

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut
Lehrstuhl: Physiologische Chemie
im BioMedizinischen Centrum München
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Andreas G. Ladurner
ehem. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Walter Neupert

**Die mitochondriale *Unfolded Protein*
Response in *Saccharomyces cerevisiae***

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

vorgelegt von
Chong Su Choi
aus
Seoul, Südkorea
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Neupert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Sommerhoff
Prof. Dr. Simon Rothenfuß

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Nikola Wagener

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2019

Eidesstattliche Versicherung

Chong Su Choi

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die mitochondriale *Unfolded Protein Response* in *Saccharomyces cerevisiae*

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.

München, den 14.08.2018

Unterschrift: Chong Su Choi

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Mitochondrien	1
1.1.1. Oxidative Phosphorylierung.....	1
1.1.2. Mitochondriale Ultrastruktur	3
1.1.3. Mitochondriale Morphologie - Fusion und Fission	3
1.1.4. Genetik	5
1.1.5. Proteinimport.....	5
1.1.6. Mitochondriale Carrier	8
1.2. Mitochondriale Qualitätskontrolle	9
1.2.1. Mitochondriale Proteasen.....	9
1.2.2. Mitochondriale Chaperone.....	10
1.3. Die <i>Mitochondrial Unfolded Protein Response</i> (mtUPR)	11
1.4. Stoffwechselprozesse der Mitochondrien und die <i>Mitochondrial Unfolded Protein Response</i>	16
1.5. Mitochondriale Krankheiten	17
1.6. Hefe als Modellorganismus zur Untersuchung der mtUPR.....	21
1.7. Zielsetzung der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Methoden der Zellbiologie.....	23
2.1.1. Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> für die Experimente mit Chloramphenicol.....	23
2.1.2. Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> durch alkalische Lyse	23
2.1.3. Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	24
2.1.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Auswirkung von Chloramphenicol auf die mitochondriale Ultrastruktur	26
2.2. Proteinbiochemische Methoden.....	27

2.2.1. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA).....	27
2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.2.4. Transfer von Protein auf Nitrocellulosemembran (Western-Blot).....	28
2.2.5. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen.....	29
2.2.6. Blue Native PAGE	29
2.2.7. <i>Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture</i> (SILAC)	30
2.3. Immunologische Methoden.....	30
2.3.1. Immundekoration von Western Blots von Nitrozellulosemembranen	30
2.3.2. Immundekoration von Western Blots von PVDF Membranen	31
2.4. Puffer und Medien	32
2.5. Chemikalien und Geräte.....	33
2.5.1. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial.....	33
2.5.2. Geräte	35
3. Ergebnisse	37
3.1. Optimierung der Bedingungen zur Induktion der <i>Mitochondrial Unfolded Protein Response</i> (mtUPR).....	37
3.1.1. Beobachtung der mtUPR in Hefe.....	37
3.1.2. Auswahl eines geeigneten Hefestamms	39
3.1.3. Untersuchung der Induktion der mtUPR in verschiedenen Medien ..	41
3.2. Untersuchung der Auswirkung von Chloramphenicol auf die mitochondriale Ultrastruktur und Proteinzusammensetzung	43
3.2.1. Mitochondrien zeigen nach Chloramphenicol-Behandlung eine veränderte Ultrastruktur	43
3.2.2. Atmungskettenkomplexe können in Anwesenheit von Chloramphenicol nicht assembliert werden.....	46
3.3. Untersuchung des mitochondrialen Proteoms mittels SILAC und massenspektrometrischer Analyse (MS)	47
3.3.1. Überprüfung der Proteinmengen in den Mitochondrien für die mas-	

senspektrometrische Analyse	48
3.3.2. Massenspektrometrische Untersuchung der SILAC Proben.....	50
3.3.3. Vergleich der Proteinverhältnisse in den Western Blots und den SILAC Ergebnissen.....	64
4. Diskussion	66
4.1. Die mtUPR in Hefe	66
4.2. Veränderung des Proteinimports.....	67
4.3. Mögliche Rollen von Yme1 in der mtUPR.....	68
4.4. Mitochondriale Ultrastruktur und Morphologie	69
4.5. Die mitochondriale Atmungskette	71
4.6. Fusion und Fission	72
4.7. Glycin Decarboxylase Komplex	73
4.8. Unterschiede zwischen Western Blot und massenspektrometrischen Ana- lysen der SILAC Experimente	74
4.9. Zusammenfassung.....	75
5. Abkürzungen	77
6. Literaturverzeichnis	80
7. Danksagung	88

1. Einleitung

1.1. Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle Organellen in Eukaryoten. Sie sind von zwei Membranen (Außenmembran und Innenmembran) umgeben. Der Raum zwischen den Membranen wird als Intermembranraum (Intermembrane space, IMS) bezeichnet und von der Innenmembran wird die mitochondriale Matrix umschlossen. Diese Morphologie erlaubt die Subkompartimentierung mitochondrialer Prozesse und ist insbesondere für den Aufbau eines Protonengradienten über die Innenmembran zur Generierung von ATP als ubiquitäre Energiequelle notwendig. Weitere biochemische Prozesse wie die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern, Häm und Aminosäuren, wie auch die Synthese und der Abbau von Proteinen laufen in den Mitochondrien ab.

Die Mitochondrien sind laut der Endosymbiontentheorie aus α -Proteobakterien hervorgegangen, die von eukaryotischen Vorläuferzellen aufgenommen wurden [3-5]. Diese Theorie wird auch dadurch gestützt, dass sie ihr eigenes Genom, Transkriptions- und Translationssystem besitzen, das einige mitochondriale Proteine der Atmungskettenkomplexe codiert bzw. synthetisiert [6].

1.1.1. Oxidative Phosphorylierung

Eine der wichtigsten Funktionen der Mitochondrien ist die ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung. Es wird ein Protonengradient über die Innenmembran mit Hilfe der Elektronentransportkette aufgebaut. Die ATP-Synthase nutzt diesen Gradienten und produziert ATP aus ADP und Phosphat [7].

Die Elektronentransportkette besteht aus verschiedenen Komplexen in der Innenmembran der Mitochondrien: NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), Cytochrom-*bc₁*-Komplex (Komplex III)

und Cytochrom-c-Oxidase (COX, Komplex IV) [7]. Die NADH-Dehydrogenase ist der erste Komplex der Atmungskette, der die Elektronen von NADH, das bei katabolischen Prozessen und im Citratzyklus entsteht, in die Atmungskette einschleust [8]. Die NADH-Dehydrogenase kommt in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (die als Modellorganismus in dieser Arbeit verwendet wurde; siehe 1.6) nicht in Form eines Komplexes vor, sondern als einzelne Enzyme Nde1, Nde2 und Ndi1. Diese katalysieren die Oxidation von zytosolischem bzw. mitochondrialem NADH [9]. Die Succinat-Dehydrogenase als ein Bestandteil des Citratzyklus katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat und gleichzeitig die Reduktion von FAD zu FADH₂. Vom FADH₂ werden wiederum Elektronen in die Elektronentransportkette geschleust [10, 11]. Der Komplex III (Cytochrom-bc₁-Komplex) katalysiert den Elektronentransfer von Ubiquinon auf Cytochrom *c* [12]. Die katalytischen Einheiten des Cytochrom-bc₁-Komplexes sind in Hefe Cob, Rip1 und Cyt1. Außerdem gibt es die sieben weiteren strukturgebenden Untereinheiten Cor1, Cor2, Qcr6, Qcr7, Qcr8, Qcr9 und Qcr10 [12, 13]. Komplex IV überträgt Elektronen von Cytochrom *c* auf molekularen Sauerstoff als finalen Akzeptor. Er besteht in Hefe aus 12 Untereinheiten. Drei von ihnen, Cox1, Cox2 und Cox3, sind mitochondrial kodiert und bilden das katalytische Zentrum. Cox1 und Cox2 koordinieren Häm und Kupfer Cofaktoren, die für den Elektrontransport notwendig sind [14].

Für den Export von ATP über die Innenmembran zu verschiedenen Orten in der Zelle ist der ADP/ATP Transporter zuständig. Er bindet ADP auf der IMS-Seite und ATP auf der Matrix-Seite und sorgt für deren Antiport über die Membran [15].

1.1.2. Mitochondriale Ultrastruktur

Die Innenmembran der Mitochondrien weist Einstülpungen auf, sogenannte *Cristae*, die in die Matrix hineinragen und zur Oberflächenvergrößerung und weiteren Subkompartimentierung dienen. Bisher sind zwei Komplexe bekannt, die die *Crista*-Morphologie beeinflussen. Der erste ist die ATP-Synthase, die als Dimer für die Ausbildung der *Crista*-Spitzen notwendig ist [16, 17].

Der zweite ist der *Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System* (MICOS) Komplex. Zum MICOS Komplex gehören Mic10, Mic12, Mic19, Mic25, Mic26, Mic27 und Mic60 [18]. Die Komponenten finden sich gehäuft an den *Crista Junctions*, die den Übergang zwischen externem IMS und *Intracristae*-Raum bilden. Sie sind für die Ausbildung der Kontaktstellen (*Contact Sites*, Verbindungen zwischen mitochondrialer Innen- und Außenmembran) zuständig. Bei Verlust einer der Komponenten zeigen Mitochondrien morphologische Abnormalitäten wie das Fehlen von *Crista Junctions* und das vermehrte Auftreten von *Crista Rims* und *Crista Branches* [19]. Bei fehlender Dimerisierung der ATP-Synthase kommt es nicht zur Bildung von *Crista*-Spitzen, wodurch *onion-like structures* in Mitochondrien entstehen [16].

1.1.3. Mitochondriale Morphologie - Fusion und Fission

Die Mitochondrien bilden ein dynamisches tubuläres Netzwerk [20]. Sie besitzen die Fähigkeit zu fusionieren oder sich zu teilen. Diese Prozesse bezeichnet man als mitochondriale Fusion und Fission. Beide Prozesse sind in Hefe sehr gut untersucht worden, so dass sich die folgenden Darstellungen auf diese Studien beziehen. Proteine, die die mitochondriale Morphologie beeinflussen, können in drei Gruppen unterteilt werden [21]:

Die erste Gruppe ist für die tubuläre Struktur und Bewegung der Mitochondrien

zuständig. Zu ihr gehören Mmm1 [22], Mdm10 [23], Mdm12 [24] und Mmm2 [25], die zusammen einen Komplex in der Außenmembran bilden. Fehlen diese Proteine kommt es zur Ausbildung von großen sphärischen Mitochondrien [21]. Mdm31 und Mdm32 sind in der Innenmembran lokalisiert, interagieren mit den zuvor genannten Proteinen der Außenmembran und sorgen ebenfalls für eine regelrechte tubuläre Struktur [21, 26].

Eine weitere Gruppe ist für die Fusion der Mitochondrien notwendig. Sie umfasst Fzo1, Mgm1 und Ugo1 in Hefe [27]. Fzo1 ist eine GTPase in der Außenmembran, bei deren Fehlen die Fission überwiegt und das mitochondriale tubuläre Netzwerk fragmentiert [27]. Mgm1 liegt in zwei verschiedenen Formen vor und ist für die Fusion der Innenmembran verantwortlich [20]. Die lange Form ist mit einer Transmembrandomäne in der Innenmembran verankert, und kann weiter zu einer kurzen Form prozessiert werden. Die kurze Form liegt dann als lösliches Protein im Intermembranraum vor [28, 29]. Ugo1 besitzt eine zytoplasmatische und eine IMS-Domäne. Es bildet einen Komplex mit Fzo1 und Mgm1, dient vermutlich als Verbindung zwischen den beiden Proteinen und koordiniert somit möglicherweise die Fusionsprozesse von Außen- und Innenmembran. Die Fusion erfolgt unter GTP Verbrauch und benötigt einen pH Gradienten und ein Membranpotential [21]. Homologe von Fzo1 und Mgm1 sind auch im Menschen zu finden. Die autosomal-dominante Optikusatrophie ist mit Mutationen in Opa1, dem humanem Mgm1-Homolog, assoziiert [21, 30]. Für Ugo1 ist kein Homolog in höheren Organismen bekannt.

Die letzte Gruppe umfasst die Proteine, die für die mitochondriale Fission notwendig sind. Zu ihr gehört die GTPase Dnm1, die frei im Zytoplasma vorliegt aber während des Teilungsprozesses an der mitochondrialen Außenmembran polymerisiert. In Dnm1 Mutanten sind die Mitochondrien elongiert und weisen eine starke Vernetzung auf [21, 31]. Für die richtige Verteilung und Funktion von Dnm1 während der Fission wird Fis1, ein

mitochondriales Außenmembranprotein, benötigt [32]. Zwei weitere Proteine sind Mdv1 und Caf4, die mit Fis1 und Dnm1 während der Fission zusammenarbeiten [33, 34]. Unklar ist, ob Fis1 und Mdv1 notwendig für die Rekrutierung oder für die Homooligomerisierung von Dnm1 sind [20, 35, 36]. Durch die GTPase Aktivität von Dnm1, einer daraus folgenden Konformationsänderung und damit verbundenen Konstriktion der Dnm1 Oligomere kommt es letztendlich zu einer Teilung der Mitochondrien. Caf4 rekrutiert Dnm1 bei der Fission [33]. Drp1 [37] und hFis1 [38] sind die humanen Homologe von Dnm1 und Fis1. Homologe von Mdv1 und Caf4 liegen in Säugetierzellen nicht vor.

1.1.4. Genetik

Die Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom in der Matrix. Bei Menschen umfasst es 16.569 Nukleotide, in *S. cerevisiae* 84.000. Die Größe in Hefe ist auf das Vorhandensein mehrerer Introns zwischen den kodierenden Bereichen zurückzuführen [39]. Sie kodiert die Proteine Cox1, Cox2 und Cox3 des COX Komplexes, Atp6, Atp8 und Atp9 der ATP Synthase, Cytb des Cytochrom bc1 Komplexes und das ribosomale Protein Var1 [40]. Außerdem kodiert sie für 24 tRNAs und zwei ribosomale RNAs.

Die Vererbung der mitochondrialen DNA erfolgt fast ausschließlich maternal. Die DNA bleibt unverändert und folgt nicht den mendelschen Regeln der Vererbung. Es wurde festgestellt, dass die paternalen Mitochondrien durch verschiedene Mechanismen zerstört werden, wie zum Beispiel über Ubiquitin Markierung und selektiven Abbau [41-43].

1.1.5. Proteinimport

Während die Außenmembran auch kleinere Moleküle bis 2 - 3 kDa problemlos

passieren können [44], ist die Innenmembran dichter und kontrolliert deren Import und Export. Die Außenmembran ist aufgrund der Porine, die eine Pore mit einem Durchmesser von ca. 1,7 nm bilden, begrenzt durchlässig. Durch diese Poren können auch CO₂, H₂O und O₂ frei diffundieren. Damit herrscht im Intermembranraum ein Milieu, das dem Zytosol ähnelt [45]. Für größere Proteine oder für den Transport über die innere Membran sind andere aktive Transporter notwendig. Es wird geschätzt, dass die Mitochondrien des besterforschten Organismus, *S. cerevisiae*, ca. 1000 Proteine enthalten [46]. Wie oben beschrieben kodiert das mitochondriale Genom einen Teil der mitochondrialen Proteine. In Bäckerhefe sind es acht, die fast alle Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe sind. Alle weiteren Proteine sind im Nukleus kodiert und werden im Zytosol translatiert und über eine komplexe Transportmaschinerie ins Mitochondrium importiert.

In der Außenmembran befinden sich die TOM (*Translocase of the Outer mitochondrial Membrane*) und TOB (*Translocase of the Outer mitochondrial Membrane for Beta-barrel proteins*) Komplexe. Diese Komplexe sind nicht nur für den Transport über, sondern auch für die Integration der Proteine in die Membran zuständig. In Hefe bilden Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 zusammen den Core Komplex [47]. Tom20, Tom22 und Tom70 fungieren als Rezeptoren, die für die Erkennung mitochondrialer Proteine notwendig sind [48-50]. Nach der Erkennung erfolgt der Transport durch die Pore, die durch Tom40 gebildet wird [51]. Die kleinen Proteine Tom5, Tom6 und Tom7 unterstützen den Prozess. Tom6 und Tom7 sind für die Integrität des Komplexes notwendig, während Tom5 für die effiziente Translokation der Precursor benötigt wird [52, 53].

Der TOB Komplex dient der Integration von *Beta-barrel* Proteinen in die Außenmembran. Tob55, selbst ein *Beta-barrel* Protein, Tob38 und Mas37 sind die bisher bekannten Untereinheiten des Komplexes [54-56]. Diese binden

precursor-Formen der *Beta-barrel* Proteine und inserieren diese in die Außenmembran. Mas37 ist zusätzlich für die Integrität des Komplexes notwendig [57-59].

Den Transport über die innere Membran in die Matrix und zum Teil in den IMS katalysiert der TIM23 Komplex. Tim23 und Tim17 bilden zusammen einen Kanal für den Transport der Proteine [60]. Tim50 und Tim21 helfen bei der Übergabe von Proteinen vom TOM-Komplex an den TIM23-Komplex [61-64]. TIM23-Substrate tragen normalerweise ein N-terminales Sortierungssignal, das positiv geladen ist. Für den Transport des Proteins durch den Kanal wird das Membranpotential $\Delta\psi$ benötigt [65]. Für den weiteren Import in die Matrix ist das mtHsp70/Ssc1 verantwortlich, das unter ATP Hydrolyse mithilfe von Tim14, Tim16 und Tim44 an das Prä-Protein bindet [66-70]. Die Ablösung von mtHsp70/Ssc1 vom Prä-Protein erfolgt durch das Cochaperon Mge1 [71]. Die Signalsequenz wird dann durch die Matrixprozessierungspeptidase Mas1/Mas2 abgespalten [72-74]. MtHsp70/Ssc1 arbeitet wiederum eng mit anderen Chaperonen wie Hsp60/Hsp10 [75] zusammen und sorgt für die korrekte Faltung des zu importierten Proteins [76]. Folgt nach der N-terminalen Signalsequenz des zu importierenden Proteins ein hydrophober Bereich, kommt es nach dem Stop-Transfer-Modell zur lateralen Freisetzung des Proteins in die Innenmembran und gegebenenfalls durch weitere Prozessierung zur Freisetzung in den IMS [77].

Proteine, die im IMS verbleiben, folgen verschiedenen Mechanismen: Die erste Gruppe beinhaltet Proteine, die zweiteilige Signalsequenzen tragen. Sie tragen, wie oben erwähnt, auf die N-terminale Prä-Sequenz folgend eine hydrophobe Transmembrandomäne, die zu einer Blockade der weiteren Imports und einer lateralen Freisetzung in die Innenmembran führt. Durch proteolytische Abspaltung dieser beiden Sequenzen wird das lösliche Protein in den IMS

freigesetzt [45]. Eine weitere Gruppe von IMS-Proteinen interagiert mit Komponenten an der Außen- oder Innenmembran oder bindet Co-Faktoren, die zu einer stabilen Faltung und somit zu ihrem Verbleib im IMS führen [45].

Kleine IMS-Proteine mit konservierten Cysteinmotiven werden über den MIA-Transportweg importiert. Ihre oxidative Faltung durch Mia40 und Erv1 sichert ihren Verbleib im IMS [78].

In der Innenmembran existieren auch andere Transportsysteme. Der TIM22 Komplex sorgt für die Integration hydrophober Carrier-Proteine in die Innenmembran abhängig vom Membranpotential [74]. Der TIM22-Komplex besteht aus Tim22, Tim54, Tim18, Tim10 und Tim12 [79-82]. Die Substratproteine besitzen hydrophobe interne Sortierungssignale. Für ihren Transport über den IMS zu TIM22 werden Chaperone wie der Tim9-Tim10 Komplex oder der Tim8-Tim13 Komplex benötigt [73, 74].

1.1.6. Mitochondriale Carrier

Für den Transport verschiedener Stoffe über die Membranen besitzen Mitochondrien Carrier-Proteine. Diese arbeiten in der Regel durch Symport oder Antiport von zwei verschiedenen Substanzen entlang eines Konzentrationsgefälles. Ein Beispiel sind Aac1, Aac2 und Aac3 in der mitochondrialen Innenmembran. Sie sorgen für den Export von ATP von der Matrix in den Intermembranraum und gleichzeitig wird ADP in die Matrix importiert [83, 84]. Ein weiterer Carrier ist Odc1, der sowohl α -Ketoacid für die Lysin Synthese, als auch α -Ketoglutarat und weitere Zwischensubstrate des Zitratzyklus über die Innenmembran durch einen Antiport Mechanismus transportiert [83]. Interessanterweise kann eine verminderte ATP Produktion durch eine Erhöhung der Odc1-Expression teilweise kompensiert werden. Dabei werden vermehrt Intermediate des Zitratzyklus ins Mitochondrium importiert

und die Substratkettenphosphorylierung wird erhöht [85]. Außerdem spielt Odc1 zusammen mit einem weiteren Carrier, Ymc2, eine Rolle beim Stoffwechsel von Oleinsäure. Sie stellen eine Verbindung zwischen Mitochondrien und der peroxisomalen Beta-Oxidation her. Ohne diese Proteine ist das Wachstum auf der Basis von Oleinsäure beeinträchtigt [86, 87].

Pic2 sorgt für den Transport von anorganischen Stoffen wie Phosphat und Kupfer über die Innenmembran [88, 89]. Kupfer ist vor allem für die Funktion der Cytochrom-c-Oxidase notwendig. Für den Phosphattransport über die Außenmembran dient Mir1 [89].

Auch Nukleotide müssen über die Membranen transportiert werden, da Mitochondrien ihre eigene DNA und RNA synthetisieren. Rim2 sorgt für den Transport von Pyrimidin Nucleosid Triphosphaten im Austausch mit Pyrimidin Nucleosid Monophosphaten über die Innenmembran [90].

1.2. Mitochondriale Qualitätskontrolle

Funktionale Mitochondrien sind für die Zelle essentiell. Daher unterliegen sie einer strengen Qualitätskontrolle. Während verschiedener Vorgänge in den Mitochondrien können ungefaltete, missgefaltete oder sogar aggregierte Proteine entstehen, die entweder in ihre korrekte Form überführt oder abgebaut werden müssen [91]. Dazu dienen die mitochondrialen Proteasen und Chaperone, die in diesem Kapitel näher erläutert werden.

1.2.1. Mitochondriale Proteasen

Man unterscheidet prozessierende von komplett degradierenden Proteasen. Zu den Ersteren gehören unter anderem die mitochondriale MPP (*matrix processing peptidase*) Mas1/2 und Pcp1. Sie aktivieren mitochondriale Proteine durch Abspaltung bestimmter Sequenzen [92]. Mas1 und Mas2 sind Untereinheiten

der Matrixprozessierungspeptidase und sorgen für die Entfernung der Signalsequenz nach erfolgreichem Import [72-74]. Pcp1 spielt eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Dynamik durch die Prozessierung von Mgm1 [92]. Proteasen sind aber auch ein unentbehrlicher Bestandteil von Mitochondrien zur Qualitätskontrolle des mitochondrialen Proteoms. In der Matrix befindet sich die Lon-Protease Pim1, die ATP-abhängig [93] missgefaltete Proteine vor der Aggregation abbaut [94]. Auch in der Innenmembran existieren Proteasen, die für den raschen Abbau falsch gefalteter und potentiell schädlicher Proteine sorgen. Man unterscheidet zwischen der m- und i-AAA Protease (m- steht für Matrix und i- für Intermembranraum, je nachdem, wo sich das katalytische Zentrum der Protease befindet) [95, 96]. Yta10 und Yta12 sind Untereinheiten der heterooligomeren m-AAA Protease und führen zu ATP-abhängigem proteolytischen Abbau falsch gefalteter Proteine [97]. Auf der anderen Seite der Innenmembran befindet sich die i-AAA Protease Yme1 [98]. Zum YME1-Komplex gehören Adapterproteine wie Mgr1 und Mgr3, die ungefaltete Proteine binden und diese der i-AAA Protease zum Abbau bereitstellen [99].

Die m- und i-AAA Proteasen arbeiten synergistisch bei der Degradation von Proteinen. Modellproteine, die sich über die Innenmembran spannen, wurden gleichzeitig von der IMS- und der Matrixseite jeweils durch die i- und m-AAA Protease proteolytisch geschnitten [98, 100].

1.2.2. Mitochondriale Chaperone

Für ihre korrekte Funktion müssen die Proteine eine bestimmte Konformation besitzen, die sie direkt nach dem Importprozesses einnehmen müssen. Um dies zu gewährleisten, gibt es die sogenannten Chaperone. Wie im Kapitel Proteinimport (siehe 1.1.5) schon ausführlich beschrieben, kommt es zu einer

Bindung der importierten Proteine durch Chaperone um ihre Faltung zu gewährleisten oder ihre Struktur aufrecht zu erhalten. Eines der häufigsten Chaperone ist das bereits oben erwähnte mtHsp70/Ssc1, das nicht nur für den Import selbst, sondern auch die darauffolgende Faltung der importierten Proteine notwendig ist [66-70, 75].

Teilweise werden die Proteine auch durch ein weiteres Chaperon, Hsp60, gefaltet. Dieses befindet sich ebenfalls in der mitochondrialen Matrix und katalysiert die Faltung von Proteinen in der Matrix [101]. Die ATP abhängige Aktivität vom Hsp60 wird durch das Co-Chaperon Hsp10 reguliert [102, 103].

Weitere Chaperone wie Tim9-Tim10 und Tim8-Tim13 sind im Intermembranraum tätig und begleiten hydrophobe Proteine während ihres Imports über den Intermembranraum [73, 74].

Chaperone sind somit ein zentraler Bestandteil der mitochondrialen Biogenese, spielen aber auch eine wichtige Rolle als Schutzmechanismus bei Stress durch ungefaltete Proteine. Dies wird im nächsten Kapitel der Einleitung näher erläutert.

1.3. Die *Mitochondrial Unfolded Protein Response* (mtUPR)

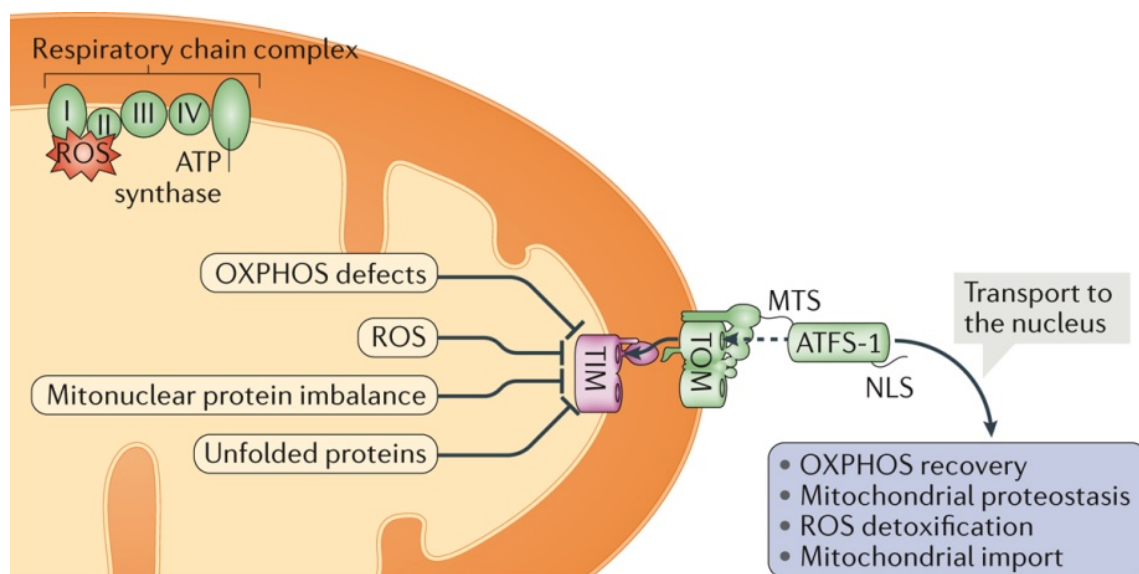
Durch die duale Kodierung mitochondrialer Proteine in der nukleären und mitochondrialen DNA muss ihre Expression eng koordiniert werden. Auch Verlust oder Schädigung der mitochondrialen DNA stellt eine Herausforderung an die Mitochondrien dar. Die Synthese der nukleär kodierten Untereinheiten muss gedrosselt werden, da für sie keine Assemblierungspartner bereitgestellt werden können. Auch durch unspezifische Oxidation durch ROS (*reactive oxygen species*) können Proteine in ihrer Faltung beeinträchtigt werden und ihre

Funktionalität verlieren. Probleme bei der Faltung von Proteinen stellen ein Problem für die Zelle dar, da sich einerseits toxische Formen anhäufen können, andererseits auch eine Menge unnötiger Energie für ihre Synthese aufgewendet wird. Um diese Situation besser zu kontrollieren, gibt es einen Qualitätskontrollmechanismus, die *mitochondrial unfolded protein response* (mtUPR), die im Folgenden näher beschrieben wird [104-106].

Chaperone dienen der korrekten Faltung von Proteinen. Bei Akkumulation ungefalteter Proteine darf deren Menge nicht die Kapazität der Chaperone übersteigen, da sonst das Mitochondrium durch die Aggregation dieser Proteine geschädigt werden kann. Um dies zu vermeiden, wird im Rahmen der mtUPR die Expression von Proteasen und Chaperonen gesteigert. Proteasen können die Proteine zu einzelnen Peptiden abbauen, die wiederum vom Mitochondrium aktiv exportiert werden können, und so deren Akkumulation verhindern [106-108]. Ob diese Peptide möglicherweise auch eine Funktion in der Signaltransduktion spielen, ist bisher unklar.

Die mtUPR wurde zuerst in *Caenorhabditis elegans* beobachtet und wird im Folgenden genauer beschrieben. Ungefaltete Proteine werden durch ClpP in der Matrix erkannt und proteolytisch abgebaut [109]. Die dadurch entstandenen Peptide werden durch den ABC Transporter HAF-1 (Homolog zu Mdl1 und seinem Paralog Mdl2 in Hefe [110]) in den IMS transportiert und über einen unbekanntes Mechanismus über die Außenmembran geschleust [111]. Wie das Signal von hier aus in den Nukleus gelangt, ist allerdings nicht bekannt. Ein möglicherweise paralleler Mechanismus wird durch den bZip Transkriptionsfaktor ATFS-1 vermittelt [111]. Er trägt sowohl ein mitochondriales (MTS) als auch ein nukleäres Sortierungssignal (NLS), wird aber bevorzugt in funktionale Mitochondrien importiert und dort möglicherweise abgebaut [112]. Wird der mitochondriale Import gestört,

kommt es zur Translokation von ATFS-1 in den Nukleus, wo er die Expression von Zielgenen der mtUPR induziert [112]. Für die Induktion der Expression nukleär kodierter Chaperone werden desweiteren DVE-1 und UBL-5 benötigt. DVE-1 befindet sich in den Nuklei aller Zellen, ändert dort aber seine Position bei Stress durch Akkumulation ungefalteter Proteine in den Mitochondrien und bindet an die Promotoren der Zielgene [109]. UBL-5 wird bei Stress ebenfalls aktiviert und bildet einen Komplex mit DVE-1 [109]. Die Homologen von UBL-5 in Hefe und Säugern (Hub1 bzw. UBL5) wurden allerdings als Splicing Faktoren beschrieben [113-115].



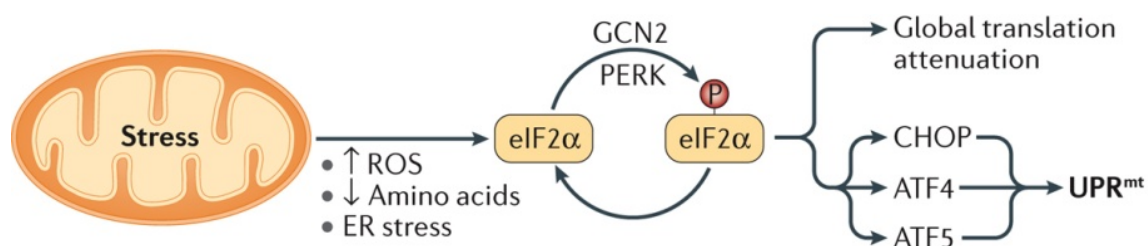
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. 1: Faktoren, die zu einer Störung der mitochondrialen Proteinhomöostase und anschließenden Induktion der mtUPR in *C. elegans* führen

Defekte in der oxidativen Phosphorylierung und der Komplexassemblierung, Akkumulation ungefalteter Proteine und oxidativer Stress führen zu einer Störung des Proteinimportes. Der Transkriptionsfaktor ATFS-1 wird daraufhin bevorzugt in den Nukleus importiert und induziert dort die Transkription der Zielgene. Dies führt zu einer vermehrten Expression von Proteinen, die für die Wiederherstellung der Proteinhomöostase notwendig sind.

(Quelle: Shpilka, T. and C.M. Haynes, *The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017 [1])

Auch in Säugetierzellen konnte eine mtUPR beobachtet werden: Expression einer trunkierten Form der Ornityl-Transcarbamylase (OTCΔ) resultiert in der Induktion verschiedener Gene, die Komponenten der mitochondrialen Qualitätskontrolle kodieren. Nach Akkumulation von OTCΔ in der Matrix kommt es zur einer vermehrten Phosphorylierung der Kinase JNK2 [116]. JNK2 aktiviert wiederum c-Jun, das das AP-1 (activator protein 1) Element vom Promotor des CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein) Transkriptionsfaktors aktiviert [117]. Durch die Aktivierung von CHOP kommt es zu einer verstärkten Transkription des Chaperons Hsp60, der Protease ClpP und dem Cochaperon mtDnaJ [107, 118]. Es wurden zudem auch weitere Transkriptionsfaktoren wie ATF4 und ATF5 beschrieben, die bei der Aktivierung der mtUPR eine Rolle spielen. Bei oxidativem Stress kommt es zu einer Aktivierung von GCN2 und PERK, das wiederum vermehrt eIF2α phosphoryliert und dadurch einerseits die globale Proteinsynthese hemmt und andererseits zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CHOP, ATF4 und ATF5 führt, die die mtUPR induzieren [1, 119, 120].



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. 2: Mitochondrial Unfolded Protein Response in Säugetierzellen

Oxidativer Stress, Reduktion der Aminosäurekonzentration und Stress im endoplasmatischen Retikulum aktivieren GCN2 und PERK, was zu einer vermehrten Phosphorylierung von eIF2α führt. Dies resultiert in einer globalen Minderung der Proteintranslation und zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CHOP, ATF4 und ATF5, die die mtUPR auslösen.

(Quelle: Shpilka, T. and C.M. Haynes, *The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017 [1])

Außerdem wurde in Säugetierzellen eine mtUPR beschrieben, die spezifisch durch Akkumulation ungefalteter Proteine im Intermembranraum aktiviert wird. Dabei wird die Kinase AKT phosphoryliert, die wiederum den Östrogenrezeptor Alpha ($ER\alpha$) aktiviert. Zum einen erhöht dies die Transkription von HtrA2 (eine IMS-spezifische Protease) und Nrfl (ein Transkriptionsregulator, der für die Expression der Gene für Atmungskettenuntereinheiten zuständig ist [121]). Zum anderen wird die Aktivität des Proteasoms als zusätzlicher Schutzfaktor erhöht [122].

Die Mechanismen in *C. elegans* und in den Säugerzellen weisen zum Teil gleiche Komponenten, wie z.B. ClpP und HSP60, auf. In Säugerzellen wurde auch kürzlich der Transkriptionsfaktor ATF5 beschrieben, der mehrere Ähnlichkeiten zu ATFS-1 aufweist. Er wird in funktionale Mitochondrien importiert und möglicherweise abgebaut. Bei mitochondrialem Stress kommt es zu seiner Translokation in den Nukleus, wo er wie ATFS-1 die Zielgene der mtUPRs induziert [119]. Allerdings gibt es auch Unterschiede bei den Mechanismen der verschiedenen Spezies. In *C. elegans* zum Beispiel zählen sowohl Hsp60 als auch Hsp70 zu den Zielgenen der mtUPR, während in Säugerzellen nur Hsp60 induziert wird [123].

Interessanterweise wurde bereits 2006 eine Studie von Arnold et al. veröffentlicht, in der das Transkriptom verschiedener Hefemutanten untersucht wurde. In einer Mutante, in der das Gen für die mitochondriale Protease Yme1 deletiert wurde, konnte eine Induktion der Transkription von typischen Zielgenen der mtUPR nachgewiesen werden. Damals wurde bereits das Vorhandensein eines solchen Kontrollmechanismus vermutet [124].

1.4. Stoffwechselprozesse der Mitochondrien und die *Mitochondrial Unfolded Protein Response*

Die mtUPR steht in enger Verbindung mit anderen biochemischen Prozessen wie zum Beispiel der Mitophagie. Beide Prozesse haben ähnliche Auslöser wie das Fehlen von mitochondrialer DNA oder Störungen in der Atmungskette, die zu mitochondrialer Dysfunktion führen [125]. Vermutlich werden diese beiden unterschiedlichen Mechanismen sequenziell induziert. Die Mitochondrien versuchen zuerst, das Organell durch Auslösung der Stressantwort zu retten. Falls dies jedoch nicht erfolgreich ist, werden die Mitochondrien abgebaut [107]. Dabei kommt es in Säugerzellen zu einer Akkumulation der Kinase PINK1 an der äußeren Mitochondrienmembran, die wiederum die E3 Ligase Parkin rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert, was wiederum zu Ubiquitinylierung und darauffolgender Rekrutierung Mitophagie-induzierender Faktoren führt [126, 127].

Zudem sind in Mitochondrien verschiedene Stoffwechselprozesse lokalisiert. Ein Beispiel ist der Harnstoffzyklus, der stickstoffhaltige Abbauprodukte wie Ammonium in Harnstoff umwandelt, der dann ausgeschieden werden kann. Ein Defekt in diesem Zyklus führt auf Dauer bei Menschen zu schweren neurologischen Störungen. Bei Neugeborenen mit einer solchen Störung beobachtet man Symptome wie Appetitlosigkeit, Tachypnoe, vermehrte Schläfrigkeit bis hin zu irreversiblen neurologischen Schäden [128]. Desweiteren befinden sich auch andere Komplexe wie der Glycin Decarboxylase Komplex (Glycin Cleavage Complex) in den Mitochondrien. Dieser Komplex befindet sich in der mitochondrialen Innenmembran und katalysiert die Umsetzung von Glycin zur aktivierten „one-carbon unit“ 5,10-methylene-tetrahydrofolate (5,10-CH₂-H₄folate) und spielt eine Schlüsselrolle bei verschiedenen lebenswichtigen Prozessen wie der Synthese von

Methylgruppen, Nukleotiden, Vitaminen und von einigen Aminosäuren [129-131]. Eine Dysfunktion dieses Komplexes führt bei Menschen zu Erkrankungen wie die Hyperglycinämie, die schwere neurologische Störungen wie Apnoe, Hypotonie und Epilepsie verursacht und häufig in der Neonatalzeit zum Tod führt [132].

1.5. Mitochondriale Krankheiten

Da der Großteil der Energie, die eine Zelle benötigt, in den Mitochondrien generiert wird, sind Mitochondrien in besonders hoher Dichte vor allem in neuronalem, muskuloskelettalem und Herzgewebe zu finden [133]. Das erklärt warum bei mitochondrialer Dysfunktion vor allem neurologische Ausfälle mit Epilepsien, Demenzen, Enzephalopathien und muskuloskelettalen Schwächen, die sich als Kardiomyopathien oder verschiedenste andere Myopathien äußern können, im Vordergrund stehen. Die Regenerationsfähigkeit von Nervengewebe ist sehr gering, was auch ein zusätzlicher Risikofaktor für die Erkrankungen ist [2, 134]. Im Vordergrund stehen vor allem Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer, die mit dem Verfall von neuronalem Gewebe einhergehen [135] und in Verbindung mit Mitochondrien gebracht werden [133]. Der Zusammenhang zwischen neuropathischen Krankheiten und der mtUPR ist jedoch noch nicht verstanden - vor allem, weil die mtUPR in Säugetierzellen nur in Bruchteilen beschrieben ist.

Interessanterweise wurde in einer Arbeit mit *C. elegans* auch eine Verbindung zwischen der mtUPR und bakteriellen Infektionen gezeigt. Eine Dysfunktion von ATFS-1 verursacht zum Beispiel eine erhöhte Anfälligkeit für *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen [136]. Dies weist auf einen protektiven Einfluss der ATFS-1-abhängigen Induktion der mtUPR hin. Bei einer Infektion mit *P. aeruginosa* ohne das Virulenz-Gen *gacA* oder bei Fehlen weiterer

Virulenzfaktoren wie den Zyanidtoxin-Genen wurde keine mtUPR induziert [136, 137]. Es wurde auch gezeigt, dass eine Überaktivierung der mtUPR bei mit *P. aeruginosa* infizierten Würmern die Überlebensrate der Würmer erhöht [136], was neue therapeutische Möglichkeiten durch die genauere Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen eröffnet.

Das klinische Bild der mitochondrialen Erkrankungen ist aber nicht nur auf neurologische Symptome begrenzt, sondern ist sehr vielfältig. Es kann zu renalen Tubulopathien, gastrointestinalen Symptomen mit Obstipation oder Obstruktionen, Endokrinopathien (Diabetes Mellitus/Hypoparathyreoidismus) und anderen kommen [2, 138].

Interessanterweise kann ein Defekt in einem Gen in der mtDNA verschiedene klinische Symptome auslösen, es ist jedoch auch möglich, dass verschiedene Mutationen dieselbe phänotypische Ausprägung zeigen (genetische Heterogenität) [139]. Wegen der zahlreichen unterschiedlichen Symptome, die durch geschädigte Mitochondrien entstehen können, wurden diese erst relativ spät als Ursache erkannt. 1962 wurde der erste klinische Fall mit einem Patienten, der eine sehr hohe Anzahl an morphologisch veränderten Mitochondrien in den Muskeln besaß, beschrieben [140]. Die erste direkte Verbindung zwischen Mutationen des mitochondrialen Genoms und bestimmten Erkrankungen gelang sogar erst 1988. Damals wurden bei Patienten mit Myopathien schwere Defekte in der Atmungskette entdeckt, die durch Mutationen in der mitochondrialen DNA entstanden sind [141]. Noch im selben Jahr wurde die Lebersche hereditäre Optikusneuropathie mit Mutationen im mitochondrialen Genom in Verbindung gebracht [142]. Mittlerweile wurden hunderte von Veränderungen in der mtDNA in Zusammenhang mit verschiedensten Erkrankungen gebracht (siehe Abb. 3). 1992 wurde dann der erste Fall beschrieben, bei dem die Ursache der Mitochondriopathie nicht auf

eine Mutation der mtDNA zurückzuführen war, sondern auf einer Mutation in der nukleären DNA beruhte [143]. Wie zuvor beschrieben und in Abbildung 3 dargestellt, werden die Atmungskettenkomplexe von mitochondrial und nukleär kodierten Untereinheiten zusammengesetzt; demzufolge können Mutationen in beiden Genomen zu Fehlfunktionen der Atmungskette und zu Mitochondriopathien führen. Diese können durch die klinische Symptomatik aber nicht unterschieden werden, da unabhängig von der Mutation dieselbe Klinik zu beobachten sein kann [144].

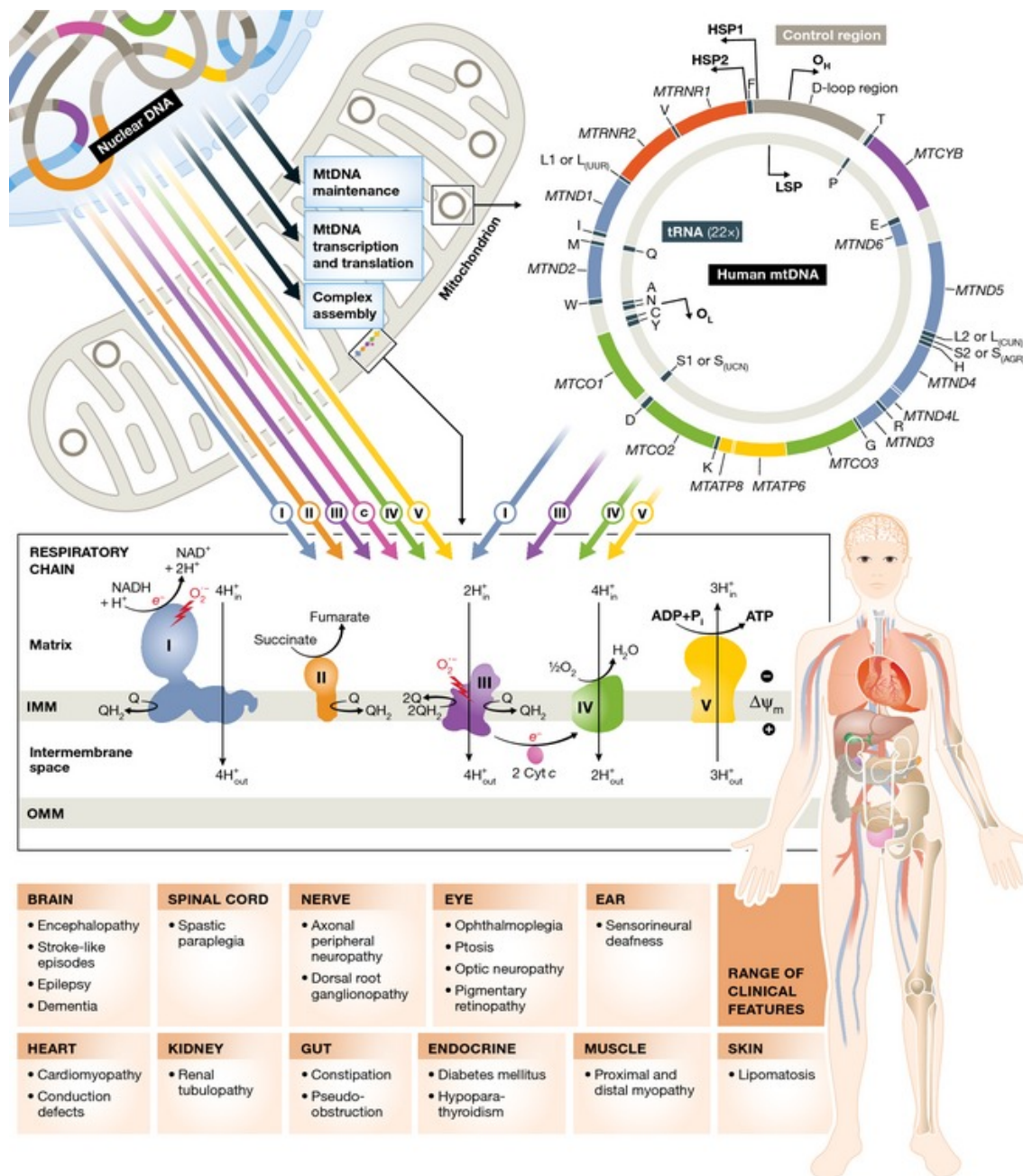


Abb. 3: Proteinumsatz bei der ATP-Produktion und die klinische Symptomatik der mitochondrialen Erkrankungen

Oben ist die Elektronentransportkette schematisch dargestellt. Zu sehen ist auch die Zusammensetzung der Komplexe, deren Untereinheiten zum Teil im Kern kodiert und importiert werden, während der Rest in der mtDNA kodiert ist. Die einzelnen Komponenten werden dann im Mitochondrium zusammgebaut. Mutationen in der mt- oder der nukleären DNA können mitochondriale Krankheiten verursachen.

Unten ist in einer Tabelle die mögliche klinische Symptomatik bei mitochondrialen Erkrankungen dargestellt. Es ist ein sehr vielfältiges Spektrum mit neurologischen, muskuloskeletalen, gastrointestinalen, endokrinologischen und anderen Symptomen zu erkennen. Einige Mutationen können spezifische Symptome verursachen, jedoch gibt es auch Mutationen, die eine vielfältige und unspezifische Symptomatik auslösen.

(Quelle: Chinnery, P.F., *Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new?* EMBO Mol Med, 2015. 7(12): p. 1503-12.. [2])

1.6. Hefe als Modellorganismus zur Untersuchung der mtUPR

Bisher wurde die mtUPR vor allem in Zellen von Säugetieren [123, 145] oder in der Nematode *C. elegans* [109, 111, 146] beobachtet und untersucht. In dieser Arbeit wurde zu weiterführenden Untersuchungen der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) eingesetzt. Zum einen weist Hefe eine relativ kurze Verdopplungszeit auf und kann somit einfach in großen Mengen kultiviert und auch biochemisch analysiert werden. Desweiteren kann sie gut kontrolliert unter verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen werden, was eine zuverlässige Analyse besonders Mitochondrien betreffender Fragestellungen ermöglicht.

Ferner lassen sich aus Hefe gewonnene Erkenntnisse zu einem relativ großen Teil auf den Menschen übertragen, da viele der Prozesse konserviert sind. Ein Beispiel dafür ist die sideroblastische Anämie. Dabei wurde das Homolog Atm1 eines der zwei betroffenen Gene, ABC7, in Hefe charakterisiert. Bei Hefe ist das Protein in den Transport von Eisen-Schwefel Clustern involviert [147, 148]. Zudem weist das menschliche Genom eine Homologie von 46 % zur Hefe auf [149].

Ob am Ende tatsächlich alle Erkenntnisse auf den Menschen übertragen werden können, sollte aber auch kritisch betrachtet werden. Die einzellige Form erlaubt viele verschiedene Versuche, jedoch sind die Mitochondrien bei Menschen deutlich komplexer und besitzen ein größeres Proteom. Ein Beispiel für die höhere Komplexität ist die Apoptose. Der programmierte Zelltod existiert bei höheren Eukaryoten [150], ist aber bei Hefe umstritten [151].

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Mitochondrien sind essentielle Organellen der eukaryotischen Zelle. Sie besitzen ein eigenes Genom, das in Hefe acht mitochondriale Proteine kodiert; die übrigen ca. 1000 Proteine werden im Zytoplasma synthetisiert und in die Mitochondrien importiert. Nach dem Import bilden die Proteine zum Teil Komplexe mit den mitochondrial kodierten Proteinen, sodass eine genaue Koordination der zytosolischen und mitochondrialen Proteinsynthese notwendig ist. Aber auch andere Prozesse in den Mitochondrien können zur Bildung fehlerhafter Proteine oder Komplexe führen, weswegen die Mitochondrien einer strengen Qualitätskontrolle unterliegen. Chaperone und Proteasen bilden die erste Instanz der mitochondrialen Qualitätssicherung und sorgen für korrekte Faltung und Abbau ungefalteter oder missgefalteter Proteine. Beim Überschreiten ihrer Kapazität wird zum Schutz der Mitochondrien die mtUPR induziert. Unter Stress durch ungefaltete Proteine wird dann die Expression von Chaperonen und Proteasen erhöht.

Diese Form der Qualitätssicherung ist für das endoplasmatische Retikulum sehr genau beschrieben worden, die mtUPR ist jedoch bisher nur ansatzweise verstanden und erscheint in verschiedenen Organismen inkonsistent. Die Dysfunktion der Mitochondrien spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung bestimmter Krankheiten wie zum Beispiel M. Parkinson und ist daher auch klinisch relevant. Ziel dieser Arbeit ist die Beschreibung von Veränderungen in Hefemitochondrien als Reaktion auf die Störung der mitochondrialen Proteostase. Einzelne Komponenten dieser Form der mitochondrialen Qualitätskontrolle sollten identifiziert und ihre Rolle gegebenenfalls genauer charakterisiert werden. Für die Analyse wurde Massenspektrometrie mit dem *Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture* (SILAC) kombiniert. Dies erlaubte den quantitativen Vergleich des gesamten mitochondrialen Proteoms unter Stress- und Normbedingungen.

2. Material und Methoden

2.1. Methoden der Zellbiologie

2.1.1. Kultivierung von *S. cerevisiae* für die Experimente mit Chloramphenicol

Die Kultivierung erfolgte nach den Standardprotokollen (Guthrie und Fink, 1991). Die Anzucht von Hefezellen erfolgt in YPD, YPGal oder S-Medium mit Galaktose oder Glukose und den entsprechenden Aminosäuren. Zellen wurden in 15 % (v/v) Glycerin suspendiert und bei -80°C gelagert. Davon konnten Zellen wieder auf YPD oder Selektivmedium ausgestrichen und bei 30°C kultiviert werden. Nach 2 bis 3 Tagen konnten die Zellen in Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 30°C inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden sie auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,2 verdünnt, gesplittet. Die eine Kultur wurde mit Chloramphenicol (CAP) versetzt. Parallel wurden sie bis zum Erreichen der stationären Phase bei 30°C weitergezogen.

2.1.2. Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus *S. cerevisiae* durch alkalische Lyse

0,5 OD₆₀₀-Einheiten der stationären Kultur wurden entnommen und mittels Zentrifugation bei 13200 rpm für 30 s geerntet, einmal mit TE-Puffer (10 mM Tri/HCL, pH 8,0, 1 mM EDTA) gewaschen und in 500 µl H₂O resuspendiert. Es wurden dann 75 µl Rödel Lösung (1,85 M NaOH, 10 mM PMSF, 10 % (v/v) Ethanol, 7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol) dazugegeben, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 400 µl 72 % (w/v) TCA gefällt (2.2.1).

2.1.3. Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

2.1.3.1. Standardprotokoll

Hefezellen wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 5-7 in dem benötigten Medium kultiviert. Dann wurden sie durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 min in der Beckman Avanti™ J-25 Centrifuge mit dem JA10-Rotor bei Raumtemperatur geerntet. Das Pellet wurde mit Wasser gewaschen und danach wurde das Feuchtgewicht bestimmt. Die Zellen wurden dann in Puffer A (100 mM TRIS, pH nicht eingestellt, 10 mM DTT) resuspendiert und für 10 min bei 30°C inkubiert. Die Suspension wurde nach der Inkubation bei 3300 rpm, 5 min, mit dem JA10-Rotor zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Für die Lyse der Zellwand wurden pro 1 g Feuchtgewicht 6,7 ml Puffer B (1,2 M Sorbitol, 20 mM KH₂PO₄ pH 7,4) mit 3 mg Zymolyase zum Pellet gegeben. Die Suspension wurde für 30 bis 60 min unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert.

Die nächsten Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C Gerättemperatur. Die Zymolyase-behandelte Suspension wurde bei 2500 rpm für 5 min mit dem JA-10 Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 6,7 ml kaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,2 % (w/v) BSA, 1 mM PMSF) resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit einem Homogenisator aufgeschlossen und erneut mit 6,7 ml kaltem Homogenisierungspuffer pro 1 g Feuchtgewicht gemischt. Es erfolgte dann die zweimalige Zentrifugation bei 3300 rpm für 5 min mit dem JA-10 Rotor um größere Bestandteile wie ganze Zellen, Zellkerne oder Zelltrümmer zu entfernen. Nach der Zentrifugation des Überstandes bei 10000 rpm für 12 min mit dem JA-10 Rotor konnten die Mitochondrien geerntet werden. Das Pellet wurde in SH Puffer (0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES) aufgenommen und erneut bei 4000

rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 12000 rpm für 12 min mit dem JA-20 Rotor zentrifugiert und das Mitochondrien-Pellet wurde in 0,5 ml SH-Puffer resuspendiert. Es folgte dann die Proteinbestimmung und die Mitochondrien wurden in kleinen Mengen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.1.3.2. Protokoll für die Isolierung von Mitochondrien modifiziert für das SILAC Experiment

Für das SILAC Experiment wurde ein besonders schonendes Verfahren zur Isolierung der Mitochondrien aus Hefezellen entwickelt. Die Zellen wurden bis zu einer stationären OD_{578} von 5-7 kultiviert. Wie zuvor beschrieben (siehe 2.1.3.1.), wurden sie durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und mit Zymolyase behandelt. Hier wurde pro 1 g Feuchtgewicht der Zellen 6,6 ml Zymolyase-Puffer (1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) und 6 mg Zymolyase pro 1 g Feuchtgewicht zugegeben. Die Lösung wurde für 30 bis 60 min unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert.

Die nächsten Schritte erfolgten auf Eis oder 4°C Gerätetemperatur. Die inkubierte Suspension wurde bei 4000 rpm für 5 min mit dem JA-10 Rotor abzentrifugiert. Die Hefezellen wurden zweimal in 15 ml kalten Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,2 % (w/v) BSA, 1 mM PMSF) durch die einmalige Invertierung der Flasche sanft gewaschen. Danach wurde das Pellet in 15 ml kaltem Homogenisierungspuffer mit einem PIPETMAN P5000 mit um 1 cm weggeschnittener Spitze sanft resuspendiert. Die Lösung wurde bei 3000 rpm, 5 min im Beckman-JA10 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde behalten und mit dem Pellet wurde der Vorgang wiederholt. Der Überstand wurde dann durch Zentrifugation bei 3000

rpm für 5 min mit dem JA-10 Rotor von großen Zelltrümmern, Zellkernen und ganzen Zellen gereinigt. Anschließend wurde der gesamte Überstand bei 10000 rpm für 10 min mit dem JA-20 Rotor zentrifugiert, wodurch die Mitochondrien geerntet werden konnten. Diese wurden in 0,5 ml SH Puffer resuspendiert. Bei SILAC II und III wurde die Suspension erneut bei 10000 rpm für 10 min mit dem JA-20 Rotor zentrifugiert und anschließend in 0,5 ml SH Puffer resuspendiert. Es folgte dann die Proteinbestimmung und die Mitochondrien wurden in kleineren Mengen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.1.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Auswirkung von Chloramphenicol auf die mitochondriale Ultrastruktur

In Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Unger (AG Westermann, Institut für Zellbiologie der Universität Bayreuth) wurden elektronenmikroskopische Bilder von Chloramphenicol-behandelten Hefezellen angefertigt. Zellen wurden für 48 h Chloramphenicol Behandlung (2,5 mg/ml) in YPGal Medium (30°C) angezogen und anschließend geerntet. Die geernteten Zellen wurden mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert. Anschließend wurden sie zur Kontrastierung mit Uranylacetat behandelt und in Epoxidharz eingebettet [152]. Es wurden dann Schnitte mit einer Dicke von 50 bis 70 nm mit dem Ultracut EM UC6 Ultra-Mikrotom der Firma Leica Microsystems mit einer Diamantklinge, Typ 45° der Firma Diatome angefertigt. Diese wurden auf einem Kupfergrid der Firma Plano überführt. Zur Färbung wurden die Schnitte mit Bleicitrat und Uranylacetat behandelt [153]. Die gefärbten Strukturen konnten dann mit einem Transmissionselektronenmikroskop der Firma Carl Zeiss, Model EM 902A untersucht werden.

2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.1. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Die Präzipitation von Proteinen erfolgt durch die Zugabe von 72 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) und der anschließenden Inkubation für 10 min auf Eis. Anschließend folgte die Zentrifugation für 15 min bei 20000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde danach in 20-50 µl SDS-Ladepuffer aufgenommen.

2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford mit dem Proteinassay der Firma Biorad nach deren Anleitung [154]. Nach dem Verdünnen des Farbstoff Konzentrates im Verhältnis 1:5, wurde es mit den Proben vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde eine Eichkurve mit Proben bekannter Proteinkonzentrationen erstellt. Es erfolgte immer eine vierfache Bestimmung der Proteinkonzentration jeder Probe: zweimal mit jeweils 3 µl und zweimal mit jeweils 5 µl Protein. Als Proteinstandard wurde IgG aus Rind verwendet.

2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Masse aufgetrennt [155]. Dabei wurde ein Gelbildner mit 30 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid verwendet. Das Gel wurde nach Zugabe von TEMED (Bodengel: 0,25 %, Trenngel: 0,06 %, Sammelgel 0,1 %) und Ammoniumpersulfat (APS) (Bodengel: 0,05 %, Trenngel 0,06 %, Sammelgel 0,05 %) zwischen zwei Glasplatten mit einer Größe von ca. 160 mm x 180 mm und einer Dicke von 1 mm in der folgenden Reihenfolge gegossen: Bodengel

(20 % Acrylamid; 0,12 % Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % SDS), Trenngel (16 % Acrylamid; 0,08-0,13 % Bisacrylamid; 386 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % SDS), Sammelgel (5 % Acrylamid; 0,03 % Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1 % SDS). Die Proben wurden mit SDS-Ladepuffer (Laemmli) (2 % SDS (w/v), 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl, pH 6,8) vermischt und für 3 min bei 95°C aufgeköcht. Das Volumen der Proben betrug 20 – 50 μ l mit einer Proteinmenge von bis zu 100 μ g pro Spur. Zur Abschätzung der Größe wurden 10 μ l vom Proteinmarker beidseits aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in vertikalen Kammern mit Elektrophoresepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,3, 384 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) durchgeführt. Bei 30 mA dauerte die Elektrophorese ca. 2,5 Stunden. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembranen (2.2.4.) transferiert oder mit Coomassie gefärbt (2.2.5.).

2.2.4. Transfer von Protein auf Nitrocellulosemembran (Western-Blot)

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen übertragen. In der Übertragungskassette wurde das Gel auf die Membran zwischen zwei Schwämme und zwei Filterpapiere gelegt und in der Wet Blot Kammer mit Wet Blot Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10-20 % Methanol, pH ~8,3, 0,01 - 0,1 % SDS) eingesetzt [156]. Die Proteine wurden für 45 min bei 360 mA übertragen, mit Ponceau S (0,2 % (w/v) in 3 % (w/v) TCA) gefärbt und die Membran anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Der Nachweis von spezifischen Proteinen erfolgte mittels Immundekoration (2.3.1.).

2.2.5. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Um mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine optisch sichtbar zu machen, wurde das Gel in 0,1 % Coomassie-Brilliant-Blue R-250 in 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure für 30 min inkubiert und geschüttelt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel in einer Mischung von 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure für eine Stunde gelagert und leicht geschüttelt. Das Gel konnte dann anschließend in ddH₂O bei 4°C gelagert werden.

2.2.6. Blue Native PAGE

Pro Probe wurden jeweils 150 µg isolierte Mitochondrien bei 14000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 15 µl Schägger-Lysepuffer (50 mM Bistris pH 7,0, 1 M ε-Aminocapronsäure, 5 mM EDTA, 0,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) und 1 mM PMSF resuspendiert. Zu der Mischung wurden dann 4,5 µl 10 % Digitonin (3 % Endkonzentration) dazugegeben, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 15000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und mit 2 µl NativePAGE[®] 5 % Sample additive G-250 von der Firma lifetechnologies versetzt. Die Proben wurden anschließend auf ein 4-16 % Bis-Tris Gel der Firma Life Technologies geladen. Beidseits wurden Marker, die aus 1 µl Thyroglobulin, 2 µl Ferritin, 3 µl 10 % Digitonin und 10 µl Lysepuffer bestanden, geladen. Das Gel wurde dann in der zugehörigen Kammer mit 1 x NativePAGE[™] Dark Blue Cathode Puffer bei 150V bis zu einem Drittel laufen gelassen. Daraufhin wurde der Puffer gegen den 1 x NativePAGE[™] Light Blue Cathode Puffer ausgewechselt und bei 250V für 2 Stunden laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel in SDS-Laufpuffer (siehe 2.2.3.) inkubiert, um die Proteine zum Blotting zu denaturieren. Der Puffer

wurde dann mit Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Methanol und 0,1 % SDS) ausgetauscht, für 2 min ohne Strom inkubiert und danach bei 30 V für 1 Stunde geblottet. Die Proteine wurden mittels ECL Immunoblot auf PVDF nachgewiesen (2.3.2.).

2.2.7. Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture (SILAC)

Für die Analyse des mitochondrialen Proteoms unter Stress wurde das SILAC Verfahren ausgewählt. Zwei Kulturen wurden in SCGal Medium (siehe 2.4), jeweils mit schwerem und leichtem Lysin versetzt, parallel angezogen und 24 h vor der Mitochondrienisolation wurde eine Kultur mit 2,5 mg/ml Chloramphenicol versetzt. Die Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 5 – 5,5 angezogen und nach dem Protokoll 2.1.3.2. wurden Mitochondrien isoliert. Es wurden mindestens 10 Verdopplungen durchlaufen, um die Aufnahme von ¹²C₆¹⁴N₂-(leichtem) und ¹³C₆¹⁵N₂-(schweren) Lysin zu sichern. Die Mitochondrien beider Kulturen wurden im Verhältnis 1:1 (jeweils 50 µg) gemischt in SDS-Puffer aufgenommen und bei 98°C für 3 min gekocht. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (2.2.3.) aufgetrennt und das Gel mit 0,1 % Coomassie-Brilliant-Blue R-250 (2.2.5.) gefärbt. In Zusammenarbeit mit der Core Facility vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried wurden dann die Proteine analysiert. Die Proteine wurden aus dem Gel gelöst und mit Lys-C enzymatisch verdaut. Anschließend wurden die Peptide mittels Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert.

2.3. Immunologische Methoden

2.3.1. Immundekoration von Western Blots von Nitrozellulosemembranen

Der Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte mittels

Immundekoration. Die Ponceau S gefärbte Membran wurde erstmal in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM Natriumchlorid) für 30 min geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen zu verhindern und sie abzusättigen. Anschließend wurden die Membranen in spezifischen affinitätsgereinigten Antikörpern aus Kaninchen, die je nach Affinität 1:100 bis 1:5000 mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBS verdünnt worden sind, für 2 bis 24 Stunden inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal für 5 min mit TBS gewaschen. Anschließend wurde sie für 0,5 bis 2 Stunden in Sekundärantikörper, der 1:10000 in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS eingesetzt wurde, inkubiert. Nach Entnahme wurde die Membran dreimal 5-10 min mit TBS gewaschen. Der Sekundärantikörper aus Ziege war mit einer Meerrettich-Peroxisase konjugiert und gegen Immunglobuline von Kaninchen gerichtet. Nach dem Waschen wurde die Membran mit den ECL 1 (100 mM Tris/HCl; 0,044 % (w/v) Luminol; 0,0066 % (w/v) p-Coumarinsäure; pH 8,5) und ELC 2 (100 mM Tris/HCl; 0,024 % (w/v) H₂O₂; pH 8,5) Lösungen, die kurz davor in einem 1:1 Verhältnis gemischt worden sind, versetzt. Durch die Peroxidase konnte eine Chemolumineszenz-Reaktion ausgelöst werden. Die Reaktion konnte durch Exposition auf Röntgenfilmen (SuperRX, Fuji) visualisiert werden.

2.3.2. Immundekoration von Western Blots von PVDF Membranen

Die PVDF Membranen wurden in Methanol für 3 min nahezu vollständig entfärbt und in PBS (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄*2H₂O, 100 mM NaCl, pH 7,5 mit HCl eingestellt) mit 0,5 % Tween 20 geblockt. Anschließend 1 x 15 min und 2 x 5 min in PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen und in Primärantikörper über Nacht in PBS mit 0,1 % Tween 20 gesetzt. Zum Waschen wurde der Blot dreimal mit destilliertem Wasser abgespült und zweimal für jeweils eine Stunde in PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen.

Anschließend wurde die Membran im Sekundärantikörper, der im Verhältnis 1:20000 in PBS mit 0,1 % Tween 20 verdünnt wurde, für eine Stunde inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit destilliertem Wasser abgespült, und einmal für 15 min in destilliertem Wasser inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal für mindestens eine Stunde in PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Die Detektion des Signals erfolgte dann durch Zugabe von einem frisch in einem Verhältnis von 1:1 gemischten ECL 1 und ECL 2 Lösung für 1 Minute und durch anschließende Röntgenfilmexpositionen (SuperRX, Fuji) für 1-20 min entwickelt.

2.4. Puffer und Medien

Platten: Das gewünschte Medium wurde mit 2 % (w/v) Agar nach dem getrennten Autoklavieren gemischt und in Petrischalen gegossen.

S-Medium: 1,7 g/l *Yeast Nitrogen Base* ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/l Ammoniumsulfat; pH 5,5 mit KOH eingestellt. Je nach gewünschter Kohlenstoffquelle entweder mit 2 % (w/v) Glukose (SD) oder mit 2 % (w/v) Galaktose (SGal) versetzt; Auxotrophiemarker: Adenin 20 mg/l, Histidin 30 mg/l, Leucin 30 mg/l, Lysin 30 mg/l, Methionin 30 mg/l, Tryptophan 30 mg/l, Uracil 20 mg/l. Im 2xS-Medium wurde die doppelte Menge von allen Aminosäuren genommen.

SC-Medium: Zusätzlich zum S-Medium 2 g/l Dropout Mix: 2 g

Alanin, 2 g Arginin, 2 g Asparagin, 2 g Aspartat, 2 g Cystein, 2 g Glutamat, 2 g Glutamin, 2 g Glycin, 2 g Inositol, 2 g Isoleucin, 2 g Methionin, 2 g Phenylalanin, 2 g Prolin, 2 g Serin, 2 g Threonin, 2 g Tyrosin, 2 g Valin und 0,2 g p-Aminobenzoesäure

TAE-Puffer: 1 mM EDTA; 40 mM Tris/Acetat; pH 7,4; 20 mM Natriumacetat

TBS-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM Natriumchlorid

YP-Medium: 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Bacto-Pepton, mit HCl auf pH 5 eingestellt; Glukose und Galaktose wurden als 40 % (w/v) Glukose bzw. 30 % (w/v) Galaktose konzentrierte Stammlösungen separat autoklaviert und je nach gewünschter Kohlenstoffquelle zum YP-Medium zugegeben mit einer Endlösung: 2 % (w/v) Glukose (YPD); 2 % (w/v) Galaktose (YPGal)

2.5. Chemikalien und Geräte

2.5.1. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert (München)	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Applichem (Darmstadt)	Ammoniumsulfat, PMSF, Tris Puffer, H ₂ O ₂
Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)	Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton

Biorad (München)	Proteinstandard und Proteinreagenzien zur Proteinbestimmung, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG, Prestained SDS-PAGE Standards
Braun (Melsungen)	Kanülen, Spritzen
Calbiochem	Adenin, L-Histidin, Uracil
Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Tewksbury, USA)	Schweres Lysin
Carl Roth (Karlsruhe)	Autoklavierbare Entsorgungsbeutel
EUROSCARF (Frankfurt)	Hefestämme
Fuji (Tokyo, Japan)	SuperRX Fuji Medical X-Ray Film 100 MF 13 x 18 cm
Gerbu (Gaiberg)	DTT, HEPES
Greiner Bio One	Semi-Micro Kunststoffküvetten; 15ml und 50ml CELLSTAR® Polypropylen Röhren steril
Invitrogen (Groningen)	Blue Native PAGE Cathode Buffer und Running Buffer
Merck (Darmstadt)	Trichloressigsäure, L-Tryptophan
Plano (Wetzlar)	Kupfergrid
Roth (Karlsruhe)	Aminosäuren
Sarstedt (Bad Homburg)	Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Röhren
Schleicher & Schüll (Kassel)	Protran Nitrozellulosemembranen BA83, Whatman Filterpapiere, Sterilfilter
Seikagaku, Tokyo (Japan)	Zymolyase 20T
Serva (Heidelberg)	Acrylamid/Bis Lösung 30 % w/v, Agarose, Bisacrylamid, Ethanol, Hefeextrakt, PMSF, Ponceau S, Saccharose (Sucrose), SDS,

	TEMED
Sigma (München)	Aminosäuren, Cumarinsäure, Galaktose, Glukose, Glycerin, Luminol, β - Mercaptoethanol, Tween 20, Yeast Nitrogen Base
Spinnrad (Bad Segeberg)	Magermilchpulver
Thermo Fisher Scientific	Unstained Protein Molecular Weight Marker; PageRuler Plus Prestained Protein Ladder

Die übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.5.2. Geräte

Autoklav	Varioclav© 400E, H + P Labortechnik (Oberschleißheim)
Blotapparatur	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)
Brutschränke, Inkubatoren	Heraeus Christ, Osterode
Entwicklermaschine	Optimax 2010 X-Ray Film Processor, Protec Medizintechnik (Oberstenfeld)
Diamantklinge	Typ 45°, Diatome (Biel, Schweiz)
Feinwaagen	Sartorius (Mainz)
Gelkammern	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)
Kolbenhubpipetten	PIPETMAN Pipetten (Gilson, Middleton, Wisconsin)
Magnetrührer	IKAMAG REO (IKA, Staufen)
Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Photometer	Biophotometer plus, Eppendorf (Hamburg)

Quantifizierungssoftware	Image Processing and Analysis in Java (ImageJ)
Quarzküvetten	Greiner Bio One (Kremsmünster, Oberösterreich)
Reinstwasseranlagen	PureLab Plus; ELGA Berkefeld GmbH (Celle)
Schüttler	Shaker Dos-10L (neoLab, Heidelberg)
Spannungsquellen	Electrophoresis Power Supply EPS 600, Amersham Biosciences (Freiburg)
Sterilbank	MSC-Advantage™, Thermo Scientific (Waltham, USA)
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf (Hamburg)
Transmissions- elektronenmikroskop	EM 902A Carl Zeiss, (Oberkochen)
Ultramikrotom	Ultracut EM UC6, Leica Microsystems (Wetzlar)
Überkopfschüttler	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)
Vortex-Mixer	Bender and Hobein (München)
Wärmeschränke	Memmert (Hannover)
Zentrifugen	Avanti™ J-25 Centrifuge, Beckman Coulter, Krefeld 3K30; Sigma, Osterode am Harz 5417 R, 5415 D, 5810 R, Eppendorf (Hamburg)

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Bedingungen zur Induktion der *Mitochondrial Unfolded Protein Response* (mtUPR)

Die mtUPR wurde in einigen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* [109] und in humanen Zellen [157] beobachtet. Bisher wurden in *Saccharomyces cerevisiae* keine Untersuchungen durchgeführt, so dass die erstmalige Etablierung der Konditionen zur Induktion der mtUPR notwendig war.

3.1.1. Beobachtung der mtUPR in Hefe

Um die mtUPR auszulösen wurden Hefekulturen mit 2,5 mg/ml Chloramphenicol versetzt und darin für 24 Stunden angezogen, um die Synthese mitochondrial kodierter Proteine zu hemmen. Durch diese Hemmung akkumulieren ungefaltete kernkodierte mitochondriale Proteine, die eine Stressreaktion auslösen. Die Expression weiterer mitochondrialer Proteine wird reguliert, um diesem entgegen zu wirken. Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation von Komponenten, die an dieser Reaktion beteiligt sind. Verschiedene Stämme und Medien wurden ausgetestet, um die besten Bedingungen zur Induktion der mtUPR zu finden und die SILAC Analyse zu ermöglichen.

Eine Reaktion auf die Akkumulation ungefalteter Proteine konnte zunächst in Gesamtzellextrakten beobachtet werden. Dabei wurde eine spezifische und reproduzierbare Expressionsänderung bestimmter Proteine ausgelöst. Die Experimente wurden zunächst mit dem Hefestamm W303 durchgeführt. Um die mtUPR auszulösen, wurden Zellen in YP Medium mit 2 % Galaktose mit und ohne den Mitochondrien-spezifischen Translationsinhibitor Chloramphenicol

angezogen. Die Kulturen wurden am Tag vor der Präparation der Gesamtzellextrakte auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt, und entweder mit oder ohne Chloramphenicol 24 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 5-6 angezogen. Durch den Rödel Aufschluss wurden die Zellen aufgeschlossen oder Mitochondrien wurden isoliert. Danach wurden die Proben mittels SDS-PAGE, Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran und Immundekoration auf endogene Mengen verschiedener mitochondrialer Proteine untersucht.

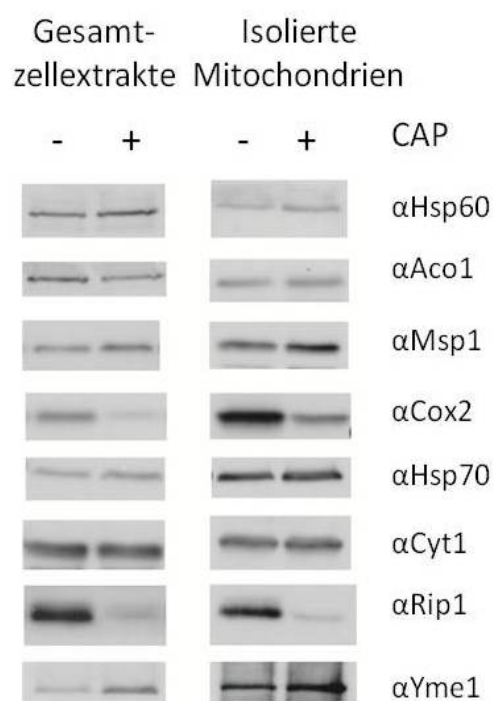


Abb. 4: In Gegenwart von Chloramphenicol kommt es zur Veränderungen der Mengen bestimmter Proteine

Nach Inkubation der W303 Zellen in YPGal Medium, jeweils mit und ohne Chloramphenicol für 24h wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und Mitochondrien isoliert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration analysiert: Hsp60, Msp1, Hsp 70 und Yme1 zeigen erhöhte Konzentrationen unter Stressbedingungen, während Aco1 und Rip1 verringerte Mengen aufwiesen. Unverändert zeigt sich hingegen Cyt1. Cox2 diente als Kontrolle für die Wirkung von Chloramphenicol, da es mitochondrial kodiert ist und die mitochondriale Proteinsynthese durch das Antibiotikum gehemmt wird. Die Veränderungen sind sowohl in Gesamtzellextrakte als auch in isolierten Mitochondrien zu beobachten.

Man beobachtet erhöhte Mengen von Msp1, Hsp60, Hsp70 und Yme1 und reduzierte Mengen von Aco1, Rip1 und Cox2, wobei Cox2 als mitochondrial kodiertes und in der Matrix translatiertes Protein als Kontrolle dient. Unverändert zeigt sich hingegen Cyt1. Es ist grundsätzlich zu beobachten, dass in den isolierten Mitochondrien die Veränderungen deutlicher zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu wurden nach Ernte der Zellen aus der logarithmischen Phase keine Veränderungen gesehen (Ergebnisse nicht gezeigt), sodass die Zellen im Folgenden immer in der stationären Phase geerntet worden sind.

3.1.2. Auswahl eines geeigneten Hefestamms

Für die ersten Experimente wurde zunächst der Hefestamm W303 verwendet. Jedoch erfordert das SILAC Experiment einen Lysin auxotrophen Stamm, der Lysin nicht synthetisieren kann und damit auf dessen Aufnahme aus dem Medium angewiesen ist. So können die Zellen mit einem Marker, in diesem Fall mit schwerem und leichtem Lysin, während des SILAC Experiments markiert werden (siehe Material und Methoden 2.2.7). Deswegen wurde zunächst der Stamm YPH499 getestet, der Lysin auxotroph ist. Der Stamm zeigte allerdings Wachstumsschwierigkeiten in Gegenwart von Chloramphenicol in 2xSGal (selektiv Medium mit 2 % Galaktose und der doppelten Konzentration von allen Aminosäuren) und YPGal (2 % Galaktose). Daher wurde der Stamm BY4742 getestet. BY4742 ist ebenfalls Lysin auxotroph. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, zeigte BY4742 im 2xSGal Medium wie zuvor W303 eine Induktion der mtUPR.

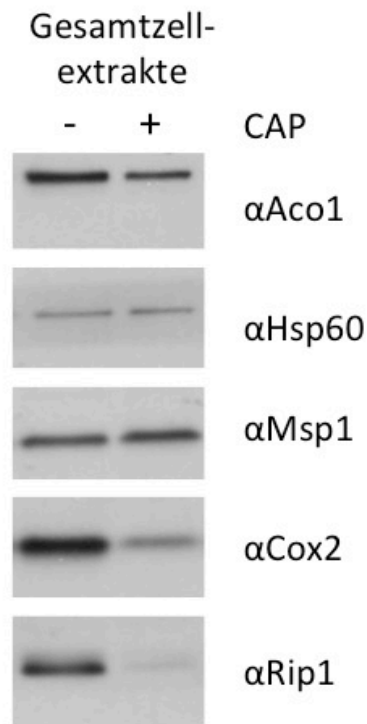


Abb. 5: In Gesamtzellextrakten von BY4742 mit und ohne Chloramphenicol sind die gleichen Veränderungen wie bei W303 zu beobachten.

Nach Inkubation der BY4742 Zellen in 2xSGal Medium, jeweils mit und ohne Chloramphenicol für 24h wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration analysiert: Hsp60, Msp1 zeigen erhöhte Konzentrationen unter Stressbedingungen, während Aco1 und Rip1 verringerte Mengen aufwiesen. Cox2 diente als Kontrolle für die Wirkung von Chloramphenicol, da es mitochondrial kodiert ist und die mitochondriale Proteinsynthese durch das Antibiotikum gehemmt wird.

Es ist eine verstärkte Expression von Msp1 und Hsp60 zu sehen, während die Expression des Kontrollproteins Cox2 unter Chloramphenicol verringert ist. Außerdem sind verminderte Konzentrationen von Rip1 und Aco1 zu beobachten. Aus BY4742 wurden auch Mitochondrien isoliert und dort konnten vergleichbare Unterschiede in den Proteinmengen wie in den Gesamtzellextrakten beobachtet werden (siehe Abbildung 10). Deswegen wurde BY4742 für die weiteren Experimente und für das SILAC Experiment verwendet.

3.1.3. Untersuchung der Induktion der mtUPR in verschiedenen Medien

Für das SILAC Experiment ist ein synthetisches Medium notwendig, da man die Hefezellen jeweils mit schwerem und leichtem Lysin parallel anziehen muss. Die Experimente wurden mit Galaktose als Kohlenstoffquelle durchgeführt, um die bekannte Reprimierung der Expression von Atmungskettenkomponenten durch Glukose zu vermeiden [158, 159]

Um ein besseres Wachstum zu erhalten und eine höhere Dichte der Zellen zu erreichen wurde das 2xSGal Medium (siehe Material und Methoden 2.4.) getestet. Dabei zeigte sich ein etwas schnelleres Wachstum. In SGal Medium ohne Chloramphenicol hatten die Zellen eine Verdopplungszeit von ca. 5,3 h im Vergleich zum Wachstum in 2xSGal Medium ohne Chloramphenicol mit einer Verdopplungszeit von ca. 4,8 h. Außerdem konnten die Zellen in 2xSGal Medium auf eine höhere OD anwachsen. In SGal Medium ohne Chloramphenicol hat die Kultur eine OD von ~ 2 über Nacht erreicht und in 2xSGal Medium ohne Chloramphenicol eine OD von ~ 4 . Aus den Kulturen wurden Gesamtzellextrakte angefertigt und mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulosemembran und Immundekoration auf die Mengen der angegebenen Proteine analysiert. Die bei Wachstum auf YPGal (siehe Abb. 4) beobachteten Änderungen der Proteinkonzentrationen konnte man auch bei Wachstum auf 2xSGal Medium beobachten (siehe Abb. 5). Diese waren allerdings schwächer ausgeprägt als bei Wachstum auf YPGal, so dass ein weiteres Medium (SCGal) ausgetestet wurde (siehe Abb. 6).

Um die Wachstumsbedingungen der Hefezellen weiter zu optimieren, wurde BY4742 in SCGal Medium angezogen. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, kann man in den isolierten Mitochondrien aus Zellen die in SCGal angezogen wurden

im Vergleich zu den Zellen aus 2xSGal eine bessere Inhibierung der Cox2-Synthese durch die Chloramphenicol-Zugabe beobachten. Außerdem erkennt man die Veränderungen der Verhältnisse der Proteinkonzentrationen deutlich besser wie etwa der verminderten Mengen von Aco1 oder der erhöhten Konzentration von Msp1 und Hsp60 unter Stressbedingungen. Die Zellen wachsen auch schneller mit einer Verdopplungszeit von 2h ohne Chloramphenicol in SCGal Medium im Vergleich zu 4,8 h in 2xSGal Medium und bis zu einer maximalen OD von 14-15 im Vergleich zu ca. OD 4 in 2xSGal.

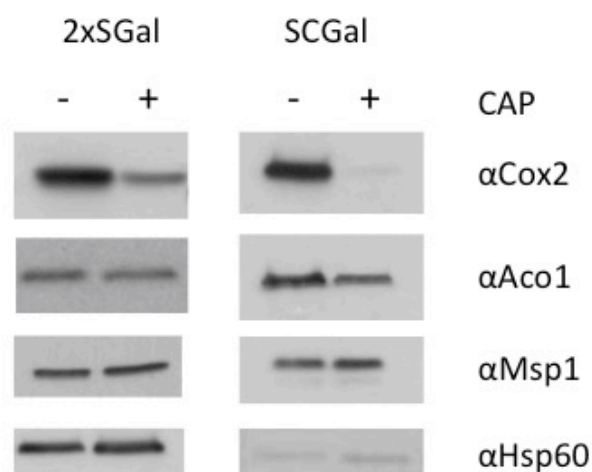


Abb. 6 Isolierte Mitochondrien aus BY4742 Zellen zeigen nach Anzucht in SCGal Medium eine deutlich bessere Inhibition der Cox2-Synthese als nach Anzucht in 2xSGal.
Die Zellen wurden gesplittet und mit und ohne Chloramphenicol über Nacht angezogen. Mittels SDS-PAGE und Immundekoration wurden sie auf ihren Proteingehalt untersucht.

3.2. Untersuchung der Auswirkung von Chloramphenicol auf die mitochondriale Ultrastruktur und Proteinzusammensetzung

3.2.1. Mitochondrien zeigen nach Chloramphenicol-Behandlung eine veränderte Ultrastruktur

Da durch Zugabe von Chloramphenicol die Bildung mitochondrialer Atmungskettenkomplexe gehemmt wird und insbesondere die ATP-Synthase einen wichtigen Einfluss auf die mitochondriale Struktur hat, stellten wir die Frage, ob es bei Behandlung der Zellen mit Chloramphenicol zu einer morphologischen Veränderung kommt.

In Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Unger (AG Westermann, Institut für Zellbiologie der Universität Bayreuth) wurden elektronenmikroskopische Bilder von Chloramphenicol-behandelten Hefezellen angefertigt. Die Abbildung 7 zeigt exemplarisch Phänotypen, die in der elektronenmikroskopischen Analyse der Mitochondrien (W303) nach 48 h Chloramphenicol Behandlung (2,5 mg/ml) in YPGal Medium (30°C) beobachtet wurden. Die Bezeichnung „elongiert“ beschreibt hier eine Elongation der *Cristae*, „septiert“ die Ausbildung von Septen in den Mitochondrien und „onion-like“ ringförmige endogene Membranstrukturen, die vermutlich auf eine andere Schnittrichtung durch die Septen zu erklären sind. Die Zuordnung zu einem Phänotyp wurde rein optisch durchgeführt ohne eine Vermessung der *Cristal*länge. Zeigte ein Mitochondrienprofil sowohl Septen, als auch elongierte *Cristae*, wurden beide Phänotypen als positiv gewertet. In der zusammenfassenden Tabelle 1 bzw. Abbildung 7 ergibt sich dadurch ein höherer Wert als 100 % aus der Summe der Anteile der einzelnen Phänotypen. Insgesamt wurden 100 Zellen je Kultur ausgewertet. Hierbei konnten in Zellen, die mit Chloramphenicol kultiviert wurden, 353 Mitochondrienprofile detektiert werden. Da allerdings 125

Mitochondrienprofile keine *Cristae* erkennen ließen oder nicht eindeutig auswertbar waren, wurden insgesamt 228 Profile ausgewertet. In Abwesenheit von Chloramphenicol wurden insgesamt 376 Profile detektiert, 35 ließen keine *Cristae* erkennen oder konnten nicht eindeutig ausgewertet werden. Dementsprechend wurden im unbehandelten Wildtyp 341 Mitochondrienprofile ausgewertet.

Als Antwort auf die Chloramphenicol Behandlung der Hefezellen zeigen die Mitochondrien eine phänotypische Veränderung mit einer vermehrten Septierung und Elongation der *Cristae* im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Es kommt ebenfalls zur Ausbildung von Ringformen der *Cristae*, die auch als „onion-like“ beschrieben werden.

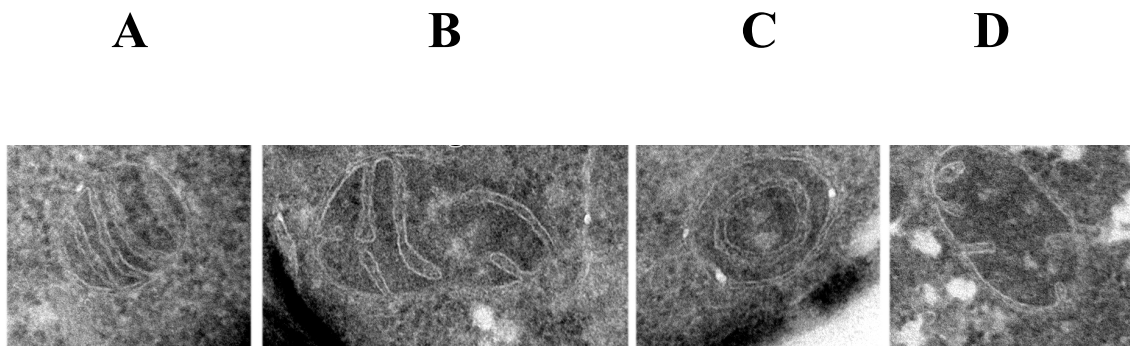


Abb. 7: Übersicht der Phänotypen, die in der elektronenmikroskopischen Analyse detektiert wurden.
A septiert, B elongiert, C onion like, D wildtypisch.

Die Tabelle 1 zeigt die prozentuale Verteilung der beobachteten Phänotypen auf die detektierten Mitochondrienprofile in unbehandelten (WT, 48h YPGal, 30°C) und mit Chloramphenicol behandelten (WT + Chloramphenicol, 48 h YPGal + 2,5 mg/ml Chloramphenicol , 30°C) Zellen.

Stamm	Phänotyp			
	wildtypisch	septiert	elongiert	onion like
WT + Chloramphenicol	17,11	65,35	27,19	4,39
WT	92,06	0,88	7,06	0

Tab. 1: Quantifizierung der beobachteten Phänotypen in Zellen, die in An- oder Abwesenheit von 2,5 mg/ml Chloramphenicol für 48 h bei 30°C in YPGal angezogen wurden.

N = 100 Zellen. In WT wurden insgesamt 341 Mitochondrienprofile detektiert, in WT + Chloramphenicol wurden 228 Mitochondrienprofile detektiert. Detektierte Profile entsprechen jeweils 100 Prozent (WT:341 = 100 %; WT + Chloramphenicol: 228 = 100 %).

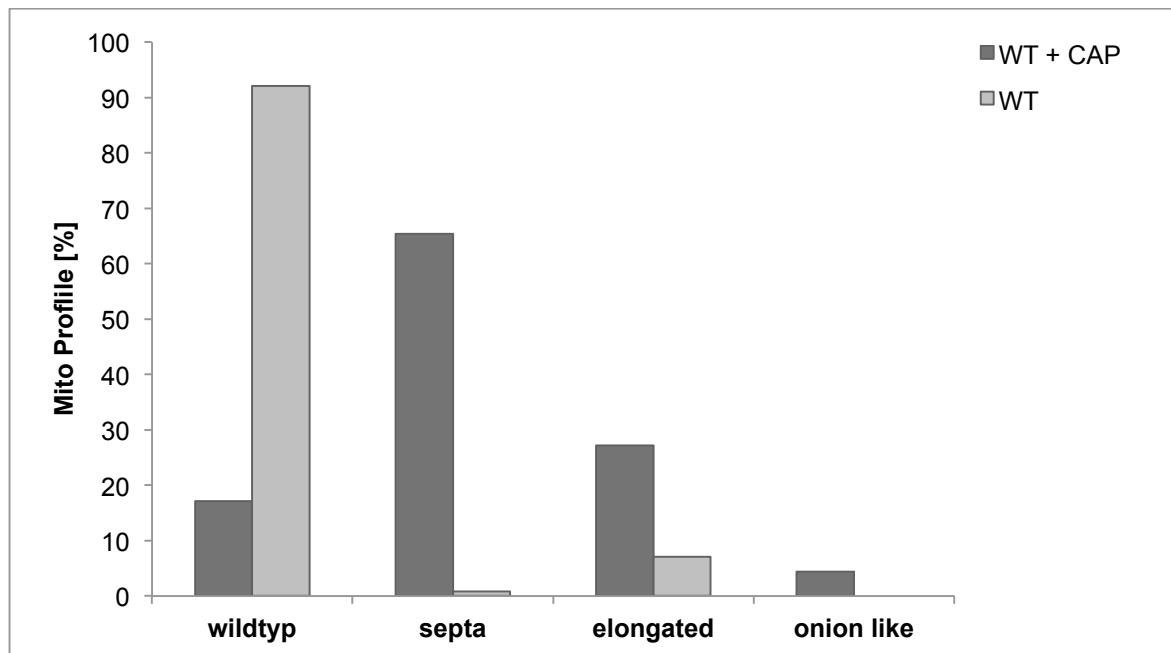


Abb. 8: Quantifizierung der beobachteten Phänotypen in Zellen, die in An- (WT + Chloramphenicol) oder Abwesenheit (WT) von 2,5 mg/ml CAP für 48 h bei 30°C in YPGal angezogen wurden.

N = 100 Zellen. In WT wurden insgesamt 341 Mitochondrienprofile detektiert, in WT + CAP wurden 228 Mitochondrienprofile detektiert. Detektierte Profile entsprechen jeweils 100 Prozent (WT: 341 = 100 %; WT + CAP: 228 = 100 %).

3.2.2. Atmungskettenkomplexe können in Anwesenheit von Chloramphenicol nicht assembliert werden

Mitochondrien wurden aus in Gegenwart oder Abwesenheit von Chloramphenicol für 24 h in SCGal Medium kultivierten Zellen isoliert. Die Mitochondrien wurden mittels Blue-Native PAGE, Western Blot und anschließender Immundekoration gegen die Untereinheiten Cyt1, Cox5a und F₁β der Atmungskettenkomplexe III, IV und V untersucht. Im mitochondrialen Genom sind weitere essentielle Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe III, IV, und V (ATP-Synthase) kodiert. Die Inhibierung ihrer Synthese in Gegenwart von Chloramphenicol verhindert offensichtlich, dass verbliebene Untereinheiten zu Komplexen assemblieren. Dies erklärt auch die Befunde aus der EM Analyse. Das Fehlen der ATP-Synthase, deren dimerisierte Form für die Ausbildung von *Crista*-Spitzen notwendig ist [16, 17], verursacht die verstärkte Ausbildung von Septen.

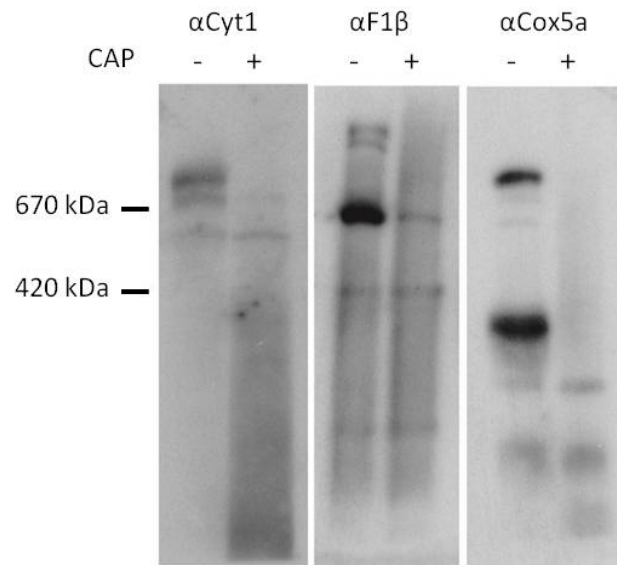


Abb. 9: Die Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe Cyt1, F₁β, Cox5a können in Gegenwart von Chloramphenicol nicht korrekt assemblieren.

Mitochondrien, die für das SILAC Experiment II isoliert worden sind, jeweils ohne (-) und mit (+) Chloramphenicol, wurden mittels Blue Native PAGE aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und anschließend gegen die angegebenen Proteine dekoriert.

3.3. Untersuchung des mitochondrialen Proteoms mittels SILAC und massenspektrometrischer Analyse (MS)

Für die Analyse der mitochondrialen Proteome wurde das SILAC Verfahren ausgewählt, da dies eine genaue Identifizierung und Quantifizierung aller mitochondrialen Proteine unter zwei verschiedenen Kulturbedingungen ermöglicht. Für das Experiment wurde der Stamm BY4742, der sich in den Vorexperimenten (siehe 3.1.2.) als zur mtUPR-Induktion geeigneter, Lysin auxotropher Stamm erwiesen hat, ausgewählt. Die Anzucht erfolgte auf SCGal-Medium. Das ermöglicht, die Aminosäuren spezifisch einzusetzen, so dass bei den verschiedenen Kulturbedingungen jeweils schweres oder leichtes Lysin für

ein SILAC Experiment zugegeben werden kann. Es wurden zwei Kulturen bei 30°C für zwei Tage parallel angezogen. Die eine wurde mit schwerem und die andere mit leichtem Lysin versetzt. Eine Kultur wurde 24 h vor Isolierung der Mitochondrien mit Chloramphenicol versetzt, während die andere unter Kontrollbedingungen angezogen wurde. Die Mitochondrien wurden nach dem zuvor beschriebenen Protokoll gewonnen (siehe 2.1.3.2., 2.2.7.). Die Markierung des Proteoms mittels SILAC Verfahren und anschließender massenspektrometrischer Analyse wurde insgesamt dreimal durchgeführt und nach der zeitlichen Reihenfolge als Experiment I bis III bezeichnet. Im Experiment I und III wurde die mit leichtem Lysin markierte Kultur mit Chloramphenicol versetzt, während im SILAC Experiment II die mit schwerem Lysin markierte Kultur mit Chloramphenicol versetzt wurde. In SILAC Experiment II und III wurde ein zusätzlicher Waschschrift bei der Mitochondrienisolierung eingeführt (siehe 2.1.3.2.).

Die Ergebnisse der MS-Analysen werden in den folgenden Unterkapiteln vorgestellt.

3.3.1. Überprüfung der Proteinmengen in den Mitochondrien für die massenspektrometrische Analyse

Nach der Isolierung der Mitochondrien aus den SILAC-Kulturen, wurden die Proben vor der massenspektrometrischen Analyse in Laemmli-Puffer aufgenommen, bei 95°C aufgekocht und mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrocellulosemembran und Immundekoration auf die Konzentration verschiedener Proteine untersucht. Die Wirkung von Chloramphenicol wurde hier anhand der Mengen des mitochondrial kodierten Proteins Cytochrom b (Cob) überprüft. Cob ist in Mitochondrien aus der Kultur mit Chloramphenicol in den Western Blots nicht nachweisbar.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die zuvor beobachteten Änderungen der

Proteinmengen auch in den SILAC-Kulturen zu beobachten sind. Es finden sich wie in den Vorexperimenten leicht verringerte Mengen an Aco1 bei Chloramphenicol-Behandlung, während Hsp60, Msp1 und Yme1 als Proteasen/Chaperone in erhöhten Mengen zu finden sind. Die Komponenten des *Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System* (MICOS) Komplexes verhalten sich unterschiedlich. Mic60, Mic12 und Mic29 zeigen erhöhte Mengen unter der Wirkung von Chloramphenicol während Mic10 und Mic27 keine Veränderung zeigen. Die Komponenten sind für die Ausbildung der *Cristae* notwendig. Bei Mgm1, das für die Fusion der Innenmembran eine Rolle spielt, sieht man ein verändertes Verhältnis der kurzen zur langen Isoform. Unter Stressbedingungen ist spezifisch eine erhöhte Konzentration der kurzen Isoform zu erkennen. Bei den TIM und TOM Komponenten, die für den mitochondrialen Proteinimport zuständig sind, sieht man auch Unterschiede. Während Tim23, Tim17, Tom22, Tom20, Tom70 und Tom7 erhöhte Mengen zeigen, zeigt sich keine Veränderung bei Tim50 und Tom40. Die Erhöhung der Proteinmengen deutet daraufhin, dass der Import von zytosolisch synthetisierten Proteinen, wie zum Beispiel mitochondrialen Proteasen oder Chaperonen, unter Stress durch Chloramphenicol gesteigert wird.

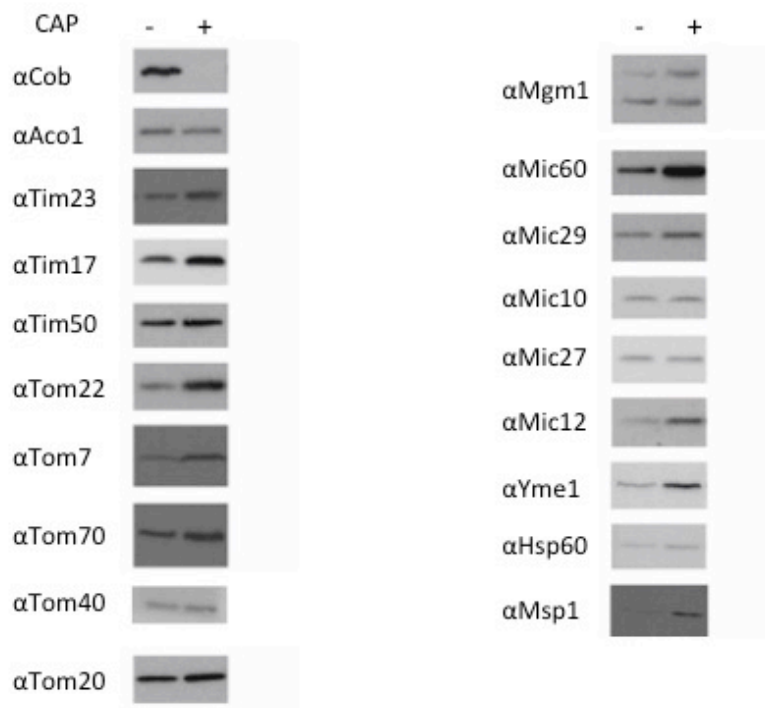


Abb. 10: Es wurden Mitochondrien aus SILAC-Kulturen isoliert und mittels Western Blot und Immundekoration wurden die Proteinmengen analysiert. In der Kultur mit leichtem Lysin wurde CAP zugesetzt.

3.3.2. Massenspektrometrische Untersuchung der SILAC Proben

Die massenspektrometrische Analyse der isolierten Mitochondrien der SILAC Experimente erfolgte durch die Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried.

Für die massenspektrometrische Analyse der SILAC Experimente wurden die Mitochondrien in gleichen Mengen aus den mit schwerem und leichtem Lysin markierten Kulturen kombiniert, in Laemmli-Puffer aufgenommen, bei 95°C aufgeköcht und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. In der Core Facility wurden die Proteine anschließend aus den Gelen extrahiert, denaturiert, enzymatisch geschnitten und die resultierenden Peptide im

Massenspektrometer analysiert. Im Massenspektrometer werden die Peptide ionisiert und anschließend über ein elektrisches Feld Richtung Detektor beschleunigt. Der Detektor sortiert und misst das Masse-zu-Ladungsverhältnis der Peptide. Diese werden mit einer Datenbank verglichen und dem entsprechenden Protein zugeordnet. Somit kann die genaue Menge bestimmt werden. Eine Datei mit identifizierten Peptiden und deren Quantifizierung wurde uns von der Core Facility zur Verfügung gestellt. Dargestellt sind in den folgenden Tabellen mit den SILAC Ergebnissen die Verhältnisse der Proteinmengen in der schweren zu den Proteinmengen der leichten Kultur.

3.3.2.1. NADH-Dehydrogenase in Hefe

Hefe besitzt keinen Komplex I in der Atmungskette, verfügt aber über zwei NADH Dehydrogenasen, die diese Funktion übernehmen. Diese sind Nde1 und Nde2 und sind beide außerhalb der Mitochondrien lokalisiert und Ndi1 innerhalb. Sie dienen der Oxidation von NADH als erster Schritt der Atmungskette [160].

Man sieht, dass beide Untereinheiten unter Chloramphenicol Behandlung in stark verminderten Mengen zu finden sind. Da in diesem Fall die Assemblierung selbst nicht beeinträchtigt sein sollte, ist die geringe Konzentration vermutlich auf eine gezielte Reduktion der Expression zurückzuführen.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
NADH Dehydrogenase				
	Nde1	1,7768	0,85045	1,7711
	Nde2	2,1784	0,39193	NaN
	Ndi1	1,779	0,79432	1,9951

Tabelle 2: NADH Dehydrogenase in Hefe

Die Tabelle zeigt zwei verschiedene NADH Dehydrogenasen. Es sind die einzelnen Ergebnisse der drei SILAC Experimente zu sehen. Für die massenspektrometrische Untersuchung werden die Proteine in Peptide gespalten und anhand Masse und Ladung aufgetrennt. Anhand der Elutionszeiten und der Signalintensität können diese Peptide bestimmten Proteinen zugeordnet und ihre Menge bestimmt werden. Kann ein Protein in einer der beiden Kulturen nicht identifiziert werden (häufig bei besonders hydrophoben Proteinen), kann das Verhältnis der Mengen unter verschiedenen Kulturbedingungen nicht berechnet werden. Diese Ergebnisse werden in dieser und allen darauffolgenden Tabellen als „NaN“ angegeben.

3.3.2.2. Der bc_1 -Komplex und seine Komponenten

Der bc_1 -Komplex, auch Komplex III, der Atmungskette dient dem weiteren Elektronentransport in der Atmungskette von Ubiquinon auf Cytochrom c, wobei Protonen über die Innenmembran in den Intermembranraum transportiert werden. Bei den Komponenten des bc_1 -Komplexes ist es auffällig, dass einzelne Untereinheiten (Qcr7, Qcr8 und Rip1) sehr niedrige Proteinkonzentrationen unter Chloramphenicol zeigen, während Komponenten, die für die regelrechte Assemblierung des Komplexes benötigt werden, sich eher nicht verändern. In Anwesenheit von Chloramphenicol wird kein Cytochrome b, das in der mtDNA codiert ist, synthetisiert. Cyt b ist aber eine der ersten Untereinheiten, die in den bc_1 -Komplex eingebaut wird. Das bedeutet, dass viele Untereinheiten nicht assemblieren können. Zu diesen zählen auch Qcr7, Qcr8 und Rip1, die in ihrer monomeren Form möglicherweise relativ instabil sind und daher verstärkt abgebaut werden.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
Bc1 Komplex				
Komponenten	Qcr2	1,7864	0,97492	1,9094
	Qcr6	1,8234	1,6426	2,3654
	Qcr7	10,013	0,26921	12,886
	Qcr8	24,186	Fehlend	19,805
	Qcr9	NaN	NaN	NaN
	Cor1	1,6197	1,0053	1,9934
	Cyt1	1,8094	1,0414	2,2764
	Rip1	15,39	0,13548	12,413
Assemblierung des Bc1 Komplexes	Bcs1	0,90193	Fehlend	1,0273
	Cbp4	1,2395	1,2364	1,3492
	Fmp25	0,93221	1,3585	0,98507
	Cbp3	0,96143	1,3395	1,2878
	Qcr7	10,013	0,2692	12,886
	Cbp6	1,0247	1,3629	1,2353
Assoziation mit Komplex III/IV Superkomplexe	Shy1	1,0103	Fehlend	1,0417
	Rcf1	Fehlend	Fehlend	Fehlend
	Cox14	NaN	NaN	1,1629

Tabelle 3: Der *bc₁*-Komplex

Die Tabelle zeigt alle Untereinheiten des *bc₁*-Komplexes und Proteine, die für die Assemblierung des Komplexes notwendig sind. In dieser und in allen darauffolgenden Tabellen bezeichnet „Fehlend“ Proteine, die in keiner massenspektrometrischen Analyse wegen fehlender signifikanter Peptide nicht identifiziert werden konnten.

3.3.2.3. Der COX Komplex und seine Untereinheiten

Bei der genaueren Analyse des COX Komplex (Komplex IV) ist zu sehen, dass die mitochondrial kodierten Proteine Cox1 und Cox2 fast komplett fehlen, was zeigt, dass die Inhibition der mitochondrialen Translation durch Chloramphenicol effektiv funktioniert hat. Darüber hinaus kommt es zu einer verringerten Menge der nukleär codierten COX Komplex Untereinheiten wie Cox4, Cox5B, Cox6, Cox8, Cox9, Cox12, Cox13 unter Chloramphenicol-Behandlung analog zu der Reduktion der Einheiten des *bc₁*-Komplexes.

Jedoch bleiben die Mengen einzelner Proteine wie Cox20 und Cox15 konstant. Auch hier handelt es sich um Assemblierungsfaktoren. Cox20 bindet Cox2 und dient als Chaperon, das die korrekte Faltung aufrecht erhält bis zum Einbau in

der Innenmembran [161]. Cox15 wird wiederum bei der Hydroxylierung von Häm O zu Häm A benötigt, das dann in den COX Komplex eingebaut wird [162]. Auch hier scheint die Destabilisierung des Komplexes die Menge der für seine Assemblierung benötigten Chaperone nicht zu beeinflussen.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
COX Komplex				
Komplex IV	Cox1	24,237	0,018659	26,546
	Cox2	17,024	NaN	11,897
	Cox3	Fehlend	Fehlend	Fehlend
	Cox4	3,0468	0,63899	3,6345
	Cox5B	4,3277	0,24887	3,3431
	Cox6	2,4287	0,87885	3,1931
	Cox8	1,6887	Fehlend	7,2
	Cox9	4,0629	0,46098	4,2885
	Cox12	4,7605	0,26888	3,9522
	Cox13	17,972	NaN	13,684
Mitochondriale Innenmembran Proteine	Cox20	1,474	1,0018	1,2995
	Cox16	Fehlend	Fehlend	2,1701
	Coa3/Cox25	NaN	NaN	1,0339
	Cox24	Fehlend	Fehlend	Fehlend
Hydroxylierung von heme O zu heme A	Cox15	1,3782	1,0117	1,3964
Kupfer Chaperon Kupfertransfer von Sco1p zu Cox11p	Cox17	NaN	Fehlend	Fehlend
Kupfer Homöostase	Cox23	3,5531	NaN	4,7838
Insertion von C Terminus von Cox2p in Membran	Cox18	Fehlend	Fehlend	Fehlend

Tabelle 4: **Der COX Komplex**

Die Tabelle zeigt alle Untereinheiten des COX Komplexes und Assemblierungsfaktoren

3.3.2.4. Untereinheiten der ATP-Synthase

Die Untereinheiten der ATP-Synthase der mitochondrialen Atmungskette sind in Tabelle 5 aufgeführt. Es sind insgesamt verringerte Konzentrationen unter Chloramphenicol-Behandlung zu beobachten. Dabei sind die Untereinheiten der verschiedenen Untergruppen unterschiedlich stark betroffen: der F₀ Sektor

zusammen mit den Untereinheiten des Stator Stiels zeigen die stärkste Verringerung unter Chloramphenicol Behandlung während der F₁ Sektor und der zentrale Stiel weniger betroffen zu sein erscheinen. Auch Atp20 und Tim11/Su e, Komponenten, die für die Dimerisierung der ATP-Synthase notwendig sind, sind betroffen. Ihre Mengen sind sehr stark verringert, was mit der veränderten Morphologie, die in den EM Aufnahmen zu beobachten war, im Einklang ist (siehe 3.2.1). Die Dimerisierung der ATP-Synthase ist notwendig für die Ausbildung der *Cristae* Spitzen. Findet keine Dimerisierung statt, sieht man „onion-like“ und septierte Strukturen.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
ATP Synthase				
F ₀ Sektor	Atp6/subunit a	9,611	NaN	4,5884
	Atp8/subunit 8	Fehlend	Fehlend	Fehlend
	Atp14/subunit h	3,4398	NaN	4,0229
	Atp17/subunit f	16,523	0,17443	11,404
	Atp18/subunit I/j	5,8126	NaN	6,0136
	Atp19/subunit k	Fehlend	NaN	10,919
	Oli1/subunit c	NaN	Fehlend	10,108
F ₁ Sektor	Atp1/subunit α	1,6584	0,87753	1,6306
	Atp2/subunit β	1,6852	0,8874	1,6297
	Atp3/subunit γ	1,792	0,87449	1,5788
	Atp15/subunit ε	1,7501	0,97857	1,8462
Zentraler Stiel	Atp16/subunit δ	1,8581	1,0076	1,6955
Stator Stiel	Atp4/subunit b	5,2176	0,42344	3,663
	Atp5/subunit 5	2,2208	0,68782	1,9792
	Atp7/subunit d	5,7426	0,36025	4,2446
Notwendig für Dimerisierung	Atp20/subunit g	11,053	0,19272	11,595
	Tim11/subunit e	22,676	0,17077	14,265

Tabelle 5: Die mitochondriale ATP-Synthase

3.3.2.5. Mitochondriale Carrier

Auch die mitochondrialen Carrier wurden genauer betrachtet (siehe Tabelle 6). Die Werte für Aac1 variieren stark zwischen den drei SILAC Experimenten, so dass darüber keine zuverlässige Aussage getroffen werden kann. Aac2 und

Aac3 zeigen leicht verringerte Mengen. Beide sind Adenin Nukleotid Transporter in der inneren Membran [83, 84]. Sie transportieren ADP in die Matrix während ATP im Antiport in den Intermembranraum exportiert wird. Die Atmungskette kann unter Chloramphenicol-Behandlung nicht mehr effizient arbeiten, da essentielle Komponenten nahezu fehlen (wie in den vorherigen Abschnitten (siehe 3.2.2., 3.3.2.1., 3.3.2.2., 3.3.2.3., 3.3.2.4.) der Arbeit beschrieben). Somit findet nur noch eine verminderte ATP-Synthese und vermutlich auch ein geringerer Transport von ADP und ATP über die innere Membran statt.

Bei Ymc2 scheint sich die Konzentration zu verdoppeln. Vermutlich spielt Ymc2 eine Rolle bei der Verarbeitung von Ölsäure und der Glutamat Synthese. Möglicherweise kommt es zu einer Umstellung des mitochondrialen Stoffwechsels aufgrund der verminderten Atmungsaktivität unter Chloramphenicol [86].

Bei Pic2 handelt es sich um einen Phosphat und Kupfertransporter. Unter Chloramphenicol-Behandlung ist die ADP-Phosphorylierung durch die ATP-Synthase stark verringert. Daher wird auch weniger anorganisches Phosphat in der Matrix benötigt. Desweiteren transportiert Pic2 Kupfer in die Matrix für dessen Einbau in die Cytochrom-c-Oxidase. Deren Mengen sind aber wie bereits beschreiben (siehe 3.3.2.3) unter Chloramphenicol vermindert, so dass auch geringere Mengen an Kupfer gebraucht werden.

Rim2 transportiert Pyrimidin Nukleosid Triphosphate im Austausch mit Pyrimidin Nukleosid Monophosphaten über die Innenmembran. Diese sind für die DNA und RNA Synthese in den Mitochondrien notwendig. Die Rim2 Mengen bleiben unverändert. Vermutlich beeinflusst die Veränderung der mitochondrialen Translation durch Chloramphenicol die Transkription und

DNA-Replikation in Mitochondrien nicht. Odc1 zeigt zwar im zweiten Experiment eher unveränderte Werte unter Stress, jedoch sieht man erhöhte Mengen im Experiment I und III unter Stressbedingungen. Odc1 ist ein Innenmembranprotein, das den Antiport von α -Ketoacidipat und α -Ketoglutarat über die Innenmembran katalysiert, jeweils für die Lysin Synthese und den Citratzyklus [163]. Erhöhte Mengen von Odc1 kompensieren bekannterweise die verringerte ADP-Phosphorylierung durch die ATP-Synthase, vermutlich auch unter Chloramphenicol Behandlung, durch eine Erhöhung der Substratkettenphosphorylierung [85].

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
Carrier				
Innenmembran	Aac1	0,42222	NaN	1,0965
	Pet9/Aac2/Anc2	1,8358	0,9231	1,7917
	Aac3	NaN	Fehlend	1,9013
	Odc1	1,6614	1,1078	1,8728
	Ymc2	0,49842	1,8181	0,59113
	Pic2	2,777	0,64014	1,8287
	Rim2	0,96113	1,2531	1,0131
Außenmembran	Mir1	Fehlend	Fehlend	Fehlend

Tabelle 6: Die mitochondriale Carrier

3.3.2.6. MICOS Komplex

Der MICOS Komplex spielt eine Schlüsselrolle für die Ultrastruktur der Mitochondrien [18, 19].

Da eine veränderte Ultrastruktur in Elektronenmikroskopaufnahmen beobachtet wurde (s. 3.2.1), stellte sich die Frage, ob davon nur die *Cristaespitzen* oder auch die *Cristae junctions* betroffen sind. Dafür wurde der MICOS Komplex als wesentlicher Bestandteil der *Cristae junctions* genauer betrachtet. Eine Beurteilung der Mengen einzelner MICOS-Untereinheiten ist in unseren

Experimenten schwierig, da die Komponenten stark variierende Werte aufweisen (vgl. Tabelle 7). Den einzigen reproduzierbaren Wert liefert hier Mic60, das in allen Experimenten reduzierte Mengen zeigt. Das steht überraschender Weise im deutlichen Gegensatz zu unseren Beobachtungen mit Western Blot und Immundekoration der der MICOS-Untereinheiten (siehe Abb. 10). Dies wird im Diskussionsteil der Arbeit näher ausgeführt. Die Variationen der detektierten Mengen scheinen für die MICOS-Untereinheiten besonders stark ausgeprägt zu sein. Dies könnte entweder darauf zurückzuführen sein, dass der MICOS-Komplex besonders empfindlich auf Veränderungen bei der Chloramphenicol-Behandlung reagiert oder dass die massenspektrometrische Quantifizierung der MICOS-Untereinheiten durch ihre Proteineigenschaften besonders schwierig ist.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
MICOS				
Auf der IMS Seite der inneren Membran lokalisiert	Mic27	1.5768	0.97708	1.0868
	Mic26	1.2001	1.4948	1.1352
	Mic12	1.6948	1.3929	1.244
	Mic10	1.8572	0.95006	1.6419
	Mic19	1.5303	1.0236	1.3667
	Mic60	1.5812	0.89694	1.5662

Tabelle 7: **Der MICOS Komplex**

3.3.2.7. Die Fusion-Fission-Maschinerie

Bei den Komponenten der Fusions- und Fissionsmaschinerie sind sehr gut aufeinander abgestimmte Veränderungen zu beobachten. Die Fusionskomponenten Mgm1, Fzo1 und Ugo1 zeigen erhöhte Konzentrationen unter Stress durch Chloramphenicol-Behandlung.

Auf der anderen Seite ist bei den Fissionskomponenten die starke Verringerung

der Konzentrationen von Dnm1 und Fis1 unter Stress zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle sieht man eine vier- bis fünffache Reduktion der Proteinmenge von Dnm1. Analog dazu findet man auch Fis1 unter Stress in einer viel geringeren Menge während Mdv1 eher konstant zu bleiben scheint. Die verringerten Mengen von Dnm1 und Fis1 unter Chloramphenicol-Behandlung deuten auf eine geringere Teilungsrate der Mitochondrien im Vergleich zu den Normbedingungen, was im Einklang mit der erhöhten Fusionsrate ist.

Dies deutet darauf hin, dass die Zellen durch mitochondriale Fusion versuchen, den Proteinfaltungstress in den Organellen zu minimieren.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
Fusion-Fission-Komponente				
Fusion	Mgm1	0,79126	1,7132	0,86754
	Fzo1	0,8265	2,3227	1,0364
	Ugo1	0,91935	NaN	0,851
Fission	Mdv1	1,045	3,1907	0,96247
	Fis1	1,4102	Fehlend	1,3712
	Dnm1	4,0087	0,32165	5,8737

Tabelle 8: **Fusion-Fission-Maschinerie**

Die Tabelle zeigt die Komponente, die für die Fusion und/oder Fission notwendig sind.

3.3.2.8. Mitochondriale Proteasen

Die Veränderungen der Proteinkonzentrationen mitochondrialer Proteasen wurden untersucht, da ihnen eine wesentliche Rolle bei dem Abbau falsch gefalteter Proteine zukommt. Während sämtliche aufgelistete Proteasen in den Experimenten I und III nahezu unveränderte Mengen unter Stressbedingungen aufzuweisen scheinen, sind ihre Mengen Experiment II durchweg erhöht.

Mas1 und Mas2 sind die beiden essentiellen Untereinheiten der *Matrix*

processing peptidase, die für die Abspaltung der Signalpeptide mitochondrialer TIM23-Substrate notwendig sind. Die erhöhte Menge deutet auf eine erhöhte Prozessierungsrate neu importierter Proteine hin, möglicherweise auch um so der Akkumulation ungefalteter Proteine entgegen zu wirken.

Falsch gefaltete Proteine in der Matrix werden durch die ATP-abhängige Pim1 Protease abgebaut, die jedoch durch alle drei SILAC Experimente unkonstante Werte zeigt, so dass zu der Veränderung der Pim1-Expression in Anwesenheit von Chloramphenicol hier leider keine eindeutige Aussage gemacht werden kann.

In der Innenmembran existieren zwei Gruppen von AAA-Proteasen, die in m- und i-AAA Proteasen unterteilt sind (m steht für Matrix und i für Intermembranraum, die Zuordnung erfolgt nach der Orientierung des katalytischen Zentrums). Yta12 bildet ein Heterooligomer mit Afg3/Yta10 und ist eine m-AAA Protease. Yme1 bildet Homooligomere und ist eine i-AAA Protease. Beide Komplexe bauen ungefaltete Proteine ab. Yme1 kann zusätzlich auch eine Chaperonfunktion ausüben. Sie sind in Experiment II in erhöhten Mengen zu finden und etwas weniger stark ausgeprägt in Experiment I während sie in Experiment III unverändert bleiben. Die Erhöhung der Menge unter Stressbedingungen deutet auf einen erhöhten Bedarf an Proteasen bei Stress durch Akkumulation ungefalteter Proteine hin.

Mgr1 und Mgr3 interagieren mit Yme1 und arbeiten zusammen mit der i-AAA Protease, indem sie Substrate binden und Yme1 zuführen. Beide sind in allen drei SILAC Experimenten unter Stress leicht erhöht. Die ungefalteten Proteine werden so vermutlich verstärkt gebunden und abgebaut.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
Proteasen und assoziierte Untereinheiten				
Proteasen	Mas1	1,0223	1,4054	0,99002
	Mas2	0,88169	1,5942	0,99209
	Pim1	1,0284	1,5437	1,3203
	Yta12	0,96389	1,6136	0,99961
	Pcp1	Fehlend	Fehlend	Fehlend
	Afg3	0,95502	1,1567	0,9897
	Yme1	0,94682	1,4462	1,0209
assoziierte Untereinheiten	Mgr1	0,88576	1,2868	0,95115
	Mgr3	0,98099	1,2656	0,97782

Tabelle 9: **Mitochondriale Proteasen**

3.3.2.9. Mitochondriale Chaperone

Auch mitochondriale Chaperone wurden näher betrachtet, da diese die Konformation von ungefalteten Proteinen ändern können und somit eine wesentliche Rolle bei der mtUPR spielen. Interessanterweise wurde bei dem zuvor als wichtiges Zielgen beschriebenen *HSP60* eine Erhöhung der Konzentration unter Stress nur im zweiten SILAC Experiment beobachtet, während die kleinen Intermembranraumchaperone Tim9, Tim10 und Tim13 Proteine eher eine Erhöhung der Konzentration unter Stressbedingungen durch Chloramphenicol zeigen. Diese sind im Intermembranraum tätig und sorgen für die korrekte Faltung der Proteine beim Transport. Dies scheint vor allem unter Stressbedingungen durch ungefaltete Proteine eine wichtige Rolle zu spielen, möglicherweise für den notwendigen erhöhten Import von weiteren Proteinen. Die verschiedenen Ergebnisse bezüglich der Hsp60-Konzentrationen in den SILAC Experimenten sind nicht eindeutig zu erklären.

Mge1, der Nukleotidaustauschfaktor für Ssc1/mtHsp70, der für die Lösung des Substratproteins von Hsp70 zuständig ist, findet man in erhöhter Konzentration

unter Stress, während Mdj1 konstant zu sein scheint. Ssc1/mtHsp70 selbst wurde in der SILAC Untersuchung nicht gefunden. Eine zügige Ablösung der Substrate nach Überführung in die richtige Konformation von Ssc1/mtHsp70 scheint bei Stress durch ungefaltete Proteine sinnvoll zu sein, um dadurch die Faltungsrage zu erhöhen.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
Chaperone und assoziierte Proteine				
Chaperone	Hsp60	0,96842	1,4602	0,97266
	Tim9	NaN	NaN	0,7698
	Tim10	0,62406	2,5744	0,7488
	Tim13	0,96308	1,5407	0,89169
assoziierte Proteine	Mge1	0,99318	1,6166	0,63663
	Mdj1	0,97132	1,1007	0,91296

Tab. 10: Chaperone und Co-Chaperone

3.3.2.10. Proteintranslokasen

Auch Komponenten, die beim Proteinimport eine Rolle spielen, zeigten Veränderungen. Fast alle Proteine des TOM Komplexes der Außenmembran zeigten eine erhöhte Konzentration unter Chloramphenicol-Behandlung. Dies gilt auch für den TIM23 Komplex der Außenmembran und für den TIM22 Komplex der Innenmembran. Als einzige Proteine zeigten Tom70 und Tim21 eine unveränderte Konzentration. Die Erhöhung der Konzentrationen unter Chloramphenicol-Behandlung deutet vor allem auf eine erhöhte Bereitschaft zum Proteinimport hin.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
Proteintranslokasen				
TOM Komplex	Tom40	0,9129	1,4929	0,86131
	Tom22	0,82444	2,0925	0,61064
	Tom7	0,92256	1,5456	0,88361
	Tom6	NaN	1,7764	0,76773
	Tom5	NaN	NaN	0,90113
	Tom20	0,94821	1,8967	0,70879
	Tom70	1,0052	1,2606	1,0039
TIM23 Komplex	Tim23	0,82698	1,4186	0,75319
	Tim17	0,957	NaN	0,93817
	Tim50	0,85156	1,278	0,85668
	Tim21	1,175	1,0531	1,017
TIM22 Komplex	Tim22	0,76236	NaN	0,71068
	Tim54	0,87497	1,0664	0,95316
	Tim18	0,9175	NaN	0,92086
	Tim10	0,62406	2,5744	0,7488
	Tim12	0,70491	1,9958	0,79388

Tab. 11: **Proteintranslokasen**

Die Tabelle zeigt Proteintranslokasen der Außenmembran (TOM Komplex und Tim23 Komplex) und diese der Innenmembran (TIM22 Komplex)

3.3.2.11. Glycin Decarboxylase Komplex

Ein Enzymkomplex, der bei der Auswertung der Massenspektrometriedaten der SILAC-Experimente auffiel, ist der Glycin Decarboxylase Komplex (Glycin Cleavage Complex, GDC). Bei der Auswertung der Ergebnisse war eine starke Erhöhung der Bestandteile Gcv1, Gcv2 und Gcv3 unter Chloramphenicol-Behandlung zu beobachten. Der Komplex katalysiert die Umsetzung von Glycin zur aktivierten „one-carbon unit“ 5,10-methylene-tetrahydrofolate (5,10-CH₂-H₄folate). Dieser Schritt liegt einer großen Anzahl zellulärer Prozesse zugrunde, einschließlich der Methylgruppenbiogenese und der Synthese von Nukleotiden, Vitaminen und einigen Aminosäuren. Darüber, inwiefern der Glycin Decarboxylase Komplex eine Rolle bei der mtUPR spielt, kann man nur spekulieren. Möglicherweise ist die Aktivierung dieses Komplexes Grundlage der zahlreichen zuvor genannten zellulären Prozesse weitere biochemische

Mechanismen zum Schutz der Zelle, die bei der Diskussion näher erläutert werden.

Gruppe	Protein Name	Ratio H/L SILAC I	Ratio H/L SILAC II	Ratio H/L SILAC III
		Light Kultur gestresst	Heavy Kultur gestresst	Light Kultur gestresst
GDC				
	Gcv1	0,26588	2,5501	0,25093
	Gcv2	0,30753	3,4457	0,34197
	Gcv3	0,53191	2,6206	0,90036

Tab. 12: Glycin Decarboxylase Komplex (GDC)

3.3.3. Vergleich der Proteinverhältnisse in den Western Blots und den SILAC Ergebnissen

Beim Vergleich der Ergebnisse, die wir mittels Western Blot bzw. massenspektrometrischer Analysen erhalten haben, fiel auf, dass sich die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden, obwohl auf dieselbe Probe angewandt, zum Teil stark voneinander unterscheiden. In Abbildung 11 ist exemplarisch der Vergleich zwischen Western Blot und Massenspektrometrie der SILAC II Daten dargestellt. Die Intensität der Banden auf den Western Blots wurde mittels des Programms Image Processing and Analysis in Java (ImageJ) quantifiziert und das Verhältnis der Proteinmengen wurde mit den in den SILAC Experimenten ermittelten Verhältnissen zwischen den unbehandelten und den mit Chloramphenicol gestressten Kulturen verglichen. Man sieht teilweise sehr große Unterschiede in den absoluten Werten, erkennt aber eine Tendenz der Änderung. Für einige Proteine entsprechen die Veränderungen in den Western Blots denen der massenspektrometrischen Analysen (Tim50, Mgm1, Mic27, Mic10). Bei anderen ist zumindest die gleiche Tendenz der Veränderung zu beobachten (Mic12, Tom70, Tom7, Tim23, Tom20, Yme1). Andere Proteine zeigen im Western Blot zwar erhöhte Mengen,

dies ist aber nicht in Übereinstimmung mit denen für sie massenspektrometrisch ermittelten Werten (Mic60). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Ergebnissen sind nicht endgültig zu erklären. Es sind beides etablierte Verfahren mit spezifischen Vor- und Nachteilen. Bekannterweise werden hydrophobe Proteine massenspektrometrisch nur unzuverlässig detektiert, was zu abweichenden Ergebnissen führen kann. Denkbar sind auch Faktoren wie der Abbau von Proteinen bei der Aufbereitung der Proben. Es ist schwierig zu sagen, welches Verfahren zuverlässiger ist.

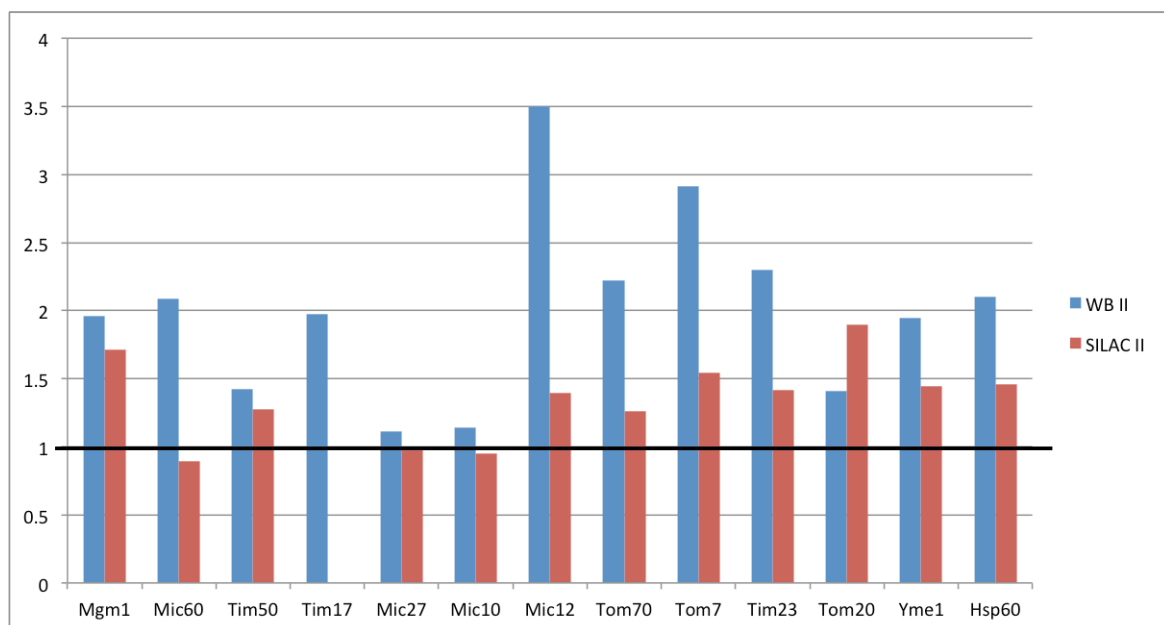


Abb. 11: Vergleich der Ergebnisse aus den Western Blot Experimenten und den massenspektrometrischen Analysen mit den Proben aus dem zweiten SILAC-Experiment (SILAC II)
 Die blauen Balken stellen die Western Blot Ergebnisse aus Abb. 10 und die roten Balken die Ergebnisse von der massenspektrometrischen Untersuchung des SILAC II Experiments dar. Die Western Blots aus wurden eingescannt, wurden dann mit Hilfe des Programms Image Processing and Analysis in Java (ImageJ) die einzelnen Signale quantifiziert und ein Verhältnis der Intensität wurde errechnet. Dies wurde den massenspektrometrisch ermittelten Werten gegenüber gestellt. Zur Verdeutlichung einer Änderung des Proteinkonzentrationen wurde bei 1 (keine Veränderung unter Chloramphenicol) eine schwarze Linie gelegt.

4. Diskussion

4.1. Die mtUPR in Hefe

Die mtUPR wurde bisher in *C. elegans* [109, 111, 146] und in Säugerzellen [123, 145] genauer untersucht, jedoch lagen am Anfang der Arbeit keine Untersuchungen zur mtUPR in Hefe vor. Wir haben, um die mtUPR in Hefezellen zu induzieren, diese in Gegenwart von Chloramphenicol angezogen und die Zellen bzw. Mitochondrien auf eine Reaktion ausgelöst durch Proteinfaltungsstress untersucht. Chloramphenicol inhibiert die Synthese der mitochondrial kodierten Proteine, worunter hauptsächlich Kernuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe sind. Überprüft wurde die Wirkung von Chloramphenicol anhand der Konzentration von Cox2, einem mitochondrial codierten Protein, in den behandelten Zellen bzw. Mitochondrien.

Neben einer Reduktion der Cox2-Konzentration konnten unter Chloramphenicolbehandlung auch verringerte Mengen einiger nukleär codierter Atmungskettenuntereinheiten wie z.B. Rip1 unter Chloramphenicolbehandlung beobachtet werden. Ob dies allerdings auf eine gezielte Reduktion ihrer Synthese oder auf erhöhte Instabilität zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Immundekorationen von Proteinen in Zellextrakten und isolierten Mitochondrien konnten eine weiterreichende Reaktion der Zelle auf die Inhibierung der mitochondrialen Proteinsynthese zeigen. Die Auswahl der untersuchten Proteine erfolgte anhand der Literaturrecherche nach Komponenten, die an der Qualitätskontrolle der Mitochondrien beteiligt sind. In den Immundekorationen zeigte sich eine Konzentrationserhöhung der Chaperone Hsp60 und Hsp70, die für die korrekte Faltung der Proteine in Stresssituationen sorgen [46]. Zudem zeigte sich eine Erhöhung der Konzentration der Protease Yme1, die ihr katalytisches Zentrum im IMS hat.

Über Chaperone im IMS ist bislang wenig bekannt, jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass Yme1 in seiner Funktion bei der Qualitätskontrolle auch bei der Faltung von Proteinen mitwirkt [164]. Die Erhöhung der Konzentration von Chaperonen wie Hsp60 und der Proteasen wie Yme1 ist ein guter Hinweis auf eine Induktion der mtUPR in Hefe.

4.2. Veränderung des Proteinimports

Die Unterschiede der Proteinkonzentrationen zwischen Stress- und Normbedingungen ließen interessante Beobachtungen zu. Die Proteine, die für den Import der nukleär kodierten Proteine zuständig sind, waren unter Stress in erhöhter Konzentration vorhanden. In der Außenmembran befindet sich der TOM Komplex, der für das Mitochondrium bestimmte nukleär kodierte Proteine erkennt und anschließend über die Außenmembran schleust [47]. Die einzelnen Rezeptoren Tom20, Tom22 und Tom70 zeigen sehr hohe Konzentrationen unter Chloramphenicol. Auch für die Pore selbst, zu der Tom40 und Tom7 zählen, wurde dies beobachtet. Auch Tim23 und Tim17, die die Pore vom TIM23-Komplex bilden, und Tim50, die Verbindung zwischen TOM und TIM23, sind in erhöhten Konzentrationen zu finden.

Das legt die erhöhte Bereitschaft der Mitochondrien nahe, größere Mengen an Proteinen zu importieren.

Ob es sich hierbei dann aber um einen spezifischen Import von mtUPR-Zielkomponenten handelt und der Import weiterer Atmungskettenkomponenten unterdrückt ist oder aber diese Unterscheidung auf einer anderen Ebene z.B. der Proteinsynthese erfolgt, konnte hier nicht geklärt werden.

Die Importmechanismen beschränken sich aber nicht nur auf die TIM und TOM Komplexe. Es sind darüber hinaus andere Helferproteine notwendig. Das Chaperon mtHsp70/Ssc1 spielt nicht nur bei der Proteinfaltung, sondern auch

beim Import selbst eine entscheidende Rolle und zeigt eine erhöhte Konzentration unter Chloramphenicol. Darüber hinaus wurde sogar für das Ssc1-Chaperon Hep1 eine höhere Konzentration detektiert [165]. Hitzeschockproteine schützen die Zelle vor verschiedenen Arten von Stress, indem sie Proteine binden um eine Aggregation dieser zu verhindern oder um missgefaltete Proteine in die korrekte Form zu überführen. Ob mtHsp70/Ssc1 hier vor allem erhöht ist, um den Import zu stimulieren, seiner Funktion als Faltungshelfer verstärkt nachkommt oder beides in gleichem Maße, wäre hier sehr interessant zu untersuchen. Dazu könnten weiterführende Untersuchungen der Interaktionspartner der Chaperone unter Proteinfaltungstress angestrebt werden. Ein weiterer Ansatz zur Auslösung und Untersuchung der mtUPR könnte auch die Depletion bestimmter Proteine sein. Ein Beispiel wird dazu im Folgenden genauer diskutiert.

4.3. Mögliche Rollen von Yme1 in der mtUPR

Ein weiteres Protein mit erhöhten Konzentrationen unter Chloramphenicolbehandlung ist die i-AAA Protease Yme1. Außer der proteolytischen Funktion wurde über eine zusätzliche Funktion als Chaperon für IMS-Proteine berichtet. Bei *yme1* Mutanten findet man eine höhere Neigung der Aggregation der Proteine zu aggregieren [164]. Zudem wurde in einer weiteren Arbeit mit *yme1* Mutanten eine Hochregulation der Transkription verschiedenen Gene im Vergleich zu Normbedingungen im Sinne einer Stressantwort festgestellt [124]. Zahlreiche Kandidaten aus dieser Arbeit stimmten mit unseren Ergebnissen überein, wie z.B. die erhöhte Transkription der Fusionskomponenten Ugo1 und Fzo1, der Protease Mas2 oder des kleinen Intermembranraumchaperons Tim9. Jedoch gibt es auch Unterschiede wie bei den Proteasen Afg3 und Mas1, die eine erhöhte Konzentration bei *yme1* Mutanten zeigten, aber in dieser Arbeit eine verringerte Konzentration unter

Chloramphenicolbehandlung aufwiesen. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass in dem einen Fall die Untersuchung des Transkriptoms, in unserem Fall aber die des Proteoms vorliegt. Unterschiede auf Proteinebene könnten auch durch veränderte Stabilität der Proteine selbst verursacht werden. Eine Proteomanalyse der *yme1* Mutante könnte aber ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der mtUPR sein.

Eine zusätzliche Möglichkeit nach weiteren mtUPR-Faktoren zu suchen, könnte eine Verstärkung der mitochondrialen Dysfunktion sein. Zum Beispiel wurde in der bereits erwähnten Arbeit von Arnold et al. [124] neben *Yme1* der Peptidtransporter *Mdl1* der inneren Membran deletiert, um eine Verstärkung des Effektes im Vergleich zum Wildtyp zu erreichen. Hier muss man allerdings anmerken, dass die zusätzliche Deletion von *Mdl1* keinen verstärkenden Effekt auf die Transkription der für uns interessanten Zielgene hatte. Es ist aber grundsätzlich denkbar, dass eine stärkere Induktion der mtUPR bei *yme1* Mutanten unter Chloramphenicolbehandlung zu sehen sein könnte.

Eine weitere Möglichkeit, die mtUPR auch spezifisch in der Matrix oder im IMS zu untersuchen, könnte die Expression eines faltungsdefizienten Proteins Dihydrofolatreduktase unter verschiedenen mitochondrialen Sortierungssignalen sein [166, 167]. In Studien mit humanen Zelllinien wurde bereits eine spezifische mtUPR festgestellt, die durch ungefaltete Proteine im IMS ausgelöst wird [122].

4.4. Mitochondriale Ultrastruktur und Morphologie

In dieser Arbeit wurde auch die mitochondriale Ultrastruktur in Anwesenheit von Chloramphenicol untersucht. Wir konnten die Ausprägung verschiedener *Cristae* Phänotypen beobachten. Einerseits überwiegen unter Kontrollbedingungen im YPGal-Medium wildtypische *Cristae*, die sich als

zahlreiche kleine Einstülpungen der Innenmembran ohne Kontakt zur Gegenseite darstellen. Andererseits sind unter Chloramphenicol vermehrt septierte, elongierte und *onion-like* Typen zu beobachten. Um dies zu verstehen, betrachten wir die Konzentrationen bestimmter Untereinheiten der Atmungskette. Es ist bekannt, dass die Dimerisierung der ATP-Synthase für die Ausbildung der *Cristae* Spitzen notwendig ist [16, 17]. In unseren SILAC Ergebnissen konnte unter Chloramphenicolbehandlung eine verminderte Konzentration von Tim11/Su e beobachtet werden. Dies führt zu einer geringeren Dimerisierung der ATP-Synthase, was zu einer vermehrten Septierung der Mitochondrien führt.

Die Verbindungen zwischen dem externen Intermembranraum und dem *Intracristae*-Raum heißen *Cristae Junctions*. Von der Innenmembran spannt sich hier der MICOS Komplex zur Außenmembran hin um mit ihr zu interagieren [19]. In dieser Arbeit zeigten in Immundekorationen die Einheiten Mic60, Mic29, Mic10, Mic12 erhöhte Konzentrationen. Da sie verantwortlich für die Ausbildung der *Cristae Junctions* sind, könnte man vermuten, dass die Erhöhung durch die vermehrte Septierung bedingt ist, die auch die Erhöhung der Menge an *Cristae Junctions* zur Folge hat. Da sich in unserem Ansatz Depletion von Su e nicht von der Depletion weiterer Kernuntereinheiten der Atmungsketten-komplexe voneinander trennen lässt, ist es nicht möglich zu sagen, inwieweit die mtUPR selbst die mitochondriale Ultrastruktur beeinflusst.

In den Untersuchungen konnten wir auch beobachten, dass die mitochondrialen Fusionskomponenten Mgm1, Fzo1 und Ugo1 in Gegenwart von Chloramphenicol erhöhte Konzentrationen aufwiesen. Die mitochondriale Morphologie wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht genauer untersucht. Eine mögliche verstärkte Fusion könnte der Kompensation von Stress durch Akkumulation ungefalteter Proteine dienen, indem die Zelle

versucht, sie auf eine möglichst große mitochondriale Masse zu verteilen. Aber auch die fehlende Expression der mitochondrial codierten Proteine könnte ein Signal für die Dysfunktion mitochondrialer Kompartimente darstellen und somit zur Induktion von Fusionsvorgängen führen.

4.5. Die mitochondriale Atmungskette

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Mitochondrien nach Chloramphenicol-Behandlung konnte eine veränderte Ultrastruktur festgestellt werden. Ein Großteil der *Cristae* war elongiert oder septenförmig. Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen zeigte, dass einige Untereinheiten der ATP-Synthase eine verringerte Konzentration aufwiesen. Dabei waren vor allem die Proteine interessant, die für die Dimerisierung des Komplexes notwendig sind. Man findet geringere Mengen von Su e/Atp21 und Su g/Atp20, was die in 3.2.1 erwähnte abnormale Morphologie der *Cristae* erklärt [168]. Ob die veränderte Ultrastruktur allein auf die fehlende Dimerisierung der ATP-Synthase zurückzuführen ist oder teilweise auch durch die mtUPR induziert wird, bleibt offen. Um dies genauer zu klären, müssten ebenfalls andere Methoden zur Induktion der mtUPR etabliert werden, die die Komposition der Atmungskettenkomplexe nicht beeinflussen.

Andere Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe III und IV kommen unter Chloramphenicol Behandlung ebenfalls in geringeren Konzentrationen vor. Cob, Cox1 und Cox2 sind mitochondrial kodiert und werden unter diesen Bedingungen nicht oder kaum noch in den Mitochondrien synthetisiert. Aber auch Untereinheiten, die nukleär kodiert sind, sind in geringerer Konzentration zu finden, was für eine Anpassung ihrer Synthese an die Verfügbarkeit der anderen Untereinheiten spricht. Interessanterweise beschränkt sich diese Koordination nicht nur auf einen Komplex, sondern scheint die gesamte

Atmungskette zu umfassen: die NADH Dehydrogenase, die bei Hefe nur aus nukleär kodierten Untereinheiten besteht, ist unter Chloramphenicol-Behandlung auch in verringerter Konzentration zu finden. Eine solche Anpassung ist auch als Schutzfunktion denkbar, um die Produktion der Sauerstoffradikale zu minimieren. Diesen Effekt konnte man zum Beispiel auch bei menschlichen Zellen beobachten [169]. Dabei nimmt die Zelle eine verringerte Energieproduktion in Kauf um sich vor schädlichen Sauerstoffradikalen zu schützen.

Sogenannte ρ^0 -Zellen, die keine mitochondriale DNA und mitochondrial kodierte Proteine besitzen, sind bei Hefe überlebensfähig. Interessant wäre zu untersuchen, inwieweit die mtUPR bei diesen Zellen eine Rolle spielt. Einzelne Untersuchungen menschlicher ρ^0 -Zellen haben eine Erhöhung der Konzentrationen der Proteasen und Chaperone und eine Verlangsamung der Proteinimportmaschinerie und Proteinsynthese gezeigt, vermutlich um die Mitochondrien zu entlasten [169, 170].

4.6. Fusion und Fission

Auch die mitochondrialen Fusions- und Fissionskomponenten wurden in den SILAC Experimenten untersucht. Die Fusionskomponenten Mgm1, Ugo1 und Fzo1 zeigten alle eine erhöhte Konzentration unter Stress durch Chloramphenicol. Die Fissionskomponenten hingegen zeigten unterschiedliche Reaktionen. Während Dnm1 und Fis1 eine verringerte Konzentration aufwiesen blieb Mdv1 interessanterweise entweder unverändert oder war eher in erhöhter Konzentration zu finden. In letzter Zeit ist die Rolle der mitochondrialen Fusion und Fission bei der Qualitätssicherung in der Zelle immer weiter in den Mittelpunkt gerückt. In neuesten Studien wurden zahlreiche Verbindungen zwischen den Fusions- und Fissionsprozessen und denen der Apoptose und

Mitophagie festgestellt [171]. Außerdem konnten auch Erkrankungen mit Mutationen in den Fusions- und Fissionskomponenten assoziiert werden [171-174]. Die Mitochondrien können bestimmten Stress zum Teil durch ihre Fusion überwinden. Proteine, die dafür verantwortlich sind, weisen demnach erhöhte Konzentrationen auf. Möglicherweise soll die Umverteilung der ungefalteten Proteine zur Beseitigung der Stressquelle führen.

Wenn kein Stressabbau möglich ist, könnte die Fission ausgelöst werden, die dafür sorgt, dass geschädigte Mitochondrien entfernt werden. Dabei müssten aber die ungefalteten Proteine asymmetrisch verteilt werden. Ähnliche Situationen sind zum Beispiel bei Bakterien [175] und Säugetierzellen [176] beobachtet worden, bei denen es zu einer asymmetrischen Verteilung von Aggregaten kommt. Es wäre in Zukunft interessant zu klären, inwiefern dies bei Hefe eine Rolle spielt und ob Mitochondrien, die bei Stress durch ungefaltete Proteine irreversibel geschädigt wurden, tatsächlich selektiv entfernt werden. Aggregierende Proteine könnten dabei mit einem fluoreszierenden Marker markiert werden und unter dem Mikroskop über eine gewisse Zeit unter Norm- und Stressbedingungen beobachtet werden. Beim Auslösen der mtUPR unter den von uns gewählten Bedingungen scheint aber die Fusion und somit die Rettung des Organells im Vordergrund zu stehen.

4.7. Glycin Decarboxylase Komplex

Konsistent bei allen massenspektrometrischen Untersuchungen war die stark erhöhte Konzentration aller Komponenten des Glycin Decarboxylase Komplexes. Der Komplex spielt eine Rolle bei der Glycinverarbeitung und dem Ein-Kohlenstoff Metabolismus, aber unter Umständen auch bei der Glycinsynthese [132, 177, 178]. Ein erhöhter Glycinumsatz unter Chloramphenicolbehandlung führt zu einer Aktivierung des Ein-Kohlenstoff Metabolismus, der zu einer erhöhten Purinsynthese führt. Dies könnte helfen,

wichtige Moleküle wie zum Beispiel RNA, DNA, AMP, ADP oder ATP, die im Rahmen der Stressantwort des Mitochondriums benötigt werden, zu synthetisieren. Außerdem führt Chloramphenicol zu einer Repression der Kernuntereinheiten der Atmungskette. Bisher wurde aber kein direkter Zusammenhang mit der mtUPR hergestellt und es wäre interessant zu überprüfen, ob der Komplex auch bei anderen Induktionsmechanismen der mtUPR eine erhöhte Konzentration zeigt.

4.8. Unterschiede zwischen Western Blot und massenspektrometrischen Analysen der SILAC Experimente

Erste Beobachtungen von Veränderungen des Mitochondrienproteoms basierten auf Western Blot Analysen. Da wir bei dieser Methode auf die Proteine beschränkt waren, gegen die Antikörper vorhanden sind, sollten umfangreichere auf SILAC-Technik basierende massenspektrometrische Analysen gestresster Mitochondrien durchgeführt werden. Western Blot Analysen wurden von denselben Mitochondrien wie die massenspektrometrischen Untersuchungen angefertigt. Überraschenderweise lieferten beide Methoden zum Teil übereinstimmende, aber zum Teil auch gegensätzliche Befunde. Es existieren drei Datensätze basierend auf drei unabhängigen Experimenten nach der SILAC-Methode. Variationen zwischen diesen drei Experimenten können durch eine möglicherweise inkonsistente Durchführung des Experiments erklärt werden. Zum Beispiel könnten abweichende ODs der Zellkulturen oder auch unterschiedliche Behandlungszeiten mit Chloramphenicol zu leichten Abweichungen in der Proteinexpression führen. Erstaunlicher ist aber die Diskrepanz zwischen Resultaten, die anhand verschiedener Methoden zur Analyse derselben Mitochondrien angewandt wurden. MICOS Komponenten zeigen in den massenspektrometrischen Analysen eher eine geringere Konzentration unter Stress, was im Widerspruch zu einer Erhöhung in den Western Blot Analysen steht. Während die mitochondriale Protease Yme1 in

den Western Blot Analysen durchweg eine erhöhte Konzentration zeigte, konnte dies nur in einer der drei massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigt werden. Die Unterschiede in den verschiedenen Verfahren werfen neue Fragen auf. Von 2002 bis heute etablierten sich sowohl das SILAC Verfahren zusammen mit der Massenspektrometrie für die Untersuchung von Proteomen als auch das noch ältere Western Blot Verfahren (1979) [179]. Für die Arbeit wurden standardisierte Protokolle (siehe Kapitel Material und Methoden) und dieselben Mitochondrien für beide Verfahren eingesetzt. Es ist schwierig zu sagen welches Verfahren hier das zuverlässigere ist, aber mit beiden Analysemethoden wird deutlich, dass es zu einer Veränderung der Proteinkonzentrationen unter Stressbedingungen kommt.

4.9. Zusammenfassung

Mitochondrien müssen die Expression nukleär und mitochondrial kodierter Proteine eng miteinander koordinieren, um der Zelle einen möglichst großen Nutzen zu erweisen. Dieser Prozess unterliegt einer strengen Kontrolle, da ständig un- oder missgefaltete Proteine akkumulieren können. Übersteigt die Menge der ungefalteten Proteine die Kapazität der Chaperone wird die mtUPR ausgelöst. Dies ist vermutlich die erste Reaktion der Mitochondrien, die die Funktionalität der Organelle erhalten soll. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich erstmalig mit der Reaktion der Mitochondrien in Hefe auf Stressbedingungen ausgelöst durch Chloramphenicol. Die Effekte der Chloramphenicolbehandlung wurden auf verschiedenen Ebenen analysiert. Der Großteil dieser Arbeit umfasst den Vergleich des mitochondrialen Proteoms unter Norm- und Stressbedingungen mit Hilfe von Western Blot und massenspektrometrischen Analysen. Desweiteren wurde die mitochondriale Ultrastruktur unter den genannten Bedingungen elektronenmikroskopisch untersucht. Wir konnten beobachten, dass die Inhibierung der mitochondrialen

Translation durch Chloramphenicol zahlreiche Veränderungen zur Folge hat, wie die erhöhte Expression von Proteasen und Chaperonen, aber auch die Verstärkung mitochondrialen Importsysteme oder eine Umstellung des mitochondrialen Metabolismus oder der Dynamik. Allerdings unterliegen dabei die Mitochondrien auch einer Veränderung auf Ebene der Ultrastruktur. Es kommt vermehrt zu einer Septierung der Mitochondrien, der Ausbildung elongierter *Cristae* und sogar zu „onion like“- Formen. Überraschenderweise mussten wir auch feststellen, dass verschiedene Methoden zur Analyse des mitochondrialen Proteoms zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Diese Diskrepanz sollte grundsätzlich in zukünftigen Untersuchungen aufgelöst werden. Außerdem sind wir zu der Erkenntnis gekommen, dass zur abschließenden Klärung vieler Beobachtungen auch die Etablierung einer zusätzlichen Methode zur Induktion der mtUPR notwendig ist.

5. Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AAA	ATPases Associated with diverse cellular Activities
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CAP	Chloramphenicol
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein
COX	Cytochrom-c-Oxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERα	Östrogenrezeptor Alpha
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GDC	Glycin Cleavage Complex
GTP	Guanosintriphosphat
g	Gramm
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IMS	Intermembranraum

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
M	Mol pro Liter
mA	Milliampère
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MICOS	Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System
mM	Millimol pro Liter
MPP	Matrix Processing Peptidase
MS	Massenspektrometrie
mtDNA	Mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
MTS	mitochondriales
mtUPR	<i>Mitochondrial Unfolded Protein Response</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NLS	Nukleäres Sortierungssignal
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rounds per Minute

s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC-Medium	Synthetisches Vollmedium
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SILAC	Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture
TCA	Thichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethyl-ethyendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3,-propandiol
TOB	<i>Translocase of the Outer mitochondrial Membrane for Beta-barrel proteins</i>
TOM	<i>Translocase of the Outer mitochondrial Membrane</i>
U	Einheiten
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Massenkonzentration
WT	Wildtyp

6. Literaturverzeichnis

1. Shpilka, T. and C.M. Haynes, *The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017.
2. Chinnery, P.F., *Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new?* EMBO Mol Med, 2015. **7**(12): p. 1503-12.
3. Degli Esposti, M., et al., *Evolution of mitochondria reconstructed from the energy metabolism of living bacteria*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96566.
4. Brown, J.R. and W.F. Doolittle, *Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(4): p. 456-502.
5. Kurland, C.G. and S.G.E. Andersson, *Origin and Evolution of the Mitochondrial Proteome*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 786-820.
6. Scarpulla, R.C., R.B. Vega, and D.P. Kelly, *Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(9): p. 459-66.
7. Saraste, M., *Oxidative phosphorylation at the fin de siecle*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1488-93.
8. Brandt, U., *Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 69-92.
9. Luttkik, M.A., et al., *The Saccharomyces cerevisiae NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24529-34.
10. Rutter, J., D.R. Winge, and J.D. Schiffman, *Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease*. Mitochondrion, 2010. **10**(4): p. 393-401.
11. Kregiel, D., *Succinate Dehydrogenase of Saccharomyces Cerevisiae-The Unique Enzyme of TCA Cycle-Current Knowledge and New Perspectives*. 2012: INTECH Open Access Publisher.
12. Hunte, C., H. Palsdottir, and B.L. Trumpower, *Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex*. FEBS Lett, 2003. **545**(1): p. 39-46.
13. Brandt, U., et al., *Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the Saccharomyces cerevisiae cytochrome bc1 complex*. J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 12947-53.
14. Herrmann, J.M. and S. Funes, *Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane*. Gene, 2005. **354**: p. 43-52.
15. Pebay-Peyroula, E., et al., *Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside*. Nature, 2003. **426**(6962): p. 39-44.
16. Paumard, P., et al., *The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology*. EMBO J, 2002. **21**(3): p. 221-30.
17. Minauro-Sanmiguel, F., S. Wilkens, and J.J. Garcia, *Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12356-8.
18. Pfanner, N., et al., *Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system*. J Cell Biol, 2014. **204**(7): p. 1083-6.
19. Harner, M., et al., *The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture*. EMBO J, 2011. **30**(21): p. 4356-70.
20. Okamoto, K. and J.M. Shaw, *Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes*. Annu Rev Genet, 2005. **39**: p. 503-36.
21. Dimmer, K.S. and L. Scorrano, *(De)constructing mitochondria: what for?* Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 233-41.
22. Burgess, S.M., M. Delannoy, and R.E. Jensen, *MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast*

- mitochondria*. J Cell Biol, 1994. **126**(6): p. 1375-91.
23. Sogo, L.F. and M.P. Yaffe, *Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane*. J Cell Biol, 1994. **126**(6): p. 1361-73.
 24. Berger, K.H., L.F. Sogo, and M.P. Yaffe, *Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast*. J Cell Biol, 1997. **136**(3): p. 545-53.
 25. Youngman, M.J., et al., *Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids*. J Cell Biol, 2004. **164**(5): p. 677-88.
 26. Dimmer, K.S., et al., *Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast*. J Cell Biol, 2005. **168**(1): p. 103-15.
 27. Mozdy, A.D. and J.M. Shaw, *A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 468-78.
 28. Wong, E.D., et al., *The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 341-52.
 29. Zick, M., et al., *Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion*. FEBS Lett, 2009. **583**(13): p. 2237-43.
 30. Delettre, C., et al., *Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 207-10.
 31. Otsuga, D., et al., *The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast*. J Cell Biol, 1998. **143**(2): p. 333-49.
 32. Mozdy, A.D., J.M. McCaffery, and J.M. Shaw, *Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 367-80.
 33. Griffin, E.E., J. Graumann, and D.C. Chan, *The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria*. J Cell Biol, 2005. **170**(2): p. 237-48.
 34. Tieu, Q. and J. Nunnari, *Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 353-66.
 35. Tieu, Q., et al., *The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission*. J Cell Biol, 2002. **158**(3): p. 445-52.
 36. Cervený, K.L. and R.E. Jensen, *The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(10): p. 4126-39.
 37. Smirnova, E., et al., *Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(8): p. 2245-56.
 38. James, D.I., et al., *hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36373-9.
 39. Alexander, N.J., et al., *Mosaic organization of a mitochondrial gene: evidence from double mutants in the cytochrome b region of Saccharomyces cerevisiae*. Cell, 1980. **20**(1): p. 199-206.
 40. Foury, F., et al., *The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 1998. **440**(3): p. 325-31.
 41. Sutovsky, P., et al., *Ubiquitin tag for sperm mitochondria*. Nature, 1999. **402**(6760): p. 371-2.
 42. Hajjar, C., K.M. Sampuda, and L. Boyd, *Dual roles for ubiquitination in the processing of sperm organelles after fertilization*. BMC Dev Biol, 2014. **14**: p. 6.
 43. Sato, M. and K. Sato, *Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(8): p. 1979-84.

44. Benz, R., *Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1197**(2): p. 167-96.
45. Herrmann, J.M. and K. Hell, *Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(4): p. 205-11.
46. Reichert, A.S. and W. Neupert, *Mitochondriomics or what makes us breathe*. Trends Genet, 2004. **20**(11): p. 555-62.
47. Ahting, U., et al., *The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria*. J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 959-68.
48. Sollner, T., et al., *MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins*. Cell, 1989. **59**(6): p. 1061-70.
49. Kiebler, M., et al., *The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore*. Cell, 1993. **74**(3): p. 483-92.
50. Hines, V., et al., *Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70*. EMBO J, 1990. **9**(10): p. 3191-200.
51. Neupert, W., *Protein import into mitochondria*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 863-917.
52. Dekker, P.J.T., et al., *Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane: Molecular Dissection and Assembly of the General Import Pore Complex*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6515-24.
53. Dietmeier, K., et al., *Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 195-200.
54. Mokranjac, D. and W. Neupert, *Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(1): p. 33-41.
55. Kutik, S., et al., *Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins*. Cell, 2008. **132**(6): p. 1011-24.
56. Paschen, S.A., et al., *Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 862-6.
57. Habib, S.J., et al., *The N-terminal domain of Tob55 has a receptor-like function in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins*. J Cell Biol, 2007. **176**(1): p. 77-88.
58. Waizenegger, T., et al., *Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria*. EMBO Rep, 2004. **5**(7): p. 704-9.
59. Wiedemann, N., et al., *Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 565-71.
60. Chacinska, A., et al., *Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17*. Cell, 2005. **120**(6): p. 817-29.
61. Geissler, A., et al., *The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel*. Cell, 2002. **111**(4): p. 507-18.
62. Yamamoto, H., et al., *Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes*. Cell, 2002. **111**(4): p. 519-28.
63. Mokranjac, D., et al., *Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria*. EMBO J, 2003. **22**(4): p. 816-25.
64. Endo, T., H. Yamamoto, and M. Esaki, *Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 16): p. 3259-67.
65. Schleyer, M. and W. Neupert, *Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes*. Cell, 1985. **43**(1): p. 339-50.
66. Neupert, W. and M. Brunner, *The protein import motor of mitochondria*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 555-65.
67. Moro, F., et al., *The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix*. EMBO J, 1999. **18**(13): p. 3667-75.
68. Schneider, H.C., et al., *Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import*. Nature, 1999. **398**(6833): p. 252-55.

1994. **371**(6500): p. 768-74.
69. Yamamoto, H., et al., *Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane*. FEBS Lett, 2005. **579**(2): p. 507-11.
 70. Mokranjac, D., et al., *Association of the Tim14.Tim16 subcomplex with the TIM23 translocase is crucial for function of the mitochondrial protein import motor*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18037-45.
 71. Bolliger, L., et al., *A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability*. EMBO J, 1994. **13**(8): p. 1998-2006.
 72. Yang, M., et al., *Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes*. EMBO J, 1988. **7**(12): p. 3857-62.
 73. Jensen, R.E. and C.D. Dunn, *Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 25-34.
 74. Rehling, P., K. Brandner, and N. Pfanner, *Mitochondrial import and the twin-pore translocase*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(7): p. 519-30.
 75. Hendrick, J.P. and F.U. Hartl, *The role of molecular chaperones in protein folding*. FASEB J, 1995. **9**(15): p. 1559-69.
 76. Rowley, N., et al., *Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding*. Cell, 1994. **77**(2): p. 249-59.
 77. Glick, B.S., et al., *Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism*. Cell, 1992. **69**(5): p. 809-22.
 78. Chacinska, A., et al., *Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins*. EMBO J, 2004. **23**(19): p. 3735-46.
 79. Sirrenberg, C., et al., *Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5*. Nature, 1998. **391**(6670): p. 912-5.
 80. van der Laan, M., M. Rissler, and P. Rehling, *Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(6): p. 849-61.
 81. Kerscher, O., et al., *The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane*. J Cell Biol, 1997. **139**(7): p. 1663-75.
 82. Kerscher, O., N.B. Sepuri, and R.E. Jensen, *Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(1): p. 103-16.
 83. Lawson, J.E. and M.G. Douglas, *Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in Saccharomyces cerevisiae. Isolation and analysis of AAC2*. J Biol Chem, 1988. **263**(29): p. 14812-8.
 84. Kolarov, J., N. Kolarova, and N. Nelson, *A third ADP/ATP translocator gene in yeast*. J Biol Chem, 1990. **265**(21): p. 12711-6.
 85. Schwimmer, C., et al., *Increasing mitochondrial substrate-level phosphorylation can rescue respiratory growth of an ATP synthase-deficient yeast*. J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 30751-9.
 86. Trotter, P.J., et al., *Mitochondrial transporters involved in oleic acid utilization and glutamate metabolism in yeast*. Arch Biochem Biophys, 2005. **442**(1): p. 21-32.
 87. Tibbetts, A.S., et al., *Yeast mitochondrial oxodicarboxylate transporters are important for growth on oleic acid*. Arch Biochem Biophys, 2002. **406**(1): p. 96-104.
 88. Vest, K.E., et al., *Copper import into the mitochondrial matrix in Saccharomyces cerevisiae is mediated by Pic2, a mitochondrial carrier family protein*. J Biol Chem, 2013. **288**(33): p. 23884-92.
 89. Hamel, P., et al., *Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in Saccharomyces cerevisiae and Arabidopsis thaliana*. Mol Microbiol, 2004. **51**(2): p. 307-17.
 90. Marobbio, C.M., M.A. Di Noia, and F. Palmieri, *Identification of a mitochondrial transporter for*

- pyrimidine nucleotides in Saccharomyces cerevisiae: bacterial expression, reconstitution and functional characterization.* Biochem J, 2006. **393**(Pt 2): p. 441-6.
91. Bukau, B., J. Weissman, and A. Horwich, *Molecular chaperones and protein quality control.* Cell, 2006. **125**(3): p. 443-51.
 92. Escobar-Henriques, M. and T. Langer, *Mitochondrial shaping cuts.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(5-6): p. 422-9.
 93. Kutejova, E., et al., *Yeast mitochondrial ATP-dependent protease: purification and comparison with the homologous rat enzyme and the bacterial ATP-dependent protease La.* FEBS Lett, 1993. **329**(1-2): p. 47-50.
 94. Wagner, I., et al., *Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria.* EMBO J, 1994. **13**(21): p. 5135-45.
 95. Thorsness, P.E., K.H. White, and T.D. Fox, *Inactivation of YME1, a member of the ftsH-SEC18-PAS1-CDC48 family of putative ATPase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(9): p. 5418-26.
 96. Tauer, R., et al., *Yta10p, a member of a novel ATPase family in yeast, is essential for mitochondrial function.* FEBS Lett, 1994. **353**(2): p. 197-200.
 97. Arlt, H., et al., *The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria.* Cell, 1996. **85**(6): p. 875-85.
 98. Leonhard, K., et al., *AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria.* EMBO J, 1996. **15**(16): p. 4218-29.
 99. Dunn, C.D., et al., *Mgr3p and Mgr1p are adaptors for the mitochondrial i-AAA protease complex.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5387-97.
 100. Langer, T. and W. Neupert, *Regulated protein degradation in mitochondria.* Experientia, 1996. **52**(12): p. 1069-76.
 101. Cheng, M.Y., et al., *Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria.* Nature, 1989. **337**(6208): p. 620-5.
 102. Hohfeld, J. and F.U. Hartl, *Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria.* J Cell Biol, 1994. **126**(2): p. 305-15.
 103. Bottinger, L., et al., *Mitochondrial heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp10 cooperate in the formation of Hsp60 complexes.* J Biol Chem, 2015. **290**(18): p. 11611-22.
 104. Baker, B.M. and C.M. Haynes, *Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging.* Trends Biochem Sci, 2011. **36**(5): p. 254-61.
 105. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging.* Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.
 106. Haynes, C.M. and D. Ron, *The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis.* J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 22): p. 3849-55.
 107. Pellegrino, M.W., A.M. Nargund, and C.M. Haynes, *Signaling the mitochondrial unfolded protein response.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(2): p. 410-6.
 108. Yoneda, T., et al., *Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 18): p. 4055-66.
 109. Haynes, C.M., et al., *ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in C. elegans.* Dev Cell, 2007. **13**(4): p. 467-80.
 110. Young, L., et al., *Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria.* Science, 2001. **291**(5511): p. 2135-8.
 111. Haynes, C.M., et al., *The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial unfolded protein response by activating the transcription factor ZC376.7 in C. elegans.* Mol Cell, 2010. **37**(4): p. 529-40.
 112. Nargund, A.M., et al., *Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation.* Science, 2012. **337**(6094): p. 587-90.

113. Mishra, S.K., et al., *Role of the ubiquitin-like protein Hub1 in splice-site usage and alternative splicing*. Nature. **474**(7350): p. 173-8.
114. Oka, Y., et al., *UBL5 is essential for pre-mRNA splicing and sister chromatid cohesion in human cells*. EMBO Rep, 2014. **15**(9): p. 956-64.
115. Karaduman, R., et al., *Error-Prone Splicing Controlled by the Ubiquitin Relative Hub1*. Mol Cell, 2017. **67**(3): p. 423-432 e4.
116. Horibe, T. and N.J. Hoogenraad, *The chop gene contains an element for the positive regulation of the mitochondrial unfolded protein response*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e835.
117. Weiss, C., et al., *JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun*. EMBO J, 2003. **22**(14): p. 3686-95.
118. Aldridge, J.E., T. Horibe, and N.J. Hoogenraad, *Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e874.
119. Fiorese, C.J., et al., *The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR*. Curr Biol, 2016. **26**(15): p. 2037-43.
120. Quiros, P.M., et al., *Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals*. J Cell Biol, 2017. **216**(7): p. 2027-2045.
121. Mattingly, K.A., et al., *Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(3): p. 609-22.
122. Papa, L. and D. Germain, *Estrogen receptor mediates a distinct mitochondrial unfolded protein response*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 9): p. 1396-402.
123. Zhao, Q., et al., *A mitochondrial specific stress response in mammalian cells*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4411-9.
124. Arnold, I., et al., *Evidence for a novel mitochondria-to-nucleus signalling pathway in respiring cells lacking i-AAA protease and the ABC-transporter Mdl1*. Gene, 2006. **367**: p. 74-88.
125. Suen, D.F., et al., *Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic hybrid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11835-40.
126. Narendra, D.P., et al., *PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin*. PLoS Biol, 2010. **8**(1): p. e1000298.
127. Lazarou, M., et al., *Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin*. Dev Cell, 2012. **22**(2): p. 320-33.
128. Leonard, J.V. and A.A. Morris, *Urea cycle disorders*. Semin Neonatol, 2002. **7**(1): p. 27-35.
129. Sinclair, D.A. and I.W. Dawes, *Genetics of the synthesis of serine from glycine and the utilization of glycine as sole nitrogen source by Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1995. **140**(4): p. 1213-22.
130. Ogur, M., et al., *"Active" one-carbon generation in Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 1977. **129**(2): p. 926-33.
131. Sinclair, D.A., S.P. Hong, and I.W. Dawes, *Specific induction by glycine of the gene for the P-subunit of glycine decarboxylase from Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 1996. **19**(3): p. 611-23.
132. Kikuchi, G., et al., *Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2008. **84**(7): p. 246-63.
133. Schapira, A.H., *Mitochondrial diseases*. Lancet, 2012. **379**(9828): p. 1825-34.
134. Schapira, A.H. and H.R. Cock, *Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies*. Eur J Clin Invest, 1999. **29**(10): p. 886-98.
135. Yuan, J. and B.A. Yankner, *Apoptosis in the nervous system*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 802-9.
136. Pellegrino, M.W., et al., *Mitochondrial UPR-regulated innate immunity provides resistance to pathogen infection*. Nature, 2014. **516**(7531): p. 414-7.
137. Pellegrino, M.W. and C.M. Haynes, *Mitophagy and the mitochondrial unfolded protein*

- response in neurodegeneration and bacterial infection.* BMC Biol, 2015. **13**.
138. Leonard, J.V. and A.H. Schapira, *Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects.* Lancet, 2000. **355**(9200): p. 299-304.
 139. DiMauro, S., *Mitochondrial encephalomyopathies: what next?* J Inher Metab Dis, 1996. **19**(4): p. 489-503.
 140. Luft, R., et al., *A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study.* J Clin Invest, 1962. **41**: p. 1776-804.
 141. Holt, I.J., A.E. Harding, and J.A. Morgan-Hughes, *Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies.* Nature, 1988. **331**(6158): p. 717-9.
 142. Wallace, D.C., et al., *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy.* Science, 1988. **242**(4884): p. 1427-30.
 143. Burgeois, M., et al., *Deficiency in complex II of the respiratory chain, presenting as a leukodystrophy in two sisters with Leigh syndrome.* Brain Dev, 1992. **14**(6): p. 404-8.
 144. Schapira, A.H., *Mitochondrial disease.* Lancet, 2006. **368**(9529): p. 70-82.
 145. Radke, S., et al., *Mitochondrial protein quality control by the proteasome involves ubiquitination and the protease Omi.* J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 12681-5.
 146. Benedetti, C., et al., *Ubiquitin-Like Protein 5 Positively Regulates Chaperone Gene Expression in the Mitochondrial Unfolded Protein Response.* Genetics, 2006. **174**(1): p. 229-39.
 147. Kispal, G., et al., *The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins.* EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3981-9.
 148. Shimada, Y., et al., *Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (hABC7), a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia.* J Hum Genet, 1998. **43**(2): p. 115-22.
 149. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome.* Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
 150. Adrain, C. and S.J. Martin, *The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas.* Trends Biochem Sci, 2001. **26**(6): p. 390-7.
 151. Carmona-Gutierrez, D., et al., *Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines.* Cell Death Differ, 2010. **17**(5): p. 763-73.
 152. Bauer, C., V. Herzog, and M.F. Bauer, *Improved Technique for Electron Microscope Visualization of Yeast Membrane Structure.* Microsc Microanal, 2001. **7**(6): p. 530-534.
 153. Reynolds, E.S., *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.* J Cell Biol, 1963. **17**: p. 208-12.
 154. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
 155. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
 156. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
 157. Rath, E., et al., *Induction of dsRNA-activated protein kinase links mitochondrial unfolded protein response to the pathogenesis of intestinal inflammation.* Gut, 2012. **61**(9): p. 1269-1278.
 158. Kayikci, Ö. and J. Nielsen, *Glucose repression in Saccharomyces cerevisiae.* FEMS Yeast Res, 2015. **15**(6).
 159. Fendt, S.M. and U. Sauer, *Transcriptional regulation of respiration in yeast metabolizing differently repressive carbon substrates.* BMC Syst Biol, 2010. **4**: p. 12.
 160. Melo, A.M., T.M. Bandejas, and M. Teixeira, *New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases.* Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(4): p. 603-16.

161. Hell, K., et al., *Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4571-8.
162. Barros, M.H., et al., *Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O*. FEBS Lett, 2001. **492**(1-2): p. 133-8.
163. Palmieri, L., et al., *Identification in Saccharomyces cerevisiae of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 1916-22.
164. Schreiner, B., et al., *Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(22): p. 4335-46.
165. Sichting, M., et al., *Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1*. EMBO J, 2005. **24**(5): p. 1046-56.
166. Yamano, K., et al., *Step-size analyses of the mitochondrial Hsp70 import motor reveal the Brownian ratchet in operation*. J Biol Chem, 2008. **283**(40): p. 27325-32.
167. Junker, J.P., et al., *Influence of substrate binding on the mechanical stability of mouse dihydrofolate reductase*. Biophys J, 2005. **89**(5): p. L46-8.
168. Cogliati, S., et al., *Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency*. Cell, 2013. **155**(1): p. 160-71.
169. Mineri, R., et al., *How do human cells react to the absence of mitochondrial DNA?* PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5713.
170. Wang, X., et al., *Reduced cytosolic protein synthesis suppresses mitochondrial degeneration*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(9): p. 1090-7.
171. Westermann, B., *Mitochondrial fusion and fission in cell life and death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(12): p. 872-84.
172. van der Bliek, A.M., Q. Shen, and S. Kawajiri, *Mechanisms of mitochondrial fission and fusion*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(6).
173. Chan, D.C., *Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health*. Annu Rev Genet, 2012. **46**: p. 265-87.
174. Nunnari, J. and A. Suomalainen, *Mitochondria: in sickness and in health*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1145-59.
175. Lindner, A.B., et al., *Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3076-81.
176. Fuentealba, L.C., et al., *Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7732-7.
177. Motokawa, Y. and G. Kikuchi, *Glycine metabolism by rat liver mitochondria. II. Methylene tetrahydrofolate as the direct on carbon donor in the reaction of glycine synthesis*. J Biochem, 1969. **65**(1): p. 71-5.
178. Gelling, C.L., et al., *Identification of a novel one-carbon metabolism regulon in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 7072-81.
179. Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3116-20.

7. Danksagung

Hiermit möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. W. Neupert für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Er förderte stets mein wissenschaftliches Interesse und stand jederzeit für Rat bereit. Durch seine große Leidenschaft für die Wissenschaft konnte mich Herr Prof. W. Neupert immer weiter motivieren.

Frau Dr. Nikola Wagener danke ich für die Mitbetreuung der Arbeit. Sie hat mich stets wissenschaftlich unterstützt und motiviert. Durch ihre freundliche Art, ihre Leidenschaft und ihr großes wissenschaftliches Wissen hat sie wesentlich zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Zudem möchte ich mich bei den Kollegen bedanken, die ich während meiner Arbeit kennengelernt habe: Frau PD D. Mokranjac, Frau Rachel Zeng, Herr Dr. Max Harner, Frau Dr. Moni Kumari, Herr Dr. Toshiaki Izawa, Frau Ann-Kathrin Unger und Frau Christine Werner.

Herrn Prof. J. Heesemann danke ich für die Aufnahme im FöFoLe Programm.

Danken möchte ich außerdem meiner Familie und meinen Freunden, die mich mit viel Geduld und Liebe uneingeschränkt während der Arbeit unterstützt haben.