

LUDWIG-MAXIMILIANS UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE  
ZELL- UND ENTWICKLUNGSBIOLOGIE

**Das AAA<sup>+</sup>-Protein Msp1 entfernt arretierte  
Vorläuferproteine aus dem TOM-Komplex  
in *Saccharomyces cerevisiae***



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von

**Marion Basch**

geboren in München

**Erstgutachter:** **Prof. Dr. Barbara Conradt**  
Zell- und Entwicklungsbiologie  
Ludwig-Maximilians Universität München

**Zweitgutachter:** **Prof. Dr. Jürgen Soll**  
Botanik  
Ludwig-Maximilians Universität München

**Betreuung durch:** Dr. Nikola Wagener

**Tag der Abgabe:** **12.11.2020**

**Tag der mündlichen Prüfung:** **25.02.2021**

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Hier mit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 12.11.2020

Marion Basch

## Zusammenfassung

Das mitochondriale AAA<sup>+</sup>-Protein Msp1 ist für die Extraktion von mislokalisierten tail-anchored (TA)-ER Proteinen aus der mitochondrialen Außenmembran bekannt. In dieser Arbeit wurde Msp1 hinsichtlich seines Einflusses auf endogene mitochondriale Proteine untersucht. Die genetische Interaktion von *MSP1* mit Komponenten des TOM-Komplexes, die sich in phänotypischen Wachstumsanalysen zeigte, gab Hinweise auf eine Rolle beim mitochondrialen Proteinimport. *In organello* und *in vivo* Experimente mit artifiziellen mitochondrialen Vorläuferproteinen, die am TOM-Komplex arretiert wurden, zeigten, dass Msp1 eine Rolle bei ihrer Entfernung spielt. Die Affinitätsaufreinigung des arretierten Substrats zeigten eine Interaktion mit Msp1. Aufreinigung von Msp1 und anschließende massenspektrometrische Analyse wiesen eine Interaktion mit der proteasomalen Untereinheit Rpn10 nach. In weiteren Wachstumsanalysen wurde sowohl die genetische Interaktion zwischen *TOM5* und *RPN10* nachgewiesen, als auch, dass Extraktion von mislokalisierten TA-ER-Proteinen in der Extraktion arretierter Vorläuferproteine am TOM-Komplex um Msp1 konkurrieren. Darüber hinaus wurden Experimente mit dem Nematoden *C. elegans* durchgeführt. Mit Hilfe von *RNAi* Experimenten und einer *mispn-1* Mutante wurde gezeigt, dass das Wurmhomolog von Msp1 einen Einfluss auf den effizienten Import mitochondrialer Proteine ausübt. Daher wird ein Modell vorgeschlagen, in dem das AAA<sup>+</sup>-Protein Msp1 als zentrale Komponente zur Elimination von arretierten Vorläuferprotein und als Adapter für das Proteasom, das die Extraktion von arretierten und mislokalisierten Proteinen an der mitochondrialen Außenmembran fördert, dient. So wird der Import von mitochondrialen Proteinen gewährleistet und die zelluläre Proteostase erhalten.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abbildungsverzeichnis.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1. Mitochondrien.....	1
1.2. Der Import von mitochondrialen Proteinen .....	2
1.3. Die mitochondriale Qualitätskontrolle.....	5
1.3.1. Chaperone und Proteasen .....	5
1.3.2. Die mitochondriale Unfolded-Protein-Response (UPR <sup>mt</sup> ) .....	7
1.3.3. Die mitochondriale Unfolded-Protein-Response activated by mistargeted mitochondrial Proteins (UPR <sup>am</sup> ) .....	7
1.3.4. PINK1-Parkin-induzierte Mitophagie .....	8
1.4. Das Ubiquitin-Proteasom System .....	8
1.5. Die zelluläre Rolle von AAA <sup>+</sup> -Proteinen.....	10
1.6. Das AAA <sup>+</sup> -Protein Msp1.....	10
1.7. Vorherige Untersuchungen zur Funktion von Msp1 .....	12
1.8. Die Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1. Kultivierung und Erhaltung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
2.2. Molekularbiochemische Methoden.....	17
2.2.1. Isolierung genomischer DNS .....	17
2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
2.2.3. Liste der Oligonukleotiden .....	18
2.2.4. Agarosegelelektrophorese .....	20
2.2.5. Geextraktion.....	20
2.2.6. Restriktionsverdau .....	20
2.2.7. Ligation.....	21
2.2.8. Transformation in <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ Zellen .....	21
2.2.9. Plasmid-Präparation (Mini-Präp) mittels Alkali Zelllyse.....	22
2.2.10. Sequenzierung.....	22
2.2.11. Aufreinigung von Plasmiden (Midi-Präp) .....	23
2.2.12. Liste der Plasmide .....	23

---

2.3.	Zellbiologische Methoden.....	24
2.3.1.	Hefe Transformation mittels Lithium Acetat .....	24
2.3.2.	Tüpfeltest .....	25
2.4.	Proteinbiochemische Methoden.....	25
2.4.1.	Gewinnung von Gesamtzellextrakten mittels alkalischer Zellyse .....	25
2.4.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	25
2.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.4.4.	Proteintransfer auf Nitrocellulose Membran.....	26
2.4.5.	Westernblot .....	26
2.4.6.	Detektion von Proteinen .....	28
2.4.7.	Silberfärbung.....	28
2.4.8.	Isolation von Mitochondrien.....	28
2.4.9.	Gradientaufreinigung von Mitochondrien .....	29
2.5.	Analyse der UPR <sup>mt</sup> Induktion in <i>C. elegans</i> .....	29
2.5.1.	Kultivierung und Erhaltung von <i>C. elegans</i> .....	29
2.5.2.	<i>RNAi</i> Experimente in <i>C. elegans</i> .....	29
2.5.3.	Mikroskopie und Datenanalyse.....	31
2.6.	Chemikalien.....	31
2.7.	Medien .....	33
2.8.	Verbrauchsmaterial.....	34
2.9.	Geräte.....	35
2.10.	Software .....	36
3.	Ergebnisse .....	37
3.1.	Analyse von Msp1-Substraten im Intermembranraum von Mitochondrien .....	37
3.1.1.	Lokalisation von kleinen Intermembranraumproteinen in zellulären Bereichen in Abhängigkeit von Msp1.....	37
3.1.2.	Untersuchung der genetischen Interaktion zwischen <i>MSP1</i> und der Untereinheit <i>TIM8</i> des Tim8-Tim13 Komplexes .....	41
3.1.3.	<i>In Organello</i> Freisetzungstest für kleine IMS-Proteine in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen.....	42
3.2.	Analyse der Interaktion zwischen Msp1 und dem TOM-Komplex.....	44
3.2.1.	Untersuchung der genetischen Interaktion zwischen <i>MSP1</i> und weiteren Untereinheiten des TOM-Komplexes .....	45
3.2.2.	Die Funktion von Msp1 bei der Qualitätskontrolle des mitochondrialen Proteinimports . .....	47
3.2.2.1.	Deletion von <i>TOM5</i> führt zur verstärkten Msp1-Expression .....	47

---

---

3.2.2.2. Die Überexpression von Msp1 hat einen Einfluss auf das Wachstum und auf die Akkumulation des Hsp60-Vorläuferproteins.....	49
3.2.3. <i>In organello</i> und <i>in vivo</i> Abbau des mitochondrialen Vorläuferproteins <i>Cytb<sub>2</sub>ΔTM-DHFR</i> .....	51
3.2.4. Aufreinigung von <i>Cytb<sub>2</sub>ΔTM DHFR-His<sub>6</sub></i> nach Aminopterin Behandlung .....	54
3.2.5. Überprüfung der Menge ubiquitinerter Proteine in Msp1-Mutanten.....	56
3.2.6. Ubiquitinierung von Msp1-Substraten ist unabhängig von Mdm30 und Cdc48.....	57
3.3. Die Interaktion zwischen Msp1 und dem Proteasom .....	59
3.3.1. Aufreinigung von Msp1-His <sub>7</sub> .....	59
3.3.2. Identifikation und Analyse der proteasomalen Untereinheit Rpn10.....	60
3.3.3. Das Proteasom bindet in Abhängigkeit von Msp1 an isolierte Mitochondrien .....	61
3.3.4. Wachstumsanalyse zur Darstellung einer genetischen Interaktion zwischen <i>RPN10</i> , <i>TOM5</i> und <i>MSP1</i> und die Akkumulation von Vorläuferproteinen.....	62
3.3.5. Phänotypische Analyse der genetischen Interaktion zwischen <i>MSP1</i> und der nicht-essentiellen proteasomalen Untereinheit <i>RPN9</i> .....	63
3.4. Deletion von <i>GET1</i> , <i>TOM5</i> und <i>MSP1</i> resultiert in einem starken Wachstumsphänotyp ..	64
3.5. Induktion von UPR <sup>mt</sup> nach <i>mspn-1</i> und <i>tomm-40 RNAi</i> Behandlung in <i>C. elegans</i> .....	65
4. Diskussion.....	68
4.1. Funktionelle Interaktion zwischen Msp1 und dem TOM-Komplex.....	68
4.2. Msp1 entfernt arretierte Vorläuferproteine aus dem TOM-Komplex und rekrutiert das Proteasom für deren Degradierung .....	71
4.3. Induktion von UPR <sup>mt</sup> nach <i>mspn-1</i> und <i>tomm-40 RNAi</i> Behandlung in <i>C. elegans</i> .....	72
4.4. Modell .....	74
5. Literaturverzeichnis.....	76
Danksagung.....	87
Curriculum Vitae .....	88

**Abkürzungsverzeichnis**

AAA <sup>+</sup>	ATPases Associated with diverse cellular Activities
ATAD1	ATPase Family AAA Domain Containing Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C-terminal	Carboxy-Ende
Cytb <sub>2</sub>	Cytochrom b <sub>2</sub>
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence Lösung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GET	Guided Entry of Tail-Anchored
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HSP	Hitzeschockproteine
IM	Innenmembran
IMS	mitochondrialer Intermembranraum
kDA	Kilodalton
<i>lf</i>	<i>loss-of-function</i>
M	Molar
mA	Milliampere
µg	Mikrogramm
mitoCPR	mitochondrial compromised protein import response
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
Msp1	Mitochondrial Sorting of Proteins 1
nm	Nanometer
N-Terminal	Amino-Ende
OD	Optische Dichte
OM	mitochondriale Außenmembran
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion



RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
<i>RNAi</i>	<i>RNA interference</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC	synthetisches Minimalmedium mit dem Aminosäure-Mix
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (engl.)
siRNA	Small interfering RNA (engl.)
TA	Tail-Anchored
TIM	Translocase of the Inner mitochondrial Membrane
TOM	Translocase of Outer Membrane
UPR	Unfolded Protein Response Activated by Mistargeted mitochondrial proteins
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
x g	Relative Zentrifugalbeschleunigung (RCF) (Vielfaches von g)
YP	Hefe-Pepton Medium
°C	Grad Celsius

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Die verwendeten <i>S. cerevisiae</i> Stämme, der Genotyp und Erzeuger.....	15
Tabelle 2 Allgemeines Schema der Zusammensetzung der Polymerase-Kettenreaktion. ....	17
Tabelle 3 Generelles PCR Programm mit Temperatur, Zeit und Zyklenanzahl.....	18
Tabelle 4 Liste der verwendeten Oligonukleotide mit Sequenz und Verwendung .....	18
Tabelle 5 Zusammensetzung des Restriktionsverdau mit zwei Enzymen .....	21
Tabelle 6 Ligationsansatz mit der T4 DNS Ligase .....	21
Tabelle 7 Name der Sequenzierungsprimer und Sequenz.....	22
Tabelle 8 Verwendete Plasmide und ihre Beschreibung .....	23
Tabelle 9 Name der neu-konstruierten Plasmide.....	23
Tabelle 10 Lösung A und Lösung B der Hefe Transformation.....	24
Tabelle 11 Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gel. ....	26
Tabelle 12 Verwendete Primär-Antikörper.....	27
Tabelle 13 Verwendete Sekundär-Antikörper .....	27
Tabelle 14 Zusammensetzung der ECL-Lösung und die Hersteller .....	28
Tabelle 15 Verwendete <i>RNAi</i> Konstrukte und ihre Beschreibung .....	30
Tabelle 16 <i>C. elegans</i> Stämme MD4432 und MD4430, ihre Beschreibung und Erzeuger. ....	31
Tabelle 17 Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller.....	31
Tabelle 18 Zusammensetzung vom Hefe-Pepton-Medium, Synthetischen Minimalmedium und Aminosäuren Mix und die Hersteller, der einzelnen Bestandteile. ....	33
Tabelle 19 Verwendete Kohlenstoffquellen, ihre Konzentrationen und Hersteller. ....	34
Tabelle 20 Aminosäuren .....	34
Tabelle 21 Verbrauchsmaterial und Hersteller.....	34
Tabelle 22 Geräte im Labor und Hersteller.....	35
Tabelle 23 Name der Software und Verwendungszweck. ....	36

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung des TOM-Komplexes mit den Untereinheiten. ....	2
Abbildung 2 Proteinimportwege in die Mitochondrien.....	4
Abbildung 3 A) Eine Chloramphenicol-Behandlung beeinflusst die Expressionsmengen von mitochondrial- und nuklear codierten Proteinen. ....	13
Abbildung 4 Experimenteller Ablauf der <i>RNAi</i> Behandlung in <i>C. elegans</i> bei 20°C.....	30
Abbildung 5 Wachstumsanalyse der <i>GAL10-MIA40</i> und <i>GAL10-ERV1</i> Mutanten mit verschiedenen Msp1-Expressionsmengen.....	38
Abbildung 6 Analyse der Verteilung kleiner IMS-Proteine in Mia40-überexprimierenden Zellen in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen.....	39
Abbildung 7 Analyse der Verteilung kleiner IMS-Proteine in Mia40-depletierenden Zellen in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen.....	40
Abbildung 8 Wachstumsanalyse der Stämme W303-pYX242, $\Delta msp1$ -pYX242, Msp1 $\uparrow$ -pYX242, $\Delta tim8$ -pYX242, $\Delta msp1\Delta tim8$ --pYX242 und $\Delta tim8$ -Msp1 $\uparrow$ -pYX242.....	41
Abbildung 9 <i>In organello</i> Freisetzung des IMS-Proteins Cox17.. ....	43
Abbildung 10 Phänotypische Wachstumsanalyse einer genetischen Interaktion von <i>MSP1</i> mit den potenziellen Kandidaten <i>TOM22</i> , <i>TOM5</i> , <i>SOP4</i> , und <i>MDM30</i> . ....	44
Abbildung 11 Es besteht eine genetische Interaktion zwischen <i>MSP1</i> und den TOM- Untereinheiten. ....	46
Abbildung 12 Msp1-Mengen sind in der $\Delta tom5$ Mutante erhöht und eine Deletion von <i>MSP1</i> hat keinen Einfluss auf andere mitochondriale Proteine.....	48
Abbildung 13 Msp1-Überexpression kompensiert nicht den Wachstumsdefekt im $\Delta tom5$ Hintergrund, führt aber zu reduzierten Hsp60-Mengen.....	49
Abbildung 14 Endogene Msp1-Mengen retten den Wachstumsdefekt der $\Delta tom5\Delta msp1$ Mutante auf das Niveau der $\Delta tom5$ Mutante.....	50
Abbildung 15 <i>In organello</i> Abbau des akkumulierten Substratproteins Cytb <sub>2</sub> (1-167) $\Delta$ TM-DHFR .....	52
Abbildung 16 <i>In vivo</i> Abbau des arretierten Cytb <sub>2</sub> (1-107) $\Delta$ TM-DHFR. ....	53
Abbildung 17 Wachstumsanalyse des Stammes $\Delta msp1$ , der die Plasmide pRS315, pRS315-Msp1 oder pRS315-Msp1E193Q trägt.....	54
Abbildung 18 Msp1E193Q interagiert mit Cytb <sub>2</sub> $\Delta$ TM-DHFR-His <sub>6</sub> . ....	55
Abbildung 19 Gesamtmenge an ubiquitinierten Proteinen an den Mitochondrien in Msp1- Mutanten.....	56
Abbildung 20 Wachstumsanalyse der Stämme W303, $\Delta msp1$ , $\Delta mdm30$ und $\Delta mdm30\Delta msp1$ . 57	

Abbildung 21 Wachstumsanalyse der Stämme W303, $\Delta msp1$ , $cdc48-3$ ( <i>KanMX4</i> ), $cdc48-3$ ( <i>KanMX4</i> ) $\Delta msp1$ , $cdc48-3$ ( <i>HIS3MX6</i> ) und $cdc48-3$ ( <i>HIS3MX6</i> ) $\Delta msp1$ .....	58
Abbildung 22 Aufreinigung von Msp1-His <sub>7</sub> und Analyse mittels Silberfärbung (A) und Westernblot (B). .....	59
Abbildung 23 Rpn10 ist angereichert nach der Affinitätsaufreinigung von Msp1-His <sub>7</sub> . .....	60
Abbildung 24 Das Proteasom bindet abhängig von Msp1 an Mitochondrien.....	61
Abbildung 25 Analyse einer genetischen Interaktion zwischen <i>RPN10</i> , <i>TOM5</i> und <i>MSP1</i> . .....	62
Abbildung 26 Wachstumsanalyse der Stämme W303, $\Delta msp1$ , $\Delta rpn10$ , $\Delta rpn10\Delta msp1$ , $\Delta rpn9$ und $\Delta rpn9\Delta msp1$ .....	63
Abbildung 27 Wachstumsanalyse der Stämme W303, $\Delta msp1$ , $\Delta tom5$ , $\Delta tom5\Delta msp1$ , $\Delta get1$ , $\Delta msp1\Delta get1$ , $\Delta get1\Delta tom5$ und $\Delta msp1\Delta get1\Delta tom5$ .....	64
Abbildung 28 Wildtyp (+/+) und $msp1-1(tm3831)$ Würmer mit dem Reporterkonstrukt $P_{hsp-6}GFP$ wurden nach <i>RNAi</i> Behandlung mit <i>tag-208</i> oder <i>msp1-1</i> unter dem Hellfeld und dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.. .....	66
Abbildung 29 Wildtyp (+/+) und $msp1-1(tm3831)$ Würmer mit dem Reporterkonstrukt $P_{hsp-6}GFP$ wurden nach <i>RNAi</i> Behandlung mit <i>tag-208</i> , <i>tomm-40</i> und <i>msp1-1</i> unter dem Hellfeld und dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. ....	67
Abbildung 30 Modell für die Zusammenarbeit von Msp1 und dem Proteasom während der Extraktion von Msp1-Substraten aus dem TOM-Komplex. ....	74

## 1. Einleitung

### 1.1. Mitochondrien

Mitochondrien sind dynamische Organelle, die eine zentrale Rolle in der ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung, im Aminosäuren- und Lipidmetabolismus und Transport von Metaboliten und Ionen spielen und dadurch essentiell für die Lebensfähigkeit von eukaryotischen Zellen sind. Nach der Endosymbiontentheorie stammen Mitochondrien aus  $\alpha$ -Proteobakterien und wurden von einer Wirtszelle aufgenommen (Margulis, 1971, Sagan, 1967). Im Laufe der Evolution ging das mitochondriale Genom teilweise verloren oder wurde in den Nukleus transferiert. Aus diesem Grund sind nur wenige mitochondriale Proteine in den Mitochondrien codiert (Borst und Grivell, 1978). In Eukaryoten variiert das mitochondriale Genom stark in Größe und Inhalt. In *Saccharomyces cerevisiae* sind acht Proteine in den Mitochondrien kodiert, im Menschen dagegen befinden sich 13 proteinkodierende Gene in den Mitochondrien und das größte mitochondriale Genset ist in *Reclinomonas americana* zu finden, das aus 62 proteinkodierenden Genen besteht (Malina et al., 2018). Diese mitochondrial-kodierten Proteine sind hauptsächlich für die Untereinheiten der Elektronentransportkette und den Komplex der oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Innenmembran zuständig (Borst und Grivell, 1978, Malina et al., 2018). Die übrigen mitochondrialen Proteine sind im Zellkern kodiert und werden im Zytosol synthetisiert. Anschließend werden die kernkodierten Proteine zu ihrem Bestimmungsort den Mitochondrien transportiert und importiert. Dabei müssen sie zwei Membranen passieren, um in die Matrix zu gelangen. Die mitochondriale Außenmembran (OM) umgibt den mitochondrialen Intermembranraum (IMS), der durch eine weitere Membran von der Matrix getrennt ist. Die Innenmembran (IM) bildet Ausstülpungen, die Cristae genannt werden, um die Oberfläche zu vergrößern. Dort befinden sich besonders viele Komplexe der Atmungskette, die für die ATP-Produktion mittels der oxidativen Phosphorylierung und den TCA-Zyklus relevant sind. Zusätzlich sind Mitochondrien noch in Aminosäuren- und Lipidmetabolismus und die Synthese von Häm und Eisen-Schwefel-Clustern involviert (Malina et al., 2018). Folglich fungieren sie wesentlich in Entwicklungsstadien, bei Alterungsprozessen und in der Apoptose (Baker et al., 2011, Malina et al., 2018, Mühlhoff und Lill, 2000, Pfanner et al., 2019). Störungen in der mitochondrialen Proteinhomöostase und defekte Mitochondrien führen zu zahlreichen schwerwiegenden Krankheiten und neurodegenerativen Erkrankungen (Fresenius und Wohlever, 2019). Aus diesen Gründen sind die multifunktionellen Mitochondrien unentbehrlich für den Erhalt von eukaryotischen Zellen.

## 1.2. Der Import von mitochondrialen Proteinen

Der Großteil der mitochondrialen Proteine ist im Zellkern kodiert und wird auf unterschiedliche Weisen in die Mitochondrien importiert. Der TOM (T\_ranslocase of O\_uter M\_embrane) -Komplex bildet die Hauptpore für den Import der mitochondrialen Proteine in und über die Außenmembran der Mitochondrien. Dieser Translokationskomplex besteht aus sieben Untereinheiten, Tom5, Tom6, Tom7, Tom20, Tom22, Tom40 und Tom70, die sich in Struktur und Funktion unterscheiden (Abbildung 1) (Chacinska et al., 2009, Bausewein et al., 2017 Dekker et al., 1998, Dietmeier, 1997, Hill et al., 1998, Hönlinger et al., 1996, Model et al., 2008 Van Wilpe, 1999, Shiota et al., 2015). Im Zytosol synthetisierte mitochondriale Proteine werden von den Rezeptorproteinen Tom20 und Tom70 erkannt, die nur leicht mit dem TOM-Kernkomplex assoziiert sind (Dekker et al., 1998, Lithgow et al., 1994). Der Kernkomplex besteht aus der Hauptimportpore dem  $\beta$ -Barrel Protein Tom40, das in engem Kontakt mit Tom22 und den drei kleinen TOM-Untereinheiten Tom5, Tom6 und Tom7 steht (Bausewein et al., 2017, Dekker et al., 1998, Hill et al., 1998, Vestweber et al., 1989). Die Untereinheit Tom6 fördert den Aufbau des TOM-Komplexes und das Fehlen lässt den TOM-Komplex teilweise zerfallen (Alconada et al., 1995, Dekker et al., 1998, Hönlinger et al., 1996). Tom7 scheint in seiner Funktion zum Teil antagonistisch zu Tom6 zu agieren (Hönlinger et al., 1996). Das Entfernen von *TOM7* führt zur Stabilisierung des Komplex (Dekker et al., 1998, Hönlinger et al., 1996). Die Depletion einer dieser beiden Untereinheiten hat nur einen leichten Effekt auf das Zellwachstum, während die Deletion beider Gene in einem starken synthetischen Wachstumsdefekt resultiert (Hönlinger et al., 1996). Die dritte kleine TOM-Untereinheit Tom5 ist nicht für die Assemblierung des TOM-Komplexes zuständig, sondern für den Import von mitochondrialen Proteinen notwendig (Dietmeier et al., 1997). Eine Deletion von *TOM5* führt zur Reduktion im Import von mitochondrialen Proteinen verschiedener Subkompartimente (Dietmeier et al., 1997). Das Fehlen von *TOM5* hat bei 30°C keinen Einfluss auf das Wachstum, dagegen ist das Gen bei 37°C essentiell (Dietmeier et al., 1997). Tom22 bindet nicht nur die Vorläuferproteine, sondern spielt auch eine Rolle in der Stabilität und reguliert den Aufbau des TOM-Komplexes (Bausewein et al., 2017, Hönlinger et al., 1995, Lithgow et al., 1994, Model et al., 2008, Van Wilpe, 1999, Shiota et al., 2015). Die Vorläuferproteine werden von den

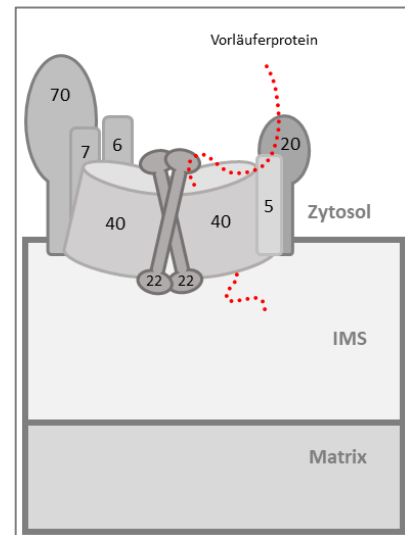
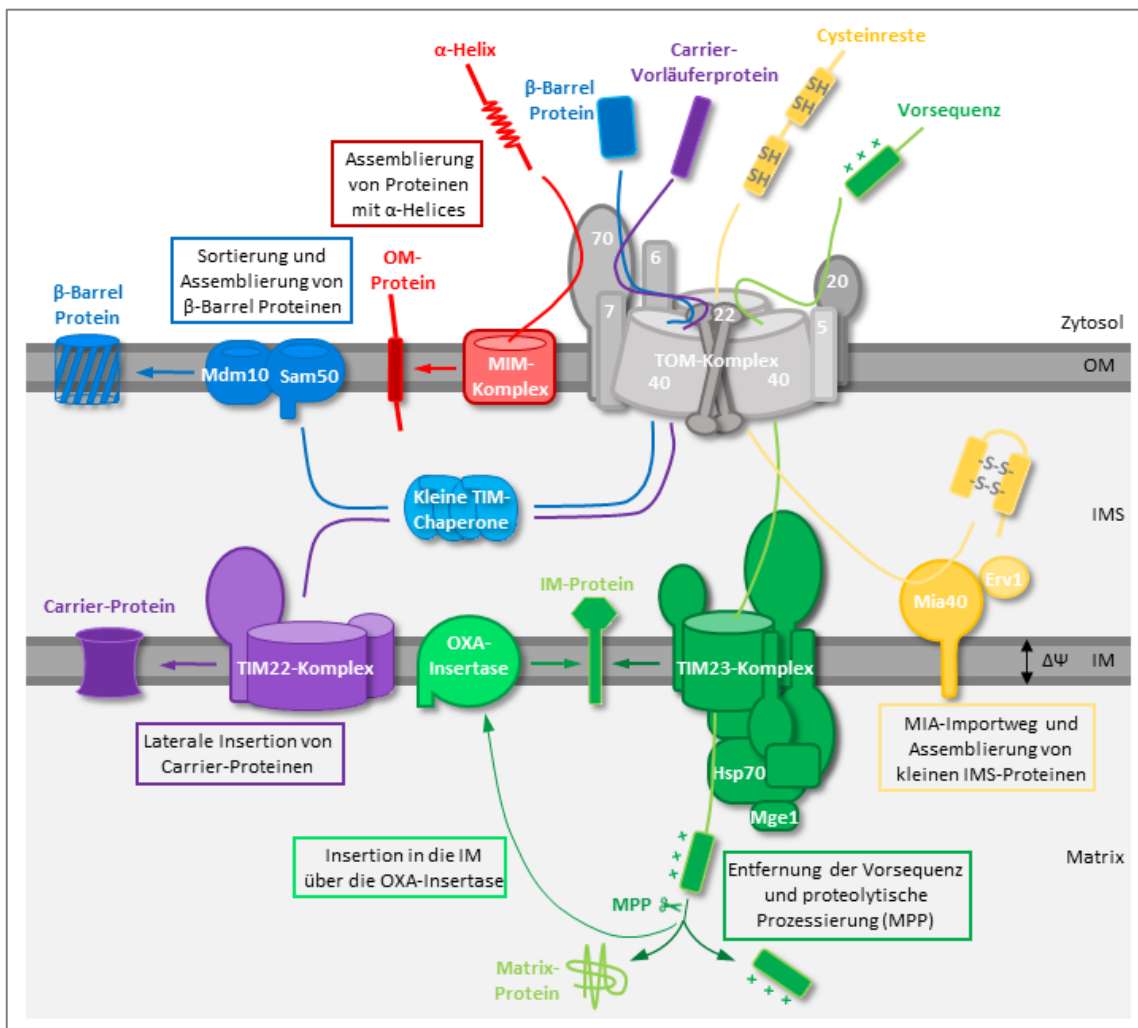


Abbildung 1 Darstellung des TOM-Komplexes mit den Untereinheiten: Tom5, Tom6, Tom7, Tom20, Tom22, Tom40 und Tom70. Das Vorläuferprotein (rot) wird von den Rezeptoren Tom20 und Tom70 erkannt und über Tom5 und Tom22 zu Tom40 transferiert. Das Protein wird über Tom40 in die Mitochondrien importiert. (Bausewein et al., 2017)

Rezeptoren Tom20 und Tom70 erkannt und über Tom5 und Tom22 zur Haupteintrittspore Tom40 transferiert. Durch diese Pore passieren die Vorläuferproteine die Außenmembran und gelangen in den Intermembranraum der Mitochondrien.

Der Import von Vorläuferproteinen unterscheidet sich aufgrund der verschiedenen Eigenschaften wie der Erkennungssequenz, Sortierungssignal oder Struktur des Proteins (Pfanner et al., 2019) (Abbildung 2). Es wird unter folgenden Merkmalen unterschieden: dem Sortierungssignal, konservierte Cystein-Motiven,  $\alpha$ -helikale Segmenten,  $\beta$ -Barrel Strukturproteinen und C-terminale Proteine (Pfanner et al., 2019). Die meisten mitochondrialen Proteine werden aufgrund ihres Sortierungssignals importiert. Diese Sortierungssignal besteht am N-terminalen Ende aus positiv-geladenen amphipathischen  $\alpha$ -Helices, die von den Rezeptoren Tom20 und Tom22 des TOM-Komplexes erkannt und durch die Hauptimportpore Tom40 in die Mitochondrien eingeschleust werden (Abe et al., 2000, Van Wilpe, 1999). In der Innenmembran sitzt der TIM23 (Translocase of the Innern mitochondrial Membrane) -Komplex, der das ankommende Protein in die Matrix oder die Innenmembran importiert. Durch das Membranpotential akkumuliert auf der Matrix-Seite negative Ladungen, wodurch die positiv-geladenen Proteine die Innenmembran passieren können und in der Matrix durch die Peptidase (MPP= Mitochondrial Processing Peptidase) prozessiert werden. Proteine, die in die Innenmembran inseriert werden, besitzen ein hydrophobes Sortierungssignal, das auf das Matrixsortierungssignal folgt und während des Importprozesses im TIM23-Komplex arretiert wird. Anschließend werden diese Proteine lateral in die Innenmembran inseriert. Eine weitere Möglichkeit, um Proteine in die Innenmembran einzufügen, ist der Import über die OXA-Insertase, die in der Innenmembran sitzt (Herrmann et al., 1997, Stiller et al., 2016). Hydrophobe Innenmembranproteine ohne N-terminale Erkennungssequenz haben interne Erkennungssequenzen, die aus hydrophoben Elementen bestehen (z.B. Carrier-Proteine) (Young et al., 2003). Diese werden von Tom70 erkannt und über Tom40 in den Intermembranraum transportiert. Der Transport zum TIM22-Komplex erfolgt über die kleinen TIM-Chaperone (Tim8-Tim13, Tim9-Tim10). Dort werden die hydrophoben Proteine (Carrier) anschließend in die Innenmembran inseriert (Curran et al., 2002, Koehler et al., 1998, Leuenberger et al., 1999, Okamoto et al., 2014). Eine andere Gruppe von Proteinen beinhaltet konservierte Cystein-Motive (Lutz et al., 2003, Mesecke et al., 2005). Im Zytosol befinden sich diese Intermembranraum (IMS)-Proteine in einem reduzierten und ungefalteten Zustand und werden über den TOM-Komplex in die Mitochondrien importiert (Lutz et al., 2003). Nach dem Eintritt in den Intermembranraum werden die kleinen IMS-Proteine über den MIA-Importweg, der aus Mia40 (Mitochondrial Intermembrane Space Import and Assembly) und Erv1 (Essential for Respiration and Viability) besteht, weiter prozessiert (Chacinska, 2004, Mesecke et al., 2005,

Naoe et al., 2004, Terziyska et al., 2005). Mia40 agiert als Rezeptor für die kleinen IMS-Proteine und führt Disulfidbrücken in das Substrat ein (Chacinska, 2004, Naoe et al., 2004, Terziyska et al., 2005). Erv1 interagiert direkt mit Mia40 und hält dies wiederum in der oxidierten Form, indem es Disulfidbrücken in Mia40 einführt (Mesecke et al., 2005). Die oxidierten, gefalteten kleinen IMS-Proteine verbleiben in gefalteter Form im Intermembranraum der Mitochondrien und können nicht zurück in das Zytosol exportiert werden. Eine Reduktion der Cysteinreste kann eine Retrotranslokation in das Zytosol veranlassen, wo die kleinen IMS-Proteine durch das Proteasom degradiert werden (Bragoszewski et al., 2015).



**Abbildung 2 Proteinimportwege in die Mitochondrien.** Diese fünf Hauptimportwege sind hier in dem Organismus *S. cerevisiae* dargestellt. 1) Die Außenmembran (OM)-Proteine mit  $\alpha$ -helikalen Segmenten werden von Tom70, einer Untereinheit des TOM-Komplexes erkannt und über den MIM-Komplex in die Außenmembran inseriert. 2) Der Import der  $\beta$ -Barrel Proteine erfolgt über den TOM-Komplex gefolgt vom Transport mittels der kleinen TIM-Chaperone zum SAM-Komplex, der die  $\beta$ -Barrel Proteine in die Außenmembran inseriert. 3) Hydrophobe Innenmembran (IM)-Proteine, wie Carrier-Proteine, werden über den TOM-Komplex importiert und durch die kleinen TIM-Chaperone zum TIM22-Komplex transportiert und inseriert. 4) Die Intermembranraum (IMS)-Proteine mit konservierten Cystein-Resten gelangen über den TOM-Komplex in den IMS und werden mit Hilfe des MIA-Importweges, bestehend aus Mia40 und Erv1, importiert und assembliert. Im gefalteten Zustand verbleiben die kleinen IMS-Proteine in den Mitochondrien. 5) Proteine mit einer N-terminalen Erkennungssequenz werden über den TOM-Komplex und TIM23-Komplex in die Matrix transportiert. Dort erfolgt die Prozessierung mittels der Peptidase MPP. IM-Proteine mit zweiteiliger Signalsequenz werden durch den TIM23-Komplex lateral in die Innenmembran freigesetzt. Die OXA-



Insertase inseriert vorwiegend mitochondrial codierte IM-Proteine co-translational in die Innenmembran. (Abbildung modifiziert nach Pfanner et al., 2019)

Mitochondriale Außenmembranproteine können entweder mit einer einzelnen  $\alpha$ -Helix, mehreren  $\alpha$ -Helices oder einer  $\beta$ -Barrel Struktur in die Membran inseriert werden. Die  $\beta$ -Barrel Proteine werden auch über den TOM-Komplex in den Intermembranraum geschleust. Dort interagieren sie zuerst mit den kleinen TIM-Chaperonen und werden anschließend über den SAM (mitochondrial Sorting and Assembly Machinery) -Komplex sortiert und in die Membran inseriert (Kutik et al., 2008). Die  $\alpha$ -helikalen Außenmembranproteine können unabhängig vom TOM-Komplex inseriert werden, somit brauchen sie ein Transmembransegment gefolgt von positiv-geladenen Aminosäuren. Beinhaltet ein Protein  $\alpha$ -helikale Segmente, dann erfolgt die Insertion in die Membran mit Hilfe des MIM (Mitochondrial Import) -Komplexes, bestehend aus Mim1 und Mim2, der ebenfalls wichtig für die Insertion von Tom20 und Tom70 ist (Dimmer et al., 2012, Kruger et al., 2017). Bei Proteinen mit einer C-terminalen Verankerung wird vermutet, dass die Lipidzusammensetzung der Außenmembran wichtig für deren spontane Insertion ist (Keskin et al., 2017).

Die Funktionalität der Importwege von Proteinen ist essenziell für den Erhalt von Mitochondrien und wird daher mittels verschiedener spezialisierter Qualitätskontrollmechanismen stetig überwacht, um gegebenenfalls Problemen sofort entgegenzuwirken. Diese mitochondriale Qualitätskontrolle kann auf verschiedene Weise stattfinden und wird im nächsten Kapitel näher beschrieben.

### **1.3. Die mitochondriale Qualitätskontrolle**

#### **1.3.1. Chaperone und Proteasen**

Durch verschiedene Mechanismen wird der Import von Proteinen in die Mitochondrien kontrolliert. Dadurch wird die Leistungsfähigkeit funktioneller Mitochondrien erhalten und das Überleben der Zelle gesichert. Ein Ungleichgewicht an mitochondrialen Proteinen führt zur Aktivierung diverser Stressantworten. Eine vergebliche Aktivierung dieser Stressantwort kann weitere Defekte verursachen und infolgedessen zum vollständigen Entfernen von beschädigten Mitochondrien mittels Autophagie, auch Mitophagie genannt, und zum programmierten Zelltod, der Apoptose, führen (Pfanner et al., 2019). Der einfachste und schnellste Qualitätskontrollmechanismus ist die Kontrolle des Proteinumsatzes durch Proteasen und Chaperone. Während Proteasen fehlerhaft gefaltete oder ungefaltete Proteine in kleine Peptide spalten, unterstützen Chaperone den Import und die Faltung von Proteinen. Proteasen und Chaperone sind in allen Kompartimenten der Mitochondrien zu finden. Das lösliche Matrix-Chaperon mtHsp70 (Ssc1 in *S. cerevisiae*) fördert den Import und die Faltung von

mitochondrialen Vorläuferproteinen, dabei wird es vom Co-Chaperon Mdj1 in seiner Aktivität unterstützt (Kang et al., 1990, Voos und Rottgers, 2002). Ein weiteres wichtiges Chaperonin des Proteinfaltungssystems in Mitochondrien ist Hsp60 mit dem Co-Chaperonin Hsp10. Die importierten Proteine treffen zunächst auf mtHsp70 und interagieren erst nach der Freisetzung von Hsp70 mit dem Hsp60-Hsp10-Komplex (Voos und Rottgers, 2002). Neben den mtHsp70- und Hsp60-Chaperonsystemen, die hauptsächlich für die Faltung neu-importierter Proteine zuständig sind, gibt es noch die Hsp100-Familie, die das mitochondriale Chaperon Hsp78 (Homolog von ClpB in Bakterien) beinhaltet (Voos und Rottgers, 2002). Die Aufgabe dieser Gruppe sind die Vorbeugung von Aggregation und die Rückfaltung von denaturierten Proteinen (Voos und Rottgers, 2002). Im Gegensatz zu den Chaperonen, spalten ATP-abhängige Proteasen Proteine in kleine Teile und fördern deren Degradierung. In der mitochondrialen Matrix befindet sich die lösliche Lon/Pim1-Protease, die mit dem Chaperonsystem kooperiert und den proteolytischen Abbau von fehlerhaft gefalteten Proteinen fördert (Wagner et al., 1994). Neben der Lon-Protease befinden sich in den Mitochondrien Membran-gebundene AAA<sup>+</sup>(ATPases Associated with diverse cellular Activities) Proteasen, die sich in der Orientierung an der mitochondrialen Innenmembran unterscheiden: *i*-AAA<sup>+</sup>-Proteasen haben ihre katalytische Domäne im Intermembranraum und *m*-AAA<sup>+</sup>-Proteasen in der Matrix (Venkatesh et al., 2012). Homologe der *i*-AAA<sup>+</sup>-Protease Yme1 sind in allen Eukaryoten zu finden. Ihr wurde auch eine Funktion als Chaperon nachgewiesen (Schreiner et al., 2012). Die *i*-AAA<sup>+</sup>-Proteasen verhindern die Aggregation von Intermembranraumproteinen, zu denen die Gruppe der kleinen IMS-Proteine gehört, die konservierte Cystein-Motive enthalten (Opalinska und Janska, 2018). Die kleinen IMS-Proteine Tim9 und Tim10, die zur Familie der TIM-Proteine gehören und Komponenten der mitochondrialen Importmaschinerie sind, werden im Falle einer Aggregation von der *i*-AAA<sup>+</sup>-Protease Yme1 abgebaut (Opalinska und Janska, 2018). Die Proteine Yta10 und Yta12 bilden zusammen eine funktionelle *m*-AAA<sup>+</sup>-Protease (Arlt et al., 1996). Dieser Komplex hat sowohl eine proteolytische Funktion in der Matrix als auch eine Chaperon-ähnliche Aktivität in der mitochondrialen Innenmembran, wo er für die Assemblierung des ATP-Synthase-Komplexes notwendig ist (Arlt et al., 1996).

Die AAA<sup>+</sup>-Proteasen spielen eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle und dadurch im Erhalt der Proteinhomöostase (Proteostase) besonders an der Innenmembran, in der die Komplexe der Atmungskette und Importmaschinerie lokalisiert sind.

Neben dem Chaperon-Protease-System gibt es weitere mitochondriale Qualitätskontrollen, die aufgrund von Stress an und in den Mitochondrien aktiviert werden: die UPR<sup>mt</sup> (Mitochondrial

Unfolded Protein Response), UPR<sup>am</sup> (Unfolded Protein Response Activated by Mistargeted mitochondrial proteins) und PINK1-Parkin induzierte Mitophagie.

### **1.3.2. Die mitochondriale Unfolded-Protein-Response (UPR<sup>mt</sup>)**

Die mitochondriale Unfolded-Protein-Response (UPR<sup>mt</sup>) ist eine retrograde Stressantwort, die unter anderem durch Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen in der mitochondrialen Matrix ausgelöst wird. Die ersten Komponenten dieses Qualitätskontrollmechanismus wurden in *C. elegans* und humanen Zellen identifiziert und untersucht (Callegari und Dennerlein, 2018). ATFS-1 ist eine der Schlüsselkomponente der UPR<sup>mt</sup> und trägt sowohl ein mitochondriales als auch ein nukleares Sortierungssignal. Bei gesunden Mitochondrien wird dieser Faktor importiert und mittels der in der Matrix-lokaliserten AAA<sup>+</sup>-Protease LON degradiert (Nargund et al., 2012). Ist jedoch der Proteinimport in die Mitochondrien beeinträchtigt, wird ATFS-1 zum Zellkern transportiert und induziert dort die Expression von Chaperonen, Proteasen und weiteren Proteinen, die die Wiederherstellung der mitochondrialen Proteostase fördern (Fiorese et al., 2016, Nargund et al., 2012, Shpilka und Haynes, 2018). Akkumulierte Proteine in der mitochondrialen Matrix werden durch die Protease CLPP-1 in Peptide gespalten. Eine Hypothese besagt, dass sie mittels des ABC-Transporters HAF-1 in das Zytosol exportiert werden (Haynes et al., 2007, Haynes et al., 2010). An dieser Stelle könnten diese Proteinfragmente möglicherweise den Import von anderen Proteinen wie ATFS-1 verhindern. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine Störung des mitochondrialen Proteinimports unabhängig von der Akkumulation von Proteinen in der Matrix dazu führt, dass der Transkriptionsfaktor ATFS-1 nicht in die Mitochondrien gelangt (Rolland et al., 2019).

### **1.3.3. Die mitochondriale Unfolded-Protein-Response activated by mistargeted mitochondrial Proteins (UPR<sup>am</sup>)**

Störungen im mitochondrialen Proteinimport führen unter anderem zur Akkumulierung von mitochondrialen Proteinen im Zytosol (Wang und Chen, 2015, Wrobel et al., 2015). Als Folge dieser Störung wird die Synthese von Proteinen reduziert und das Proteasom aktiviert, um Proteine zu entfernen und den Proteinimport in die Mitochondrien wieder zu gewährleisten (Wang und Chen, 2015, Wrobel et al., 2015). Dieser Prozess wird auch als mitochondrial Precursor Over-accumulation Stress (mPOS) bezeichnet (Pfanner et al., 2019). Es wird vermutete, dass die Aktivierung der UPR<sup>am</sup> in Hefe auch durch Peptide oder Proteine, die vom mitochondrialen Intermembranraum ins Zytosol zurücktransportiert werden, erfolgt (Bragoszewski et al., 2015, Wasilewski et al., 2017).

### **1.3.4. PINK1-Parkin-induzierte Mitophagie**

In intakten Mitochondrien wird PINK1, aufgrund seines Sortierungssignals, in die Mitochondrien importiert und durch die Peptidase MPP und die Protease PARL prozessiert. Anschließend wird PINK1 in das Zytosol freigesetzt und durch das Proteasom degradiert. Im Falle einer Störung des Proteinimports oder der Prozessierung akkumuliert das nicht-prozessierte PINK1 am TOM-Komplex. Dort phosphoryliert PINK1 die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin und fördert dadurch das komplette Entfernen von beschädigten Mitochondrien mittels Mitophagie (Pickles et al., 2018).

Diese drei retrograden Qualitätskontrollwege sind eng mit der Importmaschinerie assoziiert und werden aufgrund von Stress an den Mitochondrien aktiviert. Die im Zytosol akkumulierten Proteine werden anschließend durch das Ubiquitin-Proteasom System eliminiert, das im Folgenden detailliert beschrieben wird.

### **1.4. Das Ubiquitin-Proteasom System**

Das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) erhält die Proteostase, indem es zügig fehlerhafte, beschädigte oder unerwünschte Proteine aus dem Zytosol der Zelle degradiert (Zientara-Rytter und Subramani, 2019). Die Beschreibung des Ubiquitin-Proteasom Systems bezieht sich in diesem Kapitel auf eukaryotische Organismen. Die abzubauenen Proteine werden über eine Enzymkaskade ubiquitiniert, die aus Ubiquitin-aktivierendem Enzym E1, Ubiquitin-konjugierendem Enzym E2 und Ubiquitin-Ligase E3 besteht (Scheffner et al., 1995). Ubiquitin ist ein kleines sehr stabiles Protein und in allen Eukaryoten beinahe identisch (Komander und Rape, 2012). Als erstes aktiviert das E1-Enzym das Ubiquitin und transferiert es ATP-abhängig zum E2-Enzym. Über das E2-Enzym kann das Ubiquitinmolekül an das Zielsubstrat übermittelt werden, das zusätzlich eine Erkennung durch die E3-Ligase benötigt (Komander und Rape, 2012). Das Ubiquitin bindet kovalent an einem Lysinrest des Substrats. Dieser Prozess ist reversibel, daher kann das Ubiquitin mittels Deubiquitylasen vom Substrat wieder entfernt werden, was zu freien Ubiquitinmolekülen führt (Bragoszewski et al., 2017). Das Ubiquitin kann sowohl als einzelnes Molekül als auch als Kette aus hintereinander gereihten Molekülen am Substrat vorliegen (Komander und Rape, 2012). Nachdem das abzubauenen Protein markiert wurde, wird es durch weitere Proteine (Dsk1, Rad23, ERAD) zum Proteasom transportiert. Diese Transportproteine beinhalten Ubiquitin-ähnliche (UBL) Domänen, die eine Interaktion sowohl mit dem Proteasom als auch mit dem abzubauenen Protein zulassen. Die Markierung aus Ubiquitinmolekülen wird durch das 26S Proteasom erkannt, das für die Regulierung der Degradierung von Proteinen in eukaryotischen Zellen verantwortlich ist (Bard et al., 2018). Das 26S Holoenzym besteht aus einem 20S Kernpartikel, der durch seine zylindrische Form eine Pore bildet, und zwei 19S regulatorische Partikel (RP), die an beiden Enden der Pore sitzen und den Zugang für die

Substrate kontrollieren (Bard et al., 2018). Das regulatorische Partikel wird in eine Basis und einen Deckel unterteilt. Beide Subkomplexe bestehen aus verschiedenen RP-Proteinen. An der Basis sitzen drei Proteine ohne ATPase-Aktivität, Rpn1, Rpn2 und Rpn13, die hauptsächlich für die Bindung von Ubiquitin und Ubiquitin-ähnlichen Domänen zuständig sind (Bard et al., 2018). Rpn10 befindet sich an der Basis, kann aber als Brücke zwischen der Basis und dem Deckel fungieren oder auch in einer freien Form ohne Deckel vorliegen (Van Nocker et al., 1996). Wie die anderen drei Untereinheiten der Basis, kann Rpn10 auch Ubiquitin binden (Glickman et al., 1998, Van Nocker et al., 1996). Das Entfernen von Rpn10 resultiert in der Änderung der proteasomalen Struktur und demzufolge zum vollständigen Verlust der Untereinheiten Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11 und Rpn12 (Glickman et al., 1998). Dennoch beeinträchtigt die Deletion von *RPN10* nicht das Zellwachstum der Hefe (Van Nocker et al., 1996). Die sechs ATPasen Rpt1, Rpt2, Rpt3, Rpt4, Rpt5 und Rpt6 bilden mit ihrer AAA<sup>+</sup>-Domäne eine Ringstruktur, die als Motor fungiert, um die Substrate zu falten und in die zentrale Pore des 20S Kernpartikels zu führen (Bard et al., 2018). Die Deckelstruktur besteht aus Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11, Rpn12 und Rpn13 und ist hauptsächlich dafür zuständig, das Substrat zu binden und wieder zu deubiquitieren (Bard et al., 2018). Der 20S Kernpartikel besteht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten, die aufeinander gestapelt eine zylindrische Struktur erzeugen (Finley et al., 2016). Die außen-gelegenen  $\alpha$ -Ringe regulieren den Zugang der Substrate und die inneren  $\beta$ -Ringe formen das proteolytische Zentrum, in dem das Substrat degradiert wird (Finley et al., 2016).

Das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) ist dafür zuständig, fehlerhafte, beschädigte oder unerwünschte Proteine nicht nur aus dem Zytosol zu degradieren, sondern auch membran-gebundene Proteine zu entfernen. Dies geschieht z.B. am endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Hilfe der ER-assoziierten Degradierungsmaschinerie (ERAD) (Mayer et al., 1998). Durch die Ligasen Doa10 oder Hdr1 und ihre Co-Faktoren Usa1 und Der1 wird das abzubauenende ER-Membran Substrat erkannt und ubiquitiniert (Wu und Rapoport, 2018). Das Cdc48 AAA<sup>+</sup>-Protein wird mittels Ufd1 und Npl4 zum ER rekrutiert, indem diese an die Ubiquitinkette bindet (Wu und Rapoport, 2018). Zusätzlich interagiert Cdc48 mit dem ER-Ankerprotein Ubx2 (Wu und Rapoport, 2018). Danach extrahiert das AAA<sup>+</sup>-Protein Cdc48 das Substrat, wodurch es aus der Membran gelöst wird, und dissoziiert vom ER. Im Zytosol verkürzen Deubiquitylasen die Ubiquitinkette, um das Substrat vom Cdc48 freizusetzen (Wu und Rapoport, 2018). Anschließend erfolgt die Degradierung des Substrats durch das Proteasom (Wu und Rapoport, 2018). Das Protein Cdc48 gehört zu der Familie der AAA<sup>+</sup>-Proteine, die in der Zelle notwendig sind, um die Proteostase zu erhalten. Diese Gruppe wird im nächsten Absatz näher beschrieben.

### 1.5. Die zelluläre Rolle von AAA<sup>+</sup>-Proteinen

Die AAA<sup>+</sup>-Proteine (ATPases Associated with diverse cellular Activities) umfassen eine Proteingruppe mit vielfältigen Funktionen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Da im Laufe der Evolution bestimmte Bereiche konserviert wurden, besitzen sie einige gemeinsame Merkmale. Eine besonders hoch-konservierte Region ist die ATP-Bindedomäne, die aus 200-250 Aminosäuren besteht und in der sich das Walker-A und Walker-B Motiv befindet (Chang et al., 2017, Snider et al., 2008). Die AAA<sup>+</sup>-Proteine formen eine hexamere oder heptamere Ringstruktur mit einer zentralen Pore, in der das Substrat zunächst gebunden und anschließend prozessiert wird. Dies geschieht durch eine Konformationsänderung im AAA<sup>+</sup>-Protein, bei der die Energie aus der ATP-Hydrolyse auf das Substrat übertragen wird. Diese Proteine nehmen an verschiedenen zellulären Prozessen wie der Regulation des Zellzyklus, Proteostase und Proteolyse, Biogenese diverser Organellen, Assoziation mit dem Proteasom und intrazellulärem Transport teil (Snider et al., 2008). Die Beteiligung in vielen kritischen biologischen Prozessen, macht AAA<sup>+</sup>-Proteine unentbehrlich für die Zelle und meist führt der Verlust dieser AAA<sup>+</sup>-Proteine zu schwerwiegenden Folgen. AAA<sup>+</sup>-Proteine findet man in allen Subkompartimenten der Mitochondrien. Die zwei AAA<sup>+</sup>-Proteinkomplexe Yme1 und Yta10/12 wurden bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben und sind in der mitochondrialen Innenmembran verankert. Ein weiteres AAA<sup>+</sup>-Protein ist Bcs1, das auch in der Innenmembran der Mitochondrien lokalisiert ist und mit der ATPase Domäne in die Matrix ragt (Nobrega et al., 1992). Bcs1 ist zuständig für die Translokation und Assemblierung des mitochondrialen Rieske Proteins Rip1, das eine Untereinheit des Komplexes III der Atmungskette darstellt (Wagener et al., 2011). Auch in der mitochondrialen Außenmembran ist ein AAA<sup>+</sup>-Protein zu finden, das als Msp1 bezeichnet wird. In den letzten Jahren wurden einige Studien zur Funktion von Msp1 veröffentlicht. Im Folgenden werden die bisherigen Erkenntnisse zusammengefasst.

### 1.6. Das AAA<sup>+</sup>-Protein Msp1

Msp1 wurde ursprünglich im Rahmen einer Studie identifiziert, in der nach Komponenten gesucht wurde, die in die Sortierung von Proteinen innerhalb der Mitochondrien involviert sind (Nakai et al., 1993). Dafür wurde das Sortierungssignal des Cytochrom c<sub>1</sub> Vorläuferproteins durch die N-terminalen 61 Aminosäurereste von Tom70 ersetzt (Nakai et al., 1993). Eine Überexpression von *MSP1* führte zu einer Sortierung des Fusionsproteins von der Außenmembran in den Intermembranraum (Nakai et al., 1993). Da diese neue Komponente die Sortierung von Proteinen beeinflusst, wurde sie als Mitochondrial Sorting of Proteins 1 bezeichnet (Nakai et al., 1993). In dieser Studie wurde zwar festgestellt, dass Msp1 an der Außenmembran von Mitochondrien lokalisiert ist und zur Familie der AAA<sup>+</sup>-Proteine gehört,

allerdings blieb die genaue Funktion des Proteins unklar. Das Gen *MSP1* wurde im Laufe der Evolution konserviert und besitzt wie die anderen AAA<sup>+</sup>-Proteine eine ATP-Bindedomäne. Jedoch beinhaltet Msp1 keine Protease-Domäne. Das 40 kDA große Proteine ist mit dem N-terminalen Ende in der Außenmembran verankert und die C-terminale Domäne befindet sich im Zytosol. Nach seiner Identifikation vergingen weitere 20 Jahre bis die Funktion von Msp1 weiter untersucht wurde. Dies lag vermutlich daran, dass eine Deletion von *MSP1* in *S. cerevisiae* das Wachstum unter normalen Bedingungen nicht beeinträchtigt. Erst im Jahre 2014 wurde die Rolle von Msp1 bei der Beseitigung von mislokalisierten TA (Tail-Anchored)-ER-Proteinen von der mitochondrialen Außenmembran in zwei unabhängigen Studien beschrieben (Chen et al., 2014, Okreglak und Walter, 2014). Unter normalen Wachstumsbedingungen werden TA-ER-Proteine mit Hilfe des GET-Importweges in die ER-Membran inseriert. Eine Deletion von Komponenten des GET (Guided Entry of Tail-Anchored Proteins)-Importweges bei gleichzeitiger *msp1* Deletion führen zur Ansammlung von mislokalisierten TA-ER-Proteinen in der Außenmembran von Mitochondrien und dadurch zu Veränderung der mitochondrialen Morphologie, zum Verlust der mitochondrialen DNS und Problemen in der oxidativen Phosphorylierung (Chen et al., 2014, Okreglak und Walter, 2014). Zusätzlich wurde eine Lokalisation von Msp1 auch an den Peroxisomen beobachtet (Okreglak und Walter, 2014). Diese Versuche zeigten, dass Msp1 eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle spielt, insbesondere bei der Entfernung von mislokalisierten TA-ER-Proteinen.

Dennoch blieben viele Fragen, um die Funktion und den Mechanismus der Msp1-Aktivität offen. Zwei weitere Forschungsgruppen untersuchten die Extraktion der TA-ER-Proteine aus der Lipiddoppelschicht genauer (Wohlever et al., 2017, Weir et al., 2017). Diese Studien zeigten, dass Msp1 nicht nur die falsch inserierten TA-ER-Proteine erkennt, sondern diese auch ATP-abhängig aus der Lipid-Doppelschicht extrahiert. Wohlever et al. nehmen an, dass Msp1 ohne weitere Adapterproteine für die Extraktion von Substraten ausreicht, dass Adapterproteine aber für die Substratelektivität notwendig sind oder sogar Msp1 in seiner Aktivität regulieren. In einer weiteren Studie von Weidberg und Amon aus dem Jahr 2018, die zum Teil zeitgleich mit den Experimenten dieser Arbeit durchgeführt wurde, wurde eine neue Funktion von Msp1 beschrieben. Im Fokus dieser Studie stand die Untersuchung des Signalweges, der induziert wird, wenn Proteine am TOM-Komplex akkumulieren. Dabei wurde Msp1 als Qualitätskontrollfaktor identifiziert. Eine starke Überexpression von mitochondrialen Proteinen mit einer zweiteiligen Signalsequenz führt zur Überlastung der mitochondrialen Importmaschinerie und dadurch zur Blockierung des TOM-Komplexes. Dieser Importstress induziert die Expression von Cis1, einer Komponente der MitoCPR (Mitochondrial Compromised Protein Import Response) (Weidberg und Amon, 2018). Im nächsten Schritt rekrutiert Cis1 das

Protein Msp1 zum TOM-Komplex, um die akkumulierten Intermembranraumproteine zu entfernen und die Funktion vom TOM-Komplex wiederherzustellen (Weidberg und Amon, 2018).

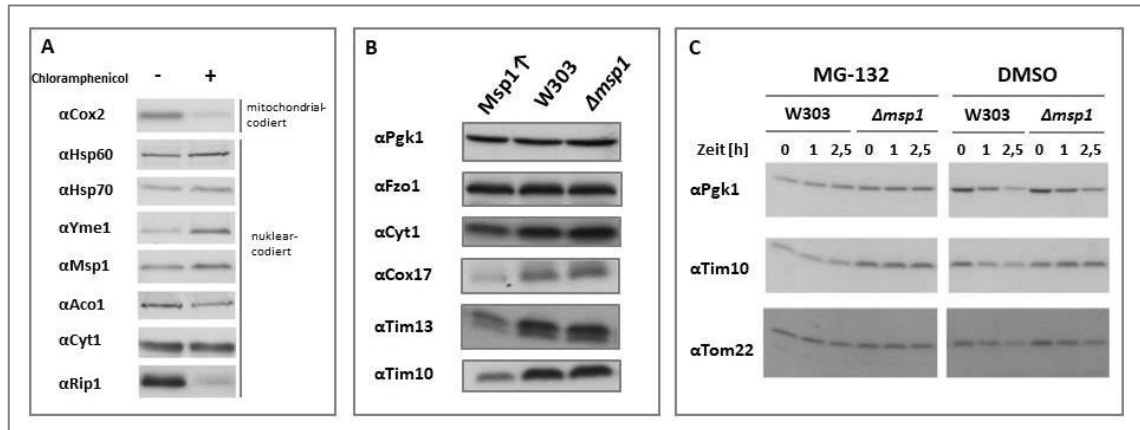
In zwei unabhängigen Studien aus dem Jahr 2019 wurde das Schicksal von TA-ER-Proteinen untersucht, nachdem diese aus der mitochondrialen Außenmembran extrahiert wurden (Dederer et al., 2019, Matsumoto et al., 2019). Es wurde gezeigt, dass die E3-Ligase Doa10, eine Komponente der ER-assoziierten Degradierungsmaschinerie (ERAD), den Abbau der extrahierten mislokalisierten TA-ER-Proteine mit Hilfe der proteasomalen Degradierung kontrolliert (Dederer et al., 2019, Matsumoto et al., 2019). Zusätzlich untersuchten Dederer und Kollegen die Substratselektivität von Msp1. Sie haben herausgefunden, dass Msp1 als unspezifischer Extraktionsfaktor für monomere TA-ER-Proteine fungiert. Dagegen verhindert die Komplexbildung eines Substrates die Extraktion durch Msp1 (Dederer et al., 2019). In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass Cdc48 ständig mit dem TOM-Komplex assoziiert ist, um das Blockieren des TOM-Komplexes durch akkumulierte Vorläuferproteine, zu verhindern (Martensson et al., 2019). Durch eine Bindung an das Adapterprotein Ubx2, das neben der ER-Membran auch an der mitochondrialen Außenmembran zu finden ist und dort mit dem TOM-Komplex interagiert, verbleibt das AAA<sup>+</sup>-Protein Cdc48 an den Mitochondrien und fördert die Degradierung dieser akkumulierten Vorläuferproteine durch das Proteasom. Dieser neue Mechanismus der Qualitätskontrolle wurde mitoTAD (Mitochondrial Protein Translocation-Associated Degradation) genannt. Er soll unter normalen Wachstumsbedingungen ohne Stress aktiv sein und den Proteinimport in die Mitochondrien und die Proteostase der Zelle gewährleisten. Die *ubx2* Deletionsmutante zeigte allerdings nur einen Wachstumsphänotyp, wenn in der Zelle Importstress generiert wird oder gleichzeitig *MSP1* deletiert wird (Martensson et al., 2019).

### **1.7. Vorherige Untersuchungen zur Funktion von Msp1**

In einem Experiment von Nikola Wagener, in dem Hefezellen eines Wildtyp Stammes mit Chloramphenicol behandelt wurden, fiel auf, dass die Mengen einiger Proteine im Vergleich zu den Kontrollbedingungen erhöht waren (Abbildung 3A). Das Antibiotikum Chloramphenicol hemmt die Proteinsynthese in Mitochondrien, was zu einem Ungleichgewicht zwischen mitochondrialen und nuklear-kodierten Proteinen in den Mitochondrien führt. Als Kontrolle wurde bei dem Experiment das mitochondrial-kodierte Protein Cox2 dekoriert, das nach Einsatz von Chloramphenicol eine reduzierte Menge aufwies. Die Chloramphenicol-Behandlung beeinflusste die Mengen der kernkodierten Proteine Hsp60, Yme1, Msp1, Aco1 und Rip1, sowohl positiv als auch negativ. Interessanterweise führte diese Chloramphenicol-induzierte



Störung der Proteostase zur stärkeren Expression von Msp1. Daher wurde vermutet, dass Msp1 eine Rolle in der retrograden Stressantwort UPR<sup>mt</sup> spielen könnte. Für weitere Untersuchungen wurden von Nikola Wagener und Rachel Zeng *msp1* Deletions- und Msp1-Überexpressionsmutanten generiert und die endogenen mitochondrialen Proteinmengen in Abhängigkeit von Msp1 von Rachel Zeng analysiert (Abbildung 3B).



**Abbildung 3 A)** Eine Chloramphenicol-Behandlung beeinflusst die Expressionsmengen von mitochondrial- und nuklear codierten Proteinen. Die Gesamtzellextrakte vom Wildtyp (W303) wurden in An- und Abwesenheit von Chloramphenicol untersucht. Es wurden Antikörper gegen Proteasen (Yme1), Chaperone (Hsp60, Hsp70) und der mitochondrialen Proteinen Cox2, Msp1, Aco1, Cyt1 und Rip1 verwendet. **B)** Die Expressionsmengen der kleinen IMS-Proteine (Cox17, Tim13 und Tim10) sind abhängig von Msp1-Expressionmengen. Die Gesamtzellextrakte wurden aus den Stämmen W303,  $\Delta$ msp1 und Msp1 $\uparrow$  entnommen. Pgk1 wurde als zytosolische Kontrolle und Fzo1 und Cyt1 als mitochondriale Kontrolle verwendet. **C)** Der Proteinumsatz vom kleinen IMS-Protein Tim10 ist abhängig von der Proteasom und Msp1-Aktivität. Tom22 ist ein mitochondriales Außenmembranprotein. Die Analyse der Abbildungen A-C wurden mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration mit den obengenannten Antikörpern durchgeführt. Die Abbildungen A und B sind nicht-publizierte Daten von Nikola Wagener und Rachel Zeng. Die Abbildung C wurden in der Dissertation von Rachel Zeng veröffentlicht.

Die Mengen der kleinen löslichen IMS-Proteine Cox17, Tim10 und Tim13 waren in der Msp1-Überexpressionsmutante vermindert. Diese kleinen IMS-Proteine beinhalten konservierte Cysteinreste und sind Substrate des MIA-Importweges (Chacinska, 2004, Lutz et al., 2003, Mesecke et al., 2005). Wie zuvor beschrieben sind diese Proteine auch Substrate der UPR<sup>am</sup> in Hefe, die vom mitochondrialen Intermembranraum ins Zytosol zurücktransportiert werden (Bragoszewski et al., 2015). Der Einfluss von Msp1 auf diese kleinen IMS-Proteine könnte auf eine mögliche Funktion in der Retrotranslokation aus dem Intermembranraum in das Zytosol und dem Abbau im Zytosol deuten. Daher wurde in einem weiteren Experiment überprüft, ob der Abbau dieser Proteine abhängig von der Msp1- und Proteasom-Aktivität ist (Abbildung 3C). Der Wildtyp W303 und die  $\Delta$ msp1-Mutante wurden mit dem Proteasominhibitor MG-132 inkubiert und der Abbau kleiner IMS-Proteine über einen Zeitraum von 2,5 Stunden beobachtet. Es wurde festgestellt, dass die kleinen IMS-Proteine in der  $\Delta$ msp1-Mutante akkumulieren und ihr Abbau auch vom Proteasom abhängig ist. Aufgrund dieser Ergebnisse von Nikola Wagener

und Rachel Zeng wurde in dieser Arbeit zunächst eine mögliche Funktion von Msp1 in der Retrotranslokation von kleinen IMS-Proteinen in das Zytosol untersucht. Msp1 scheint eine zentrale Rolle in der Qualitätskontrolle an den Mitochondrien und damit in der Aufrechterhaltung der Proteostase der Zelle zu spielen.

### **1.8. Die Zielsetzung dieser Arbeit**

Das AAA<sup>+</sup>-Protein Msp1 wurde in dieser Arbeit hinsichtlich seines Einflusses auf endogene mitochondriale Proteine untersucht. AAA<sup>+</sup>-Proteine haben verschiedene Funktionen in zellulären Prozessen wie der Proteostase und Proteolyse, Regulation des Zellzyklus, Biogenese diverser Organellen, Assoziation mit dem Proteasom und dem intrazellulären Transport. Proteine dieser Gruppe sind stark konserviert und gleichen sich zu einem großen Teil in ihrer Struktur und ihrem Aufbau. Auch ihre Mechanismen, soweit bekannt, ähneln sich. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung von Msp1 bezüglich seiner Funktion im Zusammenhang mit endogenen mitochondrialen Proteinen, um seine Bedeutung in der mitochondrialen Qualitätskontrolle zu verstehen. Durch die Lokalisation in der Außenmembran von Mitochondrien könnte Msp1, ähnlich wie Cdc48 am ER, als Komponente für den retrograden Export von IMS-Proteinen und als Interaktionspartner für das Proteasom im Rahmen der UPR<sup>am</sup> fungieren. Erste Hinweise auf endogene mitochondriale Proteine als Substrate von Msp1 gab es durch die Experimente von Nikola Wagener und Rachel Zeng (Kapitel 1.7). Aufgrund dieser Beobachtungen sollte zunächst der Einfluss von Msp1 auf kleine IMS-Proteine näher untersucht werden. Es wurden sowohl *in vivo* als auch *in organello* Versuche durchgeführt, um den Export der kleinen IMS-Proteine in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen zu überprüfen. Eine weitere Arbeitshypothese umfasst die Rolle von Msp1 in der Qualitätskontrolle des mitochondrialen Proteinimports. Die funktionelle Kooperation zwischen dem TOM-Komplex und Msp1 wurde mithilfe der genetischen Interaktion zwischen *TOM5* und *MSP1* untersucht. Diese Interaktion wurde charakterisiert und die Rolle von Msp1 in der Extraktion von arretierten Vorläuferproteinen analysiert. Darüber hinaus wurde zusätzlich die Interaktion zwischen dem TOM-Komplex bzw. Msp1 und dem Proteasom auf eine mögliche Rolle des Proteasoms bei der Entfernung der extrahierten Proteine untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Kultivierung und Erhaltung von *Saccharomyces cerevisiae*

In dieser Arbeit wurde der Hefestamm W303 $\alpha$  verwendet. Alle Mutanten wurden in diesem Hintergrund generiert und das entsprechende Gen chromosomal durch eine Deletionskassette ersetzt. Die Resistenzkassetten wurden mit einem komplementären Überhang zur Sequenz, die vorher mit der PCR amplifiziert wurde, mittels homologer Rekombination inseriert (vgl. 2.2.2 und 2.2.8). Alle verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Hefezellen wurden entweder in YP (Tabelle 18) oder synthetischen Medium (Tabelle 18) kultiviert. Beide Medienarten wurde mit einer Kohlenstoffquelle (Tabelle 19) ergänzt. Zusätzlich wurde zum synthetischen Medium die Auxotrophiemarker Adenin, Histidin, Leucin, Lysin, Tryptophan und Uracil (Tabelle 20) und bei Bedarf der DropOut-Mix zugegeben (Tabelle 18). Die Kulturen wurden bei 30°C und 140 rpm angezogen und in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Die Optische Dichte (OD<sub>600</sub>) wurde mit dem Dichtemesser Ultrospec 10™ gemessen, dessen höchste Genauigkeit sich in einem Messbereich zwischen 0,6 und 0,8 befand. Die exakten Bedingungen werden für jedes Experiment genau beschrieben.

Tabelle 1 Die verwendeten *S. cerevisiae* Stämme, der Genotyp und Erzeuger.

Name des Hefestammes	Genotyp	Generiert
<b>W303<math>\alpha</math></b>	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2-1, his3-11,15 leu2,112 trp1</i> <i>ura23-53 can1-100</i>	Rothstein et al., 1983
<b><i>cdc48-3 (HIS3 MX6)</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, cdc48-3::HIS3MX6</i>	Cheng und Chen, 2010
<b><i>cdc48-3 (HIS3 MX6) <math>\Delta</math>msp1</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, cdc48-3::HIS3MX6 <math>\Delta</math>msp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>cdc48-3 (KanMX4)</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, cdc48-3::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>cdc48-3 (KanMX4) <math>\Delta</math>msp1</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, cdc48-3::KanMX4 <math>\Delta</math>msp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>GAL10-ERV1</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, HIS3 MX6:P<sub>GAL10</sub>::ERV1</i>	Mesecke et al., 2005
<b><i>GAL10-ERV1 <math>\Delta</math>msp1</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, HIS3 MX6:P<sub>GAL10</sub>::ERV1</i> <i><math>\Delta</math>msp1::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>GAL10-MIA40</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, HIS3 MX6: P<sub>GAL10</sub>::MIA40</i>	Diese Arbeit
<b><i>GAL10-MIA40 <math>\Delta</math>msp1</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, HIS3 MX6: P<sub>GAL10</sub>::MIA40</i> <i><math>\Delta</math>msp1::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i><math>\Delta</math>get1</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, <math>\Delta</math>get1::HIS3MX6</i>	Diese Arbeit
<b><i><math>\Delta</math>get1<math>\Delta</math>msp1</i></b>	<i>W303<math>\alpha</math>, <math>\Delta</math>get1::HIS3MX6 <math>\Delta</math>msp1::HphMX</i>	Diese Arbeit

---

<b><i>Δget1Δtom5Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δtom5::KanMX4 Δget1::HIS3MX6 Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δmsp1::KanMX4</i>	Nikola Wagener
<b><i>Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δrpn9</i></b>	W303α, <i>Δrpn9::TRP1</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δrpn9Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δrpn9::TRP1 Δmsp1::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δrpn10</i></b>	W303α, <i>Δrpn10::TRP1</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δrpn10Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δrpn10::TRP1 Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δrpn10Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δrpn10::TRP1 Δmsp1::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δsop4</i></b>	W303α, <i>Δsop4::KanMX4</i>	Mirjam Wagner
<b><i>Δsop4Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δsop4::KanMX4 Δmsp1::HphMX</i>	Mirjam Wagner
<b><i>Δtim8</i></b>	W303α, <i>Δtim8::HIS3MX6 Δmsp1::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δtim8Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δtim8::HIS3MX6 Δmsp1::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δtom5</i></b>	W303α, <i>Δtom5::KanMX4</i>	Mirjam Wagner
<b><i>Δtom5Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δtom5::KanMX4 Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δtom5Δrpn10Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δtom5::KanMX4 Δrpn10::TRP1 Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δtom6</i></b>	W303α, <i>Δtom6::KanMX4</i>	Mirjam Wagner
<b><i>Δtom6Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δtom6::KanMX4 Δmsp1::HphMX</i>	Mirjam Wagner
<b><i>Δtom7</i></b>	W303α, <i>Δtom7::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δtom7Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δtom7::KanMX4 Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δtom20</i></b>	W303α, <i>Δtom20::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δtom20Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δtom20::KanMX4 Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δtom70</i></b>	W303α, <i>Δtom70::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>Δtom70Δmsp1</i></b>	W303α, <i>Δtom70::KanMX4 Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Tom22Δ3'UTR</i></b>	W303α, <i>Tom22Δ3'UTR::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>Tom22Δ3'UTRΔmsp1</i></b>	W303α, <i>Tom22Δ3'UTR::KanMX4 Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Tom40Δ3'UTR</i></b>	W303α, <i>Tom40Δ3'UTR::KanMX4</i>	Diese Arbeit
<b><i>Tom40Δ3'UTRΔmsp1</i></b>	W303α, <i>Tom40Δ3'UTR::KanMX4 Δmsp1::HphMX</i>	Diese Arbeit
<b><i>Msp1-His<sub>7</sub></i></b>	W303α, <i>Msp1ΔStop-3'UTR:: KanMX4-7xHis</i>	Nikola Wagener

---

Die Hefestämme wurden auf Agarplatten, die mit Parafilm verschlossen waren, bei 4°C gelagert. Für die Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden die Stämme in 15% Glycerol resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

## 2.2. Molekularbiochemische Methoden

### 2.2.1. Isolierung genomischer DNS

Die genomische DNS aus *S. cerevisiae* wurde aus logarithmischen Kulturen mittels des Wizard® Genomic DNA Purification Kit von Promega isoliert.

### 2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR= Polymerase chain reaction) ermöglicht die Amplifikation von selektierten DNS-Abschnitten mit spezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zum entsprechenden DNS-Abschnitt sind. Die Primer wurden selber entworfen und bei Eurofins Genomics bestellt. Die PCR wurde nach einem allgemeinen Schema zusammengeführt, das in Tabelle 2 ersichtlich ist.

Tabelle 2 Allgemeines Schema der Zusammensetzung der Polymerase-Kettenreaktion.

Komponenten	Volumen (1x)
Genomische DNA	1 µl
Primer 1: vorwärts (10 ng/µl)	2,5 µl
Primer 2: rückwärts (10 ng/µl)	2,5 µl
Phusion Puffer (10x)	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Phusion Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	32 µl
<b>Σ</b>	<b>50 µl</b>

Das PCR Programm (Tabelle 3) wurde an die Phusion DNS Polymerase von NEB angepasst. Die Anlagerungstemperatur wurde entsprechend der Schmelztemperatur der Primer und die Elongationszeit entsprechend der Größe des PCR-Produktes gewählt.

Tabelle 3 Generelles PCR-Programm mit Temperatur, Zeit und Zyklenanzahl.

Programm	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
<b>Anfängliche Denaturierung (Hot Start)</b>	98°C	5 min	1x
<b>Denaturierung</b>	98°C	1 min	} 35x
<b>Anlagerung</b>	x°C	1 min	
<b>Elongation</b>	72°C	30 sec / 500 bp	
<b>Finale Elongation</b>	72°C	5-10 min	1x
<b>Lagerung</b>	20°C	5 min	1x

### 2.2.3. Liste der Oligonukleotiden

Die verwendeten Oligonukleotide für die PCR zum Klonieren von Deletionskassetten und Plasmiden sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4 Liste der verwendeten Oligonukleotide mit Sequenz und Verwendung

Name	Sequenz (5' -> 3')	Verwendung
<b>E193Q fwd</b>	CAAGTTACAACCTTGTATAATATTCATTGACCAAATTG ATTCATTCTTAGAGAAC	Klonierung von pRS315- Msp1E193Q
<b>E193Q rev</b>	GTTCTCTAAGGAATGAATCAATTTGGTCAATGAATATT ATACAAGGTTGTAACCTG	Klonierung von pRS315- Msp1E193Q
<b>Get1_S1</b>	GCAGGACAGTTTGAATCCTTGAACCTACGTCTAGTTG ATTGAAATAGGAGAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	Generierung von <i>Δget1</i>
<b>Get1_S2</b>	GTATACTCCAATACATAAACATATTATATATACGTACA TAATGTAATAACACTAATCGATGAATTCGAGCTCG	Generierung von <i>Δget1</i>
<b>Get1_g_fwd</b>	CGTCTAGTTGATTGAAATAGGAGAA	Überprüfung von <i>Δget1</i>
<b>Get1_g_rev</b>	CTTTCTATTGTACTCCAATACATAAAC	Überprüfung von <i>Δget1</i>
<b>His3_in_Rev</b>	CAGAGCATGTATCATATGGTCCAG	Überprüfung von <i>Δget1</i>
<b>Msp1_fwd_500bp</b>	ATCTTTTTTACACCGTATATGATAAAATAC	Generierung von <i>Δmsp1</i>
<b>Msp1_rev_500bp</b>	GTTCTTCAGGCCATTAGATATC	Generierung von <i>Δmsp1</i>
<b>Msp1 for Nco1 (Rachel Zeng, Nikola Wagner)</b>	GCGCCATGGGTATGTCTCGCAAATTTGATTTAAAAC G	Klonierung von pYX242- Msp1, pYX242-Msp1E193Q, pYX242-Msp1E193Q-His <sub>7</sub> , pYX232-Msp1
<b>Msp1 rev Stop HindIII (Rachel Zeng, Nikola Wagner)</b>	GCGAAGCTTTTAATCAAGAGGTTGAGATGAC	Klonierung von pYX242- Msp1, pYX242-Msp1E193Q, pYX232-Msp1

<b>NotI_Msp1p_fwd_II</b>	GCGGCGGCCGCTTTCACCGTGGAGACC	Klonierung von pRS315-Msp1, pRS315-Msp1E193Q-His <sub>7</sub>
<b>Apal_Msp1t_rev_II</b>	GCGCTCGAGCCCACTTAAGCCTTCTTGT	Klonierung von pRS315-Msp1, pRS315-Msp1E193Q-His <sub>7</sub>
<b>RPN9_del_fwd</b>	CCAAAAAGCAAACAGTGGGCACACGCGAGGAAACCA CATTATATTTGCAAGGAATTCGAGCTCGCCTCGAGG C	Generierung von <i>Δrpn9</i>
<b>RPN9_del_rev</b>	CTGCATTATATATATGTGTGCGTGTGTTTTATATAT AACTGCCAATGGCCGCGCAAAGTGAACGATCATTCA C	Generierung von <i>Δrpn9</i>
<b>RPN10_del_f</b>	CGTAAAGAAAGAAGGGAAAAGTCAATAAATAACTCA GCAGTAACCGCACAGAATTCGAGCTCGCCTCGAGGC -	Generierung von <i>Δrpn10</i>
<b>RPN10_del_r</b>	GTTATATATGCTTTATTTGGTTTATATATGACCCATATA GATATTTTTGTACACTA CGCGCAAAGTGAACGATCATTAC	Generierung von <i>Δrpn10</i>
<b>RPN10_1</b>	CCTCTCTGATTAGTTCCTTTGATTG	Überprüfung von <i>Δrpn10</i>
<b>RPN10_2</b>	C CGTGTCTGTCAATCTCTCC	Überprüfung von <i>Δrpn10</i>
<b>Tim8_fwd</b>	GGCCTTTTGATCAACTGATTGATC	Generierung und Überprüfung von <i>Δtim8</i>
<b>Tim8_rev</b>	GTTGTACATCTCCAGAGGCTG	Generierung und Überprüfung von <i>Δtim8</i>
<b>Tom7_S1</b>	GTTCCCTCTTATCTCTCAATATTTGCCAAAATTAGCTTT TAACAAATAAACCATG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Generierung von <i>Δtom7</i>
<b>Tom7_S2</b>	CAAAATTGAAATATGGGCTTCTCTCTCACCCAAGTT GTATCGAACTGATGTTTTTA ATCGATGAATTCGAGCTCG	Generierung von <i>Δtom7</i>
<b>Tom7_500bp_fwd</b>	GATAACCAGGTTACCATAACAGGG	Überprüfung von <i>Δtom7</i>
<b>Tom7_500bp_rev</b>	GAAGACAAGAGAAAGGTCAGATCC	Überprüfung von <i>Δtom7</i>
<b>Tom20_S1</b>	CCTACAAGAAACATTGCCTCAAGTGCCACCTTCATAAA GTTTATTTTCTATTATG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Generierung von <i>Δtom20</i>
<b>Tom20_S2</b>	CAGAGTAAAAGAAACAAAACGGAGAAAAAAGCAA GCAAAATGTTACTCTCA ATCGATGAATTCGAGCTCG	Generierung von <i>Δtom20</i>
<b>Tom22 3UTR KO fwd (S3)</b>	CTAATAACATATTGGCCAAGGTGAAAAGATGCTGC AGCAACAGCCAATTAA CGTACGCTGCAGGTCGAC	Generierung von <i>TOM22Δ3'UTR</i>
<b>Tom22 3UTR KO rev</b>	GGAAGTTCATAGAAGTCTGAATGGGTACTATGACT ATGTATTGATATAGC ATCGATGAATTCGAGCTCG	Generierung von <i>TOM22Δ3'UTR</i>
<b>Tom403UTR_500bp_fwd wd</b>	CTTTATACTCCAGAAGTACGCG	Generierung von <i>TOM40Δ3'UTR</i>

<b>Tom403UTR_500_rev</b>	CTCCGTGATATCGAACACTTG	Generierung von <i>TOM40Δ3'UTR</i>
<b>Tom70_S1</b>	GCAAGATTCGGAAGTGAAATTACAGCTCACATCTAGG TTCTCAATTGCCAATG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Generierung von <i>Δtom70</i>
<b>Tom70_S2</b>	GTTACTTAGTTTTGTCTTCTCCTAAAAGTTTTAAGTT TATGTTTACTGTTTA ATCGATGAATTCGAGCTCG	Generierung von <i>Δtom70</i>
<b>MDM30_S1</b>	GAGAAACCTGAACAATTTTTCGGTATTAGTTACTAAAA GGCTCACATATACATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	Generierung von <i>Δmdm30</i>
<b>MDM30_S2</b>	GTGTAATAGAATGTGTCAGGATGCTACTTTTGAAAC CTCCTTAAATATGACTAATCGATGAATTCGAGCTCG	Generierung von <i>Δmdm30</i>
<b>MDM30_fwd_check</b>	GCTTCAGATATTCAAGGAACCGT	Überprüfung von <i>Δmdm30</i>
<b>MDM30_rev_check</b>	GTCGTACTTTTGATGCTGCTGT	Überprüfung von <i>Δmdm30</i>

#### 2.2.4. Agarosegelelektrophorese

Das PCR-Produkte wurde nach der Amplifikation mit Eazy Vision (6x) eingefärbt und anhand der Agarosegelelektrophorese mit einer Spannung von 120 mV nach der Größe getrennt. Die 1% (w/v) Agarose wurde in 1xTAE Puffer gelöst und aufgeköcht. Um die genaue Größe zu bestimmen, wurde eine DNS-Leiter (NEB), 1 kb (1:15) oder 100 bp (1:15), aufgetragen. Die Banden des PCR-Produkts und der DNS-Leiter wurden mit dem Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ und der Software Image Lab™ von Bio-Rad visualisiert.

#### 2.2.5. Gelextraktion

Nachdem das PCR-Produkt sichtbar gemacht wurde, wurde diese mit einem Skalpell unter UV-Belichtung aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Gelextraktion wurde nach dem Protokoll des QIAGEN Gel Exkrations Kit durchgeführt. Zusätzlich wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt eingeführt um den PE Buffer vollständig zu entfernen. Dafür wurde 5 Minuten anstatt 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNS wurde mit 30 µl Wasser eluiert und die Konzentration mit dem NanoPhotometer P330 von IMPLLEN gemessen.

#### 2.2.6. Restriktionsverdau

Für die Insertion von DNS-Fragmenten in Plasmide wurden beide DNS-Abschnitte vorher mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Es wurden 20 Einheiten Enzym für maximal 20 µg DNS in dem entsprechenden Puffer verwendet. Die Zusammensetzung des Restriktionsverdau ist in Tabelle 5 beschrieben. Der Verdau wurde für eine Stunde bei der vom Hersteller (NEB) empfohlenen Temperatur durchgeführt. Danach wurde der Ansatz über die Gelelektrophorese und anschließend mittels Gelextraktion aufgereinigt.



Tabelle 5 Zusammensetzung des Restriktionsverdau mit zwei Enzymen

Komponenten	Volumen (1x)
Gereinigte DNS	x $\mu$ l
Enzym 1	1 $\mu$ l
Enzym 2	1 $\mu$ l
10x Puffer	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l – x $\mu$ l
$\Sigma$	20 $\mu$ l

### 2.2.7. Ligation

Das verdaute DNS-Fragment und Plasmid wurden mittels der T4-DNS-Ligase kovalent zusammengeführt. Der Ligationsansatz wurde mittels des LIGATION CALCULATORs für ein Verhältnis von 1:3 oder 1:5 (Vektor:Insert) berechnet ([http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html), 03.09.2018). Anschließend wurde die Ligation über Nacht bei 15°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch eine Hitzebehandlung bei 65°C für 10 Minuten gestoppt.

Tabelle 6 Ligationsansatz mit der T4 DNS Ligase

Components	Volume (1x)
Vektor	x $\mu$ l
Insert	y $\mu$ l
10x T4 Ligase Puffer	2 $\mu$ l
T4 DNS Ligase	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l – x $\mu$ l – y $\mu$ l
$\Sigma$	20 $\mu$ l

### 2.2.8. Transformation in *E.coli* DH5 $\alpha$ Zellen

Der Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente *E.coli* DH5 $\alpha$  Zellen transformiert. 10  $\mu$ l der Ligation wurden vorsichtig zu 50  $\mu$ l Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis gestellt und anschließend wurde ein Hitzeschock für 2 Minuten bei 42°C durchgeführt. Direkt danach wurden die behandelten Zellen 5 Minuten wieder auf Eis gestellt. Daraufhin wurden 500  $\mu$ l steriles LB-Medium auf die *E.coli* Zellen gegeben und bei 300 rpm für 1 Stunde bei 37°C

geschüttelt. Die Zellen wurden bei 5000xg für 5 Minuten pelletiert, in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampicilin oder Carbenicillin ausplattiert, um auf das Plasmid selektiert zu werden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.9. Plasmid-Präparation (Mini-Präp) mittels Alkali Zellyse

Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden auf eine neue LB-Platte überführt und gleichzeitig wurde eine Flüssigkultur (LB-Medium) angeimpft, die über Nacht bei 37°C geschüttelt wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 10000xg für 5 Minuten geerntet und der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Suspensionspuffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lysepuffer (0,2 M NaOH, 1% SDS) zum Lysieren der Zellen zugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zu dem Gemisch 150 µl 5 M Kaliumacetat (pH 4,8) hinzu pipettiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Mit einem Zentrifugationsschritt bei 13000xg für 10 Minuten wurden die Zelltrümmer pelletiert und der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß transferiert. Die DNS wurde mit 1 ml eiskaltem 100% Ethanol gefällt und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Die gewaschene DNS wurde nochmals bei 13000xg für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die DNS bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zum Schluss wurde das DNS-Pellet in 30 µl sterilen Wasser gelöst. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNS wurde mittels des Nanophotometer von IMPLEN gemessen.

### 2.2.10. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde an der Ludwig-Maximilians Universität (LMU) an der Fakultät für Biologie im Bereich für Genetik in der Abteilung für Sequenzierung durchgeführt.

Tabelle 7 Name der Sequenzierungsprimer und Sequenz

Primer Name	Sequenz (5' -> 3')	Zweck
<b>M13/20</b>	GTAAAACGACGGCCAGTGAGC	Vorwärts Sequenzierung von Inserts in pRS-Plasmiden
<b>M13/rev</b>	CAGGAAACAGCTATGACCATG	Rückwärts Sequenzierung von Inserts in pRS-Plasmiden
<b>pYX rev</b>	GTT CAT TGT TCC TTA TTC AG	Rückwärts Sequenzierung von Inserts in pYX-Plasmiden
<b>pYX232-142 for</b>	TTG CTT AAA TCT ATA ACT AC	Vorwärts Sequenzierung von Inserts in pYX-Plasmiden, die einen <i>TPI</i> Promotor beinhalten
<b>pYX GAL for</b>	TCAAATGTAATAAAAGTATCAAC	Vorwärts Sequenzierung von Inserts in pYX-Plasmiden, die einen <i>GAL</i> Promotor beinhalten

Die Konzentration der DNS wurde an das Protokoll der Abteilung angepasst. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet.

### 2.2.11. Aufreinigung von Plasmiden (Midi-Präp)

Nachdem das neu-designte Plasmid mittels Sequenzierung überprüft wurde, wurde eine Plasmid-Präparation aus einer 50 ml Übernachtskultur durchgeführt. Die Bakterien wurden geerntet und das Plasmid mittels des QIAGEN Plasmid Midi Kit isoliert. Zum Schluss wurde die Plasmid-DNS mittels des Nanophotometer von IMPLEN gemessen und bei -20°C gelagert.

### 2.2.12. Liste der Plasmide

Die verwendeten Plasmide, die als Vektor verwendet wurden oder mit deren Hilfe eine Resistenzkassette amplifiziert wurde, sind in Tabelle 8 beschrieben. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Hefeexpressionsplasmide (pRS- und pYM-Plasmide).

Tabelle 8 Verwendete Plasmide und ihre Beschreibung

Name	Beschreibung
<b>pFA6a-kanMX4</b>	Kanamycin Deletionskassette
<b>pRS315</b>	<i>LEU2</i> -Marker, <i>CEN6</i> , Einzelkopie (Sikorski und Hieter, 1989)
<b>pYES2</b>	<i>URA3</i> -Marker, <i>GAL1</i> Promotor, 2 $\mu$ , hohe Kopienzahl (Invitrogen™)
<b>pYM22</b>	<i>TRP1</i> -Marker (Janke et al., 2004)
<b>pYX242</b>	<i>LEU2</i> -Marker, <i>TPI1</i> Promotor, 2 $\mu$ , hohe Kopienzahl (Novagen)

Die Klonierungsstrategie aller neu-konstruierten Plasmide und ihre Beschreibung sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die dazugehörigen Primer sind in Tabelle 4 aufzufinden.

Tabelle 9 Name der neu-konstruierten Plasmide, ihre Beschreibung und Klonierungsstrategie

Name	Beschreibung und Klonierungsstrategie
<b>pRS315-Msp1</b>	<i>msp1</i> Locus (300 bp aufwärts/abwärts vom ORF) wurde mit den Primern <i>NotI_Msp1p_fwd_II</i> und <i>Apal_Msp1t_rev_II</i> amplifiziert, geschnitten mit <i>NotI</i> -HF und <i>Apal</i> , Puffer CutSmart, und in pRS315 inseriert
<b>pRS315-Msp1E193Q</b>	pRS315-Msp1 wurde mit den Mutageneseprimern E193Q fwd und E193Q rev amplifiziert, um die Punktmutation einzuführen, anschließend mit <i>DpnI</i> behandelt, Puffer 2.1
<b>pYX242-Msp1</b>	<i>MSP1</i> ORF wurde mit den Primern <i>Msp1 for Nco1</i> und <i>Msp1 rev StopHindIII</i> amplifiziert, geschnitten mit <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i> , Puffer 2.1, und in pYX242 inseriert
<b>pYES2-Cytb<sub>2</sub>(1-167)<math>\Delta</math>TM-DHFR</b>	Popov-Celeketic et al., 2008, Popov-Celeketic et al., 2011

---

<b>pYES2-Cytb<sub>2</sub>(1-107)ΔTM-DHFR</b>	Popov-Celeketic et al., 2011
<b>pYES2-Cytb<sub>2</sub>(1-167)ΔTM-DHFR</b>	Popov-Celeketic et al., 2008, Popov-Celeketic et al., 2011
<b>-HIS<sub>6</sub></b>	

---

## 2.3. Zellbiologische Methoden

### 2.3.1. Hefe Transformation mittels Lithium Acetat

Die Transformation in Hefe Zellen wurde gemäß Gietz et al., 1995 durchgeführt. Die stationären Übernachtkulturen wurden morgens auf eine OD<sub>600</sub> 0,2 verdünnt. Nach 4 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die logarithmischen Kulturen bei 10000 rpm für 1 Minute abzentrifugiert, ein Mal mit 1 ml sterilen Wasser und ein Mal mit 1 ml Lösung A gewaschen (Tabelle 10). Das Zellpellet wurde in 50 µl Lösung A resuspendiert und 5 µl Lachssperma DNS (ssDNA (Sigma)) zugegeben. Anschließend wurde 1 µl Plasmid-DNS oder 10-20 µl PCR-Produkt zu den Zellen pipettiert, gefolgt von 300 µl frisch-zubereiteter Lösung B (Tabelle 10). Der Ansatz wurde gevortext und für 30 Minuten bei 30°C und 600 rpm geschüttelt. Anschließend wurde ein Hitzeschock auf 42°C für 30-45 Minuten durchgeführt. Bei der Transformation einer Auxotrophie-Marker enthaltenen Kasette wurden die Zellen kurz pelletiert, in Wasser resuspendiert und direkt auf eine Platte mit dem fehlenden Auxotrophie-Marker gegeben. Die Hefezellen, in die als Marker ein Antibiotikaresistenzgen genomisch integriert wurde, wurden kurz abzentrifugiert und 1 ml YPD wurde zugegeben. Danach wurden die behandelten Hefezellen weitere 2 Stunden bei 600 rpm und 30°C geschüttelt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Wasser resuspendiert und auf YPD-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die verwendeten Antibiotika waren Geneticin (G418, Serva) bei Kanamycinresistenzkassetten und Hygromycin B (Carl Roth) bei Hygromycinresistenzkassetten.

Tabelle 10 Lösung A und Lösung B der Hefe Transformation

Name der Lösung	Bestandteile	Hersteller
<b>Lösung A</b>	0,1 M Lithium Acetat (pH 7,5)	Sigma
	0,01 M Tris-HCl (pH 7,5)	Carl Roth
	0,001 M EDTA	Merck
<b>Lösung B</b>	0,1 M Lithium Acetat	Sigma
	0,01 M Tris-HCl (pH 7,5)	Carl Roth
	0,001 M EDTA	Merck
	50% PEG3550 (Polyethylenglycol) (w/v)	Sigma

---

Die Kulturplatten wurden mehrere Tage bei 30°C inkubiert und einzelne Kolonien erneut auf frischen Selektionsplatten ausgestrichen. Die richtige Integration wurde mittels Westernblot oder gDNS-Isolierung und anschließender PCR überprüft.

### **2.3.2. Tüpfeltest**

Um das Wachstum von verschiedenen Hefe Stämmen zu vergleichen, wurde ein Tüpfeltest durchgeführt. Die stationären Übernachtskulturen wurden morgens auf 0,2 ODs verdünnt und nach ca. 5 Stunden wurde 1 OD der logarithmischen Kultur geerntet. Das Pellet wurde mit sterilem Wasser gewaschen, die Zelldichte auf OD 1 eingestellt und anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:10 vorbereitet. 3,5 µl jeder Verdünnung wurden der Reihe nach auf eine Hefepatte getropft. Das Wachstum der Hefezellen wurde an den nachfolgenden Tagen fotografisch dokumentiert und analysiert.

## **2.4. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.4.1. Gewinnung von Gesamtzellextrakten mittels alkalischer Zellyse**

Die Analyse von Proteinmengen wurde nach der Aufbereitung der Gesamtzellextrakten aus Flüssigkulturen mittels alkalischer Zellyse durchgeführt, die in Kushnirov, 2000 beschrieben ist. Das Pellet wurde in 50 µl 3x Laemmli Puffer (150 mM Tris-HCl (pH 6,8), 3 mM EDTA, 0.02 % Bromophenol blau, 30 % Glycerol, 6 % SDS und frisch-hinzugefügten 6% β-Mercaptoethanol) für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Danach wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### **2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde mittels des Quick Start™ Bradford Protein Assays (Bio-Rad) bestimmt. Bei jeder Proteinbestimmung wurde eine Eichgerade mit BSA hergestellt und bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

### **2.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Das Vorkommen und die Menge an Proteinen wurde mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließendem Westernblot visualisiert. Die vorbereiteten Gesamtzellextrakte wurden nochmals für 5 Minuten auf 95°C aufgeköcht und für 1 Minute bei 13000 rpm abzentrifugiert. Abhängig vom Experiment und der Größe der Proteine, wurden sie in einem 8%, 12 % oder 16% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Jedes Gel bestand aus drei Teilen, dem Boden-, Trenn- und Sammelgel, deren Zusammensetzung in Tabelle 11 beschrieben wird. Für eine genaue Größenbestimmung wurde ein Proteinmaker, Unstained Protein MW Standard (Thermo Fisher Scientific) oder Prestained Protein MW Standard (Bio-Rad) neben die Proben aufgetragen. Das Gelelektrophorese System wurde mit 1x SDS-Laufpuffer (0,25 M Glycin,

0,025 M Tris, 0,1 % SDS, pH 8,4) aufgefüllt und die Proteine wanderten mit einer Stromstärke von 30-40 mA pro Gel für 1,5 – 3 Stunden.

Tabelle 11 Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gel, das aus Boden-, Trenn- und Sammelgel besteht.

Komponente	Bodengel	Trenngel			Sammelgel
		8%	12%	16%	
<b>Acryamid/Bisacrylamid</b>	20%/	8%/	12%/	16%/	5%/ 0,03%
<b>37.5:1</b>	0,12%	0,05%	0,07%	0,1%	
<b>Tris-HCl (pH 8,8)</b>	375 mM	386 mM	386 mM	386 mM	-
<b>Tris-HCl (pH 6.8)</b>	-	-	-	-	60 mM
<b>SDS</b>	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
<b>APS (Ammoniumpersulfat)</b>	0,05%	0,06%	0,06%	0,06%	0,05%
<b>TEMED</b>	0,25%	0,06%	0,06%	0,06%	0,1%
<b>(Tetramethylethylendiamin)</b>					

#### 2.4.4. Proteintransfer auf Nitrocellulose Membran

Die nach der Größe getrennten Proteinen wurde auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Protan 0,45 NC) zwischen zwei Filterpapieren (WhatMan Paper) und Schwämmen in einer Tank-blot-Kammer transferiert. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte von Kathode zu Anode. Die Proteine wurden bei einer Spannung von 380 mA für 45 Minuten in 1x Transferpuffer (0,15 M Glycin, 0,02 M Tris, 20% Methanol) auf die Membran überführt. Bei Wiederverwendung des Transferpuffers wurde die Transferzeit verdoppelt, bis zu einer maximalen Verwendung von 12 Stunden. Nach dem Transfer wurde die Membran mit der Ponceau Lösung (0,02% Ponceau, 3% Trichloressigsäure) gefärbt, um die Gesamtheit an Proteinen zu zeigen und somit auch die Transfereffizienz.

#### 2.4.5. Westernblot

Die Protein-bedeckte Nitrocellulose-Membran wurde in 2% MTBS (2 % (w/v) Milch in 1x TBS (0,14 M NaCl, 0,05 M Tris, pH 7,6) mit 0,05% Tween-20 für 45 Minuten geblockt und danach mit dem Primär-Antikörper (Tabelle 12) in 2% MTBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran drei Mal in 1x TBS mit 0,05% Tween-20 gewaschen und anschließend im Sekundär-Antikörper (Tabelle 13) in 2% MTBS für eine Stunde bei Raumtemperatur gerollt. Die Membran wurde weitere zwei Mal gewaschen und in Klarsichtfolie gelegt.

Tabelle 12 Verwendete Primär-Antikörper

Name	Hersteller/Beschrieben oder Verwendet in
$\alpha$ -Aco1 (Kaninchen)	Mesecke et al., 2005
$\alpha$ -Cox2 (Kaninchen)	Mokranjac et al., 2003
$\alpha$ -Cox17 (Kaninchen)	Mesecke et al., 2005
$\alpha$ -Cyt1 (Kaninchen)	Harner et al., 2014
$\alpha$ -DHFR (Maus)	Origene
$\alpha$ -Erv1 (Kaninchen)	Mesecke et al., 2005
$\alpha$ -Fzo1 (Kaninchen)	Pineda
$\alpha$ -Hsp60 (Kaninchen)	Izawa et al., 2017
$\alpha$ -Hsp70 (Kaninchen)	Harner et al., 2014
$\alpha$ -Mia40 (Kaninchen)	Mesecke et al., 2005
$\alpha$ -Msp1 (Kaninchen)	Nikola Wagener
$\alpha$ -Pgk1 (Maus)	Novex
$\alpha$ -Por1 (Kaninchen)	Harner et al., 2014
$\alpha$ -Rip1 (Kaninchen)	Wagener et al., 2011
$\alpha$ -Tim10 (Kaninchen)	Terziyska et al., 2005
$\alpha$ -Tim13 (Kaninchen)	Mesecke et al., 2005
$\alpha$ -Tim23 (Kaninchen)	Terziyska et al., 2005
$\alpha$ -Tim50 (Kaninchen)	Wagener et al., 2011
$\alpha$ -Tom20 (Kaninchen)	Harner, 2011
$\alpha$ -Tom22 (Kaninchen)	Harner, 2011
$\alpha$ -Tom40 (Kaninchen)	Izawa et al., 2017
$\alpha$ -Tom70(Kaninchen)	Mesecke et al., 2005
$\alpha$ -Ubi (Maus)	Merck
$\alpha$ -Ugo1 (Kaninchen)	Pineda
$\alpha$ -Yme1 (Hase)	Izawa et al., 2017

Tabelle 13 Verwendete Sekundär-Antikörper

Name	Hersteller
Goat $\alpha$ -Mouse IgG (H+L)-HRP	Bio-Rad
Goat $\alpha$ -Rabbit IgG (H+L)-HRP	Bio-Rad

### 2.4.6. Detektion von Proteinen

Für die Visualisierung der Proteine wurde eine selbsthergestellte ECL-Lösung verwendet. Zu 1 ml ECL-Lösung (Tabelle 14) wurde 1 µl 30% Wasserstoffperoxid gegeben. Die Membran wurde in eine Klarsichtfolie gelegt und die vorbereitete Lösung auf die Membran getropft. Die am Sekundär-Antikörper angeheftete Peroxidase setzte die ECL-Lösung um, was zur Lumineszenz führte. Das Signal wurde im Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ detektiert.

Tabelle 14 Zusammensetzung der ECL-Lösung und die Hersteller

Name	Konzentration	Hersteller
Luminol	0,044% (w/v)	Sigma
p-Cumarsäure	0,0066% (w/v)	Sigma
Tris-HCl (pH 8,8)	100 mM	Carl Roth

### 2.4.7. Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde verwendet, um geringe Mengen an Proteinen darzustellen, da diese Färbung besonders sensitiv ist. Diese Methode wurde mit dem Silver Stain Plus™ Kit von Bio-Rad durchgeführt.

### 2.4.8. Isolation von Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden aus logarithmisch wachsenden Hefekulturen isoliert. Zunächst wurden die Zellen geerntet und mit Wasser gewaschen, um überschüssiges Medium zu entfernen. Die Zellen wurden mit 100 mM Tris (pH nicht eingestellt) und 10 mM DTT im Schüttler für 10 Minuten bei 30°C behandelt. Da DTT später den enzymatischen Verdau beeinträchtigen würde, wurde nochmals gewaschen und anschließend die Zellwand mittels der Zymolyase T20 (Amsbio) in 1,2 M Sorbitol und 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4) für eine Stunde bei 30°C verdaut. Das Zellpellet wurde zwei Mal mit dem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA, 0,2% BSA-freie Fettsäuren und 1 mM PMSF) gewaschen. Anschließend wurden die Spheroblasten vorsichtig aufgeschlossen, indem diese mit einer abgeschnittenen 5 ml Pipettenspitze in Homogenisierungspuffer auf und ab pipettiert wurden. Die Mitochondrien wurden vom Überstand mittels eines Zentrifugationsschrittes für 10 Minuten bei 12000 rpm getrennt. Zum Schluss wurde das mitochondriale Pellet in SM-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM MOPS-KOH, pH 7,2) resuspendiert, nach einer Proteinbestimmung aliquotiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Mitochondrien wurden bei -80°C gelagert.



### **2.4.9. Gradientaufreinigung von Mitochondrien**

Für eine Aufreinigung über einen Saccharose-Gradienten wurden die isolierten Mitochondrien nicht in  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, sondern weiterbearbeitet. Zunächst wurden das Organellpellet in Puffer A (0,6 M Sorbitol, 5 mM MES (2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure) (pH 6,0), 1 mM EDTA) resuspendiert und bei  $17000\times g$  für 10 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert, um das überschüssige BSA zu entfernen. Die Organellen wurden in 2 ml Puffer A aufgenommen und auf einen linearen Gradienten mit einer Konzentration von 15% bis 60% Saccharose in Puffer A geladen. Nach einem einstündigen Zentrifugationsschritt bei  $134000\times g$  wurde der Gradient fraktioniert und die Mitochondrienfraktion in 0,5 M Saccharose, 20 mM MOPS pH 7,2 und 1 mM EDTA gewaschen. Anschließend wurde mittels eines Bradford Assays die Proteinmenge bestimmt und die Mitochondrien aliquotiert. Die Lagerung erfolgte nach dem Schockfrieren in Flüssigstickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.5. Analyse der UPR<sup>mt</sup> Induktion in *C. elegans***

### **2.5.1. Kultivierung und Erhaltung von *C. elegans***

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurde auf NGM (3 g/L NaCl, 2,5 g/L Bacto-Peptone, 20 g Agar in  $\text{H}_2\text{O}$  geben, nach dem Autoklavieren Zugabe von 0,001 M  $\text{CaCl}_2$ , 5 mg/L Cholesterin, 0,025 M  $\text{KPO}_4$  (pH 6,0)) Platten mit *E. coli* OP50 als Nahrungsquelle bei  $15^{\circ}\text{C}$  gehalten (Brenner, 1974). Damit genug L4 Hermaphroditen für die Experimente vorhanden waren, wurden regelmäßig vier L4 Hermaphroditen mit einem sterilen Platinpickel auf eine neue NGM-Platte transferiert. Bei ausgehungerten Platten, wurde ein kleines Stück des NGM-Agars mit dem Skalpell herausgeschnitten und auf eine neue NGM-Platte mit OP50 positioniert. Für eine längere Lagerung wurden die ausgehungerten Platten, die mit Parafilm umschlossen waren, bei  $15^{\circ}\text{C}$  gelagert oder die Würmer wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.5.2. RNAi Experimente in *C. elegans***

Die RNA interference (RNAi) ist eine übliche und effiziente Methode in *C. elegans* um Gene herunter zu regulieren (Fire et al., 1998). Das Enzym DICER spaltet die doppelsträngige RNA (dsRNA) in kleine eingreifende RNA-Fragmente (single interfering, siRNA) (Yigit et al., 2006). Diese siRNA wird vom RISC-Komplex verwendet, um die Ziel-mRNA zu identifizieren und diese Ziel-RNA zerschneiden, die anschließend degradiert wird (Yigit et al., 2006). Die Translation des entsprechenden Proteins wird verhindert und hat eine Auswirkung auf die Nachkommenschaft. Die Nematoden nahmen die doppelsträngige RNA über die Nahrung auf, die im Bakterienstamm *E. coli* exprimiert wurde. In dieser Arbeit wurden das Protein MSP-1 und TOMM-40 herunterreguliert. Der *mispn-1(RNAi)* Klon stammt aus der Ahringer RNAi Bibliothek (Kamath und

Ahringer, 2003) und der *tomm-40(RNAi)* Klon aus der Vidal *RNAi* Bibliothek (Rual et al., 2004) (Tabelle 15). Zunächst wurden die *RNAi* Klone auf ihre Richtigkeit überprüft und anschließend wurden Glycerin Stocks in L Broth (10 g/L Bacto-Trypthon, 5 g/L Bacto-Hefeextrakt, 5 g/L NaCl in H<sub>2</sub>O (pH 7,0 mit 1M NaOH anpassen)) mit einer Endkonzentration von 15% Glycerin hergestellt. Diese Stocks wurden bei -80°C gelagert.

Tabelle 15 Verwendete *RNAi* Konstrukte und ihre Beschreibung

<b><i>RNAi</i> Konstrukt</b>	<b>Beschreibung</b>
<b><i>tag-208</i></b>	Kontrolle, <i>tag-208</i> ORF in Vektor L4440
<b><i>mispn-1</i></b>	<i>mispn-1</i> ORF in Vektor pL4440, Sequenzierungsprimer L4440F (5'-AGCGAGTCAGTGAGCGAG-3')
<b><i>tomm-40</i></b>	<i>tomm-40</i> ORF aus cDNA in pL4440, Sequenzierungsprimer L4440F (5'-AGCGAGTCAGTGAGCGAG-3')

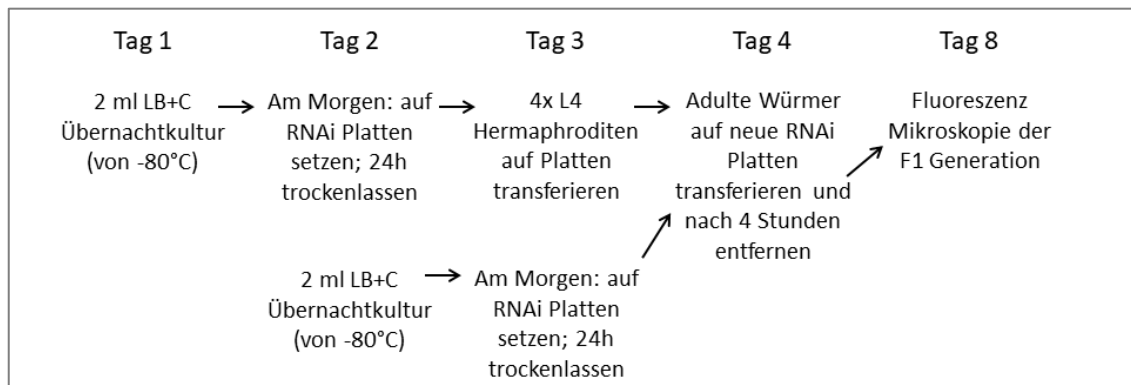


Abbildung 4 Experimenteller Ablauf der *RNAi* Behandlung in *C. elegans* bei 20°C. Von Tag 1 bis Tag 3 wurden die Bakterienkultur, die die doppelsträngige RNA beinhalteten, und die *RNAi* Platten vorbereitet. Zusätzlich wurden am Tag 3 die ersten L4 Hermaphroditen auf die trocknen Platten transferiert. Am Tag 4 erfolgte erneut ein Transfer auf frische Platten. Nach vier Stunden wurden die adulten Nematoden entfernt und die Platten mit den Eiern für vier Tage bei 20°C inkubiert. Am Tag 8 wurde die Signalintensität mittels des Fluoreszenzmikroskops Leica GFP Präpariermikroskops dokumentiert.

Die L4 Würmer vom Wildtyp (MD4432, +/+) und *mispn-1(tm3831) loss-of-function (lf)* (M4430) Mutante, die das Reporterkonstrukt *P<sub>hsp-6</sub>GFP* beinhalteten (Tabelle 16), wurden vier Tage vor dem Beginn des Experiments auf eine neue Platte transferiert und auf 15°C gestellt, um am dritten Tag genug L4 Hermaphroditen zu haben. Der genaue Ablauf des Experiments ist in Abbildung 4 dargestellt. Am Tag 1 wurde die Bakterienkultur in 2 ml LB-Medium + Carbenicillin (100 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 50 µl Bakterienkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 (in LB) auf die *RNAi*-Platten (NGM-Platten mit 1 mM IPTG) pipettiert. Diese Platten wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur für

24 Stunden getrocknet. Am Tag 2 wurden nochmals die Bakterienkulturen vorbereitet, die am Tag 3 fertiggestellt wurden (wie am Tag 2). Am Tag 3 wurden vier L4 Hermaphroditen auf die trockenen Platten (vom Tag 2) transferiert und für 24 Stunden bei 20°C inkubiert. Nach ca. 24 Stunden wurden die nun adulten Würmer auf die neuen Platten (vom Tag 3) überführt und vier Stunden auf diesen Platten gehalten, damit die Nematoden Eier legen konnten. Nach den vier Stunden wurden die Adulten entfernt und die Platten vier Tage bei 20°C inkubiert. Am Tag 8 wurden die Würmer mikroskopisch untersucht.

Tabelle 16 *C. elegans* Stämme MD4432 und MD4430, ihre Beschreibung und Erzeuger.

Name	Beschreibung	Kreuzung
<b>MD4432</b>	<i>+/+</i> ; <i>P<sub>hsp-6</sub>GFP</i>	Stéphane Rolland (3x Rückkreuzung mit SJ4100 (Yoneda et al., 2004))
<b>MD4430</b>	<i>mispn-1(tm3831)</i> , <i>P<sub>hsp-6</sub>GFP</i>	<i>mispn-1(tm3831)</i> wurde im National BioResource Project generiert. Anschließend wurde der Stamm 1x mit N2 und 2x mit SJ4100 rückgekreuzt (Stéphane Rolland)

### 2.5.3. Mikroskopie und Datenanalyse

Für jede *RNAi* Bedingung wurden 5-10 Würmer der F1-Generation mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica GFP Präpariermikroskop (M205 FA) und mit der Software Leica Application Suite (3.2.0.9652) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software Fiji und dem Makro „Worm\_SignalQuantification.ijm“ (Rolland et al., 2019).

## 2.6. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und ihr Hersteller sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17 Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller.

Name der Chemikalie	Hersteller
<b>Aceton</b>	Carl Roth
<b>Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1</b>	Serva
<b>Agar</b>	Carl Roth
<b>Agarose</b>	Applichem

---

<b>Aminopterin</b>	Sigma
<b>Ammoniumhydrogencarbonat</b>	Serva
<b>APS (Ammoniumpersulfat)</b>	Carl Roth
<b><math>\beta</math>-Mercaptoethanol</b>	Sigma
<b>Bromphenolblau-Na-Salz</b>	Carl Roth
<b>Dimethylsulphoxide (DMSO)</b>	Carl Roth
<b>DTT (Dithiothreitol)</b>	Carl Roth
<b>Ethanol</b>	CLN
<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</b>	Carl Roth
<b>Imidazol</b>	Carl Roth
<b>Di-Kaliumhydrogenphosphat</b>	Carl Roth
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Carl Roth
<b>Kaliumhydroxid</b>	Carl Roth
<b>Methanol</b>	CLN
<b>MG-132</b>	Calbiochem
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Carl Roth
<b>MOPS</b>	Carl Roth
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth
<b>Natriumhydroxid</b>	Carl Roth
<b>Protease Arrest Reagenz</b>	Calbiochem
<b>Ponceau</b>	Serva
<b>SDS (Natriumdodecylsulfat)</b>	Carl Roth
<b>TCA (Trichloressigsäure)</b>	Merck
<b>TEMED (Tetramethylethylendiamin)</b>	Invitrogen
<b>Polyethylenglycol 3350</b>	Sigma
<b>PMSF (Phenylmethylsulfonylflourid)</b>	Serva
<b>Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat (TWEEN-20)</b>	Carl Roth
<b>TRIS</b>	Carl Roth
<b>Triton X-100</b>	Serva
<b>Salzsäure, rauchend 37% (HCl)</b>	Carl Roth
<b>Sucrose</b>	Carl Roth
<b>Wasserstoffperoxid</b>	Carl Roth

---

## 2.7. Medien

Die Medien zur Kultivierung der Hefestämme werden in Tabelle 18 und die zugesetzten Kohlenstoffquellen in Tabelle 19 aufgelistet. Zum synthetischen Medium wurden spezifische Auxotrophie- Marker (Tabelle 20) gegeben, um auf das in die Hefe transformierte Plasmid zu selektieren.

Tabelle 18 Zusammensetzung vom Hefe-Pepton-Medium, Synthetischen Minimalmedium und Aminosäuren Mix und die Hersteller, der einzelnen Bestandteile.

Medium	Bestandteile	Hersteller
<b>Hefe-Pepton (YP)</b>	2 % Bacto Pepton	BD
	1% Hefextrakt	Serva
	pH 5,5 mit HCl	
<b>Synthetisches Minimalmedium (S)</b>	1,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basismedium	Sigma
	ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat	
	25 g/l Ammoniumsulfat	Merck
	pH 5,5 mit KOH	
<b>5x DropOut-Mix (Aminosäuren Mix (Complete (C)))</b>	2 g L-Alanin	Serva
	2 g L-Arginin	Sigma
	2,27 g L-Asparagin	Serva
	2 g L-Asparaginsäure	Sigma
	2 g L-Cystein	Sigma
	2 g L-Glutamin	Serva
	2 g L-Glutamat	Serva
	2 g L-Glycin	Merck
	2 g L-Methionin	Sigma
	2 g L-Isoleucin	Carl Roth
	2 g L-Phenylalanin	Carl Roth
	2 g L-Prolin	Carl Roth
	2 g L-Serin	Carl Roth
	2 g L-Threonin	Carl Roth
	2 g L-Tyrosin	Carl Roth
	2 g L-Valin	Carl Roth
	2 g Myo-inositol	Carl Roth
	0,2 g p-Aminobenzoensäure (PABA)	Sigma

Alle Aminosäuren wurden fein  
gemörsert  
5x Aminosäuren Mix: 10 g in 1l H<sub>2</sub>O  
und pH 5,5

Tabelle 19 Verwendete Kohlenstoffquellen, ihre Konzentrationen und Hersteller.

Kohlenstoffquelle	Konzentration (w/v)	Endkonzentration (w/v)	Hersteller
Galactose (Gal)	30%	2%	Sigma
Glucose (D)	40%	2%	VWR Chemicals
Glycerin (G)	30%	3%	Sigma
Lactose	5x	2%	Merck

Tabelle 20 Aminosäuren, die als auxotrophe Marker verwendet wurde, die zum synthetischen Medium zugegeben wurden.

Aminosäure	Konzentration	Hersteller
Adenin (Ade)	40,6 mg/ml	Calbiochem
Histidin (His)	62,85 mg/ml	Merck
Leucin (Leu)	219 mg/ml	Sigma
Lysin (Lys)	180,26 mg/ml	Sigma
Tryptophan (Trp)	82 mg/ml	Merck
Uracil	22,4 mg/ml	Calbiochem

## 2.8. Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Verbrauchsmaterialen und ihre Hersteller sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21 Verbrauchsmaterial und Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Einmalküvetten	Rotilabo
Einzelne PCR-Gefäße	VWR
Eppendorfgefäße (1.5 ml)	Eppendorf
Handschuhe (Größe S)	Meditrade
Milchpulver	Spinnrad
Nitrozellulose Membran	GE Healthcare Life Sciences

<b>Parafilm</b>	Bemis
<b>Petrischalen</b>	Sarstedt
<b>Pipettenspitzen</b>	Nerbe
<b>Pipettenspitzen Makro 1-5 ml</b>	Ratiolab
<b>Schraubröhre (15 ml, 50 ml)</b>	Sarstedt
<b>Whatman® Cellulose Filterpapier</b>	Whatman®

## 2.9. Geräte

Die Geräte, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 22 aufgelistet.

Tabelle 22 Geräte im Labor und Hersteller.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Autoklav</b>	Fedegari GmbH
<b>ChemiDoc XRS+™</b>	Bio-Rad
<b>BioPhotometer plus</b>	Eppendorf
<b>Dewar (Flüssigstickstoffbehälter)</b>	KGW Isotherm
<b>Elektrophorese PowerPac HC High-Current</b>	Bio-Rad
<b>Elektrophorese Power Supply EPS 601</b>	Amersham
<b>Elektrophorese Power Pac 300</b>	Bio-Rad
<b>Feinwaage AB104-S</b>	Mettler Toledo
<b>Gefrierschrank -20°C</b>	Liebherr
<b>Gefrierschrank -80°C HeraFreeze HFU T Series</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Heizblockschüttler Thermomix comfort</b>	Eppendorf
<b>Heizblockschüttler Thermomix F1.5</b>	Eppendorf
<b>Inkubator 37°C</b>	Heraeus
<b>Inkubator 30°C</b>	Memmert
<b>Inkubator für <i>C. elegans</i> (20°C)</b>	Binder
<b>Kühlschrank 4°C Comfort</b>	Liebherr
<b>Kühlzentrifuge 5417R</b>	Eppendorf
<b>Kühlzentrifuge 5810R</b>	Eppendorf
<b>Magnetrührer</b>	Hanna Instruments
<b>Magnetrührer RH basic 2</b>	IKA
<b>Mikroskop MS 5</b>	Leica
<b>NanoPhotometer P330</b>	IMPLEN

<b>PCR T100 Thermal Cycler</b>	Bio-Rad
<b>pH Meter FiveEasy Plus</b>	Mettler Toledo
<b>Pipettierhilfe Pipetboy 2</b>	Integra
<b>Pipetman Classic™ Pipetten P10, P20, P100, P200, P1000</b>	Gilson™
<b>Rollenschüttler Roller6</b>	IKA
<b>Schüttelinkubator New Brunswick Innova 42</b>	Eppendorf
<b>Schüttelinkubator New Brunswick Innova 44</b>	Eppendorf
<b>Schüttler DOS-10L</b>	NeoLab
<b>Sterilbank Herasafe™ Biologische Sicherheitswerkbank</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Tischzentrifuge Eppendorf 5424</b>	Eppendorf
<b>Vortexer Genie 2</b>	Bender & Hobein GmbH
<b>Waage PB3001-S</b>	Mettler Toledo
<b>Zelldichtemessgerät Ultrospec 10™</b>	Amersham Biosciences

## 2.10. Software

Die folgenden Softwares waren für diese Arbeit in Benutzung (Tabelle 23).

Tabelle 23 Name der Software und Verwendungszweck.

<b>Software</b>	<b>Verwendungszweck</b>
<b>Fiji</b>	Quantifizierung von Westernblots, Analyse der RNAi Experimente in <i>C. elegans</i>
<b>Graph Pad Prism</b>	Tabellen, Statistische Analyse und Graphen
<b>Image Lab™</b>	Visualisierung und Quantifizierung von Westernblots, Visualisierung von Tüpfeltests
<b>MaxQuant 1.5.5.1</b>	Analyse der Massenspektrometrie Ergebnisse
<b>Perseus 1.5.5.3</b>	Analyse der Massenspektrometrie Ergebnisse
<b>SnapGene GSL Biotech LLC</b>	Plasmid-Darstellung, Primer design, Sequenzierung



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Analyse von Msp1-Substraten im Intermembranraum von Mitochondrien

##### 3.1.1. Lokalisation von kleinen Intermembranraumproteinen in zellulären Bereichen in Abhängigkeit von Msp1

Ist der GET-Importweg ausgeschaltet, werden TA-Proteine, die eigentlich in der ER-Membran lokalisiert sind, in die mitochondriale Außenmembran inseriert. Die mislokalisierten TA-Proteine werden dann wiederum von Msp1 extrahiert, um Schaden von der Zelle abzuwenden (Chen et al., 2014, Okreglak und Walter, 2014). Es stellte sich allerdings die Frage, wie groß die physiologische Relevanz dieser Funktion ist. Da es sich bei Msp1 um ein mitochondriales Protein handelt, wurde untersucht, ob Msp1 auch einen Einfluss auf endogene mitochondriale Proteine hat.

Erste Ergebnisse von Nikola Wagener und Rachel Zeng (siehe Einleitung 1.7) zeigten, dass die Mengen an kleinen IMS-Proteinen abhängig von der Msp1-Expression sind. Der Abbau dieser Proteine scheint von Msp1 gefördert zu werden, gefolgt von der möglichen Degradierung durch das Proteasom (siehe Einleitung 1.7). Der Import und die Biogenese von kleinen, löslichen IMS-Proteinen ist abhängig von Mia40 und Erv1, die die Hauptkomponenten des MIA-Importweges sind (Chacinska, 2004, Mesecke et al., 2005, Terziyska et al., 2005). Größere Mengen an Erv1 und Mia40 resultieren in einem verstärkten Import von kleinen IMS-Proteinen in den Intermembranraum von Mitochondrien (Chacinska, 2004, Mesecke et al., 2005, Terziyska et al., 2005). Um zu untersuchen, ob die Depletion oder Überexpression einer MIA-Komponente eine Interaktion mit dem Fehlen oder der Überexpression von Msp1 zeigt, wurden Mutanten im *GAL10-MIA40* und *GAL10-ERV1* Hintergrund mit verschiedenen Msp1-Expressionsmengen generiert. Da *MIA40* und *ERV1* essentielle Gene sind, wurden Stämme verwendet, in denen diese Gene durch einen *GAL10* Promotor reguliert werden. Durch Zugabe von Galactose wurde die Expression induziert und mit Glucose gehemmt. Eine phänotypische Wachstumsanalyse (vergl. 2.3.2) wurde auf Glucose- oder Galactose-haltigem synthetischen Medium durchgeführt (Abbildung 5). Im Vergleich zum Wildtyp zeigten *msp1* Deletions- und Msp1-Überexpressionsmutante keinen Wachstumsdefekt auf beiden Medien, genauso wie die Mutanten im *GAL10-ERV1* Hintergrund. Nur Stämme im *GAL10-MIA40* Hintergrund zeigen einen Wachstumsdefekt auf Glucose. Im Gegensatz dazu wachsen die Stämme auf Galactose. Sowohl Mia40 als auch Erv1 sind allerdings essentiell für das Überleben der Hefezelle. Daraus kann man zunächst schließen, dass Mia40 der limitierende Faktor im MIA-Importweg ist. Weiterhin

bemerkenswert ist, dass *GAL10-MIA40-Δmsp1* langsamer wächst als *GAL10-MIA40* und *GAL10-MIA40-Msp1<sup>↑</sup>*. Dies könnte auf eine Überlastung des Intermembranraums aufgrund der Überexpression von Mia40 bei zusätzlichem Fehlen von Msp1 zurückzuführen sein. Diese Situation könnte durch die verstärkte Akkumulation kleiner IMS-Proteine in der *Δmsp1* Mutante entstehen, falls Msp1 für den Export dieser Proteine zuständig sein sollte. Die Regulierung der Mia40-Mengen und die dadurch bedingte Steigerung oder Minderung des Imports von IMS-Proteinen wurde in den im Folgenden beschriebenen Experimenten verwendet.

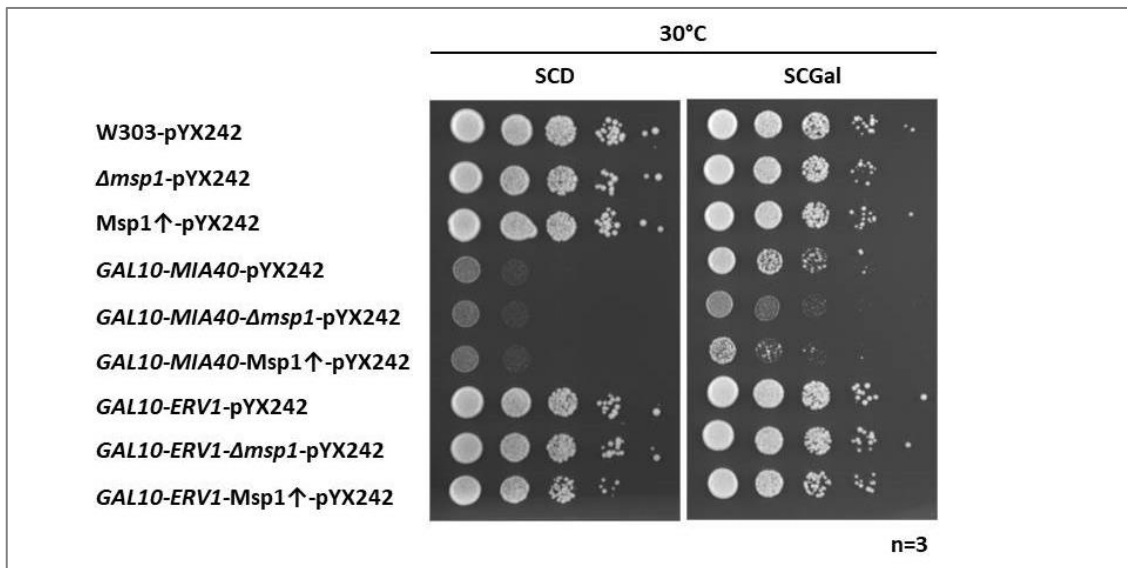
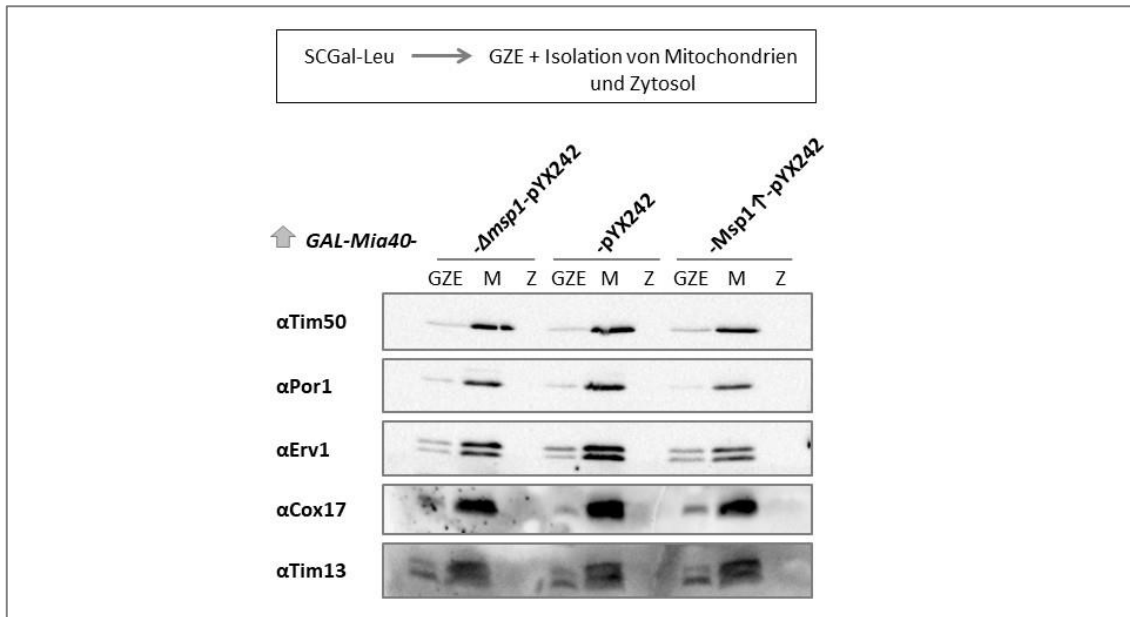


Abbildung 5 Wachstumsanalyse der *GAL10-MIA40* und *GAL10-ERV1* Mutanten mit verschiedenen Msp1-Expressionsmengen. Die Stämme W303-pYX242, *Δmsp1*-pYX242, Msp1<sup>↑</sup>-pYX242, *GAL10-MIA40*-pYX242, *GAL10-MIA40-Δmsp1*-pYX242, *GAL10-MIA40-Msp1<sup>↑</sup>*-pYX242, *GAL10-ERV1*-pYX242, *GAL10-ERV1-Δmsp1*-pYX242 und *GAL10-ERV1-Msp1<sup>↑</sup>*-pYX242 wurden auf Glucose oder Galactose angezogen und auf die entsprechenden Platten in einer Serienverdünnung von 1:10 getüpfelt. n=3.

Um eine mögliche Rolle von Msp1 in der Retrotranslokation von kleinen IMS-Proteinen zu untersuchen, wurden Zellen des Wildtyps, der *Δmsp1* Mutante und der Msp1-Überexpressionsmutante fraktioniert und anschließend die Verteilung kleiner IMS-Proteine auf diese Zellfraktionen bestimmt. Proteine aus Gesamtzellenextrakt, Mitochondrien und Zytosol wurden isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot und Immundekoration analysiert. Diese Fragestellung wurde zunächst in Mia40-überexprimierenden Zellen aus Galactose-haltigem Medium in Abhängigkeit von Msp1-Mengen analysiert, da die Mia-depletierten Mutanten auf Glucose-haltigem Medium nicht lebensfähig waren (Abbildung 6). Die IMS-Proteine Tim13, Cox17 und Erv1 waren ebenso wie die Kontrollen Tim50 und Por1 im Gesamtzellextrakt und in der mitochondrialen Fraktion, aber in keinem Stamm im Zytosol sichtbar. Möglicherweise kommt es aufgrund der hohen Mengen von Mia40 zu einem verstärkten Import von kleinen IMS-Proteinen bis zu deren vollständiger Depletion im Zytosol. Das kann zu einer Verschiebung des Gleichgewichts dieser Proteine zwischen Zytosol und

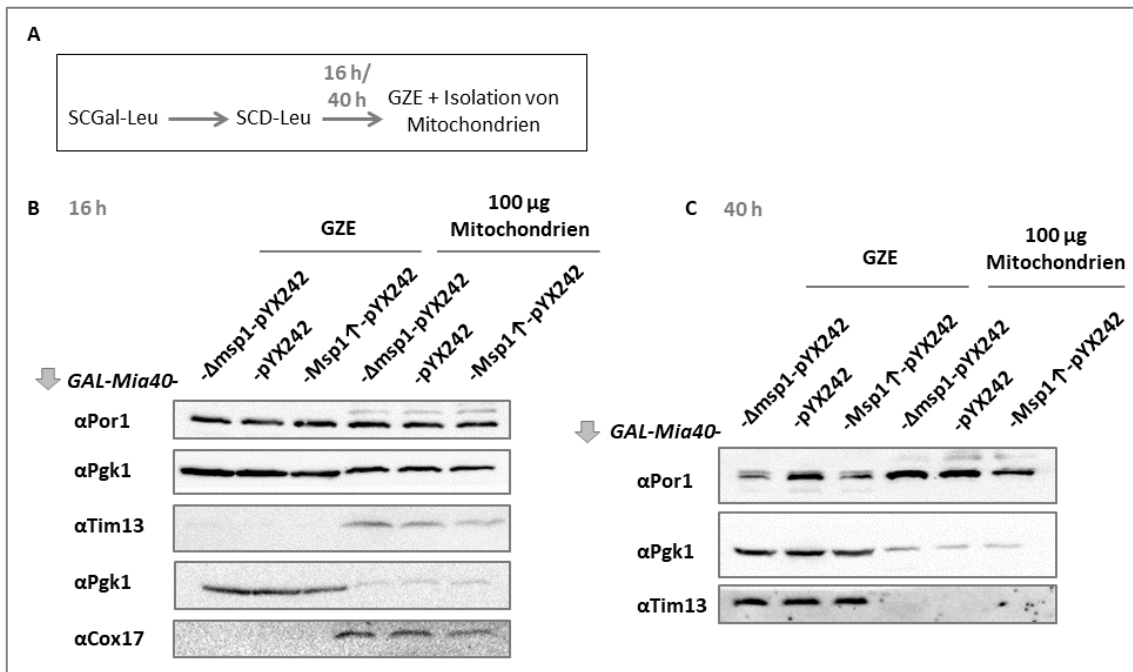
Mitochondrien führen. Aus diesen Gründen wurde dieser Ansatz in Zellen mit reduzierten Mia40-Mengen wiederholt.



**Abbildung 6** Analyse der Verteilung kleiner IMS-Proteine in Mia40-überexprimierenden Zellen in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen. Cox17, Tim13 und Erv1 wurden repräsentativ für die MIA-Substrate dekoriert. Por1 und Tim50 sind mitochondriale Kontrollen. GZE=Gesamtzellextrakt, M=mitochondriale Fraktion und Z=zytosolische Fraktion.

Die Verringerung der Mia40-Mengen führt zu einem verminderten Import kleiner IMS-Proteine. Da eine vollständige Depletion kleiner IMS-Proteine vom IMS vermieden werden sollte, wurde die Abhängigkeit ihrer Verteilung von Msp1 zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (Abbildung 7). Die Hefestämme *GAL10-MIA40*, *GAL10-MIA40-Δmsp1* und *GAL10-MIA40-Msp1↑* wurden zunächst auf Galactose angezogen und anschließend für eine Inkubationszeit von 16 oder 40 Stunden auf Glucose-haltigem Medium inkubiert (Abbildung 7A). Danach wurden Gesamtzellextrakte entnommen und Mitochondrien isoliert. Da keine Proben für das Zytosol entnommen wurden, konnte dieser Anteil der IMS-Proteine nicht direkt bestimmt werden, sondern nur aus dem Verhältnis von Gesamtzellextrakt zu Mitochondrien erschlossen werden. Leider konnte in den Experimenten entweder kein IMS-Protein im Gesamtzellextrakt oder in den Mitochondrien detektiert werden (Abbildung 7B), wodurch die Beantwortung der Fragestellung nach der Verteilung nicht möglich war. Der Vergleich der Menge der IMS-Proteine in den verschiedenen Stämmen zeigte, dass nach 16 Stunden auf Glucose in der Msp1-Überexpressionsmutante etwas weniger Tim13 und Cox17 detektierbar waren. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Experimenten von Rachel Zeng, die in Gesamtzellextrakten einer Msp1-Überexpressionsmutante geringere Mengen der kleinen IMS-Proteine beobachten konnte (siehe Einleitung 1.7). Bei einer langen Inkubationszeit von 40 Stunden war Tim13 nur

noch in den Gesamtzellextrakten und nicht mehr in den Mitochondrien detektierbar (Abbildung 7C). Hier befinden sich die kleinen IMS-Proteine vermutlich im Zytosol. Da sich sowohl die Detektion als auch die Bestimmung der Verteilung von IMS-Proteinen als schwierig erwies, wurde ein alternatives *in vivo* Experiment überlegt, um diese Fragestellung zu beantworten.



**Abbildung 7** Analyse der Verteilung kleiner IMS-Proteine in Mia40-depletierenden Zellen in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen. A) Schematische Abbildung des Experiments. Die Vorkultur wurde auf SCGal-Leu angezogen und danach auf das Medium SCD-Leu gewechselt. Nach einer Inkubationszeit von 16 oder 40 Stunden wurden Gesamtzellextrakte entnommen und Mitochondrien isoliert. B) Analyse der Proteinmenge nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden und C) nach einer Inkubationszeit von 40 Stunden aus SCD-Leu. Es wurden die kleinen IMS-Proteine Tim13 und Cox17, Por1, mitochondriale Kontrolle, und Pgc1, zytosolische Kontrolle, dekoriert. GZE= Gesamtzellextrakt.

### 3.1.2. Untersuchung der genetischen Interaktion zwischen *MSP1* und der Untereinheit *TIM8* des Tim8-Tim13 Komplexes

Da das zuvor beschriebene Experiment (Kapitel 3.1.1) nicht geeignet war, die Verteilung der IMS-Proteine zu bestimmen, wurde ein alternativer Ansatz ohne eine Depletion von Mia40 ausgearbeitet. Die Proteine des Tim8-Tim13 Komplexes gehören zu den kleinen IMS-Proteinen und zu der Familie der kleinen TIM-Proteine, die als Chaperone agieren und für den Transport von hydrophoben Innenmembranproteinen wie Tim23 in die Innenmembran zuständig sind (Paschen et al., 2000, Beverly et al., 2008). Da sich Tim8 und Tim13 gegenseitig stabilisieren, führt das Fehlen einer dieser Untereinheiten zur Reduktion oder sogar zum Verlust der anderen Untereinheit im Intermembranraum (Koehler et al., 1999).

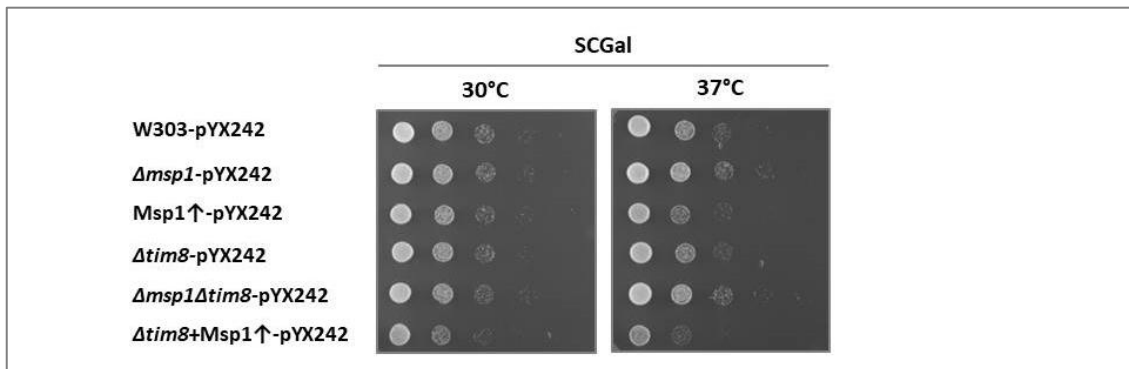


Abbildung 8 Wachstumsanalyse der Stämme W303-pYX242,  $\Delta msp1$ -pYX242, Msp1 $\uparrow$ -pYX242,  $\Delta tim8$ -pYX242,  $\Delta msp1\Delta tim8$ -pYX242 und  $\Delta tim8$ -Msp1 $\uparrow$ -pYX242. Die Vorkulturen wuchsen auf SCGal-Leu und wurden anschließend in einer Serienverdünnung von 1:10 getüpfelt. Die Platten (SCGal-Leu) wurden bei 30°C und 37°C inkubiert.

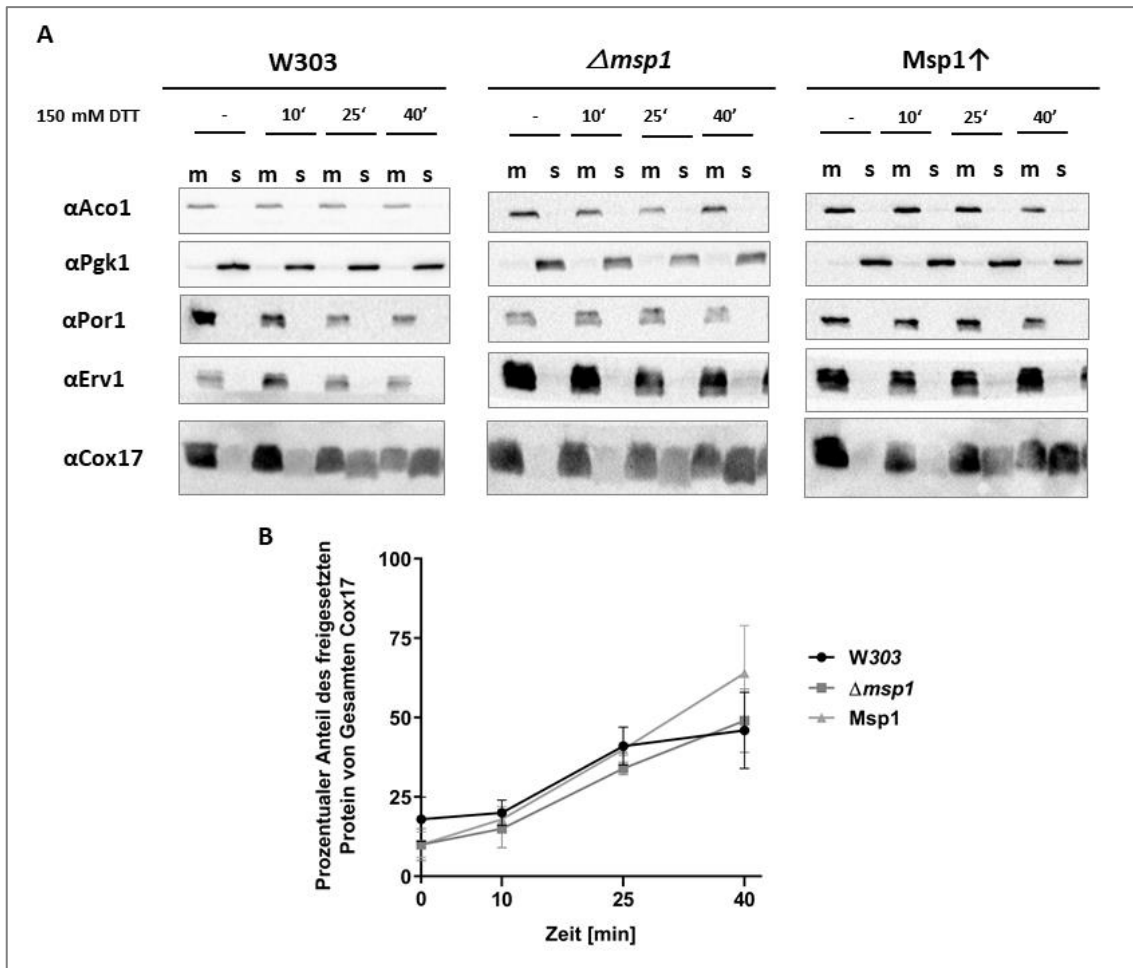
Aus diesem Grund wurde überlegt, ob eine Freisetzung von Tim13 aus dem IMS mit Hilfe der Deletion von *TIM8* analysiert werden kann. Dafür wurde zunächst eine phänotypische Wachstumsanalyse im  $\Delta tim8$  Hintergrund mit verschiedenen Msp1-Expressionsmengen durchgeführt (Abbildung 8). Die Stämme  $\Delta msp1$ , Msp1 $\uparrow$ ,  $\Delta tim8$  und  $\Delta msp1\Delta tim8$  wachsen wie der Wildtyp bei 30°C. Nur der Stamm  $\Delta tim8$ -Msp1 $\uparrow$  zeigt bereits auf 30°C einen leichten Wachstumsdefekt, der mit der Steigerung der Temperatur verstärkt wird. Bei 37°C verhält sich die  $\Delta tim8$  Mutante wie der Wildtyp. Die Doppelmutante  $\Delta msp1\Delta tim8$  und die Einzelmutante  $\Delta msp1$  zeigen ein etwas besseres Wachstum als der Wildtyp und die  $\Delta tim8$  Mutante. Die Msp1-Überexpression führt im  $\Delta tim8$  Hintergrund zu einem leichten Wachstumsdefekt bei 37°C. Depletion oder Überexpression von Msp1 im  $\Delta tim8$  Hintergrund beeinflussen das Wachstum zwar leicht, doch diese Veränderung korrelieren mit dem Wildtyp Hintergrund. Daher eignet sich die  $\Delta tim8$  Mutante vermutlich nicht, um die Verteilung kleiner IMS-Proteine in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen zu untersuchen. Grundsätzlich scheint es schwierig, die Verteilung der kleinen IMS-Proteine *in vivo* zu analysieren. Daher wurde ein *in organello* Freisetzungstest

etabliert, der direkt den Export von IMS-Proteinen veranschaulichen sollte. Bei diesem Experiment sollte eine Kinetik der Freisetzung von kleinen IMS-Proteinen in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen erstellt werden.

### **3.1.3. *In Organello* Freisetzungstest für kleine IMS-Proteine in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen**

Als nächstes wurde ein *in organello* Freisetzungstest durchgeführt, um die Retrotranslokation von IMS-Proteinen in Abhängigkeit von Msp1-Expressionsmengen darzustellen. Es wurden 400 µg isolierte Mitochondrien des Wildtyps, der *msp1* Deletions- und der Msp1-Überexpressionsmutante in Freisetzungspuffer (250 mM Saccharose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM KCl, 5 mM L-Methionine, 10 mM MOPS/KOH (pH 7,2), 10 mM KP<sub>i</sub> (pH 7,4) mit 0,1 mM Proteasom Inhibitor MG-132 resuspendiert. Danach wurden die Mitochondrien mit 150 mM DTT behandelt, um die Disulfidbrücken der kleinen IMS-Proteine zu reduzieren und somit deren Freisetzung aus den Mitochondrien zu ermöglichen. Zu mehreren Zeitpunkten wurden Proben entnommen, um die Retrotranslokation in den Überstand zu verfolgen. Dafür wurden die Mitochondrien vom Überstand durch einen Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 4°C, 10 Minuten) getrennt. Die Proteine aus dem Überstand wurden mittels TCA gefällt und ein Mal mit Aceton gewaschen. Zum Schluss wurden alle Proben mit 25 µl 2x Laemmli Puffer versetzt und sofort bei 95°C für 5 Minuten bei 1100 rpm schüttelnd aufgeköcht. Die Lagerung der Proben erfolgte danach bei -20°C. Die Proteine aus Mitochondrien und Überständen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot und einer Immundekoration analysiert (Abbildung 9A).

In dieser Kinetik wurden die IMS-Proteine Cox17 und Erv1, die mitochondrialen Kontrollen Aco1 (Matrix) und Por1 (mitochondriale Außenmembran) und die zytosolische Kontrolle Pgc1 verfolgt. In allen Stämmen wurde eine Freisetzung von Cox17 beobachtet. Die genauen Mengen des freigesetzten Cox17 aus drei Experimenten wurden quantifiziert (Abbildung 9B). In allen drei Stämmen wurde Cox17 mit einer ähnlichen Geschwindigkeit freigesetzt. Die geringen Unterschiede zwischen den Stämmen ließen schlussfolgern, dass die kleinen IMS-Proteine unabhängig von Msp1 freigesetzt werden. Eine Rolle von Msp1 in der Retrotranslokation von kleinen IMS-Proteinen konnte somit in diesem *in organello* Experiment nicht bestätigt werden.



**Abbildung 9** *In organello* Freisetzung des IMS-Proteins Cox17. Der Test wurde mit isolierten Mitochondrien der Stämme W303,  $\Delta msp1$  und Msp1 $\uparrow$  durchgeführt. Es wurden 0,1 mM Proteasominhibitor (MG-132) und 150 mM DTT zu den Proben gegeben und Aliquots zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Mitochondrien wurden vom Überstand getrennt B) Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert aus drei, unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. n=3.

### 3.2. Analyse der Interaktion zwischen Msp1 und dem TOM-Komplex

Nachdem eine Rolle von Msp1 in der Retrotranslokation von kleinen IMS-Proteinen weder *in vivo* (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2) noch *in organello* (Kapitel 3.1.3) bestätigt werden konnte, wurde diese Arbeitshypothese verworfen. Da weiterhin die Frage offen war, ob Msp1 auch einen Einfluss auf endogene mitochondriale Proteine hat, wurden neue Kandidaten als potenzielle mitochondriale Interaktionspartner mit Msp1 aus einer Tabelle gewählt. Die Auswahl basierte auf einer Studie von Hoppins et al. aus dem Jahr 2011. In dieser Studie wurde eine Tabelle mit der quantitativen Analyse genetischer Interaktionen erstellt. Die Tabelle umfasst 1265 nicht-essentielle und 217 essentielle Gene, die sowohl mitochondriale Proteine als auch Proteine, die funktionell mit den Mitochondrien interagieren, codieren (Hoppins et al., 2011). Diese Tabelle zeigte bereits die genetische Interaktion von  $\Delta msp1$  mit  $\Delta get2$  und  $\Delta get3$ , die Komponenten des GET-Importweges sind (Chen et al., 2014, Okreglak und Walter, 2014).

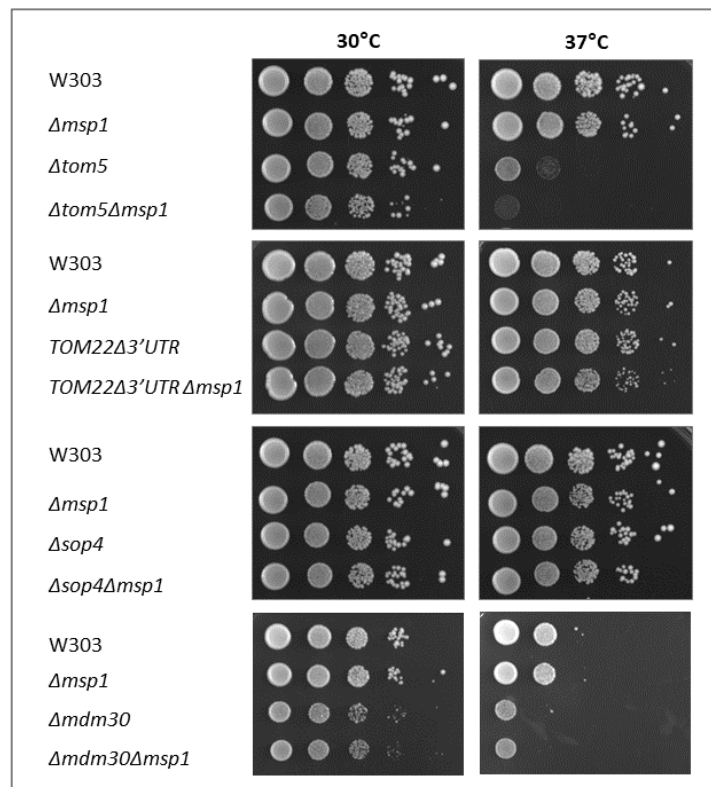


Abbildung 10 Phänotypische Wachstumsanalyse einer genetischen Interaktion von *MSP1* mit den potenziellen Kandidaten *TOM22*, *TOM5*, *SOP4*, und *MDM30*. Die Stämme W303,  $\Delta msp1$ ,  $\Delta tom5$ ,  $\Delta tom5\Delta msp1$ , *TOM22* $\Delta 3'UTR$  und *TOM22* $\Delta 3'UTR\Delta msp1$ ,  $\Delta sop4$ ,  $\Delta sop4\Delta msp1$ ,  $\Delta mdm30$  und  $\Delta mdm30\Delta msp1$  wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe (1:10) auf YPD Platten getüpfelt und bei 30°C und 37°C inkubiert. Diese Analyse wurden von Mirjam Wagner unterstützt.

Die Auswahl der Kandidaten erfolgte nach der Stärke der Interaktion und der Lokalisation an der Außenmembran der Mitochondrien. Diese Kriterien erfüllten die Gene *TOM5*, *TOM22* und *MDM30*. Die Proteine Tom5 und Tom22 sind Untereinheiten des TOM-Komplexes, der als

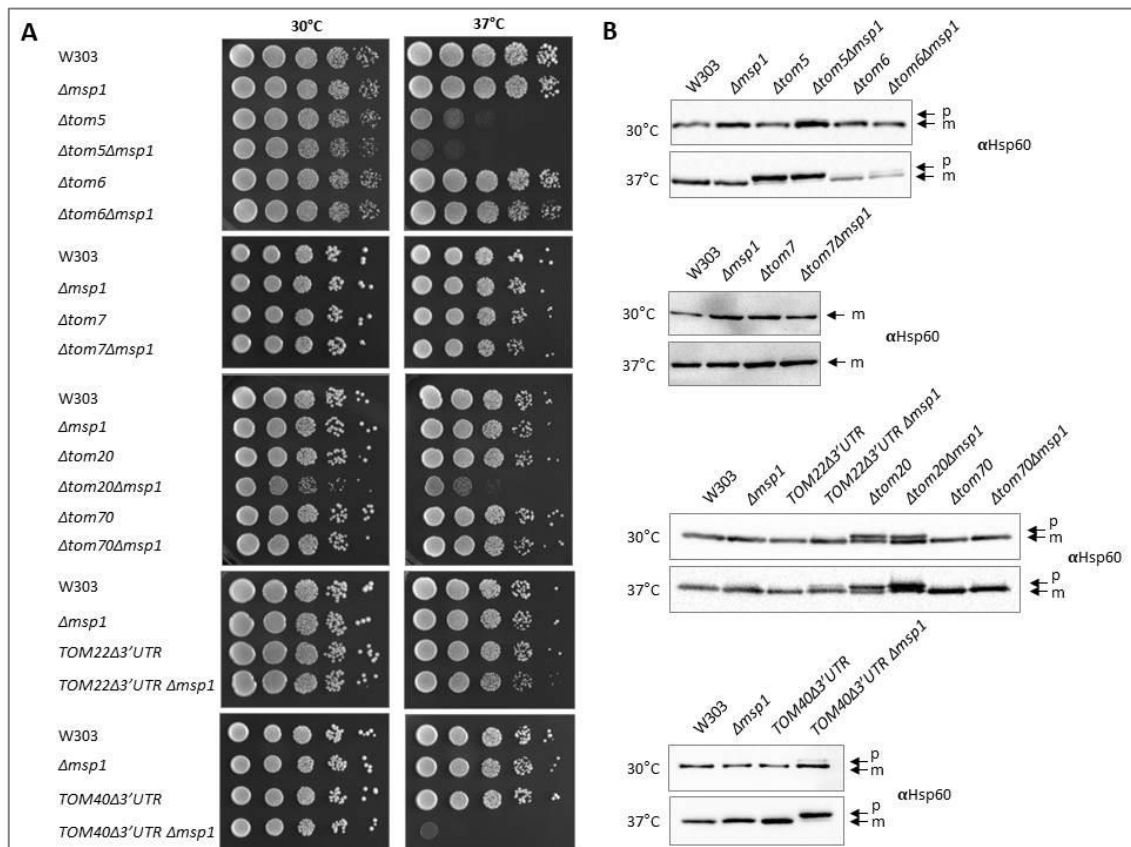


Hauptimportpore für mitochondriale Proteine fungiert. Die Ubiquitin-Ligase Mdm30 ubiquitiniert Proteine, die anschließend durch das 26S Proteasom degradiert werden, und reguliert die mitochondriale Fusion und Fission (detaillierte Analyse ist in Kapitel 3.2.6 zu finden). In die engere Auswahl kam zusätzlich das ER-Membranprotein Sop4, das den EMC (ER Membran Protein Complex) unterstützt, der die Biogenese von Transmembranproteinen im ER fördert, zu denen auch die TA-Proteine gehören (Shurtleff et al., 2018). Die Proteine Mdm30 und Sop4 könnten Msp1 möglicherweise in der Elimination von mislokalisierten ER-TA-Proteinen an der mitochondrialen Außenmembran involviert sein. Es wurden Einzel- und Doppelmutanten mit *MSP1* generiert und anschließend ein Wachstumstest durchgeführt, um eine genetische Interaktion zu überprüfen (Abbildung 10). Eine starke genetische Interaktion wurde in der Doppelmutante *Atom5Δmsp1* bei 37°C bestätigt. Aufgrund der Lokalisation von Msp1 und Tom5 an der Außenmembran von Mitochondrien liegt eine mögliche funktionelle Interaktion von Msp1 mit dem TOM-Komplex nahe. Im Folgenden wurde dieses Ergebnis im Detail weiter untersucht.

### **3.2.1. Untersuchung der genetischen Interaktion zwischen *MSP1* und weiteren Untereinheiten des TOM-Komplexes**

Der TOM-Komplex ist notwendig für die Translokation der meisten mitochondrialen Proteine in oder über die Außenmembran der Mitochondrien und besteht aus sieben verschiedenen Untereinheiten. Tom5 ist eine kleine Untereinheit des TOM-Komplexes, die zwar nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von Zellen ist, allerdings wird bei ihrem Fehlen der Import von Proteinen reduziert, die für verschiedene Subkompartimente der Mitochondrien relevant sind (Dietmeier, 1997). Daher könnte das Fehlen von Tom5 durchaus eine Akkumulation von Vorläuferproteinen an der Importpore des TOM-Komplexes zur Folge haben, die in einer Dysfunktion der Mitochondrien resultiert. Msp1 könnte notwendig sein, um die akkumulierten Proteine zu entfernen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde zunächst untersucht, ob auch eine genetische Interaktion zwischen *MSP1* und weiteren TOM-Untereinheiten besteht. Die Hauptimportpore des TOM-Komplexes bildet das Protein Tom40, das in engem Kontakt mit Tom22 und den drei kleinen TOM-Untereinheiten Tom5, Tom6 und Tom7 steht (Bausewein et al., 2017, Dekker et al., 1998, Hill et al., 1998, Vestweber et al., 1989). Diese fünf Untereinheiten bilden den Kernteil des Komplexes (Dekker et al., 1998). Das Entfernen der kleinen Untereinheiten *TOM6* lässt den TOM-Komplex teilweise zerfallen, während das Fehlen von *TOM7* den Komplex stabilisiert (Hönlinger et al., 1996, Dekker et al., 1998). Eine Deletion von *TOM5* hat keinen Effekt auf den Aufbau des TOM-Komplexes (Dekker et al., 1998, Dietmeier et al., 1997, Hönlinger et al., 1995, Kassenbrock et al., 1993). Die Rezeptorproteine Tom20 und

Tom70 sind nur leicht mit dem TOM-Kernkomplex assoziiert und deren Deletion wird von der Zelle toleriert (Dekker et al., 1998, Lithgow et al., 1994). Es wurden Einzel- und Doppelmutanten mit *MSP1* und den anderen Untereinheiten des TOM-Komplexes generiert: *Δtom6*, *Δtom6Δmsp1*, *Δtom7*, *Δtom7Δmsp1*, *Δtom20*, *Δtom20Δmsp1*, *Δtom70*, *Δtom70Δmsp1*, *TOM22Δ3'UTR*, *TOM22Δ3'UTRΔmsp1*, *TOM40Δ3'UTR* und *TOM40Δ3'UTRΔmsp1*. In den *TOM22* und *TOM40* Mutanten wurde die 3'UTR entfernt, wodurch die Expressionslevel des jeweiligen Proteins nur reduziert wurden, da diese beiden Proteine essentiell für die Zelllebensfähigkeit sind (Baker et al., 1990, Dekker et al., 1998, Lithgow et al., 1994). Alle Deletionsmutanten des TOM-Komplexes wurden auf YPD getüpfelt und bei 30°C und 37°C inkubiert. Es konnte keine genetische Interaktion zwischen *MSP1* und *TOM6*, *TOM7*, *TOM70* und *TOM22* beobachten werden. Dagegen wurde eine genetische Interaktion zwischen *MSP1* und *TOM5* bestätigt und mit *TOM20* und *TOM40* neu identifiziert (Abbildung 11A).



**Abbildung 11** Es besteht eine genetische Interaktion zwischen *MSP1* und den TOM-Untereinheiten. A) Die Stämme W303, *Δmsp1*, *Δtom5*, *Δtom5Δmsp1*, *Δtom6*, *Δtom6Δmsp1*, *Δtom7*, *Δtom7Δmsp1*, *Δtom20*, *Δtom20Δmsp1*, *Δtom70*, *Δtom70Δmsp1*, *TOM22Δ3'UTR*, *TOM22Δ3'UTRΔmsp1*, *TOM40Δ3'UTR* und *TOM40Δ3'UTRΔmsp1* wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe (1:10) auf YPD Platten getüpfelt und bei 30°C und 37°C inkubiert. B) In den angegebenen Stämmen wurden die endogenen Mengen des Chaperons Hsp60 analysiert, dabei wurde zwischen der Vorläuferform (p= precursor) und der prozessierten (m= mature) Form des Proteins unterschieden. Für die Gesamtzellextrakte wurden Zellen aus Flüssigkulturen, die auf 30°C und 37°C angezogen wurden, entnommen, aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration gegen Hsp60 untersucht. (Diese Abbildung wurde modifiziert nach Basch et al., 2020)

In diesen Mutanten wurde auch die Akkumulation von mitochondrialen Vorläuferproteinen im Zytosol untersucht, indem die Hefestämme auf YPD bei 30°C und 37°C kultiviert wurden. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte entnommen, mittels alkalischer Zellyse (Kapitel 2.4.1) aufgeschlossen und via SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration analysiert. Diese Analyse wurde exemplarisch an der Vorläuferform des mitochondrialen Chaperons Hsp60, eines Substrats des TOM-Komplexes (Singh et al., 1990), sowohl in der *tom5* Deletionsmutante als auch in allen weiteren Mutanten des TOM-Komplexes in An- und Abwesenheit von Msp1 bei 30°C und 37°C untersucht (Abbildung 11B). Tatsächlich akkumulierte die Vorläuferform von Hsp60, wenn *TOM5*, *TOM20* und *TOM40Δ3'UTR* mit *MSP1* deletiert waren. Interessanterweise korrelierte eine Akkumulation des Vorläuferproteins mit dem Wachstumsdefekt der Doppelmutanten. Dies zeigt, dass Msp1 eine mögliche Rolle in der Entfernung von akkumulierten Vorläuferproteinen an der TOM-Pore haben könnte und damit der Proteinimport in die Mitochondrien gewährleistet wird.

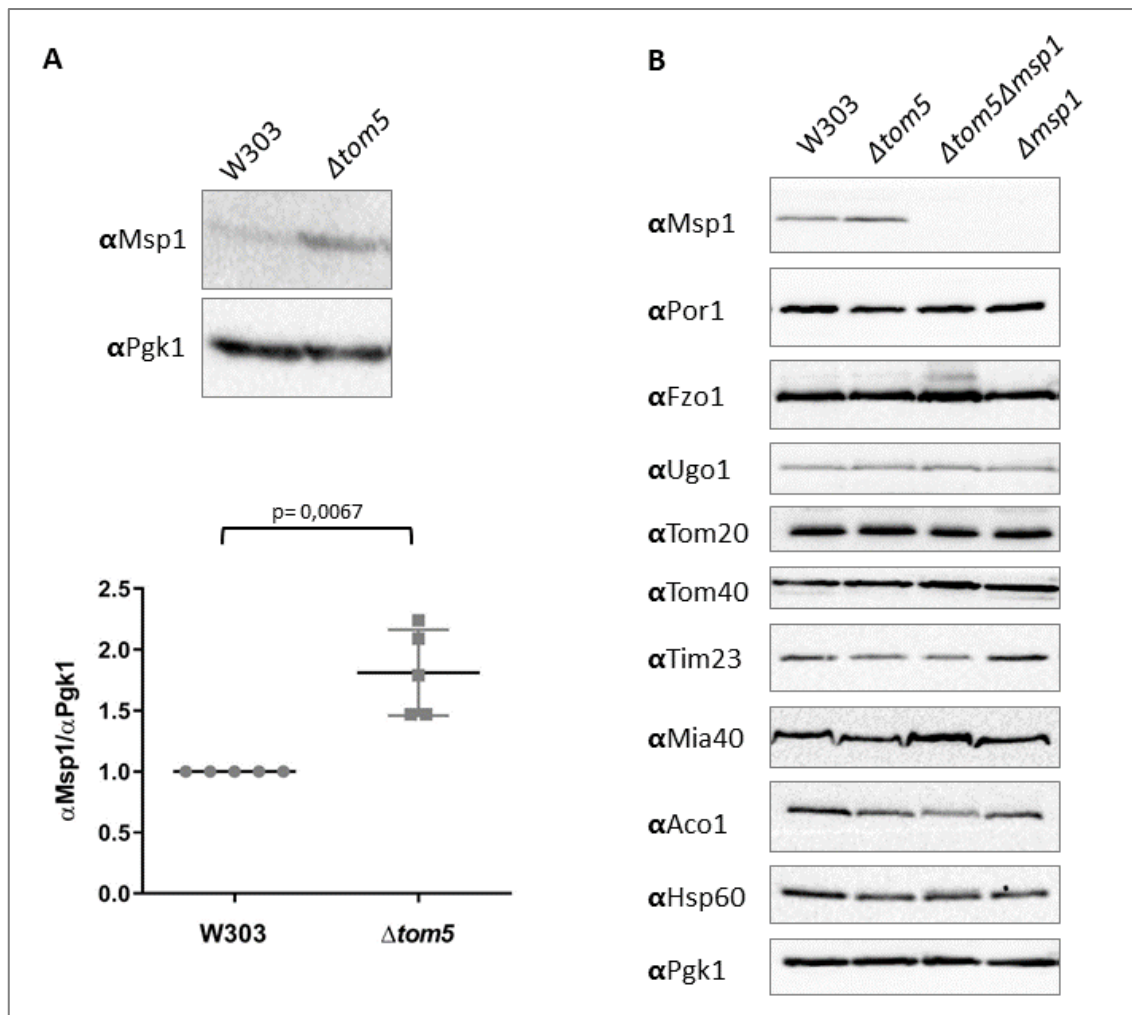
### **3.2.2. Die Funktion von Msp1 bei der Qualitätskontrolle des mitochondrialen Proteinimports**

#### **3.2.2.1. Deletion von *TOM5* führt zur verstärkten Msp1-Expression**

Die Aufrechterhaltung des Proteinimports am TOM-Kanal scheint abhängig von der Anwesenheit von Msp1 zu sein. Daher wäre es für die Zelle von Vorteil die Expression von Msp1 zu verstärken, um eine Störung am TOM-Komplex zu verhindern. Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, ob eine Deletion von *TOM5* einen Einfluss auf die endogenen Msp1-Mengen *in vivo* hat. Dafür wurden Gesamtzellextrakte des Wildtyps und der  $\Delta tom5$  Mutante geladen und ausgewertet (Abbildung 12A). Tatsächlich waren die Msp1-Mengen in der  $\Delta tom5$  Mutante im Durchschnitt um den Faktor 1,7 erhöht. Es scheint, dass die Zelle die Expression von Msp1 hochreguliert, um der Akkumulation von Vorläuferproteinen im  $\Delta tom5$  Hintergrund entgegenzuwirken.

Als nächstes wurde untersucht, ob das Fehlen von Msp1 die Biogenese von anderen mitochondrialen Proteinen beeinflusst und infolgedessen der beobachtete Effekt mit den TOM-Mutanten indirekt sein könnte. Es wurden die Proteine der Außenmembran (Por1, Fzo1, Ugo1, Tom20, Tom40), der Innenmembran (Tim23, Mia40) und der Matrix (Aco1, Hsp60) der Mitochondrien im Wildtyp,  $\Delta tom5$ ,  $\Delta tom5\Delta msp1$  und  $\Delta msp1$  analysiert (Abbildung 12B). Nur die Innenmembranraumproteine Tim23 und Mia40 zeigten leichte reduzierte Mengen in der *TOM5* Deletionsmutante. Die endogenen Level der anderen mitochondrialen Proteine waren in der  $\Delta tom5$  Mutante unverändert. Die Deletion von *MSP1* führte weder im Wildtyp noch im  $\Delta tom5$

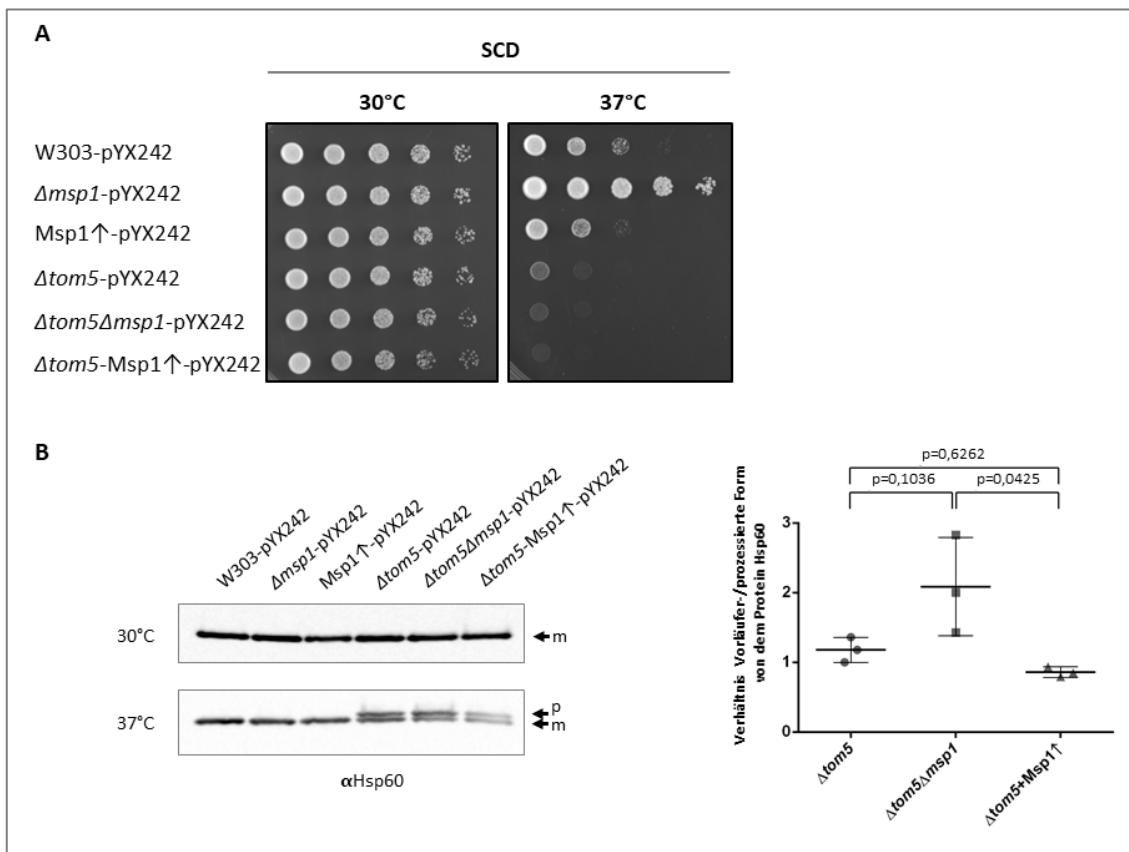
Hintergrund zu Veränderungen in der endogenen Proteinmenge. Daher kann daraus geschlossen werden, dass die genetische Interaktion von *MSP1* mit den TOM-Untereinheiten kein indirekter Effekt ist.



**Abbildung 12** Msp1-Mengen sind in der  $\Delta tom5$  Mutante erhöht und eine Deletion von *MSP1* hat keinen Einfluss auf andere mitochondriale Proteine. A) Die Expression von Msp1 wurde im Wildtyp und in der  $\Delta tom5$  Mutante in YPD Medium bei 30°C untersucht. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration gegen Msp1 und die zytosolischen Kontrolle Pgk1 analysiert. Die Msp1-Mengen wurden zu den Pgk1-Mengen normalisiert und es wurde ein One-Sample t-Test ( $p = 0,0067$ ,  $n=5$ ) durchgeführt. B) Es wurden Gesamtzellextrakte von Zellen der Stämme W303,  $\Delta tom5$ ,  $\Delta tom5 \Delta msp1$  und  $\Delta msp1$  hergestellt, die in YPD Medium bei 30°C wuchsen. Die mitochondrialen Außenmembranproteine (Msp1, Por1, Fzo1, Ugo1, Tom20, Tom40), die Innenmembranproteine (Tim23, Mia40) und die Matrixproteine (Aco1, Hsp60) wurden repräsentativ für jedes Kompartiment dekoriert. Pgk1 wurde als zytosolische Kontrolle verwendet. (In Anlehnung an Basch et al., 2020)

### 3.2.2.2. Die Überexpression von Msp1 hat einen Einfluss auf das Wachstum und auf die Akkumulation des Hsp60-Vorläuferproteins

Da eine verstärkte Expression von Msp1 in der  $\Delta tom5$  Mutante beobachtet wurde (Kapitel 3.2.2.1), wurde überprüft, ob eine Überexpression von Msp1 das Wachstums- und Importdefizit der  $\Delta tom5$  Mutante ausgleichen kann. Dafür wurden die Stämme  $\Delta tom5$ ,  $\Delta tom5\Delta msp1$  und  $\Delta tom5+Msp1\uparrow$  zunächst getüpfelt und anschließend die Hsp60-Level untersucht (Abbildung 13A).

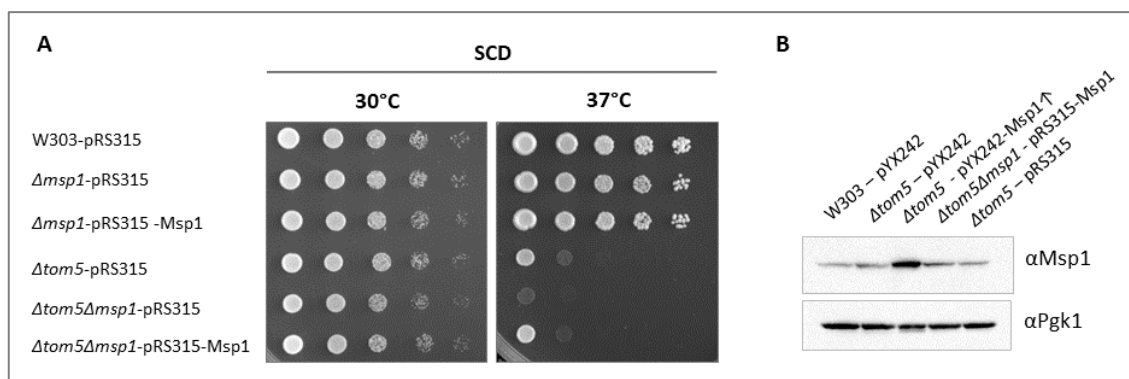


**Abbildung 13** Msp1-Überexpression kompensiert nicht den Wachstumsdefekt im  $\Delta tom5$  Hintergrund, führt aber zu reduzierten Hsp60-Mengen. A) Es wurde eine Wachstumsanalyse der Stämme W303-pYX242,  $\Delta msp1$ -pYX242, Msp1 $\uparrow$ -pYX242,  $\Delta tom5$ -pYX242,  $\Delta tom5\Delta msp1$ -pYX242 und  $\Delta tom5$ -Msp1 $\uparrow$ -pYX242 auf SCD-Leu bei 30°C und 37°C durchgeführt. B) Die Gesamtzellextrakte wurden aus denselben Stämmen entnommen, die in SCD Medium bei 30°C und 37°C wuchsen. Anschließend wurden diese mittels SDS-PAGE, Westernblot und Antikörperdekoration gegen Hsp60 analysiert und es wurde zwischen der Vorläuferform (p=precursor) und der reifen (m=mature) Form des Proteins unterschieden. Die Quantifizierung erfolgte mittels der zwei-fraktionellen ANOVA. n=3. (In Anlehnung an Basch et al., 2020)

Msp1 wurden von einem high-copy Plasmid unter einem konstitutiven Promotor kontinuierlich exprimiert. Wie zuvor beobachtet, war der Wachstumsdefekt der Doppelmutante  $\Delta tom5\Delta msp1$  stärker als in der Einzelmutante bei 37°C (Abbildung 11A). Eine Überexpression von Msp1 konnte diesen Wachstumsdefekt allerdings nicht retten, sondern verstärkte ihn noch etwas (Abbildung 13A). Es scheint, dass eine Überexpression von Msp1 ebenfalls zu Problemen in der Zelle führt.

Die drei Stämme wurden unter vergleichbaren Bedingungen in Flüssigkultur angezogen, anschließend wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und auf Hsp60-Vorläuferproteinakkumulation untersucht, um die Proteinimporteffizienz zu vergleichen (Abbildung 13B). Bei 30°C wurde keine Akkumulation von Vorläuferproteinen festgestellt. Wie bereits in Abbildung 11B gezeigt, akkumuliert die Vorläuferform von Hsp60 bei 37°C stärker in der Doppelmutante  $\Delta tom5\Delta msp1$  als in der Einzelmutante  $\Delta tom5$ . Das Verhältnis zwischen der Vorläuferform und der prozessierten Form von Hsp60 wurden in den drei Stämmen quantifiziert und verglichen (Abbildung 13B). In der  $\Delta tom5+Msp1\uparrow$  wurde verhältnismäßig mehr prozessierte Form im Vergleich zur  $tom5$  Deletionsmutante detektiert. Interessanterweise wies die  $Msp1$ -Überexpressionsmutante zusätzlich eine Reduktion der Gesamtmenge an Hsp60 auf (Abbildung 13B).

Die Überexpression von  $Msp1$  komplementierte den Wachstumsphänotyp überraschenderweise nicht, sondern beeinflusste die Lebensfähigkeit der Zellen negativ. Daher wurde sichergestellt, dass die vorherigen Beobachtungen tatsächlich auf eine genetische Interaktion von  $TOM5$  und  $MSP1$  zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wurde  $Msp1$  von einem single-copy Plasmid unter seinen endogenen Promotor in der  $\Delta tom5\Delta msp1$  Mutante exprimiert (Abbildung 14A). In dieser Analyse konnten die endogenen  $Msp1$ -Mengen den Wachstumsdefekt in der Doppelmutante zumindest auf das Niveau der  $\Delta tom5$  Mutante reduzieren. Daraus kann geschlossen werden, dass der Wachstumsphänotyp der  $\Delta tom5\Delta msp1$  Mutante tatsächlich auf die Abwesenheit von  $Msp1$  zurückgeführt werden kann.



**Abbildung 14** Endogene  $Msp1$ -Mengen retten den Wachstumsdefekt der  $\Delta tom5\Delta msp1$  Mutante auf das Niveau der  $\Delta tom5$  Mutante. A) Das Wachstum der Stämme W303-pRS315,  $\Delta msp1$ -pRS315,  $\Delta msp1$ -pRS315-Msp1,  $\Delta tom5$ -pRS315,  $\Delta tom5\Delta msp1$ -pRS315 und  $\Delta tom5\Delta msp1$ -pRS315-Msp1 wurde auf SCD-Leu Platten bei 30°C und 37°C untersucht. B) Die Gesamtzellextrakte der Stämme W303-pYX242,  $\Delta tom5$ -pYX242,  $\Delta tom5$ -Msp1 $\uparrow$ -pYX242,  $\Delta tom5\Delta msp1$ -pRS315-Msp1 $\uparrow$  und  $\Delta tom5$ -pRS315 wurden mittels SDS-PAGE, Westernblot und Antikörperdekoration gegen  $Msp1$  und die zytosolische Kontrolle  $Pgk1$  analysiert. (In Anlehnung an Basch et al., 2020)

In den Hefestämmen wurden verschiedene Plasmide und Promotor verwendet (Abbildung 13 und Abbildung 14), um  $Msp1$  in unterschiedlichen Mengen zu exprimieren. Diese

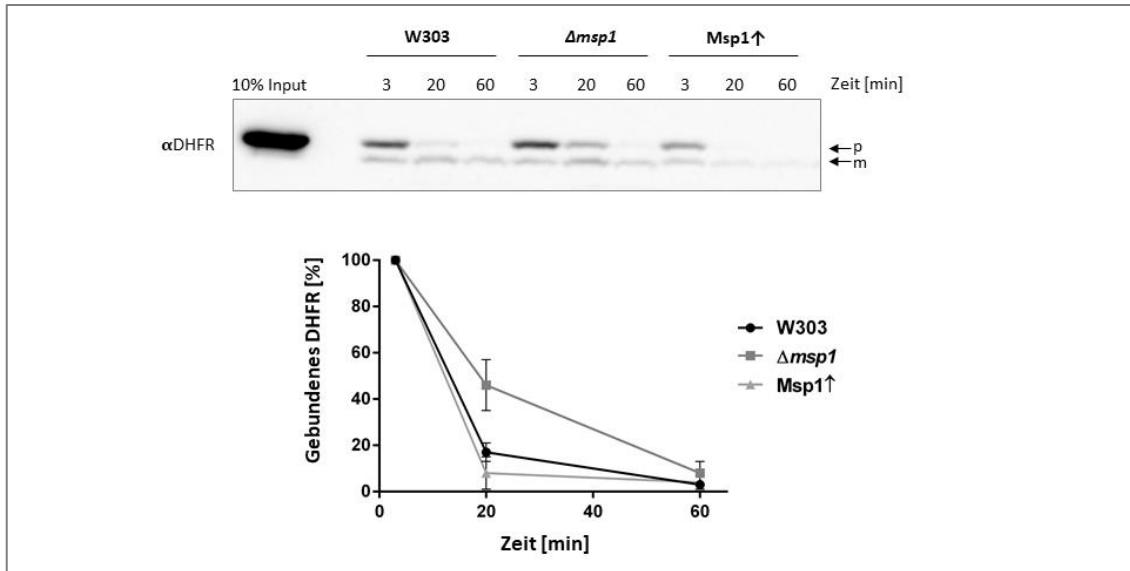
Expressionsmengen wurden als nächstes miteinander verglichen. Dafür wurden Gesamtzellextrakte der Stämme W303-pYX242,  $\Delta tom5$ -pYX242,  $\Delta tom5$ -Msp1 $\uparrow$ -pYX242,  $\Delta tom5\Delta msp1$ -pRS315-Msp1 und  $\Delta tom5$ -pRS315 hergestellt und gegen Msp1 und die zytosolische Kontrolle Pgc1 dekoriert (Abbildung 14B). Unter dem endogenen Promotor sind die Expressionsmengen von Msp1 in den Stämmen  $\Delta tom5$ -pYX242,  $\Delta tom5\Delta msp1$ -pRS315-Msp1 und  $\Delta tom5$ -pRS315 vergleichbar, im Gegensatz zu dem überexprimierten Msp1 in der  $\Delta tom5$ -Msp1 $\uparrow$ -pYX242 Mutante. Im letzteren ist die Expression von Msp1 um die acht fache Menge im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Es wurde vermutet, dass die hohe Menge an Msp1 die Vorläuferproteine unspezifisch aus der Importpore entfernt und dadurch deren Import verhindert wird. Infolgedessen gelangen weniger funktionelle Proteine in die Mitochondrien, wodurch die mitochondriale Funktion und das Zellwachstum beeinträchtigt werden.

### **3.2.3. *In organello* und *in vivo* Abbau des mitochondrialen Vorläuferproteins**

#### **Cytb<sub>2</sub> $\Delta$ TM-DHFR**

Nachdem gezeigt werden konnten, dass Msp1 eine wichtige Rolle in der Beseitigung akkumulierter Vorläuferproteine spielt, wurde im nächsten Schritt sowohl *in organello* als auch *in vivo* nachgewiesen, dass die Msp1-Substrate tatsächlich in der TOM-Komplexpore sitzen. Daher wurde in diesen Experimenten der Abbau des artifiziellen mitochondrialen Vorläuferproteins Cytb<sub>2</sub> $\Delta$ TM-DHFR verfolgt. DHFR, die Dihydrofolatreduktase kann durch Inkubation mit dem Folatanalogon Methotrexat stabil gefaltet werden. Durch die Stabilisierung der Tertiärstruktur der DHFR-Domäne, wird die Translokation über die mitochondriale Membran verhindert wird (Eilers und Schatz, 1986, Rassow et al., 1989). Die mitochondriale Präsequenz wiederum sorgt für die Passage des TOM-Komplexes, bis das Protein festsetzt. *In organello* wurde das rekombinante Cytb<sub>2</sub>(1-167) $\Delta$ TM-DHFR zu isolierten Mitochondrien der Hefestämme W303,  $\Delta msp1$  und Msp1 $\uparrow$  gegeben (Daten von Nikola Wagener, Abbildung 15). Zunächst wurde das Substratprotein Cytb<sub>2</sub>(1-167) $\Delta$ TM-DHFR mittels 1 mM Methotrexat in 100 mM NADPH, 20 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA für 10 Minuten bei 25°C vorgefaltet. 480  $\mu$ g isolierter Mitochondrien der angegeben Hefestämme wurden in 2xSJ ohne BSA, 0,1 mM Methotrexat, 100 mM NADPH, 200 mM ATP, 200 mM NADH resuspendiert. Das vorgefaltete Substratprotein wurde zu den Mitochondrien der drei Stämme zugeführt und auf 25°C inkubiert. Es wurden Proben nach 3, 20 und 60 Minuten entnommen und die Mitochondrien durch einen Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 10 Minuten, 4°C) vom Überstand getrennt. Während der Überstand verworfen wurde, wurden die Mitochondrien mit 1xLaemmli versetzt und für 3 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Die Analyse erfolgte per SDS-PAGE, Westernblot und anschließender Immundekoration mit dem Antikörper gegen die C-terminale DHFR-Domäne des

Fusionsproteins analysiert. Tatsächlich konnte der Abbau des Substratproteins mit verschiedenen Geschwindigkeiten beobachtet werden, wobei der Abbau in Abwesenheit von Msp1 verzögert und bei der Überexpression von Msp1 beschleunigt wurde.



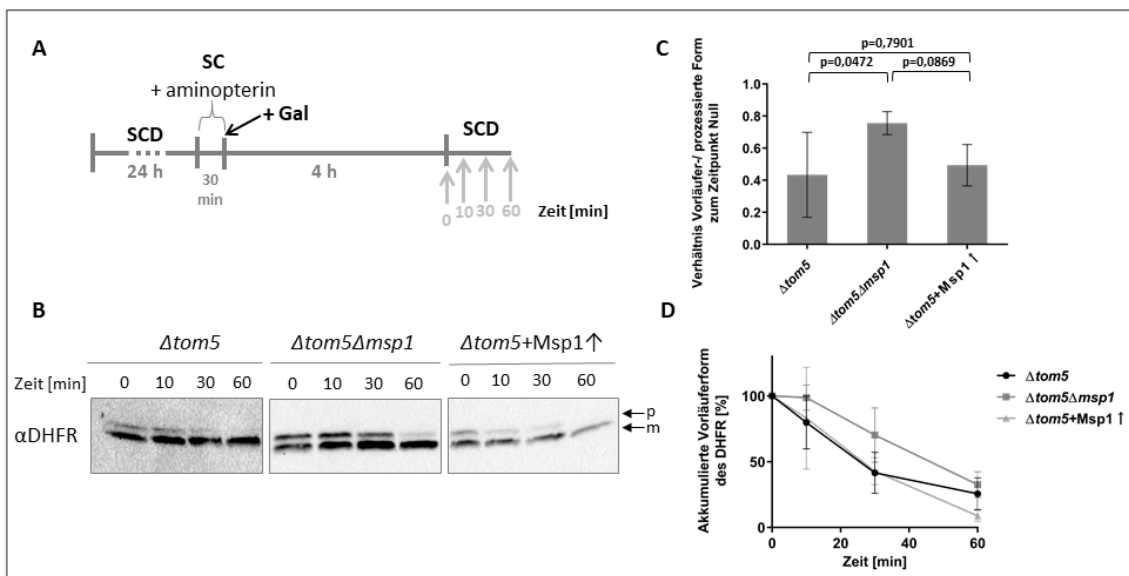
**Abbildung 15** *In organello* Abbau des akkumulierten Substratproteins  $Cytb_2(1-167)\Delta TM$ -DHFR. Die isolierten Mitochondrien von den Stämmen W303,  $\Delta msp1$  und  $Msp1\uparrow$ -Überexpression wurden mit dem vorgefalteten  $Cytb_2(1-167)\Delta TM$ -DHFR inkubiert und der Abbau wurde in einem Zeitraum von einer Stunde beobachtet und quantifiziert.  $n=3$ . Dieses Experiment wurde von Nikola Wagener durchgeführt. (In Anlehnung an Basch et al., 2020)

Der Abbau des Substratproteins  $Cytb_2(1-107)\Delta TM$ -DHFR wurde auch *in vivo* im  $\Delta tom5$  Hintergrund über einen Zeitraum von einer Stunde untersucht (Abbildung 16). Es wurde der  $\Delta tom5$  Hintergrund verwendet, da in diesem Stamm der Import bereits erschwert ist (eine Akkumulation des mitochondrialen Hsp60 Proteins wurde bei 37°C beobachtet (Abbildung 11B, Abbildung 13B)). Die Stämme  $\Delta tom5$ ,  $\Delta tom5\Delta msp1$  und  $\Delta tom5+Msp1\uparrow$  beinhalteten zusätzlich das pYES2- $Cytb_2(1-107)\Delta TM$ -DHFR Plasmid. Die Expression des Substratproteins wurde durch den *GAL1* Promotor reguliert, der durch Galactose induziert und durch Glucose gehemmt wird. Die Hefestämme, die das Konstrukt exprimierten, wurden über Nacht in SC-Medium und 2% Glucose angezogen, um die Expression des Substratproteins zu reprimieren. Am nächsten Morgen wurden die Hefezellen gewaschen, um die überschüssige Glucose zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in SC-Medium resuspendiert und für 30 Minuten mit 0,2 mM Aminopterin vorbehandelt. Aminopterin agiert wie Methotrexat als Folsäureanalog und stabilisiert die Tertiärstruktur des DHFR (Wienhues et al., 1991). Im Gegensatz zu Methotrexat wird Aminopterin *in vivo* verwendet, da es weniger schädlich für die Zellen ist. Eine Behandlung mit Aminopterin verhindert durch eine Konformationsstabilisierung vom DHFR dessen Import in die Mitochondrien und führt infolgedessen zur Akkumulation von Vorläuferproteinen am TOM-Komplex (Popov-Celeketic et al., 2008). Erst danach wurde die Galactose (2%) zugegeben. Nach



vier Stunden Induktion wurde die Expression wieder gehemmt, indem die Zellen in SCD-Medium überführt wurden. Es wurden Proben nach 10, 30 und 60 Minuten entnommen, um den Abbau des arretierten *Cytb<sub>2</sub>(1-107)ΔTM-DHFR* Proteins zu verfolgen. Nach jeder Entnahme wurden die Proben sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels alkalischer Zellyse aufgeschlossen und durch SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration gegen DHFR analysiert. Eine schematische Darstellung des Experiments ist in Abbildung 16A zu finden.

Wie bereits *in organello* gezeigt (Abbildung 15), war auch *in vivo* die Abbaugeschwindigkeit des akkumulierten *Cytb<sub>2</sub>(1-107)ΔTM-DHFR* abhängig von der Anwesenheit von Msp1 (Abbildung 16B, D). In der Doppelmutante *Δtom5Δmsp1* ist eine Verzögerung des Abbaus im Vergleich zur *Δtom5* Einzelmutante zu sehen. Das Entfernen des Substratproteins *Cytb<sub>2</sub>(1-107)ΔTM-DHFR* ist in der Msp1-Überexpressionsmutante und dem Wildtyp vergleichbar schnell. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt Null unterschiedliche Verhältnisse von Vorläufer- zu prozessiertem *Cytb<sub>2</sub>(1-107)ΔTM-DHFR* in den drei Stämmen beobachtet (Abbildung 16C). Anfangs waren in der Doppelmutante verhältnismäßig höhere Mengen an *Cytb<sub>2</sub>(1-107)ΔTM-DHFR*-Vorläufer im Vergleich zur Einzelmutante und Überexpression von Msp1 detektierbar.



**Abbildung 16** *In vivo* Abbau des arretierten *Cytb<sub>2</sub>(1-107)ΔTM-DHFR*. Die Stämme *Δtom5*, *Δtom5Δmsp1* und *Δtom5-Msp1↑* wurden mit Aminopterin behandelt und anschließend wurde durch Zugabe von Galactose die Expression des *Cytb<sub>2</sub>(1-107)ΔTM-DHFR* induziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen in Glucose-haltigem Medium kultiviert, um die Induktion zu stoppen. Direkt im Anschluss wurde der Abbau über einen Zeitraum von einer Stunde beobachtet. A) zeigt die schematische Abbildung des Experiments. B) Die Gesamtzellextrakte wurden gegen DHFR dekoriert. C) Das Diagramm zeigt das Verhältnis der Vorläuferform zur prozessierten Form des *Cytb<sub>2</sub>(1-107)ΔTM-DHFR* zu Beginn der Repressionsphase (Zeit = 0 min). Die Signifikanz wurde mittels der zwei-fractionellen ANOVA berechnet. D) Der Graph bildet den Abbau der akkumulierten Vorläuferform des DHFR über einen Zeitraum von 60 Minuten ab. In beiden Diagrammen zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung, n=3. (In Anlehnung an Basch et al., 2020)

Die Ergebnisse beider Versuche, *in organello* (Abbildung 15) und *in vivo* (Abbildung 16), unterstützen die Hypothese, dass Msp1 mitochondriale Vorläuferproteine entfernt, die in der TOM-Pore festsitzen und dadurch den Proteinimport beeinträchtigen.

### 3.2.4. Aufreinigung von *Cytb<sub>2</sub>ΔTM DHFR-His<sub>6</sub>* nach Aminopterin Behandlung

Da in den *in organello* und *in vivo* Experimenten (Kapitel 3.2.3) gezeigt wurde, dass der Abbau von arretierten Proteinen am TOM-Komplex von den Expressionsmengen von Msp1 abhängig ist, stellt sich die Frage, ob Msp1 direkt mit diesen im TOM-Komplex gefangenen Proteinen interagiert. Um dies zu untersuchen wurde eine Punktmutation in das *MSP1* Gen, das sich auf einem single-copy Plasmid befindet, mittels spezieller Mutageneseprimer integriert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *DpnI* die nicht-mutierte Plasmid-DNS verdaut (Kapitel 2.2.3 und 2.2.12). Anschließend wurde der Ansatz in *E.coli* DH5α Zellen transformiert und direkt auf LB<sub>carb</sub>-Platten ausplattiert (Kapitel 2.2.8). Die DNS wurde aus den wachsenden Kolonien aufgereinigt und sequenziert, um die Mutation zu bestätigen (Kapitel 2.2.9 und 2.2.10). Es ist bereits bekannt, dass eine Mutation in der AAA<sup>+</sup>-Domäne von Msp1 (Msp1E193Q) die ATP-Hydrolyse beeinträchtigt und somit die Freisetzung der Substrate von Msp1 verhindert (Chen et al., 2014, Okreglak und Walter, 2014). Eine phänotypische Wachstumsanalyse zeigte, dass eine Mutation in der AAA<sup>+</sup>-Domäne keinen dominant-negativen Effekt bei 30°C und 37°C hat (Abbildung 17). Daher wurde davon ausgegangen, dass die Expression von Msp1E193Q im *Δtom5Δmsp1* Hintergrund auch keinen Einfluss auf das Zellwachstum haben sollte.

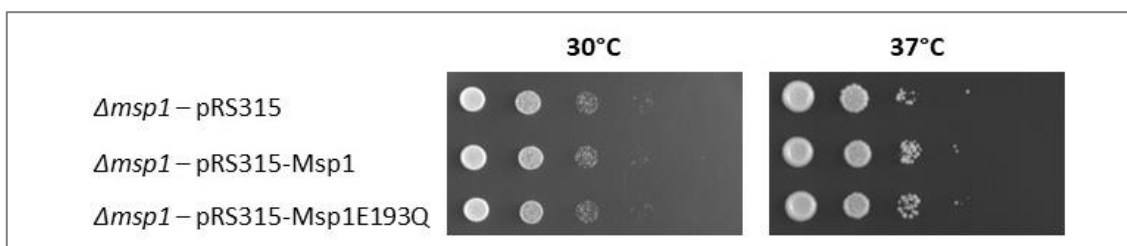
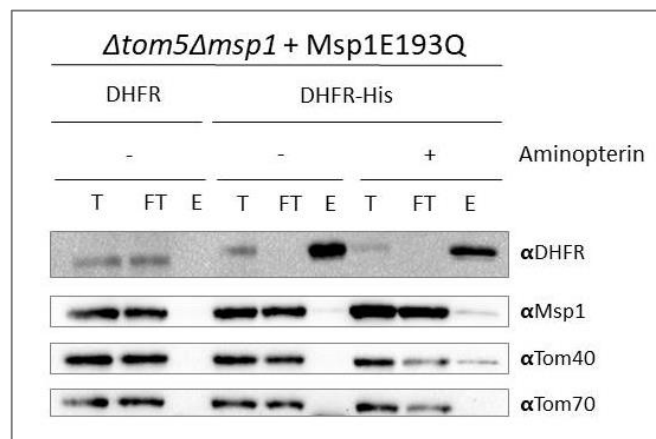


Abbildung 17 Wachstumsanalyse des Stammes *Δmsp1*, der die Plasmide pRS315, pRS315-Msp1 oder pRS315-Msp1E193Q trägt. Die Stämme wuchsen auf SCD-Leu und wurden anschließend in einer Serienverdünnung von 1:10 getüpfelt. Die Platten (SCD-Leu) wurden bei 30°C und 37°C inkubiert.

Das ATP-Hydrolyse Protein Msp1E193Q und *Cytb<sub>2</sub>(1-167)ΔTM-DHFR-His<sub>6</sub>* wurden im *Δtom5Δmsp1* Hintergrund exprimiert (Abbildung 18). Zunächst wurden die Hefezellen in SLac mit 0,1% Glucose über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurde mit einem Waschschrift die überschüssige Glucose entfernt, die Zellen wurden in SLac resuspendiert und mit 0,2 mM Aminopterin vorinkubiert. Nach 30 Minuten wurde 1% Galactose zugegeben, um die Expression des *Cytb<sub>2</sub>(1-167)ΔTM-DHFR-His<sub>6</sub>* zu induzieren. Die Hefekulturen wurden drei Stunden schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien isoliert (Kapitel 2.4.8) und bei -

80°C gelagert. Für die Aufreinigung von  $Cytb_2(1-167)\Delta TM$ -DHFR-His<sub>6</sub> wurden 500 µg isolierte Mitochondrien pelletiert, in 20 mM Tris, 80 mM KCl, 20 mM Imidazol, 10% Glycerol, 1 mM Methotrexat, 8 mM NADPH, 1 mM PMSF, pH 7,4 resuspendiert und mit 1% Digitonin solubilisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (45000 rpm, 20 Minuten, 4°C) wurde der Überstand zu den Ni-NTA Agarose Beads transferiert und eine Stunde taumelnd bei 4°C inkubiert.  $Cytb_2(1-167)\Delta TM$ -DHFR-His<sub>6</sub> wurde mit 3x Laemmli Puffer und 300 mM Imidazol für 3 Minuten bei 95°C eluiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration gegen DHFR, Msp1, Tom40 und Tom70 analysiert.  $Cytb_2(1-167)\Delta TM$ -DHFR-His<sub>6</sub> wurde sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit von Aminopterin aufgereinigt. Unter beiden Bedingungen wurde auch Msp1E193Q co-isoliert, aber effizienter nach einer Behandlung mit Aminopterin. Die Aufreinigung des gefalteten  $Cytb_2\Delta TM$ -DHFR-His<sub>6</sub> führte auch zur Co-Isolierung von Tom40, aber nicht von Tom70.

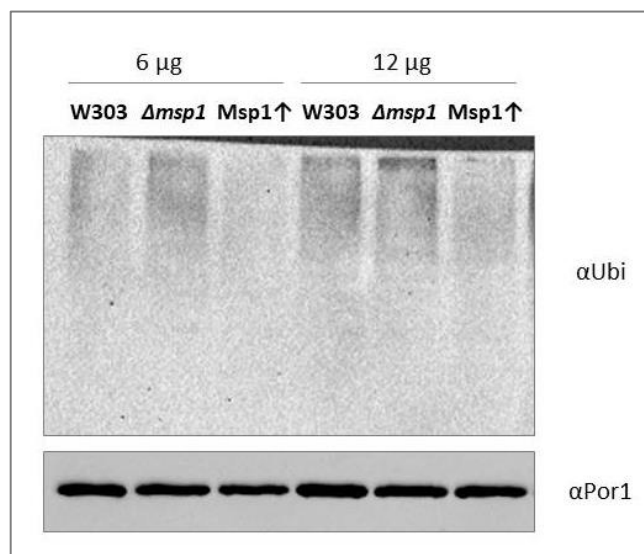


**Abbildung 18** Msp1E193Q interagiert mit  $Cytb_2\Delta TM$ -DHFR-His<sub>6</sub>.  $Cytb_2\Delta TM$ -DHFR-His<sub>6</sub> wurde im Stamm  $\Delta tom5\Delta msp1$ -pRS315-Msp1E193Q nach Zugabe von Galactose exprimiert und mittels Aminopterin vorgefaltet. Anschließend wurde eine Ni-NTA Affinitätsaufreinigung mit den vorher isolierten Mitochondrien durchgeführt und die aufgereinigten Proteine mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration gegen DHFR, Msp1, Tom40 und Tom70 visualisiert. T= Gesamte Menge an Proteinen, FT (flow through)= ungebundene Proteine, E= Eluat. Es wurden 10% vom T und FT und 100% vom Eluat geladen. (In Anlehnung an Basch et al., 2020)

Die Aufreinigung von  $Cytb_2(1-167)\Delta TM$ -DHFR-His<sub>6</sub> zeigte, dass Msp1 physikalisch mit dem gefalteten Substrat, das den TOM-Komplex blockiert, interagiert, da es mit dem Substrat isoliert wurde. Da das vorgefaltete  $Cytb_2(1-167)\Delta TM$ -DHFR-His<sub>6</sub> in der TOM-Pore sitzt, konnte auch Tom40 im Eluat detektiert werden. Vermutlich führte eine Überladung des TOM-Komplexes mit der ungefalteten Version von  $Cytb_2(1-167)\Delta TM$ -DHFR-His<sub>6</sub> ebenfalls zur Rekrutierung von Msp1, die allerdings schwächer ist als mit der vorgefalteten Version des Substrats. Im Eluat des ungefalteten Fusionsproteins nach Behandlung mit Aminopterin wurde kein Tom40 detektiert. Aus dieser Beobachtung wurde vermutet, dass es sich um eine TOM-unabhängige Interaktion handelt.

### 3.2.5. Überprüfung der Menge ubiquitiniertes Proteine in Msp1-Mutanten

Im vorherigen Experiment (Kapitel 3.2.3 und 3.2.4) wurde gezeigt, dass Msp1 in den Abbau der arretierten Substrate involviert ist und mit diesen Proteinen interagiert. Als nächstes wurde überprüft, wie die Msp1-Substrate, nachdem sie vom TOM-Komplex entfernt wurden, degradiert werden. Die selektive Degradierung von Proteinen wird meist über das Ubiquitin-Proteasom System durchgeführt, indem die Proteine mit Ubiquitin markiert, vom Proteasom erkannt und degradiert werden. Zunächst wurden Mitochondrien der Stämme W303,  $\Delta msp1$  und Msp1-Überexpressionsmutante isoliert und die gesamte Menge an ubiquitinierten Proteinen untersucht (Abbildung 19). In der Msp1-Überexpressionsmutante war die gesamte Menge an ubiquitinierten mitochondrialen oder Mitochondrien-assoziierten Proteinen im Vergleich zum Wildtyp und zur  $msp1$  Deletionsmutante reduziert. In der  $msp1$  Deletionsmutante waren die Mengen an ubiquitinierten Proteinen leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Möglicherweise führt das Fehlen von Msp1 zu verstärkter Akkumulation ubiquitiniertes Proteine an den Mitochondrien. Allerdings sind hier vermutlich auch viele ubiquitinierte Proteine keine Msp1-Substrate.



**Abbildung 19** Gesamtmenge an ubiquitinierten Proteinen an den Mitochondrien in Msp1-Mutanten. Isolierte Mitochondrien der Stämme W303-pYX242,  $\Delta msp1$ -pYX242 und Msp1↑-pYX242 wurden mittels SDS-PAGE, Westernblot und Antikörperdekorierung gegen Ubiquitin und das mitochondriale Außenmembranprotein Por1 analysiert. (Basch et al., 2020)

### 3.2.6. Ubiquitinierung von Msp1-Substraten ist unabhängig von Mdm30 und Cdc48

Sollten Msp1-Substrate vor ihrem Abbau ubiquitiniert werden, stellte sich jedoch die Frage, durch welche Ubiquitin-Protein-Ligase die Msp1-Substrate ubiquitiniert werden und ob Msp1 direkt mit diesem Protein interagiert. Der potenzielle Kandidat Mdm30 wurde untersucht, der bereits in Kapitel 3.2 kurz beschrieben wurde. Aus der Tabelle mit der quantitativen Analyse genetischer Interaktionen, wurde eine starke genetische Interaktion zwischen *MDM30* und *MSP1* aufgezeigt (Hoppins, 2011). Das F-Box Protein Mdm30 gehört zum SCF-like Ubiquitin-Protein-Ligase Komplex, das Proteine ubiquitiniert und danach zur Degradierung an das 26S Proteasom weiterleitet (Fritz et al., 2003). Mdm30 ist mit den Mitochondrien assoziiert und reguliert das Außenmembranprotein Fzo1, das für die mitochondriale Fusion notwendig ist (Fritz et al., 2003). Durch die Lage von Mdm30 an der Außenmembran der Mitochondrien, könnte Mdm30 Msp1-Substrate ubiquitinieren. Es wurden die Stämme  $\Delta mdm30$  und  $\Delta mdm30\Delta msp1$  generiert und eine phänotypische Wachstumsanalyse durchgeführt (Abbildung 20). Die Einzelmutante  $\Delta mdm30$  ist temperatursensitiv, was bereits in Fritz et al., 2003 beschrieben wurde. Die Doppelmutante zeigt auf beiden Temperaturen keinen zusätzlichen Wachstumsdefekt.

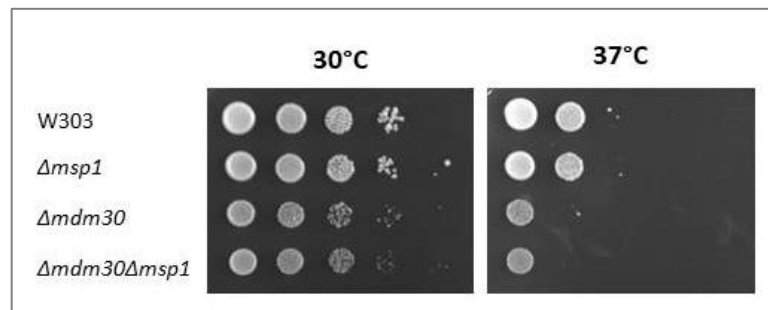


Abbildung 20 Wachstumsanalyse der Stämme W303,  $\Delta msp1$ ,  $\Delta mdm30$  und  $\Delta mdm30\Delta msp1$ . Die Stämme wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe (1:10) auf YPD Platten getüpfelt und bei 30°C und 37°C inkubiert.

Ein weiterer interessanter Kandidat, der in die Ubiquitinierung und Degradierung von Msp1-Substraten involviert sein könnte, ist Cdc48. Das AAA<sup>+</sup>-Protein Cdc48 gehört zur ER-assoziierten Degradierungsmaschinerie und hydrolysiert unerwünscht ER-Proteine, die anschließend von der Membran gelöst und zum Proteasom transferiert werden (Wu und Rapoport, 2018). Um eine genetische Interaktion zwischen *MSP1* und *CDC48* nachzuweisen, wurden Einzel- und Doppelmutanten mit *MSP1* generiert und eine Wachstumsanalyse durchgeführt (Abbildung 21). Das *CDC48* Gen trägt eine Punktmutation (R387K in der D1 ATPase (Simões et al., 2018)) und wurde in einem Stamm mit einer *KanMX4* und in dem anderen Stamm mit einer *HIS3MX6* Sequenz-abwärtsgelegenen Deletionskassette durch homologe Rekombination integriert. Beide

*cdc48-3* Stämmen reagieren sensitiv auf eine Temperatur von 37°C. Eine zusätzliche Deletion von *MSP1* resultieren in keinem zusätzlichen Wachstumsdefekt.

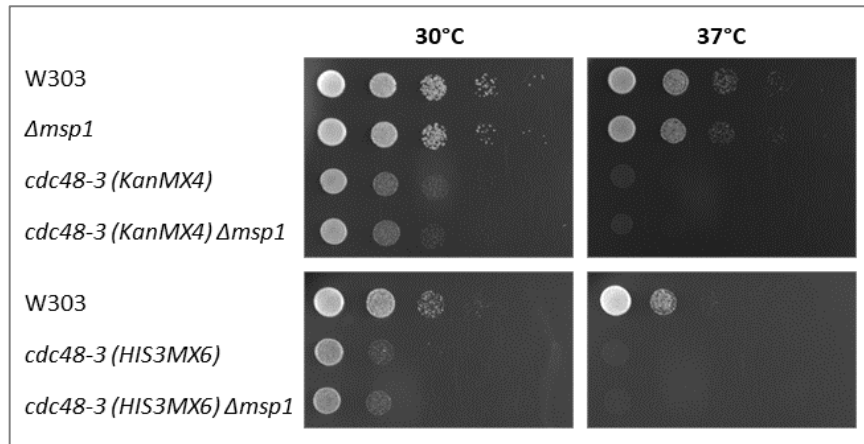


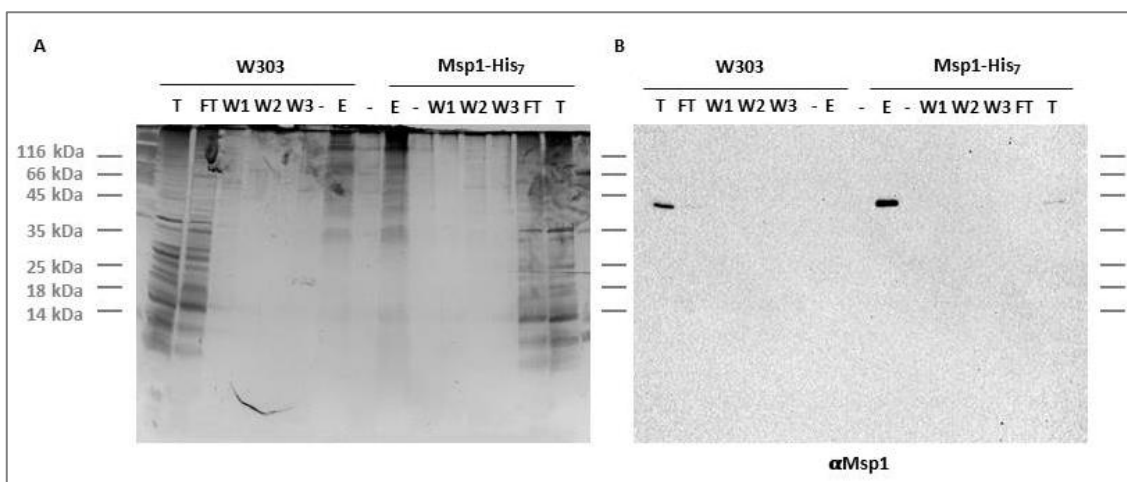
Abbildung 21 Wachstumsanalyse der Stämme W303,  $\Delta msp1$ , *cdc48-3* (KanMX4), *cdc48-3* (KanMX4)  $\Delta msp1$ , *cdc48-3* (HIS3MX6) und *cdc48-3* (HIS3MX6)  $\Delta msp1$ . Die angegebenen Hefestämme wurden in einer Serienverdünnung von 1:10 getüpfelt und auf 30°C und 37°C inkubiert.

Eine genetische Interaktion zwischen *MSP1* und *MDM30* oder *MSP1* und *CDC48-3* konnte nicht bestätigt werden.

### 3.3. Die Interaktion zwischen Msp1 und dem Proteasom

#### 3.3.1. Aufreinigung von Msp1-His<sub>7</sub>

Für die Identifikation von weiteren Interaktionspartnern von Msp1 wurde eine Affinitätsaufreinigung von Msp1 mit einem chromosomalen integriertem C-terminalen His<sub>7</sub>-Tag durchgeführt. Der Msp1-His<sub>7</sub> Stamm wuchs über Nacht auf synthetischem Medium (S), das 2% Galaktose beinhaltet. Die logarithmische Kultur wurde geerntet und in 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1:100 Protease Arrest Reagenz resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Glaskügelchen aufgeschlossen. Die Membranen wurden mit 0,5 % Triton X-100 solubilisiert und das Zelllysate mit Ni-NTA Agarose Beads (QIAGEN) für eine Stunde taumelnd bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Beads mit dem oben angegebenen Puffer und 0,1% Triton X-100 gewaschen, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Die Proteine wurden mit 3x Laemmli Puffer und 400 mM Imidazol eluiert. Die Analyse der Proben erfolgte einerseits durch SDS-PAGE und Silberfärbung und andererseits durch SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration gegen Msp1 (Abbildung 22).



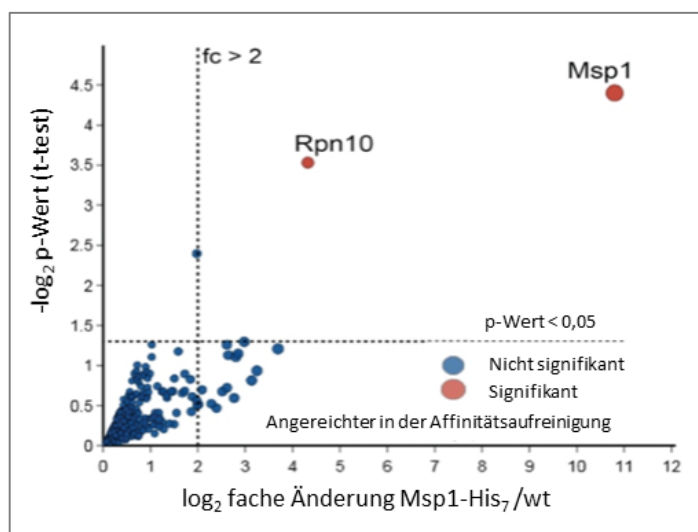
**Abbildung 22** Aufreinigung von Msp1-His<sub>7</sub> und Analyse mittels Silberfärbung (A) und Westernblot (B). Eine Ni-NTA Affinitätsaufreinigung wurde mit den Stämmen W303 und Msp1-His<sub>7</sub>, die auf SGal kultiviert wurden, durchgeführt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und danach einerseits mit einer Silberfärbung (A) und andererseits mit einem Westernblot (B) und einer Immundekoration gegen Msp1 analysiert. T= gesamte Menge an Proteinen, FT= (Flow Through) ungebundene Proteine, W1-3= Waschschrift, E=Eluat. Es wurden 1% von T, FT, W1-3 und 100% vom Eluats geladen.

Die Silberfärbung ist eine besonders sensitive Methode, um die Gesamtheit an Proteinen zu visualisieren (Kapitel 2.4.7). Im Wildtyp und Msp1-His<sub>7</sub> Stamm wurden vergleichbare Proteinmengen im Eluat festgestellt (Abbildung 22A). Durch den starken Hintergrund konnten geringe Unterschiede nicht erkannt werden, daher wurde zusätzlich eine Analyse mittels Westernblot und Immundekoration gegen Msp1 durchgeführt. Im Westernblot wurde Msp1 erfolgreich aufgereinigt (Abbildung 22B). Für eine Identifikation von Interaktionspartnern

wurden Proben aus drei unabhängigen Experimenten zur massenspektrometrischen Analyse geschickt.

### 3.3.2. Identifikation und Analyse der proteasomalen Untereinheit Rpn10

Die massenspektrometrische Analyse wurde im Zentrallabor für Proteinanalytik in der Gruppe von Prof. Dr. Axel Imhof durchgeführt, um neue Interaktionspartner von Msp1 zu identifizieren. Dafür wurden die Proben nach der Affinitätsaufreinigung nochmals mit Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Durch die massenspektrometrische Analyse wurde ein besonders stark angereichertes Protein neben Msp1 identifiziert (Abbildung 23).



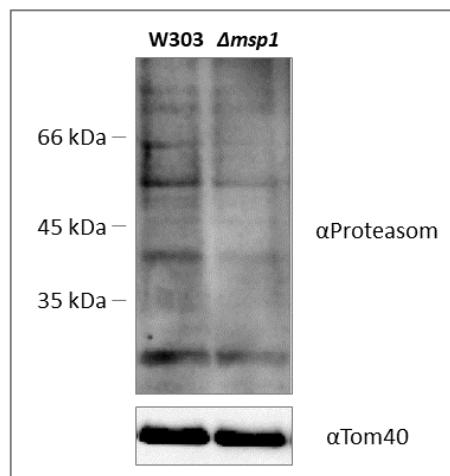
**Abbildung 23** Rpn10 ist angereichert nach der Affinitätsaufreinigung von Msp1-His<sub>7</sub>. Die interagierenden Proteine wurden mittels massenspektrometrischen Analyse nach der Affinitätsaufreinigung mittels Ni-NTA Agarose Beads identifiziert und in einem Volcano plot dargestellt. Msp1 ist mit einem Anreicherungsfaktor ( $\log_2$  fache Änderung) von 11 das abundanteste Protein (rechts oben). Der stärkste Interaktionspartner ist Rpn10. (Basch et al., 2020)

Bei diesem Protein handelt sich um Rpn10, einer Untereinheit des 19S regulatorischen Partikel des 26S Proteasoms (Glickman et al., 1998). Im Vergleich zu den meisten anderen proteasomalen Proteinen, ist Rpn10 nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von Zellen (Van Nocker et al., 1996). Eine Deletion des *RPN10* Gens resultiert in einer Veränderung der proteasomalen Struktur und dem vollständigen Verlust der folgenden Untereinheiten: Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11 und Rpn12 (Glickman et al., 1998). Msp1 besitzt keine Protease-Domäne und kann seine Substrate nicht selbst degradieren. Daher müssen die Proteine über ein anderes System degradiert werden. Aus diesem Grund ist eine Interaktion zwischen Msp1 und Rpn10 besonders interessant, da sie nahelegt, dass der Abbau der Msp1-Substrate über das Ubiquitin-Proteasom System erfolgen könnte.



### 3.3.3. Das Proteasom bindet in Abhängigkeit von Msp1 an isolierte Mitochondrien

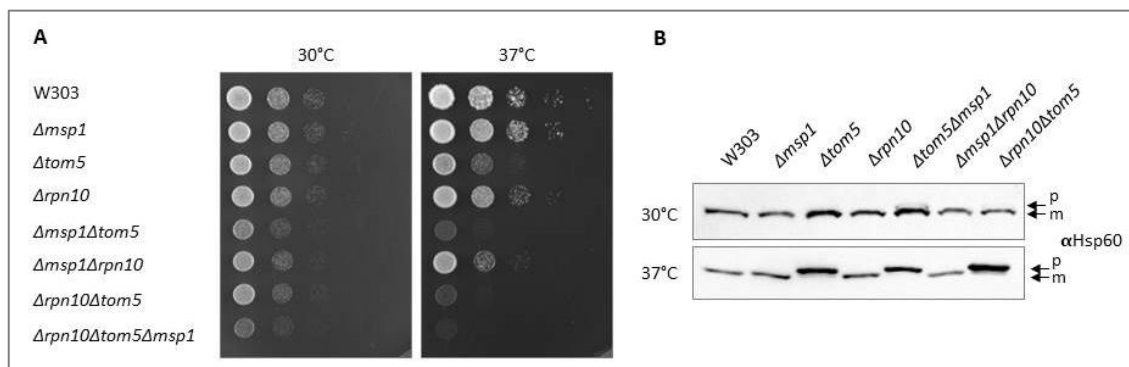
Die Interaktion zwischen Msp1 und Rpn10 wirft die Frage auf, ob das Proteasom von Msp1 an die Mitochondrien rekrutiert wird, um eine Elimination von arretierten Proteinen zu gewährleisten. Daher wurde die Anwesenheit des Proteasoms an isolierten und Gradientengereinigten Mitochondrien aus Wildtyp und der  $\Delta msp1$  Mutante überprüft. Um eine Rekrutierung des Proteasoms zu fördern, wurde in den Zellen die Expression des Substratproteins  $Cytb_2(1-167)\Delta TM$ -DHFR durch Zugabe von 2% Galactose über Nacht induziert. Anschließend wurden die Mitochondrien der Stämme W303 und  $\Delta msp1$  Mutante isoliert (Kapitel 2.4.8) und zusätzlich über einen linearen Saccharose-Gradienten aufgereinigt (Kapitel 2.4.9). Die Analyse erfolgte via SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration gegen das Proteasom und die Kontrolle Tom40. In  $\Delta msp1$  Mitochondrien wurden weniger proteasomale Untereinheiten im Vergleich zum Wildtyp co-isoliert (Abbildung 24). Aus dieser Beobachtung wurde gefolgert, dass Msp1 in die Rekrutierung des Proteasoms an die Mitochondrien involviert ist.



**Abbildung 24 Das Proteasom bindet abhängig von Msp1 an Mitochondrien.** Die isolierten Mitochondrien der Stämme W303 und  $\Delta msp1$  wurden über einen linearen Saccharose-Gradienten aufgereinigt. Die aufgereinigten Mitochondrien wurden mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundekoration gegen das Proteasom und die Kontrolle Tom40 analysiert. (Basch et al., 2020)

### 3.3.4. Wachstumsanalyse zur Darstellung einer genetischen Interaktion zwischen *RPN10*, *TOM5* und *MSP1* und die Akkumulation von Vorläuferproteinen

Aufgrund der Interaktion von Msp1 mit dem Proteasom und der Rolle von Msp1 in der Qualitätskontrolle an den Mitochondrien, wurde vermutet, dass Msp1 als zentrale Komponente interagiert. Daher wurde als nächstes untersucht, ob das Fehlen von *RPN10*, *TOM5* und *MSP1* zu einem zusätzlichen Wachstumsdefekt führt (Abbildung 25A). Es wurden zusätzlich Doppelmutanten und eine Dreifachmutante generiert und mittels einer phänotypischen Wachstumsanalyse untersucht. Eine Doppeldeletion von *RPN10* und *MSP1* zeigt nur einen leichten Wachstumsphänotyp verglichen mit der  $\Delta rpn10$  Einzelmutante. Die Doppelmutante  $\Delta rpn10\Delta tom5$  weist interessanterweise ein ähnliches Wachstum wie  $\Delta tom5\Delta msp1$  bei 37°C auf. Eine Deletion aller drei Gene führte bei 30°C zu einem ähnlichen Wachstumsdefekt wie bei  $\Delta tom5\Delta msp1$ , der allerdings bei 37°C noch stärker ausgeprägt war.



**Abbildung 25** Analyse einer genetischen Interaktion zwischen *RPN10*, *TOM5* und *MSP1*. A) Die Hefestämme W303,  $\Delta msp1$ ,  $\Delta tom5$ ,  $\Delta rpn10$ ,  $\Delta msp1\Delta tom5$ ,  $\Delta msp1\Delta rpn10$ ,  $\Delta rpn10\Delta tom5$  und  $\Delta rpn10\Delta tom5\Delta msp1$  wurden auf YPD Platten in einer seriellen Verdünnung von 1:10 getüpfelt und bei 30°C und 37°C inkubiert. B) Gesamtzellextrakte wurden gegen das Chaperon Hsp60 dekoriert und dabei wurde zwischen der Vorläuferform (p= precursor) und der prozessierten (m= mature) Form des Proteins unterschieden. (Basch et al., 2020)

Zusätzlich zur Wachstumsanalyse wurde auch die Akkumulation vom Vorläuferprotein Hsp60 im Zytosol in den Stämmen W303,  $\Delta msp1$ ,  $\Delta tom5$ ,  $\Delta rpn10$ ,  $\Delta tom5\Delta msp1$ ,  $\Delta msp1\Delta rpn10$  und  $\Delta rpn10\Delta tom5$  untersucht (Abbildung 25B). Bei 30°C wurde in allen Stämmen nur die prozessierte Form von Hsp60 festgestellt. Dagegen kam es bei 37°C zu einer Akkumulation der Vorläuferform von Hsp60 in den Stämmen  $\Delta tom5$ ,  $\Delta tom5\Delta msp1$  und  $\Delta rpn10\Delta tom5$ . Tatsächlich verhalten sich die Doppelmutanten  $\Delta tom5\Delta msp1$  und  $\Delta rpn10\Delta tom5$  sehr ähnlich im Wachstum und die Akkumulation der Vorläuferform von Hsp60 korreliert mit dem sichtbaren Wachstumsdefekt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Msp1 und das Proteasom im selben Kontrollmechanismus agieren und arretierte Vorläuferproteine aus dem mitochondrialen TOM-Komplex entfernen.

### 3.3.5. Phänotypische Analyse der genetischen Interaktion zwischen *MSP1* und der nicht-essentiellen proteasomalen Untereinheit *RPN9*

Neben Rpn10 ist auch die Untereinheit Rpn9 des Proteasoms nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von Zellen (Glickman et al., 1998). Daher bot sich die Möglichkeit, eine weitere Deletionsmutante einer proteasomalen Untereinheit zu generieren und sie auf eine genetische Interaktion mit *MSP1* zu überprüfen. Folglich wurden die Stämme  $\Delta rpn9$  und  $\Delta rpn9\Delta msp1$  generiert. Mit einer phänotypischen Wachstumsanalyse konnte keine genetische Interaktion zwischen *RPN9* und *MSP1* beobachtet werden (Abbildung 26).

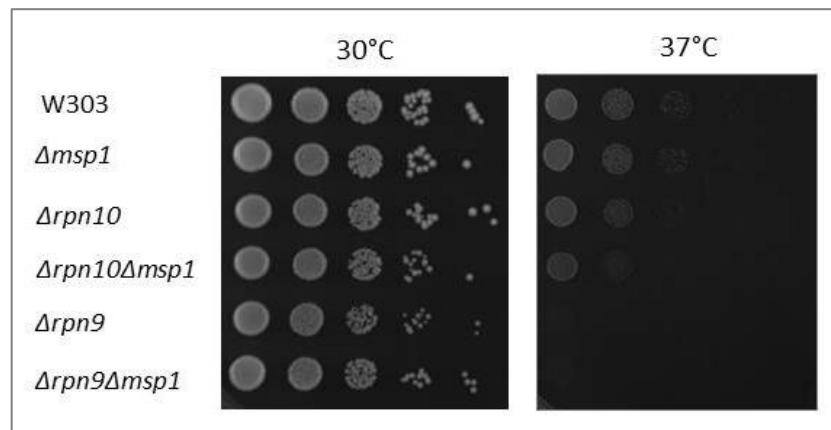


Abbildung 26 Wachstumsanalyse der Stämme W303,  $\Delta msp1$ ,  $\Delta rpn10$ ,  $\Delta rpn10\Delta msp1$ ,  $\Delta rpn9$  und  $\Delta rpn9\Delta msp1$ . Die Stämme wuchsen auf YPD und wurden anschließend in einer Serienverdünnung von 1:10 getüpfelt. Die Platten wurden auf 30°C und 37°C inkubiert.

### 3.4. Deletion von *GET1*, *TOM5* und *MSP1* resultiert in einem starken Wachstumsphänotyp

Es ist bekannt, dass *MSP1* auf genetischer Ebene mit den Komponenten des GET-Importweges *GET1*, *GET2* und *GET3* interagiert (Chen et al., 2014, Okreglak und Walter, 2014). Wie bereits gezeigt (Kapitel 3.2) entfernt Msp1 akkumulierte Vorläuferproteine aus dem TOM-Komplex. Daher stellte sich die Frage, ob die Msp1-Aktivität notwendig ist, um gleichzeitig arretierte Vorläuferproteine und mislokalisierte TA-ER-Proteine zu beseitigen. Zum Beantworten dieser Frage wurde eine phänotypische Wachstumsanalyse bei 30°C mit Mutanten, in denen die Gene *MSP1*, *TOM5* und *GET1* depletiert wurden, durchgeführt (Abbildung 27). Die Doppelmutante  $\Delta get1\Delta tom5$  zeigte einen synthetischen Wachstumsdefekt, sogar in der Anwesenheit von Msp1. Die Dreifachmutante  $\Delta get1\Delta tom5\Delta msp1$  war kaum lebensfähig. Eine Überlastung der Msp1-Kapazität durch die Akkumulation arretierter Vorläufer am TOM-Komplex und gleichzeitige Anhäufung mislokalisierter ER-TA-Proteine in der Außenmembran führt zur Beeinträchtigung der Funktion der Mitochondrien und dadurch des Zellwachstums. Dieses Ergebnis bestätigt, wie schon in den Experimenten vorher beschrieben, dass Msp1 eine zentrale Rolle in der Qualitätskontrolle an der mitochondrialen Außenmembran ausübt.

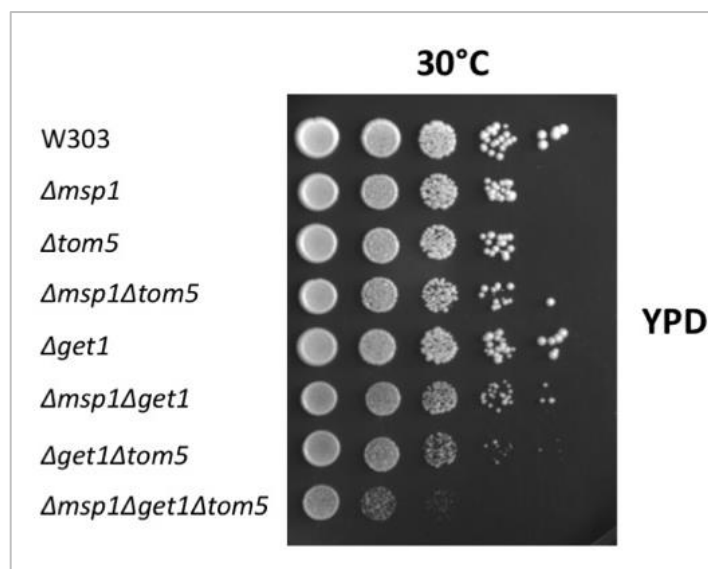
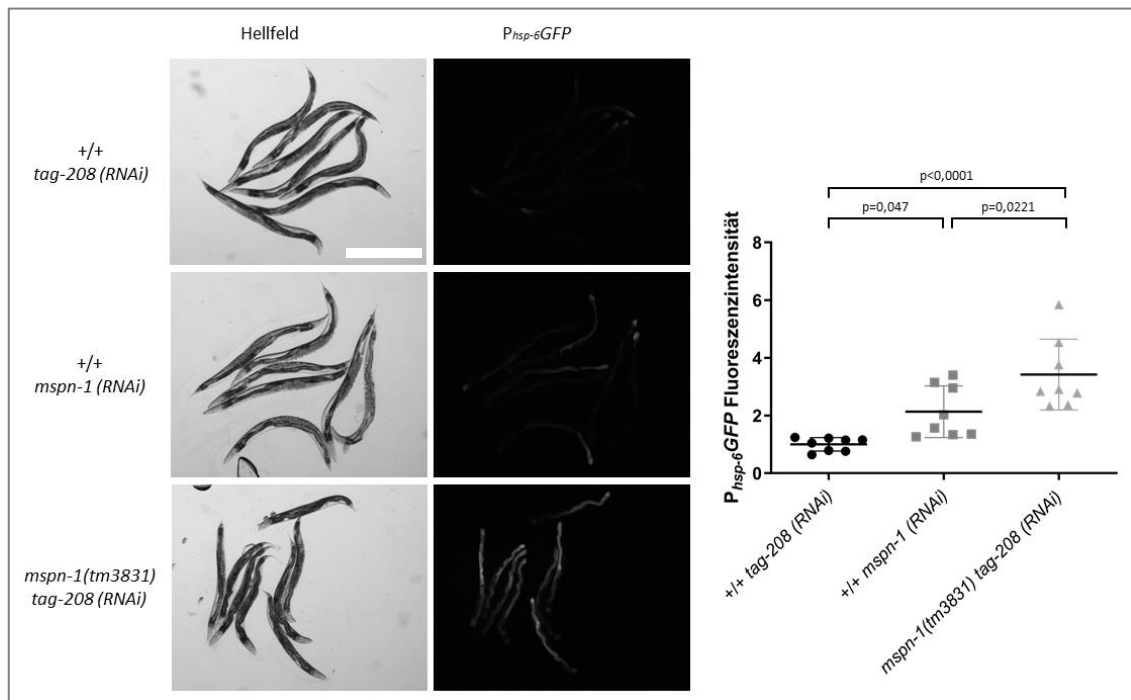


Abbildung 27 Wachstumsanalyse der Stämme W303,  $\Delta msp1$ ,  $\Delta tom5$ ,  $\Delta tom5\Delta msp1$ ,  $\Delta get1$ ,  $\Delta msp1\Delta get1$ ,  $\Delta get1\Delta tom5$  und  $\Delta msp1\Delta get1\Delta tom5$ . Die Stämme wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:10 getüpfelt und wuchsen auf einer YPD Platte bei 30°C.

### 3.5. Induktion von UPR<sup>mt</sup> nach *mispn-1* und *tomm-40 RNAi* Behandlung in *C. elegans*

*MSP1* wurde im Laufe der Evolution in verschiedenen Arten konserviert und auch im Menschen ist ein Homolog identifiziert worden. Es stellte sich die Frage, ob das Msp1-Homolog aus Metazoen eine vergleichbare Funktion wie Msp1 in *S. cerevisiae* ausübt. Es ist bereits bekannt, dass das Fehlen des Homologs *ATAD1/thorase* im Menschen zu Enzephalopathie und einem Tod im Säuglingsalter führt (Piard et al., 2018). In Mäusen wurde gezeigt, dass Tiere mit einer *ATAD1* Null-Mutation bis zu acht Wochen überleben können, aber aufgrund der Mutation die synaptische Plastizität und dadurch Lernprozesse und das Erinnerungsvermögen beeinträchtigt werden (Zhang et al., 2011). Aufgrund der Verfügbarkeit des Modellorganismus *C. elegans* am Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie wurde die Funktion von Msp1 in diesem höheren Organismus untersucht. Stéphane Rolland konnte bereits zeigen, dass in der *mispn-1(tm3831)* *loss-of-function (lf)* Mutante die Expression des Reporterkonstruktes  $P_{hsp-6}GFP$  im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist (Basch et al., 2020). Dieses Reporterkonstrukt wird zur Analyse von Importstress (Rolland et al., 2019) und daher als Indikator für die UPR<sup>mt</sup> verwendet (Haynes et al., 2007, Yoneda et al., 2004). In dieser Arbeit wird einerseits untersucht, ob eine ähnlich starke Induktion des GFP-Reporters nach Behandlung mit *mispn-1 RNAi* im Vergleich zur *mispn-1(tm3831) lf* Mutante zu sehen ist. Die Deletion *tm3831* im Gen *mispn-1* führt zum Protein MSPN-1, in dem die Aminosäuren 47-136 fehlen, zu denen das Walker-A Motiv gehört (Basch et al., 2020). Zusätzlich wurde analysiert, ob eine Depletion einer TOM-Untereinheit diesen Effekt verstärken kann. Da es in *C. elegans* kein homologes Gen zu *TOM5* gibt, wurde *tomm-40* gewählt, da ein starker Wachstumsphänotyp und eine Ansammlung von Vorläuferproteinen in der Hefemutante gezeigt wurde (Abbildung 11). In *C. elegans* wurde die Expression von *tomm-40* mittels *RNAi* herunterreguliert. Dies geschieht, indem die doppelsträngige RNA (dsRNA) mittels des Enzyms DICER in kleine eingreifende RNA-Fragmente (single interfering, siRNA) gespalten wird (Yigit et al., 2006). Anschließend verwendet der RISC-Komplex die siRNA, um die Ziel-mRNA zu identifizieren und diese Ziel-RNA zerschneiden, die daraufhin degradiert wird (Yigit et al., 2006). Dieses Herunterregulieren wirkt sich auch auf die Nachkommenschaft (F1-Generation) der Würmer aus und dadurch auf die Expression des GFP-Reporterkonstruktes, dessen Signalintensität unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert wurde. Das Experiment wurde, wie in den Methoden (siehe Kapitel 2.5.2) beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Bakterien, die die *RNAi*-Konstrukte beinhalten, wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt. Die *RNAi*-Konstrukte *tag-208* und *mispn-1* wurden in der vorhandenen Konzentration verwendet, dagegen wurde *tomm-40* mit *tag-208* oder *mispn-1* in Verhältnis von 1:3 (v/v) eingesetzt. Zunächst wurde die Fragestellung untersucht, ob eine Induktion des GFP-Reporters nach

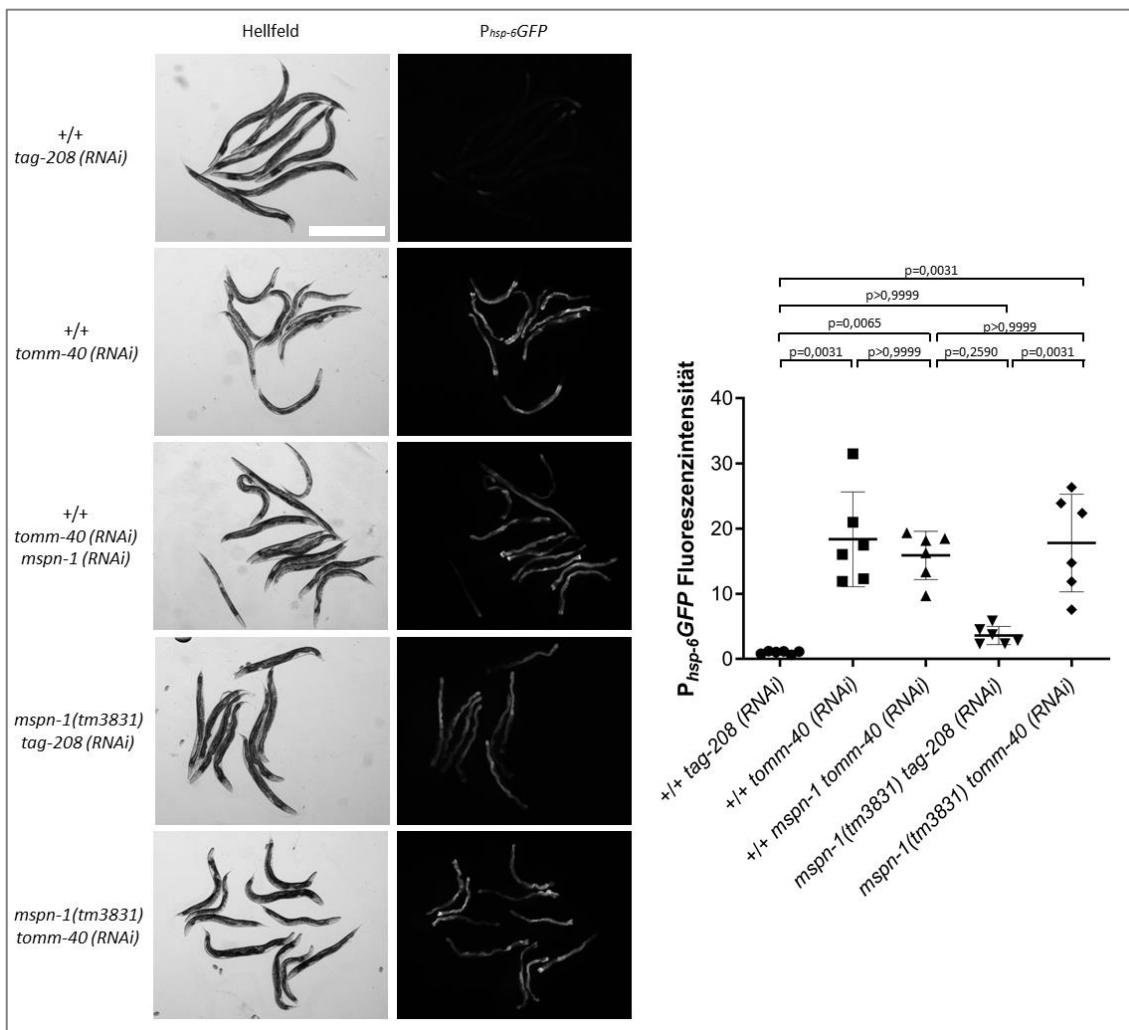
Behandlung mit *mispn-1 RNAi* im Vergleich zur *mispn-1(tm3831) lf* Mutante zu sehen ist (Abbildung 28). In der Mutante *mispn-1(tm3831) lf* mit *tag-208 RNAi* wurde eine 3,4-fach stärkere GFP-Expression als im Wildtyp mit *tag-208 (RNAi)* festgestellt. Die Expression nach *mispn-1 RNAi* Behandlung im Wildtyp war verdoppelt. Eine hohe Variation in der Fluoreszenzintensität führte zu einer hohen Standardabweichung, besonders nach der Behandlung mit *mispn-1 RNAi* (+/+ *tag-208 (RNAi)*: 0,2340; +/+ *mispn-1 (RNAi)*: 0,8975; *mispn-1(tm3831) lf tag-208 (RNAi)*: 1,226). Alle Stämme zeigten einen signifikanten Unterschied, der mittels einer ein-fraktionellen ANOVA berechnet wurde. In diesem Experiment wurde beobachtet, dass die Behandlung mit *mispn-1 RNAi* den  $P_{hsp6}$ GFP-Reporter ebenfalls induziert, allerdings ist die Effizienz weniger stark als bei genomischer Deletion des Gens. In beiden Fällen kommt es zur Stressantwort, die vermutlich auf einem gestörten mitochondrialen Proteinimport basiert.



**Abbildung 28** Wildtyp (+/+) und *mispn-1(tm3831)* Würmer mit dem Reporterkonstrukt  $P_{hsp-6}GFP$  wurden nach *RNAi* Behandlung mit *tag-208* oder *mispn-1* unter dem Hellfeld und dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die  $P_{hsp-6}GFP$  Fluoreszenzintensität wurde quantifiziert und mittels einer ein-fraktionellen ANOVA (Shapiro-Wilk Test, Brown-Forsythe Test) analysiert. Der p-Wert zwischen +/+ *tag-208 (RNAi)* und +/+ *mispn-1 (RNAi)* lag bei p=0,047, zwischen +/+ *tag-208 (RNAi)* und *mispn-1(tm3831) tag-208 (RNAi)* bei p<0,001 und zwischen +/+ *mispn-1 (RNAi)* und *mispn-1(tm3831) tag-208 (RNAi)* bei p=0,0221. Die Anzahl der biologischen Replikate lag bei n=8 (Ein Replikat entspricht einer einzelnen *RNAi* Platte). Maßstab: 5 mm.

Als nächstes wurde untersucht, ob *tomm-40 RNAi* die Induktion des  $P_{hsp6}$ GFP-Reporterkonstrukts verstärken kann. Es wurde eine sehr starke Expression des  $P_{hsp6}$ GFP-Reporterkonstrukts nach *tomm-40 RNAi* Behandlung sowohl im Wildtyp als auch im *mispn-1(tm3831) lf* Hintergrund festgestellt (Abbildung 29). Allerdings waren keine Unterschiede

zwischen den Stämmen nach *tomm-40 RNAi* Behandlung erkennbar. Für die statistische Auswertung wurde eine ein-fractionelle ANOVA (Kruskal-Wallis-Test) verwendet. Aus dieser Beobachtung, konnte nur geschlossen werden, dass das Fehlen von *tomm-40* zu einer starken Inhibierung des mitochondrialen Imports führt. Es konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden, ob das Fehlen von *mispn-1* die Induktion der GFP-Expression zusätzlich beeinflusst, da die Signalintensität aufgrund der *tomm-40 RNAi* sehr hoch war. Das Beantworten der Fragestellung erfordert weitere Anpassungen der Konzentration von *tomm-40 RNAi*, um mögliche detektierbare Unterschiede sichtbar zu machen.



**Abbildung 29** Wildtyp (+/+) und *mispn-1(tm3831)* Würmer mit dem Reporterkonstrukt  $P_{hsp-6GFP}$  wurden nach *RNAi* Behandlung mit *tag-208*, *tomm-40* und *mispn-1* unter dem Hellfeld und dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die  $P_{hsp-6GFP}$  Fluoreszenzintensität wurde quantifiziert und mittels einer ein-fractionellen ANOVA (Kruskal-Wallis-Test) analysiert. Der p-Wert zwischen +/+ *tag-208 (RNAi)* und +/+ *tomm-40 (RNAi)* lag bei  $p=0,0031$ , zwischen +/+ *tag-208 (RNAi)* und +/+ *mispn-1 (RNAi) tomm-40 (RNAi)* bei  $p=0,0065$ , zwischen +/+ *tag-208 (RNAi)* und *mispn-1(tm3831) tag-208 (RNAi)* lag bei  $p>0,9999$ , zwischen +/+ *tag-208 (RNAi)* und *mispn-1(tm3831) tomm-40 (RNAi)* bei  $p=0,0031$ , zwischen +/+ *tomm-40 (RNAi)* und *mispn-1(tm3831) tomm-40 (RNAi)* bei  $p=0,0065$ , zwischen *mispn-1(tm3831) tag-208 (RNAi)* und *mispn-1(tm3831) tomm-40 (RNAi)* bei  $p=0,0031$  und zwischen *mispn-1(tm3831) tomm-40 (RNAi)* und +/+ *mispn-1 (RNAi) tomm-40 (RNAi)* bei  $p>0,9999$ . Die Anzahl der biologischen Replikate lag bei  $n=6$  (Ein Replikat entspricht einer einzelnen *RNAi* Platte). Maßstab: 5 mm.

## 4. Diskussion

Die Funktionalität vieler essenzieller Prozesse in der Zelle hängt von hochspezialisierten Qualitätskontrollmechanismen ab. Die Qualitätskontrolle an Mitochondrien kann auf verschiedene Weise stattfinden. Zu diesen Mechanismen gehören das Chaperon-Protease System, die UPR<sup>mt</sup>, UPR<sup>am</sup> und die PINK1-Parkin induzierte Mitophagie, die als letzter Ausweg, um ein dysfunktionales Organell zu eliminieren, verwendet wird. Mit diesen speziellen Rettungsmechanismen wird die Proteostase und Funktionalität der Mitochondrien aufrechterhalten oder wiederhergestellt und das Überleben der Zelle gesichert.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Charakterisierung von Msp1 bezüglich seiner Funktion im Zusammenhang mit endogenen mitochondrialen Proteinen. Die erste Arbeitshypothese besagte, dass Msp1 als eine Retrotranslokase für IMS-Proteine agiert. Diese konnte nicht bestätigt werden. Die zweite Hypothese postulierte eine Rolle von Msp1 in der Qualitätskontrolle des Proteinimports in Mitochondrien.

### 4.1. Funktionelle Interaktion zwischen Msp1 und dem TOM-Komplex

Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese wurde der Importstress an dem Hauptimportkomplex untersucht. Wir untersuchten die funktionelle Kooperation zwischen Msp1 und dem TOM-Komplex und charakterisierten die einzelnen Schritte dieses Qualitätskontrollmechanismus an den Mitochondrien. Der TOM-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten, die sich auf bestimmte Funktionen spezialisiert haben (Chacinska et al., 2009, Bausewein et al., 2017 Dekker et al., 1998, Dietmeier, 1997, Hill et al., 1998, Hönlinger et al., 1996, Model et al., 2008 Van Wilpe, 1999, Shiota et al., 2015). Während die Deletion der Hauptimportpore Tom40 zum Tod der Zelle führt, wird eine Deletion der Rezeptoren Tom70 und Tom20 toleriert (Baker et al., 1990, Lithgow et al., 1994). Die Deletion von Tom22 führt im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren zu einem besonders schweren Wachstumsphänotyp (Van Wilpe, 1999). Die Entfernung der kleinen TOM-Proteine Tom5, Tom6 und Tom7 zeigte unter normalen Bedingungen fast keinen Wachstumsdefekt (Hönlinger et al., 1996).

In dieser Arbeit konnte eine negative genetische Interaktion zwischen *MSP1* und *TOM5*, *TOM20* und *TOM40Δ3'UTR* bei erhöhter Temperatur gezeigt werden. Diese genetische Interaktion korrelierte mit der Akkumulation der Vorläuferform von Hsp60 in den Doppelmutanten. In den Mutanten *Δtom6Δmsp1*, *Δtom7Δmsp1*, *Δtom70Δmsp1* und *TOM22Δ3'UTRΔmsp1* wurde weder ein Wachstumsdefekt noch eine Anhäufung von Vorläuferproteinen beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt, dass Msp1 funktionell mit dem TOM-Komplex interagiert. Dieser Befund stimmt mit der Hypothese von Weidberg und Amon (2018) überein, dass Msp1 zum TOM-Komplex



rekrutiert wird, um akkumulierte Substrate zu entfernen und die TOM-Funktion wiederherzustellen. Im Unterschied zu diesen Ergebnissen wurde in der Studie von Weidberg und Amon (2018) der Fokus auf Substrate mit einem zweiteiligen Sortierungssignal gelegt, die nach Eintritt in die Mitochondrien in die Innenmembran inseriert werden. Eine Überexpression und somit Akkumulation dieser Innenmembranproteine am TOM-Komplex führt zur Induktion der Expression des Proteins Cis1, welches zur MitoCPR gehört und womöglich die Rekrutierung von Msp1 an den TOM-Komplex fördert (Weidberg und Amon, 2018).

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen darüber hinaus einen Einblick in die Funktionen der Untereinheiten in Anwesenheit von akkumulierten Matrix-Vorläuferproteinen, die im Folgenden schrittweise näher beschrieben werden. Die ankommenden Vorläuferproteine werden zunächst von den Rezeptoren Tom20 oder Tom70 erkannt. In den Experimenten dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Vorläuferform des Chaperonin Hsp60 in der  $\Delta tom20\Delta msp1$ , aber nicht in der  $\Delta tom70\Delta msp1$  akkumuliert. Die Akkumulation dieses Substrats in der  $\Delta tom20\Delta msp1$  Mutante und die genetische Interaktion zwischen *MSP1* und *TOM20* sind mit den bisher publizierten Eigenschaften von Tom20 zu erklären. Die Untereinheit Tom20 erkennt die Proteine mit einer N-terminalen Signalsequenz, die positiv-geladene amphipathisches  $\alpha$ -Helices formen (Söllner et al., 1989, Moczek et al., 1993). Im Gegensatz zu Tom20, interagiert Tom70 mit internen Signalsequenzen, die in multi-transmembranen Carrier-Proteinen der mitochondrialen Innenmembran zu finden sind (Söllner et al., 1990). Tom70-Substrate werden durch Chaperone sofort erkannt und abgebaut, damit eine Akkumulation am TOM-Komplex verhindert wird (Young et al., 2003, Opalinski et al., 2018). Die Beobachtungen in dieser Arbeit entsprechen den bisher publizierten Charakteristika der Rezeptoren Tom20 und Tom70 und unterstützen die Hypothese, dass Msp1 in der Qualitätskontrolle von Tom20-Substraten am TOM-Komplex involviert ist. Ein weiterer Rezeptor des TOM-Komplexes, der weder eine genetische Interaktion mit *MSP1* noch eine Anhäufung von Proteinen aufwies, ist Tom22. Der Rezeptor Tom22 ist erforderlich, um den TOM-Komplex in einem oligomeren Zustand zu halten, was folglich einen Einfluss auf die Importaktivität hat (Shiota et al., 2015). Der TOM-Komplex unterliegt einer ständigen Dynamik, in der kontinuierlich von einer dimeren zu einer trimeren Isoform gewechselt wird (Shiota et al., 2015). Der dimere Zustand ist sowohl in Anwesenheit als auch in der Abwesenheit von Tom22 möglich (Bausewein et al., 2017, Sakaue et al., 2019). Tom22 dient dabei als ein Stabilisierungsfaktor für den dimeren Zustand des Kernkomplexes (Bausewein et al., 2017). Außerdem ist Tom22 für die Rekrutierung neu synthetisierter TOM-Untereinheiten notwendig, die durch alte Untereinheiten ausgetauscht werden (Shiota et al., 2015). Dieser ständige Austausch gewährleistet einen effizient Proteinimport. Die dimere Isoform des TOM-Komplex fördert den Import von IMS-Proteinen, wogegen die trimere Isoform

---

für den Großteil der Vorläuferproteine erforderlich ist (Sakaue et al., 2019). In der Publikation von Shiota und Kollegen (2011) wurde gezeigt, dass die transiente Interaktion zwischen Tom22 und Tim50 den TIM23 Komplex näher an den TOM-Komplex bringt, wodurch der Import von mitochondrialen Proteinen mit einer Vorsequenz zusätzlich gefördert wird (Shiota et al., 2011). Das vollständige Entfernen von Tom22 ist kritisch für die Stabilität dieses Kernkomplexes, daher ist dieses Protein essentiell für das Überleben der Zelle (Van Wilpe, 1999; Hönlinger, 1995). Des Weiteren, wurde gezeigt, dass Tom22 teilweise die Funktion von Tom20 und Tom70 kompensieren kann (Harkness et al., 1994). Aus diesem Grund ist eine Deletion von *TOM20* und *TOM70* weniger kritisch für die Zelle als *TOM22*. Da Tom22 hauptsächlich die Zusammensetzung und Stabilität des TOM-Komplexes beeinflusst und nicht direkt den Import von Vorläuferproteinen, hat das zusätzliche Entfernen von *MSP1* keine Auswirkung auf eine Akkumulation von Vorläuferproteinen am TOM-Komplex.

Die kleinen Untereinheiten Tom6 und Tom7 regulieren die Stabilität des Komplexes. Tom6 ist an der IMS-Seite von Tom40 lokalisiert und kann daher nicht mit eingehenden Vorläuferproteinen interagieren (Bausewein et al., 2017, Dietmeier, 1997). Zusätzlich fördert Tom6 die Rekrutierung von Tom22 und beide Proteine beeinflussen die Zusammensetzung und die Importfähigkeit des TOM-Komplexes (Sakaue et al., 2019). Da Tom6 und Tom22 den TOM-Komplex auf eine ähnliche Weise beeinflussen, wurde eine vergleichbare Wirkung auf die Akkumulation von Vorläuferproteinen vermutet. Die Untereinheit Tom7 unterstützt den Import von Proteinen über ein 2-Stufen Importsystem und anschließend den Transfer zum TIM23-Komplex (Esaki et al., 2004, Hönlinger et al., 1996). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Tom7 mit dem C-terminalen Ende von Tom22 auf der *trans* Seite vom TOM-Komplex interagiert und in diesem Fall Tom7 eine ähnliche Wirkung wie Tom22 in der Akkumulation von Vorläuferproteinen haben kann (Esaki et al., 2004). Die drei TOM-Untereinheiten Tom6, Tom7 und Tom22 beeinflussen hauptsächlich die Assemblierung und Stabilität des TOM-Komplexes, den Import aber nicht direkt. Aufgrund ihrer ähnlichen Funktion haben sie eine vergleichbare Wirkung in den *MSP1* Mutanten, in denen keine Akkumulation von Vorläuferproteinen beobachtet wird.

Nachdem das ankommende Vorläuferprotein von Tom20 erkannt wurde, wird es im nächsten Schritt zu Tom5 transferiert. Die kleine Untereinheit Tom5 zeigt eine starke genetische Interaktion mit *MSP1*. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde berichtet, dass die positiv-geladenen Reste der IMS-Domäne von Tom5 die Interaktion mit Msp1 verstärken könnten (Li et al., 2019). Dabei erkennt Msp1 mit seinem negativ-geladenen D12-Rest in der IMS-Domäne die positiv-geladenen Reste von Tom5 (Li et al., 2019). Im Gegensatz zu Tom5, besitzt die kleine TOM-Untereinheit Tom6 keine positiv-geladene IMS-Domäne und daher ist die physikalische

Interaktion mit Msp1 unwahrscheinlich (Li et al., 2019). Aus diesem Grund ist die Interaktion zwischen Tom5 und Msp1 besonders interessant. Das Entfernen von Tom5 hat keinen Einfluss auf das Wachstum unter normalen Bedingungen, dennoch kommt es bei dieser Mutante zu schweren Importproblemen (Dietmeier et al., 1997). Tom5 interagiert mit den eingehenden Vorläuferproteinen, wenn diese an der Außenmembran ankommen (Dietmeier et al., 1997). Anschließend werden diese Proteine zu Tom40 übertragen und in die Mitochondrien eingeschleust. Dies ist nur möglich, da sich Tom5 in der Nähe des zytosolischen Teils von Tom40 befindet (Dietmeier, 1997, Shiota et al., 2015). Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit der bisher publizierten Organisation und Funktionalität des TOM-Komplexes überein. Die Vorläuferproteine reichern sich in der *Δtom5* Mutante an und beeinträchtigen den Proteinimport. Folglich müssen diese arretierten Proteine durch Msp1 entfernt werden, um den Proteinimport in die Mitochondrien zu gewährleisten.

#### **4.2. Msp1 entfernt arretierte Vorläuferproteine aus dem TOM-Komplex und rekrutiert das Proteasom für deren Degradierung**

Nachdem eine funktionelle Interaktion zwischen *MSP1* und dem TOM-Komplex bewiesen wurde, konnte in weiteren Experimenten gezeigt werden, dass Msp1 ein wesentlicher Faktor des Qualitätskontrollmechanismus ist und zusätzlich mit dem Proteasom kooperiert.

Zunächst wurde der direkte Beweis geliefert, dass Msp1 mit seinem Substrat, das im TOM-Komplex akkumuliert, physisch interagiert und mit Hilfe vom Proteasom extrahiert wird. Dieses Substrat wurde bereits in einer anderen Studie verwendet und führt bei Überexpression zur einem starken Importstress, wodurch die Expression von proteasomalen Genen induziert wird (Boos et al., 2019). Daher scheint es naheliegend, dass das Proteasom zum TOM-Komplex rekrutiert wird, um das akkumulierte Substrat zu entfernen. Die beobachtete genetische Interaktion zwischen *TOM5* und der proteasomalen Untereinheit *RPN10*, die vergleichbar stark wie die genetische Interaktion zwischen *TOM5* und *MSP1* ist, zeigt die Abhängigkeit von der Proteasom-Aktivität in diesem Qualitätskontrollmechanismus. In der Studie von Li und Kollegen (2019) wurden ebenfalls gezeigt, dass der Abbau von Msp1-Substraten nicht nur von Msp1 sondern auch vom Proteasom abhängig ist.

Da der Abbau der Msp1-Substrate über das Ubiquitin-Proteasom System erfolgt (Basch et al., 2020), müssen die Msp1-Substrate zuerst ubiquitiniert werden, um anschließend vom Proteasom erkannt und degradiert zu werden. Die Ubiquitinierung der Msp1-Substrate erfolgte dabei direkt am TOM-Komplex (Basch et al., 2020). Vermutlich ist eine E3-Ligase in die Ubiquitinierung der Msp1-Substrate involviert. In zwei unabhängigen Studien wurde gezeigt,

dass die E3-Ligase Doa10 notwendig ist, damit mislokalisierte TA-ER-Proteine abgebaut werden können (Dederer et al., 2019, Matsumoto et al., 2019). Es wird angenommen, dass die Msp1-Substrate nach der Extraktion durch Msp1 in das ER verlagert und durch Ubc6-Ubc7 und Doa10 ubiquitiniert werden (Dederer et al., 2019, Matsumoto et al., 2019). Daraufhin erfolgt die Degradierung der ubiquitinierten TA-ER-Proteine durch Cdc48 und das Proteasom. Allerdings wurde auch gezeigt, dass Msp1 als unspezifischer Extraktionsfaktor für monomere TA-ER-Proteine fungiert (Dederer et al., 2019). Es scheint, dass Msp1 nur nicht-ubiquitinierte TA-ER-Proteine extrahiert während Cdc48 seine Substrate in einer ubiquitinierten Form von der ER-Membran extrahiert (Matsumoto et al., 2019). Allerdings gibt es Unterschiede in der Extraktion von TA-ER-Proteinen und anderen Msp1-Substraten. In der Studie Basch et al., 2020 konnten wir zeigen, dass unser am TOM-Komplex akkumuliertes Modellprotein ubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom degradiert wird. Weitere Hinweise zu diesen Unterschieden in der Extraktion stammen von Li und Kollegen (2019). Dort wurde berichtet, dass mislokalisierte TA-ER-Proteine ihre hydrophobe Oberfläche in das Zytosol exponieren, die von hydrophoben Resten in Msp1 erkannt werden (Li et al., 2019). Zusätzlich wurde festgestellt, dass Msp1-Substrate mit positiv-geladenen IMS-Resten von Msp1 durch den negativ-geladenen D12 Rest erkannt werden. Die positiv-geladenen Reste im IMS-Bereich dieser Substrate führen zur Mislokalisierung in die Mitochondrien (Li et al., 2019). Vermutlich verstärkt dieser zweifache Erkennungsmechanismus, sowohl über die IMS- als auch zytosolische Domäne, die Interaktion zwischen Msp1 und seinem Substrat und fördert die Extraktion und den Abbau über das Proteasom (Li et al., 2019). Eine strukturelle Analyse von Msp1 bestätigte diesen möglichen Substraterkennungsmechanismus (Wang et al., 2020).

#### **4.3. Induktion von UPR<sup>mt</sup> nach *mispn-1* und *tomm-40* RNAi Behandlung in *C. elegans***

Im Laufe der Evolution wurde das Gen *MSP1* konserviert und ist in verschiedenen Arten zu finden. Im Menschen führt eine homozygote *loss-of-function* Mutation im Homolog *ATAD1/thorase* zur Hypertonie, Krampfanfällen, respiratorischen Insuffizienz und einem frühen Tod (Piard et al., 2018). Eine *gain-of-function* Mutation verursacht eine schwere und tödliche Enzephalopathie in Verbindung mit Gelenksteifheit (Piard et al., 2018). Ein Verlust von *ATAD1* in embryonalen Fibroblasten von Mäusen resultiert in der Verminderung der Funktion der Atmungskette in Mitochondrien, in der starken Fragmentierung von Mitochondrien und in der Mislokalisierung von TA-ER-Proteinen (Chen et al., 2014). Die *ATAD1* knockout Mäuse weisen schwere neuronale Defekte auf, die das Lern- und das Erinnerungsvermögen beeinflussen (Zhang et al., 2011). Darüber hinaus wurde die Konservierung der Rolle von Msp1 in dem

Nematoden *C. elegans* untersucht (Basch et al. 2020). Der Verlust der MSPN-1 Funktion induziert die UPR<sup>mt</sup>, die aufgrund einer Störung im Proteinimport ausgelöst wird (Rolland et al., 2019). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in der *mispn-1(tm3831)* Mutante die Expression des P<sub>hsp6</sub>GFP-Reporters um das 3-fache stärker ist als im Wildtyp (Abbildung 28). Zusätzlich konnte dieser Effekt auch mit der Behandlung mit *mispn-1 RNAi* beobachtet werden, aber nicht mit der Stärke wie eine genomische Deletion. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass MSPN-1 aus *C. elegans* eine ähnliche Rolle wie das Msp1 aus Hefe hat, in dem es den mitochondrialen Proteinimport erhält. Mit einer Depletion einer TOM-Untereinheit wurde dieser Effekt verstärkt. Die Wahl fiel auf *tomm-40*, da in *C. elegans* kein homologes Gen zu *TOM5* existiert und bei einer Deletion von *TOM40Δ3'UTR* einen starken Wachstumsphänotyp und eine Akkumulation von Vorläuferproteinen in Hefe beobachten werden konnte (Abbildung 11). Nach einer Behandlung mit *tomm-40 RNAi* wurde sowohl im Wildtyp als auch in der *mispn-1(tm3831)* Mutante eine starke Induktion des P<sub>hsp6</sub>GFP-Reporterkonstrukts zeigen (Abbildung 29). Allerdings war die Induktion in allen Stämmen ähnlich stark. Daher ist zunächst eine weitere Anpassung der Konzentration *tomm-40 RNAi* erforderlich, um eine Aussage über die Unterschiede treffen zu können. Die Induktion der UPR<sup>mt</sup> nach Behandlung mit *tomm-40 RNAi* stimmt mit den Ergebnissen der Studie von Billing und Kollegen (2011) überein. Zusätzlich wurde dort der P<sub>hsp60</sub>GFP-Reporter verwendet, der wie der P<sub>hsp6</sub>GFP-Reporter als Reaktion auf eine mitochondriale Import-Störung spezifisch induziert wird (Billing et al., 2011). Des Weiteren wurde dort untersucht, ob *tomm-20* oder *tomm-22 RNAi* ebenfalls die UPR<sup>mt</sup> induzieren (Billing et al., 2011). Nach beiden Behandlungen wurde das P<sub>hsp6</sub>GFP-Konstrukt exprimiert, allerdings wurde die Fluoreszenzintensität weder ausgewertet noch direkt mit *tomm-40 RNAi* verglichen. In der Studie von Rolland et al. (2019) wurde gezeigt, dass genauso wie in der Studie von Billing und Kollegen (2011) *tomm-20 RNAi* zu einer Induktion der UPR<sup>mt</sup> führt. Die P<sub>hsp6</sub>GFP-Fluoreszenzintensität nach *tomm-20 RNAi* Behandlung war auf eine Fluoreszenzintensität von 125 A.U. im Vergleich zu Kontrollbehandlung mit *tag-208 RNAi* (Fluoreszenzintensität von 0 bis 5 A.U.) erhöht (Rolland et al., 2019). Diese Ergebnisse decken sich mit der Rolle des TOM-Komplexes in der Organisation und Funktionalität in Hefe (Kapitel 4.1). Ein direkter Vergleich zwischen *tomm-20 RNAi* und *tomm-40 RNAi* würde den Einblick in die Organisation des TOM-Komplexes in multizellulären Organismen vertiefen und ein Verständnis in der Funktionalität des TOM-Komplexes näherbringen.

#### 4.4. Modell

In dieser Arbeit lag der Fokus auf den Importdefekt am TOM-Komplex.

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit wurde ein Modell erstellt, das die Rolle von Msp1 in der Qualitätskontrolle veranschaulicht (Abbildung 30): Das ankommende Vorläuferprotein mit einer N-terminalen Erkennungssequenz wird von dem Rezeptor Tom20 erkannt. Anschließend wird es über Tom5 und Tom22 zu Tom40 transferiert. Der Import erfolgt über die Hauptimportpore Tom40. Kommt es am TOM-Komplex zu einer Beeinträchtigung des Imports, führt das zu Akkumulation von Vorläuferproteinen an der Importpore oder sogar zum Stillstand des Proteinimports. Folglich wird Msp1 zum TOM-Komplex rekrutiert, wo es für die Elimination dieser arretierten Proteine benötigt wird. Msp1 fungiert zusätzlich als Adapter für das Proteasom, welches das Substrat mit Hilfe von Msp1 extrahiert und degradiert. Sowohl Msp1 als auch das Proteasom agieren als Schlüsselkomponenten bei der Qualitätskontrolle des mitochondrialen Proteinimports am TOM-Komplex.

Dieser Qualitätskontrollprozess ähnelt stark dem ERAD-Mechanismus, der für die Entfernung fehlgefalteter Proteine am ER erforderlich ist. Das fehlgefaltete Protein wird durch die Ligasen Doa10 und Hdr1 erkannt und ubiquitiniert (Wu und Rapoport, 2018). Das AAA<sup>+</sup>-Protein Cdc48 wird mittels Ufd1 und Npl4,

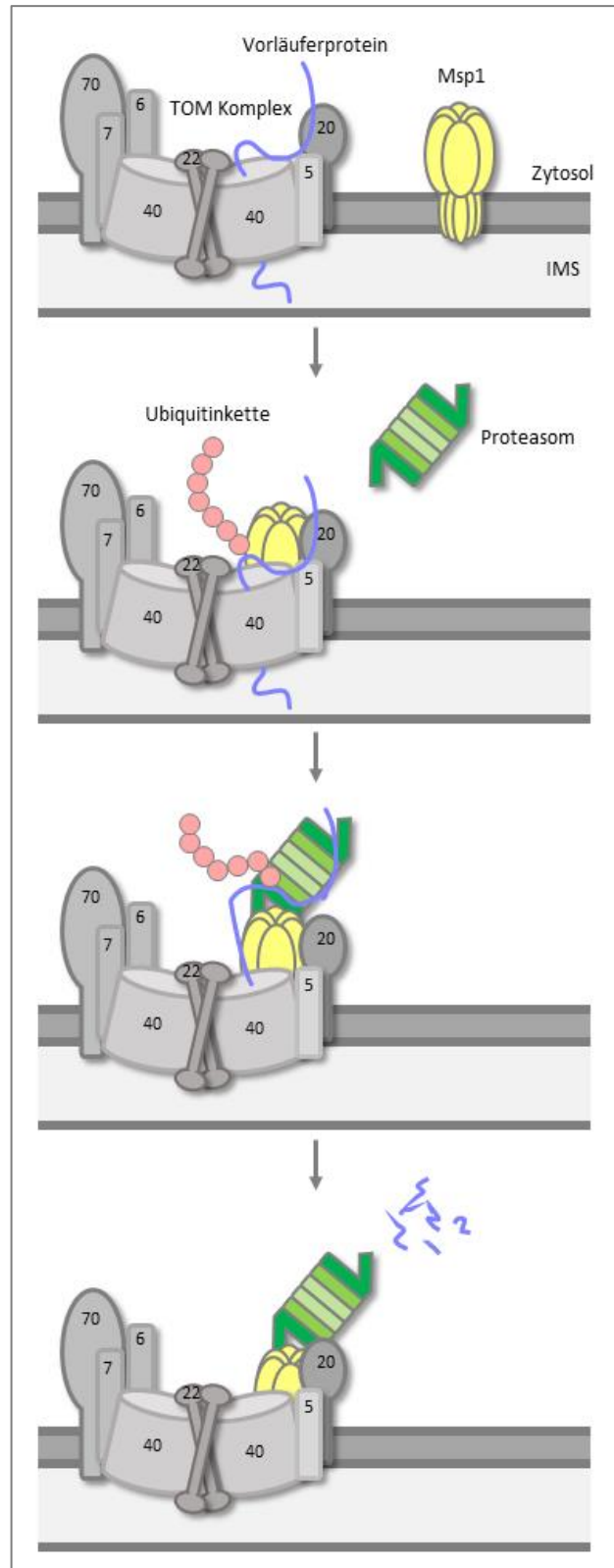


Abbildung 30 Modell für die Zusammenarbeit von Msp1 und dem Proteasom während der Extraktion von Msp1-Substraten aus dem TOM-Komplex. (Die Abbildung wurde adaptiert nach Basch et al., 2020)

die das ubiquitinierte Substrat erkennen, zum ER rekrutiert und bindet an das ER-Ankerprotein Ubx2 (Wu und Rapoport, 2018). Das Substrat wird aus dem ER geschleust und durch das Proteasom degradiert. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Cdc48 und Msp1 ist, dass Cdc48 ubiquitinierte Substrate extrahiert und es scheint, dass Msp1 auf nicht-ubiquitinierte Substrate spezialisiert ist (Matsumoto et al., 2019), die durch spezifische Aminosäurereste in der IMS- und zytosolischen Domäne erkannt werden (Li et al., 2019). Außerdem werden die arretierten Proteine durch das Proteasom entfernt (Li et al., 2019). Ein weiterer Unterschied zwischen Cdc48 und Msp1 ist, dass Ubx2 rekrutiert Cdc48 zum ER. Neue Erkenntnisse haben gezeigt, dass Ubx2 auch an den Mitochondrien vorkommt und Cdc48 an den TOM-Komplex rekrutiert, um arretierte Vorläuferproteine zu entfernen (Martensson et al., 2019). Dieser Mechanismus (mitoTAD) findet unter normalen Wachstumsbedingungen statt, was darauf hinweist, dass mitoTAD den TOM-Komplex kontinuierlich überwacht, um eine Akkumulation von Vorläuferproteinen zu verhindern (Martensson et al., 2019). Eine genetische Interaktion zwischen Msp1 und Ubx2, deutet darauf hin, dass beide Proteine in zwei parallelen Mechanismen wirken, die für die mitochondriale Qualitätskontrolle des Proteinimports notwendig sind. Anhand dieser Beobachtungen wurde zusätzlich festgestellt, dass Msp1 kein weiteres Adapterprotein wie Cdc48 für die Extraktion von arretierten Vorläuferproteinen braucht, sondern direkt seinen Substraten und dem Proteasom interagiert (Abbildung 21, Abbildung 23 und Abbildung 24)

Zusammenfassend habe ich in dieser Arbeit gezeigt, dass das mitochondriale AAA<sup>+</sup>-Protein Msp1 für die Extraktion von akkumulierten Vorläuferproteinen am TOM-Komplex, wenn der Proteinimport beeinträchtigt ist, zuständig ist. Außerdem agieren Msp1 und das Proteasom im selben Kontrollmechanismus, um den Import von mitochondrialen Proteinen zu gewährleisten, die zelluläre Proteostase zu erhalten und folglich das Überleben der Zelle zu sichern.

## 5. Literaturverzeichnis

### Publikationen

Abe, Y., T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo und D. Kohda (2000). "Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20." *Cell* 100(5): 551-560.

Alconada, A., M. Kubrich, M. Moczko, A. Honlinger und N. Pfanner (1995). "The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins." *Mol Cell Biol* 15(11): 6196-6205.

Arlt, H., R. Tauer, H. Feldmann, W. Neupert und T. Langer (1996). "The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria." *Cell* 85(6): 875-885.

Baker, K. P., A. Schaniel, D. Vestweber und G. Schatz (1990). "A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability." *Nature* 348(6302): 605-609.

Baker, M. J., T. Tatsuta und T. Langer (2011). "Quality control of mitochondrial proteostasis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7).

Bard, J. A. M., E. A. Goodall, E. R. Greene, E. Jonsson, K. C. Dong und A. Martin (2018). "Structure and Function of the 26S Proteasome." *Annual review of biochemistry* 87: 697-724.

Basch, M., M. Wagner, S. Rolland, A. Carbonell, R. Zeng, S. Khosravi, S. Schmidt, W. Aftab, A. Imhof, J. Wagener, B. Conradt und N. Wagener (2020). "Msp1 cooperates with the proteasome for extraction of arrested mitochondrial import intermediates." *Molecular Biology of the Cell*.

Bausewein, T., D. J. Mils, J. D. Langer, B. Nitschke, S. Nussberger und W. Kühlbrandt (2017). "Cryo-EM Structure of the TOM Core Complex from *Neurospora crassa*." *Cell* 170: 693-700.

Beverly, K. N., M. R. Sawaya, E. Schmid und C. M. Koehler (2008). "The Tim8-Tim13 complex has multiple substrate binding sites and binds cooperatively to Tim23." *J Mol Biol* 382(5): 1144-1156.

Billing, O., G. Kao und P. Naredi (2011). "Mitochondrial function is required for secretion of DAF-28/insulin in *C. elegans*." *PLoS One* 6(1): e14507.

Boos, F., L. Krämer, C. Groh, F. Jung, P. Haberkant, F. Stein, F. Wollweber, A. Gackstatter, E. Zöllner, M. van der Laan, M. M. Savitski, V. Benes und J. M. Herrmann (2019). "Mitochondrial protein-induced stress triggers a global adaptive transcriptional programme." *Nat Cell Biol* 21(4): 442-451.

Borst, P. und L. A. Grivell (1978). "The mitochondrial genome of yeast." *Cell* 15(3): 705-723.



Bragoszewski, P., M. Turek und A. Chacinska (2017). "Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin-proteasome system." *Open Biol* 7(4).

Bragoszewski, P., M. Wasilewski, P. Sakowska, A. Gornicka, L. Böttinger, J. Qiu, N. Wiedemann und A. Chacinska (2015). "Retro-translocation of mitochondrial intermembrane space proteins." *PNAS* 112(25): 7713-7718.

Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* 77(1): 71-94.

Callegari, S. und S. Dennerlein (2018). "Sensing the Stress: A Role for the UPR(mt) and UPR(am) in the Quality Control of Mitochondria." *Front Cell Dev Biol* 6: 31.

Chacinska, A., C. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow und N. Pfanner (2009). "Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanism." *Cell* 138: 628-644.

Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuan Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C. and Pfanner, N. (2004). "Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins." *EMBO Journal* 23(19): 3735-3746.

Chang, C. W., S. Lee und F. T. F. Tsai (2017). "Structural Elements Regulating AAA+ Protein Quality Control Machines." *Front Mol Biosci* 4: 27.

Chen, Y.-C., G. K. E. Umanah, N. Dephoure, S. A. Andrabi, S. P. Gygi, T. M. Dawson, V. L. Dawson und J. Rutter (2014). "Msp1/ATAD1 maintains mitochondrial function by facilitating the degradation of mislocalized tail-anchored proteins." *The EMBO Journal* 33(14): 1548-1564.

Cheng, Y. L. und R. H. Chen (2010). "The AAA-ATPase Cdc48 and cofactor Shp1 promote chromosome bi-orientation by balancing Aurora B activity." *J Cell Sci* 123(Pt 12): 2025-2034.

Curran, S. P., D. Leuenberger, E. Schmidt und C. M. Koehler (2002). "The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins." *The Journal of Cell Biology* 158(6): 1017-1027.

Dederer, V., A. Khmelinskii, A. G. Huhn, V. Okreglak, M. Knop und M. K. Lemberg (2019). "Cooperation of mitochondrial and ER factors in quality control of tail-anchored proteins." *Elife* 8.

Dekker, P. J., M. T. Ryan, J. Brix, H. Muller, A. Honlinger und N. Pfanner (1998). "Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex." *Mol Cell Biol* 18(11): 6515-6524.

Dietmeier, K., A. Hönlinger, U. Bömer, P. J. T. Dekker, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, M. Kübrich und N. Pfanner (1997). "Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore." *Nature* 388: 195-200.

Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P. J. T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M. and Pfanner, N. (1997). "Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore." *Nature* 388: 195-200.

Dimmer, K. S., D. Papic, B. Schumann, D. Sperl, K. Krumpke, D. M. Walther und D. Rapaport (2012). "A crucial role for Mim2 in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins." *J Cell Sci* 125(Pt 14): 3464-3473.

Eilers, M. und G. Schatz (1986). "Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria." *Nature* 322(6076): 228-232.

Esaki, M., H. Shimizu, T. Ono, H. Yamamoto, T. Kanamori, S. Nishikawa und T. Endo (2004). "Mitochondrial protein import. Requirement of presequence elements and tom components for precursor binding to the TOM complex." *J Biol Chem* 279(44): 45701-45707.

Finley, D., X. Chen und K. J. Walters (2016). "Gates, Channels, and Switches: Elements of the Proteasome Machine." *Trends Biochem Sci* 41(1): 77-93.

Fiorese, C. J., A. M. Schulz, Y. F. Lin, N. Rosin, M. W. Pellegrino und C. M. Haynes (2016). "The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR." *Curr Biol* 26(15): 2037-2043.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver und C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-811.

Fresenius, H. L. und M. L. Wohlever (2019). "Sorting out how Msp1 maintains mitochondrial membrane proteostasis." *Mitochondrion* 49: 128-134.

Fritz, S., N. Weinbach und B. Westermann (2003). "Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast." *Molecular biology of the cell* 14(6): 2303-2313.

Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems und R. A. Woods (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." *Yeast* 11(4): 355-360.

Glickman, M. H., D. M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V. A. Fried und D. Finley (1998). "A subcomplex of proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP0-signalosome and eIF3." *Cell* 94(5): 615-623.

Harkness, T. A., F. E. Nargang, I. van der Klei, W. Neupert und R. Lill (1994). "A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria." *J Cell Biol* 124(5): 637-648.

Harner, M., Neupert, W., Deponte, M. (2011). "Lateral release of proteins from the TOM complex into the outer membrane of mitochondria." *EMBO Journal* 30: 3232-3241.

Harner, M. E., A. K. Unger, T. Izawa, D. M. Walther, C. Ozbalci, S. Geimer, F. Reggiori, B. Brugger, M. Mann, B. Westermann und W. Neupert (2014). "Aim24 and MICOS modulate respiratory function, tafazzin-related cardiolipin modification and mitochondrial architecture." *Elife* 3: e01684.

Haynes, C. M., K. Petrova, C. Benedetti, Y. Yang und D. Ron (2007). "ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*." *Dev Cell* 13(4): 467-480.

Haynes, C. M., Y. Yang, S. P. Blais, T. A. Neupert und D. Ron (2010). "The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*." *Mol Cell* 37(4): 529-540.

Herrmann, J. M., W. Neupert und R. A. Stuart (1997). "Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p." *The EMBO journal* 16(9): 2217-2226.

Hill, K., K. Model, M. T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner und N. Pfanner (1998). "Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]." *Nature* 395(6701): 516-521.

Hönlinger, A., U. Bomer, A. Alconada, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, K. Dietmeier und N. Pfanner (1996). "Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import." *Embo j* 15(9): 2125-2137.

Hönlinger, A., M. Kübrich, M. Moczko, F. Gärtner, L. Mallet, F. Bussereau, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, K. Dietmeier, M. Jacquet und N. Pfanner (1995). "The Mitochondrial Receptor Complex: Mom22 is essential for Cell Viability and directly interacts with Preproteins." *Molecular and Cellular Biology* 15(6): 3382-3389.

Hönlinger, A., Kübrich, M., Moczko, M., Gärtner, F., Mallet, L., Bussereau, F., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., Jacquet, M. and Pfanner, N. (1995). "The Mitochondrial Receptor Complex: Mom22 is essential for Cell Viability and directly interacts with Preproteins." *Molecular and Cellular Biology* 15(6): 3382-3389.

Hoppins, S., S. R. Collins, A. Cassidy-Stone, E. Hummel, R. M. DeVay, L. Lackner, B. Westermann, M. Schuldiner, J. S. Weissman und J. Nunnari (2011). "A mitochondrial-focused genetic

interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria." *The Journal of Cell Biology* 195(2): 323-340.

Hoppins, S., Collins, S. R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., DeVay, R. M., Lackner, L. L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J. S., Nunnari, J. (2011). "A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria." *The Journal of Cell Biology* 195(2): 323-340.

Izawa, T., S.-H. Park, L. Zhao, F. U. Hartl und W. Neupert (2017). "Cytosolic Protein Vms1 Links Ribosome Quality Control to Mitochondrial and Cellular Homeostasis." *Cell* 171(4): 890-903.e818.

Janke, C., M. M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel und M. Knop (2004). "A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes." *Yeast* 21(11): 947-962.

Kamath, R. S. und J. Ahringer (2003). "Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*." *Methods* 30(4): 313-321.

Kang, P. J., J. Ostermann, J. Shilling, W. Neupert, E. A. Craig und N. Pfanner (1990). "Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins." *Nature* 348(6297): 137-143.

Kassenbrock, C. K., W. Cao und M. G. Douglas (1993). "Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex." *Embo j* 12(8): 3023-3034.

Keskin, A., E. Akdogan und C. D. Dunn (2017). "Evidence for Amino Acid Snorkeling from a High-Resolution, In Vivo Analysis of Fis1 Tail-Anchor Insertion at the Mitochondrial Outer Membrane." *Genetics* 205(2): 691-705.

Koehler, C. M., D. Leuenberger, S. Merchant, A. Renold, T. Junne und G. Schatz (1999). "Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2141-2146.

Koehler, C. M., S. Merchant, W. Oppliger, K. Schmid, E. Jarosch, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz und K. Tokatlidis (1998). "Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins." *Embo j* 17(22): 6477-6486.

Komander, D. und M. Rape (2012). "The ubiquitin code." *Annu Rev Biochem* 81: 203-229.

Kruger, V., T. Becker, L. Becker, M. Montilla-Martinez, L. Ellenrieder, F. N. Vogtle, H. E. Meyer, M. T. Ryan, N. Wiedemann, B. Warscheid, N. Pfanner, R. Wagner und C. Meisinger (2017).

---

"Identification of new channels by systematic analysis of the mitochondrial outer membrane." *J Cell Biol* 216(11): 3485-3495.

Kushnirov, V. V. (2000). "Rapid and reliable protein extraction from yeast." *Yeast* 16(9): 857-860.

Kutik, S., D. Stojanovski, L. Becker, T. Becker, M. Meinecke, V. Kruger, C. Prinz, C. Meisinger, B. Guiard, R. Wagner, N. Pfanner und N. Wiedemann (2008). "Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins." *Cell* 132(6): 1011-1024.

Leuenberger, D., N. A. Bally, G. Schatz und C. M. Koehler (1999). "Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins." *Embo j* 18(17): 4816-4822.

Li, L., J. Zheng, X. Wu und H. Jiang (2019). "Mitochondrial AAA-ATPase Msp1 detects mislocalized tail-anchored proteins through a dual-recognition mechanism." *EMBO Rep* 20(4).

Lithgow, T., T. Junne, K. Suda, S. Gratzner und G. Schatz (1994). "The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast." *Cell Biology* 91: 11973-11977.

Lutz, T., W. Neupert und J. M. Herrmann (2003). "Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space." *EMBO Journal* 22(17): 4400-4408.

Malina, C., C. Larsson und J. Nielsen (2018). "Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology." *FEMS Yeast Res* 18(5).

Margulis, L. (1971). "Symbiosis and evolution." *Sci Am* 225(2): 48-57.

Martensson, C. U., C. Priesnitz, J. Song, L. Ellenrieder, K. N. Doan, F. Boos, A. Floerchinger, N. Zufall, S. Oeljeklaus, B. Warscheid und T. Becker (2019). "Mitochondrial protein translocation-associated degradation." *Nature* 569(7758): 679-683.

Matsumoto, S., K. Nakatsukasa, C. Kakuta, Y. Tamura, M. Esaki und T. Endo (2019). "Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER." *Mol Cell* 76(1): 191-205.e110.

Mayer, T. U., T. Braun und S. Jentsch (1998). "Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein." *The EMBO journal* 17(12): 3251-3257.

Mesecke, N., N. Terziyska, C. Kozany, F. Baumann, W. Neupert, K. Hell und J. M. Herrmann (2005). "A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import." *Cell* 121: 1059-1096.

Moczko, M., F. Gartner und N. Pfanner (1993). "The protein import receptor MOM19 of yeast mitochondria." *FEBS Lett* 326(1-3): 251-254.

Model, K., C. Meisinger und W. Kuhlbrandt (2008). "Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase." *J Mol Biol* 383(5): 1049-1057.

Mokranjac, D., M. Sichtung, W. Neupert und K. Hell (2003). "Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria." *Embo j* 22(19): 4945-4956.

Mühlenhoff, U. und R. Lill (2000). "Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria." *Biochim Biophys Acta* 1459(2-3): 370-382.

Nakai, M., T. Endo, T. Hase und H. Matsubaraj (1993). "Intramitochondrial Protein Sorting." *The Journal of Biological Chemistry* 268(32): 24262-24269.

Naoe, M., Y. Ohwa, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto und T. Endo (2004). "Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space." *J Biol Chem* 279(46): 47815-47821.

Nargund, A. M., M. W. Pellegrino, C. J. Fiorese, B. M. Baker und C. M. Haynes (2012). "Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation." *Science* 337(6094): 587-590.

Nobrega, F. G., M. P. Nobrega und A. Tzagoloff (1992). "BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo j* 11(11): 3821-3829.

Okamoto, H., A. Miyagawa, T. Shiota, Y. Tamura und T. Endo (2014). "Intramolecular disulfide bond of Tim22 protein maintains integrity of the TIM22 complex in the mitochondrial inner membrane." *J Biol Chem* 289(8): 4827-4838.

Okreglak, V. und P. Walter (2014). "The conserved AAA-ATPase Msp1 confers organelle specificity to tail-anchored proteins." *PNAS* 111(22): 8019-8024.

Opalinska, M. und H. Janska (2018). "AAA Proteases: Guardians of Mitochondrial Function and Homeostasis." *Cells* 7(10).

Opalinski, L., J. Song, C. Priesnitz, L. S. Wenz, S. Oeljeklaus, B. Warscheid, N. Pfanner und T. Becker (2018). "Recruitment of Cytosolic J-Proteins by TOM Receptors Promotes Mitochondrial Protein Biogenesis." *Cell Rep* 25(8): 2036-2043.e2035.

Paschen, S. A., U. Rothbauer, K. Kaldi, M. F. Bauer, W. Neupert und M. Brunner (2000). "The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria." *Embo j* 19(23): 6392-6400.

Pfanner, N., B. Warscheid und N. Wiedemann (2019). "Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks." *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(5): 267-284.

Piard, J., G. K. E. Umanah, F. L. Harms, L. Abalde-Atristain, D. Amram, M. Chang, R. Chen, M. Alawi, V. Salpietro, M. I. Rees, S. K. Chung, H. Houlden, A. Verloes, T. M. Dawson, V. L. Dawson, L. Van Maldergem und K. Kutsche (2018). "A homozygous ATAD1 mutation impairs postsynaptic AMPA receptor trafficking and causes a lethal encephalopathy." *Brain* 141(3): 651-661.

Pickles, S., P. Vigie und R. J. Youle (2018). "Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance." *Curr Biol* 28(4): R170-r185.

Popov-Celeketic, D., K. Mapa, W. Neupert und D. Mokranjac (2008). "Active remodelling of the TIM23 complex during translocation of preproteins into mitochondria." *Embo j* 27(10): 1469-1480.

Popov-Celeketic, D., K. Waagemann, K. Mapa, W. Neupert und D. Mokranjac (2011). "Role of the import motor in insertion of transmembrane segments by the mitochondrial TIM23 complex." *EMBO Rep* 12(6): 542-548.

Rassow, J., B. Guiard, U. Wienhues, V. Herzog, F. U. Hartl und W. Neupert (1989). "Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites." *J Cell Biol* 109(4 Pt 1): 1421-1428.

Rolland, S. G., S. Schneid, M. Schwarz, E. Rackles, C. Fischer, S. Haeussler, S. G. Regmi, A. Yeroslaviz, B. Habermann, D. Mokranjac, E. Lambie und B. Conradt (2019). "Compromised Mitochondrial Protein Import Acts as a Signal for UPR(mt)." *Cell Rep* 28(7): 1659-1669.e1655.

Rual, J. F., J. Ceron, J. Koreth, T. Hao, A. S. Nicot, T. Hirozane-Kishikawa, J. Vandenhaute, S. H. Orkin, D. E. Hill, S. van den Heuvel und M. Vidal (2004). "Toward improving Caenorhabditis elegans phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library." *Genome Res* 14(10b): 2162-2168.

Sagan, L. (1967). "On the origin of mitosing cells." *J Theor Biol* 14(3): 255-274.

Sakaue, H., T. Shiota, N. Ishizaka, S. Kawano, Y. Tamura, K. S. Tan, K. Imai, C. Motono, T. Hirokawa, K. Taki, N. Miyata, O. Kuge, T. Lithgow und T. Endo (2019). "Porin Associates with Tom22 to Regulate the Mitochondrial Protein Gate Assembly." *Mol Cell* 73(5): 1044-1055.e1048.

Scheffner, M., U. Nuber und J. M. Huibregtse (1995). "Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade." *Nature* 373(6509): 81-83.

Schreiner, B., H. Westerburg, I. Forne, A. Imhof, W. Neupert und D. Mokranjac (2012). "Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria." *Mol Biol Cell* 23(22): 4335-4346.

Shiota, T., K. Imai, J. Qiu, V. L. Hewitt, K. Tan, H. H. Shen, N. Sakiyama, Y. Fukasawa, S. Hayat, M. Kamiya, A. Elofsson, K. Tomii, P. Horton, N. Wiedemann, N. Pfanner, T. Lithgow und T. Endo (2015). "Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate." *Science* 349(6255): 1544-1548.

Shiota, T., H. Mabuchi, S. Tanaka-Yamano, K. Yamano und T. Endo (2011). "In vivo protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(37): 15179-15183.

Shpilka, T. und C. M. Haynes (2018). "The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing." *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(2): 109-120.

Shurtleff, M. J., D. N. Itzhak, J. A. Hussmann, N. T. Schirle Oakdale, E. A. Costa, M. Jonikas, J. Weibezahn, K. D. Popova, C. H. Jan, P. Sinitcyn, S. S. Vembar, H. Hernandez, J. Cox, A. L. Burlingame, J. L. Brodsky, A. Frost, G. H. Borner und J. S. Weissman (2018). "The ER membrane protein complex interacts cotranslationally to enable biogenesis of multipass membrane proteins." *Elife* 7: e37018.

Sikorski, R. S. und P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 122(1): 19-27.

Simões, T., R. Schuster, F. den Brave und M. Escobar-Henriques (2018). "Cdc48 regulates a deubiquitylase cascade critical for mitochondrial fusion." *Elife* 7: e30015.

Singh, B., H. V. Patel, R. G. Ridley, K. B. Freeman und R. S. Gupta (1990). "Mitochondrial import of the human chaperonin (HSP60) protein." *Biochem Biophys Res Commun* 169(2): 391-396.

Snider, J., G. Thibault und W. A. Houry (2008). "The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins." *Genome biology* 9(4): 216-216.

Söllner, T., G. Griffiths, R. Pfaller, N. Pfanner und W. Neupert (1989). "MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins." *Cell* 59(6): 1061-1070.

Söllner, T., R. Pfaller, G. Griffiths, N. Pfanner und W. Neupert (1990). "A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier." *Cell* 62(1): 107-115.

Stiller, S. B., J. Hopker, S. Oeljeklaus, C. Schutze, S. G. Schrempp, J. Vent-Schmidt, S. E. Horvath, A. E. Frazier, N. Gebert, M. van der Laan, M. Bohnert, B. Warscheid, N. Pfanner und N. Wiedemann (2016). "Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins." *Cell Metab* 23(5): 901-908.



Terziyska, N., T. Lutz, C. Kozany, D. Mokranjac, N. Mesecke, W. Neupert, J. M. Hermann und K. Hell (2005). "Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondrial is able to bind metal ions." *FEBS Letter* 579(1): 179-184.

Van Nocker, S., S. Sadis, D. M. Rubin, M. Glickman, H. Fu, O. Coux, I. Wefes, D. Finley und R. D. Vierstra (1996). "The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover." *Molecular and Cellular Biology* 16(11): 6020-6028.

Van Wilpe, S., Ryan, M. T., Hill, K., Maarse, A. C., Meisinger, C., Brix, J, Dekker, P. J. T., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M, Guiard, B., Hönlinger, A. and Pfanner, N. (1999). "Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase." *Nature* 401: 485-489.

Venkatesh, S., J. Lee, K. Singh, I. Lee und C. K. Suzuki (2012). "Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease." *Biochim Biophys Acta* 1823(1): 56-66.

Vestweber, D., J. Brunner, A. Baker und G. Schatz (1989). "A 42K outer-membrane protein is a component of the yeast mitochondrial protein import site." *Nature* 341(6239): 205-209.

Voos, W. und K. Rottgers (2002). "Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1592(1): 51-62.

Wagener, N., M. Ackermann, S. Funes und W. Neupert (2011). "A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1." *Mol Cell* 44(2): 191-202.

Wagner, I., H. Arlt, L. van Dyck, T. Langer und W. Neupert (1994). "Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria." *Embo j* 13(21): 5135-5145.

Wang, L., A. Myasnikov, X. Pan und P. Walter (2020). "Structure of the AAA protein Msp1 reveals mechanism of mislocalized membrane protein extraction." *Elife* 9.

Wang, X. und X. J. Chen (2015). "A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death." *Nature* 524(7566): 481-484.

Wasilewski, M., K. Chojnacka und A. Chacinska (2017). "Protein trafficking at the crossroads to mitochondria." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864(1): 125-137.

Weidberg, H. und A. Amon (2018). "MitoCPR-A surveillance pathway that protects mitochondria in response to protein import stress." *Science* 360(6385).

Weir, N. R., R. A. Kamber, J. S. Martenson und V. Denic (2017). "The AAA protein Msp1 mediates clearance of excess tail-anchored proteins from the peroxisomal membrane." *Elife* 6.

Wienhues, U., K. Becker, M. Schleyer, B. Guiard, M. Tropschug, A. L. Horwich, N. Pfanner und W. Neupert (1991). "Protein folding causes an arrest of preprotein translocation into mitochondria in vivo." *The Journal of Cell Biology* 115(6): 1601-1609.

Wohlever, M. L., A. Mateja, P. T. McGilvray, K. J. Day und R. J. Keenan (2017). "Msp1 is a Membrane Protein Dislocase for Tail-Anchored Proteins." *Molecular Cell* 57: 1-9.

Wrobel, L., U. Topf, P. Bragoszewski, S. Wiese, M. E. Sztolsztener, S. Oeljeklaus, A. Varabyova, M. Lirski, P. Chroscicki, S. Mroczek, E. Januszewicz, A. Dziembowski, M. Koblowska, B. Warscheid und A. Chacinska (2015). "Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol." *Nature* 524(7566): 485-488.

Wu, X. und T. A. Rapoport (2018). "Mechanistic insights into ER-associated protein degradation." *Curr Opin Cell Biol* 53: 22-28.

Yigit, E., P. J. Batista, Y. Bei, K. M. Pang, C.-C. G. Chen, N. H. Tolia, L. Joshua-Tor, S. Mitani, M. J. Simard und C. C. Mello (2006). "Analysis of the *C. elegans* Argonaute Family Reveals that Distinct Argonautes Act Sequentially during RNAi." *Cell* 127(4): 747-757.

Yoneda, T., C. Benedetti, F. Urano, S. G. Clark, H. P. Harding und D. Ron (2004). "Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones." *J Cell Sci* 117(Pt 18): 4055-4066.

Young, J. C., N. J. Hoogenraad und F. U. Hartl (2003). "Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70." *Cell* 112(1): 41-50.

Zhang, J., Y. Wang, Z. Chi, M. J. Keuss, Y. M. Pai, H. C. Kang, J. H. Shin, A. Bugayenko, H. Wang, Y. Xiong, M. V. Pletnikov, M. P. Mattson, T. M. Dawson und V. L. Dawson (2011). "The AAA+ ATPase Thorase regulates AMPA receptor-dependent synaptic plasticity and behavior." *Cell* 145(2): 284-299.

Zientara-Rytter, K. und S. Subramani (2019). "The Roles of Ubiquitin-Binding Protein Shuttles in the Degradative Fate of Ubiquitinated Proteins in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy." *Cells* 8(1).

## **Danksagung**

Am Ende meiner Doktorarbeit richte ich einige Worte an jene, die zur Anfertigung und Entstehung beigetragen haben.

Prof. Dr. Barbara Conradt danke ich dafür, dass ich an Ihrem Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie meine Dissertation anfertigen konnte und dass Frau Conradt die Verantwortung als Erstgutachterin übernimmt.

Vielen Dank an Nikola Wagener, die mir die Möglichkeit gab meine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe zu verfassen. Die vielen spannenden Diskussionen und hilfreichen Anregungen halfen bei der Entstehung dieser Arbeit. Das Eintauchen in die Welt der Hefe und Mitochondrien sowie die zahlreichen Experimente gewährten mir wertvolle Einblicke in die Grundlagenforschung. Die in dieser Zeit gewonnenen Eindrücke und Erfahrungen haben meine persönliche sowie berufliche Entwicklung gefördert.

Danke an alle Mitglieder der Prüfungskommission und des TAC-Komitees!

Meiner Kollegin, Mirjam Wagner, aus unserem Hefe-Labor und allen Mitglieder aus den Conradt-, Lambie-, Zanin- und Mikeladze-Dvali Arbeitsgruppen möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die unvergesslichen Bio-Partys bedanken. Für die vielen lustigen und unterhaltsamen Kaffeepause bedanke ich mich bei den Lab-Unicorns und besonders bei zwei guten Freundinnen, Jenny und Lisa!

Mein Dank geht auch an meine Familie für die Unterstützung während des Studiums!

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Ela und Jurek, und meinen Schwiegereltern, Dori und Philipp, für die großartige Unterstützung bei der Betreuung unseres unglaublichen Sohnes. Ohne Eure Hilfe wäre diese Arbeit nie entstanden!

Zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinem Mann Alex und unseren Sohn Linus. Danke, Alex, dass Du immer für mich da warst und schon zu Beginn meines akademischen Werdegangs jederzeit unterstützt hast. Du gibst mir Liebe, emotionalen Halt und Geborgenheit! Dem größten Dank gilt Dir, Linus! Du gabst mir mit Deiner grenzenlosen Liebe die Kraft diese Arbeit erfolgreich zu beenden! Euch beiden widme ich diese Arbeit!

## Curriculum Vitae

02/2016 – 11/2019

### **Promotion**

Zell- und Entwicklungsbiologie

Ludwig-Maximilians Universität München

03/2017 – 03/2020

### **Graduierenden Programm Life Science Munich (LSM)**

10/2013 – 12/2015

### **Master of Science in Biologie**

Zell- und Entwicklungsbiologie

Ludwig-Maximilians Universität München

10/2010 – 07/2013

### **Bachelor of Science in Biologie**

Mikrobiologie

Leopold-Franzens Universität Innsbruck, Österreich

07/2010

### **Abitur**

Luitpold-Gymnasium München