wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (NEB) benutzt und die vom Hersteller mitgelieferten zehnfach konzentrierten Puffer. Für 1 µg DNA wurden 1-2 U des entsprechenden Restriktionenzyms eingesetzt und die Reaktionsansätze bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Zum Aufreinigen der Reaktionsansätze kam wiederum das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega) zur Anwendung, wobei die verdaute DNA-Sequenz direkt aufgereinigt wurde, während der verdaute Vektor zunächst über Gelelektrophorese überprüft und erst dann über das Kit aufgereinigt wurde (vgl. 2.1.2. und 2.1.3.).

2.1.5 Ligation von DNA

Das Restriktionsfragment der DNA und der zugeschnittene Vektor werden mithilfe einer DNA-Ligase unter ATP-Verbrauch verknüpft. Die Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase der Firma New England Biolabs (NEB). Ein Ligationsansatz von insgesamt 20 µl enthielt 2 µl

Ligase, 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten zehnfach konzentrierten Puffers welches 10 mM ATP enthält, sowie ca. 50 bis 200 ng des zugeschnittenen Vektors, ein ungefähr dreifacher molarer Überschuss des zu klonierenden Fragments und die entsprechende Menge Wasser. Der Reaktionsansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert. 10 µl des Ligationsansatzes wurden dann direkt zur Transformation in *E.coli* eingesetzt (vgl. 2.1.6.2.).

2.1.6 Transformation von *E.coli*

2.1.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen für Transformation

5 ml einer Vorkultur von *E.coli* XL-1 Blue wurde in LB-Medium übernacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf 100 ml in frischem LB-Medium verdünnt und bis zur einer OD₅₇₈ von ca. 0.5 angezogen. Die folgenden Schritte erfolgten stets mit Kühlung auf Eis bzw. 4°C. Die Zellen wurden steril pelletiert durch Zentrifugation bei 4400 g für 15 min in einem Beckman-JA10-Rotor bei 4°C. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zell-Pellet in 40 ml sterilfiltriertem, eiskaltem Puffer 1 resuspendiert (30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin auf pH 5.8 mit 100 mM Essigsäure eingestellt) und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4400 g für 15 min wurden die Zellen in sterilfiltriertem, eiskaltem Puffer 2 resuspendiert (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% Glycerin, pH 6.5 mit KOH eingestellt) und erneut auf Eis für 15 min inkubiert. Die dann chemisch kompetenten Zellen wurden in Aliquote zu je 60 µl aufgeteilt und bei -80°C zur Lagerung rasch eingefroren.

2.1.6.2 Transformation kompetenter *E. coli* mittels Hitzeschock

Chemisch kompetente *E.coli*-Zellen, die bei -80°C gelagert waren, wurden auf Eis aufgetaut. 40-50 µl Aliquote der *E.coli*-Zellen wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes vorsichtig vermischt und für 10-30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 45-60 sec, direkt im Anschluss wurde der Ansatz nochmal für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz in 1 ml LB-Medium (ohne Ampicillin) mit Pipette suspendiert und für 30-60 min bei 37°C vorsichtig geschüttelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde ein Teil vom Überstand entfernt und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert und auf selektiven LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37

°C inkubiert. Die gewachsenen *E.coli*-Kolonien konnten dann im nächsten Schritt auf eine erfolgreiche Transformation hin untersucht werden (vgl. 2.1.7.1.).

2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini-/ Midi-Präps)

2.1.7.1 Mini-Präparation

Um kleine Mengen an Plasmid-DNA aus *E.coli* zu isolieren und sie auf eine gelungene Klonierung hin zu überprüfen wurde eine sogenannte Mini-Präparation durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden *E.coli*-Kolonien von der Platte gepickt und auf einer frischen LB-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert um den entsprechenden Stamm für spätere Verwendung aufzuheben. Die zum Ausstreichen verwendete Pipettenspitzen wurde dann jeweils in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin abgeworfen um die somit suspendierten *E.coli*-Stämme übernacht bei 37°C anzuziehen.

1-1,5 ml der Übernachtskultur wurde für 1 min bei 10,000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 D) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die *E.coli*-Zellen in 50 µl steriles Wasser resuspendiert. Die alkalische Lyse der *E.coli*-Zellen erfolgte durch die Zugabe von 300 µl TENS-Puffer (10mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA; 0,1 M NaOH; 0,5% SDS) mit darauffolgendem Vortexen für 10 sec. Nach Zugabe von 150 µl 3M Natriumacetat pH 4,5 zur Neutralisation erfolgte nochmals Vortexen für 10sec. Danach wurde für 10 min bei 14,000 rpm zentrifugiert, wodurch Proteine und andere Zellbestandteile ausfallen. Der Überstand mit der darin enthaltenen DNA wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 900 µl reines Ethanol gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14,000 rpm und Entfernen des Überstandes, wurde das Pellet mit 200 µl kaltes 70 % Ethanol gewaschen und nochmals für 10 min bei 14,000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand gründlich entfernt und die DNA für ca. 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Schluss wurde die getrocknete DNA mit 100 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurden 5 µl der präparierten Plasmid-DNA einem Restriktionsverdau zugeführt (vgl. 2.1.4.) und der Ansatz in der Gelelektrophorese (vgl. 2.1.2.) überprüft, wobei DNA-Ladepuffer mit RNase-Zusatz verwendet wurde.

2.1.7.2 Midi-Präparation

Um größere Mengen an Plasmid-DNA aus *E.coli* zu isolieren (Midi-Präparation) kam das PureYield Plasmid Midiprep System Kit (Promega) zur Anwendung.

Der entsprechende *E.coli*-Stamm wurde übernacht in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C angezogen. Die Übernachtskultur wurde in sterile Reagenzröhrchen überführt und die *E.coli*-Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 g (Eppendorf Centrifuge 5810 R) geerntet. Das Zellpellet wurde dann in 6 ml Lösung 1 resuspendiert (Promega Cell Resuspension Solution). Die Lyse der *E.coli*-Zellen erfolgte durch die Zugabe von 6 ml Lösung 2 (Promega Cell Lysis Solution) und 3-5 maligen Invertieren des Reagenzröhrchens. Nach Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur wurde zur Neutralisation 10 ml Lösung 3 hinzugegeben (Promega Neutralization Solution) und zum Mischen das Reagenzröhrchen 5-10 mal invertiert. Nachdem somit die Zellbestandteile in Form eines flockig-weißen Präzipitates ausgefällt wurden, wurde das Zelllysats für 10 min bei 4000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in die ineinander aufgesteckten Säulenaufsätze (Promega Clearing Column and Binding Column) überführt. Während dabei die groben Zellbestandteile und Proteine im Clearing Column zurückgehalten wurden, wurde die im Zelllysats gelöste chromosomale DNA an das Binding Column gebunden. Nach Durchtropfen des Lysats wurde das Clearing Column verworfen und das Binding Column in einem Reagenzröhrchen nochmals für 5 min bei 4000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde mit 20 ml der ethanolhaltigen Waschlösung (Promega Column Wash Solution) gewaschen und für 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Um das Ethanol verdampfen zu lassen, wurde dann nochmals für 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Schließlich wurde das Clearing Column auf ein neues Reagenzröhrchen gesteckt und die DNA mit 600 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1500 g wurde die filtrierte DNA in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde die Extinktion bei 260 nm (OD₂₆₀) in einem Spektrophotometer (Eppendorf BioPhotometer plus) bestimmt. Dazu wurde die aus der Midi-Präparation gewonnene DNA 1:100 in Wasser

verdünnt, in eine Küvette überführt und im Photometer vermessen. Dabei entsprach eine OD₂₆₀ von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.1.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte auswärtig durch die Firma MWG Eurofins.

2.1.10 Klonierung von pYX242-*MSP1* zur Überexpression von *MSP1*

Zur Generierung des Plasmids pYX242-*MSP1* zur Überexpression von *MSP1* wurde der offene Leserahmen (OLR) von *MSP1* mittels PCR und den Primern *Msp1 for Nco1* und *Msp1 rev StopHindIII* aus genomischer DNA des Wildtyp-Hefestamms W303α amplifiziert. Das resultierende DNA-Fragment wurde dann über die in den Primern enthaltenen Restriktionsschnittstellen *Nco1* und *HindIII* in den Vektor pYX242 (Novagen) kloniert, einem Hefe-Expressionsvektor mit LEU-Marker unter der Kontrolle eines TP1-Promotors.

Primer *Msp1 for Nco1*:

5'-GCG CCA TGG GTA TGT CTC GCA AAT TTG ATT TAA AAA CG- 3'

Primer *Msp1 rev StopHindIII*:

5'-GCG AAG CTT TTA ATC AAG AGG TTG AGA TGA C- 3'

2.1.11 Weitere verwendete genetische Konstrukte

2.1.11.1 pVT100U-mtGFP

pVT100U-mtGFP verfügt über einen konstitutiven ADH-Promotor und kodiert für ein Fusionsprotein aus der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 der Fo-ATPase aus *N. crassa* (Pre-Su9) und GFP von *Aequorea victoria* mit S65T Mutation, wodurch das GFP in die mitochondriale Matrix sortiert wird⁹⁸. Somit ermöglicht das Plasmid die Analyse von Mitochondrien in lebenden Hefezellen unterm Fluoreszenzmikroskop.

2.1.11.2 p416GPDp-OM45-MYC-nonstop

p416GPDp-OM45-MYC-nonstop ist ein Plasmid zur Expression von Om45-myc-nonstop Proteinen unter der Kontrolle eines GPD1-Promotors. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Toshiaki Izawa zur weiteren Verwendung überlassen.

2.2 Methoden der Hefegenetik

2.2.1 Herstellung der PCR-Produkte zur homologen Rekombination in *S. cerevisiae*

Zur homologen Rekombination und Deletion von Genen in *S. cerevisiae* wurden DNA-Sequenzen konstruiert, die heterologe Markergene enthalten und an den flankierenden Regionen wiederum homolog zu den korrespondierenden Regionen links und rechts des auszuschaltenden Gens sind. Dazu benötigt man Primer, welche für jeweils einen Bereich von 50 bp homolog zu den flankierenden Regionen des Zielbereiches sind und ein Plasmid, das die Resistenzkassette und das Markergen enthält. In dieser Arbeit kamen insbesondere die Plasmide pFA6-kanMX4 mit Resistenz gegen Kanamycin und pFA6-hphMX mit Resistenz gegen Hygromycin B basierend auf kanMX-Kassetten, zum Einsatz. Mittels PCR (vgl. 2.1.1.) wurde das Fragment amplifiziert und eine Probe davon über Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.1.2.) auf die korrekte Größe hin überprüft. Das entstandene PCR-Produkt konnte dann im nächsten Schritt in den gewünschten Hefestamm transformiert werden (vgl. 2.2.2.), wobei das auszuschaltende Gen durch die zurechtgeschnittene Resistenzkassette ersetzt wird.

2.2.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Der zu transformierende Stamm von *S. cerevisiae* wurde in 10 ml YP-Medium mit 2 % Glucose (YPD) übernacht kultiviert. Am Tag der Transformation wurde die Kultur auf OD₆₀₀ 0,2 verdünnt und bis zur eine OD₆₀₀ von 1 angezogen. Anschließend wurden Zellen aus 5 ml der Kultur in sterilen Reagenzröhrchen durch Zentrifugation für 30 sec. bei 3000 g (Eppendorf Centrifuge 5810 R) geerntet. Die Zellpellets wurden in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und für 30 sec. bei 10,000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 D). Das somit gewaschene Zellpellet wurde in 1 ml Lösung A resuspendiert, erneut für 30 sec. bei 10,000

rpm pelletiert und in 100 µl Lösung A resuspendiert. Die nun kompetenten Hefezellen waren somit bereit für die Transformation. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µg denaturierter Lachsspermien-DNA, 1-2 µg PCR-Produkt zur homologen Rekombination und 300 µl frisch hergestellter Lösung B gemischt. Der Transformationsansatz wurde dann für 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert bevor ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C erfolgte. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 30 sec. bei 10,000 rpm pelletiert, in 1 ml YPD-Medium resuspendiert und für 1 Stunde bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder pelletiert und nach Waschen mit 1 ml sterilem Wasser schließlich in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf Medium mit dem entsprechenden Selektionsmarker und Selektionsantibiotikum ausplattiert und die Platten bei 30°C inkubiert. Als Selektionsantibiotikum diente je nach transformierter Resistenzkassette Kanamycin oder Hygromycin B. Zur Gewinnung einer Reinkultur wurden Einzelkolonien gepickt und erneut auf Selektionsplatten vereinzelt. Einzelkolonien von diesem Ausstrich wurden weiter kultiviert. Die Kontrolle erfolgte mittels PCR (vgl. 2.2.3) oder bei Vorhandensein spezifischer Antikörper mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodekoration.

Lösung A

100 mM Lithiumacetat (pH 7,5 mit Essigsäure eingestellt), 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5.

Lösung B

40 % (w/v) Polyethylenglycol, 100 mM Lithiumacetat (pH 7,5 durch Zugabe von Essigsäure), 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5.

Die Lösungsbestandteile wurden vor der Verwendung filtersterilisiert.

2.2.3 Überprüfung der Transformation von *S. cerevisiae* mittels PCR

Mittels einer Pipettenspitze wurde eine kleine Menge an Zellen der zu überprüfenden Hefekolonie aufgenommen und in 30 µl 20 mM NaOH resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 15 min bei 98°C. Nach Zugabe von 70 µl Wasser wurden die Zellen für 1 min bei 12,000 rpm pelletiert. 1

µl des Überstandes wurde als DNA-Matrize für die nachfolgende PCR (vgl. 2.1.1.) verwendet. Als Primer kamen dieselben wie zur Herstellung der Resistenzkassette (vgl. 2.2.1.) zum Einsatz. Das entstandene PCR-Produkt wurde dann mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.1.2.) auf seine Größe hin überprüft, wodurch eine korrekte Integration der Resistenzkassette in das Genom der Hefezelle nachgewiesen werden konnte.

2.2.4 Verwendete und hergestellte Stämme von *S. cerevisiae*

Stamm	Genotyp
YPH499	<i>MATα, ade2-101, his3-Δ200, leu2, trp1-Δ63, ura3-52, lys2-801</i>
W303 α	<i>MATα, ade2-1, his3-11, 15 leu2, 112 trp1, ura23-53, can1-100</i>
W303 α +MSP1	W303 + pYX242- MSP1 (<i>LEU2</i>)
Δ <i>msp1</i>	W303, <i>YGR028w::kanMX4</i>
Δ <i>yme1</i>	W303, <i>YPR024w::hphMX4</i>
Δ <i>yme1</i> + MSP1	W303, <i>YPR024w::hphMX4</i> + pYX242- MSP1 (<i>LEU2</i>)
Δ <i>msp1</i> Δ <i>yme1</i>	W303, <i>YGR028w::kanMX4, YPR024w::hphMX4</i>
BY4741	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>
Δ <i>msp1</i>	BY4741, <i>YGR028w::kanMX4</i>
Δ <i>atg32</i>	BY4741, <i>YIL146c::hphMX4</i>
Δ <i>msp1</i> Δ <i>atg32</i>	BY4741, <i>YGR028w::kanMX4, YIL146c::hphMX4</i>

2.2.5 Methoden der Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte nach Standardverfahren⁹⁹. Zur langfristigen Lagerung wurden die Hefezellen in 15 %-iger (v/v) Glycerollösung suspendiert und bei -80°C tiefgefroren. Davon wurden, um eine frische Kultur anzuziehen, Zellen auf Kulturplatten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Nach Anwachsen der Hefekolonien konnten die Zellen in Flüssigkultur überführt werden. Anhand eines Photometers wurde die Zelldichte in den Flüssigkulturen bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Bei einer OD_{600} von ca. 0,5-1,5 befinden sich die Hefezellen in der logarithmischen Wachstumsphase, darüber hinaus verlangsamt sich das Wachstum der Zellen bis sie stagniert. Bezüglich Medien standen Vollmedium (YP-Medium)

oder Selektivmedium mit variablen Zusatz von Aminosäuren (S-Medium) zur Verfügung; als Kohlenstoffquelle wurde entweder Glukose, Galaktose, Glycerin oder Laktat gewählt. Hefezellen zeigen die höchste Wachstumsrate mit fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Glukose und Galaktose, auf respiratorischem Kohlenstoffquellen wie Glycerin und Laktat ist das Wachstum langsamer, dafür ist die Ausbeute an Mitochondrien größer da Energie nur über oxidative Phosphorylierung an der Atmungskette gewonnen werden kann. Die grundlegenden Supplemente im Selektivmedium waren je nach Auxotrophiemarker Adenin, Uracil, Leucin, Lysin, Histidin und Tryptophan. Bei schwachen Wachstumsphänotypen wurden diese Supplemente in erhöhter Konzentration zusammen mit zusätzlichen Aminosäuren dem Selektivmedium hinzugefügt, was in dieser Arbeit mit Dropout-Mix (SC-Medium) benannt wurde.

2.2.6 Analyse des Wachstumsphänotyps auf fermentierbaren und nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Tüpfeltest)

Zur Analyse des Wachstumsphänotyps erfolgte ein so genannter Tüpfeltest. Dazu wurden die zu testenden Hefestämme bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, Zellen geerntet und einmal mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und auf eine exakte $OD_{600} = 1$ konzentriert. Von dieser Zellsuspension wurde dann eine Verdünnungsreihe erstellt mit OD_{600} 0,1 – 0,01 – 0,001 – 0,0001 – 0,00001 und jeweils 3,5µl in einer Reihe auf eine Medium-Platte getropft. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation wurde das Wachstum der unterschiedlichen Verdünnungen ausgewertet. Im Tüpfeltest konnten somit der Wachstumsphänotyp unterschiedlicher Hefestämme miteinander verglichen werden, z.B. Wildtyp vs. Mutante. Außerdem konnte das Wachstum auf unterschiedlichen Medien, z.B. fermentierbare und nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen, und unterschiedlichen Temperaturen getestet werden.

2.2.7 Halo-Assay zur Analyse der Auswirkung von chemischen Substanzen auf den Wachstumsphänotyp von Hefestämmen

Der Halo-Assay erfolgte nach Frand und Kaiser¹⁰⁰. Hefestämme wurden übernacht bei 30°C angezogen. Die Übernachtskulturen wurden verdünnt und in logarithmischer Wachstumsphase geerntet. Die Zellen wurden in Wasser resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,01 verdünnt. Von der Zellsuspension wurden dann 100µl gleichmäßig auf Kulturplatten verteilt und in die Mitte des Zellrasens ein steriles Filterpapierscheibchen gelegt, das dann mit der zu testenden chemischen Substanz getränkt wurde. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert und die sich ausbildenden Wachstumshemmhöfe beurteilt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Morphologie

Um Hefezellen unterm Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich ihrer mitochondrialen Morphologie untersuchen zu können, wurden die zu untersuchenden Hefestämme mit dem Konstrukt pVT100U-mtGFP transformiert, welches ein Fusionsprotein aus einer mitochondrialen Presequenz, pre-Su9, zusammen mit dem grün fluoreszierende Protein GFP exprimiert⁹⁸. Dadurch können die Mitochondrien mittels Anregung des fluoreszierenden GFPs betrachtet und hinsichtlich ihrer Morphologie beurteilt werden. Die transformierten Hefen wurden in Selektivmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle bei 30°C angezogen und in entweder logarithmischer oder stationärer Wachstumsphase für das Fluoreszenzmikroskop präpariert. Die morphologische Untersuchung der Hefezellen erfolgte mittels einem Fluoreszenzmikroskop mit Ölimmersionsobjektiv (Carl Zeiss, Axioplan 2 wide field fluorescence microscope). Für die Analyse von GFP betrug die Wellenlänge zur Anregung 450 bis 490nm, Emission >515 nm¹⁰¹. Mit einer Kamera (Intas, Evolution VF Mono Cooled monochrome camera) wurden Aufnahmen der untersuchten Zellen in nativ und mit Fluoreszenz gemacht. Mikroskop und Kamera wurden durch die Image ProPlus 5.0 und Scope Pro 4.5 Software (Media Cybernetics) gesteuert. Die Aufnahmen wurden dann hinsichtlich der Anzahl und Morphologie der Mitochondrien in unterschiedlichen Hefestämmen ausgewertet.

2.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Ultrastruktur

Hefezellen wurden in Flüssigmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle in einer Übernachtskultur bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit Glutaraldehyd fixiert, mit Osmiumtetroxid und Uranylacetat kontrastiert und in Epoxidharz eingebettet (Methode nach ¹⁰²). Ultradünnschnitte von 50-70 nm Dicke wurden mittels einem Ultracut EM UC6 Ultra-Mikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) mit Diamantklinge (Typ Ultra 45°; Diatome, Biel, Switzerland) hergestellt, auf einem Pioloform-beschichtetem Kupfernetz (Plano, Wetzlar, Germany) gesammelt und mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt (Methode nach ¹⁰³). Die Untersuchung der zellulären Ultrastruktur erfolgte mit einem EM 902A Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) bei 80 kV. Aufnahmen wurden mit einer 1,350 × 1,050 Pixel Erlangenshen ES500W CCD-Kamera (Gatan, Pleasanton, CA, USA) und der Digital Micrograph Software (version 1.70.16, Gatan) gemacht.

2.3.3 Untersuchung der Vakuolengröße in Hefezellen mittels konfokaler Lasermikroskopie

Hefezellen wurden in Flüssigmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle bei 30°C kultiviert. Die Übernachtskulturen wurden einmal verdünnt und weiter bei 30°C bis zur stationären Wachstumsphase angezogen (OD>6). Um die Vakuolen in den Hefezellen für Fluoreszenzmikroskopie anzufärben wurden die Zellen geerntet, in 10 mM *Cell Tracker Blue CMAC* (Thermo Fisher Scientific, präpariert nach Herstellerangaben) resuspendiert und für ca. 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen und Entfernung des Zellfarbstoffs wurden die Zellen für das Fluoreszenzmikroskop präpariert. Die fluorezenzmikroskopische Untersuchung der Vakuolen erfolgte mithilfe eines Konfokalen Lasermikroskops mit Ölimmersionsobjektiv (Leica TCS SP5 Confocal). Die Maxima für Exzitation und Emission lagen bei 353 nm und 466 nm. Der Abstand zwischen den einzelnen Schnittebenen betrug ca. 500 nm. Die Auswertung erfolgte mittels der LAS AF – Software (Leica) und Adobe Photoshop.

2.3.4 Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus *S. cerevisiae*

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus ganzen Hefezellen für Western-Blot Analysen kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Am Anfang dieser Arbeit wurde noch die Methode nach Yaffe und Schatz ¹⁰⁴, auch „Rödel-Aufschluss“ genannt, zur Extraktion von Gesamtzellprotein angewandt, später wurde sie durch die einfache alkalische Lyse nach Kushnirov ¹⁰⁵ ersetzt, welches eine deutlich zeiteffizientere und verlässliche Methode darstellte.

2.3.4.1 Alkalische Lyse nach Yaffe und Schatz („Rödel-Aufschluss“)

Der zu untersuchende Hefestamm wurde in Flüssigkultur angezogen und 0,5 OD₆₀₀ durch Zentrifugation für 30 sec bei 15,000 g in einer Tischzentrifuge geerntet. Das Zellpellet wurde mit 300 µl TE-Puffer gewaschen und in 500 µl Wasser resuspendiert. Dann erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 75 µl 1,85 M NaOH, 7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 10 mM PMSF und 10 % (v/v) Ethanol („Rödel-Lösung“). Die Probe wurde gemischt und für 10min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Proteinfällung durch Zugabe von 400 µl 72 % (w/v) TCA und Inkubation für 10 min bei -20°C. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 20,000 rpm und 4°C (Sigma Zentrifuge 3K30). Die Pellets wurden mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen und nochmals für 10 min bei 20,000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Pellets für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet, in 20 µl SDS-Probenpuffer ¹⁰⁶ resuspendiert und für 3 min bei 95°C aufgeköcht. Danach erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

2.3.4.2 Einfache Alkalische Lyse nach Kushnirov

Der zu untersuchende Hefestamm wurde in Flüssigkultur angezogen und 2,5 OD₆₀₀ durch Zentrifugation für 30 sec bei 15,000 g geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 µl Wasser resuspendiert, dann erfolgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 100 µl 0,2 M NaOH. Die Proben wurden gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 14,000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417R) und Abnahme des Überstands, wurden die Pellets in 50 µl SDS-Probenpuffer ¹⁰⁶ resuspendiert und für 3min bei 95°C aufgeköcht. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 14,000 rpm

wurden 10 µl des Überstandes in jeweils eine Proben tasche des SDS-Gels aufgetragen und die Gesamtzellextrakte mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.3.5 Isolation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolation von Mitochondrien aus Hefezellen erfolgte in einer modifizierten Version der Methode nach Daum¹⁰⁷.

Hefestämme wurden bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1,2 in flüssigem Laktatmedium angezogen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm und Raumtemperatur geerntet (Beckman Avanti™ J-25 Centrifuge, Rotor JA-10). Anschließend wurde das Zellpellet mit destilliertem Wasser gewaschen und das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt. Pro Gramm Feuchtgewicht wurden die Zellen in 2 ml Puffer 1 resuspendiert und für 10 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden die Zellen einmal in 1,2 M Sorbitol gewaschen und zum Verdau der Zellwände in 6,7 ml Puffer 2 mit 3 mg Zymolyase pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und für 30 - 60min bei 30°C geschüttelt.

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten durchgehend bei 4°C bzw. auf Eis. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2500 rpm wurden die Zellen in 6,6 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und die Zellmembranen mit Hilfe eines Teflonhomogenisators durch ca. 10 Stöße aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde nochmals mit 6,6ml Homogenisierungspuffer pro Gramm Feuchtgewicht verdünnt und für 5min bei 3300rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert, wodurch die gelösten Zellorganellen von noch intakten Zellen, Zellkerne und Membranen getrennt wurden. Anschließend wurde der Überstand für 12 min bei 10,000 rpm zentrifugiert, wobei die Mitochondrien pelletieren. Das mitochondrienhaltige Pellet wurde insgesamt zweimal mit je 10 ml SH-Puffer gewaschen und in kleineren Behälter für 12 min bei 12,000 rpm (Rotor JA-25,50) zentrifugiert. Anschließend wurden die Mitochondrien in 0,3 – 0,5ml SH-Puffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (vgl. 2.4.1.), anschließend wurden die isolierten Mitochondrien mit SH-Puffer auf eine Proteinkonzentration von ca. 10 mg/ml eingestellt, in 30 µl Aliquote aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°.

Puffer 1

100 mM Tris (pH nicht eingestellt); 10 mM DTT

Puffer 2

1,2 M Sorbitol; 20 mM KH₂PO₄ pH 7,4; 3 mg Zymolyase/g Feuchtwicht

Homogenisierungspuffer

10 mM Tris/HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,2 % BSA fatty acid free; 1 mM PMSF; 0,6 M Sorbitol

SH-Puffer

0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES

2.3.6 Topologie-Analyse von mitochondrialen Proteinen mit Proteinase K- Behandlung

Je 15 µl isolierte Mitochondrien wurden mit folgenden Puffern 1:10 verdünnt: In Probe A und B wurden die Mitochondrien in isoosmotischen SH-Puffer verdünnt, in Probe C erfolgte eine osmotische Schockbehandlung mit 20 mM HEPES pH 7,4 und damit die Zerstörung der Außenmembran durch Schwellen des Matrixraumes, in Probe D wurden die Mitochondrien komplett lysiert durch Zugabe von 20 mM HEPES pH 7,4 mit 0,1 % (v/v) TritonX-100. In den Proben B, C und D erfolgte die Zugabe von 100 µg/µl Proteinase K. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 200 mM PMSF wurde der Verdau für 10 min terminiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 14,000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417R) wurden die Pellets in 500 µl SH-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 100 µl 72 % (w/v) TCA und Inkubation für 30 min bei -80°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde dann erneut für 20 min bei 14,000 rpm und 4°C zentrifugiert und mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen und gründlich getrocknet. Schließlich wurden die Pellets in SDS-Probenpuffer¹⁰⁶ aufgenommen und der Proteinverdau in den verschiedenen mitochondrialen Kompartimente mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

SH-Puffer

0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach der Methode von Bradford¹⁰⁸ mit dem Bio-Rad-Proteinassay nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Für die Ermittlung der Konzentrationen wurde eine Eichgerade mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt, dabei wurden die Extinktionen bei 595 nm bei BSA-Konzentrationen von 1, 3, 6, 9 und 12 µg/ml gemessen. Die Messungen der Proteinkonzentrationen in Lösungen erfolgten mithilfe des Spektrophotometers (Eppendorf BioPhotometer plus).

2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (kurz SDS-PAGE) nach Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt (Methode nach¹⁰⁶). Der Aufbau bestand im Wesentlichen aus zwei Glasplatten von 160x180 mm und dazwischen liegende Abstandshalter von 1 mm Dicke. Bei der Gelherstellung wurde zwischen Bodengel, Trenngel und Sammelgel unterschieden, welche unterschiedliche Puffer enthielten. Als Gelbildner diente 30 % w/v Acrylamid/Bis Lösung, die Polymerisation geschah durch Zugabe des Katalysators TEMED und das Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS). Die Gellösungen wurden zwischen die Glasplatten gegossen, wobei bei jeder Gellösung die vollständige Polymerisation abgewartet wurde, bevor die nächste Gellösung dazukam. Zuerst wurde das Bodengel zur Abdichtung gegossen, anschließend das Trenngel mit einer zusätzlichen Schicht Isopropanol, und nach Polymerisation des Trenngels und Entfernung des Isopropanols schließlich das Sammelgel mit Einsetzen eines Probenkamms für die späteren Probenaschen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Probenkamm wieder vorsichtig herausgezogen.

Die zu analysierenden Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer¹⁰⁶ aufgenommen und zur Denaturierung für 2-3 min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden dann in die Probenaschen vom Gel aufgetragen, welches im SDS-Laufpuffer eingelegt war. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA für 2-2,5 h, wobei die negativ geladenen Proben in Abhängigkeit von ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel wandern.

Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenmarker auf das Gel geladen, um später die Größe der Proteine im Vergleich mit dem Standard-Bandenmuster des Markers ermitteln zu können (Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker).

Bodengel:

20 % Acrylamid; 0,12 % Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; zur Polymerisation 0,05 % APS und 0,25 % TEMED

Trenngel:

16 % Acrylamid; 0,08-0,13 % Bisacrylamid; 386 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; zur Polymerisation 0,06 % APS und 0,06 % TEMED

Sammelgel:

5 % Acrylamid; 0,03 % Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1 % SDS; zur Polymerisation 0,05 % APS und 0,1 % TEMED

SDS-Laufpuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,3; 0,38 M Glycin; 0,1 % SDS

SDS-Auftragspuffer (Laemmli-Puffer):

60 mM Tris/HCl; 2% SDS; 5% β -Mercaptoethanol; 10% Glycerin; 0.02% Bromphenolblau, pH 6.8

2.4.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)

Nachdem die Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt wurden erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western Blot. In dieser Arbeit wurde der Western Blot ausschließlich in Wet Blot Verfahren durchgeführt. Blotting-Kassette, Schwämme, Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden zuerst in Blot-Puffer eingetaucht. Das Trenngel wurde vorsichtig aus der Elektrophoresekassette herausgelöst und auf die Membran platziert. Bei Assemblierung von Gel und Membran zwischen zwei Filterpapiere, zwei Schwämme und der Blotting-Kassette wurde insbesondere darauf geachtet keine Luftblasen einzubauen, die den Proteintransfer stören könnten. Die

zusammengebaute Kassette wurde in die mit Blot-Puffer gefüllte Blot-Kammer gestellt, der Proteintransfer erfolgte dann bei 380 mA für 45 min. Nach Abschluss des Blottings wurde die Membran zur Visualisierung der Proteinbanden mit Ponceau-Lösung gefärbt, mit entsalztem Wasser kurz gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Vor Beginn der Immundekoration (vgl. 2.5.3.) wurde die Membran vollständig mit TBS-Puffer wieder entfärbt.

Blot Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,01 – 0,1 % SDS; pH 8,3

Ponceau-Lösung: 0,3 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Erzeugung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wurden Kaninchen mit Antigenen immunisiert. Als Antigene dienten dabei rekombinante Proteine, die in *E.coli* exprimiert wurden (vgl. 2.1.1. – 2.1.10.). Zur Primärimmunisierung wurden 200 µl (1 µg/µl) der Antigenlösung mit 200 µl TiterMax Gold (Sigma) gemischt und dem Kaninchen subkutan an mindestens drei Stellen injiziert. Weitere Immunisierungen erfolgten im Abstand von vier Wochen mit jeweils 200 µl Antigenlösung versetzt mit 200 µl Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma). Ab der zweiten Immunisierung wurden ca. zehn Tage nach jeder Injektion aus der Ohrarterie des Kaninchens 20-25 ml Blut entnommen. Nachdem das Blut bei Raumtemperatur geronnen war, wurde es einmal für 5 min bei 3,000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand nochmal für 12 min bei 12,000 g und 4°C zentrifugiert. Somit wurde das Serum mit den darin enthaltenen Antikörpern von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Durch Inkubation für 30 min bei 56°C wurde das Komplementsystem inaktiviert. Schließlich wurde das so gewonnene Serum aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Einige in dieser Arbeit verwendete Antikörper wurden auch kommerziell erworben. Diese waren zumeist über Immunisierung von Mäusen generiert worden.

2.5.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Um antigenspezifische Antikörpern aus zuvor durch Immunisierung erhaltenen Blutseren (vgl. 2.5.1.) anzureichern, wurde das Serum durch eine Antigensäule aufgereinigt, sogenannte Affinitätsreinigung. Dadurch wird die spezifische Antigenerkennung in folgenden Immundekorationen verstärkt (vgl. 2.5.3.).

Zunächst erfolgte die Herstellung der Antigensäule durch Koppelung des jeweiligen Antigens an SulfoLink Coupling Gel (Thermo Fisher Scientific). Dazu wurde zunächst eine Säule mit 1 ml SulfoLinks Coupling Gel mit 6 ml Bindungspuffer (50 mM Tris; 5 mM EDTA; pH 8,5) äquilibriert. 1 mg Antigen wurde in 1 ml Bindungspuffer gelöst und mit dem äquilibrierten Säulenmaterial für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 3 ml Bindungspuffer gewaschen. Um die noch freien Bindungsstellen abzusättigen wurde die Säule dann noch mit 50 mM Cystein in Bindungspuffer für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säule mit 16 ml 1 M NaCl gewaschen.

Vor Bindung des Antikörpers erfolgten nacheinander weitere Waschschriffe mit je 10 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM Glycin/HCl (pH 2,5), 10 mM Tris/HCl (pH 8,8), 100 mM Na₃PO₄ (pH 11,5) und erneut mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,5). Dann erfolgte die Bindung des Antikörpers. Dazu wurde zunächst 6 ml Antiserum mit 24 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) mit 1 mM PMSF und 1 x Roche Complete Protease Inhibitor gemischt und die Lösung mittels einer Peristaltikpumpe dreimal über die Säule gepumpt. Danach wurde die Säule mit 10 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 10 ml 500 mM NaCl in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen.

Die Elution des Antikörpers erfolgte in drei Schritten bei unterschiedlichen pH-Werten. Nacheinander wurden jeweils 10 ml 100 mM Natriumcitrat (pH 4,0), 100 mM Glycin/HCl (pH 2,5) und 100 mM Na₃PO₄ (pH 11,5) über die Säule gegeben und Fraktionen von 1 ml gesammelt, deren pH schnell durch Zugabe von 100 µl 1 M Tris/Base (pH 8,8) (bei Citrat- und Glycin-Elution) bzw. 1 M Glycin/HCl (pH 2,5) (bei Natriumphosphat-Elution) neutralisiert wurde. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt (vgl. 2.4.1.) und Fraktionen mit hohem Proteingehalt nochmal mittels Immunoblot überprüft und schließlich bei -20°C gelagert. Das Säulenmaterial wurde mit 10

ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen und mit 0,05% (w/v) Natriumazid in 2 ml des gleichen Puffers bei 4°C bis zur erneuten Benutzung gelagert.

2.5.3 Immundekoration von Western Blots

Die Western-Blot-Membranen wurden zunächst geblockt um freie Bindungsstellen abzusättigen. Dazu wurde die Membran vollständig in Blockpuffer getränkt und für ca. 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Danach erfolgte die Dekoration der Proteine mit affinitätsgereinigte Antikörpern: Die Antikörper wurden in Blockpuffer verdünnt bei einer Konzentration zwischen 1:250 und 1:5000 je nach Stärke des Antikörpers, die Membran wurde gleichmäßig mit der Antikörperlösung benetzt und übernacht bei 4°C darin inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-Puffer für jeweils 5-10 min gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 30 min – 2h bei Raumtemperatur. Der Zweitantikörper war dabei entweder gegen Immunglobulin G von Kaninchen (Goat Anti Rabbit-IgG, Bio-Rad, 1:10000 in Blocklösung verdünnt) oder gegen Immunglobulin G von Mäuse (Goat Anti Mouse-IgG, Bio-Rad, 1:5000 Blocklösung verdünnt) gerichtet. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-Puffer für jeweils 5-10 min gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte dann über eine Chemolumineszenz-Reaktion: Die an die Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase reagierte auf den Membranen unter Zugabe der Lösungen ECL1 und ECL2, die kurz vor Anwendung im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Die Detektion der Lumineszenz-Signale erfolgte durch Exposition der Membranen auf Röntgenfilmen (Super RX, Fuji).

Blockpuffer

5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer

ECL1

100 mM Tris/HCl; 0,044% (w/v) Luminol; 0,0066% (w/v) p-Coumarinsäure; pH 8,5

ECL2

100 mM Tris/HCl; 0,024% (w/v) H₂O₂; pH 8,5

2.5.4 Quantifizierung von Western Blots

Die Quantifizierung von Proteinmengen in Western Blots erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) und Microsoft Excel 2010.

2.6 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE-Puffer	20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 40 mM Tris/Acetate; pH 7,4
TBS-Puffer	10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5
LB-Medium	10 g/L Bacto-Trypton; 5 g/L Hefeextrakt; 5 g/L Natriumchlorid
LB/Amp-Medium	Autoklaviertes LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Platten	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar Kobe I; Medium und Agar wurden separat autoklaviert, nach dem Autoklavieren gemischt und in Petrischalen gegossen
Laktatmedium für <i>S.cerevisiae</i>	3 g/L Hefeextrakt; 0,5 g/L Calciumchlorid; 0,5 g/L Natriumchlorid; 0,6 g/L Magnesiumsulfat; 1 g/L Kaliumdihydrogenphosphat; 1 g/L Ammoniumchlorid; 3 mg/L Eisen-(III)-chlorid; 2% (w/v) Lactat; pH mit KOH auf 5,5 eingestellt
YP-Medium (Vollmedium für <i>S.cerevisiae</i>)	1% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Bacto-Peptone; pH mit HCl auf 5,5 eingestellt. Glukose wurde als 40% (w/v), Galaktose und Glycerin als 30% (w/v) konzentrierte Stammlösungen separat autoklaviert und dem autoklavierten YP-Medium zugegeben. Kohlenstoffquellen: YP-Medium mit 2% (w/v) Glukose (YPD); YP-Medium mit 2% (w/v) Galaktose (YPGal); YP-Medium mit 3% (w/v) Glycerin (YPG)
S-Medium (Selektivmedium für <i>S.cerevisiae</i>)	1,7 g/L <i>Yeast Nitrogen Base</i> ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/L Ammoniumsulfat; pH mit KOH auf 5,5 eingestellt. Kohlenstoffquellen: S-Medium mit 2% (w/v) Glukose (SD), 2% (w/v) Galactose (SGal), 3% (w/v) Glycerin (SG) oder 2% (w/v) Lactat (SLac).

	Auxotrophiemarker: Adenin 20 mg/L; Uracil 20 mg/L; Leucin 30 mg/L; Lysin 30 mg/L; Histidin 30 mg/L; Tryptophan 30 mg/L
SC-Medium (Selektivmedium mit Aminosäuren-Dropout-Mix für <i>S.cerevisiae</i>)	Wie S-Medium (s.o.) mit zusätzlich 2g/l Aminosäuren-Dropout-Mix (Supplemente: 2 g Alanin, 2 g Arginin, 2 g Asparagin, 2 g Aspartat, 2 g Cystein, 2 g Glutamin, 2 g Glutamat, 2 g Glycin, 2 g Inosit, 2 g Isoleucin, 2 g Methionin, 0,2 g p-Aminobenzoesäure, 2 g Phenylalanin, 2 g Prolin, 2 g Serin, 2 g Threonin, 2 g Tyrosin, 2 g Valin Auxotrophiemarker: Adenin 55,3 mg/L; Uracil 22,4 mg/L; Leucin 219 mg/L; Lysin 180,26 mg/L; Histidin 62,85 mg/L; Tryptophan 82 mg/L
Spezialmedium zur Proteasominhibition mittels MG132 in <i>S.cerevisiae</i>	0,17% (w/v) <i>Yeast Nitrogen Base</i> ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 0,1% (w/v) Prolin; 2% (w/v) Galactose oder 2% (w/v) Lactat; Auxotrophiemarker wie in SC-Medium (s.o.)
Kulturplatten für <i>S.cerevisiae</i>	Entsprechendes Medium (s.o.) mit 2% (w/v) Agar-Agar Kobe I; Medium und Agar wurden separat autoklaviert, nach dem Autoklavieren gemischt und in Petrischalen gegossen

2.7 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

Firmenname	Chemikalien und Verbrauchsmaterial
Agfa-Gevaert (München)	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Agilent Technologies (Böblingen)	<i>E. coli</i> XL-1 Blue
AppliChem (Darmstadt)	Ampicillin, Ammoniumpersulfat (APS), Tris Buffer grade, H ₂ O ₂
Becton, Dickinson	Bacto-Trypton
Bio-Rad (München)	Proteinstandard und Reagenzien zur Proteinbestimmung, Meerrettich-Peroxidasegekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-IgG-

	Antikörper
Calbiochem	Adenin; Uracil; L-Histidin
Eppendorf (Hamburg)	Protein LoBind Reagenzgefäße
Fermentas	GeneRuler 1kb DNA Ladder; 6X DNA Loading Dye
Fuji (Düsseldorf)	Medical X-ray Film Super RX 13 x 18 cm
GE Healthcare (München)	Bacto-Pepton
Gerbu (Gaiberg)	DTT; HEPES
Gilson	PIPETMAN Pipetten
Greiner Bio-One	Semi-Micro Kunststoffküvetten; 15ml und 50ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen steril
Merck (Darmstadt)	Ammoniumchlorid; Ammoniumsulfat; Calciumchlorid; Tritriplex III (EDTA); Kupfer(II)-chlorid; L-Tryptophan; Magnesiumchlorid; Milchsäure etwa 90%; Natriumacetat; Natriumchlorid; Trichloressigsäure
Metabion, Martinsried	Oligonukleotide
New England BioLabs (Schwalbach)	Taq PCR Kit, Phusion® High-Fidelity PCR Kit; Q5® High-Fidelity PCR Kit; High Fidelity (HF®) Restriktionsenzyme und CutSmart Puffer; T4 DNA Ligase und T4 Ligase Puffer
Promega	Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit; PureYield Plasmid Midiprep System Kit
Roche Applied Sciences (Mannheim)	Proteinase K
Roth (Karlsruhe)	Agar-Agar Kobe I; Aminosäuren, u.a. L-Prolin; Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat
Sarstedt (Bad Homburg)	Petrischalen; Pipettenspitzen
Schleicher & Schüll (Kassel)	Protan Nitrozellulosemembran BA83; Whatman Filterpapiere; Sterilfilter
Seikagaku, Tokyo (Japan)	Zymolyase 20T

Serva (Heidelberg)	Agarose für DNA-Elektrophorese; DNA-Farbstoff Clear G; Acrylamid/Bis Lösung 30% w/v; Hefeextrakt; PMSF; Ponceau S; SDS; TEMED
Sigma-Aldrich	DMSO; D-Sorbitol, Essigsäure; D-(+)-Galactose; Glycerol; Aminosäuren, u.a. L-Leucin, L-Lysin und L-Methionin; Lithiumacetat-dihydrat, Luminol; 2-Mercaptoethanol; Polyethylenglykol, 2-Propanol; Triton X-100; Tween 20; Yeast Nitrogen Base; TiterMax Gold; Freund's Adjuvant Incomplete
Spinnrad (Bad Segeberg)	Magermilchpulver
Thermo Fisher Scientific	Unstained Protein Molecular Weight Marker; PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; SulfoLink Coupling Gel; Cell Tracker Blue CMAC

Geräte	Firmenname
Autoklav	Varioclav® 400E ; H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Blotapparatur für Wet Blot	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
Brutschränke, Inkubatoren	Heraeus Christ, Osterode
Entwicklermaschine	Optimax 2010 X-Ray Film Processor; Protec Medizintechnik, Oberstenfeld
Feinwaagen	Sartorius analytic, Mainz VWR, Radnor, Pennsylvania
Fluoreszenzmikroskop	Mikroskop: Axioplan 2 wide field fluorescence microscope; Carl Zeiss, Jena. Kamera: Evolution VF Mono Cooled monochrome camera; Intas, Göttingen Software: Image ProPlus 5.0 und Scope Pro 4.5; Media Cybernetics, Silver Spring, MD
Gelkammern	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Konfokales Lasemikroskop	Leica TCS SP5 Confocal und LAS AF-Software; Leica, Wetzlar
Kolbenhubpipetten	PIPETMAN Pipetten; Gilson, Middleton, Wisconsin.
Magnetrührer	IKAMAG REO; IKA, Staufen
OD600 DiluPhotometer	Implen, München
Schüttler	Shaker Dos-10L; neoLab, Heidelberg
Spannungsquellen	Electrophoresis Power Supply EPS 600; Amersham Biosciences, Freiburg
Spektrophotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	MSC-Advantage™, Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermocycler	Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg
Transmissions-elektronenmikroskop & Zubehör	Ultra-Mikrotom: Ultracut EM UC6; Leica, Wetzlar Pioloform-beschichtetes Kupfernetz; Plano, Wetzlar Elektronenmikroskop: EM 902A Transmissionselektronenmikroskop; Carl Zeiss, Oberkochen CCD-Kamera: 1,350 × 1,050 Pixel Erlangenshen ES500W; Gatan, Pleasanton, CA, USA Software: Digital Micrograph Software; Version 1.70.16; Gatan, Pleasanton, CA, USA
UV-Transiluminator	Benchtop 2UV Transilluminator und BioDoc-It™ Imaging System; UVP, Upland (USA)
Vortex-Mixer	Bender und Hobein, München
Wärmeschränke	Memmert, Hannover
Zentrifugen	Avanti™ J-25 Centrifuge, Beckman Coulter, Krefeld 3K30; Sigma, Osterode am Harz Centrifuge 5417 R; Eppendorf Hamburg Centrifuge 5415 D; Eppendorf Hamburg Centrifuge 5810 R; Eppendorf, Hamburg

3. Ergebnisse

3.1 Topologie-Analyse von Msp1 mit Hilfe von Proteinase K- Behandlung

Bevor Untersuchungen zur Funktion von Msp1 unternommen wurden, sollte zu allererst eine Analyse zur Lokalisation von Msp1 in Mitochondrien erfolgen. Eine Zuordnung von Msp1 in ein bestimmtes mitochondriales Kompartiment kann Hinweise auf den Funktionsbereichs des Proteins in der Zelle geben.

Zur Bestimmung der Topologie von Msp1 wurden isolierte Mitochondrien einer Behandlung mit dem Enzym Proteinase K unterzogen und die Zugänglichkeit verschiedener Proteine mittels Western Blot und Immundekoration analysiert. Hefezellen vom Stammhintergrund YPH499 wurden dazu in Lactat-Medium bei 30°C angezogen, in logarithmischer Wachstumsphase geerntet und die Mitochondrien daraus isoliert. Die Mitochondrien wurden entweder im isosmotischen SH-Puffer suspendiert oder in einer 1:10 Verdünnung mit HEPES-Puffer geschwollen um Mitoplasten zu generieren oder zusätzlich zum Schwellen mit Triton X-100 behandelt um alle Membranen zu lysieren. Es erfolgte dann die Behandlung mit Proteinase K für 30 min auf Eis, der Verdau wurde durch Zugabe von PMSF terminiert. Im Anschluss wurden die Proteine durch TCA-Fällung und Zugabe von Laemmli-Puffer denaturiert und solubilisiert, und mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration mit spezifischen Antisera analysiert (Abbildung 1). Um die Proteinase K-Behandlung und damit die Aussagekraft des Versuchs zu beurteilen, wurden als Kontrollen Tom70 als typisches Außenmembranprotein, Tim50 als Innenmembranprotein, Erv1 als Protein im Intermembranraum und Hep1 als Matrixprotein dekoriert. Der Immunblot zeigte, dass Tom70 in intakten Mitochondrien im SH-Puffer wie erwartet gut zugänglich für Proteinase K ist, während Tim50 und Erv1 nur durch die Zerstörung der Außenmembran nach Zugabe von HEPES-Puffer für das Enzym angreifbar werden. Hep1 wird wiederum erst durch die zusätzliche Auflösung der Innenmembran mit Triton X-100 durch das Enzym verdaut. Der Versuch zeigte auch, dass Msp1 sich wie Tom70 verhält und in intakten Mitochondrien durch die Proteinase K vollständig abgebaut wird, was auf eine Lokalisation von Msp1 in der mitochondrialen Außenmembran deutet. Außerdem konnten im Immunblot keine Abbaufragmente von Msp1 nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass ein Großteil des

Proteins ins Zytosol exponiert liegt. Sequenzanalysen des Proteins haben des Weiteren ergeben, dass Msp1 mit hoher Wahrscheinlichkeit eine N-terminale Transmembrandomäne aus ca. 20 Aminosäuren besitzt (Abbildung 2).

Die Befunde deuten also daraufhin, dass Msp1 mit einer N-terminalen Transmembrandomäne in der Außenmembran von Mitochondrien verankert liegt, während der Hauptanteil des Proteins inklusive seiner löslichen C-terminalen AAA-Domäne zum Zytosol hin exponiert ist.

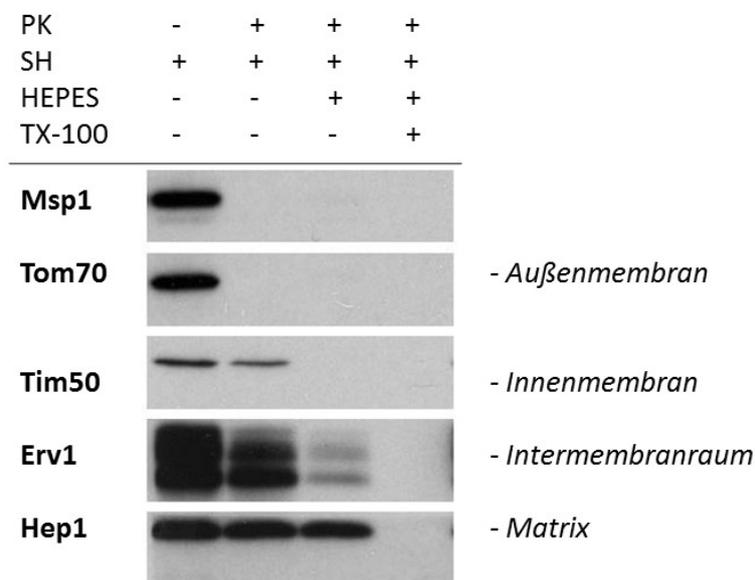


Abbildung 1: Msp1 wird in intakten Mitochondrien durch die Proteinase K vollständig abgebaut und verhält sich somit wie ein Außenmembranprotein. Isolierte Mitochondrien wurden im isosmotischen SH-Puffer suspendiert und parallel in HEPES-Puffer geschwollen oder zusätzlich zum Schwellen mit Triton X-100 behandelt. Es erfolgte dann die Behandlung mit Proteinase K für 30 min auf Eis, der Verdau wurde durch Zugabe von PMSF terminiert. Die Proteinmengen wurden nach TCA-Fällung und Zugabe von Laemmli-Puffer mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration mit spezifischen Antisera gegen die oben aufgeführten Proteine analysiert.

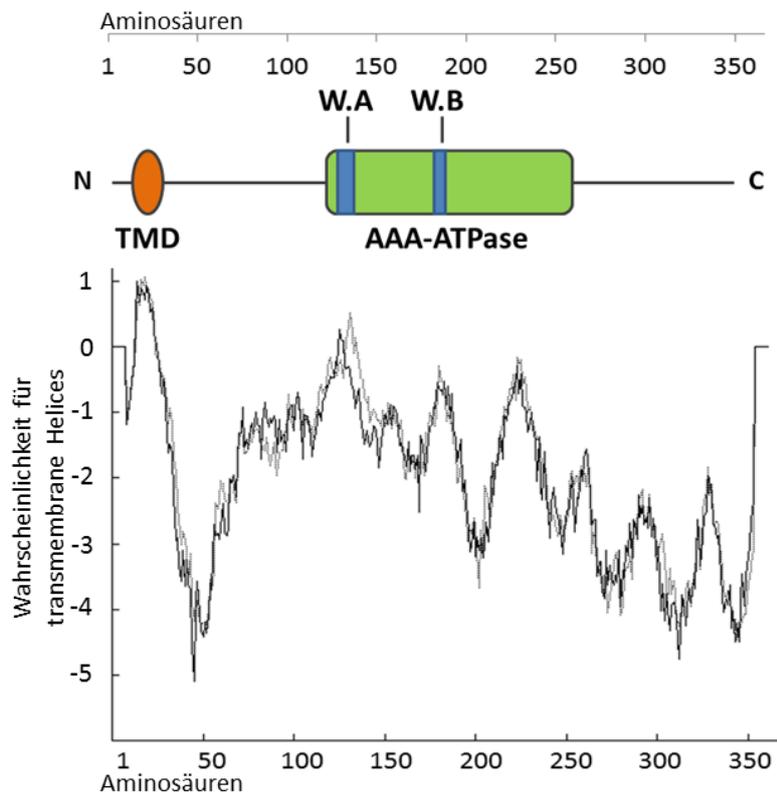


Abbildung 2: Analyse der Sequenz und funktioneller Domänen in Msp1. Durch statistische Analyse mit Hilfe des TMpred Programms (<http://www.ch.embnet.org/>) wurde die Sequenz von Msp1 auf transmembrane Domänen hin untersucht. Als Funktion stellt die x-Achse die Aminosäuresequenz von Msp1 und die y-Achse die Wahrscheinlichkeit für transmembrane Helices dar, wobei $y > 0,5$ als signifikant gilt. An die Funktion angepasst ist ein Modell für die funktionellen Domänen in Msp1, die mithilfe des Programms NCBI Conserved Domain Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) detektiert wurden. TMD= Transmembrandomäne; W.A= WALKER-A-Motiv; W.B= WALKER-B-Motiv.

3.2 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *MSP1*-Expressionsmutanten mittels Tüpfeltest

Nachdem die Topologie von Msp1 bestimmt werden konnte, sollte als erster Schritt zur funktionellen Charakterisierung eine Untersuchung der Wachstumsphänotypen von *MSP1*-Deletions- und Überexpressionsmutanten (*MSP1*↑) mittels Tüpfeltest erfolgen. Wildtyp und $\Delta msp1$ trugen dabei den Leervektor pXY242 als Korrelat zum *MSP1*-

Überexpressionsplasmid pYX242-*MSP1*. Somit konnten alle drei Stämme im selben Medium angezogen werden.

Wildtyp, $\Delta msp1$ und *MSP1* \uparrow im Stammhintergrund W303 wurden in Selektivmedium (SD-Medium ohne den Selektionsmarker Leucin) bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und jeweils in 1:10 Verdünnungsschritten auf Platten mit zwei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen aufgetragen. Dabei handelte es sich um glukosehaltiges SD-Medium und glycerinhaltiges SCG-Medium, jeweils ohne den Selektionsmarker Leucin. Zum Wachstum auf dem nicht-fermentierbaren SCG-Medium wird eine funktionierende Atmungskette benötigt. Die Hefen wurden dann bei 30°C und 37°C inkubiert. Wachstum und Koloniegröße wurden dokumentiert (Abbildung 3). Die Deletionsmutante $\Delta msp1$ zeigte auf glukosehaltigem Medium bei 30°C ein Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Im Gegenzug zeigte die Überexpressionsmutante *MSP1* \uparrow ein langsames Wachstum als der Wildtyp. Dieses Wachstumsdefizit konnte sowohl auf der Kohlenstoffquelle Glukose als auch auf Glycerin und verstärkt unter Hitzestress bei 37°C beobachtet werden.

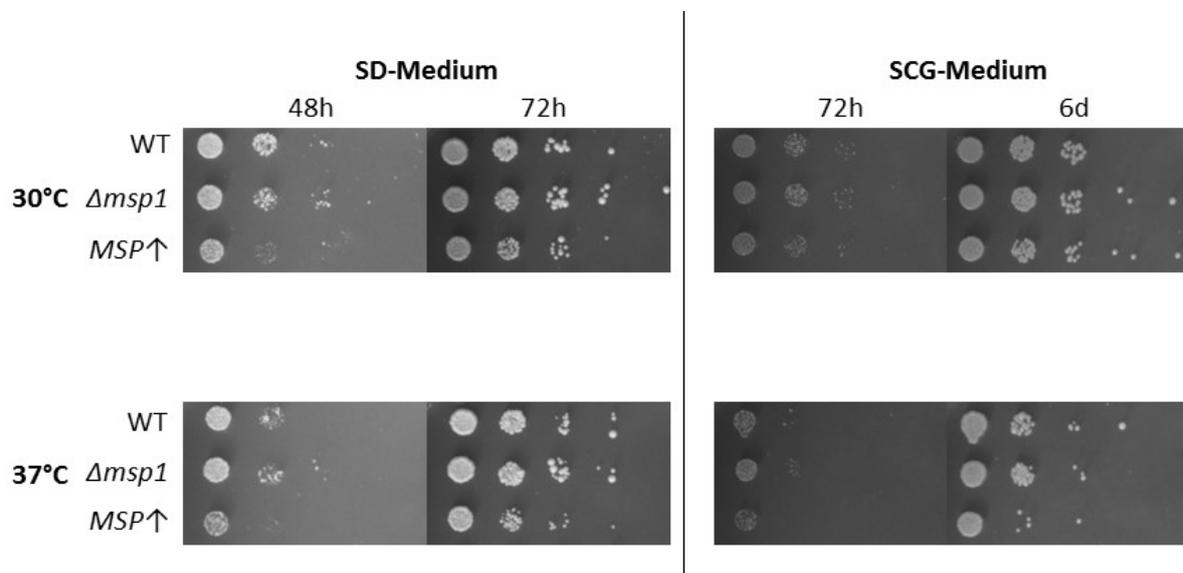


Abbildung 3: Die *MSP1*-Überexpressionsmutante (*MSP1* \uparrow) weist vermindertes Wachstum auf, während $\Delta msp1$ ein Wildtyp-ähnliches Wachstumsverhalten zeigt. Wildtyp (WT) und *MSP1*-Expressionsmutanten wurden mittels Tüpfeltest auf ihr Wachstumsverhalten auf Platten mit Glukose (SD-Medium) oder Glycerin (SCG-Medium) als Kohlenstoffquelle und bei 30°C oder 37°C untersucht.

Insgesamt zeigt sich demnach, dass sowohl eine Deletion als auch eine Überexpression von *MSP1* das Zellwachstum nicht essentiell bedrohen. Das Fehlen von Msp1 hat keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Unter diesen Bedingungen können möglicherweise alternative Mechanismen das Fehlen von Msp1 kompensieren. Bemerkenswerterweise führt dagegen die Überexpression von Msp1 unter allen getesteten Bedingungen zu einem Wachstumsdefizit mit kleineren Zellkolonien und langsameren Proliferationsrate, wobei dieser Effekt unter Hitzestress bei 37°C am deutlichsten in Erscheinung tritt. Die Funktion der Atmungskette scheint aber nicht speziell beeinträchtigt zu sein, da der Wachstumsphänotyp der Überexpressionsmutante in Medien mit fermentierbaren oder respiratorischen Kohlenstoffquellen vergleichbar ist. Die Beobachtungen deuten also daraufhin, dass eine Überpräsenz von Msp1 den zellulären Metabolismus und die Anpassung des Organismus auf widrige Wachstumsverhältnisse stört, entweder weil es Aufbauprozesse hemmt oder Abbauprozesse begünstigt.

3.3 Mikroskopische Untersuchung der Mitochondrienmorphologie in *MSP1*-Expressionsmutanten

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Morphologie

Da $\Delta msp1$ keinen Wachstumsphänotyp zeigt, sollte die Mutante mikroskopisch untersucht werden um herauszufinden, ob die Deletion von *MSP1* einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie hat.

Zunächst wurden Wildtyp- und $\Delta msp1$ -Hefezellen im W303 Stammhintergrund mit einem pVT100U-mtGFP-Plasmid transformiert, welches ein Fusionsprotein aus einer mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 der Fo-ATPase (Pre-Su9) zusammen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) exprimiert. Dadurch können die Mitochondrien unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden ⁹⁸.

Wildtyp- und $\Delta msp1$ mit mtGFP wurden zunächst in Selektivmedium (SD-Medium ohne den Selektionsmarker Uracil) bei 30°C angezogen. Die Übernachtskulturen wurden gesplittet und in YPD-Medium soweit verdünnt, dass zum Untersuchungszeitpunkt von jedem Stamm sich jeweils eine Kultur in logarithmischer und eine Kultur in stationärer Wachstumsphase befand. Die Hefezellen wurden dann mit Hilfe der

Phasenkontrastmikroskopie analysiert (Abbildung 4). Dabei konnte kein Unterschied in Zellgröße und -morphologie zwischen Wildtyp und $\Delta msp1$ festgestellt werden. Nach Anregen des mtGFP im Fluoreszenzmikroskop konnten in logarithmischer Wachstumsphase in beiden Hefestämmen die Mitochondrien als tubuläre, sich verzweigende Strukturen dargestellt werden. In stationärer Wachstumsphase fiel auf, dass die Mitochondrien deutlich stärker fragmentiert sind, wobei keine Unterschiede in Art und Ausmaß der Fragmentierung zwischen Wildtyp und $\Delta msp1$ festgestellt werden konnten.

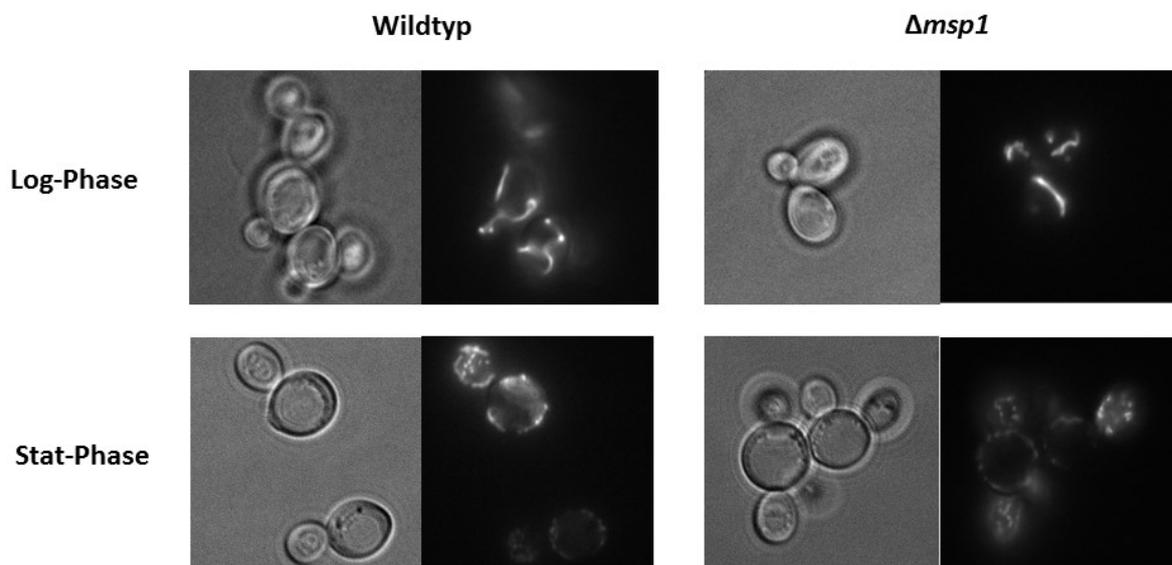


Abbildung 4: Repräsentative Phasenkontrastbilder und Fluoreszenzbilder von Wildtyp und $\Delta msp1$ in logarithmischer (log) und stationärer (stat) Wachstumsphase. Die Mitochondrien wurden durch Expression von GFP visualisiert, welches mit Hilfe eines mitochondrialen Sortierungssignals in die Matrix importiert wird⁹⁸.

3.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Ultrastruktur

Zur genaueren Untersuchung der mitochondrialen Ultrastruktur in *MSP1*-Mutanten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Benedikt Westermann für Zellbiologie und Elektronenmikroskopie an der Universität Bayreuth EM-Bilder von Wildtyp, $\Delta msp1$ und *MSP1* \uparrow -Hefezellen im W303 Stammhintergrund aufgenommen.

Wildtyp und $\Delta msp1$ trugen den Leervektor pXY242, um alle drei Stämme im selben Medium anziehen zu können. Die Stämme wurden in SG-Medium (ohne Leucin, mit Methionin) in einer Übernachtskultur bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen

und die Zellen anschließend geerntet, fixiert (2%GA, 1%OsO₄), in Epoxidharz eingebettet und mit Hilfe des Elektronenmikroskops untersucht (Abbildung 5). Dabei konnten weder bei der Deletion, noch bei der Überexpression von *MSP1* phänotypische Auffälligkeiten in Bezug auf Größe, Membran- und Cristaeformation in den Mitochondrien festgestellt werden. Auch die Gesamtzellmorphologie in den *MSP1*-Mutanten waren im Vergleich zum Wildtyp unauffällig.

Zusammenfassend ergeben weder die fluoreszenzmikroskopische noch die elektronenmikroskopische Untersuchung der *MSP1*-Expressionsmutanten morphologische bzw. ultrastrukturelle Auffälligkeiten in den Mitochondrien. Insbesondere bei der *MSP1*-Überexpressionsmutante konnten trotz des auffälligen Wachstumsphänotyps keine morphologischen Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Ein strukturelles Korrelat zur wachstumsphänotypisch sichtbaren zellulären Dysfunktion bei Überexpression von *MSP1* ließ sich mit dieser Methode also nicht finden. Auch lässt sich aus den Beobachtungen schließen, dass Msp1 an der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie nicht direkt beteiligt ist. Im Folgenden soll die Funktion von Msp1 auf molekularer Ebene untersucht werden.

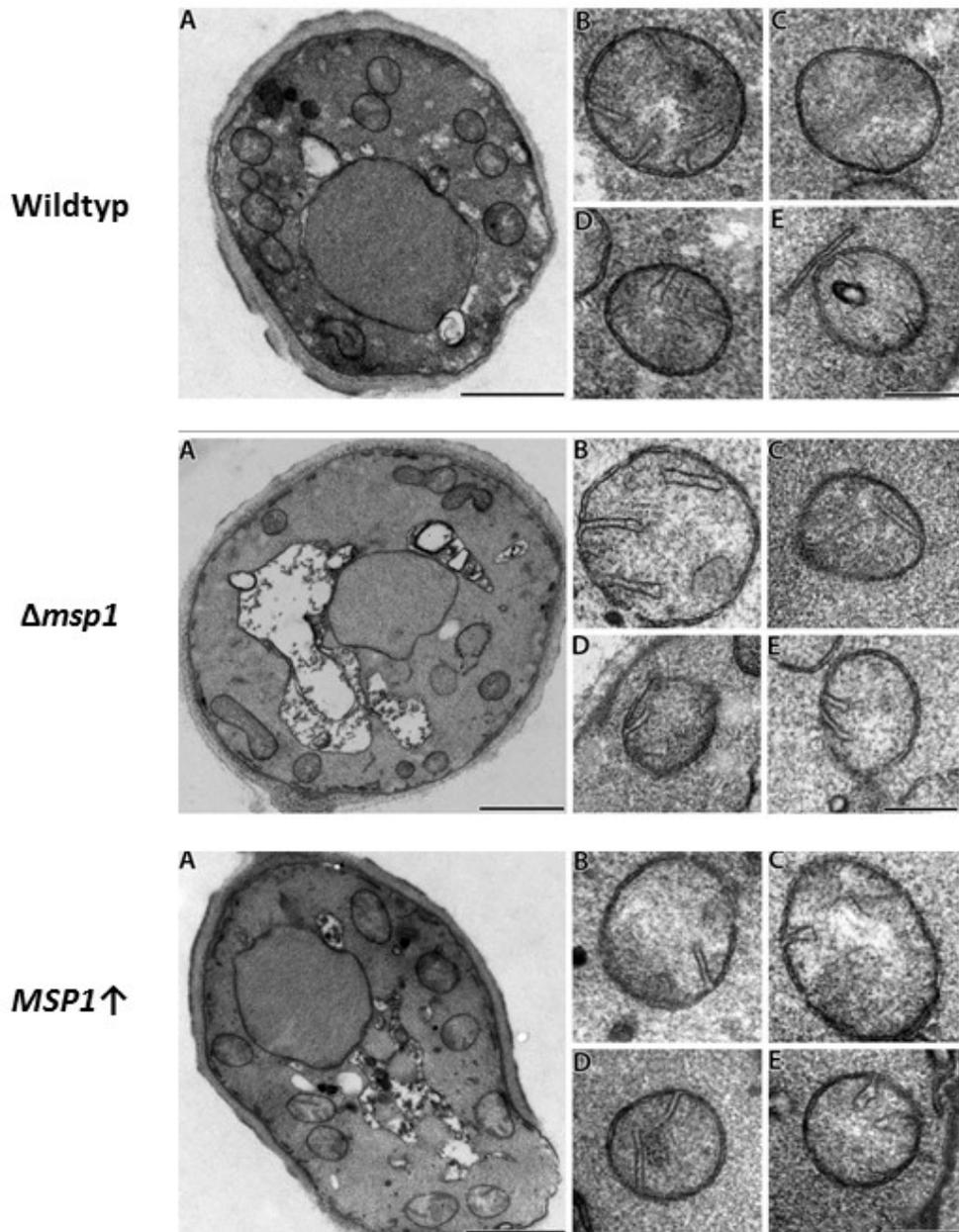


Abbildung 5: Repräsentative EM-Bilder von Wildtyp, $\Delta msp1$ und $MSP1\uparrow$. Die $MSP1$ -Expressionsmutanten weisen dabei keine phänotypischen Auffälligkeiten in Bezug auf die Mitochondrien, sowie die Gesamtzellmorphologie auf. Die Stämme wurden in Selektivmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und die Zellen anschließend geerntet, fixiert und in Epoxidharz eingebettet. Anschließend wurde mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops die mitochondriale Ultrastruktur untersucht. Die Bilder wurden in Zusammenarbeit mit Ann-Katrin Unger, Uni Bayreuth erstellt. A: Gesamtaufnahme; B-E: Einzelaufnahmen von Mitochondrien.

3.4 Untersuchung des Einflusses von Msp1 auf die endogenen Proteinmengen in Mitochondrien

3.4.1 Msp1 beeinflusst die endogenen Proteinmengen von kleinen Intermembranraumproteinen

Um die mitochondrialen Funktionen wie Energietransduktion, Proteintransport und Proteinabbau in den *MSP1*-Expressionsmutanten zu untersuchen, wurden zunächst die endogenen Proteinmengen in Wildtyp, $\Delta msp1$ und *MSP1* \uparrow mittels Western Blot und Immundekoration analysiert.

3.4.1.1 Endogene Proteinmengen in der *msp1*-Deletionsmutante

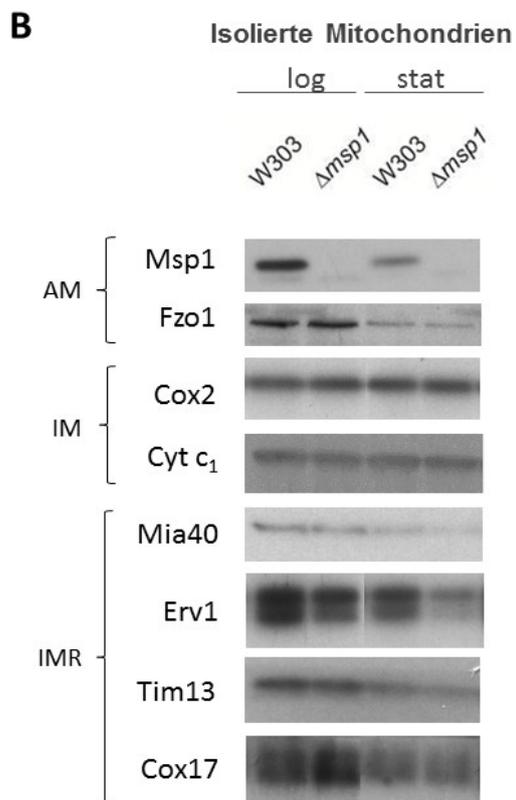
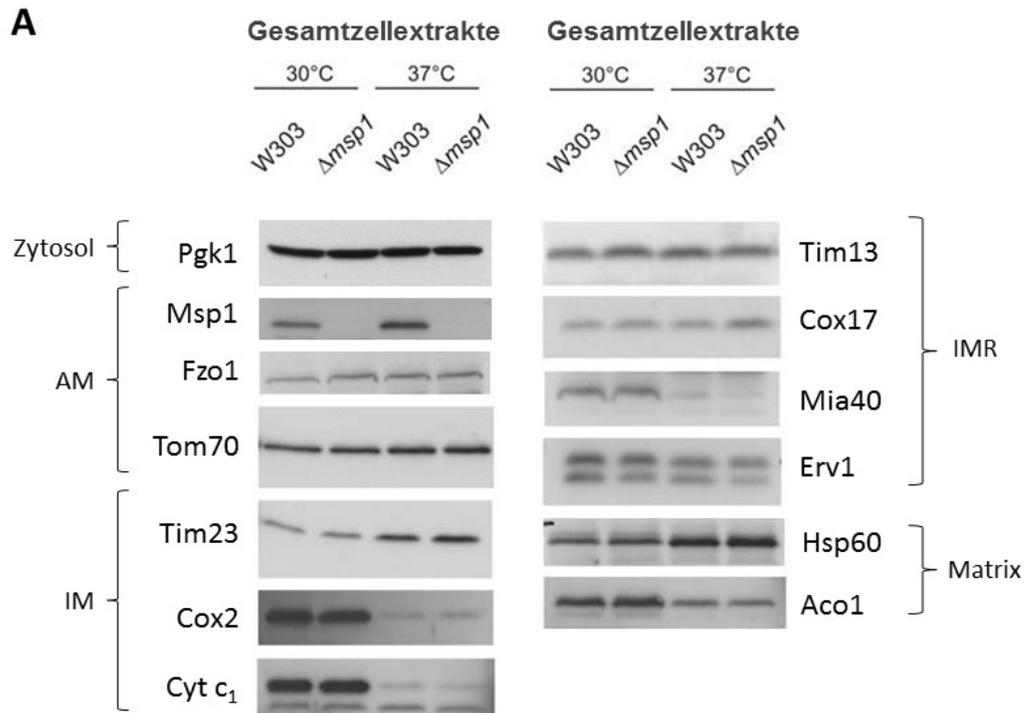
Zunächst wurde die *msp1*-Deletionsmutante untersucht. Dazu wurden Wildtyp und $\Delta msp1$ im W303 Stammhintergrund in Vollmedium mit Glukose (YPD) bei 30°C bis zur stationären Phase angezogen. Die Zellen wurden geerntet und durch Zugabe von Rödel-Lösung aufgeschlossen (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.3.4.1.). Im Anschluss wurden die Proteine mittels TCA gefällt und nach SDS-PAGE und Western Blot mit spezifischen Antisera dekoriert (Abbildung 6A). Bei der Analyse der Gesamtzellextrakte von $\Delta msp1$ zeigte sich, dass die endogenen Proteinmengen der kleinen Intermembranraumproteine Tim13 und Cox17 im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht waren. Cox17 und Tim13 sind kleine Proteine im Intermembranraum mit konservierten Cysteinmotiven, deren Biogenese durch ein Disulfid-Transfer-System katalysiert wird. Dieses System basiert auf den beiden essentiellen Komponenten Mia40 und Erv1 und einer funktionierenden Atmungskette^{40,109}. Mia40 verhielt sich in den Gesamtzellextrakten von $\Delta msp1$ unauffällig, während Erv1 sich als Doppelbande im Western Blot darstellte, dessen untere Bande in $\Delta msp1$ schwächer erschien. Weitere Proteine, welche mit Proteinimport assoziiert sind, wie Tom70 und Tim23, sowie die Atmungsketten-Proteine Cox2 und Cytochrom *c*₁ blieben unverändert.

Außerdem konnte beobachtet werden, dass in einem Parallelansatz, bei dem die Kulturen vor dem Zellaufschluss bei 37°C über Nacht inkubiert wurden, Msp1 stärker exprimiert wurde. Gleichzeitig waren die Atmungsketten-Proteine Cox2 und Cytochrom *c*₁ bei 37°C deutlich reduziert, während die Expression des Chaperons Hsp60 stark induziert waren.

Diese Beobachtungen sprechen für eine ausgeprägte Zellstresssituation unter der erhöhten Temperatur. Interessant ist, dass auch Msp1 unter diesen Bedingungen stärker exprimiert war.

Als nächstes wurden die endogenen Proteinmengen von isolierten Mitochondrien aus Wildtyp und $\Delta msp1$ Zellen analysiert, um Veränderungen insbesondere in der mitochondrialen Fraktion von Zellen zu beurteilen. Um eine hohe Ausbeute an Mitochondrien bei der Isolierung zu erhalten, wurden die Zellen in Medium mit Laktat als Kohlenstoffquelle und bei 30°C kultiviert. Als Zeitpunkt der Zellernte wurden sowohl die logarithmische als auch die stationäre Wachstumsphase gewählt, weil unter letzterer Bedingung die Mengenveränderungen von Cox17 und Tim13 in Gesamtzellextrakten von $\Delta msp1$ am deutlichsten waren. Die Mitochondrien wurden isoliert und mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration analysiert (Abbildung 6B). Bei der Analyse der isolierten Mitochondrien zeigte sich, dass in logarithmischer Phase die Proteinmenge von Cox17 im $\Delta msp1$ erhöht war im Vergleich zum Wildtyp, was mit den Beobachtungen in Gesamtzellextrakten übereinstimmt. In stationärer Phase konnte in den isolierten Mitochondrien jedoch keine erhöhte Menge an Cox17 beobachtet werden. Tim13 verhielt sich sowohl in logarithmischer als auch in stationärer Phase unauffällig. Interessanterweise zeigte sich besonders in stationärer Phase erneut eine verminderte Menge an Erv1 in $\Delta msp1$. Die tendenziell geringeren Proteinmengen in Mitochondrien, die aus stationären Zellen isoliert wurden, könnten auf eine erfahrungsgemäß reduzierteren Qualität der Mitochondrienisolation bzw. der Mitochondrien selbst unter diesen Bedingungen zurückzuführen sein.

Abbildung 6 (Seite 48): Analyse der endogenen Proteinmengen zeigt diskret erhöhte Mengen der kleinen Intermembranraumproteine Tim13 und Cox17 in $\Delta msp1$. (A) Wildtyp (W303) und $\Delta msp1$ wurden in Vollmedium mit Glukose (YPD) bei 30°C angezogen und in einem Parallelansatz zusätzlich über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann in stationärer Wachstumsphase geerntet, mittels Rödel-Lösung aufgeschossen und die Proteine mittels TCA gefällt. (B) Wildtyp (W303) und $\Delta msp1$ wurden in Laktat-Medium bei 30°C angezogen und die Mitochondrien jeweils aus logarithmischer (log) und stationärer (stat) Wachstumsphase isoliert. (A und B) Proteinmengen wurden über SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration mit spezifischen Antiseren gegen die oben aufgeführten Proteine analysiert. AM=Außenmembran; IM=Innenmembran; IMR=Intermembranraum.



3.4.1.2 Endogene Proteinmengen in der *MSP1*-Überexpressionsmutante

Als nächstes sollte die *MSP1*-Überexpressionsmutante auf veränderte Proteinmengen untersucht werden. Dazu wurden der Wildtyp mit Leervektor pYX242 und *MSP1*↑ in Selektivmedium mit Laktat als Hauptkohlenstoffquelle (S-Lac-Medium, ohne den Selektionsmarker Leucin, mit zusätzlich 0,1% Galaktose) bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend Gesamtzellextrakte durch alkalische Lyse gewonnen. Die Proteine im Zelllysat wurden nach SDS-PAGE mittels Western Blot und Immundekoration analysiert (Abbildung 7A). Bei der Analyse der Gesamtzellextrakte zeigte sich, dass die Proteinmengen der kleinen Intermembranraumproteine Tim10, Tim13 und Cox17 in *MSP1*↑ im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert waren. Außerdem fielen auch verringerte Mengen des Intermembranraumproteins CCHL und Innenmembranproteins Cytochrom c_1 auf. In isolierten Mitochondrien von *MSP1*↑ (Abbildung 7B) konnten in logarithmischer Wachstumsphase dagegen keine signifikante quantitative Veränderung der kleinen Tim-Proteine und Cox17 im Western Blot nachgewiesen werden. Erv1 und Mia40 verhielten sich sowohl in Gesamtzellextrakten als auch in isolierten Mitochondrien von *MSP1*↑ unauffällig.

Versuche *MSP1*↑-Zellen bei 37°C zu testen waren nicht durchführbar, da sich die Zellen aufgrund des bereits festgestellten Wachstumsdefizits nicht ausreichend unter diesen erschwerten Wachstumsbedingungen kultivieren ließen.

Zusammenfassend ergab die Analyse von endogenen Proteinmengen in den *MSP1*-Expressionsmutanten quantitative Veränderungen insbesondere der Intermembranraumproteine. Während die Menge kleiner Intermembranraumproteine in *Δmsp1* im Vergleich zum Wildtyp tendenziell erhöht war, war sie in der *MSP1*-Überexpressionsmutante verringert. Die quantitativen Veränderungen der Intermembranraumproteine können deutlich in Gesamtzellextrakten dargestellt werden, während die Unterschiede in isolierten Mitochondrien weniger stark ausgeprägt sind. Diese Beobachtung könnte auf veränderte Verteilungsvorgänge der Intermembranraumproteine zwischen Mitochondrien und Zytosol bei *MSP1*-Expressionsmutanten hindeuten. Somit wäre eine Funktion von Msp1 im Abbau oder Export dieser Proteine aus dem Intermembranraum denkbar.

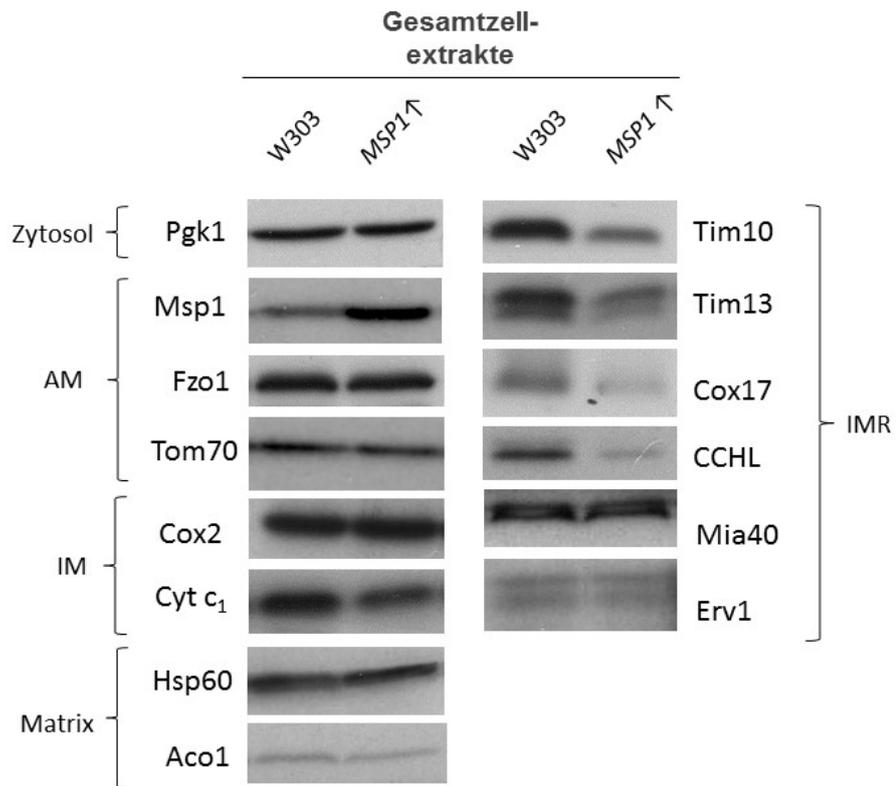
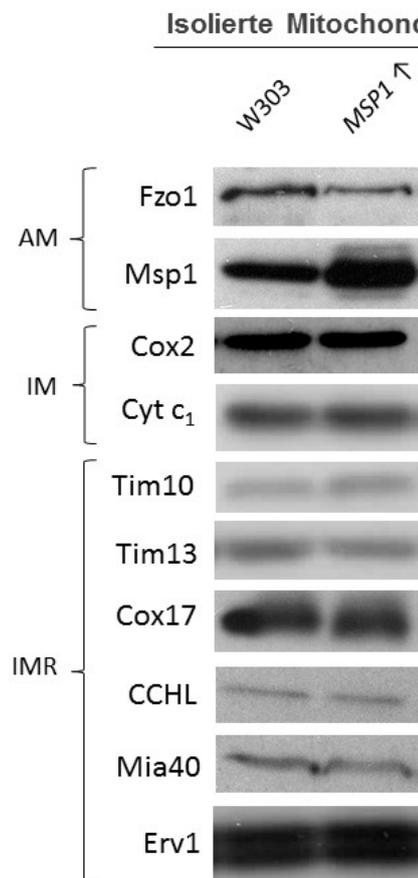
A**B**

Abbildung 7 (Seite 50): Analyse der endogenen Proteinmengen in *MSP*[↑] zeigt in Gesamtzellextrakten verringerte Mengen der kleinen Intermembranraumproteine Tim10, Tim13 und Cox17. (A) Wildtyp (W303) und *MSP*[↑] wurden in Selektivmedium mit Laktat (S-Lac-Medium - Leu + 0,1% Gal) bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden in logarithmischer Wachstumsphase geerntet und mittels alkalischer Lyse Gesamtzellextrakte gewonnen. (B) Wildtyp (W303) und *MSP*[↑] wurden in Selektivmedium mit Laktat (S-Lac-Medium - Leu) bei 30°C angezogen und die Mitochondrien aus logarithmischer Wachstumsphase isoliert. (A und B) Proteinmengen wurden über SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration mit spezifischen Antisera gegen die oben aufgeführten Proteine analysiert. AM=Außenmembran; IM=Innenmembran; IMR=Intermembranraum.

3.4.2 Halo-Assay zur Analyse der Auswirkung von oxidativem und reduktivem Stress auf das Wachstum von *MSP1*-Expressionsmutanten

Bei der Analyse endogener Proteinmengen in $\Delta msp1$ - und *MSP1*-Überexpressionsmutanten im Western Blot wurden quantitative Veränderungen der kleinen Intermembranraumproteine, vornehmlich Tim10, Tim13 und Cox17 beobachtet. Im mitochondrialen Intermembranraum spielen beim Import der kleinen Tim-Proteine und Cox17 Oxidations- und Reduktionsvorgänge eine wichtige Rolle: Beim Import in den Intermembranraum interagieren diese Proteine über ihre Cysteinreste mit Mia40 unter Ausbildung von Disulfidbrücken. Erv1, ein Protein mit Sulfhydryloxidase-Aktivität, regeneriert die oxidierte Form von Mia40. Dementsprechend behindern stark reduzierende Einflüsse z.B. durch Zugabe von hochkonzentriertem DTT den Import von kleinen Intermembranraumproteinen über Mia40 und Erv1: Stämme mit verringerter Erv1-Aktivität zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit auf DTT im Wachstumstest⁴⁰. Aufgrund der Mengenveränderungen der kleinen Intermembranraumproteine in den *MSP1*-Expressionsmutanten und auch der Veränderung von Erv1 speziell in $\Delta msp1$ sollte untersucht werden, ob eine Expressionsveränderung von Msp1 den Import der kleinen Intermembranraumproteine beeinflusst. Hierzu wurde in einem Halo-Assay die Auswirkung von oxidativem und reduktivem Stress auf das Wachstum der *MSP1*-Expressionsmutanten getestet.

Wildtyp, $\Delta msp1$ und *MSP1*[↑]-Zellen im W303 Stammhintergrund wurden in Selektivmedium mit Glukose (SD-Medium ohne den Selektionsmarker Leucin) bei 30°C angezogen. Wildtyp und $\Delta msp1$ trugen dabei den Leervektor pXY242. Die Stämme wurden

bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, geerntet und gleiche Zellmengen auf SD-Medium ausgestrichen. In die Mitte des Zellrasens wurde ein steriles Filterpapier gelegt, dass entweder mit 30%igem H_2O_2 oder 3 M DTT getränkt wurde. Anhand der Größe der sich ausbildenden Wachstumshemmhöfe wurde die Empfindlichkeit der Stämme auf die Chemikalien beurteilt (Abbildung 8). Bezüglich der sich bildenden Hemmhof-Radien konnte jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp, $\Delta msp1$ und $MSP1\uparrow$ ausgemacht werden. Oxidativer und reduktiver Stress beeinträchtigen also das Wachstum der $MSP1$ -Mutanten nicht stärker als den Wildtyp.

Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Funktionalität des Mia40-Erv1-Systems in den $MSP1$ -Mutanten nicht beeinträchtigt ist. Somit stellt die verringerte Proteinmenge von Erv1 in der $MSP1$ -Deletionsmutante nicht den Grund für die veränderten Mengen an IMR-Proteinen da, sondern ist wahrscheinlich vielmehr als eine physiologische Gegenregulation der Zelle zu verstehen, um bei erhöhten Proteinmengen von Tim13 und Cox17 den Import dieser Proteine zu drosseln und somit die Homöostase im Intermembranraum zu gewährleisten.

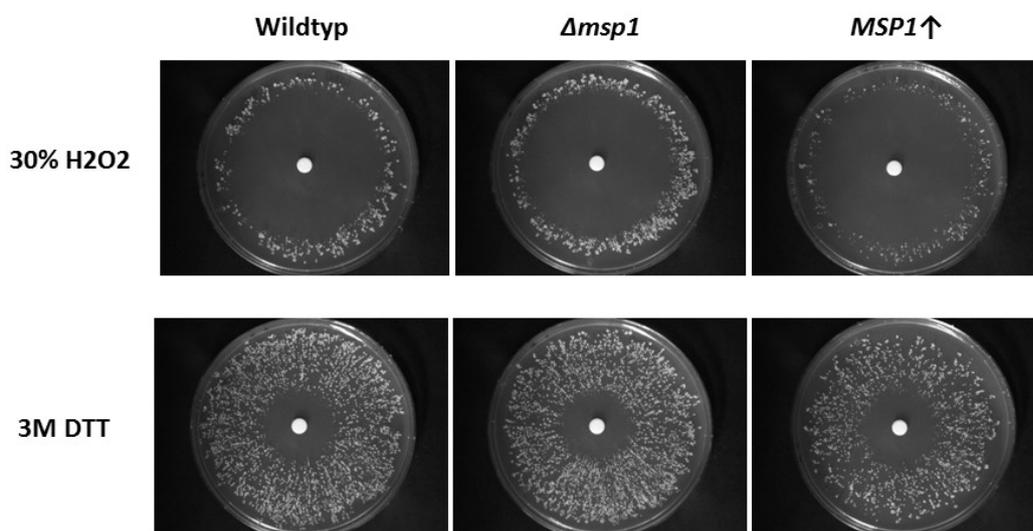


Abbildung 8: $MSP1$ -Expressionsmutanten zeigen keine erhöhte Empfindlichkeit auf stark oxidierende (H_2O_2) oder reduzierende Chemikalien (DTT) im Vergleich zum Wildtyp im Halo-Assay. Wildtyp, $\Delta msp1$ und $MSP1\uparrow$ wurden in Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle (SD-Medium - Leu) bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Jeweils gleiche Zellmengen wurden auf SD-Platten ausgestrichen und in die Mitte des Zellrasens ein Filterpapierscheibchen gelegt, dass mit 30%igem H_2O_2 oder 3M DTT getränkt wurde. Die Platten wurden für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Anhand der Größe der sich ausbildenden Wachstumshemmhöfe wurde die Empfindlichkeit der Stämme auf die Chemikalien beurteilt.

3.4.3 Untersuchung der endogenen Proteinmengen und des Zellwachstums bei *MSP1*- und *YME1*-Mutanten

Eine wichtige Rolle in der Qualitätskontrolle von Proteinen im Intermembranraum spielt das Protein Yme1, eine AAA-Protease in der mitochondrialen Innenmembran, die Intermembranraumproteine bei der Faltung unterstützt und fehlgefaltete Proteine abbaut⁵⁰⁻⁵². Bei der Analyse endogener Proteinmengen in *MSP1*-Mutanten wurde beobachtet, dass Veränderung der Proteinmenge von Msp1 die endogenen Mengen kleiner Intermembranraumproteine verändert. Somit stellte sich die Frage, ob Msp1 möglicherweise Yme1 in seiner Funktion zum Erhalt der Proteinhomöostase im Intermembranraum beeinflusst oder ergänzt. In einer Microarray-Analyse von *yme1*-Deletionsmutanten in Hefe wurde bereits festgestellt, dass *MSP1* in $\Delta yme1$ hochreguliert wird¹¹⁰. Um diese Beobachtung zu verifizieren und möglichen Ursachen dafür auf den Grund zu gehen, wurden im W303 Stammhintergrund eine $\Delta yme1$ -Mutante und eine Doppelmutante $\Delta msp1\Delta yme1$ generiert. Es wurde mittels Western Blot und Immundekoration bestätigt, dass in Gesamtzellaufschlüssen von $\Delta yme1$ die endogene Menge von Msp1 erhöht ist (Abbildung 9A). Des Weiteren kann in $\Delta yme1$ Zellen eine Akkumulation von Cox17 und Tim13 beobachtet werden. In der gleichzeitig analysierten Doppelmutante $\Delta msp1\Delta yme1$ sind die Mengen von Cox17 und Tim13 allerdings vergleichbar mit der Einzelmutante und nicht stärker erhöht. $\Delta yme1$ weist im Vergleich zum Wildtyp einen Wachstumsdefizit im Tüpfeltest auf, eine zusätzliche Deletion von *MSP1* zeigt jedoch den gleichen Wachstumsphänotyp und keine weitere Verschlechterung des Zellwachstums (Abbildung 9B).

Die erhöhte endogene Menge von Msp1 in der $\Delta yme1$ -Mutante könnte darauf hindeuten, dass Msp1 versucht das Fehlen von Yme1 zu kompensieren, z.B. durch Export fehlgefalteter Proteine aus dem Intermembranraum. Daher sollte untersucht werden, ob eine Überexpression von *MSP1* den Wachstumsphänotyp von $\Delta yme1$ rettet. Dazu wurde

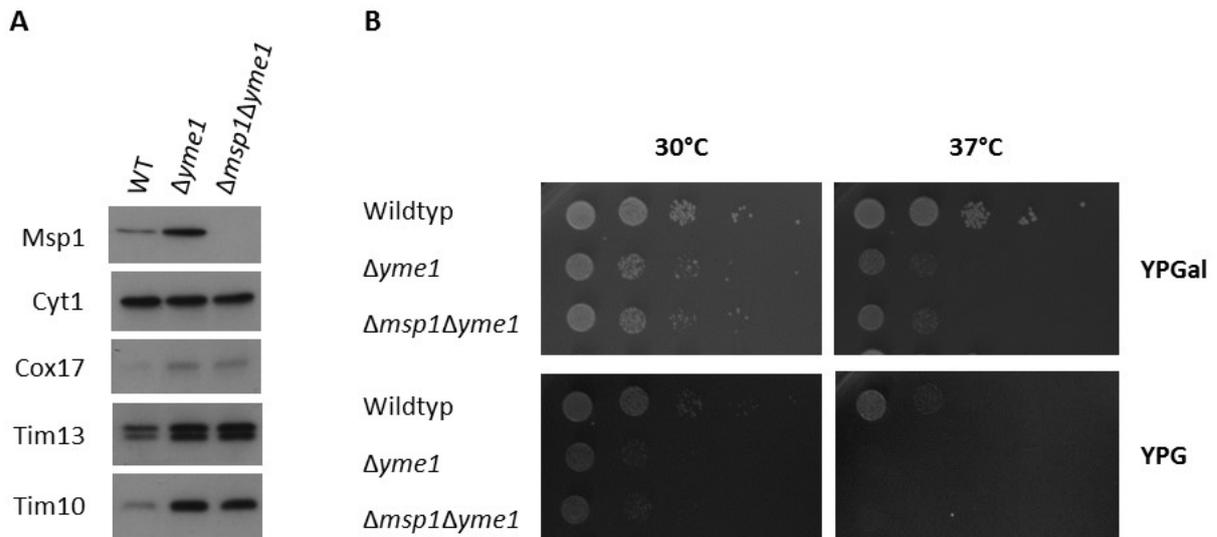


Abbildung 9: Analyse endogener Proteinmengen und Wachstumsverhalten der $\Delta yme1$ -Mutante und der $\Delta msp1\Delta yme1$ Doppelmutante. (A) Wildtyp (WT), $\Delta yme1$ und $\Delta msp1\Delta yme1$ im Stammhintergrund W303 wurden in Vollmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle (YPGal) bei 30°C bis zur stationären Wachstumsphase angezogen. Nach alkalischer Lyse wurden die Gesamtzellextrakte mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration analysiert. (B) Wildtyp, $\Delta yme1$ und $\Delta msp1\Delta yme1$ wurden mittels Tüpfeltest auf ihr Wachstumsverhalten auf Platten mit Galaktose (YPGal), und Glycerin (YPG) als Kohlenstoffquelle bei jeweils 30°C und 37°C untersucht.

$\Delta yme1$ mit dem Plasmid pYX242-*MSP1* transformiert, das *MSP1* unter der Kontrolle eines *TPI1*-Promotors überexprimiert. Dann wurde das Zellwachstum von $\Delta yme1 + MSP1 \uparrow$ in einem Tüpfeltest analysiert. Für das Experiment wurden Selektivmedien mit Galaktose, Glycerin oder Laktat als Kohlenstoffquelle verwendet, und die Hefeplatten jeweils bei 15°, 30° und 37°C inkubiert (Abbildung 10).

Wie bereits zuvor beobachtet wurde, wiesen sowohl *MSP1* \uparrow also auch $\Delta yme1$ ein etwas schwächeres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp auf. Überraschenderweise konnte die *MSP1*-Überexpression den Wachstumsphänotyp von $\Delta yme1$ nicht retten, sondern verschlechterte ihn sogar. Dieser Effekt wurde insbesondere auf Laktat-Medium und Inkubation bei 37°C deutlich. Dies weist darauf hin, dass Msp1 das Fehlen von Yme1 nicht kompensieren kann. Msp1 ist somit nicht in einem parallelen Mechanismus aktiv, sondern möglicherweise sogar im selben Mechanismus wie Yme1.

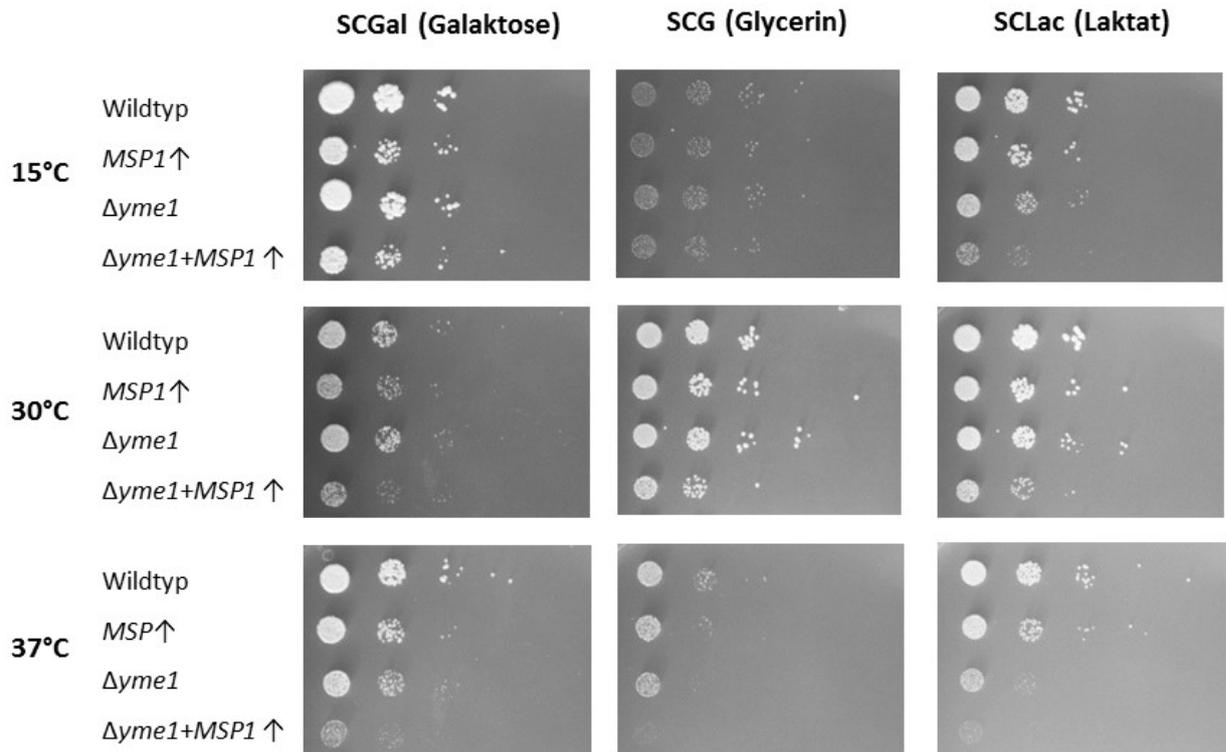


Abbildung 10: Überexpression von *MSP1* kompensiert nicht den Wachstumsphänotyp von $\Delta yme1$, sondern führt in Kombination zu einem noch stärkeren Wachstumsdefizit. Wildtyp, *MSP1*↑, $\Delta yme1$ und $\Delta yme1 + MSP1$ ↑ im Stammhintergrund W303 wurden mittels Tüpfeltest auf ihr Wachstumsverhalten auf Platten mit Galaktose (SCGal), Glycerin (SCG) oder Laktat (SCLac) als Kohlenstoffquelle und bei 15°C, 30°C oder 37°C untersucht.

3.5 Untersuchung des Einflusses von Msp1 auf die Mitophagie

In den vorherigen Untersuchungen zu *MSP1*-Expressionsmutanten fiel auf, dass einige endogene Proteinmengen verändert waren, und es stellte sich somit die Frage, ob Msp1 bei der mitochondrialen Qualitätskontrolle eine Rolle spielt. Um einen Einfluss auf autophagische Abbauprozesse zu überprüfen, wurden sowohl Proteinmengen eines vakuolären Proteins, als auch die Größe der Vakuolen in *MSP1*-Mutanten untersucht.

3.5.1 Untersuchung zur endogenen Menge des vakuolären Proteins Vac8 in $\Delta msp1$

Vac8 ist ein vakuoläres Membranprotein, welches beim Transport von Proteinen aus dem Zytosol zur Vakuole benötigt wird und somit in Autophagie-Prozessen der Zelle mitwirkt¹¹¹. In Untersuchungen zu endogenen Proteinmengen von *MSP1*-Mutanten mittels Western Blot und Immundekoration konnte beobachtet werden, dass Vac8 in $\Delta msp1$ erhöht ist (Abbildung 11).

Da Vac8 bei Fehlen von Msp1 induziert wird, stellte sich die Frage nach einer Rolle von Msp1 in autophagischen Prozessen, spezifisch in der Mitophagie. Eine veränderte Dynamik in der Elimination von Mitochondrien durch autophagische Prozesse könnte auch die veränderten Proteinmengen in *MSP1*-Mutanten unter stationärem Wachstumsstress erklären und dass diese Effekte deutlich im Gesamtzellysate und weniger in isolierten, intakten Mitochondrien zu beobachten sind. Im Folgenden sollte also untersucht werden, ob Msp1 die Mitophagie beeinflusst.

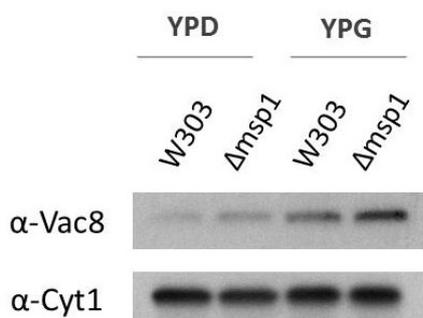


Abbildung 11: Analyse endogener Proteinmengen zeigt erhöhte Mengen des vakuolären Proteins Vac8 in $\Delta msp1$. Wildtyp (W303) und $\Delta msp1$ -Mutante wurden in Medien mit Glukose (YPD) oder Glycerin (YPG) als Kohlenstoffquelle bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden in stationärer Wachstumsphase geerntet und die Gesamtzellextrakte über SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration mit spezifischem Antiserum gegen Vac8 analysiert. Immundekoration gegen Cytochrom c_1 diente hierbei als Kontrolle.

3.5.2 Untersuchung der Vakuolengröße in $\Delta msp1$ mittels konfokaler Lasermikroskopie

Nachdem gezeigt wurde, dass die Proteinmengen eines vakuolären Membranproteins in Gesamtzellextrakten von $\Delta msp1$ erhöht sind, sollte ergänzend untersucht werden, ob die Deletion von *MSP1* auch zu einer Vergrößerung der Vakuolen in den Zellen führt. Zur

Beantwortung dieser Fragestellung wurde die Konfokale Lasermikroskopie zu Hilfe gezogen. Ein spezifischer Vakuolenfarbstoff sollte die Beurteilung der Vakuolengröße in Wildtyp und $\Delta msp1$ - Mutante unterm Mikroskop ermöglichen. Bei der Kultivierung der Zellen wurde berücksichtigt, dass Mitophagie in Hefe verstärkt unter Nährstoffmangel und langem Wachsen in respiratorischem Medium eintritt¹¹²⁻¹¹⁴. Wildtyp und $\Delta msp1$ im Stammhintergrund W303 wurden bei 30°C jeweils einmal in Vollmedium (YPG) und einmal im nährstoffärmeren Selektivmedium (SCG) angezogen, wobei in beiden Medien Glycerin als nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle diente. Die Zellen wurden bis zur stationären Wachstumsphase (OD>6) angezogen, dann erfolgte die Zugabe von 100 μ M des Vakuolenfarbstoffes Cell Tracker Blue CMAC. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen unterm Mikroskop untersucht (Abbildung 12). Es zeigte sich, dass die Vakuolenbildung in den Zellen, die in Selektivmedium angezogen wurden, ausgeprägter ist. Es konnte jedoch unter diesen Bedingungen keine Unterschiede in Bezug auf Vakuolengröße und -morphologie zwischen Wildtyp und $\Delta msp1$ -Mutante beobachtet werden.

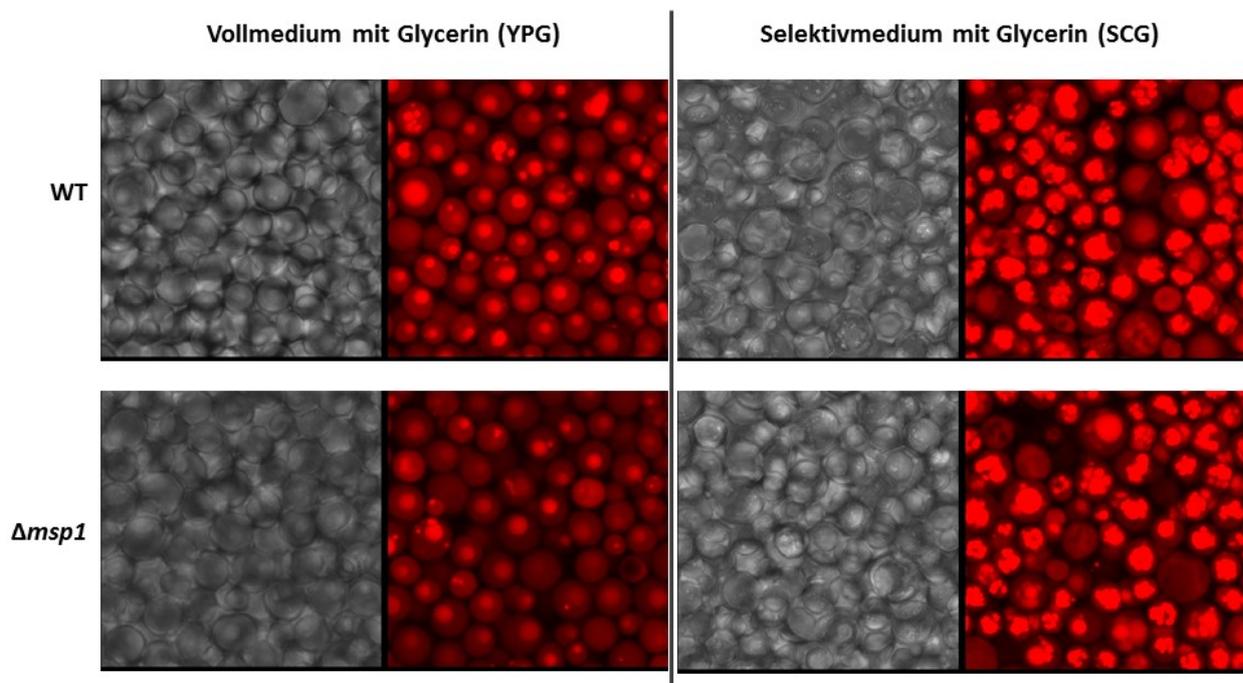


Abbildung 12 (S. 57): Repräsentative Phasenkontrastbilder und Fluoreszenzbilder von Wildtyp und $\Delta msp1$ - Mutante in der konfokalen Lasermikroskopie zur Untersuchung der Vakuolengröße. Wildtyp und $\Delta msp1$ wurden bei 30°C jeweils in Vollmedium (YPG) und in Selektivmedium (SCG) angezogen. Die Zellen wurden in stark stationärer Wachstumsphase ($OD > 6$) geerntet und unterm Mikroskop untersucht. Die Vakuolen wurden mithilfe eines spezifischen Vakuolenfarbstoffes unter Fluoreszenz visualisiert. Bilder in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Johannes Wagener, Max von Pettenkofer-Institut, München.

3.5.3 Untersuchung des Zellwachstums bei *MSP1*- und *ATG32*-Mutanten

Das mitochondriale Außenmembranprotein Atg32 spielt eine entscheidende Rolle in der Initiierung der Mitophagie, wodurch ein selektiver vakuolärer Abbau von Mitochondrien als Antwort auf widrige Wachstumsbedingungen erfolgt ⁷¹. Da die endogenen Proteinmengen von mitochondrialen Proteinen und das vakuoläre Protein Vac8 in den *MSP1*-Expressionsmutanten verändert waren, sollte überprüft werden, ob Msp1 die Atg32-abhängige Initialisierung der Mitophagie beeinflusst.

Ausgangspunkt der Untersuchung zum Einfluss von Msp1 auf die Mitophagie war die Generierung einer $\Delta atg32$ -Mutante und einer Doppelmutante $\Delta msp1\Delta atg32$. Diese Hefestämme sollten zunächst im Vergleich mit Wildtyp und $\Delta msp1$ bezüglich ihres Zellwachstums untersucht werden. Dazu wurden Wildtyp, $\Delta msp1$, $\Delta atg32$ und $\Delta msp1\Delta atg32$ im Stammhintergrund BY4741 bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und mittels Tüpfeltest auf ihr Wachstumsverhalten auf Platten mit Glukose oder Glycerin als Kohlenstoffquellen und bei 30°C untersucht (Abbildung 13). Weder bei den Einzelmutanten noch bei der Doppelmutante $\Delta msp1\Delta atg32$ konnte ein Wachstumsphänotyp im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Es zeigte sich somit, dass der Verlust von Atg32 und Msp1 sowie auch das gleichzeitige Fehlen beider Proteine unter normalen Wachstumsbedingungen keinen Einfluss auf die Zellviabilität haben. Im Folgenden sollen daher die $\Delta msp1$ - und $\Delta atg32$ -Mutanten unter speziellen Wachstumsbedingungen analysiert werden, wo gezielt Mitophagie induziert wird.

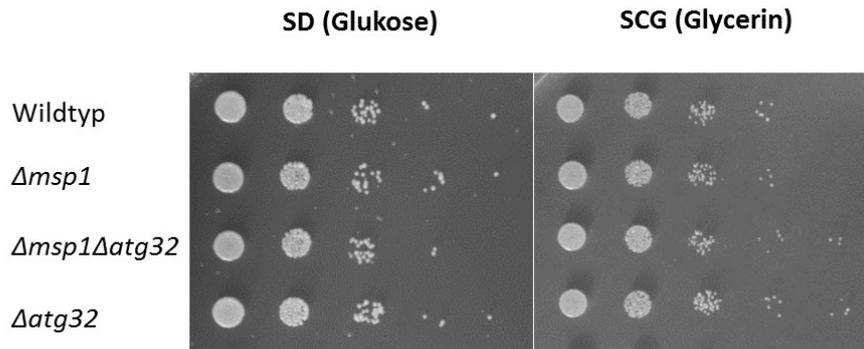


Abbildung 13: Die Doppelmutante $\Delta msp1\Delta atg32$ zeigt ähnlich wie die Einzelmutanten ein Wildtyp-ähnliches Wachstumsverhalten. Wildtyp, $\Delta msp1$, $\Delta atg32$ und $\Delta msp1\Delta atg32$ im Stammhintergrund BY4741 wurden mittels Tüpfeltest auf ihr Wachstumsverhalten auf Platten mit Glukose (SD-Medium) oder Glycerin (SCG-Medium) als Kohlenstoffquelle bei 30°C untersucht.

3.5.4 Untersuchung der Mitophagie in *MSP1*- und *ATG32*-Mutanten

Um Mitophagie in Hefezellen gezielt zu induzieren, findet man in der Literatur unterschiedliche Methoden: Eine Methode beinhaltet das Umstellen einer Hefekultur von respiratorischem Medium, in der Zellen vermehrt Mitochondrien zur Zellatmung benötigen, auf Wachstum in einem Stickstoffmangel-Medium, bei der infolge des Nährstoffmangels Mitochondrien verstärkt abgebaut werden^{112–114}. Eine andere Methode ist die Zugabe von Rapamycin, das über die Inhibition des TOR-Signalwegs zu einer Induktion autophagischer Prozesse in der Zelle führt^{69,115}. Mithilfe dieser Methoden sollte der Mitophagie-assoziierte Proteinabbau in Wildtyp, $\Delta msp1$ -Mutante, und $\Delta msp1\Delta atg32$ -Mutante untersucht werden. Dabei sollten mögliche Unterschiede zwischen den Stämmen aufgezeigt werden.

3.5.4.1 Mitophagie-Induktion durch Stickstoffmangel

Die Hefestämme Wildtyp, $\Delta msp1$, $\Delta atg32$ und $\Delta msp1\Delta atg32$ im BY4741 Hintergrund wurden in SCLac-Medium bei 30°C kultiviert. Bei Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurden Aliquote für den Gesamtzellaufschluss entnommen (t=0) und in den verbliebenen Zellen die Mitophagie induziert, indem die Zellen in SD-Medium ohne Ammoniumsulfat und Aminosäuren überführt und somit einem Stickstoffmangel ausgesetzt wurden. Die Kulturen wurden dann bei 30°C weiter inkubiert und nach 12 h, 18 h und 38 h erfolgte die Entnahme weiterer Aliquote zum Gesamtzellaufschluss mittels alkalischer Lyse

(t=12, t=18, t=38). Die Proben wurden mittels Western Blot und Immundekoration analysiert (Abbildung 14). Um die Mitophagie zu beurteilen, wurde der Abbau von Aac2 verfolgt, einem ADP/ATP Carrier in der mitochondrialen Innenmembran und bekanntlich sensitivem Mitophagie-Marker¹¹⁵. Im Wildtyp war ein ausgeprägter Abbau von Aac2 zu erkennen, während in der $\Delta atg32$ -Mutante der Abbau etwas langsamer ablief, da das Fehlen von Atg32 die Initialisierung der Mitophagie behindert. Dennoch konnte in der $\Delta atg32$ -Mutante ein Aac2-Abbau beobachtet werden, was höchstwahrscheinlich auf alternative Abbaumechanismen zurückzuführen ist. In der $\Delta msp1$ -Mutante fielen zunächst im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Mengen von Aac2 bereits vor Induktion der Mitophagie auf, wobei die Abbaurate nach Induktion mit der vom Wildtyp vergleichbar war. Der Proteinabbau in der Doppelmutante verhielt sich ähnlich wie in der $\Delta atg32$ -Einzelmutante. Die erhöhten endogenen Proteinmengen von Aac2 in den $msp1$ -Deletionsmutanten könnten möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass Aac2 ein bekanntes Substrat des Tim9-Tim10-Komplexes ist^{28,116}. Da die Mengen der kleinen Tim-Proteine in $\Delta msp1$ erhöht sind (siehe Abschnitt 3.4.1.1), wär auch ein verstärkter Import von Aac2 denkbar.

Insgesamt war in diesem Experiment zur Induktion der Mitophagie durch Stickstoffentzug leider deutlich nicht-mitochondrienspezifischer Abbau zu sehen. Zum einen zeigte sich dies im Aac2-Abbau trotz Deletion von $ATG32$, und zum anderen auch in einem deutlichen Abbau des zytosolischen Proteins Pgc1. Es ist sehr gut denkbar, dass bei ausgeprägtem nutritivem Mangel wie in diesem Fall multiple Mechanismen in Gang gesetzt werden um auf den Zellstress zu reagieren und Proteinabbau herbeizuführen, z.B. durch ungezielte Sequestration von Mitochondrien durch allgemeine Autophagie oder durch zytosolische und Organell-spezifische Proteasen, sodass aus diesen Ergebnissen keine isolierten Aussagen zur Mitophagie in $\Delta msp1$ und $\Delta msp1\Delta atg32$ gemacht werden können.

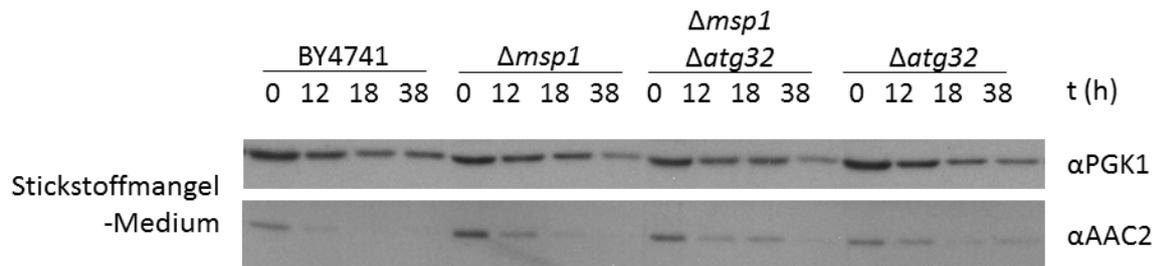


Abbildung 14: Mitophagie-Induktion in *MSP1*- und *ATG32*-Mutanten mittels Stickstoffentzug zeigt zum Teil nicht-mitochondrienspezifischen Abbau. Wildtyp (BY4741), $\Delta msp1$, $\Delta atg32$ und $\Delta msp1\Delta atg32$ wurden in SCLac-Medium (Selektivmedium mit Laktat als Kohlenstoffquelle) bei 30°C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurde die Mitophagie durch Überführen der Kulturen in stickstoffarmes Selektivmedium induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquote für Gesamtzellaufschlüsse entnommen (0h, 12h, 18h und 38h). Die Proben wurden mit Hilfe von Western Blot und Immundekoration analysiert.

3.5.4.2 Mitophagie-Induktion durch Rapamycin

Die Hefestämme Wildtyp, $\Delta msp1$, $\Delta atg32$ und $\Delta msp1\Delta atg32$ im BY4741 Hintergrund wurden in SCLac-Medium bei 30°C kultiviert. Bei Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurden Aliquote für den Gesamtzellaufschluss entnommen (t=0) und in den verbliebenen Zellkulturen die Mitophagie induziert mittels Zugabe von 1 μ M Rapamycin. Parallel wurde der Kontrollversuchsreihe DMSO zugegeben. Die Kulturen wurden weiter bei 30°C inkubiert und nach 12 h und 18 h erfolgte die Entnahme von weiteren Aliquote zum Gesamtzellaufschluss (t=12 und t=18). Die Proben wurden mittels Western Blot und Immundekoration analysiert (Abbildung 15 A.1). Zur Beurteilung der Mitophagie wurde wieder der Abbau des mitochondrialen Proteins Aac2 verfolgt. Zur genaueren Bewertung der Abbaudynamik unter Rapamycin wurden die Blotsignale von Aac2 quantifiziert und ins Verhältnis zu einer Kontrolle gesetzt, dem zytosolischen Protein Pgk1, welches von der Rapamycin-Gabe weitestgehend unbeeinflusst blieb (Abbildung 15 A.2). Auch in diesem Versuch zur Mitophagie war ein deutlicher Abbau von Aac2 im Wildtyp zu beobachten. Dagegen blieben dieses Mal die Proteinmengen von Aac2 in der $\Delta atg32$ -Mutante weitestgehend konstant, was für eine selektive Induktion der Mitophagie durch Rapamycin im Gegensatz zur Stickstoffmangelbehandlung spricht. Es zeigten sich erneut erhöhte Proteinmengen von Aac2 sowohl im $\Delta msp1$ als auch im $\Delta msp1\Delta atg32$ vor der Mitophagieinduktion. In der $\Delta msp1$ -Mutante erfolgte nach Rapamycin-Gabe ein Abbau,

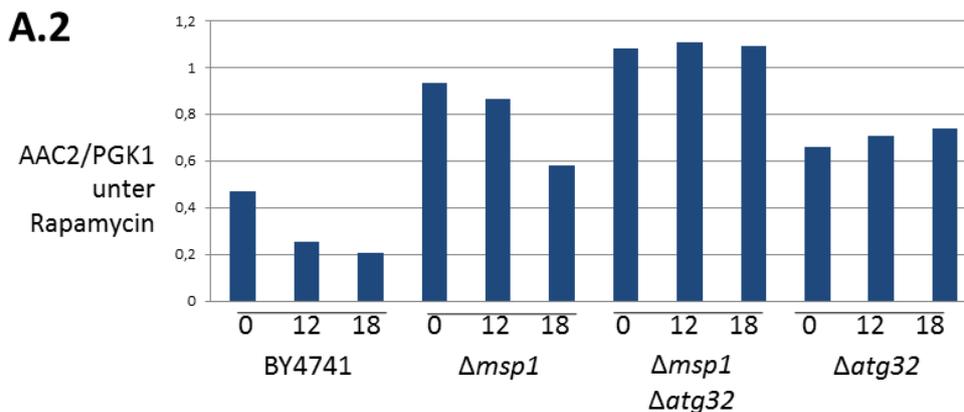
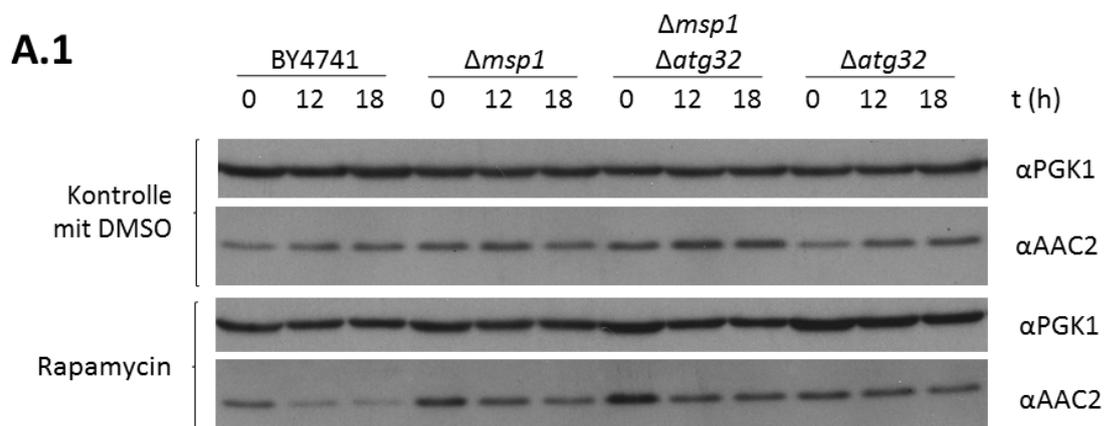
welcher jedoch im Vergleich zum Wildtyp verzögert eintritt. In der Doppelmutante konnte kein Abbau von Aac2 in der Quantifizierung der Blotsignale beobachtet werden, die Proteinmengen blieben konstant. In den DMSO-Kontrollen erfolgte kein Abbau von Aac2, sondern eher eine leichte Akkumulation des Proteins in allen Stämmen.

Die stabilen Proteinmengen in der *Δatg32*-Mutante deuteten also darauf, dass die durch Rapamycin induzierte Mitophagie eine selektive Form der Autophagie darstellt, was in Übereinstimmung mit der Studie von Mendl und Kollegen steht ¹¹⁵. Es sollte im Folgenden der Abbau weiterer mitochondrialer Proteine in *Δmsp1* mit dieser Methode untersucht werden. Bei einem wiederholten Versuch mit Hefezellen im Stammhintergrund BY4742 zeigte der Vergleich mehrerer Proteine zwischen Wildtyp und *Δmsp1* jedoch nur geringe Unterschiede (Abbildung 15 B.1). Erst nach Quantifizierung der Signale im Western Blot konnte für die ersten 12 Stunden nach Induktion eine tendenziell langsamere Abbaurrate für die mitochondrialen Proteine Fzo1, Tom70 und Tim50 in der *Δmsp1*-Mutante nachgewiesen werden (Abbildung 15 B.2). Bemerkenswert war, dass nicht für alle mitochondriale Proteine ein Abbau zu beobachten ist. So bleibt das Protein Cytochrom *c*₁ auch nach Rapamycin-Gabe stabil.

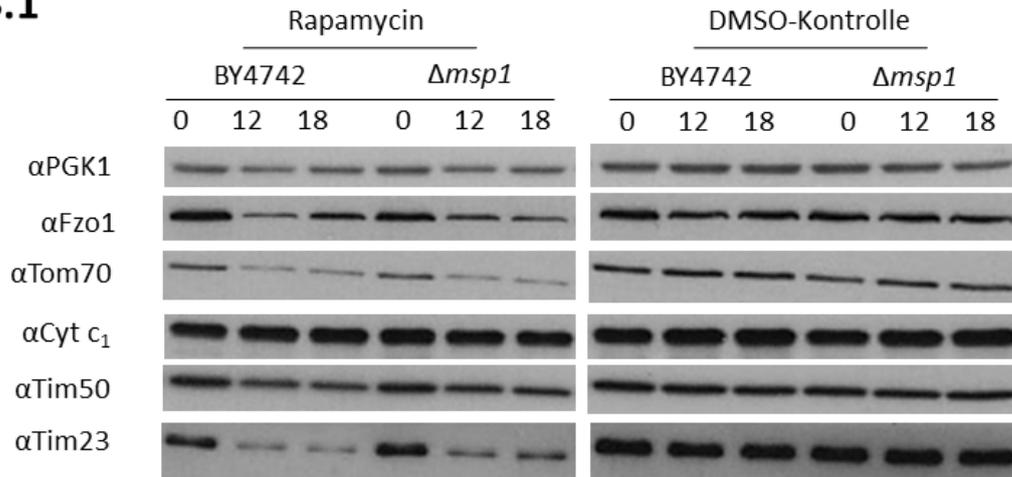
Es soll hier erwähnt sein, dass insgesamt die Analysen zum Proteinabbau nach Mitophagieinduktion teils variable Ergebnisse bezüglich der Abbaukinetik der Markerproteine lieferten. So konnten für einige Proteine ein deutlicher Rapamycin-induzierter Abbau beobachtet werden, während andere Proteine in ihrer Menge stabil blieben oder sogar akkumulierten. Für ein einzelnes Protein konnte das Ausmaß an Degradation in den Versuchswiederholungen deutlich variieren. Die Unbeständigkeit in Western-Blot-Analysen zum Mitophagie-assoziierten Proteinabbau wurde auch bereits in einer anderen Studie beschrieben, die diese Beobachtung den wechselnden Aktivitäten vakuolärer und mitochondrialen Proteasen zuschreibt ¹¹⁵.

Zusammenfassend zeigten aber die Ergebnisse der Mitophagie-Experimente mit *MSP1*-Mutanten zum einen, dass durch Rapamycin-Gabe eine effektivere und spezifischere Induktion der Mitophagie in Hefe bewirkt werden kann als mittels Stickstoffentzug bei Kultivierung der Zellen. Zum anderen konnte beobachtet werden, dass der Abbau des mitochondrialen Proteins Aac2 in der *msp1*-Deletionsmutante verglichen zum Wildtyp im Stammhintergrund BY4741 langsamer verläuft. Im Stammhintergrund BY4742 waren die Unterschiede im Proteinabbau nach Mitophagie-Induktion zwischen Wildtyp und *Δmsp1*

jedoch nicht so deutlich ausgeprägt und bedürfen wohl weiterer Wiederholungsversuche um die Signifikanz der Daten zu beurteilen und einen möglichen Einfluss von Msp1 auf die Mitophagie zuverlässig zu klären. Insgesamt lieferten die Ergebnisse keine klare Evidenz für einen Einfluss von Msp1 auf die Mitophagie, dennoch geben sie Hinweise auf eine Behinderung des phagolytischen Abbaus mitochondrialer Proteine bei Fehlen von Msp1. Damit bleibt die Frage weiter offen, ob Msp1 in den Prozess der Mitophagie direkt eingreift oder ob es die Mitophagie in indirekter und unspezifischer Weise beeinflusst, indem es an anderen Mechanismen der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle beteiligt ist.



B.1



B.2

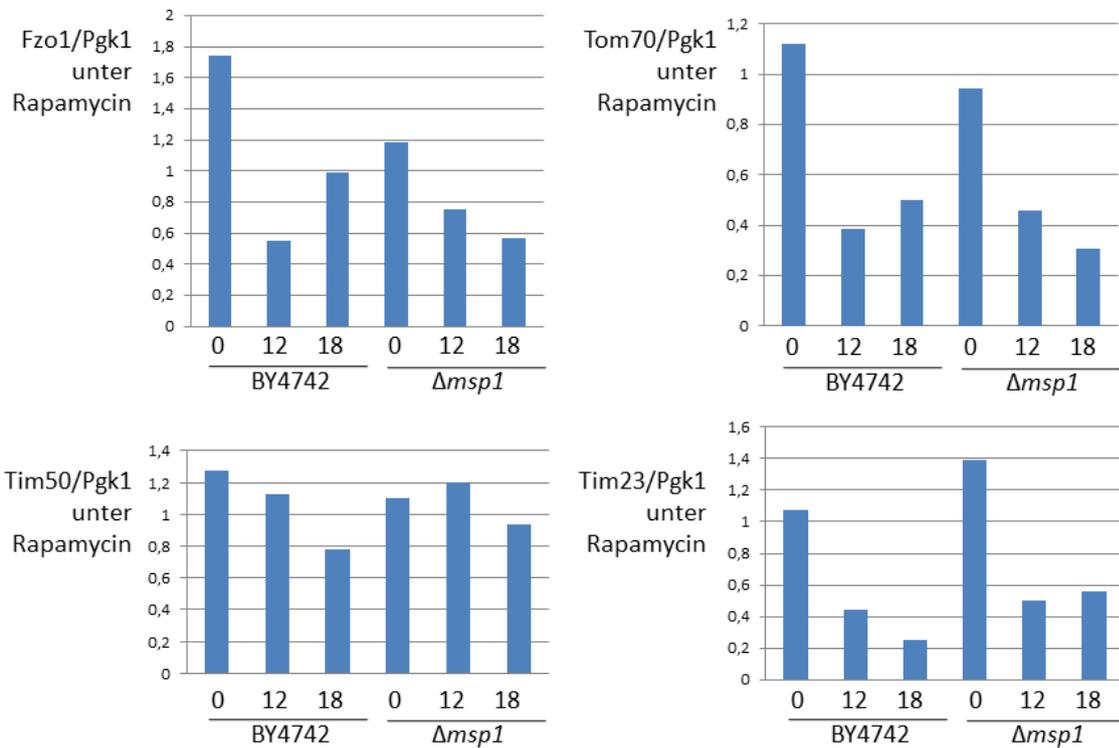


Abbildung 15 (Seiten 63, 64): Mitophagie-Induktion mit Rapamycin in *misp1*- und *atg32*-Mutanten zeigt mitochondrienspezifischen Abbau. (A) Mitophagie-Induktion in Wildtyp, $\Delta msp1$, $\Delta atg32$ und $\Delta msp1\Delta atg32$ im BY4741 Stammhintergrund zeigt eine verringerte Abbaurate von AAC2 in $\Delta msp1$ im Vergleich zum Wildtyp. (B) Mitophagie-Induktion in Wildtyp und $\Delta msp1$ im BY4742 Stammhintergrund zeigen keine signifikanten Unterschiede in den Abbauraten für die mitochondrialen Proteine Fzo1, Tom70, Tim50 und Tim23. (A.1 und B.1) Die Stämme wurden in SCLac-Medium (Selektivmedium mit Laktat als Kohlenstoffquelle) bei 30°C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Die Mitophagie wurde durch Zugabe von 1 μ M Rapamycin induziert. Parallel wurde der Kontrollversuchsreihe DMSO zugegeben. In Zeitintervallen (0h, 12h und 18h) erfolgte die Entnahme von Aliquote zum Gesamtzellaufschluss mittels alkalischer Lyse. Die Proben wurden mit Hilfe von Western Blot und Immundekoration analysiert. (A.2 und B.2) Zur genaueren Beurteilung der Kinetik wurden die Blotsignale der mitochondrialen Proteine quantifiziert und im Verhältnis zum zytosolischen Kontrollprotein Pgc1 gesetzt.

3.6 Untersuchung von Msp1 im Zusammenhang mit dem Abbau mitochondrialer Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System

3.6.1 Msp1 wird unter Proteinfaltungstress durch Hitze oder Zugabe von Chloramphenicol induziert

Bei der Untersuchung endogener Proteinmengen in *MSP1*-Expressionsmutanten fiel bereits in Zellen, die unter günstigen Wachstumsbedingungen mit Vollmedium und bei 30°C inkubiert wurden, Mengenveränderungen einiger mitochondrialer Proteine auf (siehe Abschnitt 3.4.1.1). Des Weiteren konnte wiederholt beobachtet werden, dass in Zellen, welche bei 37°C kultiviert und somit einem Temperaturstress ausgesetzt werden, erhöhte Proteinmengen von Msp1 vorliegen (vgl. Abschnitt 3.4.1.1, Abbildung 6 A). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Msp1 unter Hitzestress stärker exprimiert wird.

Hitzestress führt in Zellen zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen und damit zu einer Störung der Proteinhomöostase. Eine andere Art und Weise Proteinfaltungstress spezifisch in Mitochondrien zu induzieren ist durch die Zugabe eines mitochondrialen Translationshemmers, wie z.B. dem Antibiotikum Chloramphenicol. Es sollte daher überprüft werden, ob Msp1 auch bei Zugabe von Chloramphenicol induziert wird. Zellen im Stammhintergrund W303 wurden in Vollmedium mit entweder Glukose (YPD) oder Galaktose

(YPGal) bei 30°C anziehen. Die Übernachtskulturen wurden verdünnt und gesplittet in Kulturen ohne und mit 2,5 mg/ml Chloramphenicol und für 24 Stunden weiter bei 30°C inkubiert. Die Proteinmengen wurden nach Gesamtzellextraktion mittels Western Blot und Immundekoration analysiert (Abbildung 16). In Bezug auf Msp1 konnte auch hier eine Expressionssteigerung in Zellen festgestellt werden, welche 24 Stunden lang mit Chloramphenicol behandelt wurden. Dies konnte am deutlichsten im YPGal-Medium beobachtet werden.

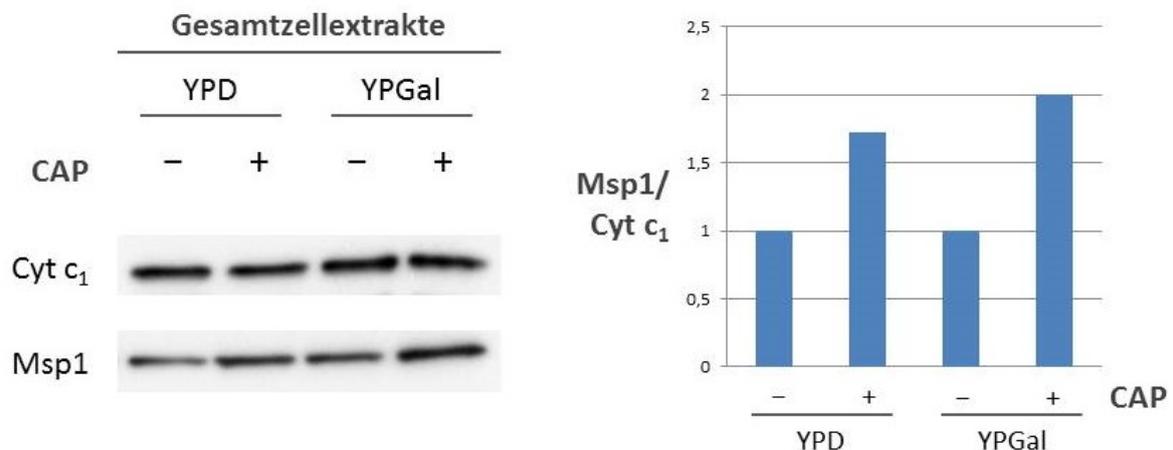


Abbildung 16: Induktion von Msp1 durch Behandlung mit dem Translationshemmer Chloramphenicol (CAP). Hefezellen im W303 Hintergrund wurden in Vollmedium mit entweder Glukose (YPD) oder Galaktose (YPGal) als Kohlenstoffquelle bei 30°C angezogen. Die Übernachtskulturen wurden wiederum verdünnt und in Kulturen ohne und mit 2,5 mg/ml Chloramphenicol aufgeteilt und für weitere 24h bei 30°C inkubiert. Die endogenen Proteinmengen wurden nach Gesamtzellextraktion mittels Western Blot und Immundekoration analysiert. Blotsignale von Msp1 wurden quantifiziert und im Verhältnis zum Kontrollprotein Cytochrom c_1 gesetzt. Die Signale der Proben ohne CAP wurden gleich 1 gesetzt, dargestellt ist die relative Erhöhung der Expression nach Zugabe von CAP.

Die Ergebnisse deuten also darauf hin, dass Msp1 durch Proteinfaltungsstress wie Hitze oder Zugabe von Chloramphenicol induziert wird. Eine Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen und damit eine Störung der Proteinhomöostase zieht meist reaktive Rettungs- und Abbaumechanismen nach sich (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.1.3.). Msp1 könnte bei dieser Stressantwort eine Rolle spielen. In den vorherigen Untersuchungen sind reduzierte Proteinmengen mitochondrialer Proteine bei Überexpression von *MSP1* beobachtet worden, sodass es denkbar wäre, dass Msp1 einen Einfluss auf den Abbau dieser Proteine nimmt und

damit in die Regulierung der Proteinmengen in Mitochondrien eingreift. Dies sollte im nachfolgenden untersucht werden.

3.6.2 Untersuchung des proteasomabhängigen Abbaus mitochondrialer Proteine in *MSP1*-Expressionsmutanten

Die gesteigerte Expression von Msp1 unter Proteinfaltungsstress und die Mengenveränderungen einiger mitochondrialer Proteine bei Expressionsänderung von Msp1 deuten auf eine Rolle von Msp1 in der Qualitätskontrolle mitochondrialer Proteine hin. Eine wichtige Instanz für den kontrollierten Abbau von Proteinen in der Zelle bildet das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), welches neueren Erkenntnissen nach auch mitochondriale Proteine degradiert (Review von ¹¹⁷; siehe auch Einleitung, Abschnitt 1.1.3.3). Für das mitochondriale Außenmembranprotein Fzo1 ist zum Beispiel ein proteasomabhängiger Abbau beschrieben worden, wobei es durch die Ubiquitin-Ligase Mdm30 dem proteasomalen Abbau zugeführt wird⁵⁹. Im Folgenden sollte daher in *MSP1*-Expressionsmutanten der Abbau von Proteinen über das UPS untersucht werden.

3.6.2.1 *MSP1*-Überexpression verlangsamt den Abbau von Om45-nonstop, einem Marker des proteasomabhängigen Proteinabbaus

Zur Untersuchung des proteasomabhängigen Proteinabbaus in *MSP1*-Expressionsmutanten sollte experimentell die Proteinsynthese inhibiert werden, um den Abbau bereits synthetisierter Proteine verfolgen zu können. Dies erfolgte durch Zugabe von Cycloheximid, einem Translationshemmer, der die Proteinbiosynthese an den zytosolischen Ribosomen unterbindet. Zum anderen sollte parallel auch der Effekt einer gezielten Proteasominhibition untersucht werden, um einen Abbau mit Lokalisation im Zytosol nachzuweisen und eine mögliche Akkumulation von Proteinen, die nicht abgebaut werden können, zu analysieren. Zur Proteasominhibition wurde MG-132 eingesetzt, welches durch die selektive Blockade der proteolytischen Aktivität des Proteasomkomplexes den Abbau ubiquitylierter Proteine hemmt. Als Marker für den UPS-abhängigen Abbau sollte u.a. das mitochondriale Protein Fzo1 dienen. Außerdem wurden die Zellen mit einem p416GPDp-*OM45-MYC-nonstop*-Plasmid transformiert, welches für ein Om45 ohne Stop-Codon unter

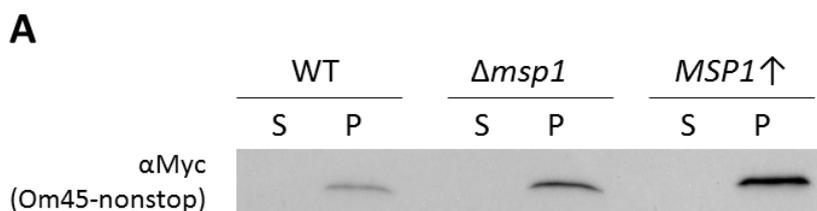
der Kontrolle eines GPD1 Promotors kodiert. Dieses fehlerhaft exprimierte Protein ist ebenfalls ein Substrat des UPS¹¹⁸⁻¹²⁰, an dessen Abbaukinetik der UPS-abhängige Proteinabbau beurteilt werden kann. Die Lokalisation von Om45-nonstop wurde bestimmt durch Isolation von Mitochondrien aus den transformierten Hefezellen und Western-Blot-Analyse des mitochondrialen Pellets und des post-mitochondrialen Überstandes. Dabei wurde Om45-nonstop in der mitochondrialen Fraktion vorgefunden (Abbildung 17 A).

Der nachfolgende Versuchsaufbau erfolgte gemäß der Methode von Liu et al. 2007¹²¹. Wildtyp, *Δmsp1* und *MSP1*↑ Zellen wurden in Selektivmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle, ohne Ammoniumchlorid, dafür mit Zusatz von 0,1% (w/v) Prolin bei 30°C kultiviert. Die Übernachtskultur wurde auf OD 0,5 in frischem Medium mit 0,003% SDS verdünnt. Nach einer Inkubation für 3,5 Stunden bei 30°C erfolgte die Zugabe von 75 μM MG-132 bzw. DMSO als Kontrolle. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 50 min bei 30°C wurden Aliquote entnommen und über alkalische Lyse Gesamtzellextrakte gewonnen (Probe t=0). Dann erfolgte die Zugabe von 100 μg/mL Cycloheximid zu den Kulturen. Nach 1 h und 2,5 h erfolgten Probenentnahmen für Gesamtzellextrakte (t=1 und t=2,5). Die Zellextrakte wurden mittels Western Blot und Immundekoration analysiert (Abbildung 17 B.1). Der Abbau des myc-getaggten Om45-nonstop konnte mittels Immundekoration mit einem spezifischen myc-Antikörper verfolgt werden. Zur genaueren Beurteilung der Abbaukinetik wurden die Blotsignale von Om45-nonstop und Fzo1 quantifiziert und ins Verhältnis zu dem zytosolischen Kontrollprotein Pgk1 gesetzt.

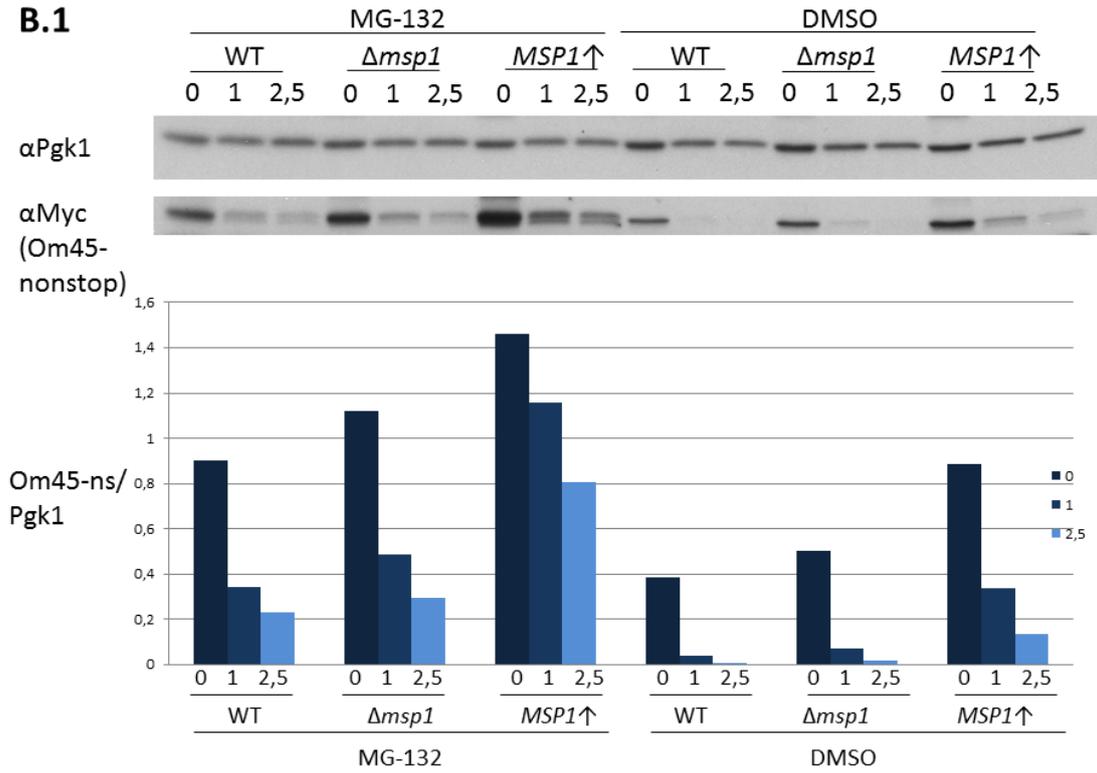
Bei der Analyse des Abbaus von Om45-nonstop konnte zunächst beobachtet werden, dass die Proteinmengen von Om45-nonstop bei t=0 in den Zellen, welche bereits für 50 min mit MG-132 behandelt wurden, höher waren als in den Kontrollen mit DMSO. Diese Beobachtung kann durch den gehemmten proteasomabhängigen Abbau von Om45-nonstop bei Blockade des UPS unter MG-132 erklärt werden. Interessanterweise waren dabei die Proteinmengen von Om45-nonstop in beiden *MSP1*-Expressionsmutanten und hierbei besonders in *MSP1*↑ höher als im Wildtyp, sowohl in Anwesenheit von MG-132 als auch von DMSO. In allen drei Stämmen konnte ein Abbau von Om45-nonstop trotz Zugabe des Proteasominhibitors beobachtet werden, der jedoch im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen langsamer ablief. Dies deutet entweder auf eine unvollständige Hemmung des UPS oder einen alternativen Abbauweg wie z.B. Mitophagie hin, der unter normalen Umständen parallel zum UPS zur Erhaltung der Proteinhomöostase beiträgt und bei Blockade des UPS

weiterhin Proteine degradiert. Bei Analyse des Abbaus zeigte sich, dass der Abbau von Om45-nonstop sich in der *MSP1* \uparrow -Mutante deutlich von dem im Wildtyp unterscheidet. Während die Abbaurate in $\Delta msp1$ der im Wildtyp gleicht, war deutlich zu erkennen, dass der Abbau im *MSP1* \uparrow im Vergleich zum Wildtyp langsamer abläuft, sowohl nach Zugabe von MG-132 also auch in der DMSO-Kontrolle. Die Beobachtungen zeigten somit, dass die Überexpression von *MSP1* den Abbau von Om45-nonstop behindert, möglicherweise weil das überexprimierte Msp1 andere Proteine verstärkt als Substrate an das Proteasom liefert, die in Konkurrenz zum Om45-nonstop dessen Abbau verzögern.

Bei der Analyse des Abbaus von Fzo1, bei dem ein UPS-abhängiger Abbau postuliert wird, wurde überraschenderweise festgestellt, dass die Proteinmengen bei t=0 in den Zellen mit Proteasominhibitor geringer sind als in den Zellen ohne MG-132 (Abbildung 17 B.2). Bei einem proteasomabhängigen Abbau hätte man das Gegenteil vermutet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zugabe des Proteasominhibitors bereits eine Stressreaktion in der Zelle hervorruft, durch die Fzo1 weniger exprimiert wird. Nach Zugabe von Cycloheximid konnte wiederum beobachtet werden, wie Fzo1 in den Zellen ohne Proteasominhibition etwas schneller abgebaut wird, was für einen UPS-abhängigen Abbau von Fzo1 spricht. Dabei verhielten sich die Abbauraten von Fzo1 in Wildtyp, $\Delta msp1$ und *MSP1* \uparrow ähnlich. Eine Deletion oder Überexpression von *MSP1* scheint somit keinen Einfluss auf den Abbau von Fzo1 durch das UPS zu haben.



B.1



B.2

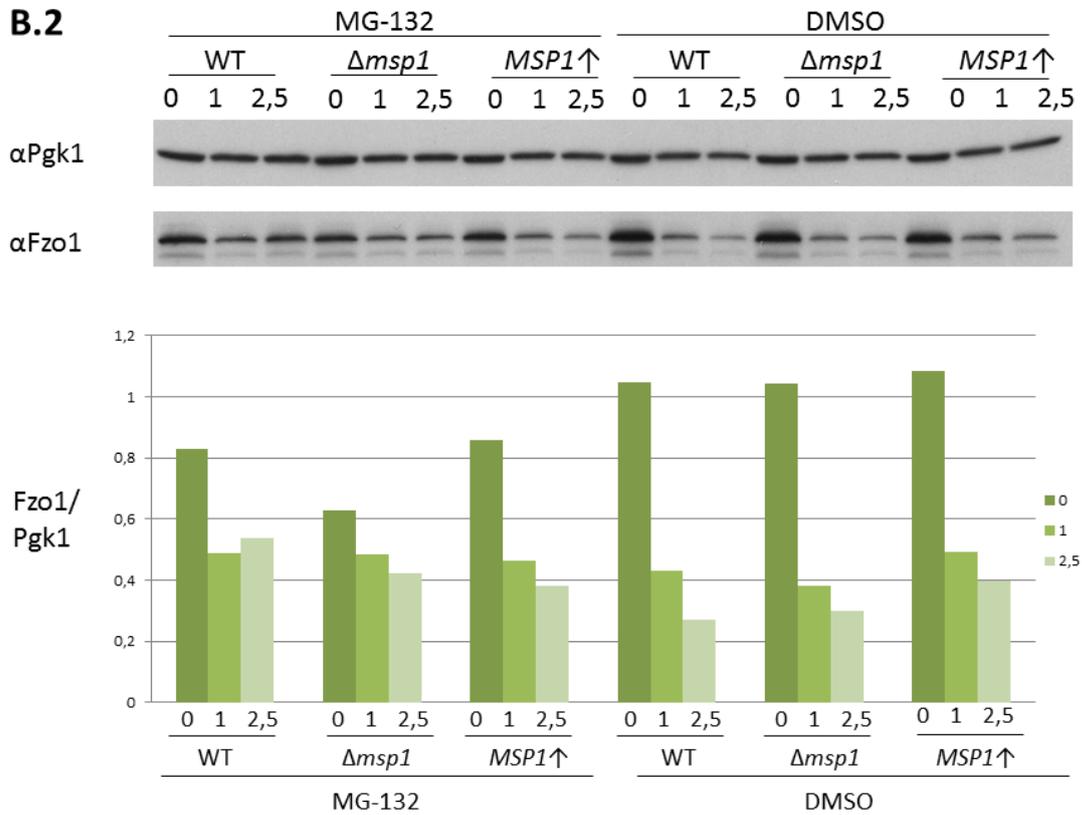


Abbildung 17 (Seite 69,70): (A) Om45-nonstop ist in Mitochondrien lokalisiert. (B) Analyse des Abbaus eines artifiziellen (B.1) und eines endogenen UPS-Substrates (B.2) in Abhängigkeit von Msp1. (A) Wildtyp (WT), $\Delta msp1$ und $MSP1\uparrow$ im Stammhintergrund W303 wurden mit dem Om45-nonstop-myc-Plasmid transformiert und in Selektivmedium bei 30°C angezogen und die Mitochondrien aus logarithmischer Wachstumsphase isoliert. Proteinmengen wurden über Western Blot und Immundekoration mit Antiserum gegen den Myc-Tag analysiert. S=Überstand mit zytosolischer Fraktion; P=Pellet mit mitochondrialer Fraktion. (B.1 und B.2) Die Stämme Wildtyp (WT), $\Delta msp1$ und $MSP1\uparrow$ im Stammhintergrund W303 wurden in einem für Versuche mit MG132 spezifischen Medium (Yeast Nitrogen Base mit Prolin und essentiellen Aminosäuren, Galaktose als Kohlenstoffquelle) bei 30°C kultiviert. Die Übernachtskultur wurde in frischem Medium mit 0,003% SDS verdünnt. Zur Proteasominhibition erfolgte die Zugabe von 75 μ M MG132, während in einem Kontrollansatz nur DMSO hinzugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 50 min bei 30°C wurden Aliquots entnommen (Probe t=0). Dann erfolgte die Hemmung der Proteintranslation mit 100 μ g/mL Cycloheximid. Nach 1h und 2,5h erfolgten Probenentnahmen für Gesamtzellextrakte (t=1 und t=2,5). Die Zellextrakte wurden mittels Western Blot und Immundekoration analysiert. Zur genaueren Beurteilung der Abbaukinetik wurden die Blotsignale von Om45-nonstop und Fzo1 quantifiziert und im Verhältnis zum zytosolischen Kontrollprotein Pgk1 gesetzt.

3.6.2.2 Kleine Intermembranraumproteine akkumulieren bei Proteasominhibition durch MG-132 in $MSP1$ -Überexpressionsmutanten

Bei der Untersuchung des UPS-abhängigen Abbaus von Om45-nonstop fiel ein verlangsamter Abbau in der $MSP1$ -Überexpressionsmutante auf. Eine Erklärung wäre, dass Msp1 andere Proteine an das Proteasom liefert, die mit Om45nonstop als Abbausubstrat konkurrieren. So konnte in Untersuchungen zu endogenen Proteinmengen in $MSP1$ -Expressionsmutanten beobachtet werden, dass die endogenen Mengen kleiner Intermembranraumproteine in $MSP1\uparrow$ deutlich verringert sind (vgl. Abschnitt 3.4.1.2, Abbildung 7 A). Eine mögliche Erklärung für beide Beobachtungen wäre, dass Msp1 diese Proteine vom Intermembranraum ins Zytosol transportiert, um sie so gezielt dem Abbau übers Proteasom zuzuführen. Um diese Hypothese zu unterstützen, sollte untersucht werden, ob mitochondriale Proteine bei Proteasominhibition in der $MSP1$ -Überexpressionsmutante akkumulieren, weil sie nicht abgebaut werden können.

Dazu wurden Wildtyp und $MSP1\uparrow$ Zellen in Selektivmedium mit Laktat als Kohlenstoffquelle und ohne Ammoniumchlorid, dafür mit Zusatz von 0,1% (w/v) Prolin bei 30°C kultiviert. Die Übernachtskultur wurde auf OD 0,5 in frischem Medium mit 0,003% SDS

verdünnt. Nach einer Inkubation für 3,5 Stunden bei 30°C wurden Aliquote für Gesamtzellaufschlüsse über alkalische Lyse entnommen (t=0), während in der restlichen Zellkultur die Zugabe von 200 µM MG-132 bzw. DMSO zur Kontrolle erfolgte. Nach 5,5 Stunden bei 30°C wurden die Zellen geerntet und erneut Gesamtzellextrakte gewonnen (t=5,5) und die Proteinmengen über Western Blot und Immundekoration analysiert (Abbildung 18). Die Analyse zeigte eine Akkumulation von Tim10, Tim13 und Cox17 in Wildtyp und *MSP1*↑ unter Zugabe von MG-132. Besonders deutlich sah man die Akkumulation dieser Proteine in der *MSP1*-Überexpressionsmutante: Während die Proteinmengen zum Zeitpunkt t=0 geringer als im Wildtyp sind, findet nach Zugabe von MG-132 eine deutliche Akkumulation der kleinen Intermembranraumproteine statt, sodass sich die Proteinmengen denen im Wildtyp angleichen. Diese Beobachtungen sprechen für eine Rolle von Msp1 im Abbau kleiner Intermembranraumproteine durch das Proteasom, sodass bei Überexpression von Msp1 ein gesteigerter Abbau zu verringerten Proteinmengen führt, dies bei Inhibition des Proteasoms aber wieder aufgehoben wird.

Interessanterweise wurde bei Analyse weiterer Proteine festgestellt, dass im Gegensatz zu den kleinen Intermembranraumproteinen diese bei Zugabe von MG-132 stärker abgebaut werden als in den DMSO-Kontrollen. Dies konnte für das zytosolische Protein Pgk1 und die mitochondrialen Proteine Tom70, Cytochrom *c*₁, Fis1 und auch Fzo1 beobachtet werden. Diese Beobachtungen deuten auf einen alternativen Abbauweg der Zelle hin. Es gibt viele Indizien dafür, dass das UPS und Autophagie als die zwei wesentlichen Abbaumechanismen der Zelle funktionell aneinander gekoppelt sind und sich gegenseitig beeinflussen, wenn auch der genaue Mechanismus dahinter noch nicht vollständig verstanden ist. So konnte bereits in unterschiedlichen Zelllinien gezeigt werden, dass bei Blockade des Proteasoms durch Inhibitoren wie MG-132 oder Bortezomib als kompensatorischer Mechanismus die Autophagie aktiviert wird, um die vermehrt anfallenden fehlgefalteten Proteine und Proteinaggregate zu entfernen^{122,123}. So kann auch im Fall des vorliegenden Experiments angenommen werden, dass nach Inhibition des Proteasoms vermutlich autophagische Prozesse aktiviert wurden. Dabei bleibt zunächst offen, wie die untersuchten kleinen Intermembranraumproteine dem phagolytischen Abbau entgehen, da sie unter MG-132 deutlich akkumulieren. Möglicherweise handelt es sich hier um den cytosolischen Pool der mitochondrialen IMR-Proteine.

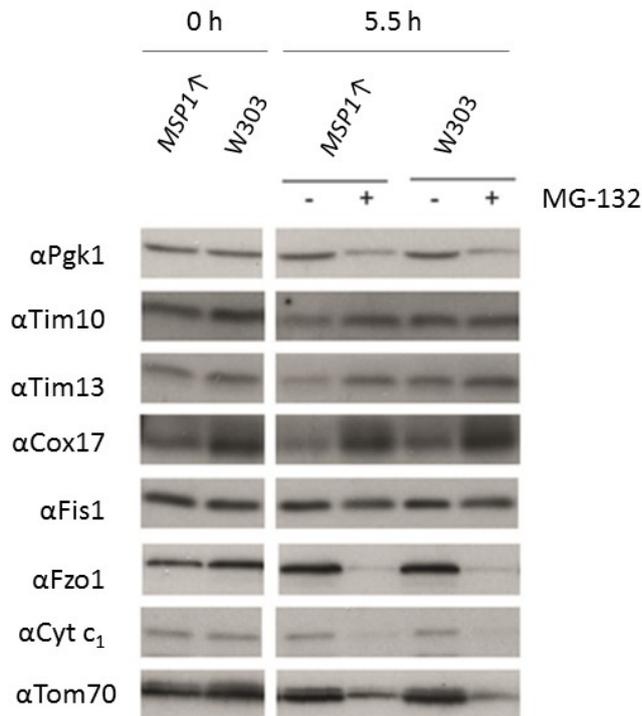


Abbildung 18: Kleine Intermembranraumproteine akkumulieren in *MSP1*Δ bei Proteasominhibition durch MG-132. Die Stämme W303 Wildtyp und *MSP1*Δ wurden in einem für Versuche mit MG-132 spezifischen Medium (Yeast Nitrogen Base mit Prolin und essentiellen Aminosäuren, Laktat als Kohlenstoffquelle) bei 30°C kultiviert. Die Übernachtskultur wurde in frischem Medium mit 0,003% SDS verdünnt. Nachdem Aliquote für Gesamtzellaufschlüsse entnommen wurden (t=0), erfolgte in der restlichen Zellkultur die Zugabe von 200 μM MG132 bzw. DMSO. Nach einer Inkubationszeit von 5,5 h bei 30°C wurden nochmals Aliquote zur Gesamtzellextraktion entnommen (t=5,5) und die Proteinmengen über Western Blot und Immundekoration analysiert.

3.6.2.3 Deletion von *msp1* hemmt den Abbau von Tim10 über das Proteasom

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass in der *MSP1*-Überexpressionsmutante kleine Intermembranraumproteine akkumulieren wenn gleichzeitig der proteasomale Abbau blockiert wird. Wenn Msp1 diese Proteine dem Abbau übers Proteasom zuführt, müsste dementsprechend der Proteinabbau in der *msp1*-Deletionsmutante blockiert oder verlangsamt sein. Dies sollte im Folgenden untersucht werden. Wildtyp und $\Delta msp1$ Zellen wurden in Selektivmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle und ohne Ammoniumchlorid, dafür mit Zusatz von 0,1% (w/v) Prolin bei 30°C kultiviert. Die Übernachtskultur wurde in frischem Medium mit 0,003% SDS verdünnt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4 Stunden bei 30°C wurden Aliquote zur Zellextraktion entnommen (Probe t=0). Dann wurde

die Proteintranslation durch Zugabe von 100 µg/mL Cycloheximid inhibiert. Nach 1 h und 2,5 h erfolgten Probenentnahmen für Gesamtzellextrakte (t=1 und t=2,5), um den Proteinabbau zu verfolgen. Die Zellextrakte wurden mittels Western Blot und Immundekoration analysiert (Abbildung 19). In einer Kontrollgruppe erfolgte kurz vor dem Zeitpunkt t=0 die zusätzliche Gabe von 200 µM MG-132 um im Vergleich einen proteasomspezifischen Abbau nachzuweisen.

In diesem Experiment konnte für Tim10 ein Abbau abhängig vom Proteasom und von Msp1 dargestellt werden. Dabei zeigte sich nach Zugabe von Cycloheximid ein deutlicher Abbau von Tim10 im Wildtyp, während die Proteinmenge in $\Delta msp1$ konstant blieb. In der Kontrollgruppe mit MG-132 fand in keinem der beiden Stämme ein Abbau statt. Diese Beobachtungen sprechen für einen spezifischen Abbau von Tim10 durch das Proteasom und dass dieser Prozess an das Vorhandensein von Msp1 gebunden ist. Es sei hier angemerkt, dass sich dieses Ergebnis insgesamt schwierig reproduzieren und auch nicht für andere kleine IMR-Proteine wie Tim13 oder Cox17 konkret darstellen ließ. Dies deutet darauf, dass andere Kontrollmechanismen vorliegen müssen, welche die Funktion von Msp1 zum Abbau von IMR-Proteinen zumindest teilweise kompensieren.

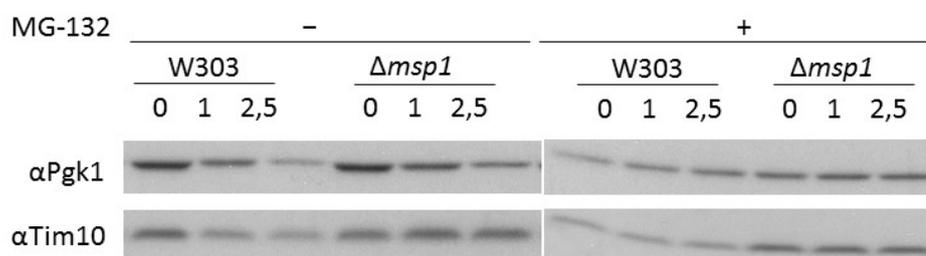


Abbildung 19: Nach Translationshemmung durch Cycloheximid wird Tim10 Proteasom-abhängig abgebaut. Dieser Prozess ist in $\Delta msp1$ aufgehoben. Wildtyp und $\Delta msp1$ vom Stammhintergrund W303 wurden in Selektivmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle und ohne Ammoniumchlorid, dafür mit Zusatz von Prolin bei 30°C kultiviert. Die Übernackkultur wurde in frischem Medium verdünnt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4 h bei 30°C wurden Aliquote zur Zellextraktion entnommen (Probe t=0). Dann wurde die Proteintranslation durch Zugabe von 100 µg/mL Cycloheximid terminiert. Nach 1 h und 2,5 h erfolgten Probenentnahmen für Gesamtzellextrakte (t=1 und t=2,5). Die Zellextrakte wurden mittels Western Blot und Immundekoration analysiert. In einer Kontrollgruppe erfolgte die zusätzliche Gabe von 200 µM MG-132 zur Proteasominhibition.

4. Diskussion

Msp1 wurde im Rahmen eines Screening-Versuchs in *S. cerevisiae* bezüglich der membranspezifischen Sortierung mitochondrialer Proteine als ein Protein identifiziert, dessen Überexpression die Lokalisierung von Proteinen zwischen der mitochondrialen Außenmembran und dem Intermembranraum beeinflusst⁹². Die genaue Funktion des Proteins war jedoch lange nicht bekannt. Erst kürzlich erschienen zwei voneinander unabhängige Studien, in denen dem Protein eine Rolle bei der Entfernung fehllokalisierter Proteine aus der mitochondrialen Außenmembran zugeschrieben wird^{124,125}. Darin wird berichtet, dass die Proteine Pex15 und Gos1, welche unter physiologischen Bedingungen durch das GET (**G**uided **E**ntry of **T**ail-anchored proteins)-System von den Ribosomen zum ER geleitet und in die ER-Membran inseriert werden, bei gleichzeitigen Fehlen von GET-Komponenten und Msp1 verstärkt in der mitochondrialen Außenmembran akkumulieren. Das Vorhandensein von Msp1 und insbesondere die Überexpression des Proteins bewirken wiederum eine Beseitigung der fehllokalisierten Proteine. Zudem ist die Abbaurate von mislokalisiertem Pex15 und Gos1 in $\Delta msp1$ verringert. In beiden Studien wird daraus geschlossen, dass Msp1 eine Rolle in der Proteinqualitätskontrolle der mitochondrialen Außenmembran spielt, indem es Proteine daraus extrahiert und dem Abbau zuführt. Der eigentliche Abbau, so vermuten sie, findet durch das Proteasom im Zytosol statt. Abgesehen von den fehllokalisierten ER- bzw. peroxisomalen Proteine konnte keine der beiden Studien mitochondriale Substratproteine von Msp1 identifizieren. Die vorliegende Arbeit liefert erstmalig Hinweise auf eine Rolle von Msp1 in der Qualitätskontrolle mitochondrialer Proteine, wobei hier ebenfalls ein Zusammenspiel mit dem Ubiquitin-Proteasom-System von zentraler Bedeutung ist.

4.1 Msp1 beeinflusst die endogenen Konzentrationen von kleinen Intermembranraumproteinen

Im Rahmen dieser Arbeit fielen bei der Untersuchung von Proteinmengen in Zellaufschlüssen von *MSP1*-Expressionsmutanten quantitative Veränderungen der kleinen Intermembranraumproteine Cox17, Tim10 und Tim13 auf. Dabei waren die endogenen

Mengen dieser Proteine in der *msp1*-Deletionsmutante geringfügig erhöht und in der Überexpressionsmutante deutlich verringert. Dass diese Veränderungen wiederholt primär in Gesamtzellaufschlüssen und weniger in isolierten Mitochondrien zu beobachten waren, weist auf eine veränderte Verteilung der kleinen Intermembranraumproteine zwischen den zellulären Kompartimenten hin. Die Ergebnisse legen nahe, dass es in Abhängigkeit von Deletion bzw. Überexpression von *MSP1* zu einem erhöhten bzw. verminderten Auftreten von Cox17, Tim10 und Tim13 im Zytosol kommt, während die Proteinmengen innerhalb der Mitochondrien relativ stabil bleiben.

Cox17, Tim10 und Tim13 sind bekanntermaßen durch ihre spezifischen Cysteinmotive Substrate von Mia40, welches in Zusammenspiel mit der Sulfhydryloxidase Erv1 in einem Disulfid-Transfer-System den Import und Verbleib von Proteinen im IMR katalysiert^{39,40,109} (siehe auch Einleitung, Abschnitt 1.1.2). Neben den quantitativen Veränderungen der Mia40-Substratproteine fielen in dieser Arbeit auch verminderte Proteinmengen von Erv1 in der *msp1*-Deletionsmutante in Western-Blot-Analysen auf. Ein Halo-Assay mit *MSP1*-Expressionsmutanten zeigte jedoch keine veränderte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber oxidativem Stress, was für eine regelrechte Funktion des Mia40-Erv1-Systems spricht. Somit ist die verringerte Proteinmenge von Erv1 in $\Delta msp1$ möglicherweise im Rahmen eines kompensatorischen Effekts bei erhöhtem Angebot an IMR-Proteinen zu werten.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch untersucht, ob Msp1 funktionell in Zusammenhang mit der AAA-Protease Yme1 steht, da letztere nachweislich durch proteolytischen Abbau die endogenen Mengen der kleinen Tim-Proteine bestimmt¹²⁶. In Einklang mit einer älteren Studie konnten wir zeigen, dass die endogene Menge von Msp1 in *yme1*-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist¹¹⁰. Wir überprüften daraufhin, ob Msp1 möglicherweise hochreguliert wird, um die Funktion von Yme1 zu kompensieren, z.B. durch Export fehlgefalteter Proteine aus dem IMR. Die Überexpression von *MSP1* in einer $\Delta yme1$ -Mutante konnte jedoch den im Vergleich zum Wildtyp schwächeren Wachstumsphänotyp von $\Delta yme1$ nicht retten. Bemerkenswerterweise führte dies zu einem noch stärkeren Wachstumsdefizit. Diese Beobachtung legt nahe, dass Yme1 und Msp1 nicht parallel, sondern möglicherweise im selben zellulären Mechanismus aktiv sind. Es wäre z.B. denkbar, dass Yme1 in Funktion eines Chaperones⁵² Proteine entsprechend faltet oder seine Proteaseaktivität benötigt wird, um Msp1-Substrate in einem vorgeschalteten Schritt zu prozessieren, damit sie mit Hilfe von Msp1 transloziert werden können. Weitere

Experimente sind nötig, um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen. So könnte untersucht werden, ob der Einfluss von überexprimierten *MSP1* auf die endogenen Mengen der kleinen IMR-Proteine in Abwesenheit von Yme1 noch zu beobachten ist. Auch in Proteinabbau-Tests mit *MSP1*- und *YME1*-Expressionsmutanten könnten diese miteinander verglichen werden.

4.2 Msp1 beeinflusst den Abbau kleiner Intermembranraumproteine durch das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist ein Proteinkomplex im Zytosol eukaryotischer Zellen zum Abbau von ubiquitinylierten Proteinen aus dem Zytosol und Endoplasmatischem Retikulum⁵⁸. Es gibt bereits mehrere Studien, die eine Rolle des UPS auch am Abbau mitochondrialer Proteine zeigen. Die bisher identifizierten mitochondrialen Substrate des UPS sind größtenteils Außenmembranproteine. Für Fzo1 in Hefe und das humane Ortholog Mitofusin 1 konnte bereits eine spezifische Ubiquitinylierung mit nachfolgendem Proteasom-abhängigen Abbau nachgewiesen werden^{59,127}. Mcl1, VDAC1, Tom20 und Tom70 sind weitere vorgeschlagene Substrate des UPS an der Außenmembran, da ihre endogenen Proteinmengen unter Proteasominhibition stabilisiert werden^{128,129}. Auch für Proteine im Intermembranraum konnte eine Akkumulation bei Proteasominhibition gezeigt werden, dabei wurde zunächst für das IMR-Protein Endonuklease G in humanen Zellen ein UPS-abhängiger Abbau nachgewiesen¹³⁰. Später zeigten Bragoszewski und Kollegen auch für die Mia40-Substrate in Hefe Cox12, Mic17, Pet191 und Tim13 einen Proteasom-abhängigen Abbau während ihres Imports vom Zytosol ins Mitochondrium und postulierten damit eine Importregulation der IMR-Proteine durch das Proteasom-Ubiquitin-System⁶³. Eine neue Studie von Bragoszewski und Kollegen weist nun zusätzlich auf die Möglichkeit der Retrotranslokation von strukturell instabilen IMR-Proteinen über den TOM-Komplex zurück ins Zytosol und nachfolgenden Abbau über das Proteasom hin¹³¹. Dieser Vorgang war allerdings nicht ausschließlich TOM-Komplex abhängig.

Die Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit unterstützen dieses neuartige Konzept der Proteinregulation im Intermembranraum durch Export von Proteinen und Abbau über zytosolische Kontrollsysteme, dabei könnte dem Protein Msp1 eine entscheidende Rolle zukommen: Im Rahmen dieser Arbeit war die Hochregulation von Msp1

bei Induktion von Zellstress via Hitze oder Gabe von Chloramphenicol aufgefallen. Diese Beobachtungen deuten auf eine Rolle von Msp1 in der Qualitätssicherung des mitochondrialen Proteoms hin. Außerdem fielen veränderte endogene Mengen von mitochondrialen Proteinen bei Expressionsänderung von *MSP1* auf. Daraufhin wurde der Einfluss von Msp1 auf den Abbau von mitochondrialen Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System untersucht. In unseren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Msp1-abhängige Abbau der kleinen IMR-Proteine Cox17, Tim10 und Tim13 durch Zugabe des Proteasominhibitors MG-132 gehemmt wird. Weitere Versuche zeigten, dass die Überexpression von *MSP1* den proteasomalen Abbau von Om45-nonstop verlangsamt, einem überlang exprimierten Genprodukt mit möglicher Lokalisation in Mitochondrien. Dies lässt vermuten, dass erhöhte Mengen an Msp1 möglicherweise zur verstärkten Beanspruchung des UPS durch seine spezifischen Substratproteine führen, was den Abbau anderer Proteine behindern könnte. In Bezug auf die Studie von Bragoszewski und Kollegen zur Retrotranslokation von IMR-Proteinen über den TOM-Komplex zum proteasomabhängigen Abbau ergeben sich aus den vorliegenden Ergebnissen unterschiedliche Hypothesen wie Msp1 dabei eine Rolle spielen könnte. Msp1 könnte aktiv durch seine ATPase-Aktivität den Rücktransport von Proteinen über den TOM-Komplex katalysieren. Hier wäre es interessant, in weitergehenden Experimenten eine direkte Interaktion von Msp1 mit seinen möglichen Substratproteinen oder anderen Komponenten nachzuweisen. Des Weiteren wäre auch denkbar, dass Msp1 ähnlich wie Cdc48 im ERAD-Transportweg⁶² unabhängig vom TOM-Komplex Proteine aus dem IMR extrahiert oder die Rekrutierung und Ubiquitylierung der Substratproteine als essentielle Schritte hin zum proteasomalen Abbau unterstützt, nachdem sie die mitochondriale Außenmembran überwunden haben. Im zweiten Fall würde Msp1 vermehrt auf den im Zytosol lokalisierten Pool an IMR-Proteinen wirken. Diesbezüglich müsste nach möglichen Kofaktoren von Msp1, z.B. de-ubiquitylierenden Enzymen und Ubiquitin-Ligasen gesucht werden.

4.3 Bedeutung von Msp1 in der Proteinqualitätskontrolle in Mitochondrien und der Zelle

Neben einer Rolle im Proteasom-Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau wiesen die Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit auch auf einen Einfluss von Msp1 auf andere Qualitätskontrollsysteme der Zelle hin. Bei der Untersuchung eines möglichen Einflusses von Msp1 auf die Mitophagie ergab die Analyse des Proteinabbaus nach Mitophagieinduktion mittels Rapamycin eine langsamere Abbaurate für das Markerprotein Aac2 in der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp im Stammhintergrund BY4741. Da aber ein deutlicher Abbau mitochondrialer Proteine trotz Deletion von *MSP1* zu verfolgen war, konnte eine Rolle von Msp1 in der Induktion von Mitophagie weitestgehend ausgeschlossen werden. Der leicht verzögerte Abbau des mitochondrialen Proteins Aac2 in der Deletionsmutante könnte aber darauf hindeuten, dass die Assoziation von Msp1 mit dem UPS in indirekter Weise auch die Dynamik anderer Abbauwege wie die Mitophagie beeinflussen kann. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die zwei Kontrollsysteme UPS und Autophagie in ihrer Funktionalität eng gekoppelt sind. So wurde in Säugetierzellen und *Drosophila* gezeigt, dass die E3-Ub Ligase Parkin an defekte Mitochondrien transloziert und durch Ubiquitylierung mitochondrialer Proteine den autophagischen Abbau von Mitochondrien herbeiführt^{127,132–134}. Abhängig von Parkin transloziert dabei p97 (Ortholog zu Cdc48 in Hefe) an Mitochondrien und assistiert beim proteasomalen Abbau von Mfn1 und Mfn2 (Orthologe zur Fzo1 in Hefe), sodass die Fusion von Mitochondrien eingeschränkt wird und die Mitophagie initiiert wird. Inhibition von p97 verhindert die Parkin-vermittelte Mitophagie¹²⁷. Auch der UPS-abhängige Abbau weiterer Außenmembranproteine soll für die Initiierung von Mitophagie entscheidend sein (siehe Review¹³⁵). Da keine Homologen zu Parkin in *S. cerevisiae* existieren, ist zurzeit nicht bekannt, ob ein ähnlicher Mechanismus auch in Hefe zu finden ist. Es wäre aber vorstellbar, dass Msp1 den proteasomalen Abbau bestimmter mitochondrialer Proteine vermittelt, wodurch autophagische Prozesse begünstigt werden, ähnlich wie bei der Parkin-vermittelten Mitophagie in Säugetierzellen. Weiterführende Untersuchungen zum Einfluss von Msp1 auf die Mitophagie sind hierbei nötig. So könnte unter anderem getestet werden, ob Überexpression von *MSP1* den Proteinabbau durch Mitophagie beschleunigt und ob dieser Prozess durch Inhibition des Proteasoms beeinflusst wird.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit ist also anzunehmen, dass Msp1 zumindest indirekt in umfangreicher Weise an der Proteinqualitätskontrolle der Zelle beteiligt ist. In Bezug auf das mitochondriale Proteom konnte speziell gezeigt werden, dass Msp1 den proteasomalen Abbau von IMR-Proteinen vermittelt. Dies ergänzt die bisherigen Erkenntnisse zur Funktion des Proteins bei der Entfernung fehllokalisierter peroxisomaler Proteine aus der mitochondrialen Außenmembran^{124,125} somit um einen neuen Aspekt: die Rolle von Msp1 in der quantitativen Regulation mitochondrialer Proteine. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Funktion von Msp1 darüber hinausgeht. So konnten Okreglak und Walter zeigen, dass Msp1 auch in Peroxisomen lokalisiert ist. Alle Befunde zusammengenommen sprechen für ein breites Spektrum an Funktionen von Msp1 im Qualitätskontrollsystem der Zelle.

Der womöglich multifunktionale Einsatz von Msp1 ist eine weitere Parallele zu Cdc48, das sowohl in den ERAD-Signalweg als auch in das UPS an Mitochondrien involviert ist. Bisherige Studien legen nahe, dass das UPS an die Aktivität von Cdc48 gebunden ist und dass Cdc48 über Vms1 an die mitochondriale Außenmembran rekrutiert wird^{61,128} (siehe auch Einleitung, Abschnitt 1.1.3.3). Es wäre daher von großem Interesse die Assoziation von Cdc48 mit Mitochondrien in zukünftigen Versuchen genauer zu untersuchen und zu evaluieren, ob Msp1 mit dem Vms1–Cdc48/p97-Komplex in funktioneller Verbindung steht oder als ein eigenständiges System Proteine dem proteosomalen Abbau zuführt. In diesem Zusammenhang wäre die Identifikation weiterer Substratproteine von Msp1 und möglicher Interaktionspartner wichtig, um ein umfassenderes Bild von der Funktion des Proteins in der Qualitätskontrolle der Zelle zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Msp1 ist ein von Hefe bis zum Menschen konserviertes Protein in Mitochondrien und gehört zu der Familie der AAA-Proteine. Zu Beginn dieser Arbeit war über die physiologische Funktion dieses Proteins kaum etwas bekannt. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich daher mit der funktionellen Charakterisierung dieses Proteins mittels zellbiologischer und proteinchemischer Methoden in Hefezellen. Msp1 ist in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert und weist in der Sequenzanalyse eine N-terminale Transmembrandomäne auf, während der Hauptanteil des Proteins inklusive seiner löslichen C-terminalen AAA-Domäne zum Zytosol hin exponiert ist. Analysen zum Zellwachstum von *MSP1*-Expressionsmutanten ergeben, dass die *msp1*-Deletionsmutante ein Wildtyp-ähnliches Wachstumsverhalten zeigt, während die Überexpressionsmutante ein Wachstumsdefizit aufweist. Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hefezellen zeigen keine Veränderung der mitochondrialen Morphologie in den *MSP1*-Expressionsmutanten. Dennoch führen Mengenveränderungen von Msp1 zu Veränderungen in der Menge kleiner Intermembranraumproteine, die gleichzeitig Substrate des Mia40-Erv1-Systems sind. Beobachtungen des Proteinabbaus deuten darauf hin, dass diese Proteine über das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden und dass dieser Prozess durch Msp1 beeinflusst wird. Für ein AAA-Protein in der mitochondrialen Außenmembran wäre es denkbar, dass Msp1 Proteine aus dem mitochondrialen Kompartiment ATP-abhängig ins Zytosol transloziert und sie somit dem proteasomalen Abbau zuführt. Zudem wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass Msp1 unter Zellstress hochreguliert wird. Die vorliegenden Ergebnisse deuten somit daraufhin, dass Msp1 eine wichtige Funktion im Erhalt der Proteinhomöostase in Mitochondrien einnimmt, indem es am Abbau von mitochondrialen Intermembranraumproteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System mitwirkt. Ein genaues Verständnis der Qualitätskontrollmechanismen in Mitochondrien ist sowohl bei der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen als auch onkologischen Erkrankungen von entscheidender Bedeutung.

6. Literaturverzeichnis

1. Duchen, M. R. Mitochondria and Ca(2+) in cell physiology and pathophysiology. *Cell calcium* **28**, 339–348 (2000).
2. Lill, R. & Muhlenhoff, U. Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences* **30**, 133–141 (2005).
3. Modre-Osprian, R. *et al.* Dynamic simulations on the mitochondrial fatty acid beta-oxidation network. *BMC systems biology* **3**, 2 (2009).
4. Stryer, L. *Biochemie*. 4th ed. (Spektrum Akad. Verl., Heidelberg u.a., 1999).
5. Rassow, J. *Biochemie. 50 Tabellen*. 2nd ed. (Thieme, Stuttgart, 2008).
6. Green, D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671–674 (2005).
7. Pollack, M. & Leeuwenburgh C. Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES*, B475–B482 (2001).
8. Saraste, M. Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**, 1488–1493 (1999).
9. Leonard, J. V. & Schapira, A. H. Mitochondrial respiratory chain disorders I. Mitochondrial DNA defects. *The Lancet* **355**, 299–304 (2000).
10. Koolman, J. & Röhm, K.-H. *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. 4th ed. (Thieme, Stuttgart, 2009).
11. Mannella, C. A. *et al.* Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB life* **52**, 93–100 (2001).
12. Gilkerson, R. W., Selker, J. M. & Capaldi, R. A. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS letters* **546**, 355–358 (2003).

13. Frey, T. G. & Mannella, C. A. The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **25**, 319–324 (2000).
14. Perkins, G. & Frey, T. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* **31**, 97–111 (2000).
15. Prince, F. P. Lamellar and tubular associations of the mitochondrial cristae: unique forms of the cristae present in steroid-producing cells. *Mitochondrion* **1**, 381–389 (2002).
16. Gray, M. W., Burger, G. & Lang, B. F. Mitochondrial evolution. *Science (New York, N.Y.)* **283**, 1476–1481 (1999).
17. Kurland, C. G. & Andersson, S. G. Origin and Evolution of the Mitochondrial Proteome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 786–820 (2000).
18. Neupert, W. & Herrmann, J. M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry* **76**, 723–749 (2007).
19. Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628–644 (2009).
20. Benz, R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochimica et biophysica acta* **1197**, 167–196 (1994).
21. Herrmann, J. M. & Hell, K. Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **30**, 205–211 (2005).
22. Herrmann, J. M. & Neupert, W. Protein transport into mitochondria. *Current opinion in microbiology* **3**, 210–214 (2000).
23. Endo, T., Yamamoto, H. & Esaki, M. Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *Journal of Cell Science* **116**, 3259–3267 (2003).
24. Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C. & Lithgow, T. Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nature structural & molecular biology* **11**, 1044–1048 (2004).

25. Wiedemann, N., Frazier, A. E. & Pfanner, N. The protein import machinery of mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **279**, 14473–14476 (2004).
26. van der Laan, M., Rissler, M. & Rehling, P. Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines. *FEMS yeast research* **6**, 849–861 (2006).
27. Paschen, S. A., Neupert, W. & Rapaport, D. Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **30**, 575–582 (2005).
28. Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W. & Koehler, C. M. The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *The EMBO journal* **21**, 942–953 (2002).
29. Curran, S. P., Leuenberger, D., Schmidt, E. & Koehler, C. M. The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *The Journal of cell biology* **158**, 1017–1027 (2002).
30. Rehling, P., Brandner, K. & Pfanner, N. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 519–530 (2004).
31. Koehler, C. M. New developments in mitochondrial assembly. *Annual review of cell and developmental biology* **20**, 309–335 (2004).
32. D'Silva, P. D., Schilke, B., Walter, W., Andrew, A. & Craig, E. A. J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13839–13844 (2003).
33. D'Silva, P. R., Schilke, B., Walter, W. & Craig, E. A. Role of Pam16's degenerate J domain in protein import across the mitochondrial inner membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12419–12424 (2005).
34. Truscott, K. N. *et al.* A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *The Journal of cell biology* **163**, 707–713 (2003).

35. Frazier, A. E. *et al.* Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nature structural & molecular biology* **11**, 226–233 (2004).
36. Chacinska, A. *et al.* Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell* **120**, 817–829 (2005).
37. Mokranjac, D., Popov-Celeketic, D., Hell, K. & Neupert, W. Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *The Journal of biological chemistry* **280**, 23437–23440 (2005).
38. Chacinska, A. *et al.* Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO journal* **23**, 3735–3746 (2004).
39. Terziyska, N. *et al.* Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS letters* **579**, 179–184 (2005).
40. Mesecke, N. *et al.* A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**, 1059–1069 (2005).
41. Baker, M. J., Tatsuta, T. & Langer, T. Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3** (2011).
42. Kang, P. J. *et al.* Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* **348**, 137–143 (1990).
43. Horwich, A. L., Weber-Ban, E. U. & Finley, D. Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11033–11040 (1999).
44. Schmitt, M., Neupert, W. & Langer, T. The molecular chaperone Hsp78 confers compartment-specific thermotolerance to mitochondria. *The Journal of cell biology* **134**, 1375–1386 (1996).
45. Doyle, S. M. & Wickner, S. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends in biochemical sciences* **34**, 40–48 (2009).

46. Suzuki, C. K., Suda, K., Wang, N. & Schatz, G. Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science (New York, N.Y.)* **264**, 273–276 (1994).
47. Bota, D. A. & Davies, K. J. A. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nature cell biology* **4**, 674–680 (2002).
48. Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T. & Neupert, W. Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *The EMBO journal* **13**, 5135–5145 (1994).
49. Bender, T., Lewrenz, I., Franken, S., Baitzel, C. & Voos, W. Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Molecular biology of the cell* **22**, 541–554 (2011).
50. Leonhard, K. *et al.* Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Molecular cell* **5**, 629–638 (2000).
51. Koppen, M. & Langer, T. Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **42**, 221–242 (2007).
52. Schreiner, B. *et al.* Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria. *Molecular biology of the cell* **23**, 4335–4346 (2012).
53. Haynes, C. M. & Ron, D. The mitochondrial UPR – protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci* **123**, 3849–3855 (2010).
54. Yoneda, T. *et al.* Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *Journal of Cell Science* **117**, 4055–4066 (2004).
55. Haynes, C. M., Petrova, K., Benedetti, C., Yang, Y. & Ron, D. ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Developmental cell* **13**, 467–480 (2007).

56. Haynes, C. M., Yang, Y., Blais, S. P., Neubert, T. A. & Ron, D. The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Molecular cell* **37**, 529–540 (2010).
57. Pellegrino, M. W., Nargund, A. M. & Haynes, C. M. Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 410–416 (2013).
58. Finley, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry* **78**, 477–513 (2009).
59. Cohen, M. M. J., Leboucher, G. P., Livnat-Levanon, N., Glickman, M. H. & Weissman, A. M. Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Molecular biology of the cell* **19**, 2457–2464 (2008).
60. Livnat-Levanon, N. & Glickman, M. H. Ubiquitin-proteasome system and mitochondria - reciprocity. *Biochimica et biophysica acta* **1809**, 80–87 (2011).
61. Heo, J.-M. *et al.* A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Molecular cell* **40**, 465–480 (2010).
62. Wolf, D. H. & Stolz, A. The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 117–124 (2012).
63. Bragoszewski, P., Gornicka, A., Sztolsztener, M. E. & Chacinska, A. The ubiquitin-proteasome system regulates mitochondrial intermembrane space proteins. *Molecular and cellular biology* **33**, 2136–2148 (2013).
64. Hoppins, S. & Nunnari, J. The molecular mechanism of mitochondrial fusion. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 20–26 (2009).
65. Otera, H. & Mihara, K. Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small GTPases* **2**, 167–172 (2011).

66. Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. & Hayashi, J. I. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nature genetics* **28**, 272–275 (2001).
67. Chen, H., Chomyn, A. & Chan, D. C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of biological chemistry* **280**, 26185–26192 (2005).
68. Twig, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* **27**, 433–446 (2008).
69. Kisoová, I., Deffieu, M., Manon, S. & Camougrand, N. Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **279**, 39068–39074 (2004).
70. Kurihara, Y. *et al.* Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *The Journal of biological chemistry* **287**, 3265–3272 (2012).
71. Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N. & Ohsumi, Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Developmental cell* **17**, 87–97 (2009).
72. Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M. & Klionsky, D. J. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Developmental cell* **17**, 98–109 (2009).
73. Aoki, Y. *et al.* Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Molecular biology of the cell* **22**, 3206–3217 (2011).
74. Kondo-Okamoto, N. *et al.* Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *The Journal of biological chemistry* **287**, 10631–10638 (2012).
75. Trimmer, P. A. *et al.* Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines. *Experimental neurology* **162**, 37–50 (2000).

76. Castellani, R. *et al.* Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research* **70**, 357–360 (2002).
77. Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 819–822 (2003).
78. Johri, A. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **342**, 619–630 (2012).
79. Duffy, L. M., Chapman, A. L., Shaw, P. J. & Grierson, A. J. Review: The role of mitochondria in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology* **37**, 336–352 (2011).
80. Damiano, M., Galvan, L., Deglon, N. & Brouillet, E. Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica et biophysica acta* **1802**, 52–61 (2010).
81. Sisková, Z. *et al.* Morphological and Functional Abnormalities in Mitochondria Associated with Synaptic Degeneration in Prion Disease. *The American Journal of Pathology* **177**, 1411–1421 (2010).
82. Beal, M. F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of Neurology* **58**, 495–505 (2005).
83. Baker, B. M. & Haynes, C. M. Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging. *Trends in biochemical sciences* **36**, 254–261 (2011).
84. Hanson, P. I. & Whiteheart, S. W. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 519–529 (2005).
85. Ogura, T. & Wilkinson, A. J. AAA+ superfamily ATPases: common structure–diverse function. *Genes to Cells* (2001).
86. Casari, G. *et al.* Spastic Paraplegia and OXPHOS Impairment Caused by Mutations in Paraplegin, a Nuclear-Encoded Mitochondrial Metalloprotease. *Cell* **93**, 973–983 (1998).

87. Cruciat, C. M., Hell, K., Folsch, H., Neupert, W. & Stuart, R. A. Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex. *The EMBO journal* **18**, 5226–5233 (1999).
88. Nobrega, F. G., Nobrega, M. P. & Tzagoloff, A. BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **11**, 3821–3829 (1992).
89. Wagener, N., Ackermann, M., Funes, S. & Neupert, W. A Pathway of Protein Translocation in Mitochondria Mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Molecular cell* **44**, 191–202 (2011).
90. Hinson, J. T. *et al.* Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome. *The New England journal of medicine* **356**, 809–819 (2007).
91. Kotarsky, H. *et al.* Characterization of complex III deficiency and liver dysfunction in GRACILE syndrome caused by a BCS1L mutation. *Mitochondrion* **10**, 497–509 (2010).
92. Nakai, M., Endo, T., Hase, T. & Matsubara, H. Intramitochondrial protein sorting. Isolation and characterization of the yeast MSP1 gene which belongs to a novel family of putative ATPases. *The Journal of biological chemistry* **268**, 24262–24269 (1993).
93. Goffeau, A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)* **274**, 546, 563-7 (1996).
94. Rothstein, R. J. One-step gene disruption in yeast. *Methods in enzymology* **101**, 202–211 (1983).
95. Winzeler, E. A. *et al.* Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science (New York, N.Y.)* **285**, 901–906 (1999).
96. Botstein, D. & Fink, G. R. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* **189**, 695–704 (2011).
97. Heinicke, S. *et al.* The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PloS one* **2**, e766 (2007).

98. Westermann, B. & Neupert, W. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (2000).
99. Sherman, F. Getting started with yeast. *Methods in enzymology* **194**, 3–21 (1991).
100. Frand, A. R. & Kaiser, C. A. The ERO1 Gene of Yeast Is Required for Oxidation of Protein Dithiols in the Endoplasmic Reticulum. *Molecular cell* **1**, 161–170 (1998).
101. Heim, R. & Tsien, R. Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current biology : CB* **6**, 178–182 (1996).
102. Bauer, C., Herzog, V. & Bauer, M. F. Improved Technique for Electron Microscope Visualization of Yeast Membrane Structure. *Microscopy and Microanalysis*, 530–534 (2001).
103. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology* **17**, 208–212 (1963).
104. Yaffe, M. P. & Schatz, G. Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 4819–4823 (1984).
105. Kushnirov, V. V. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast (Chichester, England)* **16**, 857–860 (2000).
106. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
107. Daum, G., Böhni, P. C. & Schatz, G. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **1982**, 13028–13033 (1982).

108. Marion M. Bradford. A Rapid und Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities auf Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 248–254 (1976).
109. Bihlmaier, K. *et al.* The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *The Journal of cell biology* **179**, 389–395 (2007).
110. Arnold, I., Wagner-Ecker, M., Ansorge, W. & Langer, T. Evidence for a novel mitochondria-to-nucleus signalling pathway in respiring cells lacking i-AAA protease and the ABC-transporter Mdl1. *Gene* **367**, 74–88 (2006).
111. Wang, Y.-X., Catlett, N. L. & Weisman, L. S. Vac8p, a Vacuolar Protein with Armadillo Repeats, Functions in both Vacuole Inheritance and Protein Targeting from the Cytoplasm to Vacuole. *The Journal of cell biology* (1998).
112. Kissova, I. *et al.* Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* **3**, 329–336 (2007).
113. Kanki, T. & Klionsky, D. J. Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *The Journal of biological chemistry* **283**, 32386–32393 (2008).
114. Kanki, T., Kang Dongchon & Klionsky, D. J. Monitoring mitophagy in yeast: The Om45-GFP processing assay. *Autophagy*. *Author manuscript; available in PMC* (2009).
115. Mendl, N. *et al.* Mitophagy in yeast is independent of mitochondrial fission and requires the stress response gene WHI2. *Journal of Cell Science* **124**, 1339–1350 (2011).
116. Beverly, K. N., Sawaya, M. R., Schmid, E. & Koehler, C. M. The Tim8-Tim13 complex has multiple substrate binding sites and binds cooperatively to Tim23. *Journal of molecular biology* **382**, 1144–1156 (2008).
117. Heo, J.-M. & Rutter, J. Ubiquitin-dependent mitochondrial protein degradation. *The international journal of biochemistry & cell biology* **43**, 1422–1426 (2011).

118. Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T. & Inada, T. Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes & development* **21**, 519–524 (2007).
119. Wilson, M. A., Meaux, S. & van Hoof, A. A genomic screen in yeast reveals novel aspects of nonstop mRNA metabolism. *Genetics* **177**, 773–784 (2007).
120. Bengtson, M. H. & Joazeiro, C. A. P. Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* **467**, 470–473 (2010).
121. Liu, C., Apodaca, J., Davis, L. E. & Rao, H. Proteasome inhibition in wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *BioTechniques* **42**, 158, 160, 162 (2007).
122. Ding, W.-X. *et al.* Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *The American Journal of Pathology* **171**, 513–524 (2007).
123. Zhu, K., Dunner, K., JR & McConkey, D. J. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene* **29**, 451–462 (2010).
124. Okreglak, V. & Walter, P. The conserved AAA-ATPase Msp1 confers organelle specificity to tail-anchored proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 8019–8024 (2014).
125. Chen, Y.-C. *et al.* Msp1/ATAD1 maintains mitochondrial function by facilitating the degradation of mislocalized tail-anchored proteins. *The EMBO journal* **33**, 1548–1564 (2014).
126. Baker, M. J. *et al.* Impaired folding of the mitochondrial small TIM chaperones induces clearance by the i-AAA protease. *Journal of molecular biology* **424**, 227–239 (2012).
127. Tanaka, A. *et al.* Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of cell biology* **191**, 1367–1380 (2010).

128. Xu, S., Peng, G., Wang, Y., Fang, S. & Karbowski, M. The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Molecular biology of the cell* **22**, 291–300 (2011).
129. Chan, N. C. *et al.* Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human molecular genetics* **20**, 1726–1737 (2011).
130. Radke, S. *et al.* Mitochondrial protein quality control by the proteasome involves ubiquitination and the protease Omi. *The Journal of biological chemistry* **283**, 12681–12685 (2008).
131. Bragoszewski, P. *et al.* Retro-translocation of mitochondrial intermembrane space proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 7713–7718 (2015).
132. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F. & Youle, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* **183**, 795–803 (2008).
133. Ziviani, E., Tao, R. N. & Whitworth, A. J. Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 5018–5023 (2010).
134. Gegg, M. E. *et al.* Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human molecular genetics* **19**, 4861–4870 (2010).
135. Karbowski, M. & Youle, R. J. Regulating mitochondrial outer membrane proteins by ubiquitination and proteasomal degradation. *Current opinion in cell biology* **23**, 476–482 (2011).

7. Abkürzungen

AAA	ATPases Associated with diverse cellular Activities
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	Rinderserumalbumin
C-Terminus	Carboxyterminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
i-AAA-Protease	AAA-Protease des Intermembranraums
Leu	Leucin
IMR	Intermembranraum
m-AAA-Protease	AAA-Protease der Matrix
mtUPR	Mitochondriale Unfolded-Protein-Response
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure

TEMED	N, N, N', N' – Tetramethyl-ethylendiamin
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TIM	Translocase of the inner Membrane
TOM	Translocase of the outer Membrane
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3,-propandiol
Trp	Tryptophan
Ura	Uracil
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolettstrahlung
WT	Wildtyp

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. W. Neupert für die Übernahme und Betreuung der vorliegenden Arbeit danken. Er förderte in jedem seiner Mitarbeiter das Interesse und die Neugier an wissenschaftlichen Fragenstellungen und stand stets für fachliche Diskurse und Ratschläge bereit.

Fr. PD D. Mokranjac danke ich ebenfalls für die Betreuung und Zusammenarbeit.

Fr. Dr. Nikola Wagener danke ich besonders herzlich für die Betreuung dieser Arbeit. Ihre Geduld, Verständnis, wissenschaftliches Know-How und positive Persönlichkeit haben diese Arbeit unentwegt begleitet. In diesem Zusammenhang möchte ich auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gegenseitige Unterstützung, intellektuellen Austausch und dem positiven Arbeitsklima danken, namentlich Dr. Max Harner, Dr. Toshiaki Izawa, Dr. Moni Kumari und Chong-Su Choi. Durch die angenehme zwischenmenschliche Atmosphäre war es jeden Tag eine Freude in dieser Gruppe arbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. J. Heesemann danke ich für die Organisation und Betreuung des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ (FöFoLe), in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit entstand.

Und schließlich möchte ich den mir am nahestehendsten Menschen danken, deren Liebe, Verständnis, bedingungslose Unterstützung und Ermutigung zur Durchführung und Vollendung der vorliegenden Arbeit wesentlich beigetragen haben: Meinen Eltern und Michael Weber.