

---

---

ANALYSE DES LON EINFLUSSES AUF DIE HITZE-  
INDUZIERTER AGGREGATION MITOCHONDRIALER  
PROTEINE UND AUF DIE BILDUNG VON  
AGGREGATABLAGERUNGEN

---

---

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn

Vorgelegt von

**KAREN POLLECKER**

aus

Coesfeld

Bonn, Februar 2020





Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Voos
2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Gruss

Tag der Promotion: 19.06.2020

Erscheinungsjahr: 2020



---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Zusammenfassung/ Abstract.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Bildung von Proteinaggregaten und zelluläre Schutzmechanismen.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Schutzmechanismus der Aggregatablagerung in <i>E. coli</i> .....	6
2.1.2 Schutzmechanismus der Aggregatablagerung in <i>S. cerevisiae</i> .....	7
2.1.3 Schutzmechanismus der Aggregatablagerung in Mammalia .....	8
<b>2.2 Schutzmechanismus der Proteinaggregationen in Mitochondrien.....</b>	<b>11</b>
2.2.1 Mitochondriale Proteinbiosynthese .....	11
2.2.2 Mitochondrialer Proteinimport.....	11
2.2.3 Mitochondriale Dynamik und Abbau von beschädigten Mitochondrien .....	12
2.2.4 Funktion des mitochondrialen Protein-Qualitätskontroll-System .....	13
2.2.5 Die Matrix Protease Lon .....	17
2.2.5.1 Regulation der Lon Expression als Stressreaktion.....	17
2.2.5.2 Funktionen von Lon .....	18
2.2.5.3 Einfluss von Lon auf das Überleben der Zelle.....	22
2.2.5.4 Lon in Erkrankungen.....	22
2.2.5.5 Lon im Alter .....	24
<b>3. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>25</b>
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Material.....</b>	<b>27</b>
4.1.1 Laborgeräte .....	27
4.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	27
4.1.3 Chemikalien .....	28
4.1.4 Reagenzien und Kits .....	28
4.1.5 Lösungen und Puffer.....	29
4.1.6 Medium und Reagenzien für Zellkultur.....	32
4.1.6.1 Reagenzien .....	32
4.1.6.2 Zellkulturmedien .....	33
4.1.7 Mammalia Zelllinien.....	33
4.1.8 Plasmide .....	34
4.1.9 Antikörper .....	36
4.1.9.1 Primärantikörper .....	36

4.1.9.2	Peroxidase- gekoppelte Sekundärantikörper .....	36
4.1.9.3	Fluoreszenz- gekoppelte Sekundärantikörper .....	37
4.1.10	Software .....	37
<b>4.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>38</b>
4.2.1	Zellkultur .....	38
4.2.1.1	Zellkulturbedingungen .....	38
4.2.1.2	Transfektion mit Turbofect® in der Zellkultur .....	38
4.2.2	Genetischer Knockdown von Lon durch eine CRISPR/Cas9 Endonuklease .....	39
4.2.3	Proteinbestimmung mittels SDS-PAGE, Western Blot und Antikörperdekoratation ...	41
4.2.3.1	Proteinlyse mithilfe von SDS oder Triton X-100™ .....	41
4.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	41
4.2.3.3	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese .....	41
4.2.3.4	Western Blot .....	42
4.2.3.5	Immuno-Dekoration und Detektion .....	43
4.2.4	Immunzytochemie .....	43
4.2.5	<i>Live Cell</i> -Mikroskopie .....	44
4.2.6	Slot Assay .....	44
4.2.7	Mitochondrialer Import von endogenen Proteinen .....	45
4.2.8	Isolation von Mitochondrien aus Mammalia Zellen .....	45
4.2.9	Bestimmung des ATP-Gehalts in isolierten Mitochondrien .....	46
4.2.10	<i>In organello</i> Import von Reporterproteinen .....	46
4.2.10.1	<i>In vitro</i> Transkription und Translation .....	46
4.2.10.2	<i>In organello</i> Import von [ <sup>35</sup> S]-markierten Reporterproteinen .....	46
4.2.11	Messungen von mitochondrialen Membranpotential .....	47
4.2.11.1	Messung von mitochondrialen Membranpotential in Zellen mittels Durchflusszytometrie .....	47
4.2.11.2	Messung von mitochondrialen Membranpotential in isolierten Mitochondrien .....	48
4.2.12	Messung von ROS mittels Durchflusszytometrie .....	48
4.2.13	<i>In organello</i> Translation von mitochondrial kodierten Proteinen .....	48
4.2.14	<i>In organello</i> Degradation von [ <sup>35</sup> S]-markierten Reporterproteinen .....	49
4.2.15	Sedimentation von Aggregaten .....	50
4.2.15.1	Sedimentationsassay für Western Blot Analyse .....	50
4.2.15.2	Sedimentationsassay für massenspektrometrische Analyse .....	50
4.2.16	Statistische Analyse .....	51
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung der Lon gKD Zellen .....</b>	<b>52</b>
5.1.1	Morphologie von Lon gKD Zellen .....	54
5.1.2	Proteinmengenänderung nach Lon gKD .....	55
5.1.3	Untersuchung der mitochondrialen Funktionen nach Lon gKD .....	56

5.1.3.1	Änderung der ATP Konzentration in isolierten Mitochondrien .....	56
5.1.3.2	Analyse der Stressantwort nach Stress mit ROS .....	57
5.1.3.3	Messung von mitochondrialen Membranpotential in isolierten Mitochondrien.....	58
5.1.3.4	Proteinimport von [ <sup>35</sup> S]-markierten Reporterproteinen in isolierten Mitochondrien und <i>in vivo</i> Import von endogenen Protein Trap1 .....	59
5.1.3.5	<i>In organello</i> Degradation nach Import von [ <sup>35</sup> S]-markierten Reporterproteinen .....	61
5.1.3.6	<i>In organello</i> Translation.....	63
5.1.4	Zusammenfassung der Charakterisierung der Lon gKD Zellen .....	64
<b>5.2</b>	<b>Lon-bedingte Änderung des mitochondrialen Proteoms .....</b>	<b>65</b>
5.2.1	Veränderung der relativen Proteinmenge von bekannten Lon Substraten und Interaktionspartnern .....	67
5.2.2	Veränderung der relativen Proteinmenge von mitochondrialen Chaperonen und Proteinimportkomplexen.....	68
<b>5.3</b>	<b>Lon-abhängiges, Hitze-induziertes Aggregationsverhalten .....</b>	<b>71</b>
5.3.1	Lon-abhängiges Aggregationsverhalten von Beispielproteinen .....	71
5.3.2	Lon-abhängige, Hitze-induzierte Aggregationstendenz im mitochondrialen Proteomen .....	72
<b>5.4</b>	<b>Mitochondriale Aggregatbildung als Schutz der Mitochondrien mittels PolyQ Reporterproteinen.....</b>	<b>81</b>
5.4.1	Mitochondriale Aggregatbildung mittel PolyQ-Reporterproteins.....	81
5.4.2	Ausbildung der Vimentin-Hülle um zytosolische und nicht um mitochondriale Aggregate .....	84
5.4.3	Zellen zeigen unterschiedliche Typen der Aggregatbildung.....	87
5.4.3.1	Charakterisierung mitochondrialer Aggregatbildung.....	87
5.4.3.2	Aggregatbildung nach Transfektion mit PolyQ-Konstrukten .....	89
5.4.4	Zeitabhängigkeit der mitochondrialen Aggregatbildung .....	95
5.4.5	Abhängigkeit der Aggregatbildung von Mikrotubuli.....	99
5.4.6	Charakterisierung zytosolischer Aggregatbildung.....	101
<b>6.</b>	<b><i>Diskussion</i> .....</b>	<b>103</b>
<b>6.1</b>	<b>Auswirkungen des partiellen Lon-Verlustes .....</b>	<b>103</b>
<b>6.2</b>	<b>Lon-abhängige, Hitze-induzierte Proteinaggregation .....</b>	<b>108</b>
<b>6.3</b>	<b>Mitochondriale Proteinablagerung von Aggregaten als Schutzmechanismus.....</b>	<b>110</b>
6.3.1	Lon-abhängige Ablagerung von Aggregaten in Mitochondrien .....	110
6.3.2	Modell: mitochondriale Antwort auf Aggregate als Stressantwort .....	113

6.4	gKD Lon Zellen als zelluläres Modell für das Altern.....	115
6.5	Offene Fragen und Ausblicke.....	117
	<b>Anhang</b> .....	<b>119</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>135</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>141</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>143</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>144</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>154</b>

---

# 1. Zusammenfassung/ Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

Die mitochondriale Matrix Protease Lon ist ein essentieller Bestandteil des mitochondrialen Protein Qualitätskontroll-Systems. Der Verlust von Lon führt zu einer erhöhten Apoptoserate und embryonaler Letalität im Mausmodell. Des Weiteren korrelieren Alterungsprozesse mit einer Reduktion von Lon. Bisher wurden der Verlust von Lon in transient transfizierten Zellen mit siRNA-vermitteltem Lon Knockdown untersucht. Die Reduktion der Lon-Proteinmenge war nur temporär und sehr variable und an diesen Zellen konnten langfristige Anpassungsprozesse wie das Altern nicht untersucht werden. Für die Analyse der Auswirkungen eines Lon Verlustes auf humane HeLa Zellen, wurde eine genetischer Lon Knockdown (gKD) konstruiert und charakterisiert. Die Reduktion von Lon auf 27% führt zu einer verringerten Stressresistenz. Die Lon Aktivität scheint in diesen Zellen erhöht zu sein um negative Effekte des Lon Verlustes zu reduzieren. Die Proteomanalyse zeigte eine auffällige Zunahme der Importrezeptoren, allerdings wurde beim mitochondrialen Import keine Unterschiede zwischen Lon gKD und WT Zellen beobachtet, was auf eine Kompensation des Imports hinweist. Des Weiteren wurde der Einfluss von Lon auf das Hitze-induzierte Aggregationsverhalten mitochondrialer Proteine analysiert. Dieser zeigte, dass besonders Proteine, die an der mitochondrialen Translation beteiligt sind, in Lon gKD Mitochondrien aggregieren. Die dadurch entstandene Hemmung der mitochondrialen Translation könnte als Schutz vor der Akkumulation von fehlgefalteten mitochondrial codierten Proteinen dienen. Als weiterer Schutzmechanismus vor proteotoxischen Effekten dient die Ablagerung fehlgefalteter Proteine in Aggregate. HeLa Zellen lagern Aggregate ebenfalls innerhalb der mitochondrialen Netzwerke an ein bis zwei Punkten ab, dabei führt der Verlust von Lon zu einer verlangsamten Ablagerung. Daher ist Lon ein essentieller Faktor Der Verlust von Lon führt zu einer verlangsamten Bildung von Proteinaggregaten. Lon ist ein essentieller Faktor in der Antwort auf proteotoxischen Stress. Die vorgestellte Lon gKD Zelllinie bietet ein gutes Modell für die Analyse der Lon Funktion in Alterungsprozessen sowie die Verarbeitung und Prävention von Aggregaten in Mitochondrien.

## 1.2 Abstract

The mitochondrial matrix protease Lon is the essential part of the organelle quality control system. Loss of Lon leads to an increase in apoptosis and to embryonic lethality in mice. Furthermore, reduction in Lon-Protein level correlates with ageing processes. Up to now, loss of Lon was studied in transient transfected cells with siRNA mediated Lon knockdown. These siRNA knockdowns were very variable, since most of the studies used a transient transfection and Lon-Protein level is viable as well. These cells were not useful to study long-term adaptation processes, like ageing. To analyse the cellular adaptation in human HeLa cells, a CRISPR/Cas mediated genetical Lon knockdown (gKD) was constructed and characterized. The stable reduction of Lon to 27% leads to a decreased stress resistance. Cells showed no changes of mitochondrial network morphology. Lon activity was increased in Lon gKD cells, probably to compensate negative effects of Lon loss. Proteomic analysis showed an increase of the amount of import receptors, while mitochondrial import is not affected. The heat-induced aggregation behavior was also affected by the loss of Lon, especially members of mitochondrial translation were affected. The decrease of mitochondrial translation could serve to reduce the accumulation of misfolded proteins and thus decrease proteomics stress. In yeast a sequestration of aggregates to reduce proteotoxic effects was previously observed, similar sequestration was observed in HeLa cells as well. The loss of Lon leads to a slower deposition of these aggregates. This indicated that Lon is an essential factor in proteotoxic stress response and necessary for a fast deposition of misfolded proteins into aggregate sequestration sites. To summarize all results, Lon proteolytic function is essential for cell survival. The presented Lon gKD cell line is a useful model for studying ageing processes as well as processing and prevention of aggregation in mitochondria.

---

## 2. Einleitung

Die Aufrechterhaltung des zellulären Proteingleichgewichts ist eine der wichtigsten Aufgaben der Zelle. Dieser dynamische Prozess von Proteinsynthese, Faltung und Proteinabbau wird auch Proteinhomöostase oder Proteostase genannt. Als Kontrollinstanz besitzen Zellen ein Protein-Qualitätskontroll-System (PQC, engl.: protein quality control), bestehend aus molekularen Chaperonen und Proteasen. Während Chaperone Proteine bei der korrekten Faltung unterstützen, bauen Proteasen wie Lon, spezifisch durch Stress beschädigte oder aggregierte Proteine ab (Voos and Pollecker 2020; Rego and Oliveira 2003). In Alterungsprozessen verlieren die Proteostase ihre Kapazität, was zu einer zunehmenden Akkumulation beschädigter Proteine und demzufolge Aggregaten führt (Labbadia and Morimoto 2015). Diese Akkumulation von Aggregaten führt wiederum zu einer Beeinträchtigung der Proteostase und kann verschiedene neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel Alzheimer oder Parkinson, auslösen (Chiti and Dobson 2017). Aufgrund ihrer essentiellen zellulären Funktionen, spielen mitochondriale Fehlfunktionen in diesen neuronalen Erkrankungen und physiologischen Alterungsprozesse eine wichtige Rolle (Osiewacz 2010; Rüb, Wilkening, and Voos 2017). Mitochondrien besitzen zudem ihr eigenes Proteom und somit ein eigenes mitochondriales Protein-Qualitätskontroll-System (mtPQC, engl.: mitochondrial protein quality control) um die mitochondriale Proteostase aufrecht zu erhalten (Voos 2009; 2013).

### 2.1 Bildung von Proteinaggregaten und zelluläre

#### Schutzmechanismen

Um die zelluläre Proteostase zu schützen, verfügt die Zelle über verschiedene Mechanismen um die Bildung von Aggregaten zu verringern. Proteine müssen, um ihrer Funktion zu auszuüben, in eine dreidimensionale Struktur gefaltet werden. Für den dynamischen Ablauf und die Kontrolle ist das PQC System zuständig, welches die Faltung und den Abbau von Proteinen reguliert. Native Proteine wiederum sind permanent der Gefahr ausgesetzt beschädigt und entfalten zu werden. Bei vielen Faltungsintermediaten oder

entfalteten Proteinen liegen die inneren, meistens hydrophoben Aminosäuren frei. Hierdurch können sie mit sich und mit anderen Proteinen interagieren und Aggregate bilden. Diese Interaktion mit anderen Proteinen stört die Proteostase und wichtige zelluläre Prozesse, indem vermeintlich unbeteiligte Proteine koaggregieren und somit ihre Funktion verlieren. Der Schutz vor Fehlfaltungen ist einer der besten Schutzmechanismen vor Aggregationen und deren toxischen Auswirkungen auf das zelluläre Milieu (Tyedmers, Mogk, and Bukau 2010). Die Fehlfaltung von Proteinen und das Bilden von Aggregaten kann auf verschiedene Stressoren oder Defekte zurückgeführt werden. Diese Einflüsse können grob in (i) äußeren oder inneren Faktoren eingeordnet werden. Die inneren Faktoren können wiederum in (ii) Proteinsynthesedefekte, (iii) Fehler im PQC System und (iv) intrazelluläre Stressoren unterteilt werden. Zu den äußeren Einflüssen zählen unter anderem die negativen Folgen von Hitzestress. Dieser führt zu einer verstärkten Anhäufung von ungefalteten Proteinen, was wiederum zu der Aggregation dieser Proteine führen kann (Wilkening et al. 2018). Bei Proteinsynthesedefekten können Proteine aufgrund von Gendefekten, zu einer verstärkten Aggregationstendenz neigen. So kommt es, zum Beispiel, durch eine Trinukleotid-Wiederholung im Exon 1 des Huntingtin-Gens, zu einer wiederholten Expression von Glutaminen (Polyglutamin, PolyQ). Folgen mehr als 36 Glutamine aufeinander kommt es zu einer Aggregatbildung (Clabough 2013). Diese Aggregate sind zelltoxisch und führen zu der neurodegenerativen Erkrankung Chorea Huntington (Martindale et al. 1998). Weitere Defekte in der Proteinbiosynthese sind Transkription- und Translationsdefekte. Diese führen zu dem Einbau falscher Aminosäuren, welcher wiederum zu Assemblierungsdefekten und in Folge zu Aggregationen führt (Drummond and Wilke 2008). Defekte im PQC System führen ebenfalls zu der Zunahme von Proteinaggregaten, da die Regulierung und Kontrolle der Proteinfaltung beeinträchtigt ist. Eine der bekanntesten Folgen des PQC Verlustes ist die neurodegenerative Erkrankung Parkinson. Eine Mutation in der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin führt zu einem partiellen Verlust der PQC Funktion. Proteine können nicht mehr für die Degradation durch das Proteasom markiert werden, dieses führt wiederum zu der Akkumulation toxischer Aggregate (Olzmann and Chin 2008). Umgekehrt, führt die verstärkte Expression verschiedener Komponenten des PQC System zu einer verlängerten Lebensspanne bei Zwergmäusen (Ozkurede and Miller 2019). Einer der größten

intrazellulären Stressoren ist der Stress, der durch freie Sauerstoffradikale ausgelöst wird (ROS; engl.: free oxidative species; (Ngo, Pomatto, and Davies 2013). Freie Sauerstoffradikale entstehen vorwiegend während der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien (Beckman and Ames 1998; Ngo, Pomatto, and Davies 2013). Die Bindung dieser freien Radikale führt zu verschiedenen irreversiblen Proteinmodifikationen, die aus Oxidation verschiedener Aminosäuren und/oder Carbonylierungen bestehen. Wobei Carbonylierungen als Folge von Oxidationen angesehen werden. Diese Modifikationen sind irreversibel, die betroffenen Proteine müssen mittels proteolytischer Degradation wiederum abgebaut werden, da sie sonst zu Fehlfaltungen und Aggregationen führen. (Stadtman and Levine 2000). Ein weiterer Risikofaktor für die Akkumulation von ungefalteten Proteinen ist der physiologische Alterungsprozess. Im Alter kommt es zu der Verbindung und/oder Zunahme verschiedener Stressoren, wie zum Beispiel zu der Zunahme von ROS Stress (Stadtman and Levine 2000) und anderen Defekten, welche an späterer Stelle behandelt wird.

Diese Defekte oder Stressoren führen zu der Bildung von Aggregaten. Diese werden anhand ihrer inneren Organisation und Eigenschaften in verschiedene Gruppen eingeteilt. Zunächst führen die benannten Defekte zu dem Offenlegen der hydrophoben Aminosäureresten, die im nativen Zustand im Inneren des Proteins liegen und strukturgebend sind. Diese hydrophoben Seitenketten können sowohl die eigene Proteinstruktur negativ verändern, als auch ungewollt mit anderen Proteinen wechselwirken. Dieses führt wiederum zu der Ausbildung von größeren Aggregaten. Liegt eine ungeordnet Aggregatstruktur vor und sind keine oder nur wenige Strukturen wie  $\beta$ -Faltblattstrukturen erkennbar, werden sie als amorphe oder ungeordnete Aggregate bezeichnet. Sie sind meistens noch durch Proteasen abbaubar und chemisch löslich. Weisen Aggregate hingegen eine hohe strukturierte Ordnung auf, werden sie zu den amyloiden Aggregaten gezählt. Sie zeigen eine sehr geringe chemische Löslichkeit und eine hohe Protease-Resistenz durch die enge Zusammenlagerung von  $\beta$ -Faltblättern in parallel oder anti-parallelen Fibrillen. Ein wichtiges Beispiel ist das, in dieser Arbeit verwendete Aggregationsreporterprotein, Huntingtin. Die Expression dieses Proteins führt, aufgrund der hohe Anzahl an Glutamin-Wiederholungen, zu der Ausbildung von amyloiden Aggregaten (Clabough 2013).

Paradoxerweise haben große Aggregatstrukturen weniger zytotoxische und proteotoxische Auswirkungen auf die Zellen. Sie interagieren seltener mit unbeteiligten Proteinen, da die meisten hydrophoben Seitenketten durch die Aggregatformatin gebunden wurden. Kleinere Aggregate wie Aggregatoligomere und protofibrilläre Strukturen lösen die Aggregation weiterer, bislang unbeteiligter, nativer Proteine aus, da ihre hydrophoben Seitenketten weiterhin offen liegen. Die Bildung größerer fibrillärer Strukturen führte zu einer Enttoxifizierung und einer längeren Lebenspanne im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (Cohen et al. 2006). Dennoch können auch sie mit zellulären Membransystemen interagieren und hierdurch ebenfalls essentielle Funktionen stören (Guardia-Laguarta et al. 2014).

Zellen in allen Bereichen des Lebens haben daher spezifische Schutzmechanismen entwickelt, um die Bildung von Aggregaten zu minimieren und sie mit möglichst geringen zytotoxischen Effekten abzulagern, sofern ein Abbau nicht möglich ist. Diese Mechanismen unterscheiden sich bei Prokaryoten sowie Eukaryoten. Im Weiteren sind die Schutz- und Abbaumechanismen bei den verschiedenen Modellorganismen, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, und in Mammalia Zellen, beschrieben (Abb. 1).

### **2.1.1 Schutzmechanismus der Aggregatablagerung in *E. coli***

Die Aggregation von endogenen Proteinen in Bakterien ist meistens eine Reaktion auf den Stress durch Hitze oder ROS. Des Weiteren ist sie im Labor meist nach der induzierten Proteinexpression zu beobachten. Um sich vor den zytotoxischen Effekten zu schützen bilden Bakterien Aggregatablagerungen an den polaren Enden des Bakteriums, in Form von sogenannten Einschlusskörper (engl. *Inclusion Bodies*; Abb. 1A). Die Zelle bildet meistens ein bis zwei *Inclusion Bodies*, die meistens amyloid-ähnliche Aggregatstrukturen aufweisen (de Groot and Ventura 2006). Die Ablagerung dient der Enttoxifizierung von kleineren Aggregatoligomeren, sowie der Auflösung durch Rückfaltung oder Abbau durch das bakterielle PQC System (Mogk et al. 1999). Die genaue Regulierung der Bildungen solcher *Inclusion Bodies* an den polaren Enden ist noch nicht ausreichend geklärt.

### 2.1.2 Schutzmechanismus der Aggregatablagerung in *S. cerevisiae*

In dem Modellorganismus der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, ergeben sich, aufgrund der eukaryotischen Zellstruktur, verschiedene Ablagerungswege für Proteinaggregate (Abb. 1B). Die Ablagerung ist abhängig von den jeweiligen Eigenschaften der falsch gefalteten Proteine. Lösliche und falsch gefaltete Proteine werden im Zytosol der Hefezellen ubiquitiniert und an Chaperone gebunden, um ihre Löslichkeit zu erhalten. Da die Proteasomenkonzentration am Nukleus am höchsten ist, werden sie als Q-Körperchen (engl.: Q-Bodies) in Nukleus Richtung transportiert und dort abgelagert. Diese Proteinablagestelle wird als JUNQ (engl.: juxtanuclear quality-control compartment) bezeichnet und dient zur Aufbewahrung der löslichen Proteine bevor sie vom Proteasom degradiert werden. Proteinaggregate mit einem hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen bilden häufiger amyloide Strukturen aus. Diese Proteine sind unlöslich und können über das Proteasom nicht abgebaut werden. Daher werden diese Aggregate nahe der Vakuole im IPOD (engl.: perivacuolar insoluble protein deposit) abgelagert und über die Vakuole abgebaut. Ist die Ubiquitinierung, der Signalweg für eine Proteasom-abhängige Degradation, gestört, werden auch potentielle JUNQ-Substrate zum IPOD transportiert. Zudem werden ubiquitinierte IPOD-Substrate zum Nukleus transportiert und im JUNQ abgelagert. Dieses zeigt, dass die Ubiquitinierung das entscheidende Signal für die Wahl der Ablagerungsstelle im Zytosol ist (Kaganovich, Kopito, and Frydman 2008). Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden falschgefaltete und lösliche Proteine durch Translokationskanäle in das Zytosol befördert. Durch Ubiquitinierung können sie, wie Proteine des JUNQs, durch das Proteasom abgebaut werden. Dieser Vorgang wird als ER assoziierte Degradation (ERAD) bezeichnet. Aggregierte, unlösliche Proteine hingegen können nicht mehr durch die Translokationskanäle transportiert werden und werden vom ER als Vesikel abgespalten und als ERQC (engl.: ER associated quality control compartment) bezeichnet. Dieses Kompartiment wird mittels LC3-vermittelter Autophagie durch das Lysosom abgebaut (Oikonomou and Hendershot 2020).

Da Mitochondrien kein Proteasom besitzen und sie räumlich, durch eine Doppelmembran, vom Rest der Zelle getrennt sind, benötigen Mitochondrien ein eigenes System um sich vor Proteinaggregationen zu schützen (Voos 2013; Voos

et al. 2016). Für die Ablagerung von Proteinaggregaten innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes in Hefe Zellen ist kürzlich ein spezifischer Ablagemechanismus, das IMiQ (engl.: intramitochondrial protein quality control compartment), beschrieben worden (Bruderek et al. 2018). Aggregate eines destabilisierten Reporterproteins werden über die Ablagerung an einem Ort des mitochondrialen Netzwerkes gesammelt, anschließend wird das Mitochondrium vom restlichen Netzwerk abgespaltet um die mitochondriale Funktion zu erhalten. Über die Motorproteinbewegung von Dynein entlang des Mikrotubulus wird das Mitochondrium am Zellkern abgelagert. Es weist zudem spezifische Charakteristika auf, die weiterhin als Mitochondrium ausweist, allerdings ist es gleichzeitig vom restlichen Netzwerk abgetrennt. Es besitzt mitochondriale Proteine und wird von mitochondrialen Chaperonen umgeben (Ruland et al. unveröffentlicht), allerdings hat es das mitochondriale Membranpotential verloren. Das IMiQ schützt, ähnlich den anderen Ablagestellen, das mitochondriale Netzwerk vor proteotoxischen Stress und erhöht die Fitness der Mitochondrien (Bruderek et al. 2018; Abb.1B).

### **2.1.3 Schutzmechanismus der Aggregatablagerung in Mammalia**

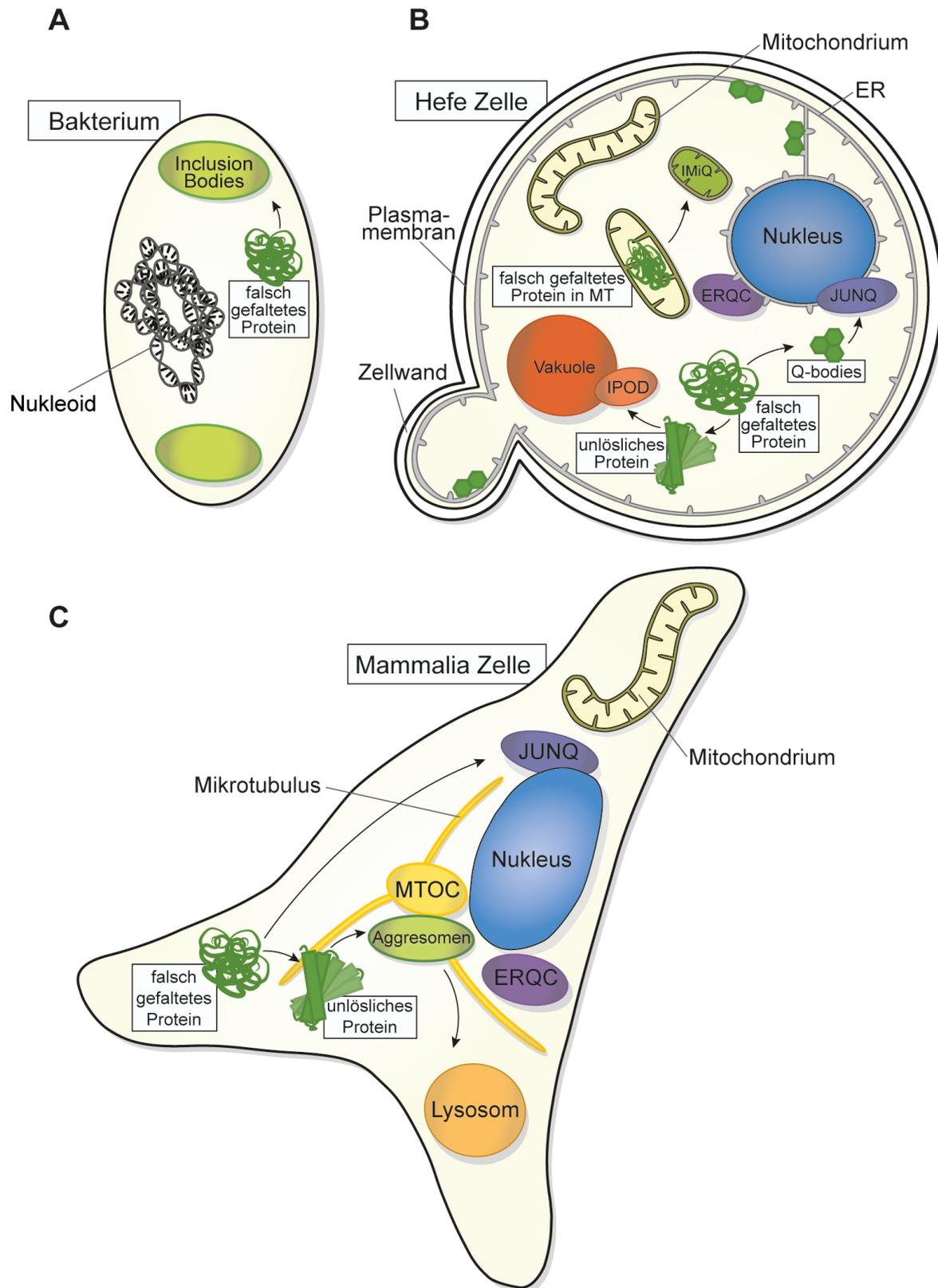
In Säugetierzellen sind, ähnlich wie in Hefe Zellen, Proteinablagerungen in Form von ERQC und JUNQ gefunden worden. Allerdings zeigen Mammalia Zellen eine weitere hiervon unabhängige Form der Aggregatablagerung, welche als Aggresom bezeichnet wird. Die besondere Charakteristik dieser Ablagerung ist eine Vimentin-Hülle. Hiermit werden die unlöslichen Aggregate von den Proteinen im Zytosol räumlich getrennt um weitere Proteinaggregationen zu verhindern (Johnston, Ward, and Kopito 1998; García-Mata et al. 1999).

Für den Aufbau des Aggresom ist ein Ubiquitin-abhängiger Signalweg notwendig. Fehlgefaltete Proteine werden zunächst durch die Bindung mit mehreren Ubiquitin zum Abbau durch das Proteasom markiert. Aggregieren zu viele Proteine oder wird das Proteasom gehemmt, kommt es zu einer Akkumulation dieser Proteine und es bilden sich toxische Aggregate. Die Histondeacetylase 6 dient als Adapter der gebundenen Ubiquitinketten und bindet darüber die Aggregate an den Dynein Motorproteinkomplex (Kawaguchi et al. 2003). Durch die Bindung der aggregierten Proteine zu Dynein, wird die

Histone deacetylase 6 aus ihrem Komplex mit verschiedenen Chaperonen gelöst. Dies wiederum löst die Stressantwort auf zytotoxische Proteinaggregate aus (Boyault et al. 2007). Dynein transportiert die gebundenen Aggregate entlang des Mikrotubulus zum Minus-Ende und damit zum Mikrotubuli Organisationszentrum (MTOC; engl.: microtubule organization center) am Nukleus. Die dort abgelagerten ubiquitinierten Proteine bilden mit der Vimentin-Hülle das Aggresom. Dessen Form ist wiederum Zelltypabhängig, zudem wird meistens nur ein Aggresom pro Zelle gebildet (Kawaguchi et al. 2003). Dieses kann anschließend mittels LC3-vermittelter Autophagie (LC3 A/B-I/II; engl.: Microtubuli-associated proteins 1a/1b light chain 3B; Zou et al. 2014) durch das Lysosomen abgebaut werden. Über das Ubiquitin im Aggresome wird zunächst p62 gebunden, welches wiederum an das prozessierte LC3-II bindet und das Autophagosomen bildet. Das Autophagosomen verschmilzt mit dem Lysosomen und die aggregierten Proteine können abgebaut werden (Garcia-Mata, Gao, and Sztul 2002; Abb. 1C).

### **Abbildung 1: Schutzmechanismen der Aggregatablagerung in verschiedenen zellulären Systemen**

**A** In Bakterien akkumulieren falschgefaltete und unlösliche Proteine in *Inclusion Bodies*, welche häufig an den Polen der Bakterie zu finden sind. Diese Lokalisation wird vom Nukleoid kontrolliert. **B** Eukaryotische Hefe Zellen besitzen verschiedene PQC-Kompartimente, die Aggregate je nach Lokalisation und Eigenschaft spezifisch ablagern. Unlösliche Proteine im ER werden im ERQC (engl.: ER associated quality-control compartment) abgelagert, während zytosolische Proteine entweder in JUNQ (engl.: juxtanuclear quality-control compartment) oder in IPOD (engl.: perivacuolar insoluble protein deposit) abgelagert werden. Zudem können sie sogenannte *Q-Bodies* formen, die im gesamten zellulären System zu finden sind. Aggregierte Proteine im mitochondrialen Netzwerk werden in einem einzelnen Mitochondrium (MT) gesammelt und bilden das IMiQ (engl.: intramitochondrial protein quality control compartment). **C** Sowohl ERQC, JUNQ und IPOD-ähnliche Strukturen wurden ebenfalls in Mammalia Zellen gefunden. Eine Besonderheit der Proteinablagerung und dem darauf gefolgten Abbau, ist die Bildung eines Aggresom. Aggregierte, unlösliche Proteine werden mittels Dynein und Histone deacetylase 6 über den Mikrotubulus zum Minusende am MTOC (engl.: microtubule organization center) transportiert. Das Aggresom bildet eine charakteristische Vimentin-Hülle.



(Beschriftung siehe S.9)

## **2.2 Schutzmechanismus der Proteinaggregationen in Mitochondrien**

Hefemitochondrien besitzen spezifische Schutzmechanismen, die ungefaltete und unlösliche Proteine ablagern. Diese sind bedingt durch den endosymbiontischen Ursprung und der sich hieraus folgenden Anpassungen ergeben besondere Herausforderungen für die mitochondrialen Lebensweise. Diese Besonderheiten und Anpassungen werden im Folgenden beschrieben. Ein besonderes Augenmerk liegt hier auf dem mtPQC-System und der mitochondrialen Protease Lon. Diese Protease hat wichtige Funktion in Bezug auf mitochondriale Proteinaggregaten, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

### **2.2.1 Mitochondriale Proteinbiosynthese**

Obwohl Mitochondrien im Laufe der Evolution fast alle Gene in den Nukleus übertragen haben, sind in humanen Zellen weiterhin 13 Proteine im mitochondrialen Genom codiert. Hierbei handelt es sich ausschließlich um verschiedene, hydrophobe Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe. Die mitochondriale DNA (mtDNA) liegt, wie bei Prokaryoten, als zirkuläres Genom vor. Da Mitochondrien ihr eigenes Genom besitzen, haben sie auch eine spezifische Proteinbiosynthese. Prinzipiell entspricht sie der anderen Pro- und Eukaryoten. Allerdings gibt es zwei Besonderheiten, zum einen codiert das Codon UGA nicht ein Stoppcodon, sondern die Aminosäure Tryptophan. Zum anderen gibt es zusätzliche Stoppcodons (AGG, AGA). Aufgrund der unterschiedlichen Kodierung der Aminosäuren beinhaltet die mtDNA neben den 13 Proteinen und mitochondrialer rRNA auch eigene tRNAs (Anderson et al. 1981).

### **2.2.2 Mitochondrialer Proteinimport**

Die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine werden im nuklearen Genom codiert, daher müssen mitochondriale Proteine nach der Translation im Zytosol, in die Mitochondrien importiert werden. Der Antrieb für diesen Import ist der elektrochemische Gradient, der ebenfalls für die ATP-Synthese genutzt wird. Aufgrund der Ansammlung positiv geladener Protonen im Intermembranraum, ist die Matrix im Vergleich negativ geladen. Viele Proteine, die in die Mitochondrien

importiert werden sollen, besitzen eine positiv geladene mitochondriale Zielsequenz (MTS, engl.: mitochondrial targeting sequence) nachdem sie durch zytosolische Ribosome translatiert wurden (Becker, Böttinger, and Pfanner 2012). Diese MTS muss zwei spezifische Eigenschaften besitzen, zum einen muss sie zwischen 10 bis 60 Aminosäuren lang sein und zum anderen aus einer  $\alpha$ -Helices bestehen, die aus hydrophoben und positiv geladenen Aminosäuren aufgebaut ist (Neupert and Herrmann 2007).

Viele der mitochondrialen Proteine sind in der Matrix lokalisiert und müssen daher über die äußere und innere Membran, sowie den Intermembranraum transportiert werden. Die MTS des Präproteins wird im Zytosol zunächst von dem Tom20 Rezeptor des Tom Komplexes (engl.: translocase of the outer membrane) erkannt. Über die Tom40 Translokase wird das Präprotein in den Intermembranraum transportiert. Anschließend wird die MTS erneut von dem Rezeptor des Tim23 Komplexes (engl.: translocase of the inner membrane), Tim20 erkannt und mittels einer zweiten Translokase, Tim23, in die Matrix transportiert. Erreicht die MTS die Matrix, wird das Protein durch den PAM Komplex (engl.: presequence translocase-associated motor) in die Matrix gezogen. Nach dem Import wird die MTS durch die Peptidase MPP (engl.: mitochondrial-processing peptidase) prozessiert und das Protein liegt als maturierte Form vor (m-Form; Abb.2).

### **2.2.3 Mitochondriale Dynamik und Abbau von beschädigten Mitochondrien**

Mammalia Mitochondrien erscheinen in mikroskopischen Studien als über die gesamte Zelle verzweigte, tubuläre Struktur. Man spricht daher von einem mitochondrialen Netzwerk. Dieses ist dynamisch und kann seine Morphologie durch Fusion oder Abspaltung als Adaption auf diverse Faktoren verändern. Werden Mitochondrien z.B. stark durch Hitze gestresst, verändert sich das mitochondriale Netzwerk und die Mitochondrien fragmentieren (Richter, Haslbeck, and Buchner 2010). Eine weitere Funktion der mitochondrialen Dynamik ist die Abspaltung geschädigter Mitochondrien vom restlichen Netzwerk. Beschädigte mitochondriale Komponenten, wie mtDNA und Proteinaggregate, können an einem Ort gesammelt und anschließend abgespalten werden (Detmer and Chan

2007; Bruderek et al. 2018). Hierdurch bleibt die Integrität des mitochondrialen Netzwerks beibehalten und das Überleben der Zelle ist gesichert. Nach der Abspaltung eines irreversiblen geschädigten Mitochondriums, wird dieses über Mitochondrien-spezifischen Autophagie, der Mitophagie, abgebaut (Kim, Rodriguez-Enriquez, and Lemasters 2007). Die Mitophagie wird über die, an den Mitochondrien lokalisierte Kinase, Pink1 (engl.: PTEN-induced putative kinase 1) reguliert. Pink1 wird konstitutiv degradiert, sofern die Mitochondrien intakt sind. Werden Mitochondrien beschädigt und verlieren z.B. ihr Membranpotential, akkumuliert Pink1 an der äußeren Membran (oM; engl.: outer mitochondrial membrane) und rekrutiert die zytosolische E3 Ubiquitin-Ligase Parkin. Diese ubiquitiniert das Organell und es wird über die LC3-vermittelter Autophagie abgebaut (Rüb, Wilkening, and Voos 2017). Neben dem spezifischen Abbau von beschädigten Organellen kann unter Hungerbedingungen die Zelle unselektiv Bestandteile abbauen um sich mit essentiellen Nährstoffen zu versorgen.

#### **2.2.4 Funktion des mitochondrialen Protein-Qualitätskontroll-System**

Mitochondriale Fehlfunktionen können schwerwiegende Folgen für das zelluläre System haben. Aufgrund ihrer endosymbiontischen Abstammung, besitzen Mitochondrien ihr eigenes mtPQC, welches aus verschiedenen Chaperonen, Kochaperonen und Proteasen besteht (Voos 2009; 2013). Mitochondrien sind besonders hohen Stress durch ROS ausgesetzt, da dieser vorwiegend durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien entsteht (Beckman and Ames 1998; Ngo, Pomatto, and Davies 2013). Daher müssen Mitochondrien beschädigte Proteine zeitnah abbauen, um eine Ansammlung und Aggregation von fehlgefalteten Proteinen vorzubeugen. Zunächst wird versucht, die beschädigten oder ungefalteten Proteine zurück zu falten oder sie, falls die Rückfaltung nicht möglich ist, abzubauen (Voos 2009).

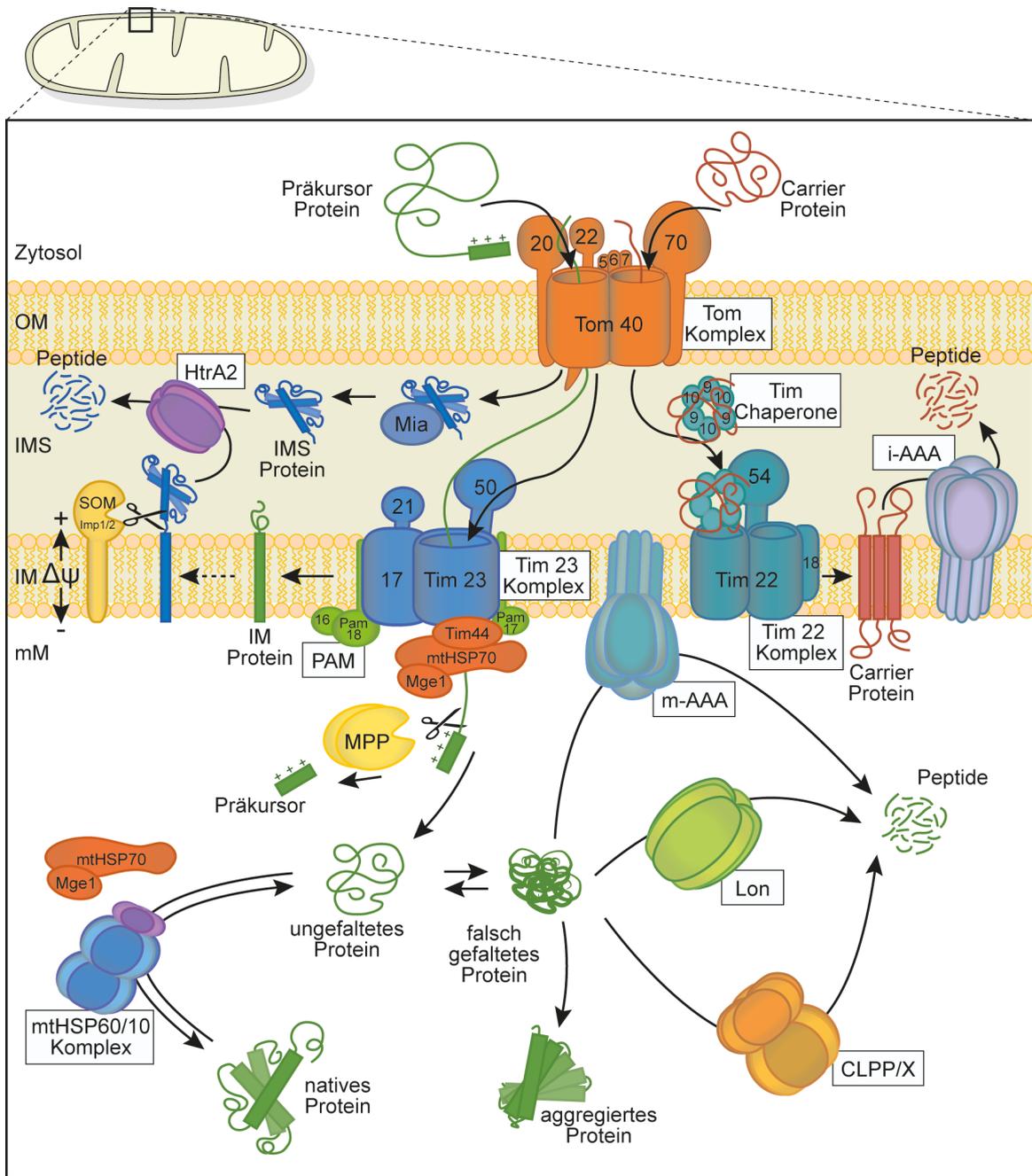
Die Komponenten des mtPQC werden anhand ihrer Größen und Funktion in verschiedene Klassen der Hitzeschockproteine (HSP) unterteilt (Voos 2013). Proteine der Familie HSP70 werden klassischerweise als Chaperone bezeichnet und übernehmen, definitionsgemäß, die Aufgabe Proteine bei der Faltung zu unterstützen. Sie sind hoch konserviert und besitzen eine ATPase-Domäne, sowie

eine C-terminale Proteinbindedomäne, mit dieser werden hydrophobe und positiv geladene Proteinsequenzen gebunden um Fehlfaltungen vorzubeugen. Weitere wichtige Chaperone sind Proteine der Klasse HSP60, die auch als Chaperonine bezeichnet werden. Das mitochondriale HSP60 bildet einen großen Komplex aus zwei Hexamerringen, die einen großen hydrophoben Hohlraum bilden, in dem sich Proteine zurückfalten können. Der Kofaktor HSP10 verschließt hierbei die Öffnung. Durch die Hydrolyse von ATP kommt es zu Konformationsänderung des HSP60 Komplexes und der Hohlraum wird hydrophiler und das Substratprotein kann in seinen nativen Zustand zurückgefaltet werden (Voos 2013). Aufgrund des Aufbaus der mitochondrialen Importkanäle, liegen Proteine nach dem Import ungefaltet in der mitochondrialen Matrix vor. Da eine Gefahr der Fehlfaltung vorliegt, werden die ungefalteten Proteine durch Chaperone bei der Faltung unterstützt. Neu importierte Proteine sind besonders stressanfällig und bilden schneller Aggregate als bereits vollständig gefaltete Proteine (Wilkening et al. 2018).

Können Proteine nicht in ihre native Struktur gefaltet werden, besteht die Gefahr, dass sie aggregieren, daher müssen sie abgebaut werden. Hierfür besitzen Mitochondrien vier verschiedene AAA+ Proteasen (engl.: ATPases associated with a wide variety of cellular functions) als Teil des mtPQC Systems. Es gibt drei Matrix Proteasen, von der eine, m-AAA (AFG3L3; engl.: AFG3-like protein 2 (Paraplegin-like protein), SPG7; engl.: paraplegin) in der inneren Membran verankert ist und ebenfalls eine Hexamerstruktur aus jeweils drei SPG7 sowie drei AFG3L3 Untereinheiten aufweist. Sie ist vorwiegend für den Abbau nicht assemblierter Untereinheiten der Atmungskette zuständig (Korbel et al. 2004). Die anderen Proteasen, Lon und der CLPX/P Komplex, sind frei beweglich innerhalb der mitochondrialen Matrix. Wobei der CLPX/P Komplex aus zwei Hexamerringen aus dem Chaperone CLPX (engl.: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial) und der Protease CLPP (engl.: ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial) besteht. Diese Proteasen können beschädigte oder fehlgefaltete Proteine abbauen um Aggregationen zu verhindern (Voos 2009; Bota, Ngo, and Davies 2005). Im Weitem wird die Matrix Protease Lon im Detail beschrieben.

**Abbildung 2: Mitochondriale Proteinimport Maschinerie und Proteinprozessierung**

Proteine werden je nach ihrer Lokalisation über verschiedene Wege in die Mitochondrien importiert. Proteine, die für den Intermembranraum (IMS) bestimmt sind, werden nach dem Import über den Tom Komplex durch Mia gefaltet und werden von HtrA2 (engl.: high temperature requirement protein A2) degradiert. Handelt es sich Carrier Proteine für die innere Membran (IM), werden sie zunächst ebenfalls über den Tom Komplex (engl.: translocase of the outer membrane) in den Intermembranraum importiert, durch kleine Tims (engl.: translocase of the inner membrane), gebunden und mittels Tim22 Komplex in die innere Membran (IM) eingebaut. Matrixproteine werden mittels Tim23 Komplex importiert, als Motor hierfür dient der PAM-Komplex (engl.: presequence translocase-associated motor), bestehend aus Tim44 (engl.: translocase of the inner membrane 44), mtHSP70 (engl.: heat shock protein 70 kDa, mitochondrial) und Mge1. Nach dem Import wird die MTS von MPP prozessiert und das ungefaltete Protein kann von dem HSP60 (engl.: heat shock protein 60 kDa, mitochondrial) Komplex in seine native Form gefaltet werden. Membranproteine mit einer Matrixdomäne können durch m-AAA (AFG3L3; engl.: AFG3-like protein 2 (Paraplegin-like protein), SPG7; engl.: paraplegin) abgebaut werden. Ist ein Matrix Protein falsch gefaltet, kann es über den CLPP/X Komplex (CLPX engl.: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial; CLPP engl.: ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial) oder Lon abgebaut werden (Becker, Böttinger, and Pfanner 2012).



(Beschriftung siehe S.15)

## 2.2.5 Die Matrix Protease Lon

Eine der wichtigsten Matrix Proteasen ist die hoch konservierte Protease Lon (Teichmann et al. 1996; Bender et al. 2011; Bota, Van Remmen, and Davies 2002). In Bakterien wird Lon als La (Suzuki et al. 1994), in *S. cerevisiae* als Pim1 (engl.: proteolysis in mitochondria 1) bezeichnet. Aufgrund der hohen Homologie zwischen den verschiedenen Organismen, ist es wahrscheinlich, dass Lon eine ähnliche Ringstruktur aufweist, wie Pim1 in Hefe (Venkatesh et al. 2012).

Lon ist nuklear kodiert und das LONP1 Gen liegt auf Chromosom 19, in der Region p13.2 und ist ~29 kbp lang (Wang et al. 1993). Nach der Transkription liegt Lon, mit einer relativen Molekülmasse von 106 kDa als Präkursor Form im Zytosol vor und wird aufgrund der MTS in die mitochondriale Matrix importiert. Nach Prozessierung durch MPP hat Lon die endgültige Größe von 100 kDa erreicht (Wang et al. 1993; 1994). Das Lon-Protein besteht aus drei funktionalen Proteindomänen, einer Substratbinde-, der AAA+ und einer proteolytischen Domäne. Die N-terminale Domäne beinhaltet, neben der MTS, eine Proteinbinde-Domäne, mit der Lon-Substrate gebunden werden. Diese erkennt unspezifische Peptidsequenzen, bevorzugt allerdings hydrophobe Aminosäuren (Ondrovicová et al. 2005). Die zweite beinhaltet die AAA+ Domäne. Hier führt das Binden von ATP zu einer Konformationsänderung, welches zu der Aktivierung der proteolytischen Kammer führt. Die ATP Hydrolyse führt außerdem zu der Translokation des Substrates in die proteolytische Kammer (Vasilyeva et al. 2002), der dritten, C-terminalen Domäne. Der Lon Monomer ist inaktiv und wird erst durch die Bildung eines Hexamer-Rings aktiv. Im inneren dieses Rings bildet sich, aus den proteolytischen Domänen, eine proteolytische Kammer (Ondrovicová et al. 2005; Pinti et al. 2015). Diese proteolytische Kammer besitzt das aktive Zentrum, welches für die Hauptfunktion der Serin-Protease essentiell ist.

### 2.2.5.1 Regulation der Lon Expression als Stressreaktion

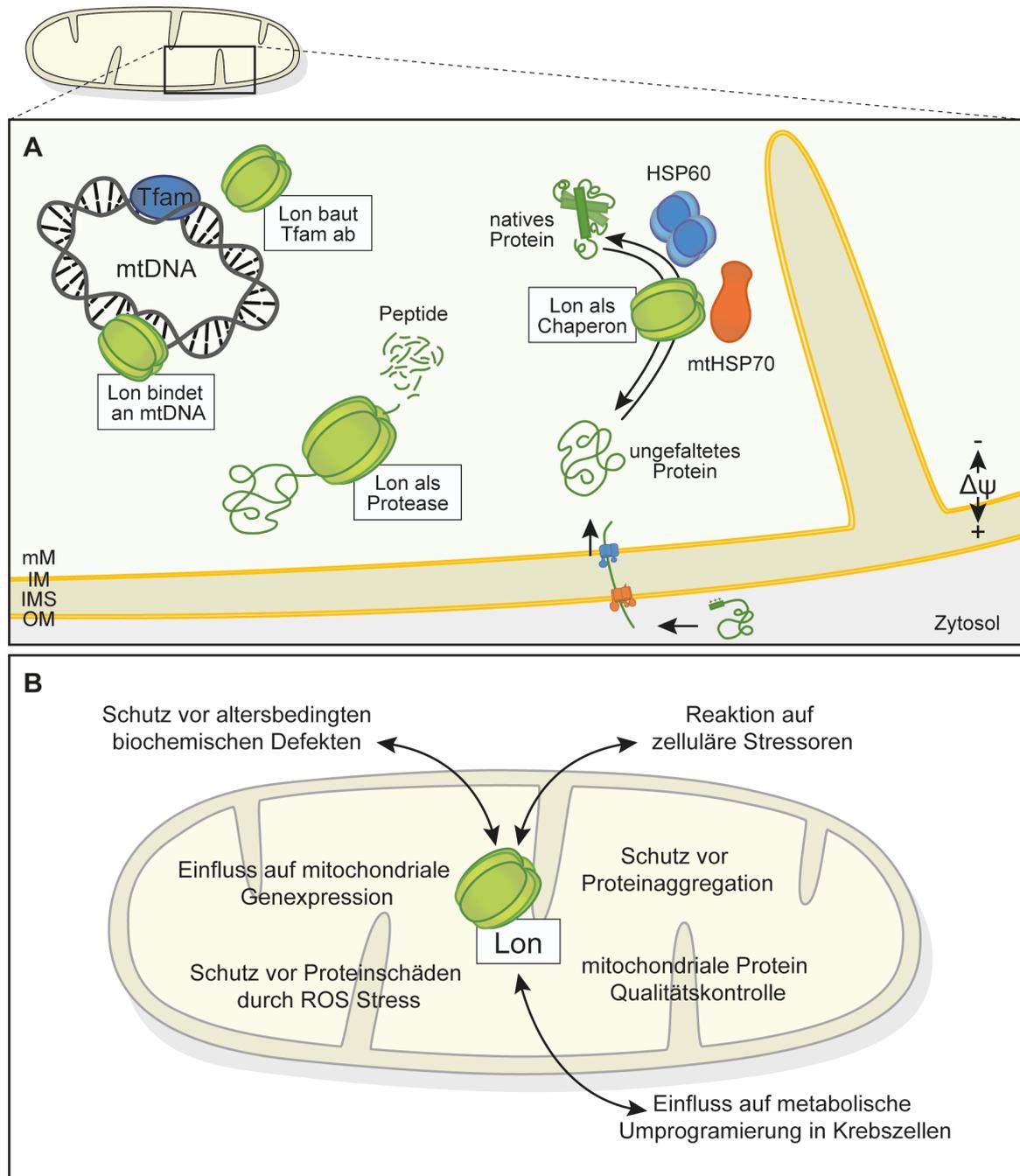
Die Regulation von Lon ist ambivalent. Aufgrund von Hitzestress (Ngo and Davies 2009; Ngo, Pomatto, and Davies 2013; Bender et al. 2010), Nahrungsmangel (Ngo and Davies 2009) und oxidativen Stress (Bota and Davies 2002; Ngo and Davies 2009; Pinti et al. 2015; Bender et al. 2010) wird Lon, als Stressantwort in verschiedenen Modellen, hochreguliert. Die Regulierung des

LONP1 Gens ist noch nicht genauer untersucht, bis jetzt wurden vier Transkriptionsfaktoren beschrieben. In einer Studie wurden zwei Transkriptionsfaktoren entdeckt, NF- $\kappa$ B und NRF-2 (engl.: nuclear respiratory factor 2), die nach ROS-Stress verstärkt an die Lon Promotorregion gebunden hatten (Pinti et al. 2011). Dieses verstärkte die Lon Expression, welches wiederum die Zelle vor der Akkumulation falsch-gefalteter Proteine schützte und dadurch ihr Überleben sichern sollte (Ngo and Davies 2009). Des Weiteren wurden potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor HIF1 (engl.: hypoxia inducible factor 1) gefunden, welcher unter hypoxischen Bedingungen zu einer verstärkten Lon Expression führt (Fukuda et al. 2007). Ein weiterer Lon Regulator ist der epidermale Wachstumsfaktor (EGF; engl.: epidermal growth factor). Diese verschiedenen Transkriptionsfaktoren zeigen einen Einfluss verschiedener zellulärer Regulationswege auf die Lon Expression (Fukuda et al. 2007). Sind diese Regulationswege gestört, kann es zu einer dauerhaft erhöhten Lon Expression führen, was wiederum bei Krebspatienten zu einer schlechten klinischen Prognose führt (Quirós et al. 2014). Die AAA+ Protease wird durch die Bindung von ATP aktiviert, im Gegensatz wirkt ADP als Inhibitor der Lon Funktion. Das Binden von Peptide oder Protein wiederum stimulieren die Abgabe von gebunden ADP, welches zu einer Aktivierung der Proteolysefunktion führt (Watabe et al. 2001).

#### **2.2.5.2 Funktionen von Lon**

Lon hat drei wesentliche Funktionen, die anhand der Proteinstruktur erkennbar sind. Zum einen hat Lon eine proteolytische Funktionen (Bota, Van Remmen, and Davies 2002; Bota and Davies 2016; Voos 2013), des Weiteren kann Lon, über die Substratbinde-Domäne, eine Chaperonen-Funktion (Kao et al. 2015; Desautels and Goldberg 1982) übernehmen und zuletzt reguliert Lon die Replikation und Transkription der mtDNA (Liu et al. 2004; Abb. 3A/B).

Durch die proteolytische Funktion ist Lon essentiell an der Aufrechterhaltung der mitochondriale Proteostase beteiligt. Es degradiert gezielt beschädigte und/oder fehlgefaltete Proteine (Bender et al. 2011; Quirós et al. 2014; Gibellini et al. 2014; 2015; Pinti et al. 2016).



**Abbildung 3: Lon Funktionen und Einfluss auf das zelluläre System**

**A** Lon übernimmt sowohl Protease-, Chaperon-Funktionen und reguliert die Replikation und Transkription der mitochondrialen DNA (mtDNA). Lon agiert als Hauptprotease in der mitochondrialen Matrix (mM) und baut verschiedene Substrate ab. Des Weiteren hat Lon eine Chaperonen-Funktion und interagiert mit HSP60 und mtHSP70. Lon reguliert die mtDNA Replikation durch Bindung an CG-reiche Regionen. Außerdem baut es Tfam ab und reguliert damit wiederum die Replikation und Transkription. **B** Aufgrund der vielfältigen Funktionen ergeben sich verschiedene Einflüsse von Lon auf das zelluläre System. Im mitochondrialen Netzwerk hat Lon Einfluss auf die Genexpression und schützt, als Teil des mtPQC-Systems, vor Proteinaggregation und Schäden durch ROS-Stress. Lon schützt vor altersbedingten biochemischen Defekten und dient als Stressantwort auf zelluläre Stressoren.

Mitochondriale Proteine sind, aufgrund der Atmungsfunktion, durchgängig freien Sauerstoffradikalen ausgesetzt und können oxidiert werden (Ngo et al. 2011). Um eine Akkumulation von oxidierten Proteinen entgegen zu wirken, baut Lon diese Proteine gezielt ab (Ngo and Davies 2009; Bulteau and Bayot 2011). Als erstes konnte dieses an oxidiertem Aconitase 2 (Aco2) gezeigt werden (Bota, Van Remmen, and Davies 2002). Der Verlust von Lon führt zu der Zunahme von oxidierten Proteinen, welches wiederum zu einer Akkumulation der Proteinaggregaten führt (Ngo and Davies 2009; Bulteau and Bayot 2011; Bayot et al. 2014). Weitere bekannte Substrate von Lon sind: ACADM (Hansen, Gregersen, and Bross 2005), PMPCA (Zurita Rendón and Shoubridge 2018; Suzuki et al. 1994), das STaR Protein (Ondrovicová et al. 2005) sowie verschiedene Untereinheiten der ATPase (Bayot et al. 2010; Bulteau et al. 2017). Neben der Detektion von oxidierten Proteinen, soll Lon Peptide unabhängig einer spezifischen Sequenz erkennen und abbauen (Ondrovicová et al. 2005). Auch hier führt der Verlust von Lon zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine, was ebenfalls zu der Bildung von Aggregaten führen kann (Erjavec et al. 2013). Des Weiteren führt Stress zu einer irreversiblen Inaktivierung von Eisen-Schwefel Proteinen (Bulteau, Ikeda-Saito, and Szweda 2003), welche dann von Lon abgebaut werden (Song, Marszalek, and Craig 2012). Die stressbedingt Zunahme von Lon wirkt dem entgegen, so kann Lon diese Eisen-Schwefel Proteine abbauen und die Mitochondrien vor Beschädigungen schützen (Ngo, Pomatto, and Davies 2013). Somit ist Lon, aufgrund der proteolytischen Funktion ein sehr wichtiger Bestandteil des mtPQC-Systems (Ngo and Davies 2009; Voos 2013). Bislang wurde die Protease Funktion von Lon häufig anhand spezifischer Proteinsubstrate analysiert, eine gesamte Analyse der Lon Substrate ist allerdings noch nicht durchgeführt worden.

Die Chaperonen-Funktion von Lon ist die bislang am schlechtesten untersuchte Lon Funktion (Abb. 3A). Bekannt ist, dass Lon mit den mitochondrialen Chaperonen HSP60, mtHSP70, Myosine-9/10 und NDUFS8 (engl.: NADH ubiquinone oxidoreductase core subunit S8) interagiert, um die Zelle vor Apoptose zu schützen, welche durch den Stress von ungefalteten Proteinen entstehen kann (Kao et al. 2015; Desautels and Goldberg 1982). Des Weiteren zeigt Lon seine Chaperonen-Funktion indem es bei der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe unterstützt (Hori et al. 2002). Bekannt ist außerdem, dass

Lon sowohl ungefaltete als auch gefaltete Proteine abbaut, wobei Lon die ungefalteten Proteine zunächst entfalten soll, da der Abbau von entfaltenen Proteinen deutlich schneller von statten geht (Ondrovicová et al. 2005).

Die dritte Funktion von Lon ist die Regulation der Replikation und Transkription der mtDNA (Abb. 3A). Bekannt ist, dass eine Reduktion der Lon-Proteinmenge zu einer Verringerung der mtDNA Menge in homozygoten Lon Knockout Mäusen führt (Quirós et al. 2014), auch in humanen Fibroblasten wurde eine Verringerung der mtDNA Menge nach den Verlust von Lon festgestellt (Bota, Ngo, and Davies 2005; Zurita Rendón and Shoubridge 2018). Die Regulation der Replikation und Transkription kann an zwei Punkten geschehen. Lon bindet spezifisch an die Basen Guanin und Thymin, allerdings nicht an das Desoxyribose-Phosphat Rückgrat der mtDNA (T. Liu et al. 2004). Diese GT-reichen mtDNA Sequenzen überlappen wiederum mit Promotorregionen. Allerdings bindet Lon eher an einzelsträngige mtDNA als an doppelsträngige mtDNA (Lu et al. 2003; T. Liu et al. 2004; G. K. Fu and Markovitz 1998). Zusätzlich ist Lon in der Lage an Guanin- und Uracil-reiche mRNA innerhalb der mitochondrialen Matrix zu binden. Diese wird wiederum durch eine Zunahme der ATP Konzentration in der mitochondrialen Matrix inhibiert (T. Liu et al. 2004). Lon kann die Transkription der mtDNA auch durch die spezifische Degradation des mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (Tfam, engl.: mitochondrial transcription factor A) regulieren (Matsushima, Goto, and Kaguni 2010). Tfam ist das „Histon“ der Mitochondrien und bildet durch die Bindung mit der mtDNA den Nukleoid (Kukat et al. 2015). Je mehr Tfam Proteine an die mtDNA gebunden sind, desto fester ist die Struktur des Nukleoid und mitochondriale Gene können nicht mehr transkribiert werden (Kukat et al. 2011). Durch die Proteinmenge von Tfam wird die Menge der mtDNA reguliert und über den Abbau von Tfam wird diese indirekt von Lon gesteuert (Ekstrand et al. 2004; Matsushima, Goto, and Kaguni 2010). Allerdings sind diese Beobachtungen nicht konsistent, bei LS174T Zellen, konnte keine Veränderung der mtDNA Menge nach der Verringerung der Lon-Proteinmenge festgestellt werden (Lu et al. 2007).

Die grundlegende proteolytische Funktion von Lon ist weitestgehend geklärt, allerdings sind die Einflüsse von Lon so vielseitig, dass eine Übersicht über alle Substrate und Interaktionspartner eine klare Antwort über die Einflüsse von Lon auf das Überleben der Zelle geben könnte.

### **2.2.5.3 Einfluss von Lon auf das Überleben der Zelle**

Aufgrund der vielfältigen Funktion, hat die genetische Manipulation der Lon-Proteinmengen verschiedenen Auswirkungen auf Zellen. Besonders auffällig ist, dass ein homozygoter Knockout von Lon am Tag 9.5 embryonal letal ist, zudem weisen sie nach 5.5 Tagen ein verlangsamtes Wachstum auf. Wohingegen der heterozygote knockout nicht letal ist. Diese Mäuse zeigten eine Abnahme der Lon-Proteinmenge auf 40% und eine Reduktion der mtDNA Menge und ATP Konzentration (Quirós et al. 2014; Hamon et al. 2020). Des Weiteren nimmt die Apoptoserate durch die Abnahme von Lon deutlich zu (Bota, Ngo, and Davies 2005; Gibellini et al. 2015). Im Vergleich ist eine Zunahme der Lon-Proteinmenge mit einer Abnahme der Apoptoserate assoziiert (Kao et al. 2015; Sung et al. 2018). Zudem verlieren die Mitochondrien, mit einer verringerten Lon-Proteinmenge ihre Atmungsfähigkeit (Suzuki et al. 1994; Bota, Ngo, and Davies 2005) und ihre Cristae-Struktur (Bota, Van Remmen, and Davies 2002; Bota and Davies 2002; Bota, Ngo, and Davies 2005; Gibellini et al. 2015). Eine Zunahme der Proteinmenge von Lon führt dementsprechend zu einer verlängerten Lebenspanne von Zellen und Organismen (Quirós et al. 2014; Ozkurede and Miller 2019), welches besonders bei Krebserkrankungen negative Auswirkungen auf die klinische Prognose hat (Quirós et al. 2014).

Eine weitere Auswirkung auf das mitochondriale Überleben soll Lon durch den Einfluss auf die Prozessierung von frisch importierten Proteinen haben. Dieses soll durch eine physische Interaktion mit MPP entstehen (Zurita Rendón and Shoubridge 2018). Diese Studie fand zudem ebenfalls die Anhäufung von Proteinaggregationen innerhalb Zellen mit verringerter Lon-Proteinmenge. Allerdings waren Komponenten der mtPQC-System nicht hoch reguliert, was gegen eine postulierte Stresskompensation spricht (Zurita Rendón and Shoubridge 2018). Diese Studien, zu dem Verlust von Lon, zeigen dass Lon essentiell für die Gesundheit des mitochondrialen Environments ist, und somit auch für das Überleben des zellulären Systems ist.

### **2.2.5.4 Lon in Erkrankungen**

Eine Veränderung der Lon-Proteinmenge sowie der Lon Aktivität ist ebenfalls in verschiedenen Krankheitsbildern beobachtet worden. Das

bekannteste Beispiel ist die Multi-System Entwicklungsstörung, das CODAS (engl.: cerebral, ocular, dental, auricular, skeletal) Syndrom, welches 1991 das erste Mal beschrieben wurde (Shebib et al. 1991). Hier führen verschiedene Punktmutationen nahe der ATP-bindenden Tasche von Lon zu einer Reduktion der Protease Aktivität. Im zellulären CODAS-Modell, erscheint der Phänotyp sehr ähnlich jener der zuvor beschriebenen Zellen, die mittels siRNA Knockdown eine verringerte Lon-Proteinmenge zeigten. Diese Zellen zeigten eine verringerte respiratorische Aktivität sowie das Auftreten von Proteinaggregaten und einer unnormalen Morphologie der inneren mitochondrialen Membran. Das CODAS Syndrom zeigt zudem einen ähnlichen Phänotyp wie Erkrankungen, die ein Defekt im mtPQC System als Ursache haben (Strauss et al. 2015).

Eine Verbesserung des zellulären Überlebens, bzw. eine verringerte Apoptoserate und eine erhöhte Stressresistenz sind typische Veränderungen der Tumorentwicklung und können zu einer unkontrollierten Vermehrung betroffener Zellen führen. Da sich viele Zellen auf kleinsten Raum schnell vermehren, herrschen Sauerstoffmangelbedingung innerhalb des betroffenen Gewebes (Cairns, Harris, and Mak 2011). Da sich ebenfalls der Energiestoffwechsel von Krebszellen neu programmiert, ist die Reprogrammierung der Mitochondrienfunktion wichtig für das Wachstum des Tumors. Mehrere Studien zeigten eine Zunahme in der Lon-Proteinmenge in verschiedenen Krebszellen (Quirós et al. 2014; Gibellini et al. 2014; 2018; Pinti et al. 2015). Diese Zunahme ist wahrscheinlich auf eine verstärkte Transkription, aktiviert durch den Transkriptionsfaktor HIF1, zurückzuführen. Aufgrund des hypoxischen Milieus, welches in Krebszellen herrscht, bindet HIF1 verstärkt an die Promotoregion von Lon. Zusätzlich wurde gezeigt, dass HIF1 die differentielle Expression verschiedener Untereinheiten des Atmungskettekomplex IV reguliert, was ebenfalls als metabolische Anpassung auf die hypoxische Umgebung im Krebsgewebe zurückzuführen ist (Fukuda et al. 2007). Zudem scheint eine Abnahme von Lon bedingt vor der Ausbildung von Tumoren zu schützen (Quirós et al. 2014). Zusammengefasst führt die Zunahme der Lon Expression in Krebszellen zu einer erhöhten zellulären Fitness und verringerten Apoptoserate, was wiederum zu einer schlechten klinischen Prognose führt (Quirós et al. 2014; Y. Liu et al. 2014).

### 2.2.5.5 Lon im Alter

Auch Alterungsprozesse werden in Verbindung mit mitochondrialer Fehlfunktion gebracht (Melentijevic et al. 2017). Altern führt zu einer höheren Produktion von freien Sauerstoffradikalen innerhalb der Mitochondrien (Ngo, Pomatto, and Davies 2013; Beckman and Ames 1998). Durch ROS geschädigte Proteine zeigen ein erhöhtes Risiko zu aggregieren und werden zeitnah von Lon abgebaut (Ngo and Davies 2007; Bota, Van Remmen, and Davies 2002). Im Alter ist die Lon mRNA Menge (Lee et al. 1999), sowie die Lon Aktivität verringert (Bakala et al. 2003; Erjavec et al. 2013). In *Drosophila*, führt der Verlust von Lon zudem zu einer verkürzten Lebenspanne der Fliegen (Pareek et al. 2018). Eine weitere Studie zeigt, dass die ROS-induzierte Lon Expression in alternden humanen Fibroblasten nicht mehr möglich ist. Somit können carbonylierte Proteine nicht mehr abgebaut werden und beeinträchtigen somit die mitochondriale Funktionen (Ngo et al. 2011). Im Unterschied, zeigen langlebige Zwergmäuse (engl.: long-lived snell dwarf mice) eine bessere mtUPR in Mitochondrien. Sowohl HSP60 als auch Lon ist in diesen Zwergmäusen hochreguliert, im Vergleich zu WT Mäusen (Ozkurede and Miller 2019).

Im Alter ist der Schutz vor der Akkumulation beschädigter Proteine durch die Abnahme von Lon mRNA, Proteinmenge und Aktivität nicht mehr gegeben. Dieses führt zu dem Verlust verschiedener mitochondrialer Funktionen und einer verminderten Stressresistenz der Mitochondrien. Wie dieser Lon Verlust sich auf Proteinebene innerhalb der Mitochondrien auswirkt ist allerdings im Detail noch nicht erklärt. Eine weitere Schwachstelle der meisten verwendeten siRNA Knockdown-Modelle ist, dass die Zellen sich nicht an den Verlust von Lon gewöhnen können und daher keine Adaptionsmechanismen zeigen. Alternde Zellen hingegen müssen durchgängig und nicht nur kurzfristig mit dem Verlust von Lon überleben. Die Frage ist nun welche Adaptionsmechanismen sind in alternden Zellen vorhanden.

---

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Wie zuvor dargestellt, ist Lon essentiell für das Überleben der Mitochondrien und des gesamten zellulären Systems, indem Lon die mitochondriale Proteostase aufrechterhält. Da die Lon Aktivität sowie die Proteinmenge während des Alterungsprozesses abnimmt, besteht die Frage, wie Zellen mit einer verringerten Lon-Proteinmenge auf verschiedene Stressoren wie Hitze, ROS und Proteotoxizität reagieren. Die zuvor beschriebenen Modelle nutzen einen temporären Knochdown. Diese Zellen hatten nicht die Zeit sich an den Verlust von Lon zu gewöhnen, sodass diese Modelle zur Klärung der Alterungsmechanismen nur unzureichend nutzbar sind. Um diese Fragen zu untersuchen sollte eine Zelllinie etabliert werden, die eine stabile Lon Reduktion aufweist. Des Weiteren sollte die Veränderung des Proteoms als Adaption an den partiellen Lon Verlust untersucht werden.

Lon ist eine der wichtigsten Protease, welche die Mitochondrien vor Hitze-induzierter Aggregation schützt. Zudem ist bekannt, dass einige mitochondriale Proteine nach Hitzestress stark aggregieren. Eine weitere wichtige Frage war daher, ob sich das Aggregationsverhalten der mitochondrialen Proteine in diesem Zellmodell verändert. Ein Schutzmechanismus vor Proteotoxizität ist die Ablagerung der Proteinaggregate. In Hefezellen wurde zuvor gezeigt, dass Mitochondrien einen eigenen Ablagemechanismus, das sogenannte IMiQ, besitzen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Lon Überexpression positive Effekte auf die Zelle hat. Somit besteht die Frage ob der Verlust von Lon ebenfalls die Ablagerung von Aggregaten beeinflusst.

Alle Ziele und wichtige Fragen im Überblick:

- *Herstellung und Etablierung eines zellulären Modells mit konstant verringerter Lon-Proteinmenge.*
- *Wie ändern sich mitochondriale Funktionen in diesem Modell?*
- *Wirkt sich der Verlust von Lon auf die mitochondriale Morphologie aus?*
- *Ändert sich das Proteom als Adaption an den Verlust von Lon und welche Folgen haben diese Veränderungen?*
- *Gibt es eine Veränderung der Aggregationstendenz von mitochondrialen Proteinen nach Hitzestress und dem teilweisen Verlust von Lon?*

- *Gibt es einen Schutzmechanismus des mitochondrialen Systems in Mammalia Zellen, ähnlich dem zuvor in Hefe beschriebenen IMiQ?*
- *Wie verhält sich die Ablagerung von PolyQ Aggregaten innerhalb der Mitochondrien von Zellen mit einer verringerten Lon-Proteinmenge?*

---

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Laborgeräte

Gerät	Name	Hersteller
CCD Kamera	LAS-400 mini	Fujifilm, Japan
Durchflusszytometer	CyFlow space CY-S3001	Sysmex- Partec, Deutschland
Einfrier-Container	Cryo 1°C Freezing-Container	Nalgene®, USA
Fluoreszenz Mikroskop	EVOS <sub>FL</sub>	PeqLab, Deutschland
Fluoreszenz Lampe für das <i>Live Cell</i> Mikroskop	Colibri	Zeiss, Deutschland
<i>Live Cell</i> Mikroskop	Axiovert 200M	Zeiss, Deutschland
Mirkoplatenleser	Infinite M200 pro	Tecan, Schweiz
Phosphoimager	FLA-5100	Fujifilm, Japan
Power Supply	Power Supply	PeqLab, Deutschland
Western Blot Kammer	Semi-Dry-Blotter	PeqLab, Deutschland
Zellinkubator	Function Line Cell Incubator	Heraeus Instruments
Zellzähler	Scepter	Millipore, USA

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Acetatcellulose Membran	GE Healthcare, USA
Live Cell Platte ( $\mu$ -Dish, 50 mm)	ibidi, Deutschland
Nitrocellulose Membran	GE Healthcare, USA
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Carl Roth, Deutschland
Whatman-Papier	Merk, USA

Die Standard-Verbrauchsmaterialien wurden nicht aufgeführt.

### 4.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, USA
Bacto Tryptone	Sigma-Aldrich, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, USA
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, USA
1,4- Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Kreatinkinase (CK)	Roche, Schweiz
Kreatin Phosphat (CP)	Sigma-Aldrich, USA
Menadion (Me)	Sigma-Aldrich, USA
Oligomycin	Sigma-Aldrich, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, USA
Puromycin	Carl Roth, Deutschland
Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE)	Life Technologies, USA
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
Valinomycin	Sigma-Aldrich, USA

Alle weiteren verwendenden Chemikalien, sofern hier nicht aufgeführt, wurden von Carl Roth bezogen.

### 4.1.4 Reagenzien und Kits

Name	Hersteller
ATP Determination Kit	Invitrogen, USA
Express [ <sup>35</sup> S] Protein Labeling mix	Perkin Elmer, USA
MitoSOX™ Mitochondrial Superoxide Indicator	Life Technologies, USA
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Carl Roth, Deutschland
Proteinmarker Roti®-Quant Tri-color Marker	Carl Roth, Deutschland
PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen, USA
Rabbit Reticulocyten Lysate System	Promega, USA
Restriktionsenzym BbsI	Invitrogen, USA
Restriktionsenzym Fnu4HI	Invitrogen, USA
Roti®-Mount Fluoro Care	Carl Roth, Deutschland
Roti®-Mount Fluoro Care with DAPI	Carl Roth, Deutschland
Roti®-Quant Brandfordreagenz	Carl Roth, Deutschland
ServaLight EoSULtra CL HRP WB Substrate Kit	Serva, Deutschland
T <sub>N</sub> T® T7/T3 Coupled Reticulocyten Lysate Kit	Promega, USA
Turbofect®	Invitrogen, USA

### 4.1.5 Lösungen und Puffer

Diese Auflistung beinhaltet alle verwendeten Lösungen und Puffer. Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nichts anderes angegeben, in destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gelöst.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Agarose Gel	1% [w/v] Agarose 0.1% [v/v] Ethidiumbromid in TAE
Blockier-Lösung (Immunzytochemie)	2% [w/v] BSA in PBS
Blocklösung (Western Blot)	5% [w/v] Magermilchpulver in TBS-Tween oder Deko Salt-Tween
Coomassie (Färbelösung)	0.1% [w/v] Coomassie Brilliant Blue R-250 10% [v/v] Essigsäure 50% [v/v] Methanol
Degradationspuffer	5 mM Glutamate 5 mM Malate 1 mM DTT 5 mM KPi 2 mM ATP 10 mM Creatine Phosphate 75 µg/ml Creatine Kinase 0.02 µg/ml Trypsin inhibitor in Import Stammlösung
Deko Salt	15 mM NaCl 5 mM Tris
Deko Salt-Tween	15 mM NaCl 5 mM Tris 0.1% [v/v] Tween-20
Entfärber	10% [v/v] Essigsäure 40% [v/v] Methanol
FACS Puffer	0.2% [w/v] BSA in PBS
Import Stammlösung	250 mM Saccharose 20 mM HEPES/KOH, pH 7.6 80 mM KAc 5 mM MgAc

Import Puffer	5 mM Glutamat 5 mM Malat 50 mM KPi, pH 7.4 2 mM ATP 1 mM DTT in Import Stammlösung
Kalium-Phosphat Puffer (KPi)	1 M $K_2HPO_4$ und 1 M $KH_2PO_4$ titriert bis pH 7.4
Lämmli-Probenpuffer	2% [w/v] SDS 10% Glycerol 60 mM Tris/HCl pH 6.8 5% [w/v] $\beta$ - Mercaptoethanol 0.02% [w/v] Bromphenolblau
Laufpuffer (SDS-PAGE)	250 mM Tris 1.91 M Glycin 10% [w/v] SDS
LB-Medium	1% [w/v] Bacto Trypton 1% [w/v] NaCl 0.5% [w/v] Hefe Extrakt pH 7.5
Lysis Puffer	0.5% [v/v] Triton X-100 <sup>TM</sup> oder 1% SDS 200 mM KCl 30 mM Tris/HCl, pH 7.4 0.5 mM PMSF Protease Inhibitor Cocktail
MOPS/Methionin Puffer	50 mM MOPS/KOH, pH 7.2 10 mM Methionin
Paraformaldehyd Lösung (PFA)	4% [w/v] Paraformaldehyd 10% [w/v] Saccharose in PBS
PBS	2.7 mM KCl 137 mM NaCl 12 mM $Na_2HPO_4$ 1.8 mM $KH_2PO_4$ pH 7.4
Permeabilisierungslösung	0.5 [v/v] Triton X-100 <sup>TM</sup> in PBS

---

Potentialpuffer	600 mM Sorbitol 20 mM KPi, pH 7.4 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Glutamat 5 mM Malat 0.1% [w/v] BSA
Resuspendierpuffer	5 mM Glutamat 5 mM Malat 1 mM DTT in Import Stammlösung
Solution A	220 mM Mannitol 70 mM Saccharose 20 mM HEPES, pH 7.6 1 mM EDTA 2 mg/ml BSA 1 mM PMSF
Solution B	220 mM Mannitol 70 mM Saccharose 20 mM HEPES, pH 7.6 1 mM EDTA 1 mM PMSF
TAE	5 mM Tris 2 mM EDTA 2 mM Natriumacetat pH 8.0 (Essigsäure)
TBS	200 mM Tris/HCl, pH 7.5 1.25 M NaCl
TBS-Tween	200 mM Tris/HCl, pH 7.5 1.25 M NaCl 0.1% Tween-20
Transferpuffer	25 mM Tris 25 mM Glycin 0.1% [w/v] SDS 20% [v/v] Methanol

Translationspuffer	645 mM Sorbitol 160 mM KCl 16 mM KPi, pH 7.2 21.5 mM Tris, pH 7.4 13.5 mM MgSO <sub>4</sub> 3.3 µg/µl BSA 21.5 mM ADP 0.53 mM GTP 13.8 mM Creatine Phosphate 4 µg/ml Creatine Kinase 1.2 mg/ml α-Ketoglutarate 14 µM Aminosäuremix ohne Methionine (Promega)
Waschpuffer (Translation)	0.6 M Sorbitol 1 mM EDTA 5 mM Methionin

---

#### 4.1.6 Medium und Reagenzien für Zellkultur

##### 4.1.6.1 Reagenzien

Name	Hersteller
RPMI 1640 Medium	Gibco, Life Technologies, USA
RPMI 1640 Medium (ohne Phenolrot)	Gibco, Life Technologies, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco, Life Technologies, USA
Fatales Kälberserum (FKS)	Gibco, Life Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Life Technologies, USA
L-Glutamin	Gibco, Life Technologies, USA
0.005% Trypsin-EDTA	Gibco, Life Technologies, USA
10x PBS	Gibco, Life Technologies, USA

---

#### 4.1.6.2 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Zellkulturmedium	10% [v/v] FKS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin in RPMI 1640 Medium
<i>Live Cell</i> Medium	10% [v/v] FKS 2 mM L-Glutamin 25 mM HEPES 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin in RPMI 1640 Medium (ohne Phenolrot)
SILAC Medium	10% [v/v] FKS 200 g/l Glukose 200 mM L-Glutamine 10 g/l Phenolrot 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin 0.1 mg/ml leichtes Arginin 0.1 mg/ml leichtes oder schweres Lysin in DMEM Medium
Einfriermedium	10% DMSO 40% FKS in RPMI 1640 Medium
Transfektionsmedium	1% [w/v] Plasmid DNA 2% [v/v] Turbofect® in DMEM

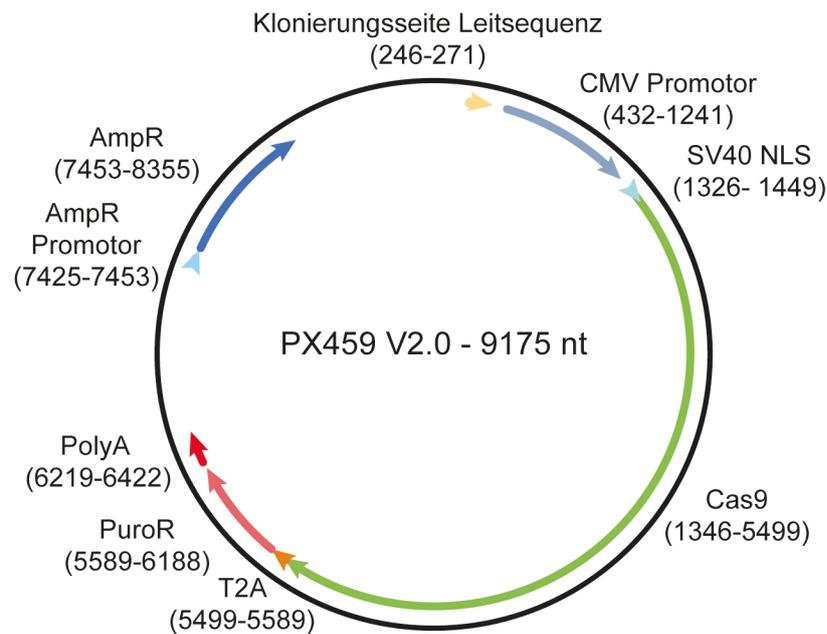
#### 4.1.7 Mammalia Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Hersteller
HeLa (Scherer, Syverton, and Gey 1953)	Humanes Cervixkarzinom	DSMZ, ACC-57
Lon gKD	HeLa mit Deletion in LONP1 Gen	Karen Pollecker

### 4.1.8 Plasmide

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Hersteller
PX459 V2.0	PX459 V2.0	Vektor mit CRISPR/Cas9 Endonuklease (CMV Promotor)	Addgene (Ran et al. 2013), USA
pKP05	PX459 V2.0	CRISPR/Cas Leitsequenz LonP1_2: 5' ACGTGCGTTTCGCGGCGAG (CMV Promotor)	Karen Pollecker
pKP10	pET28b	Su9- $\Delta$ Cytb (62-167)-DHFR mit T7 Promotor für <i>in vitro</i> Transkription	Karen Pollecker
pKP12 (mtQ74)	pcDNA3.1	Su9-eGFP-Q74 für Mammalia Expression (CMV Promotor)	Karen Pollecker
pKP13 (mtQ25)	pcDNA3.1	Su9-eGFP-Q25 für Mammalia Expression (CMV Promotor)	Karen Pollecker
pCR7 (mtQ115)	pcDNA3.1	Su9-eGFP-Q115 für Mammalia Expression (CMV Promotor)	Cornelia Rüb
pCR8 (cQ115)	pcDNA3.1	eGFP-Q115 für Mammalia Expression (CMV Promotor)	Cornelia Rüb
Trap1	pOTB7	Humanes Trap1 mit SP6 Promotor für <i>in vitro</i> Transkription	Invitrogen, USA
Mdh2	pOTB7	Humanes Mdh2 mit SP6 Promotor für <i>in vitro</i> Transkription	Invitrogen, USA

Promotor des humanen Cytomegalovirus (CMV Promotor); CRISPR (engl.: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats); Cas9 (engl.: CRISPR-associated endonuclease 9), die Plasmidkarten von pKP10, pKP12, pKP13 befinden sich im Anhang (Abb. S1).



**Abbildung 4: Plasmidkarte CRISPR/Cas9 Vektor PX459**

Der Vektor für einen CRISPR/Cas9-vermittelten Doppelstrangbruch besitzt die Endonuklease Cas9, die unter dem CMV Promotor in humanen Zellen exprimiert wird. Für eine nukleare Lokalisation besitzt der Vektor eine nukleare Lokalisationssequenz (NLS). Zur Klonierung der spezifischen Leitsequenz besitzt PX459 eine Klonierungs-Seite in der die LONP1\_2 Sequenz (5' ACGTGCGTTTCGCGGCGAG) ligiert wurde. Zudem besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz (AmpR) für die bakterielle, sowie eine Puromycin (PuroR)-Resistenz für die zelluläre Selektion. (CMV (Cytomegalovirus); CRISPR (engl.: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats); Cas9 (engl.: CRISPR-associated endonuclease 9); SV40 NLS (engl.: large T-antigen protein from SV40 virus with nuclear localization signal); PolyA (engl.: polyadenylation signal); T2A (engl.: 2A self-cleaving peptide); nt (Nukleotide))

## 4.1.9 Antikörper

### 4.1.9.1 Primärantikörper

Immunogen	Typ	Spezifikation	Hersteller
Aco2	Kaninchen	HP001097	Sigma-Aldrich, USA
CLPP	Kaninchen	15698-1-AP	Protein Tech, United Kingdom
CLPX	Kaninchen	GR 2385	Gramsch, Deutschland
F1 $\beta$	Maus	A21351	Invitrogen, USA
GAPDH	Kaninchen	2118S	NEB, Deutschland
GFP	Maus	50430-2-AP	Protein Tech, United Kingdom
HSP60	Kaninchen	SC-13966	Santa Cruz, USA
LC3 A/B-I/II	Kaninchen	12741S	NEB, Deutschland
Lon	Kaninchen	GR 1047-2	Gramsch, Deutschland
Mdh2	Kaninchen	11908 S	NEB, Deutschland
MPP (Pmpca)	Kaninchen	HPA021648	Sigma-Aldrich, USA
mtHSP70	Kaninchen	SPS-825	Stressgen, USA
SDHA	Kaninchen	14865-1-AP	Protein Tech, United Kingdom
SOD2	Kaninchen	S5569	Sigma-Aldrich, USA
Tfam	Kaninchen	80760S	NEB, Deutschland
Tim23	Maus	611222	BD. Bioscience, USA
Tom40	Kaninchen	SC-11414	Santa Cruz, USA
Tom70	Kaninchen	NB 110-583 47	Novus, Deutschland
TSMF	Kaninchen	HPA024087	Sigma-Aldrich, USA
TUFM	Kaninchen	11701-1-AP	Protein Tech, United Kingdom
TRAP1	Kaninchen	GR 2388-5b	Gramsch, Deutschland
Vimentin	Maus	373717	Santa Cruz, USA

### 4.1.9.2 Peroxidase- gekoppelte Sekundärantikörper

Immunogen	Typ	Spezifikation	Hersteller
Kaninchen IgG	Ziege	A6154	Sigma-Aldrich, USA
Maus IgG	Ziege	A4416	Sigma-Aldrich, USA

#### 4.1.9.3 Fluoreszenz- gekoppelte Sekundärantikörper

Immunogen	Typ	Spezifikation	Hersteller
Maus IgG Alexa Fluor™ 350	Ziege	A11045	Invitrogen, USA
Kaninchen IgG Alexa Fluor™ 350	Ziege	A11046	Invitrogen, USA
Maus IgG Alexa Fluor™ 488	Ziege	A11001	Invitrogen, USA
Kaninchen IgG Alexa Fluor™ 488	Ziege	A11008	Invitrogen, USA
Maus IgG Cy3™	Ziege	M30010	Invitrogen, USA
Kaninchen IgG Cy3™	Ziege	A10520	Invitrogen, USA
Maus IgG Alexa Fluor™ 594	Ziege	A11005	Invitrogen, USA
Kaninchen IgG Alexa Fluor™ 594	Ziege	A11012	Invitrogen, USA

#### 4.1.10 Software

Name	Hersteller
FIJI	Johannes Schindelin et al.
GraphPad prism 7	GraphPad Software, USA
Illustrator	Adope, USA
MultiGauch	Fujifilm, Japan
Photoshop	Adope, USA
SerialCloner 2.0	Serial Basic
ZEN	Zeiss, Deutschland

FIJI (is just ImageJ by Wayne Rasband, Institute of Mental Health Bethesda, USA), ist ein „open source image processing package“ Tool für ImageJ.

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Zellkultur**

#### **4.2.1.1 Zellkulturbedingungen**

Die hier verwendete Zelllinien wurden in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator (4.1.1) kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage 1:10 geteilt. Vor dem Ablösen wurden sie zunächst mit PBS (engl.: phosphate buffered saline) gewaschen. Zum Abzulösen wurden sie mit Trypsin für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit Medium von der Kulturplatte abgewaschen. Wurde eine bestimmte Zellzahl benötigt, wurden die Zellen mit Hilfe des Zellzähler (4.1.1), nach Herstellerangaben, gezählt und ausgesät.

Um eingefrorene Zellen aufzutauen, wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 9 ml PBS aufgenommen und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 10 ml PBS aufgenommen und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und auf eine 10 cm Zellkulturplatte aufgetragen. Nach einer Inkubation über Nacht wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht, um tote Zellen zu entfernen. Ein bis zwei Tage später wurden die Zellen, wie oben beschrieben, geteilt.

Wurden die Zelllinien eingefroren, wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend abgelöst, wie zuvor beschrieben. Nachdem die Zellen in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt worden sind, wurden sie bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und mithilfe des Einfrier-Containers (4.1.1) zunächst bei -80°C über Nacht eingefroren und anschließend in einen Flüssigstickstofftank überführt und aufbewahrt.

#### **4.2.1.2 Transfektion mit Turbofect® in der Zellkultur**

Um Plasmid DNA in eukaryotische Zellen einzubringen, wurde die Lipid-basierte Transfektion genutzt, hierbei bilden Reagenzien eine einfache Lipidhülle

um die Plasmid DNA. Diese Hülle kann nun mit der Zellmembran fusionieren und somit nimmt die Zelle die Plasmid DNA auf und der Promotor von humanen Cytomegaloviren (CMV) kann von den Zellen erkannt und das Reporterprotein exprimiert werden (Felgner et al. 1987). Für die Transfektion mit Turbofect® (4.1.4) wurden zunächst bestimmte Zellzahlen, in Abhängigkeit der Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht an die Platte anheften lassen. Am Folgetag wurde das Transfektionsmedium (4.1.6.2), modifiziert nach Herstellerangaben angesetzt, Tröpfchen-weise auf die Zellen gegeben und anschließend für vier Stunden im Inkubator kultiviert. Nach der Inkubation wurde das Transfektionsmedium gegen Zellkulturmedium ausgetauscht. Je nach Versuch wurden die Zellen unterschiedlich lang kultiviert und verwendet.

Zellkulturplatte	Zellzahl	Transfektionsmedium
24-Well Plate	$3 \times 10^4$	100 $\mu$ l
$\mu$ -Dish (Live Cell)	$8 \times 10^4$	400 $\mu$ l
6-Well Plate	$1.5 \times 10^5$	400 $\mu$ l
10 cm Platte	$1 \times 10^6$	2900 $\mu$ l

#### 4.2.2 Genetischer Knockdown von Lon durch eine CRISPR/Cas9 Endonuklease

Da ein vollständiger Lon Knockout embryonal letal ist (Quirós et al. 2014; Gibellini et al. 2014), wurde die Methode des CRISPR/Cas Systems (Ran et al. 2013) genutzt um Lon genetisch zu reduzieren.

Hierbei handelt es sich um die Endonuklease Cas9 aus *Streptococcus pyogenes*, welche mittels RNA Zielsequenz spezifische Gen-loci (engl.: protospacer adjacent motif, PAM-Sequenzen) erkennt und einen Doppelstrangbruch (DSB) hervorruft. Dieser DSB wird vom einem zelleigenen Reparaturmechanismus (NHEJ; engl.: nonhomologous end joining) erkannt und repariert. In Abwesenheit einer Reparatursequenz wird der DSB zwar repariert allerdings werden mehrere Base während der Reparatur gelöscht (Chang et al. 2017). Diese Deletion bewirkt eine *Frameshift*-Mutation, die in den meisten Fällen zu einem Knockout führt (Ran et al. 2013).

Um Lon genetisch zu reduzieren wurde die Deletion in der Promotorregion des LONP1 Gens durchgeführt. Hierfür wurde eine 19-nt (Nukleotide) Leitsequenz (4.1.8) kurz vor dem Startcodon, mithilfe des Online Tools (<http://crispr.mit.edu>) entwickelt, welche direkt neben einer PAM-Sequenz NGG liegt. Diese Leitsequenz wurde nach dem NATURE Protocol (Ran et al. 2013) in einen CRISPR/Cas Vektor kloniert und in DH5 $\alpha$  Bakterien transformiert. Um die erfolgreiche Klonierung zu testen, wurden die entstanden Klone mittels Restriktionsverdau zunächst analysiert und anschließend sequenziert. Hierfür wurde die Plasmid DNA mit dem Plasmid-Isolation Kit (4.1.4) nach Herstellerangaben isoliert und anschließend für 2 Stunden bei 37°C mit Fun4HI verdaut und auf ein 1% Agarose-Gel aufgetragen. Positive Klone wurden anschließend mittels Sanger Sequenzierung (GATC Sequencing, Deutschland) analysiert und für die folgende Transfektion genutzt. Um Lon in Mammalia Zellen genetisch zu reduzieren, wurde die Turbofect® Transfektion mit pKP05 (4.1.8), wie zuvor beschreiben, durchgeführt. Das Plasmid pKP05 besitzt als Selektionsfaktor eine Puromycin-Resistenz. Für die Selektion wurde die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit 2  $\mu$ g/ml Puromycin behandelt. Anschließend wurden die Zellen auf 2.5 Zellen pro ml verdünnt und auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Da pro Well 200  $\mu$ l Zellsuspension aufgetragen wurden, ist zu erwarten, dass in jedem zweiten Well eine einzelne Zelle vorhanden ist. Diese *Single-Cell* Verdünnung wurden für weitere zwei Wochen wachsen gelassen und auf größer Platten übertragen. Anschließend wurde ein Western Blot und Immunodekoration durchgeführt um die Zellklone zu bestimmen, welche eine Reduzierung von Lon aufwiesen. Hierfür wurden 200 000 Zellen pro Klon in Lämmli-Probenpuffer für 10 Minuten bei 95°C gekocht und wie folgt beschrieben, mittelst Western Blot analysiert. Positive Klone wurden anschließend von Daniel Hinze (Uniklinik Bonn, Deutschland) sequenziert.

### **4.2.3 Proteinbestimmung mittels SDS-PAGE, Western Blot und Antikörperdekoration**

#### **4.2.3.1 Proteinlyse mithilfe von SDS oder Triton X-100™**

Zur Proteinlyse, wurden die Zellen auf der Kulturschale zunächst zweimal mit eiskalten PBS gewaschen und mithilfe eines Zellschabers abgekratzt. Die entstandene Zellsuspension wurde anschließend bei 1500 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in Lysis Puffer, mit Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) oder Triton X-100™ als Detergens, aufgenommen. Zur Proteinlyse wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit geschüttelt und anschließend bei 800 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde entweder direkt verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Proteinkonzentrationen wurden modifiziert nach Bradford analysiert. Proteine binden an den Farbstoff Coomassie Blue G-250, welcher anschließend seine Absorption von 465 nm auf 595 nm verändert (Bradford 1976). Die Analyse wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde neben der eigentlichen Probe ebenfalls eine BSA-Standardreihe gemessen. Hierfür wurden 2 µl Proteinprobe mit 200 µl Bradford Reagenz gemischt und die Absorption bei 595 nm im Mikroplattenleser detektiert. Die Endkonzentration wurde anschließend mittels dieser Standardreihe berechnet.

#### **4.2.3.3 Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese**

Für die Bestimmung des Proteingehalt in Zellen, wurden die Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Hierbei werden Proteine gemäß ihrer Molekularmasse auf einem 8% bis 15%-igen Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Zunächst wurden 15-20 µg Proteinprobe in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C für 5 Minuten gekocht. Anschließend wurden die kurz Proben zentrifugiert und auf das Polyacrylamid Gel

aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer bei 35 mA für drei Stunden durchgeführt.

	Trenngel				Sammelgel
	8%	10%	12.5%	15%	
Acrylamid/ Bisacrylamid (30:0.8 Mix) [ml]	4.56	5.7	6.9	8.8	0.83
1.875 M Tris/HCl pH 8.8 [ml]	3.5	3.5	3.5	3.5	/
0.8 M Tris/HCl pH 6.8 [ml]	/	/	/	/	0.5
10% [w/v] SDS [ $\mu$ l]	170	170	170	170	50
ddH <sub>2</sub> O [ml]	8.64	7.5	6.3	4.74	3.55
10% [w/v] APS [ $\mu$ l]	100	100	100	100	50
TEMED [ $\mu$ l]	10	10	10	10	10
Total [ml]	17	17	17	17	5

Für einige Experimente wurden UREA-SDS Gele genutzt, hierfür wurde UREA (f.c. 1.1 M), in ddH<sub>2</sub>O gelöst, hinzugegeben.

#### 4.2.3.4 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mittels Semi-Dry Western Blot Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Für den Transfer wurde das Polyacrylamid Gel und sechs Whatman-Papiere für 5 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF Membran wurde für 5 Minuten in 100% Methanol aktiviert. Anschließend wurde das Blot-Sandwich aufgebaut, hierfür wurden drei Whatman-Papiere, die Membran, das Gel und weitere drei Whatman-Papiere blasenfrei übereinandergelegt (Kathode zur Anode). Der Transfer erfolgte für zwei Stunden bei 220 mA. Zum Anfärben der Proteine nach dem Transfer wurde die Membrane für 5 Minuten mit Coomassie angefärbt und anschließend mittels Entfärber Lösung wieder entfernt. Die Coomassie Färbung wurde mittels Scanner digitalisiert.

#### 4.2.3.5 Immuno-Dekoration und Detektion

Nach dem vollständigen Entfärben der PVDF Membran mit 100% Methanol wurde die Membran für eine Stunde mit Blocklösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 Minute mit Deko Salt oder TBS gewaschen und über Nacht mit der Primärantikörperverdünnung (4.1.8; 1:1000- 1:250 in Deko Salt-Tween oder TBS-Tween) bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und anschließend mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (4.1.9.2; 1:10 000 in Blocklösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran mithilfe von Chemilumineszenzen (Serva Light EoS Ultra) nach Herstellerangaben detektiert.

#### 4.2.4 Immunzytochemie

Für die mikroskopische Analyse von fixierten Zellen wurden  $3 \times 10^4$  Zellen pro *Well* einer 24-*Well* Zellkulturplatte auf sterilen Deckgläschen gesät und über Nacht kultiviert, um eine Anlagerung der adhärennten Zellen an die Deckgläschen zu gewährleisten. Für die Mikroskopie transferierter Zellen (4.2.1.2), wurden sie, wie oben beschreiben, zunächst transfiziert und für verschiedene Zeiträume kultiviert. Für die Behandlung mit Ciliobrevin (f.c. 20  $\mu$ M) und Benomyl (50  $\mu$ g/ml), wurden die Zellen direkt bzw. 12 Stunden nach der Transfektion mit den Inhibitoren behandelt.

Zwischen jedem Schritt wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zunächst wurde das Medium verworfen und die Zellen mit Paraformaldehyd Lösung (PFA) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und fixiert. Nach der Permeabilisierung für 10 Minuten bei RT wurden die unspezifische Antikörperbindung blockiert indem die Deckgläschen für 1 Stunde mit Blockier-Lösung bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit Primärantikörpern (4.1.9.1; 1:100-1:200, in Blockier-Lösung) bei 4°C inkubiert. Zur Visualisierung wurden die Primärantikörper mithilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (4.1.9.3; 1:200, in Blockier-Lösung) detektiert und mit Roti®-Mount Fluoro Care (4.1.4) auf Objektträger eingefasst. Anschließend wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop (4.1.1) mit einer 400-fachen Vergrößerung

visualisiert. Der Kontrast der entstandenen Bilder wurde um maximal  $\pm 10\%$  verändert.

Für eine Quantifizierung von immunzytochemischen Bildern wurde FIJI (4.1.10) genutzt. Hiermit wurde die durchschnittliche Intensität der Pixel analysiert.

#### **4.2.5 Live Cell-Mikroskopie**

Für die *Live Cell*-Mikroskopie wurden zunächst  $8 \times 10^4$  Zellen auf eine  $\mu$ -Dish Platte (4.1.2) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurde die Transfektion (4.2.1.2) mit verschiedenen PolyQ-Konstrukten (4.1.8) wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde das Transfektionsmedium gegen *Live Cell*-Medium (4.1.6.2) ausgetauscht. Nach einer Inkubation für 12 Stunden, wurde die *Live Cell*-Mikroskopie (4.1.1) begonnen und über einen Zeitraum von 30 bis 36 Stunden wurde alle 15 Minuten ein Bild, mit einer Lichtintensität von 5%, aufgenommen. Anschließend wurde das mitochondriale Membranpotential mittels Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) Färbung (f.c.  $0.5 \mu\text{M}$ ) analysiert (4.2.11.1).

#### **4.2.6 Slot Assay**

Um SDS-unlösliche Aggregate darzustellen, wurden ein Slot Assay (Rousseau et al. 2004) durchgeführt. Hierbei werden die Proteine mittels Unterdrucks auf eine Acetat- oder Nitrocellulose Membran gezogen. SDS-unlösliche Aggregate verbleiben an der Acetat Membran und wurden mittels Antikörper-Dekoration dargestellt. Als Ladekontrolle wurde die Nitrocellulose Membran verwendet.

Für die Analyse der PolyQ-Aggregation in Mitochondrium wurden zunächst Zellen mit verschiedenen PolyQ-Konstrukten transfiziert (4.2.1.2) und für 24 oder 48 Stunden kultiviert. Zunächst wurden die Zellen mit eiskalten PBS gewaschen und modifiziert nach Scherzinger (Scherzinger et al. 1997) in SDS-Lysis Puffer lysiert und die Konzentration wie zuvor beschreiben (4.2.3.2) detektiert.  $50 \mu\text{g}$  Proteinlysate wurde mit PBS und 1% SDS auf  $100 \mu\text{l}$  aufgefüllt. Anschließend wurden die Membranen in PBS mit 1% SDS für 5 Minuten inkubiert und das Slot-Assay nach Herstellerangaben aufgebaut. Nachdem die Proteinlösung in das Slot-

Assay gefüllt wurde, wurde sie mittels Unterdrucks auf die Membran gezogen und nochmals mit 100 µl PBS mit 1% SDS gewaschen. Zur Visualisierung wurde eine Antikörper-Dekoration durchgeführt (4.2.3.5).

#### **4.2.7 Mitochondrialer Import von endogenen Proteinen**

Für die Analyse des Imports von endogenen Proteinen in Mitochondrien wurden  $1 \times 10^6$  Zellen auf eine 10 cm Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Valinomycin (f.c. 1 µM) für 4 Stunden behandelt, was zu einer Inhibierung des Membranpotential führt ( $-\Delta\psi$ ). Für die Proteinlyse wurden die Zellen zunächst mit eiskalten PBS gewaschen und mithilfe eines Zellschabers von der Platte abgeschabt und nochmals gewaschen. Anschließend wurden das entstandene Zellpellet in Triton™ X-100 Lysis Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 4°C geschüttelt. Nachdem die Proteinkonzentration mittels Bradford (4.2.3.2) bestimmt und 20 µg Proteinlysat auf ein 8%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Proteinanalyse (4.2.3) visualisiert.

#### **4.2.8 Isolation von Mitochondrien aus Mammalia Zellen**

Für die Isolation von Mitochondrien wurden zunächst die Zellen zweimal mit eiskalten PBS gewaschen und anschließend mittels Zellschabers von der Zellkulturplatte abgekratzt und gesammelt. Nachdem die Zellen erneut zweimal mit eiskalten PBS gewaschen und bei 800 g, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert wurden, wurden das Zellpellet in Solution A aufgenommen. Nach einer Inkubation von 60 Minuten auf Eis, wurden die Zellen mithilfe eines Glashomogenisators aufgeschlossen. In einem Zentrifugationsschritt mit 1500 g und 4°C für 10 Minuten wurden lysierte Zellen und Zelltrümmer von nicht lysierten Zellen getrennt. Das entstandene Pellet wurde erneut in Solution A aufgenommen, erneut homogenisiert und zentrifugiert. Um die Mitochondrien aus den entstandenen Überständen aus beiden Homogenisationsschritten zu isolieren, wurden sie bei 12 000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die entstanden Pellets enthielten nun die Mitochondrien und wurden in Solution B aufgenommen und gewaschen um weitere Zelltrümmer zu entfernen. Hierfür wurden die Ansätze bei 2000 g und

4°C für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet, welches nun die Zelltrümmer enthielten, verworfen. Die Mitochondrien wurden anschließend aus dem Überstand durch einen Zentrifugationsschritt, mit 12 000 g und 4°C für 10 Minuten, pelletiert und in Solution B aufgenommen. Die Konzentration der isolierten Mitochondrien wurden anschließend mittels Bradford-Assay (4.2.3.2) bestimmt.

#### **4.2.9 Bestimmung des ATP-Gehalts in isolierten Mitochondrien**

Um den ATP-Gehalt in isolierten Mitochondrien zu analysieren, wurde ein Luciferase-basiertes ATP Assay (4.1.4) modifiziert nach Herstellerangaben verwendet. 50 µg frisch isolierte Mitochondrien wurden mithilfe von 0.5% Triton X-100™ aufgeschlossen und die entstandene Lichtreaktion im Mikroplattenleser detektiert. Anschließend wurde die Endkonzentration anhand einer Eichreihe (0-200 nM ATP) berechnet.

#### **4.2.10 *In organello* Import von Reporterproteinen**

##### **4.2.10.1 *In vitro* Transkription und Translation**

Die, für den Import- oder Degradation-Versuche benötigten, Reporterproteine (Su9-ΔCytb-(62-167)-DHFR, Trap1 und Mdh2 (4.1.8), wurden mithilfe des T<sub>N</sub>T® T7/T3 *Coupled Reticulocyten Lysate Kit* (4.1.4), nach Herstellerangaben, synthetisiert. Hierfür wurden 2 µg Plasmid-DNA zum Transkription/ Translations- Retikulozytenlysat Ansatz hinzugegeben und die Proteine wurden in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]-Methionin und [<sup>35</sup>S]-Cystein für 45 Minuten bei 30°C synthetisiert.

##### **4.2.10.2 *In organello* Import von [<sup>35</sup>S]-markierten Reporterproteinen**

Für die Analyse des mitochondrialen Imports wurden die zuvor synthetisierten [<sup>35</sup>S]-markierten Reporterproteinen verwendet. Zunächst wurden 50 µg isolierte Mitochondrien pro Ansatz in Importpuffer aufgenommen und für 2 Minuten bei 30°C präinkubiert. Als Negativreaktion wurde bei einem Ansatz das Membranpotential (-Δψ) durch die Zugabe von Antimycin A (f.c. 8 µM), Oligomycin (f.c. 20 µM) und Valinomycin (f.c. 0.5 µM) zerstört. Nach der Präinkubation wurde

die Importreaktion durch die Zugabe des Reporterproteins gestartet. Nach einer Inkubation von 5, 10, 20 oder 40 Minuten wurde die Importreaktion durch die Zugabe von Valinomycin (f.c. 0.5  $\mu\text{M}$ ) gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze geteilt und ein Teil wurde pelletiert und die Mitochondrien wurden in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Im zweiten Teil wurde das nicht-importierte Reporterprotein mithilfe von Proteinase K (PK; f.c. 150  $\mu\text{g/ml}$ ) entfernt, hierfür wurde dieser Teil des Ansatzes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die PK durch die Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; f.c. 5 mM) inaktiviert und durch zwei Waschschrte in Importpuffer mit PMSF gewaschen. Das Mitochondrienpellet wurde anschließend in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und auf einen 8%-ige Polyacrylamid Gel aufgetrennt und mittels Proteinanalyse und Autoradiographie visualisiert.

#### **4.2.11 Messungen von mitochondrialen Membranpotential**

##### **4.2.11.1 Messung von mitochondrialen Membranpotential in Zellen mittels Durchflusszytometrie**

Zur *in vitro* Messung von mitochondrialen Membranpotential wurde der positiv geladene, rot fluoreszierender Farbstoff Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE; Scaduto and Grotyohann 1999) verwendet. TMRE akkumuliert bei vorhanden Membranpotentials proportional zum Membranpotentials ( $\Delta\psi$ ) in der mitochondrialen Matrix (Crowley, Christensen, and Waterhouse 2016) und wird bei fehlenden Membranpotential ( $-\Delta\psi$ ) nicht importiert und zeigt ein weniger starkes Fluoreszenz Signal.

Als Vorbereitung für die Membranpotentialmessung wurden  $4 \times 10^5$  Zellen pro *Well* einer 6-*Well* Platte ausgesät. Am Folgetag wurde zunächst die Negativkontrolle für Zellen ohne Membranpotential für 90 Minuten mit Valinomycin (f.c. 1  $\mu\text{M}$ ) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei allen Proben das Medium entfernt und durch TMRE (f.c. 0.5  $\mu\text{M}$ ) in Zellkulturmedium ersetzt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen, wie zuvor beschrieben (4.2.1.1), abgelöst wurden, wurden sie dreimal in PBS gewaschen und bei 500 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrte wurde das

Zellpellet in FACS Puffer aufgenommen. Mithilfe des Durchflusszytometers CyFlow Space (4.1.1) wurde die TMRE-Fluoreszenz von 50 000 Zellen gemessen.

#### **4.2.11.2 Messung von mitochondrialen Membranpotential in isolierten Mitochondrien**

Für die Analyse mitochondrialen Membranpotentials wurden Mitochondrien zunächst isoliert, wie zuvor beschrieben (4.2.8). 50 µg Mitochondrien wurden in Potentialpuffer aufgenommen, die Negativkontrolle ( $-\Delta\psi$ ) wurde für 10 Minuten mit Valinomycin (f.c. 1 µM) bei 30°C behandelt. Anschließend wurden alle Proben mit TMRE (f.c. 0.5 µM) für 10 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend dreimal mit Potentialpuffer gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurden die Mitochondrien für 5 Minuten bei 12 000 g und 4°C zentrifugiert. Die TMRE-Fluoreszenz wurde mittels Mikroplattenlesegerät gemessen.

#### **4.2.12 Messung von ROS mittels Durchflusszytometrie**

Zur Analyse der Menge an ROS wurde der rot-fluoreszierende mitochondriale Superoxidindikator MitoSOX<sup>TM</sup> (4.1.4) verwendet.

Zunächst wurden die Zellen, wie zuvor beschreiben (4.2.1.1) ausgesät. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 90 Minuten mit Menadion (f.c. 0.1 mM; White and Clark 1988) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und gewaschen, wie zuvor beschreiben. Nach der Aufnahme des Zellpellets in FACS Puffer wurde die MitoSOX<sup>TM</sup> Fluoreszenz von 50 000 Zellen mittels Durchflusszytometers gemessen.

#### **4.2.13 *In organello* Translation von mitochondrial kodierten Proteinen**

Für die Kontrolle der mitochondrialen Translation wurden 50 µg isolierte Mitochondrien (4.2.8) in Translationspuffer aufgenommen. Als Negativkontrolle wurden die Proben für 3 Minuten bei 30°C mit Chloramphenicol (Chla; f.c. 20 µM) oder Cycloheximid (Chx; f.c. 20 µg/ml) behandelt. Nach einer 5-minütigen Vorinkubation wurden die Translation durch die Zugabe von

[<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein (f.c. 22 µCi/µl) gestartet. Alle Proben wurden für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, während sie durchgängig leicht geschüttelt wurden. Die Translation von radioaktiven Proteinen wurde durch die Zugabe von MOPS/Methionin Puffer gestoppt und für weitere 30 Minuten bei gleichen Bedingungen inkubiert. Die Mitochondrien wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen und bei 12 000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 15%-iges UREA-Polyacrylamid Gel aufgetragen und mittels Western Blot auf eine PDFV Membran übertragen. Die Detektion der radioaktiv-markierten Proteine wurden mittels digitaler Autoradiographie visualisiert. Anschließend wurden weitere Proteine mittels Immuno-Dekoration (4.2.3.5) analysiert.

#### **4.2.14 *In organello* Degradation von [<sup>35</sup>S]-markierten Reporterproteinen**

Um die Degradation in Mitochondrien zu untersuchen wurde zunächst [<sup>35</sup>S]-markierten Reporterproteinen importiert und ihre Degradation anschließend detektiert. Für eine eindeutigere Analyse wurden die Intensität der neu entstandenen Degradationsfragmente mithilfe von Multi Grauge (4.1.10) gemessen. Um einen Verfahrensfehler auszuschließen wurden beide Schritte, Import und Degradation, in einem Ansatz durchgeführt. Hierfür wurden für jeden Zeitpunkt 25 µg Mitochondrien in 100 µl Puffer kalkuliert.

Zunächst wurden [<sup>35</sup>S]-markierten Reporterproteinen für 10 Minuten importiert (4.2.10.2). Anschließend wurden nicht importierte Reporterproteine entfernt, indem die Mitochondrien bei 12 000 g und 4°C für 10 Minuten pelletiert wurden. Die Mitochondrien wurden in Degradationspuffer aufgenommen und zu den Negativkontrollproben wurde Menadion (f.c. 1 mM) zum Auslösen von ROS Stress hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 0-480 Minuten bei 30°C inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden 25 µg Mitochondrien aus dem Ansatz entnommen und alle Proteine wurden mit TCA (f.c. 14.4% [w/v]) gefällt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben für 35 Minuten bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert und das Aceton wiederum verworfen. Anschließend wurde das Pellet

getrocknet und in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und mittels Proteinanalyse und Autoradiographie visualisiert, zudem wurde eine Immuno-Dekoration durchgeführt um endogene Proteine zu analysieren.

## **4.2.15 Sedimentation von Aggregaten**

### **4.2.15.1 Sedimentationsassay für Western Blot Analyse**

Für die Analyse des Aggregationsverhalten von mitochondrialen Proteinen wurden zunächst Mitochondrien, wie zuvor beschrieben (4.2.8), isoliert und 30 µg Mitochondrien in 100 µl Resuspendierpuffer aufgenommen. Zum Vergleich mit unbehandelten Mitochondrien wurden 30 µg Mitochondrien in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen (T; total). Nach einer Hitzebehandlung mit 25°C, 37°C, 42°C oder 45°C für 20 Minuten wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 12 000 g und 4°C für 10 Minuten reisoliert und mittels Triton-Lysis Puffer und starken Schütteln für 10 Minuten bei 4°C aufgeschlossen. Anschließend wurden lösliche und unlösliche Proteine durch eine Ultra-Zentrifugation bei 125 000 g und 4°C für 45 Minuten getrennt. Lösliche Proteine verblieben im Überstand (S; engl.: supernatant) und unlösliche Proteine und Aggregate wurden im Pellet (P) sedimentiert. Das Pellet wurde erneut in Lysis Puffer gelöst, 10 Minuten geschüttelt, erneut durch Ultra-Zentrifugation pelletiert und anschließend in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Um die löslichen Proteine aus dem Überstand zu fällen, wurde Trichloressigsäure (TCA; f.c. 14.4% [w/v]) hinzugegeben und stark geschüttelt. Diese Proben wurden für mindestens 35 Minuten oder über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend für 35 Minuten bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert. Um die TCA wieder zu entfernen, wurden die Proben zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und bei 20 000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde bei RT getrocknet und in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben durch die Proteinbestimmung (4.2.3) visualisiert.

### **4.2.15.2 Sedimentationsassay für massenspektrometrische Analyse**

Zur Analyse von Lon-abhängigen Aggregationsverhalten von mitochondrialen Proteinen, wurden beide Zelllinien für 4 Passagen (~2 Wochen)

in SILAC (engl.: stable isotope labelling with amino acids in cell culture) Medium mit  $^{13}\text{C}$  Kohlenstoffisotope (Lon gKD) oder  $^{12}\text{C}$  Kohlenstoff (WT) markierten Arginin kultiviert. Nachdem die Mitochondrien isoliert wurden (4.2.8) wurden 30  $\mu\text{g}$  Lon gKD und 30  $\mu\text{g}$  WT Mitochondrien in Resuspendierpuffer gemischt und bei  $42^\circ\text{C}$  oder  $25^\circ\text{C}$  für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Sedimentationsassay, wie zuvor beschrieben (4.2.15.1), durchgeführt und auf ein Polyacrylamid aufgetragen und für 30 Minuten bei 35 mA aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proben, wurde das Gel in Coomassie für 10 Minuten gefärbt und über Nacht mittels Entfärber entfärbt. Die Proben wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in der Massen Spektrometrie (MS, IBMB Uniklinik Bonn, Deutschland analysiert).

#### **4.2.16 Statistische Analyse**

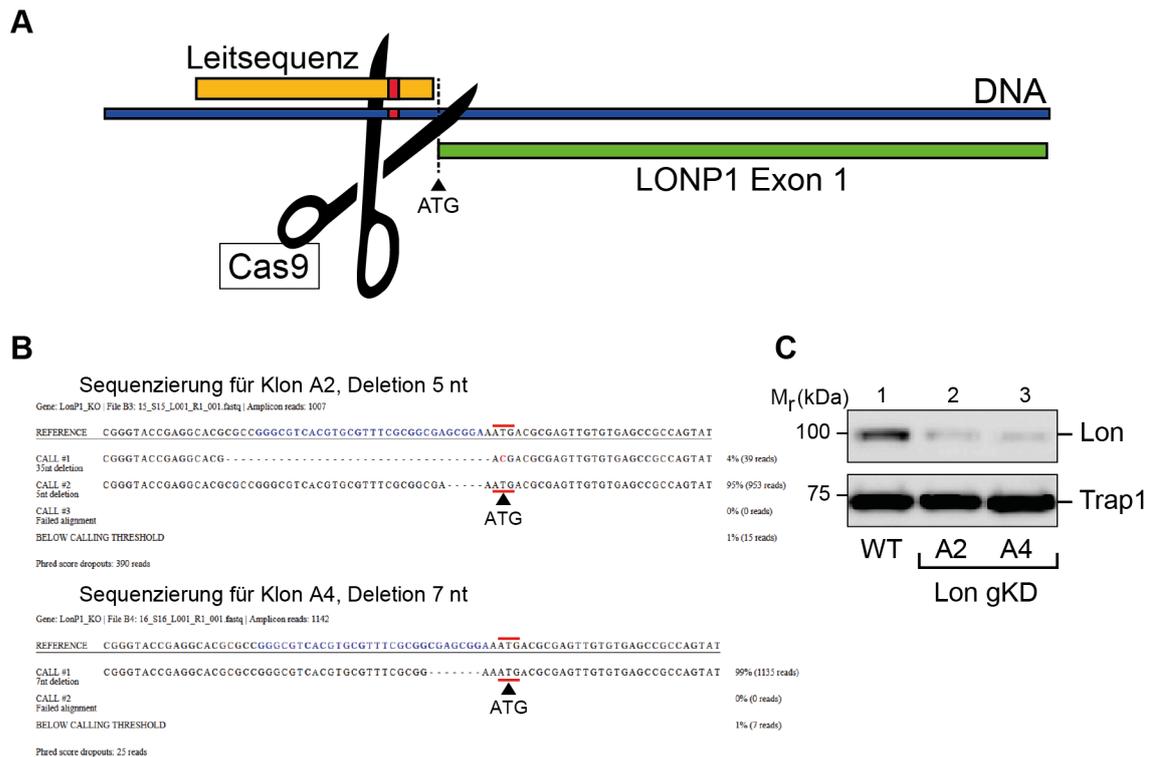
Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad prism 7 durchgeführt und zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standard Fehler des Mittelwerts (standard error of the mean, SEM) an.

---

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Herstellung und Charakterisierung der Lon gKD Zellen

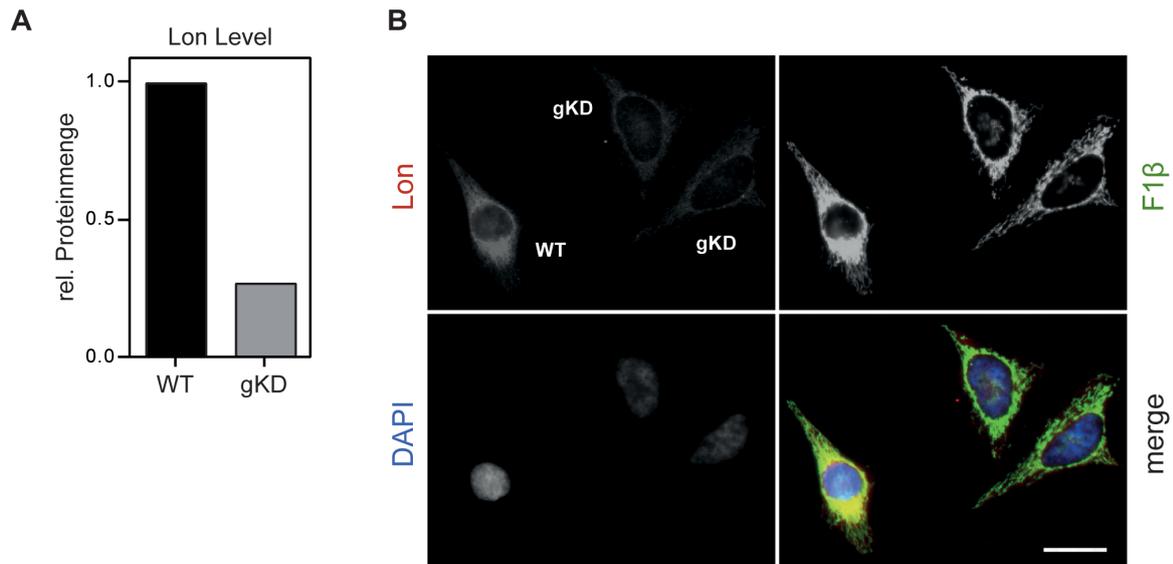
Für die Analyse der Lon Funktionen wurde ein genetischer Knockdown (gKD) mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems erstellt. Aufgrund der hohen Apoptoserate (Bota, Ngo, and Davies 2005) und der Letalität am Tag 9.5 in homozygoten Knockout Mäusen (Quirós et al. 2014) konnte daher kein herkömmliches *loss-of-function* (Funktionsverlust) Modell erstellt werden. Für den Lon gKD wurde eine Leitsequenz erstellt und in den Cas9-beinhaltenden Vektor PX459 V2.0 kloniert. Die genomische Leitsequenz der Cas9, die PAM-Sequenz (Abb. 5A, orange; B, blaue Sequenz) liegt zwei Nucleotide (nt) vor dem Startcodon und ist allerdings nicht Teil der eigentlichen Leitsequenz. Diese bindet direkt anschließend an die genomische DNA und die Cas9 Endonuklease schneidet wiederum 3 nt neben der PAM Sequenz (Abb. 5A/B). Der hervorgerufene Doppelstrangbruch (Abb. 5A, rot) wird durch den NHEJ-Reparaturmechanismus wieder geschlossen. In Abwesenheit einer Reparatursequenz wird der Bruch unter dem Verlust von mehreren Nucleotiden wieder geschlossen (Chang et al. 2017). Die Länge der entstandenen Deletion kann unterschiedlich groß ausfallen. Nach der Transfektion und der Vereinzelung der HeLa Zellen, wurden zwei Klone sequenziert und zeigten eine Deletion von 5 nt (A2) bzw. 7 nt (A4) nahe des Startcodons (Abb. 5B). Die Lon-Proteinmenge wurde mittels Proteinbestimmung untersucht, beide Klone zeigen eine starke Reduktion der Proteinmenge, allerdings ist bei beiden Klonen weiterhin ein schwache Lon Signal detektierbar (Abb. 5C). Im Weiteren wurde der Lon gKD Klon A4 charakterisiert indem die Morphologie und wesentlichen mitochondriale Funktionen analysiert wurden.



**Abbildung 5: CRISPR/Cas-vermittelter Lon Knockdown und Sequenzierung**

**A** Schema der Bindung der Leitsequenz (orange) kurz vor dem Startcodon des LONP1 Gens (grün) und Schnittstelle der Endonuklease Cas9 (rot). **B** Ergebnis der Sequenzierung der beiden Lon gKD Klone durch Daniel Hinze (Uniklinikum Bonn). Die Leitsequenz ist blau und das Startcodon ATG von LONP1 ist rot markiert. **C** Überprüfung der Reduktion der Lon-Proteinmenge in HeLa Wildtyp (WT) und zwei Lon gKD Klonen mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion unter Verwendung der angegebenen Antikörper. Trap1 wurde als Ladekontrolle verwendet.

In der quantitativen Massenspektrometrie (MS) zeigte sich eine Reduktion der Lon-Proteinmenge auf 27% im Verhältnis zum HeLa Wildtyp (WT) Proteinlevel (Abb. 6A). Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Analyse der Zellen mittels Immunzytochemie. WT und Lon gKD Zellen wurden in einem Verhältnis 1:1 gemischt und mit einem Lon Antikörper dekoriert. In Lon gKD Zellen zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der Lon-Proteinmenge (rot; Abb. 6B).



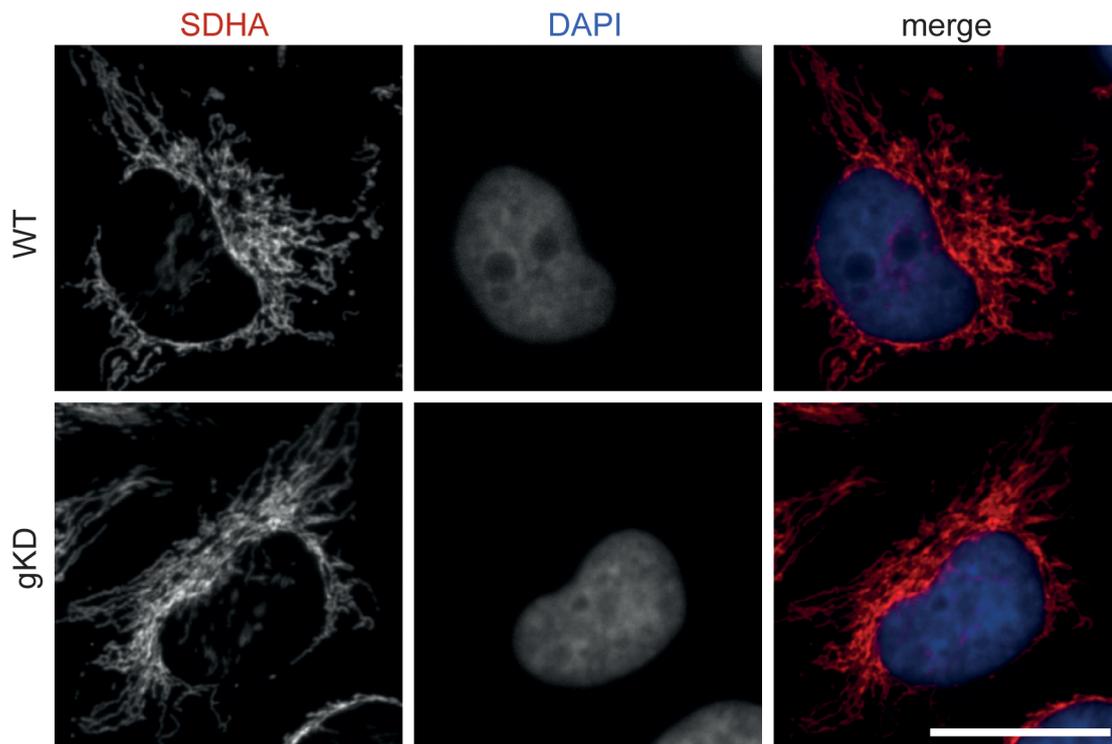
**Abbildung 6: Lon-Proteinlevel in quantitativer Massenspektrometrie und Immunzytochemie**

**A** Proteinmenge von Lon in Lon gKD Zellen im Verhältnis zur Lon WT Proteinmenge in MS Analyse. **B** Immunzytochemie vom Lon (rot) in fixierten WT und Lon gKD Zellen, welche im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Als mitochondriales Protein wurde F<sub>1</sub>β (grün), eine Untereinheit der mitochondrialen ATPase in der inneren Membran verwendet. Der Zellkern wurde mittels DAPI angefärbt (blau); Skala: 50 µm.

### 5.1.1 Morphologie von Lon gKD Zellen

Für die Untersuchung der mitochondrialen Integrität wurden das mitochondriale Netzwerk der Zellen mittels Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Als mitochondriales Protein wurde die Untereinheit A der Succinat Dehydrogenase (SDHA; engl.: succinate dehydrogenase subunit A, flavoprotein, rot; Abb. 7) verwendet. Als Teil des Atmungskettenkomplexes CII (engl.: Complex II) ist SDHA gleichmäßig über das mitochondriale Netzwerk verteilt.

Sowohl das SDHA-Signal in den WT als auch in den Lon gKD Zellen zeigte eine gleichmäßige Verteilung im mitochondrialen Netzwerk der Zellen (rot; Abb. 7). Es konnte zudem keine morphologischen Auffälligkeiten gefunden werden. Das mitochondriale Netzwerk beider Zelllinien war tubulär und zeigte keine Hinweise auf Stress-bedingten Fragmentierung.



**Abbildung 7: Morphologie der Lon gKD Zellen**

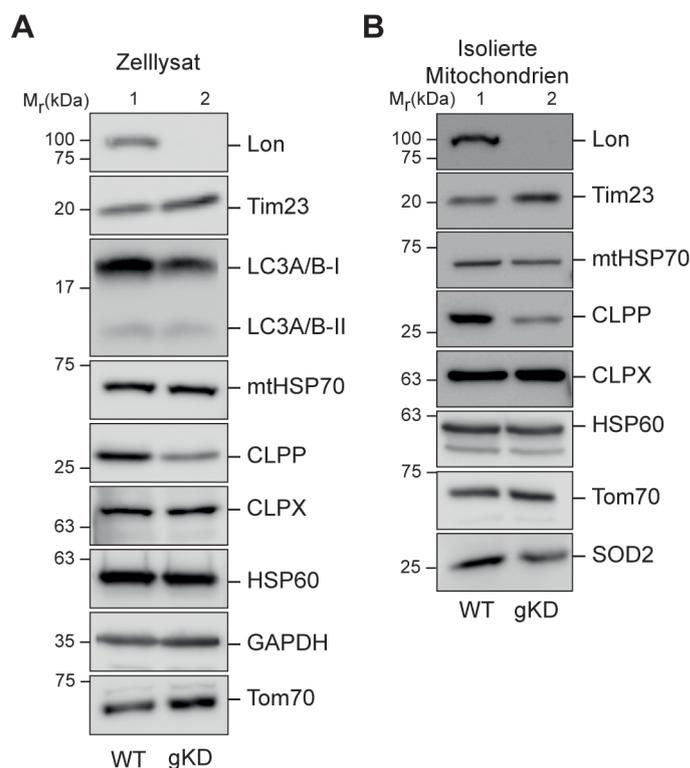
Visualisierung des mitochondrialen Netzwerkes in fixierten Lon gKD und WT Zellen mittels Immunzytochemie. Als mitochondriales Protein wurde die Untereinheit SDHA (rot) des Atmungskettenkomplexes CII verwendet. Der Zellkern wurde mittels DAPI angefärbt (blau). Skala: 50  $\mu$ m.

### 5.1.2 Proteinmengenänderung nach Lon gKD

Um einen generellen Überblick über die Änderung der Proteinmenge verschiedener mitochondriale Proteine zu erhalten, wurde sowohl isolierte Mitochondrien (Abb. 8B) als auch Zelllysat (Abb. 8A) von WT und Lon gKD Zellen mittels Proteinbestimmung untersucht. Es wurden verschiedene Proteine mit unterschiedlichen mitochondrialen Lokalisationen verwendet.

Die Proteinmenge von fast allen untersuchten Proteinen verhielt sich sowohl im Zelllysat als auch in isolierten Mitochondrien äquivalent. Als Untereinheit der äußeren mitochondrialen Membran wurde Tom70 detektiert. Die Proteinmenge war sowohl in isolierten Mitochondrien als auch im Zelllysat geringfügig erhöht. Im Vergleich zu Tom70 war Tim23, als Bestandteil der inneren Membran, deutlich erhöht. Bei den analysierten Matrix-Proteine zeigten sich Unterschiede in der Proteinmenge. Während die Chaperone HSP60 und mtHSP70 keine Änderung der

Proteinmenge zeigten. Verringerte sich die Menge der Protease CLPP in Lon gKD Zellen überraschend deutlich, allerdings zeigte CLPX, der Komplexpartner von CLPP keine Verringerung oder Zunahme. In isolierten Mitochondrien war SOD2 (engl.: manganese superoxide dismutase 2) nach Lon gKD ebenfalls stark verringert. Zusätzlich war der Autophagie-Marker LC3 A/B Typ I (Zou et al. 2014) ebenfalls verringert in Lon gKD Zelllysate. Das zytosolische Protein GAPDH (engl.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Abb. 8A) wurde als Ladekontrolle verwendet.



**Abbildung 8: Proteinmengen verschiedener Proteine nach Lon gKD**

Analyse verschiedener Proteine in Zelllysate (A) und isolierten Mitochondrien (B) von WT und Lon gKD Zellen mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion, unter Verwendung der angegebenen Antikörper. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

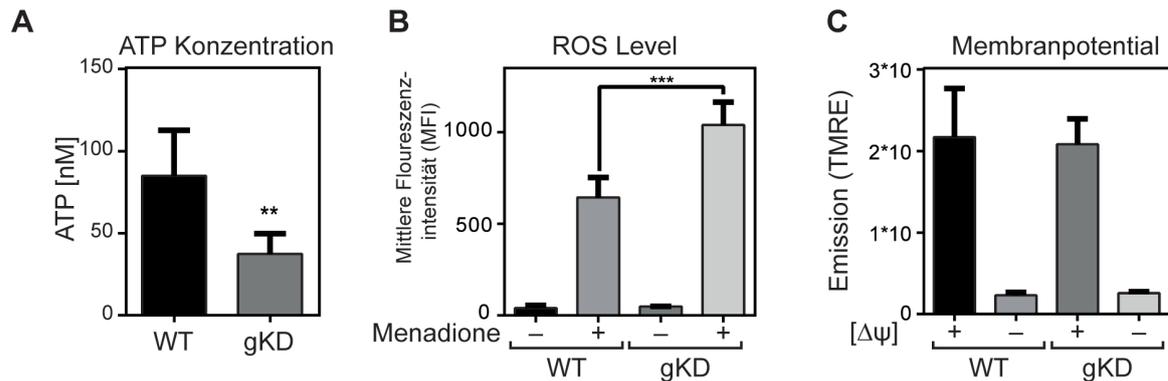
### 5.1.3 Untersuchung der mitochondrialen Funktionen nach Lon gKD

#### 5.1.3.1 Änderung der ATP Konzentration in isolierten Mitochondrien

Da Mitochondrien als Reaktion auf Stress mehr Energie benötigen und die ATP Konzentration nach Stress verringert ist (Wilkening et al. 2018) wurde die ATP Konzentration nach Lon gKD in isolierten Mitochondrien gemessen. Zur

Quantifizierung wurde die ATP Konzentration mittels Biolumineszenz-Assay gemessen. Die ATP-abhängige Luciferase setzte das Substrat D-Luciferin um und produziert Licht, welches wiederum mittels Mikroplattenlesegerätes detektiert werden konnte.

Die ATP Konzentration in isolierten Mitochondrien der Lon gKD Zelllinie, verringerte sich um 43%, im Vergleich zu WT Mitochondrien (Abb. 9A).



**Abbildung 9: Analyse verschiedener mitochondrialer Funktionen**

**A** Messung der ATP Konzentration in isolierten WT (schwarz) und Lon gKD (dunkelgrau) Mitochondrien mittels Luciferasereaktion. Die ATP Konzentration wurde mit Hilfe einer ATP-Standardreihe ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM der ATP Konzentration von drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ); \*\*  $p=0.0032$ . **B** Analyse von ROS in WT (schwarz) und Lon gKD (dunkelgrau) Zellen mittels *Flow Cytometry* unter der Nutzung des Mitochondrien-spezifischen Superoxid-reaktiven Farbstoffs MitoSOX<sup>TM</sup>. Als Positivkontrollen wurden WT (grau) und Lon gKD (hellgrau) Zellen für 90 Minuten mit 100  $\mu$ M mit Menadion kultiviert. Ergebnisse zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM der mittlere Fluoreszenzintensität von MitoSOX<sup>TM</sup> in drei unabhängige Experimente ( $n=3$ ); \*\*\*  $p<0.001$ . **C** Messung des Membranpotentials in isolierten WT (schwarz) und Lon gKD (dunkelgrau) Mitochondrien mittels Verwendung des positiv-geladenen TMRE Farbstoff. Als Negativkontrollen wurde das Membranpotential ( $\Delta\psi$ ) in WT (grau) und Lon gKD (hellgrau) Mitochondrien zerstört, indem sie für 10 Minuten mit 1  $\mu$ M Valinomycin bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Ergebnisse zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM der TMRE Emission in drei unabhängige Experimente ( $n=3$ ).

### 5.1.3.2 Analyse der Stressantwort nach Stress mit ROS

Um die Anfälligkeit gegenüber Stress zu untersuchen, wurde die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mithilfe des Mitochondrien-spezifischen Superoxid-reaktiven Farbstoffs MitoSOX<sup>TM</sup> ermittelt. Da Lon als ROS Stressantwort hoch reguliert wird (Bender et al. 2011), besteht die Frage, ob Lon

gKD Zellen generell gestresst sind bzw. sensitiver auf Stress reagieren. Der MitoSOX™ Farbstoff bindet Superoxidradikale und die entstandene rote Fluoreszenz wurde mittels *Flow Cytometry* Analyse detektiert. Als Positivkontrolle diente eine Behandlung mit 100 µM Menadion, welches toxische Superoxidradikale produziert (Chaput et al. 1983).

Die Detektion der mittleren Fluoreszenzintensität des MitoSOX™ Farbstoffes der unbehandelten WT und Lon gKD Zellen zeigte keine Unterschiede. Wurden die Zellen jedoch mit Menadion behandelt, zeigten Lon gKD Zellen eine um 56% erhöhte Akkumulation freier Sauerstoffradikale (Abb. 9B). Demnach zeigten die Lon gKD Zellen eine erhöhte Sensitivität für Superoxidradikale, sie reagieren gestresster auf die Menadion-Behandlung. Allerdings zeigten sie im unbehandelten Zustand keine Zunahme an freien Sauerstoffradikale, sie sind also nicht generell gestresst.

### **5.1.3.3 Messung von mitochondrialen Membranpotential in isolierten Mitochondrien**

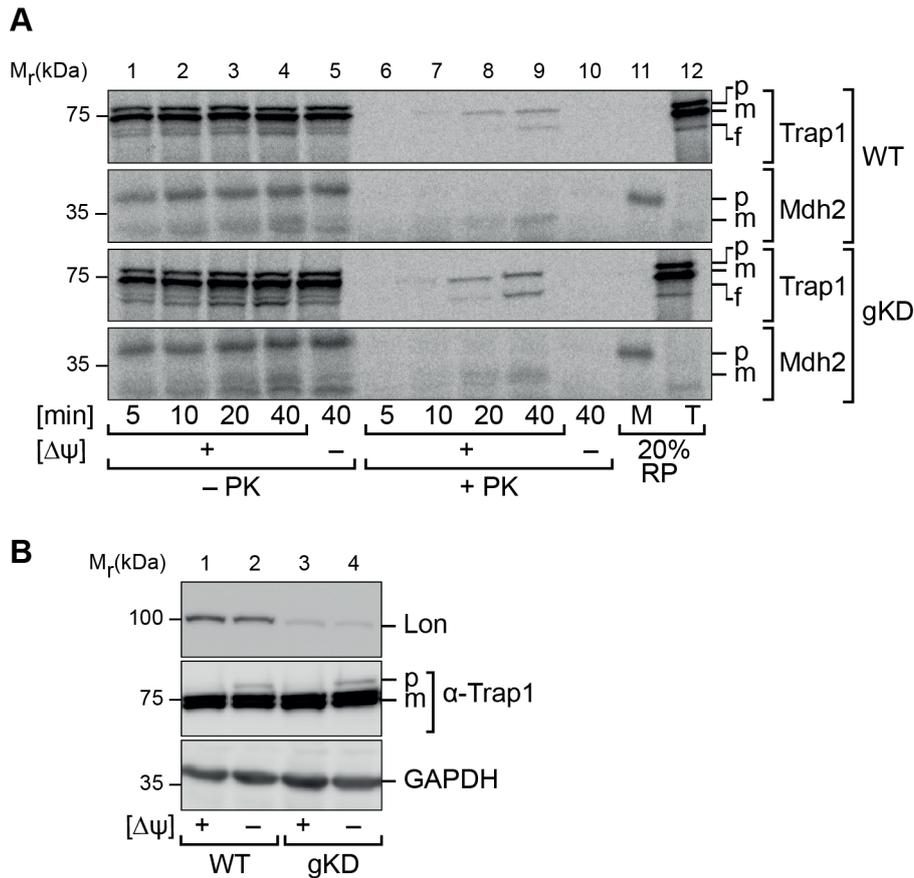
Das mitochondriale Membranpotential ist essentiell für die Aufrechterhaltung von den verschiedenen mitochondrialen Funktionen, wie Proteinimport und ATP-Produktion. Um einen Einfluss des Verlustes von Lon auf das Membranpotential zu untersuchen, wurden zunächst Mitochondrien isoliert und mittels positiv geladenen Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminmethylester (TMRE) behandelt. Dieser Farbstoff wird mittels Membranpotentials in die Mitochondrien importiert und akkumuliert dort (Crowley, Christensen, and Waterhouse 2016). Für die Negativkontrolle, wurden die Mitochondrien vor der TMRE Färbung mit 1 µM Valinomycin behandelt ( $-\Delta\psi$ ).

Die Analyse der TMRE Fluoreszenz zeigte keine Veränderung des mitochondrialen Membranpotential nach Lon gKD. Die, als Negativkontrolle behandelten Mitochondrien ohne Membranpotential zeigten nur eine geringe TMRE Fluoreszenz (Abb. 9C).

#### 5.1.3.4 Proteinimport von [<sup>35</sup>S]-markierten Reporterproteinen in isolierten Mitochondrien und *in vivo* Import von endogenen Protein Trap1

Aufgrund ihrer endosymbiontischen Herkunft besitzen Mitochondrien zwar ihr eigenes Genom, jedoch sind nur 13 Proteine mitochondrial codiert. Die restlichen >1000 Proteine werden im Nukleus codiert und müssen nach der Translation im Zytosol in die Mitochondrien importiert werden. Dieser Proteinimport ist eine essentielle Funktion der Mitochondrien und ist daher Teil der Charakterisierung der Lon gKD Zellen. Für den Import von markierten Reporterproteinen, wurden zunächst Mitochondrien aus WT und Lon gKD Zellen isoliert, und mit dem Reporterprotein Trap1 (engl.: Tumor necrosis factor type1 receptor associated protein) und Mdh2 (Melatdehydrogenase 2, mitochondrial) für verschiedene Zeiträume inkubiert, um den zeitlichen Verlauf des Imports zu analysieren. Nicht importierte Proteine (Prä-Form; p) wurden durch die Proteinase K (PK) verdaut. Nur Proteine, die sich nach Import in den Mitochondrien befanden (*Mature*-Form; m), sind anschließend vor Abbau durch PK geschützt. Um den Proteinimport zu blockieren, wurden das Membranpotential gehemmt ( $-\Delta\psi$ ).

Sowohl die WT als auch die Lon gKD Mitochondrien zeigten einen Import beider Reporterproteine nach 20-minütiger Inkubation, sowohl mit als auch ohne PK Behandlung waren die prozessierten Proteine detektierbar. Beide, WT und Lon gKD Mitochondrien zeigten keinen Proteinimport, wenn kein Membranpotential vorhanden waren (Abb. 10A). Für die Untersuchung des Proteinimports von endogenen Trap1, wurde zunächst der mitochondriale Import durch die Behandlung mit 1  $\mu$ M Valinomycin für vier Stunden gehemmt. Durch diese Hemmung konnte die Prä-Form des endogenen Trap1 im Zytosol akkumulieren und war durch SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion detektierbar. Nach der Hemmung des Proteinimports, akkumulierte endogenes, unprozessiertes Trap1 in WT und Lon gKD Zellen im gleichen Maße (Abb. 10B). Der Verlust von Lon führt zu keiner Einschränkung des Proteinimports sowohl in isolierten Mitochondrien als auch in ganzen Zellen.



**Abbildung 10: *In organello* Proteinimport von radioaktiv markierten Reporterproteinen und *in vivo* Import von endogenen Trap1**

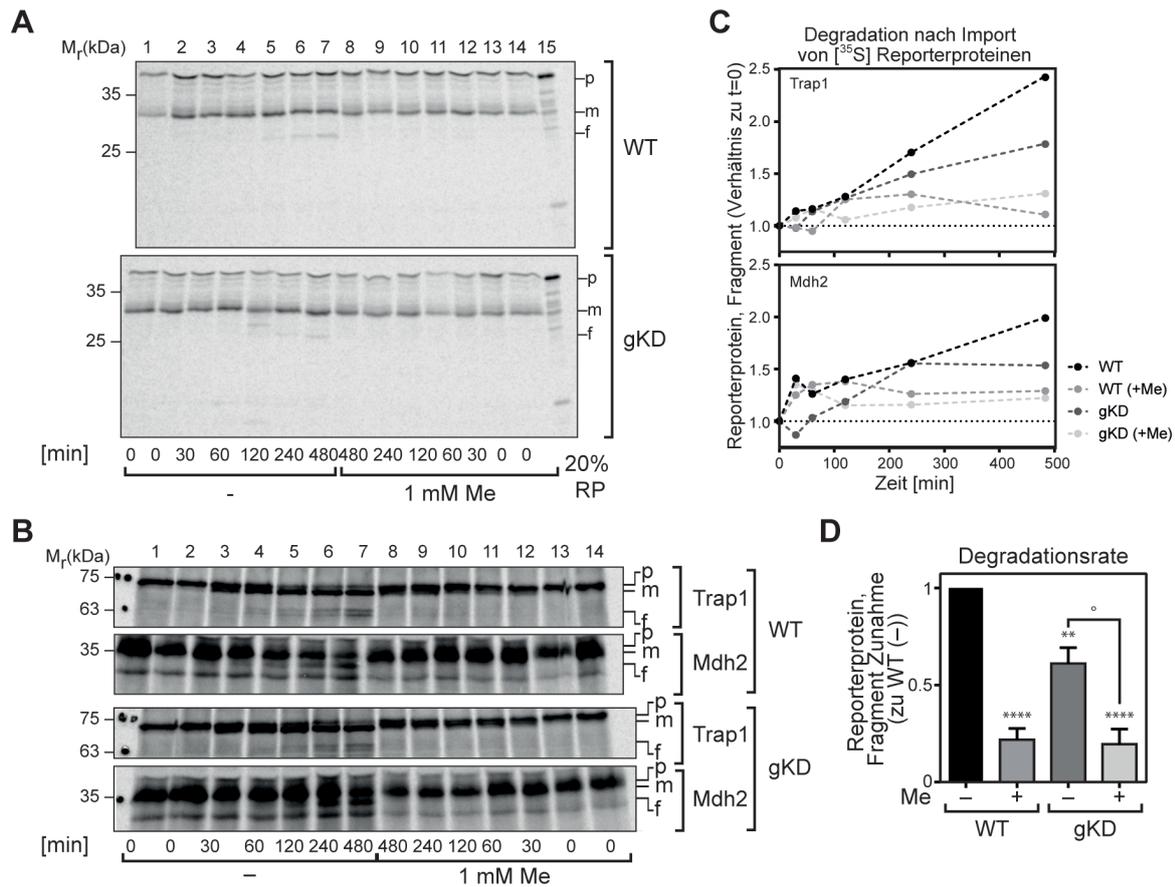
**A** *In organello* Proteinimport von [<sup>35</sup>S]-markierten Reporterproteinen Trap und Mdh2 wurde mittels SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie analysiert. Isolierte WT und Lon gKD Mitochondrien wurden für verschiedene Zeiträume mit beiden Reporterproteinen (RP) inkubiert. Importierte Proteine (m, *Mature*-Form) erscheinen im Versuchsverlauf. Für den Abbau nicht-importierter Reporterproteine (p, *Prä*-Form) wurden die Mitochondrien für 30 Minuten mit Proteinase K (+PK) inkubiert (Spur 6-10). Um den mitochondrialen Import zu verhindern, wurden die Mitochondrien zuvor mit 0.2 μM Valinomycin (-Δψ, Spur 5, 10) behandelt. Für die Darstellung des nicht-importierten Reporterproteins, wurden 20% Reporterproteins aufgetragen (Spur 11, 12).

**B** Der Proteinimport von endogenem Trap1 in WT (Spur 1, 2) und Lon gKD (Spur 3, 4) Zellen wurde mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion analysiert. Der Import endogener Proteine wurde mittels 1 μM Valinomycin Behandlung für 4 Stunden (-Δψ, Spur 2 und 4) geblockt. In den behandelten Zellen erscheint die akkumulierte p-Form von Trap1. In der unbehandelten Kontrolle ist nur die m-Form zu sehen. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

### 5.1.3.5 *In organello* Degradation nach Import von [<sup>35</sup>S]-markierten Reporterproteinen

Nachdem zuvor gezeigt werden konnte, dass der mitochondriale Proteinimport durch den partiellen Verlust von Lon, nicht beeinträchtigt wurde, konnte nun die Proteindegradation von radioaktiv-markierten und importierten Reporterproteinen analysiert werden. Für die Untersuchung der Degradation, wurden zunächst die Reporterproteine Su9- $\Delta$ Cytb (62-167)-DHFR, Trap1 und Mdh2 für 10 Minuten in isolierte Mitochondrien importiert. Anschließend wurde die Degradation über einen Zeitraum von 480 Minuten verfolgt und mittels SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie detektiert. Als Negativkontrolle, wurden die Mitochondrien nach dem Proteinimport und während der Degradation mit 1 mM Menadion behandelt. Zur Quantifizierung wurde die Intensität der Bande des neu entstandenen Fragments quantifiziert. Zur Berechnung der Degradationsrate wurde die Zunahme der Intensität mittels Regressionsgerade berechnet und auf die unbehandelten WT Degradationsrate normalisiert.

Nach einer Degradationszeit von 120 Minuten, erschien ein Degradationsfragment (f) aller Reporterproteine in den isolierten WT Mitochondrien (Abb. 11A/B; Spur 5, oben). Ein vergleichbares Fragment erschien in Lon gKD Mitochondrien erst nach einer Degradationszeit von 240 Minuten (Abb. 11A/B; Spur 6, unten). Die Intensität der Banden dieser Degradationsfragmente nahm in beiden Ansätzen im Verlauf der Zeit zu. Nach der Quantifizierung zeigte sich eine Verringerung der Degradationsrate in Lon gKD Mitochondrien auf 60%. Durch die Menadion Behandlung, war lediglich eine Degradationsrate von 20% der WT Degradation zu detektieren. Dies zeigte, dass die Protease Funktion in Lon gKD Mitochondrien prinzipiell vorhanden ist, allerdings ist sie, durch den partiellen Verlust von Lon, reduziert (Abb. 11C/D).

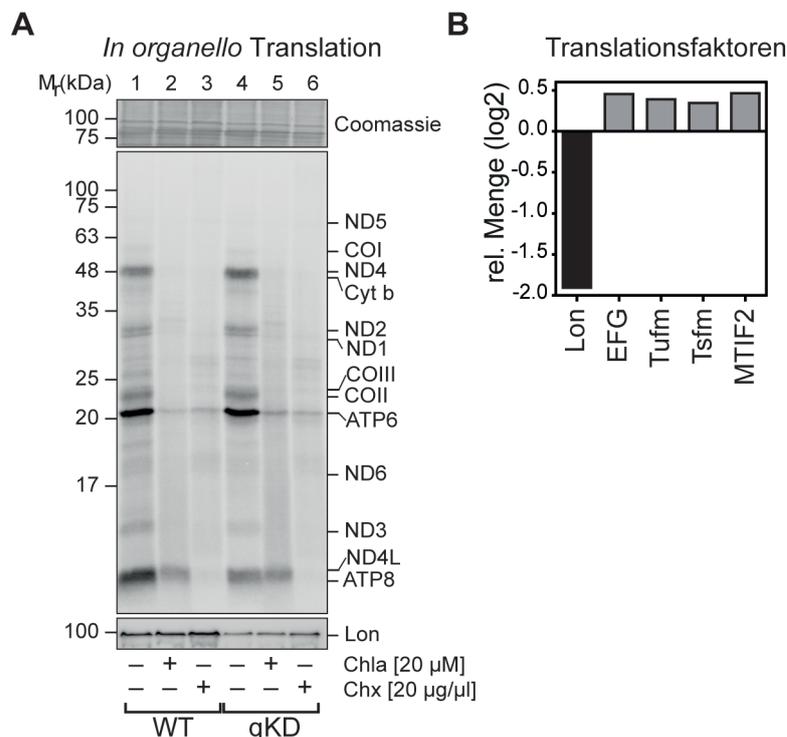


**Abbildung 11: In organello Degradation von Reporterproteinen**

Analyse der *in organello* Degradation von  $^{35}\text{S}$ -markierten Reporterproteinen Su9- $\Delta$ Cytb (62-167)-DHFR (**A**), Trap1 und Mdh2 (**B**) nach TCA-Fällung mittels SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie. Nach einem 10-minütigen Proteinimport, wurde die Degradation über einen Zeitraum von 0-480 Minuten in isolierten WT (oben) und Lon gKD (unten) Mitochondrien dargestellt. Als Negativkontrolle, wurden die Mitochondrien mit 1 mM Menadion (Me) behandelt. **C** Für die Analyse der Degradationsrate, wurde die Zunahme des neu-entstandenen Fragment (f) detektiert und über die Zeit mittels FUJI FILM Multi Grauge detektiert. **D** Die Degradationsrate für WT (schwarz) und Lon gKD (dunkelgrau) sowie die mit Menadion behandelten WT (grau) und Lon gKD (hellgrau) wurde anhand der Zunahme des Fragments über die Zeit kalkuliert. Die Ergebnisse zeigen die mittlere Zunahme des Fragments im Verhältnis zum WT (ohne Menadion (Me) Behandlung)  $\pm$  SEM von fünf unabhängigen Experimenten (n=5), \*\*\*\* p<0.0001; \*\* p=0.0032; ° p=0.01. Alle Ergebnisse in Mittelwert  $\pm$ SEM.

### 5.1.3.6 *In organello* Translation

Neben der Protease Funktion reguliert Lon die Replikation durch Bindung an die mtDNA (T. Liu et al. 2004; Matsushima, Goto, and Kaguni 2010) und Lon degradiert Tfam, welcher wiederum einen Einfluss auf die Transkription und Translation (Matsushima, Goto, and Kaguni 2010; Kukat et al. 2015) der mtDNA hat. Daher wurde ebenfalls die Translation mitochondrial codierter Proteine untersucht. Hierfür wurden neu translatierte Proteine in isolierte WT und Lon gKD Mitochondrien mittels [<sup>35</sup>S]-Methionin und Cystein radioaktiv markiert und durch SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie und Immunodetektion analysiert. Als Negativkontrollen wurde die Translation durch die Zugabe von Cycloheximid (CHX) oder Chloramphenicol (Chla) gehemmt.



**Abbildung 12: *In organello* Translation von mitochondrial codierten Proteinen**

**A** Analyse von der *in organello* Translation von mitochondrial codierten Proteinen mittels 15% Urea-SDS-PAGE, Western Blot und Autoradiographie und Immunodetektion. Isolierte Mitochondrien wurden für 45 Minuten mit [<sup>35</sup>S]-Methionin und Cystein inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die Translation mit 20 μg/μl Cycloheximid (CHX) oder 20 μM Chloramphenicol (Chla) gehemmt. **B** Veränderung der Proteinmenge verschiedener mitochondrialer Transkriptionsfaktoren in quantitativer MS Analyse von isolierten WT und Lon gKD Mitochondrien. Verhältnis Lon gKD zu WT Proteinmenge (log<sub>2</sub>).

Die Analyse der *in organello* Translation zeigte, dass sich die Synthese das mitochondrial kodierte Protein nur geringfügig ändert. Lediglich drei Proteine zeigen leichte Änderungen, die Synthese von ND4 (engl.: NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4) ist leicht erhöhte. In Gegensatz hierzu, verringerte sich die Synthese von ND4L (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4L) und ATP8 (ATP synthase protein 8) deutlich (Abb. 12A). Die Negativkontrolle, die mit Cycloheximid oder Chloramphenicol behandelt wurden, wies keine Neubildung mitochondrial kodierter Proteine auf (Abb. 12A).

Zusätzlich wurde die Veränderung der Proteinmenge verschiedener Translationsfaktoren nach Lon gKD mittels quantitativer MS detektiert. Die Translationsfaktoren EFG (mitochondrial elongation factor G), Tufm (mitochondrial elongation factor Tu), Tsfm (mitochondrial elongation factor Ts) und MTIF2 (mitochondrial translation initiator factor IF-2) zeigten alle eine geringe Zunahme der relative Proteinmenge nach Lon gKD (Abb. 12B).

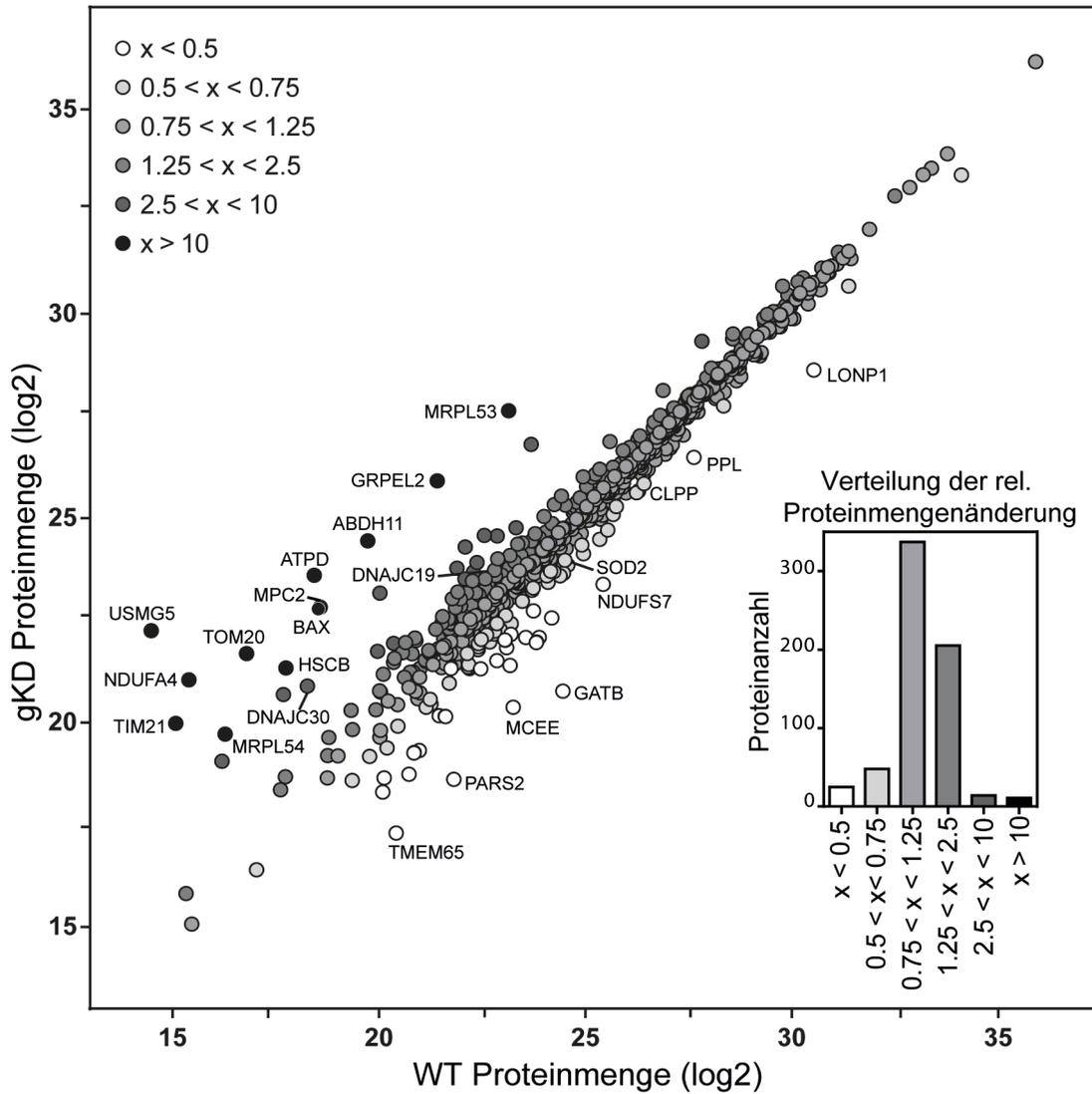
#### **5.1.4 Zusammenfassung der Charakterisierung der Lon gKD Zellen**

Die Analyse der mitochondrialen Funktionen und Morphologie der Lon gKD Zellen zeigten, dass der Verlust von Lon zu leichten Anpassungen führt. Lon scheint keinen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie zu haben, diese ist in Lon gKD Zellen weitestgehend intakt. Besonders überraschend war die Verringerung der Proteinmenge von CLPP, welche als weitere Matrix Protease den Verlust von Lon somit nicht kompensieren könnte. Die Lon gKD Zellen zeigten eine erhöhte Akkumulation von freien Sauerstoffradikalen nach der Behandlung mit Menadion. Lon gKD Zellen regieren gestresster und zeigen somit eine erhöhte Sensitivität für Superoxidradikale. Des Weiteren war die Proteinmenge von SOD2 verringert, welches für die erhöhte Akkumulation von freien Sauerstoffradikalen verantwortlich seien könnte. Auffällig war die Reduktion der ATP Konzentration, was auf einen Metabolismus hindeutet. Des Weiteren ist die Degradationsrate weniger stark verringert als die Reduktion der Lon-Proteinmenge vermuten lässt.

## 5.2 Lon-bedingte Änderung des mitochondrialen Proteoms

Um ein detailliertes Bild der, durch den partiellen Verlust von Lon entstandenen Änderungen, zu erhalten, wurde eine quantitative MS Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit  $^{13}\text{C}$  Kohlenstoffisotope (Lon gKD) oder  $^{12}\text{C}$  Kohlenstoff (WT) markierten Arginin kultiviert. Nach der Isolation der Mitochondrien wurde beide Mitochondrien Typen im Verhältnis 1:1 gemischt, das Proteomen wurde mittels quantitativer MS analysiert. Für die Berechnung der relative Proteinmengenänderung wurde der Quotient aus der Proteinmenge in Lon gKD und WT Mitochondrien gebildet.

Die MS Analyse zeigte, dass die hier verwendete Mitochondrien Isolation nicht ausschließlich Mitochondrien aufgereinigt hatte. In dieser Proteomenanalyse waren 20% der gefundenen Proteine mitochondrial, daher wurde nach der quantitativen MS alle nicht-mitochondrialen Proteine entfernt. Zusammengefasst ergibt sich eine Verteilung der Mengenänderungen: 25 mitochondriale Proteine waren in Lon gKD Mitochondrien stark reduziert (Abb. 13; weiß); 48 Proteine waren um weniger als das 0.75-fache verringert (Abb. 13, hellgrau); Proteine, die eine relative Mengenänderung von 0.75 bis 1.25 zeigten, wurden als unverändert bzw. natürliche Schwankung definiert (Abb. 13, grau). 205 Proteine zeigten eine leichte Zunahme, bis zum 2.5-fache (Abb. 13, dunkelgrau). Des Weiteren wurden 14 Proteine gefunden, die eine bis zu 10-fache Erhöhung zeigten (Abb. 13, anthrazit). Die Proteinmenge von 11 Proteinen war um mehr als das 10-fache erhöht (Abb. 13, schwarz). Besonders stark reduziert waren zwei Komponenten der tRNA Synthese, GATB (engl.: mitochondrial Glutamyl-tRNA aminotransferase subunit b), welche auf das 0.08-fache und PARS2 (engl.: mitochondrial Probable proline t-RNA ligase), welche auf das 0.1-fache reduziert wurde. Ähnlich stark wurde MCEE (engl.: mitochondrial Methylmalonyl-CoA epimerase) auf das 0.13-fache bzw. TMEM65 (Transmembrane protein 65) auf 0.12-fache reduziert. Des Weiteren war die Untereinheit des Komplexes 1 NDUFS7 (engl.: Cytochrome c oxidase subunit NDUFS7) auf das 0.24-fache verringert und Periplakin (PLL) auf das 0.45-fache reduziert.



**Abbildung 13: Proteomänderung nach Lon gKD in isolierten Mitochondrien**

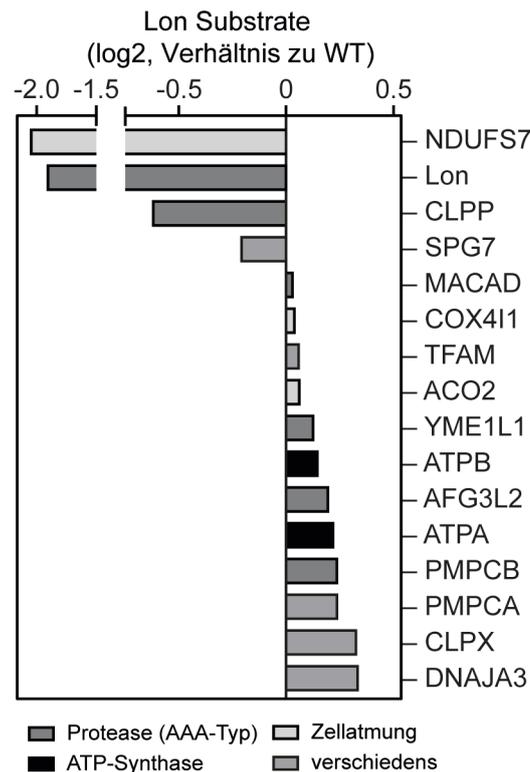
Änderung der Proteinmenge (log<sub>2</sub>) aller gefundenen mitochondrialen Proteine in quantitativer MS Analyse in isolierten WT und Lon gKD Mitochondrien, welche mit <sup>13</sup>C Kohlenstoffisotope (Lon gKD) oder <sup>12</sup>C Kohlenstoff (WT) markierten Arginin kultiviert wurden. Das Verhältnis der Proteinmengenänderung wurde in Relation zur WT Proteinmenge kalkuliert. 25 Proteine wurden um weniger als die Hälfte reduziert (weiß), 48 Proteine zeigen eine Verringerung zwischen 0.5 und 0.75 (hellgrau). 337 Proteine galten als unverändert und zeigten eine Proteinmengenänderung von 0.75<x<1.25 (grau). Eine leichter, größer als 1.25-fache Erhöhung zeigten 205 Proteine (dunkelgrau), 14 Proteine wurden bis zu 10-fachen Erhöht (anthrazit) und 11 Proteine wurden mehr als 10-fach erhöht (schwarz).

Zu den Proteinen, die die größte Zunahme zeigten gehörten MRPL54 (engl.: mitochondrial 39S ribosomal protein subunit L54), MPC (engl.: mitochondrial pyruvate carrier) und BAX (engl.: apoptosis regulator BAX), die auf das 20-fache erhöht waren. MRPL53 (engl.: mitochondrial 39S ribosomal protein subunit L53), Tom20, Tim21, ATPD (engl.: mitochondrial ATP synthase subunit delta) und NDUFA4 (engl.: Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4) waren auf über das 10-fache erhöht und die Proteinmenge von USMG5 (engl.: mitochondrial ATP synthase membrane subunit DAPIT) wurde auf mehr als das 30-fache erhöht (Abb. 13, schwarz, Table S1). Die zuvor gezeigte, auffällige Veränderung von SOD2 und CLPP konnten auch in der quantitativen MS bestätigt werden. SOD2 war um das 0.69-fache und CLPP auf das 0.67-fache verringert, dieses spiegelt in ebenfalls die detektierte Reduktion beider Proteine in der Proteinbestimmung.

### **5.2.1 Veränderung der relativen Proteinmenge von bekannten Lon Substraten und Interaktionspartnern**

Für die Analyse verschiedener Interaktionspartner und Substrate von Lon wurde der log<sub>2</sub> der relativen Proteinmengenänderung kalkuliert. Ist dieser negativ, ist die Proteinmenge in Lon gKD Zellen verringert, ist er positiv, ist die Proteinmenge erhöht.

Interessanterweise war die Proteinmenge der bekannten Lon Substrate Aconitase 2 (Bota, Van Remmen, and Davies 2002), Tfam(Li, Hou, and Hao 2017) und MACAD (Hansen, Gregersen, and Bross 2005) nach Lon gKD nicht verändert. Zwei der anderen mitochondrialen Proteasen YME1L1 und AFG3L2 waren nur sehr gering erhöht. CLPP und SPG7 sind überraschenderweise reduziert. Die Untereinheiten von MPP, PMPCA und PMPCB waren nur geringfügig erhöht. Besonders stark war NDUFS7 reduziert (Abb. 14). Interessanterweise bleibt die Mehrzahl der bekannten Lon Substrate unverändert.



**Abbildung 14: Veränderung der Proteinmenge von bekannten Lon Substrate und Interaktionspartnern**

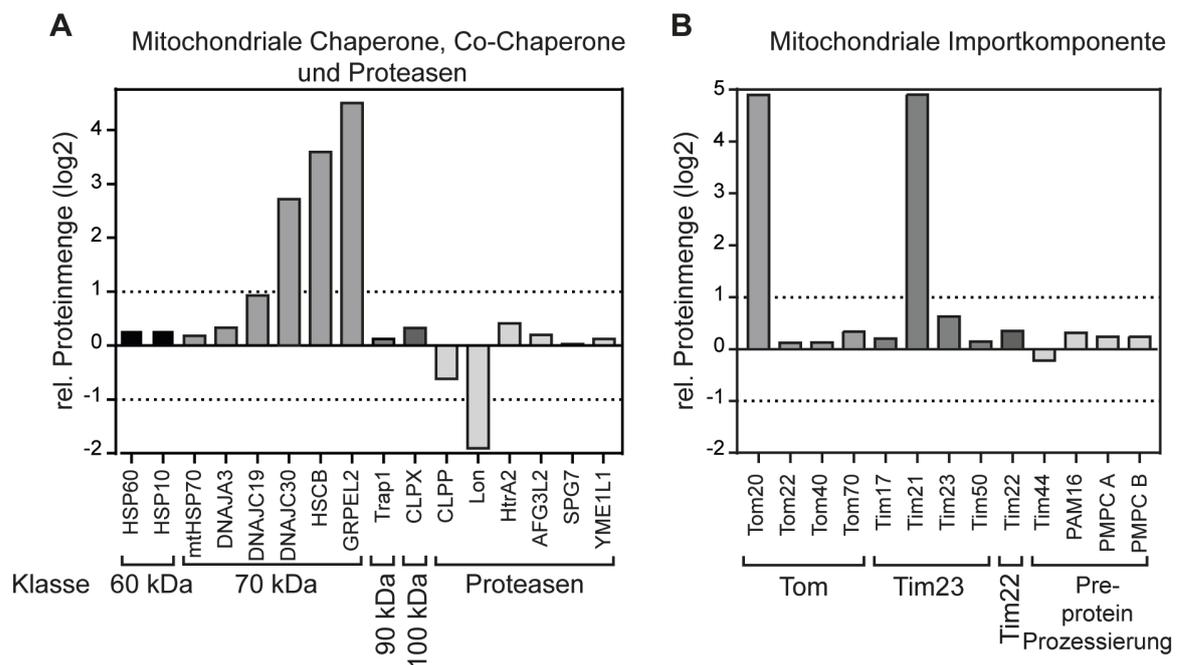
Proteinmengenänderung (log2) bekannter Lon Substrate (dunkelgrau) und Interaktionspartner der Untereinheiten der ATP-Synthase (schwarz), Zellatmung und TCA Zyklus (hellgrau), und anderen (grau).

### 5.2.2 Veränderung der relativen Proteinmenge von mitochondrialen Chaperonen und Proteinimportkomplexen

Zur Untersuchung des mtPQC-Systems wurde die relative Proteinmengenänderung von Chaperonen verschiedener Klassen, Proteasen (Abb. 15A) und Untereinheiten der Proteinimportkomplexe nach Lon gKD mittels quantitativer MS untersucht (Abb. 15B).

Besonders auffällig war die starke Zunahme verschiedener Klasse 70 kDa Ko-Chaperone, HSCB (engl.: iron-sulfur cluster co-chaperone protein HSCB), GRPEL2 (engl.: mitochondrial GrpE protein homolog 2), DNAJC19 (engl.: Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14 (Truscott et al. 2003) und DNAJC30 (engl.: DnaJ homolog subfamily C member 30, mitochondrial; Voos 2009). Diese Ko-Chaperone sind an verschiedenen mitochondrialen Prozessen beteiligt, HSBC ist an der Bildung von Eisen-Schwefel Clustern

beteiligt. DNAJC30 stabilisiert die ATPase der Atmungskette (engl.: CV, respiratory chain complex V) und ist somit indirekt an der Zellatmung beteiligt (Tebbenkamp et al. 2018). GRPEL2 und DNAJC19 sind essentielle Untereinheiten des Importmotor Komplexes (PAM, engl.: presequence translocase-associated motor). Beide sind an der Translokation von Peptiden über die innere Membran in die mitochondriale Matrix beteiligt (Voos 2013). Die untersuchten Proteasen zeigen, mit Ausnahme von CLPP und Lon, nur geringfügige Schwankungen.



**Abbildung 15: Änderung der Proteinmenge von Chaperonen, Co-Chaperonen, Proteasen und mitochondriale Importkomponenten**

**A** Proteinmengenänderung mitochondrialer Chaperone Klasse 60 kDa (schwarz) und 70 kDa (grau), Co-Chaperone (dunkelgrau) und Proteasen (hellgrau) im Verhältnis zur WT Proteinmenge in quantitativer MS Analyse. **B** Änderung der Proteinmenge von Mitochondriale Importkomplexe im Verhältnis zur WT Proteinmenge (log2). Gefunden wurden Untereinheiten von Tom (Translokase Komplex der äußeren Membran, grau), Tim23 und Tim22 (Translokase Komplex der inneren Membran, dunkelgrau) und Komponenten des Preprotein Prozessierung (hellgrau).

Aufgrund der Zunahme der relativen Proteinmenge der Untereinheiten des PAM Komplexes, besteht die Vermutung, dass ebenfalls auch die relative Proteinmenge der Untereinheiten von Tom, Tim23 oder Tim22 verändert waren. Die Analyse dieser Untereinheiten zeigte eine starke Zunahme von Tom20. Tom20

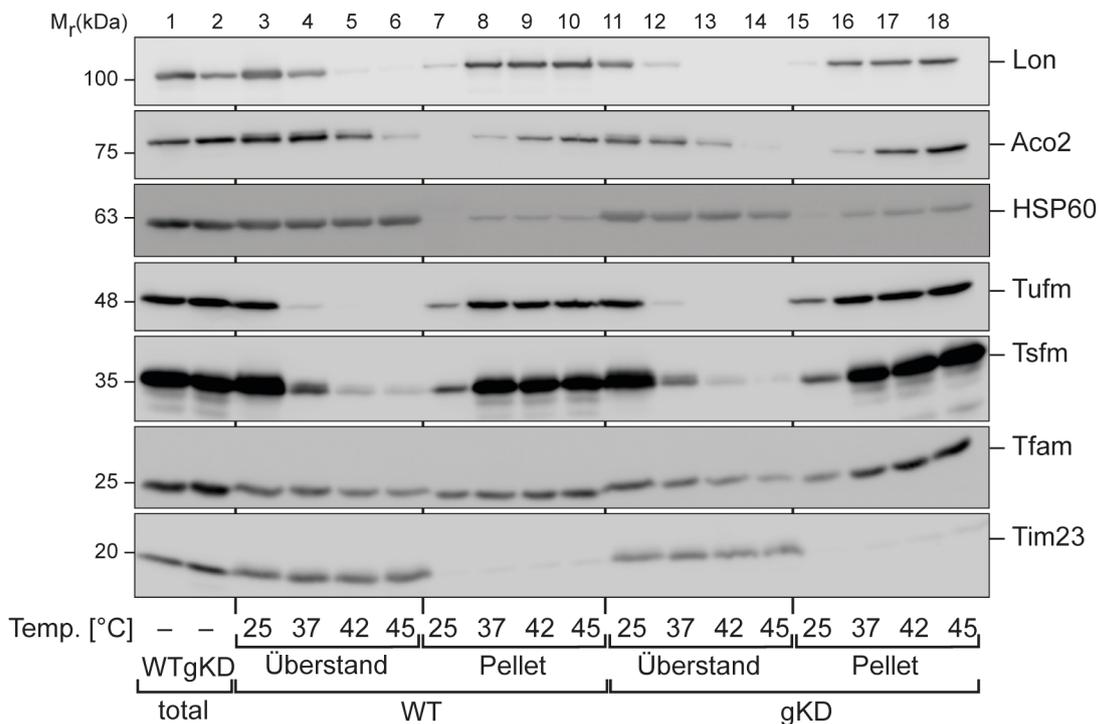
ist der Rezeptor für die Erkennung positiv geladener Präcursor Proteinen (Becker, Böttlinger, and Pfanner 2012), allerdings zeigte die mitochondriale Importrate keine Auffälligkeiten in Lon gKD Zellen. Des Weiteren nahm Tim21 deutlich zu. Es ist zwar nicht essentiell am Proteinimport beteiligt, allerdings ist Tim21 für den Aufbau der Atmungskette erforderlich (Mick et al. 2012).

## 5.3 Lon-abhängiges, Hitze-induziertes Aggregationsverhalten

### 5.3.1 Lon-abhängiges Aggregationsverhalten von Beispielproteinen

Um den Einfluss von Hitzestress auf das Aggregationsverhalten von mitochondrialen Proteinen zu analysieren, wurden isolierte WT und Lon gKD Mitochondrien zunächst für 20 Minuten bei milden bis starken Hitzeschock (37°C bis 45°C) oder Kontrollbedingungen (25°C) inkubiert. Früherer Untersuchungen zeigten, dass isolierte Mitochondrien bereits bei 37°C eine erhöhte Thermosensitivität aufwiesen (Wilkening et al. 2018), daher wurde hier 25°C als Kontroll- und 37°C als milde Hitzeschockbedingung angesehen. Nach der Hitzebehandlung, wurden die Mitochondrien zunächst mittels Detergens unter nativen Bedingungen lysiert und die löslichen (Überstand) von den unlöslichen und aggregierten Proteinen (Pellet) wurden mittels Zentrifugation. Die entstandenen Proteinfraktionen wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion visualisiert.

Die Matrixproteine Aco2 und HSP60 zeigten eine leichte Aggregationstendenz nach einer Behandlung mit 37°C, allerdings aggregierte Aco2 nach einem starken Hitzeschock bei 45°C fast vollständig, während HSP60 auch bei diesen Temperaturen noch teilweise in der Fraktion der löslichen Proteine verblieb. Lon und Tsfm hingegen zeigten bereits nach milden Hitzestress mit 37°C eine starke Aggregationstendenz. Beide waren nach einer Behandlung mit 42°C fast vollständig im Pellet detektierbar. Tfam war temperaturunabhängig in beiden Fraktionen zu finden. Das stark Hitze-sensitive Tufm begann bereits bei Kontrollbedingungen leicht zu aggregieren und war nach einem milden Hitzestress (37°C) fast vollständig im Pellet zu finden und diente hier als Kontrolle für Proteinaggregation. Als Kontrolle für lösliche Proteine, welche auch bei starken Hitzeschock nicht aggregieren, diente Tim23. Bei diesen Proteinen konnte kein Unterschied im Aggregationsverhalten von WT und Lon gKD Mitochondrien detektiert werden (Abb. 16). Für eine genauere Protein-spezifische Untersuchung des Lon-abhängigen Aggregationsverhalten wurde eine quantitative MS Analyse durchgeführt.

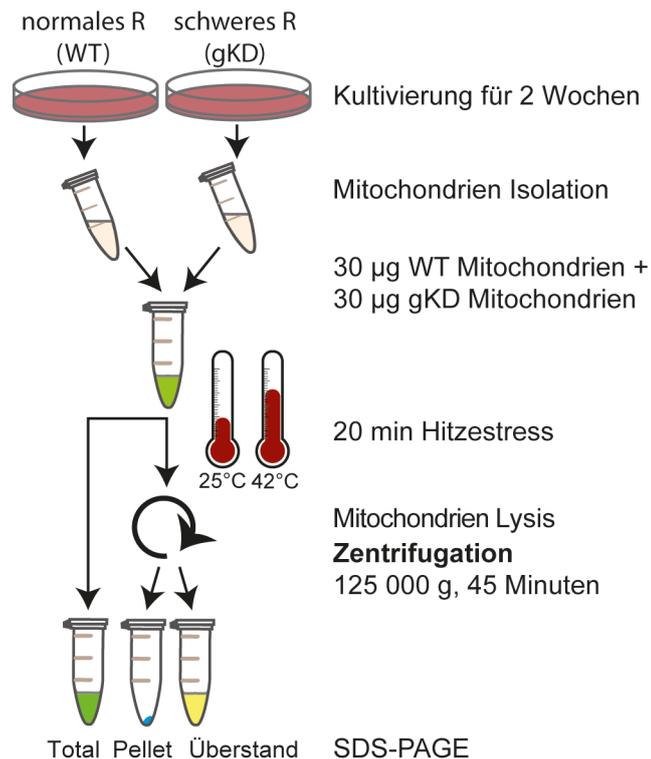


**Abbildung 16: Proteinaggregation in Mitochondrien nach Hitzestress**

Sedimentation der Proteinaggregate mittels Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation mit 125 000 g nach 20-minütigen Hitzestress mit Temperaturen von 25°C bis 45°C. Unlösliche Proteine wurde pelletiert, lösliche Proteine verblieben im Überstand. Nicht-zentrifugierte Proben (total) dienten als Maß für die Proteinmenge in ungestressten Proben. Analyse durch SDS-PAGE und Western Blot und Immunodetektion mit den angegebenen Antikörpern. Tufm wurden als Aggregationskontrolle und Tim23 also Kontrolle für lösliche Proteine verwendet.

### 5.3.2 Lon-abhängige, Hitze-induzierte Aggregationstendenz im mitochondrialen Proteomen

Für die Protein-spezifische Untersuchung der Lon-abhängigen und Hitze-induzierter Aggregationstendenz mitochondrialer Proteine wurden zunächst beide Zelllinien mit <sup>13</sup>C Kohlenstoffisotope (Lon gKD) oder <sup>12</sup>C Kohlenstoff (WT) markierten Arginin zwei Wochen bei Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Mitochondrien beider Zelllinien isoliert und im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach einem Hitzeschock bei 42°C und einer Kontrollbehandlung mit 25°C für 20 Minuten, wurden die Mitochondrien mittels Detergens unter nativen Bedingungen lysiert, anschließend wurden die aggregierte und unlöslichen Proteine (Abb. 17, blau) mittels Zentrifugation bei 125 000 g sedimentiert. Lösliche Proteine verblieben im Überstand (Abb. 17, gelb).



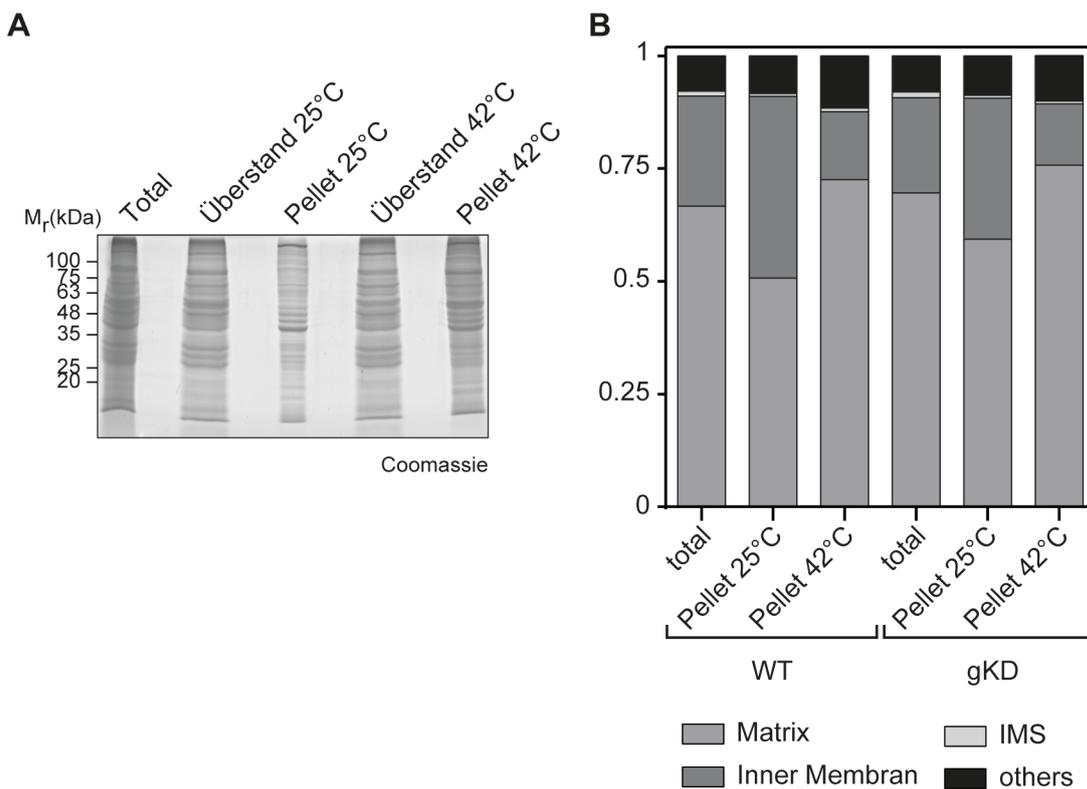
**Abbildung 17: Arbeitsablauf für quantitative Massenspektrometrie**

Schematischer Arbeitsablauf für die Untersuchung von Proteinaggregationen nach Hitzestress: Zellen wurden für zwei Wochen in SILAC Medium <sup>13</sup>C Kohlenstoffisotope (Lon gKD) oder <sup>12</sup>C Kohlenstoff (WT) markierten Arginin (R) kultiviert. Anschließend wurden die Mitochondrien beider Zelllinien isoliert und jeweils 1:1 Lon gKD und WT gemischt. Nach einem 20-minütigen Hitzestress mit 42°C und einer Kontrolle bei 25°C wurden die aggregierten Proteine durch einen Zentrifugationsschritt bei 125 000 g sedimentiert (blau) lösliche Proteine verblieben im Überstand (gelb). Nicht-zentrifugierte Proben (total, grün) dienten der Analyse der gesamten mitochondrialen Proteinmengenänderung. Die Proben wurden über ein SDS-PAGE aufgetrennt und mittels quantitative MS analysiert.

Alle Proben wurden auf mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Färbelösung angefärbt. Das angefärbte Gel zeigte deutlich, das bereits bei Kontrollbedingungen von 25°C, Proteine in der Pellet Fraktion zu finden waren. Die Menge der Proteine in der Pellet Fraktion nahm nach dem Hitzestress deutlich zu, die Menge der löslichen Proteine im Überstand nach Hitzestress mit 42°C nahm dementsprechend ab (Abb. 18A).

Nach der quantitativen MS Analyse, wurden in den Pellet Fraktionen ~3200 Proteine detektiert, 20% wurden dem mitochondrialen Proteomen zugeordnet. Alle nicht-mitochondrialen Proteine wurden ausgeschlossen, da im Versuchsablauf, die Mitochondrien isoliert wurden und nicht-mitochondriale

Proteine auf Verunreinigungen zurückzuführen sind. Anschließend wurden die mitochondrialen Proteine nach ihrer sub-mitochondrialen Lokalisation sortiert. Bei Kontrollbedingungen wurden 51% Matrixproteine detektiert. Nach dem Hitzestress mit 42°C stieg die relative Proteinmenge der Matrixproteine auf 79%. Nach Kontrollbedingungen waren in Lon gKD Mitochondrien 59% der detektierten Proteinen Matrixproteine. Nach der Hitzebehandlung mit 42°C stieg die Menge der Matrixproteine auf 76%. In WT und Lon gKD sank die Menge der Proteine der inneren Membran nach Hitzestress. Die prozentuale Verteilung der anderen Lokalisationen, veränderte sich nach Hitzestress kaum. Die generelle Tendenz der Verteilung der Lokalisationen mit und ohne Hitzestress zeigte keinen Unterschied in WT und Lon gKD Mitochondrien (Abb. 18B). Dieses zeigte, dass in beiden Zelllinien verstärkt Matrixproteine nach Hitzestress aggregierten.



**Abbildung 18: Coomassie Färbung und Lokalisation der detektierten Proteine**

**A** Coomassie Färbung des Polyacrylamid Gels vor quantitativer MS. Auftrennung der Proben nach löslichen Proteinen in Überstand und aggregierten Proteinen im Pellet nach einem Zentrifugationsschritt bei 125 000 g. **B** Verhältnis der unlöslichen Proteinen, in Abhängigkeit zu ihrer mitochondrialen Lokalisation in Matrix (grau), inneren Membran (dunkelgrau), Intermembranraum (IMS; engl.: Innermembrane space IMS; hellgrau) und andere (engl.: others; schwarz).

Zur Identifizierung von Proteinen, die eine veränderte Lon-abhängige und Hitze-induzierte Aggregationstendenz aufweisen, wurde zunächst die Zunahme der Proteinmenge nach Hitzeschock in WT bzw. Lon gKD Mitochondrien berechnet. Hierfür wurde der Quotient aus Proteinmenge in Pellet Fraktion nach 42°C Hitzestress und Pellet Fraktion nach Kontrollbedingungen kalkuliert und in einem Punktdiagramm dargestellt (Abb. 19A). Proteine, die sich eher nach rechts, entlang der X-Achse orientierten, aggregierten verstärkt in WT Mitochondrien. Orientierten sie sich eher nach oben, entlang der Y-Achse orientieren, zeigten eine Zunahme in der Aggregationstendenz in Lon gKD Mitochondrien. Jedes Protein, welches in WT und Lon gKD Mitochondrien ein ähnlichen Aggregationsverhalten zeigte, war im Bereich der Regressionsgerade zu finden (Abb. 19A, schwarze Line, blau). Lon, als Beispiel, zeigte eine starke Aggregation nach 42°C Hitzestress und keine Unterschiede im Aggregationsverhalten in WT als auch in Lon gKD Mitochondrien und lag daher auf der Regressionsgerade (Abb. 19A, gelb). Um Schwankungen auszuschließen, wurden Proteine mit geringen Unterschieden im Aggregationsverhalten bei der Untersuchung ebenfalls nicht berücksichtigt (Abb. 19A, grauer Balken). Für eine genauere Analyse der Aggregationstendenz wurde der Aggregationsfaktor (AF) berechnet, hier fließen sowohl die Aggregation (AGG) als auch die Proteinmengenänderung (PM) nach Lon gKD ein. Durch den Aggregationsfaktor wurde versucht falsch-positive Treffer zu reduzieren, da die Möglichkeit besteht, dass Proteine, die eine sehr starke Zunahme nach Lon gKD zeigten, ebenfalls auch verstärkt in der Aggregationsanalyse detektiert wurden. Für die Berechnung des Aggregationsfaktor wurde zunächst der Quotient aus der Zunahme der Proteinmenge in der Pellet Fraktion nach 42°C im Verhältnis von Lon gKD zum WT berechnet.

$$AGG = \log_2\left(\frac{\text{Proteinmenge Lon gKD} (P_{42}/P_{25})}{\text{Proteinmenge WT} (P_{42}/P_{25})}\right)$$

Anschließend konnte der Aggregationsfaktor (AF) aus Aggregation und Proteinmengenänderung nach Lon gKD (5.2) berechnet werden, wobei die *Proteinmengenänderung* (PM) =  $\frac{\text{Proteinmenge Lon gKD}}{\text{Proteinmenge WT}}$  entspricht,

$$AF = \frac{\text{Aggregation}}{PM}.$$

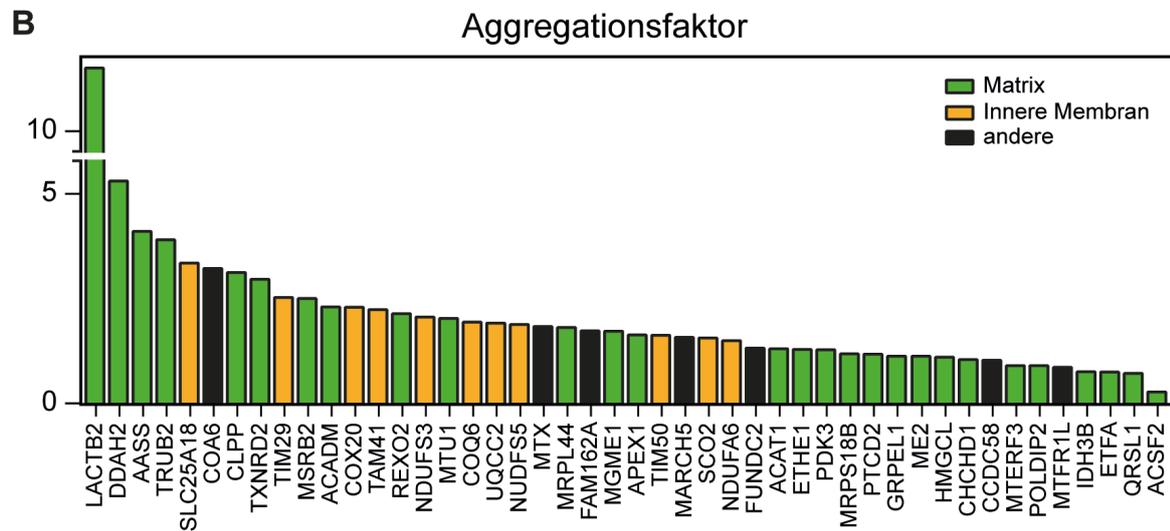
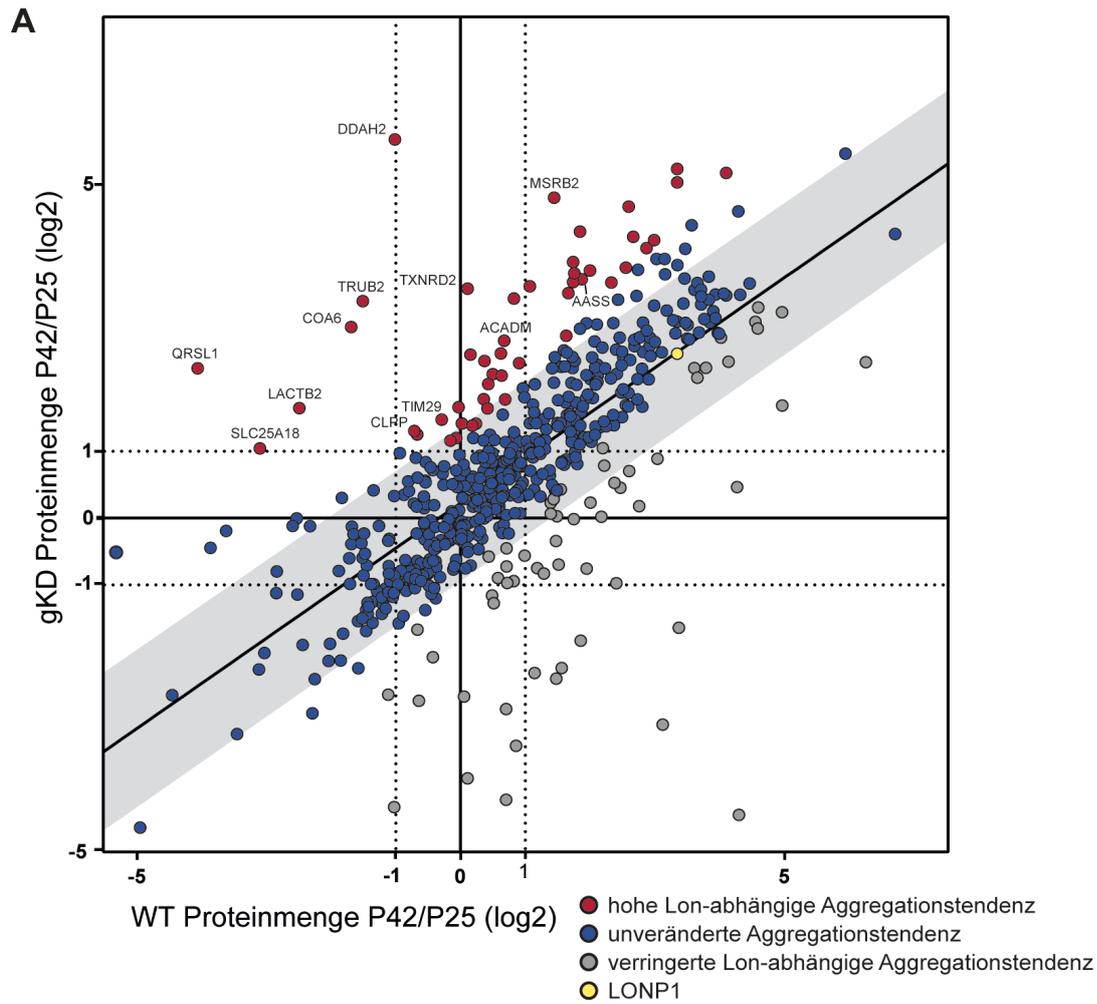
Proteine, die eine geringere Aggregationstendenz in Lon gKD im Vergleich zu WT Mitochondrien aufwiesen, waren unter anderen die Untereinheiten der Tim/Tom Komplexe oder der Atmungskette (Abb. 19A, grau). Proteine, die ein doppelt so starke Aggregationstendenz in Lon gKD zeigten, galten als potentielle Kandidaten der Lon-abhängigen Aggregation (Abb. 19A, rot). Von den 46 Proteinen, die einen erhöhten Aggregationsfaktor aufwiesen, waren 27 Proteine in der mitochondrialen Matrix (mM) lokalisiert, 11 in der inneren Membran (im) und 8 im Intermembranraum oder der äußeren Membran (o, engl.: others). Die 6 Proteine, mit der höchsten Zunahme der Proteinmenge in der Pellet Fraktion in Lon gKD, waren im linken oberen Quadranten zu finden (Abb. 19A) und zeigten keine Aggregation in WT Mitochondrien nach 42°C Hitzestress. Diese Proteine zeigten zudem einen sehr hohen Aggregationsfaktor (Abb. 19B; Tabelle 1). Den höchsten Aggregationsfaktor zeigte die Endonuklease LACTB2, trotz einer Reduktion auf das 0.34-fache in ungestressten Lon gKD Mitochondrien, zeigte LACTB2 eine sehr hohe Aggregationstendenz nach Hitzestress und keine Aggregation in WT Mitochondrien. Die mitochondrialen Matrixproteine AASS (engl.: mitochondrial  $\alpha$ -aminoacidic semialdehyde synthase), MACAD (engl.: Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial) und CLPP zeigten ebenfalls eine erhöhte Aggregationstendenz und einer verringerte Proteinmenge in Lon gKD Mitochondrien. Sie sind, neben LACTB2, mögliche Lon Substrate. Auch Tim29 (engl.: mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim29) zeigte, wie auch LACTB2, eine erhöhte Aggregationstendenz, trotz Verringerung der Proteinmenge im Lon gKD. Tim29 ist, obwohl es in der inneren Membran lokalisiert ist, trotzdem ein mögliches Lon Substrat, da Tim29 eine Matrix-Domäne besitzt (Callegari et al. 2016). Im Gegensatz zu diesen Proteinen, zeigten TRUB2 (engl.: mRNA pseudo uridine synthase 2) und TXNRD2 (engl.: thioredoxin reductase 2) keine Veränderung der Proteinmenge nach Lon gKD, allerdings zeigten beide Proteine eine erhöhte Aggregationstendenz im Vergleich zum Aggregationsverhalten in WT Mitochondrien. Der Glutamat-Kanal SLC25A18 (engl.: mitochondrial glutamate carrier 2) zeigte eine doppelte Aggregationsrate in Lon gKD Mitochondrien, während sich die Proteinmenge nach Lon gKD nur geringfügig verändert. Eine deutliche höhere Zunahme der relativen Proteinmenge (1.27-fache) in Lon gKD Mitochondrien zeigte DDAH2 (engl.: dimethylarginine

dimethylaminohydrolase 2), dieses Protein wies zusätzliche eine der höchsten Aggregationsrate auf, während DDAH2 im WT keine Aggregation zeigte. Eine ähnliche Tendenz zeigte ebenfalls MSRB2 (engl.: mitochondrial methionine-R-sulfoxide reductase B2), MSRB2 wies ebenfalls eine erhöhte relative Proteinmenge in Lon gKD, zusätzlich zu einer hohen Aggregationstendenz, auf. Im Gegensatz hierzu, zeigte QRSL1 (engl.: mitochondrial glutamyl-tRNA aminotransferase subunit A, mitochondrial) eine hohe Zunahme der Aggregationstendenz und war ebenfalls auf mehr als das ~8-fache der Proteinmenge in Lon gKD Mitochondrien erhöht. Durch diese starke Zunahme, hatte QRSL1 einen eher geringeren Aggregationsfaktor.

Eins der Proteine mit hohem Aggregationsfaktor war COA6 (engl.: Cytochrome c oxidase assembly factor 6 homologue), welches im Intermembranraum lokalisiert ist (Baertling et al. 2015). Aufgrund der räumlichen Trennung wäre es nicht möglich, dass COA6 von Lon abgebaut wird, somit kann COA6 als potentiell Substrat ausgeschlossen werden.

### **Abbildung 19: Lon-abhängige, Hitze-induzierte Aggregation in isolierten Mitochondrien**

**A** Proteomen Analyse der Lon-abhängigen Proteinaggregation nach Hitzestress mit 42°C mittels SDS-PAGE und quantitativer MS. Zu Bestimmung der Proteinmengenänderung der unlöslichen Proteine nach einem Hitzestress mit 42°C, wurde der Quotient der Pellet Fraktion nach 42°C (P42) und 25°C (P25) Hitzebehandlung ermittelt. Proteinaggregation in WT Mitochondrien wird auf der X-Achse dargestellt, Aggregation in Lon gKD auf der Y-Achse. Proteine, die verstärkt nach Hitzestress in WT Mitochondrien aggregieren verschieben sich  $x > 1$  Richtung. Aggregierte Proteine, die verstärkt in Lon gKD Mitochondrien verschieben sich entlang der Y-Achse in  $y > 1$  Richtung. 48 Proteine zeigten eine hohe Lon-abhängige Aggregation nach Hitzebehandlung (rot) und 59 Proteine zeigten ein verringerte Lon-abhängige Aggregationsverhalten (grau). Die verbleibenden Proteine (blau), wie z.B. Lon (gelb) zeigen ein unverändertes Aggregationsverhalten und liegen im näheren Bereich (grau) der Regressionsgerade (schwarze Linie). **B** Zum Ausschluss, der Schwankungen in der Proteinmenge nach Lon gKD, wurde der Aggregationsfaktor (AF) berechnet. Er wurde aus dem Quotienten aus Lon-abhängiger Aggregation und Proteinmengenänderung (PM) nach Lon gKD kalkuliert.



(Beschriftung auf S.77)

Die meisten Proteine mit einer hohen Aggregationstendenz, waren ebenfalls in unbehandelten Lon gKD erhöht. Lediglich vier Proteine zeigten eine hohe Aggregationstendenz und eine verringerte Proteinmenge in Lon gKD Mitochondrien (LACTB2, CLPP, Tim29, AASS).

**Tabelle 1: Lon-abhängiger Aggregationsfaktor**

Aggregationsfaktor (AF) wurde kalkuliert aus dem Quotienten der Lon-abhängige Aggregation nach Hitzestress mit 42°C und dem Proteinmengenänderung nach Lon gKD. Angegeben sind Name, Uniprot-ID, die mitochondriale Lokalisation (Lok.), die Proteingröße, der Aggregationsfaktor, die Proteinmengenänderung (PM) nach Lon gKD und das Aggregationsverhalten (AGG).

Name	Uniprot ID	Beschreibung	Lok.	Größe [kDa]	PM (log2)	AGG	AF
LACTB2	Q53H82	Endoribonuclease LACTB2	mM	32.8	-1.475	4.137	<b>11.497</b>
DDAH2	O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	mM	29.6	0.347	6.681	<b>5.252</b>
AASS	Q9UDR5	Alpha-amino adipic semialdehyde synthase, mitochondrial	mM	102	-1.258	1.703	<b>4.074</b>
TRUB2	O95900	Mitochondrial mRNA pseudouridine synthase TRUB2	o	36.7	0.296	4.754	<b>3.871</b>
SLC25A18	Q9H1K4	Mitochondrial glutamate carrier 2	mM	33.8	0.320	4.141	<b>3.317</b>
COA6	Q5JTJ3	Cytochrome c oxidase assembly factor 6 homolog	ims	14.1	0.507	4.547	<b>3.2</b>
CLPP	Q16740	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial	mM	30.2	-0.618	2.016	<b>3.096</b>
TXNRD2	Q9NNW7	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	o	56.5	0.178	3.326	<b>2.939</b>
TIM29	Q9BSF4	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim29	ims	29.2	-0.505	1.767	<b>2.507</b>
MSRB2	Q9Y3D2	Methionine-R-sulfoxide reductase B2, mitochondrial	mM	19.5	0.428	3.351	<b>2.490</b>
MACAD	P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	mM	46.6	-0.208	1.980	<b>2.288</b>
COX20	Q5RI15	Cytochrome c oxidase assembly protein COX20, mitochondrial	im	13.3	-0.610	1.497	<b>2.284</b>
TAM41	Q96BW9	Phosphatidate cytidylyltransferase, mitochondrial	im	51	-0.107	2.066	<b>2.225</b>
REXO2	Q9Y3B8	Oligoribonuclease, mitochondrial	im	26.8	0.105	2.294	<b>2.133</b>
NDUFS3	O75489	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	o	30.2	0.262	2.461	<b>2.053</b>
MTU1	O75648	Mitochondrial tRNA-specific 2-thiouridylase 1	mM	47.7	-0.780	1.175	<b>2.018</b>
COQ6	Q9Y2Z9	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondrial	mM	50.8	-0.193	1.688	<b>1.930</b>
UQCC2	Q9BRT2	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2	mM	14.9	0.331	2.399	<b>1.907</b>
NDUFS5	O43920	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	im	12.5	-0.258	1.574	<b>1.882</b>

ERGEBNISSE

MTX2	O75431	Metaxin-2	mM	29.7	0.420	2.446	<b>1.828</b>
MRPL44	Q9H9J2	39S ribosomal protein L44, mitochondrial	im	37.5	0.026	1.842	<b>1.809</b>
FAM162A	Q96A26	Protein FAM162A	mM	17.3	-0.399	1.315	<b>1.734</b>
MGME1	Q9BQP7	Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1	mM	39.4	-0.033	1.682	<b>1.721</b>
APEX1	P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	mM	35.5	-0.367	1.266	<b>1.633</b>
TIM50	Q3ZCQ8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	o	39.6	0.146	1.793	<b>1.620</b>
MARCH5	Q9NX47	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH5	mM	31.2	0.412	2.097	<b>1.576</b>
SCO2	O43819	Protein SCO2 homolog, mitochondrial	im	29.8	0.272	1.883	<b>1.560</b>
NDUA6	P56556	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	mM	15.1	0.147	1.658	<b>1.498</b>
FUNDC2	Q9BWH2	FUN14 domain-containing protein 2	mM	20.7	0.363	1.703	<b>1.324</b>
ACAT1	P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	mM	45.2	0.232	1.543	<b>1.314</b>
ETHE1	O95571	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	im	27.9	0.140	1.420	<b>1.288</b>
PDK3	Q15120	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl- transferring)] kinase isozyme 3, mitochondrial	mM	46.9	0.573	1.908	<b>1.283</b>
MRPS18B	Q9Y676	28S ribosomal protein S18b, mitochondrial	im	29.4	0.236	1.398	<b>1.187</b>
PTCD2	Q8WV60	Pentatricopeptide repeat-containing protein 2, mitochondrial	im	43.9	-0.102	1.096	<b>1.177</b>
GRPEL1	Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	o	24.3	0.589	1.706	<b>1.134</b>
ME2	P23368	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	mM	65.4	0.097	1.204	<b>1.126</b>
HMGCL	P35914	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	im	34.3	0.142	1.226	<b>1.111</b>
CHCHD1	Q96BP2	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 1	mM	13.5	0.198	1.199	<b>1.045</b>
CCDC58	Q4VC31	Coiled-coil domain-containing protein 58	mM	16.6	0.448	1.416	<b>1.038</b>
MTERF3	Q96E29	Transcription termination factor 3, mitochondrial	mM	47.9	1.127	1.983	<b>0.908</b>
POLDIP2	Q9Y2S7	Polymerase delta-interacting protein 2	mM	42	0.370	1.170	<b>0.905</b>
MTFR1L	Q9H019	Mitochondrial fission regulator 1-like	im	31.9	0.295	1.065	<b>0.868</b>
IDH3B	O43837	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial	o	42.2	0.492	1.089	<b>0.775</b>
ETFA	P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	mM	35.1	0.631	1.174	<b>0.758</b>
QRSL1	Q9H0R6	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A, mitochondrial	mM	57.4	3.113	6.302	<b>0.728</b>
ACSF2	Q96CM8	Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial	mM	68.1	2.027	1.195	<b>0.293</b>

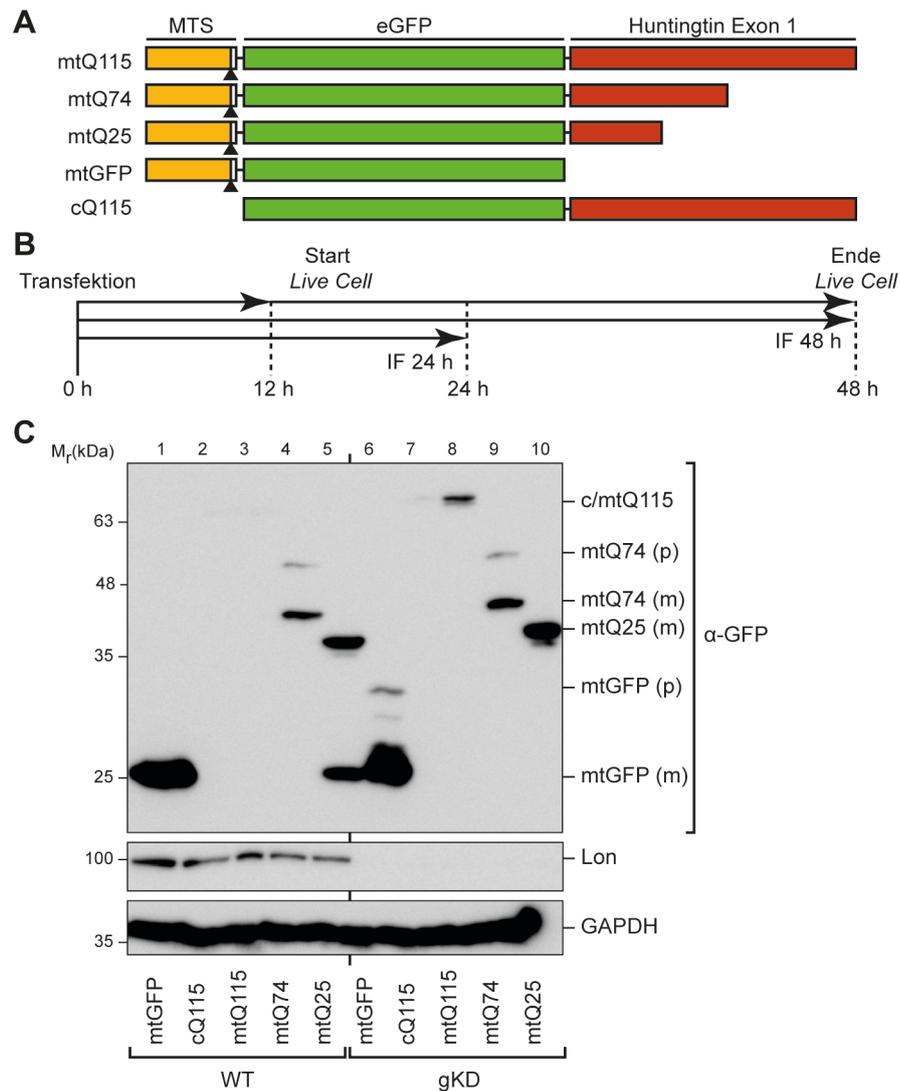
## 5.4 Mitochondriale Aggregatbildung als Schutz der Mitochondrien mittels PolyQ Reporterproteinen

### 5.4.1 Mitochondriale Aggregatbildung mittel PolyQ-Reporterproteins

Für die morphologische Untersuchung der Proteostase in Mitochondrien wurden Reporterproteine genutzt, welche das humane Exon 1 des Huntingtin (Htt) Proteins beinhaltet. Chorea Huntington ist eine genetische Trinukleotid-Repeat-Erkrankung, bei dem das Codon von Glutamine, CAG, mehr als 36-mal wiederholt wird (Clabough 2013). Diese genetische Verlängerung führt nach der Expression zu einer Aneinanderreihung von vielen Glutaminen (Polyglutamin, PolyQ), welches wiederum zu der Ausbildung toxischer Aggregate führt (Martindale et al. 1998). Bei dem hier verwendeten Reporterproteine, handelt es sich um ein Fusionsprotein, bestehend aus mitochondriale Zielsequenz (MTS, engl.: mitochondrial targeting sequenz, Abb. 20A, orange), eGFP der Viktoriaqualle *Aequorea victoria* (engl.: enhanced green fluorescence protein, Abb. 20A, grün) als Detektionsmöglichkeit und dem Htt Exon 1 (Abb. 20A, rot). Die hier verwendeten Konstrukte besitzen verschiedene Wiederholungsanzahlen des Glutamine-Codons im Htt Exon1, als nicht-aggregierende Kontrolle wurde das Htt Exon 1, mit einer Glutamine-Wiederholung von 25 Aminosäuren verwendet (Q25). Als Aggregationsreporter wurden zwei Konstrukte mit jeweils Q74 und Q115 Wiederholungen verwendet (Clabough 2013). Um den Import der Konstrukte in die Mitochondrien zu gewährleisten, wurde die MTS der ATPase Untereinheit 9 (Su9) aus dem Organismus *Neurospora crassa* verwendet. Als Importkontrolle wurde ein Konstrukt, bestehend aus MTS und eGFP verwendet (mtGFP) und als Aggregationskontrolle im Zytosol wurde ein Fusionsprotein aus eGFP und Q115 verwendet (cQ115, engl.: cytosolic Q115). Die Expression aller Konstrukte standen unter der Regulation des Überexpressions-Promotors des humanen Cytomegalovirus (CMV Promotor).

Um die zeitliche Entwicklung der Aggregate zu untersuchen, wurden WT und Lon gKD Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert. Anschließend wurden die Zellen entweder für 24 oder 48 Stunden kultiviert, fixiert und mittels Immunzytochemie detektiert, oder die Aggregatbildung mittels *Live Cell*-Mikroskopie über 48 Stunden verfolgt (Abb. 20B).

Die Analyse der angegebenen Konstrukte nach 48-stündiger Expression mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion zeigte, dass die Konstrukte in Abhängigkeit ihrer Länge unterschiedlich gut zu detektieren waren (Abb. 20C). Die Importkontrolle mtGFP zeigte eine ähnliche Intensität der prozessierten Form bei ~27 kDa in WT und Lon gKD Zellen. Allerdings war eine leichte Akkumulation der mtGFP Prä-Form bei ~35 kDa in Lon gKD Zellen zu sehen, was auf einen nicht vollständigen oder verlangsamten mitochondrialen Import hinweist. Sowohl in WT als auch in Lon gKD Zellen war cQ115 nur sehr schlecht detektierbar, was auf die erwartete Aggregation dieses PolyQ-Konstrukts hinweisen könnte. Für cQ115 wurde eine theoretische Größe von ~52 kDa berechnet, das Konstrukt befand sich allerdings auf der Höhe von ~70 kDa. In den WT Zellen war mtQ115 ebenfalls nur sehr schlecht detektierbar. Im Vergleich hierzu war mtQ115 in Lon gKD Zellen eindeutig bei etwa ~70 kDa zu erkennen, auch hier lag die kalkulierte Größe bei ~52 kDa. Die zweite Aggregationskontrolle, mtQ74, war in beiden Zelllinien deutlich als Prä- und prozessierte Form bei ~49 kDa bzw. ~41 kDa zu detektieren. MtQ74 wurde bei beiden Zelllinien nicht vollständig importiert, allerdings war die Prä-Bande sehr schwach. MtQ25, besitzt zu wenige Glutamin-Wiederholungen um zu aggregieren (Clabough 2013), allerdings zeigten sich in WT Zellen, nach 48-stündiger Expression, zwei Banden. Die obere Bande zeigte die kalkulierte Größe des Konstrukts von ~35 kDa. Die untere Bande zeigte die molekulare Masse des GFPs ~27 kDa, was darauf hindeutet, dass nach Import des mtQ25 Konstrukts, das Htt, des Fusionsproteins abgebaut wurde. GFP, aufgrund seiner Struktur (Ormö et al. 1996), scheint eher Protease-resistent zu sein, akkumulierte in den WT Mitochondrien und blieb detektierbar. In Lon gKD war kein partieller Abbau von mtQ25 detektierbar, lediglich die Bande des gesamten Konstrukts bei ~35 kDa war zu sehen. Zusammengefasst war anhand der Veränderung der relativen Molekülmasse erkennbar, dass die meisten Konstrukte mit MTS weitestgehend komplett in die Mitochondrien importiert wurden. Diese war allerdings nicht bei der Analyse des mtQ115 zu detektieren, dieses könnte auf die schlechtere Auflösung des SDS-Gels in höheren Proteingrößen zurückzuführen sein.



**Abbildung 20: Konstrukt- und Experimentaufbau zur Analyse der mitochondrialen Aggregatbildung**

**A** Schematische Darstellung der verschiedenen PolyQ-Konstrukte: zur mitochondrialen Lokalisation besitzen sie eine MTS der ATPase Untereinheit 9 (Su9). Als Detektor diente eGFP (engl.: enhanced green fluorescence protein, grün) und als Aggregationsreporter Huntingtin Exon 1 mit verschiedenen Polyglutamin Wiederholungen (mtQ115, mtQ74, rot). Als Negativkontrolle wurde mtQ25 verwendet, welches nicht aggregiert. Für die Kontrolle des Imports wurde mtGFP verwendet. Als zytosolische Kontrolle wurde cQ115, ohne MTS, verwendet. **B** Zeitablauf für *Live Cell* und Immunzytochemie mit Fluoreszenz Markierung (IF) Experimente: als Startpunkt dient die Transfektion, 12 Stunden nach Transfektion beginnt die *Live Cell* Detektion. Nach 24 oder 48 Stunden werden die Zellen für die IF fixiert und mittels Immunzytochemie analysiert. **C** Die Analyse der 48-stündigen Expression mittels UREA-SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion mit den angegebenen Antikörpern. Die Konstrukte wurden nicht vollständig importiert und zeigen sowohl die nicht-importierte Prä-Form (p) als auch die importierte, prozessierte Form (engl.: mature-form, m). GAPDH dient als Ladekontrolle.

#### **5.4.2 Ausbildung der Vimentin-Hülle um zytosolische und nicht um mitochondriale Aggregate**

Als Nachweis für den erfolgreichen Import und um zytosolische Aggregate von mitochondrialen zu unterscheiden, wurde eine Immunzytochemie gegen Vimentin durchgeführt. Vimentin bildet eine Hülle um zytosolische, allerdings nicht um mitochondriale Aggregate (García-Mata et al. 1999; L. Fu et al. 2005). Nachdem die Zellen mit cQ115- oder mtQ115-Konstrukt transfiziert und nach 48-stündiger Expression fixiert wurden, wurde eine Immunzytochemie gegen Vimentin und SDHA durchgeführt. Für die Analyse des Reporterproteins war keine Immunzytochemie notwendig, da die Expression des eGFP zur Detektion ausreichte.

Die Analyse der Fluoreszenzmikroskopie nach Transfektion mit cQ115 in WT als auch in Lon gKD Zellen zeigte, dass sich ein großes zytosolische Aggregat in der Mitte der Zelle gebildet hatte. Dieses Aggregat ist mit einer Vimentin-Hülle umgeben, die einen Kreis um das GFP-Signal bildete (Abb. 21A, weißer Pfeil). Bei beiden Zelltypen war keine Kolo-kalisation mit dem mitochondrialen SDHA zu erkennen. Die Lokalisation der zytosolischen Aggregate, sowie die Vimentin-Hülle weisen darauf hin, dass es sich ein Aggresom gebildet hatte. Durch die Transfektion mit mtQ115 zeigten sich mehrere Aggregate, die allerdings deutlich kleiner wirkten, als die zytosolischen Aggregate. Zudem wirken sie nicht rund, sondern eher oval bzw. Bohnen-förmig. Diese Aggregate waren allerdings klar mit dem mitochondrialen Protein SDHA ko-lokalisiert, was auf mitochondriale Aggregate und somit einen erfolgreichen Import der Konstrukte in die Mitochondrien hinweist (Abb. 21A, weißer Kreis). Die Bildung einer Vimentin-Hülle konnte hier wiederum nicht detektiert werden.

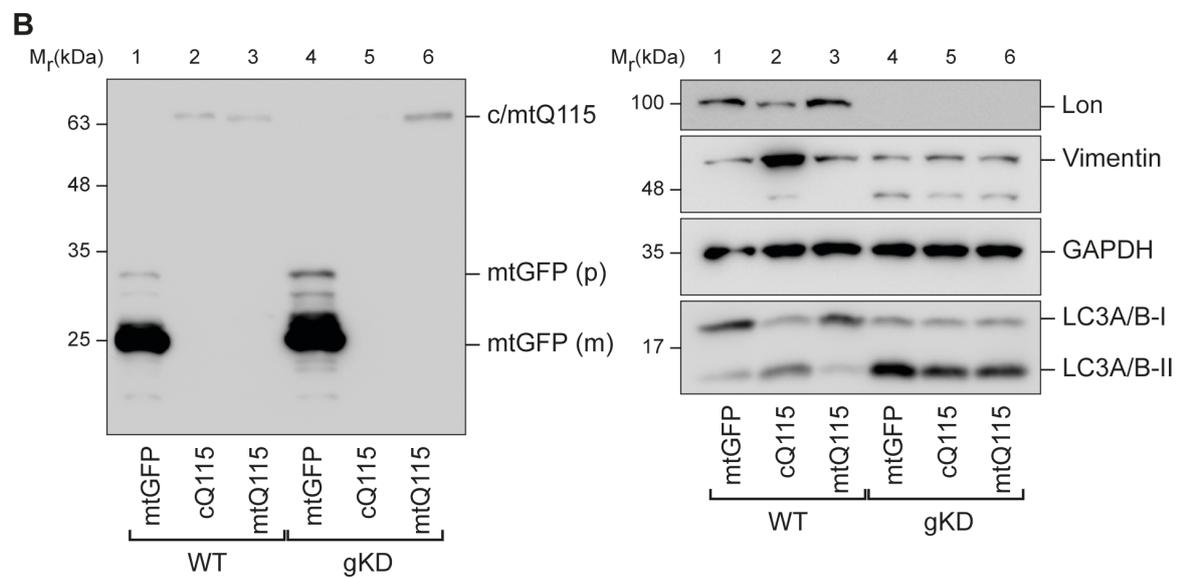
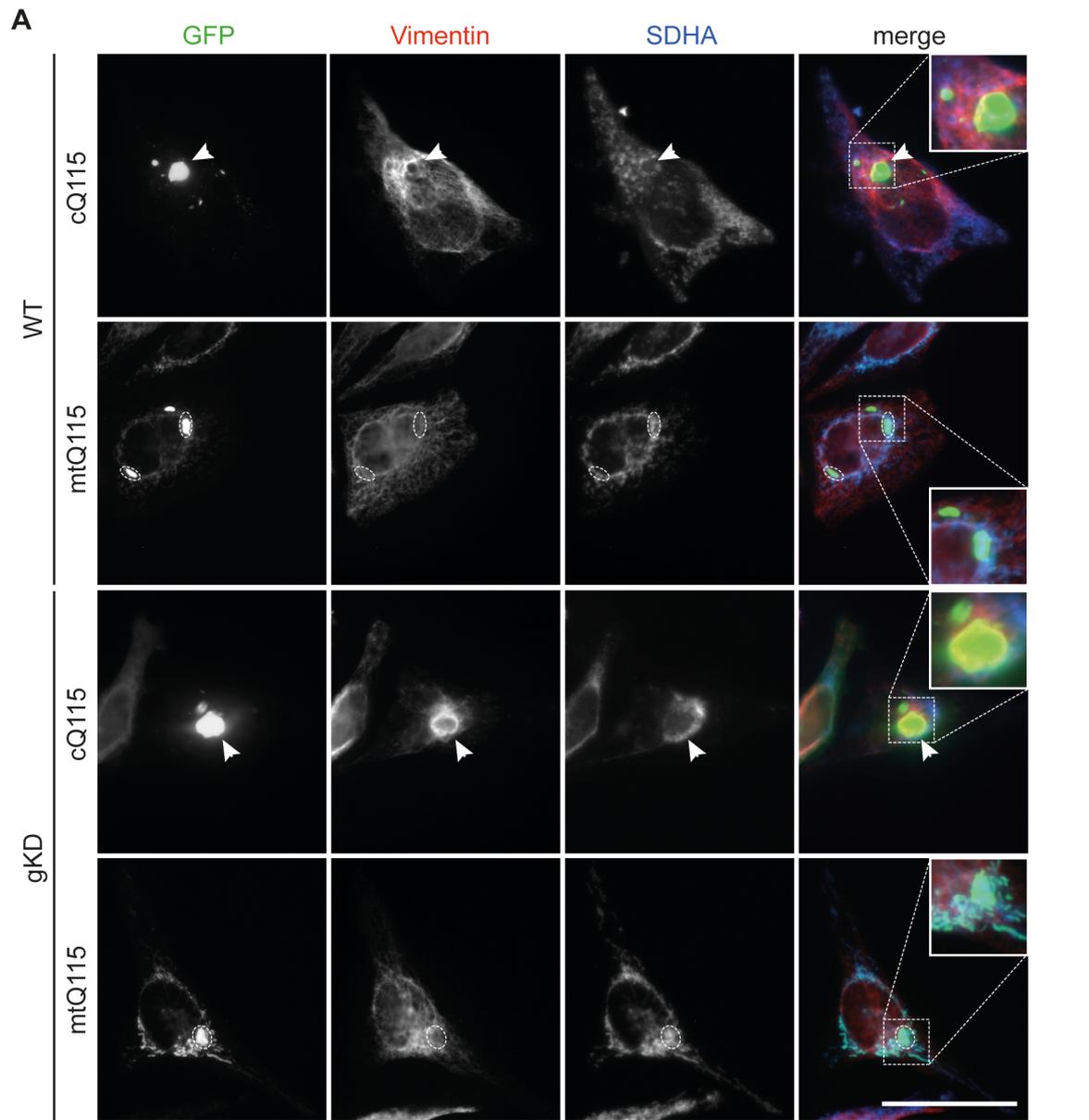
Für die Detektion der Änderung der Vimentin Proteinmenge, wurden WT und Lon gKD Zelllysate nach Transfektion mit mtGFP, cQ115 und mtQ115 und 48-stündiger Inkubation, mittels UREA-SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion analysiert. Zunächst war ein eindeutiges mtGFP-Signal detektierbar, Lon gKD Zellen zeigten eine stärkere mtGFP Expression und eine höhere Akkumulation der Prä-Form, was auf einen unvollständigen Import hinweist. Das GFP-Signal der beiden anderen Reporter Konstrukte mt/cQ115 war erneut nur schwer detektierbar. Im WT Lysat, nach der Transfektion mit cQ115,

war die Proteinmenge von Vimentin deutlich erhöht, im Vergleich zu den Zellen, die mit mtGFP oder mtQ115 transfiziert wurden. Die Vimentin-Konzentration war unverändert, wenn Lon gKD Zellen mit mtGFP, mtQ115 oder cQ115 transfiziert wurden. Besonders auffällig war die Veränderung des LC3 Signals. Bei einem erhöhtem LC3 A/B Typ II Signal, liegt LC3 in prozessierter Form vor und ist ein Zeichen für eine erhöhte Autophagie (Zou et al. 2014). Nach der Transfektion mit cQ115 zeigten WT Zellen eine deutliche Zunahme des LC3 Typ II Signals, was auf den Abbau des entstandenen Aggregats durch Autophagie hinweist. Im Vergleich zu der WT LC3 Typ II Proteinmenge, zeigten die Lon gKD Zellen, unabhängig ihrer Transfektion, eine erhöhte Autophagie (Abb. 21B), was wiederum auf gestresste Zellen hinweisen könnte.

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass die Konstrukte mit MTS importiert werden, da sich um diese Aggregate keine Vimentin-Hülle bildeten. Des Weiteren ist auffällig, dass WT cQ115 und alle Zellen des Lon gKD einen erhöhte Autophagie-Marker zeigten.

### **Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vimentin-Hüllenbildung**

**A** Detektion der Vimentin-Hülle um zytosolische Aggregate mittels Immunzytochemie gegen Vimentin (rot) nach der Transfektion mit cQ115 und mtQ115 und 48-stündiger Expression (grün). Um die Kollokalisierung mit dem mitochondrialen Netzwerk zu detektieren, wurden zusätzlich SDHA (blau) detektiert. Skala: 100 µm. **B** Für die Analyse der Vimentin Proteinmenge mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion, wurden WT und Lon gKD Zellen mit mtGFP, cQ115 oder mtQ115 transfiziert und nach 48 Stunden lysiert. Zellen, die mit mtGFP transfiziert wurden, zeigten sowohl die nicht-importierte Prä-Form (p) als auch die importierte, prozessierte Form (engl.: mature-form, m). Als Kontrolle des Lon gKD diente der Antikörper gegen Lon. LC3 dient als Autophagiekontrolle. GAPDH diente als Ladekontrolle.

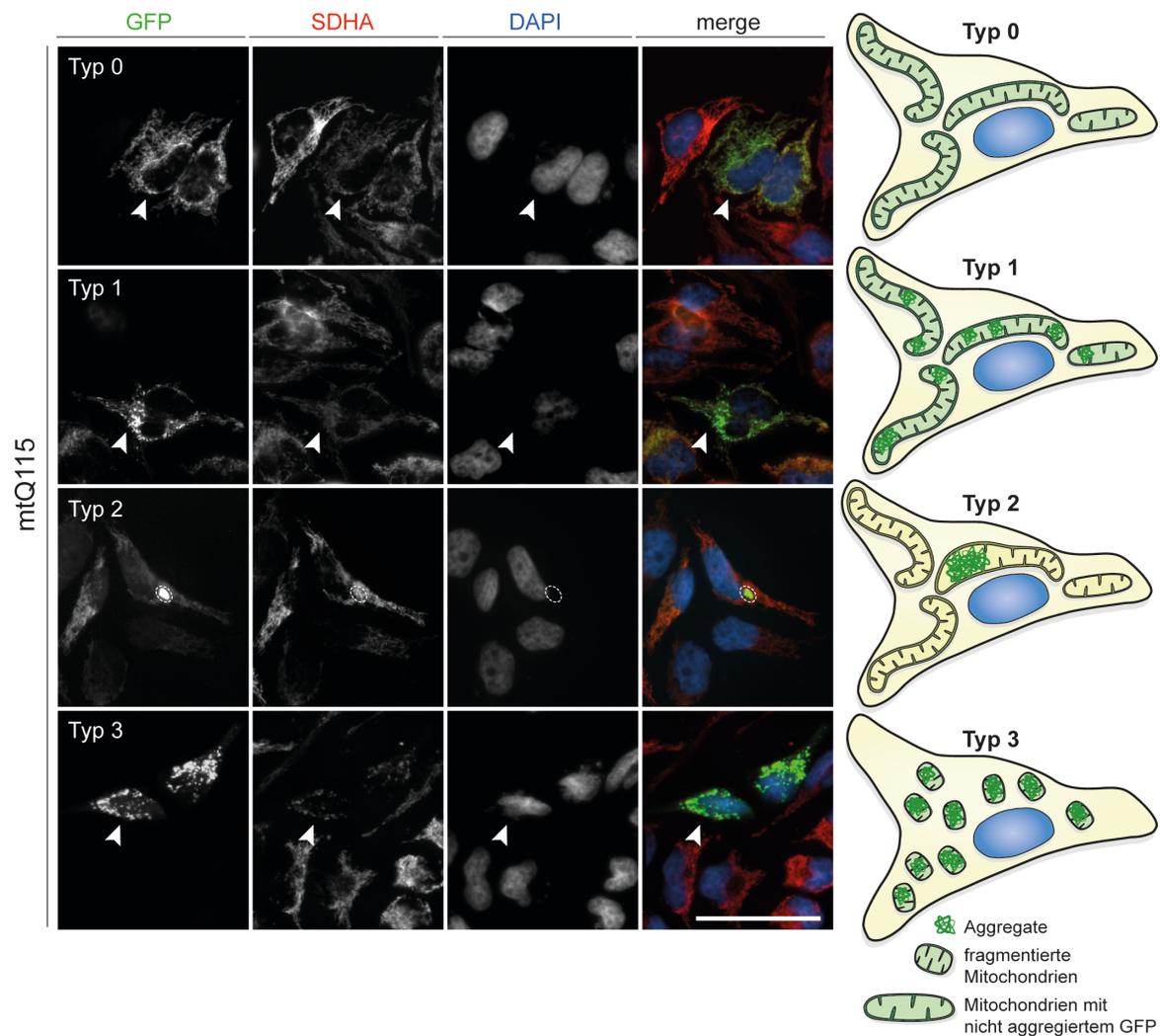


(Beschriftung siehe S.85)

### **5.4.3 Zellen zeigen unterschiedliche Typen der Aggregatbildung**

#### **5.4.3.1 Charakterisierung mitochondrialer Aggregatbildung**

Für die morphologische Untersuchung der mitochondrialen Aggregatbildung wurden zunächst die Zellen mit dem mtQ115-Konstrukt transzient, nach 48 Stunden Expression fixiert und mittels Immunzytochemie detektiert. Nach der Transfektion mit mtQ115 wurden verschiedene Morphologie der Aggregate im mitochondrialen Netzwerk gefunden und in drei verschiedenen Aggregattypen klassifiziert. Zellen, die sehr viele kleine mitochondriale Aggregate, verteilt über ein tubuläres mitochondriales Netzwerk zeigten, wurden dem Typ 1 zugeordnet. Bei Aggregattyp 2 zeigten die Zellen ein oder zwei sehr große, ovale Aggregate, während das GFP-Signal im restlichen mitochondrialen Netzwerk verringert war. Diese Aggregate zeigten ebenfalls eine Kolo-kalisation mit dem mitochondrialen Protein SDHA (Abb. 22, Typ 2 Kreis). Auch bei diesem Aggregattyp zeigten die Mitochondrien keine stressbedingte Fragmentierung, sondern lagen in einer tubulären Netz-ähnlichen Struktur vor. Zellen, die viele und sehr helle Aggregate zeigten, die über das gesamte mitochondriale Netzwerk verteilt waren, wurden dem dritten Typ zugeordnet. Zudem war das mitochondriale Netzwerk stark fragmentiert, welches auf mitochondrialen Stress hinweist. Zellen, die lediglich ein GFP-Signal zeigten, welches mit SDHA ko-lokalisiert war, wurden dem Typ 0 zugeordnet (Abb. 22). Durch die Klassifizierung der verschiedenen mitochondrialen Aggregattypen, wurde im Folgenden die detektierten Aggregate den Typen zugeordnet.



**Abbildung 22: Charakterisierung der mitochondrialen Aggregatbildung**

Charakterisierung der mitochondrialen Aggregate nach Transfektion mit mtQ115 nach 48-stündiger Expression mittels Immunzytochemie. Das Fusionsprotein mtQ115 ist durch eGFP (grün) detektierbar und zeigt bei allen Typen eine Kolokalisation mit dem mitochondrialen SDHA (rot). Die Mitochondrien weisen vier verschiedenen Aggregationstypen auf. Typ 0: Das mitochondriale Netzwerk zeigt ein grünes Signal allerdings keine Aggregate. Typ 1: Mitochondrien bilden kleine punktförmige Aggregate, das mitochondriale Netzwerk ist nicht fragmentiert. Typ 2: Mitochondrien bilden mehrere große, bohnenförmige Aggregate, das mitochondriale Netzwerk ist ebenfalls nicht fragmentiert. Typ 3: Mitochondriales Netzwerk zeigt eine starke Fragmentierung und viele Aggregate. Durch Pfeile wurden die beschriebenen Zellen markiert. Der Kern aller Zellen wurde mittels DAPI (blau) angefärbt. Skala: 100 µm.

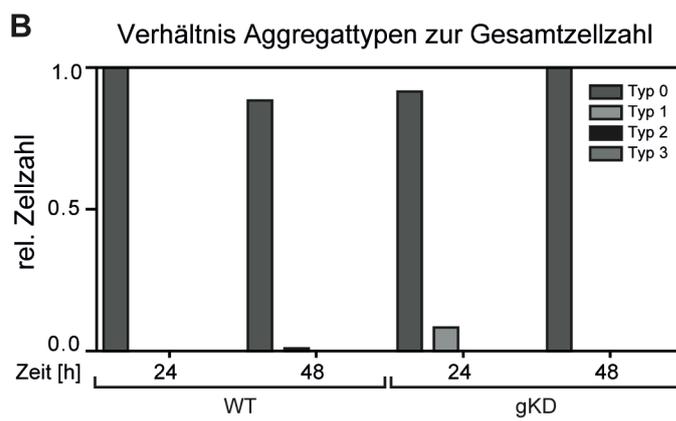
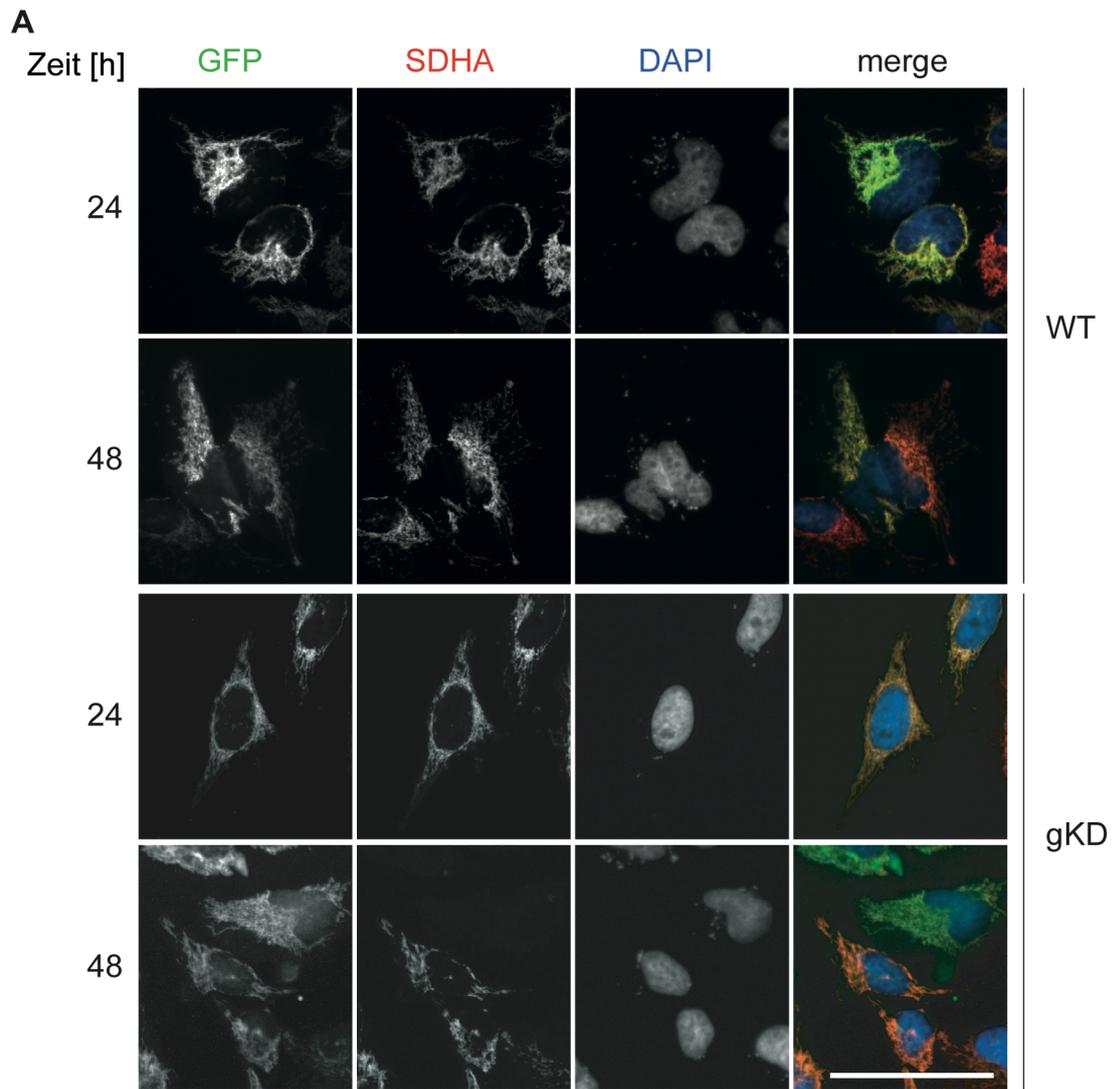
### 5.4.3.2 Aggregatbildung nach Transfektion mit PolyQ-Konstrukten

Für die Analyse der Aggregatbildung wurden WT und Lon gKD Zellen nach Transfektion mit mtQ25, mtQ74 oder mtQ115 und einer Kultivierung von 24 oder 48 Stunden fixiert und eine Immunzytochemie gegen das mitochondriale SDHA durchgeführt. Für die Detektion der Konstrukte, war, aufgrund des eGFPs keine Antikörperfärbung notwendig. Für die Verteilung der Aggregattypen, wurden die Zellen der verschiedenen Typen zugeordnet und die relative Zellzahl im Verhältnis zur Gesamtzellzahl kalkuliert. Zur Quantifizierung wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität ermittelt. Hierfür wurden die Intensität der Pixel einer Zelle mithilfe der Software FIJI detektiert und anschließend gemittelt.

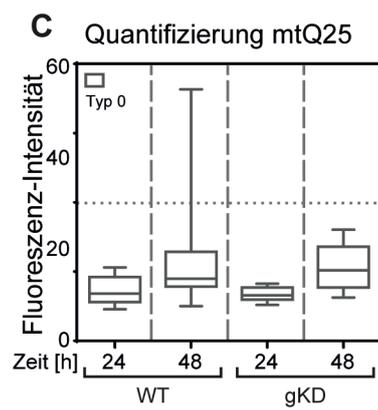
Zunächst wurden die Kontrolle mtQ25 analysiert, dieses Konstrukt diente als nicht-aggregierende Kontrolle. Die Kolo-kalisation des Reporterproteins und dem mitochondrialen SDHA war sowohl in WT als auch in Lon gKD Zellen nach 24 und 48 Stunden detektierbar. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte zudem, dass das GFP-Signal gleichmäßig über das mitochondriale Netzwerk verteilt war, was auf die Löslichkeit des Reporterproteins hinweist (Abb. 23A). Die Mehrzahl der Zellen zeigte den Aggregationstyp 0, die Zellen weisen keine Aggregate in den Mitochondrien auf, lediglich ~8% der Lon gKD Mitochondrien nach 24-stündiger mtQ25 Expression waren leicht gestresst und fragmentiert (Abb. 23B). Die mittlere Fluoreszenz-Intensität ist bei allen Bedingungen und beiden Zelllinien annähernd identisch und relativ gering (Abb. 23C).

#### Abbildung 23: Aggregatbildung nach der Transfektion mit mtQ25

**A** Untersuchung der Aggregatbildung nach Transfektion mit mtQ25 (grün) nach 24- oder 48-stündiger Expression in WT und Lon gKD Zellen mittels Immunzytochemie gegen SDHA (rot). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Skala: 100 µm. Verhältnis der Zellen (**B**) und durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (**C**) der verschiedenen Aggregattypen. Typ 1 (hellgrau): Mitochondrien bildeten kleine punktförmige Aggregate, das mitochondriale Netzwerk war nicht fragmentiert. Typ 2 (schwarz): Mitochondrien bildeten mehrere große, bohnenförmige Aggregate, das mitochondriale Netzwerk war ebenfalls nicht fragmentiert. Typ 3 (grau): Mitochondriales Netzwerk zeigte eine starke Fragmentierung und viele Aggregate. Zellen die keine Aggregate zeigten wurden Typ 0 (dunkelgrau) zugeordnet.

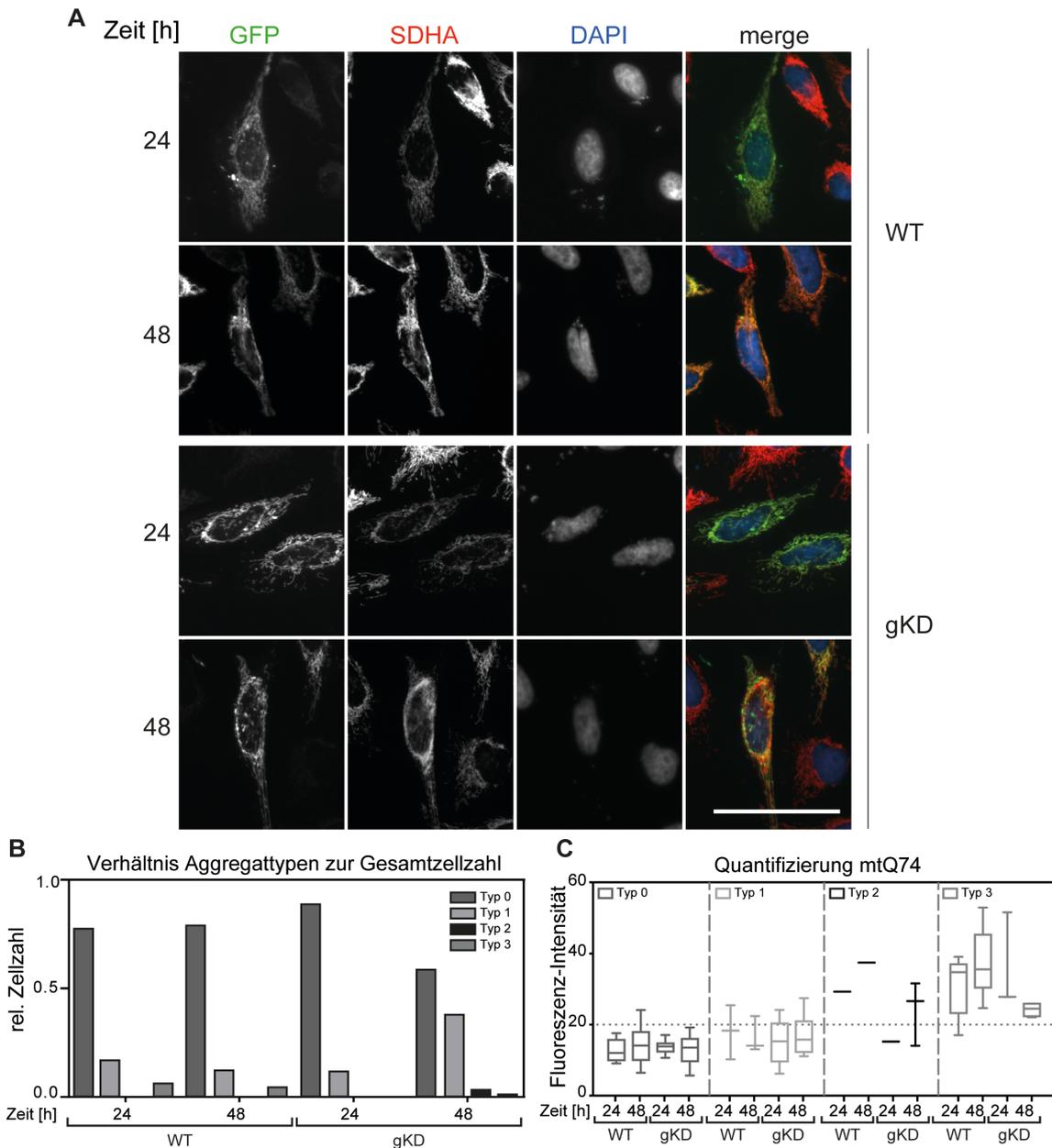


(Beschriftung siehe S. 89)



Für die Untersuchung von mitochondrialen Aggregaten wurden WT und Lon gKD Zellen mit dem mtQ74-Konstrukt transfiziert. Diese zeigten, im Vergleich zu Zellen, die mtQ25 exprimieren, eine unregelmäßige Verteilung des GFP-Signals innerhalb des mitochondrialen Netzwerks. Dieses Signal ist zudem mit dem mitochondrialen SDHA ko-lokalisiert. Die ungleichmäßige Verteilung des GFP-Signals und die Kolo-kalisation mit SDHA zeigt, dass das Reporterprotein mtQ74 Aggregate innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes bildete. Die restlichen Reporterproteine scheinen gleichmäßig über das Netzwerk verteilt zu sein (Abb. 24A). In WT Zellen konnten sowohl nach 24 als auch 48 Stunden viele kleine Aggregate (Typ 1) detektiert werden, 16% bzw. 12% der WT Zellen zeigten diesen Aggregationstypen. In 6% bzw. 4% der WT Zellen wurde ein fragmentiertes mitochondriales Netzwerk und viele größere Aggregate detektiert. Zu beiden Zeitpunkten wurden nur jeweils eine WT Zelle gefunden, die dem Aggregattyp 2 zeigten. Die Verteilung der Aggregatstypen in Lon gKD 24 Stunden nach der Transfektion mit mtQ74 entsprach, in etwa, der Verteilung der Aggregatstypen bei WT Zellen. Nach 48 Stunden zeigten Lon gKD Zellen allerdings eine deutliche Veränderung in der Verteilung der Aggregatstypen. Die Lon gKD Zellen zeigten mit ~38% deutlich mehr Zellen mit Aggregattyp 1. Größere Aggregate oder ein fragmentiertes mitochondriales Netzwerk waren hier seltener zu finden (Abb. 24B).

Die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität der Typ 0 und 1 war unabhängig der Zelllinie und der Expressionszeit der Konstrukte weitestgehend unverändert. Auffällig war, dass WT Zellen mit Typ 2 Aggregaten, eine höhere Fluoreszenz-Intensität aufwiesen, als Zellen mit Typ 1 Aggregaten. Nur die Lon gKD Zellen zeigten, nach 24 Stunden Expression, eine vergleichbare Intensität. Allerdings wurde nur eine Zelle mit diesem Aggregationstyp gefunden, daher war dieses nicht repräsentativ. Alle Zellen mit dem Aggregationstyp 3 zeigen eine erhöhte Fluoreszenz-Intensität, unabhängig von der Expressionszeit und der Zelllinie (Abb. 24C). Zusammenfassend zeigten Lon gKD verstärkt viele kleine Aggregate nach längerer Expression der Konstrukte. Und generell zeigten alle Zellen mit dem Aggregationstyp 3 eine deutlich erhöhte Fluoreszenz-Intensität.

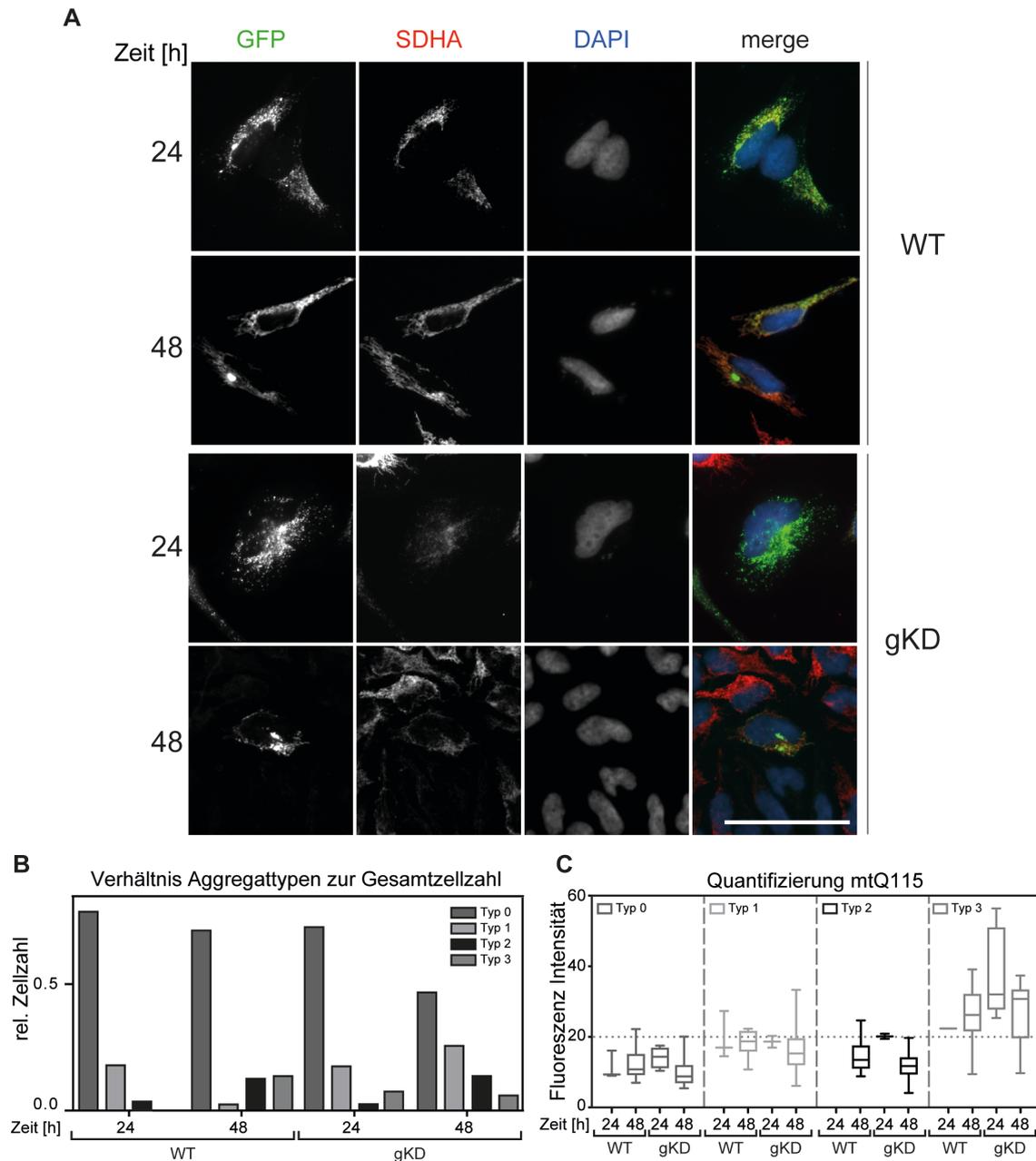


**Abbildung 24: Aggregatbildung nach der Transfektion mit mtQ74**

**A** Untersuchung der Aggregatbildung nach Transfektion mit mtQ74 (grün) nach 24- oder 48-stündiger Expression in WT und Lon gKD Zellen mittels Immunzytochemie gegen SDHA (rot). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Skala: 100  $\mu$ m. Verhältnis der Zellen (**B**) und durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (**C**) der verschiedenen Aggregattypen. Typ 1 (hellgrau): Mitochondrien bildeten kleine punktförmige Aggregate, das mitochondriale Netzwerk war nicht fragmentiert. Typ 2 (schwarz): Mitochondrien bildeten mehrere große, bohnenförmige Aggregate, das mitochondriale Netzwerk war ebenfalls nicht fragmentiert. Typ 3 (grau): Mitochondriales Netzwerk zeigte eine starke Fragmentierung und viele Aggregate. Zellen die keine Aggregate zeigten wurden Typ 0 (dunkelgrau) zugeordnet.

Die Transfektion mit mtQ115 zeigte, dass dieses Konstrukt nur punktuelle große grüne Strukturen innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes bildete. Diese Strukturen waren immer mit SDHA ko-lokalisiert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden zeigten sowohl WT als auch Lon gKD Zellen sehr viele kleine Aggregate (Typ 1). Nach 48 Stunden zeigten WT und Lon gKD Zellen die Ablagerung der Aggregate an mehreren Orten des mitochondrialen Netzwerkes, wobei WT nur ein und Lon gKD vier Aggregate aufwies (Typ 2). Die Transfektion mit mtQ115 zeigte eine Zeitabhängigkeit der Aggregatsbildung. Nach 24-stündiger Expression zeigten 18% der WT oder Lon gKD Zellen viele kleine Aggregate ohne Fragmentierung der Mitochondrien. 48 Stunden nach Transfektion mit mtQ115 zeigten WT Zellen deutlich mehr Typ 2 Aggregate, bei diesem Typ bilden die Mitochondrien ein oder mehrere große Aggregate ohne Fragmentierung der Mitochondrien. WT Zellen zeigten zudem einen ähnlichen Anteil an Aggregattyp 3. In Lon gKD waren, nach 48-stündiger Expression, alle Aggregationstypen verstärkt vorhanden. Typ 1 war zu 26%, Typ 2 zu 14% und Typ 3 zu 6% detektierbar (Abb. 25A/B). Die Veränderung der Fluoreszenz-Intensität entsprach in etwa der, nach der Transfektion mit mtQ74. Aggregate in Zellen des Typs 0,1 und 2 zeigten eine ähnliche Fluoreszenz-Intensität. Nur Zellen mit dem Aggregationstyp 3 zeigten eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität, wobei in WT mit 24-stündiger Expression nur eine Zelle gefunden wurde (Abb. 25C).

Der Unterschied der Verteilung der Aggregattypen nach verschiedenen Inkubationszeiträumen weist auf eine Zeitabhängigkeit der Aggregatbildung und Aggregatablagerung hin. Transfizierte Zellen scheinen zunächst viele kleine Aggregate innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes zu bilden. Innerhalb der nächsten 24 Stunden lagerten sich die Aggregate in mehrere großen zusammen, während das Reporterprotein aus dem restlichen mitochondrialen Netzwerk verschwindet. Diese deutet auf eine Akkumulation bzw. Ablagerung des Reporterproteins an mehreren Punkten im mitochondrialen Netzwerk hin. Ist die Menge des Reporterproteins zu hoch, ist also die Fluoreszenz-Intensität erhöht, fragmentieren die Mitochondrien und es bilden sich sehr viele große Aggregate.



**Abbildung 25: Aggregatbildung nach der Transfektion mit mtQ115**

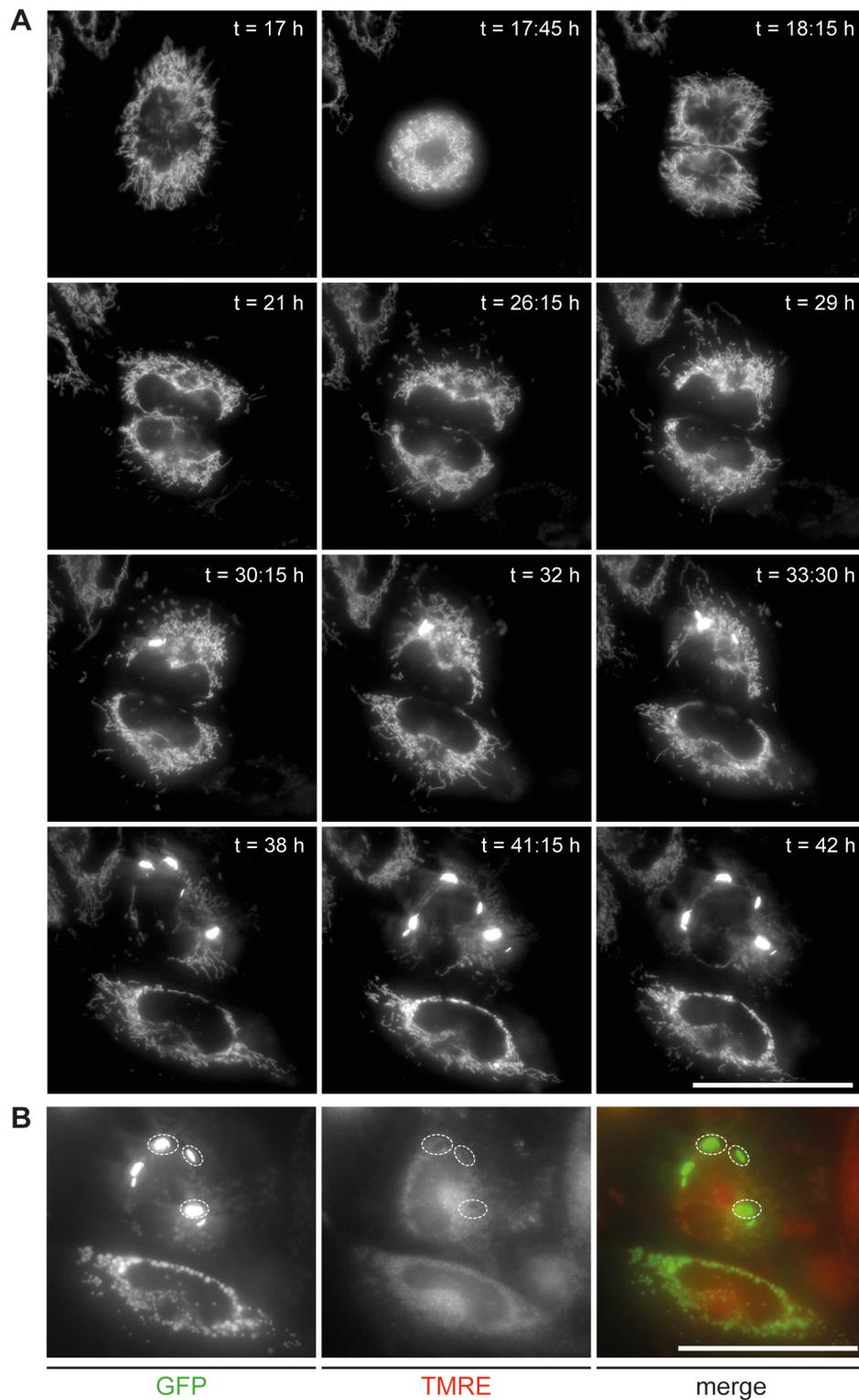
**A** Untersuchung der Aggregatbildung nach Transfektion mit mtQ115 (grün) nach 24- oder 48-stündiger Expression in WT und Lon gKD Zellen mittels Immunzytochemie gegen SDHA (rot). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Skala: 100 µm. Verhältnis der Zellen (**B**) und durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (**C**) der verschiedenen Aggregattypen. Typ 1 (hellgrau): Mitochondrien bildeten kleine punktförmige Aggregate, das mitochondriale Netzwerk war nicht fragmentiert. Typ 2 (schwarz): Mitochondrien bildeten mehrere große, bohnenförmige Aggregate, das mitochondriale Netzwerk war ebenfalls nicht fragmentiert. Typ 3 (grau): Mitochondriales Netzwerk zeigte eine starke Fragmentierung und viele Aggregate. Zellen die keine Aggregate zeigten wurden Typ 0 (dunkelgrau) zugeordnet.

Aufgrund der gefunden zeitabhängigen Aggregatbildung, wurde im Folgenden die Aggregatsbildung über Zeit untersucht.

#### **5.4.4 Zeitabhängigkeit der mitochondrialen Aggregatbildung**

Für die Analyse der Zeitabhängigkeit der Aggregatbildung wurde die *Live Cell*-Mikroskopie nach Transfektion mit mtQ115 durchgeführt. Für die Analyse des Membranpotentials wurde anschließend eine TMRE Färbung bei den zuvor analysierten Zellen durchgeführt.

Auffällig war, dass sich die Zelle nach ~18 Stunden geteilt hatte, was auf gute Bedingungen im *Live Cell*-Mikroskopie hindeutet. Während der Zellteilung waren keine Aggregate innerhalb der Mitochondrien sichtbar. Beide Zellen hatten nach der Teilung theoretisch die gleiche Menge an Reporterprotein mtQ115 im mitochondrialen Netzwerk. Trotzdem bildete nur eine Zelle nach ~21 Stunden die ersten kleineren Aggregate, das mitochondriale Netzwerk beider Zellen war hier nicht fragmentiert. Die obere Zelle bildete im Verlauf der Zeit vier große Aggregate, während das GFP-Signal im restlichen mitochondrialen Netzwerk abnahm. Die untere Zelle bildete im Verlauf der Zeit viele kleine Aggregate und wies ab dem Zeitpunkt  $t = 38$  h fragmentierte Mitochondrien auf. Diese Zelle war ab  $t = 38$  h dem Aggregattyp 3 zugeordnet (Abb. 26A). Die vier großen Aggregate, der oberen Zelle wiesen kein Membranpotential nach ~42 Stunden auf, während das restliche mitochondriale Netzwerk weiterhin ein normales mitochondriales Netzwerk aufwies (Abb. 26B, Kreis). Die untere Zelle zeigte eine starke Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks nach der TMRE-Färbung und begann wahrscheinlich gerade abzusterben (Abb. 26B). Andere untersuchte und hier nicht gezeigte Zellen zeigten entweder einen ähnlichen Zeitverlauf bei der Bildung von Aggregaten oder zeigten ein fragmentiertes mitochondriales Netzwerk. Um eine allgemeine Aussage über die Aggregatbildung zu treffen war die Anzahl der untersuchten Zellen zu gering. Für eine spezifische zeitliche Abfolge der Aggregatbildung müssen noch mehr Zellen untersucht werden.

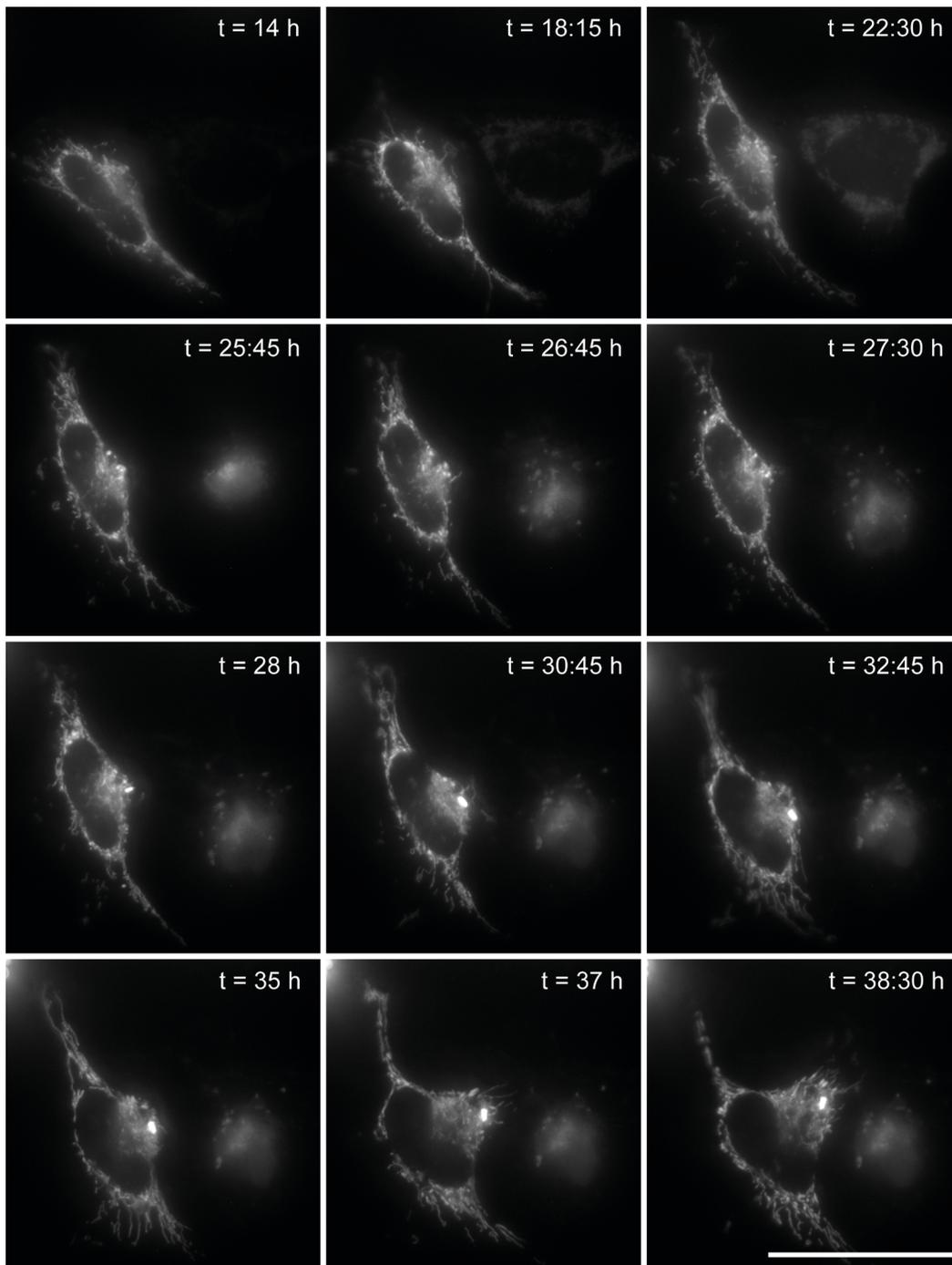


**Abbildung 26: Zeitabhängigkeit der Aggregatbildung in WT Zellen**

Analyse der Zeitabhängigkeit (t) der mitochondrialen Aggregatbildung nach der Transfektion mit mtQ115 (grün) in WT Zellen mittels *Live Cell*-Mikroskopie (**A**) und anschließender TMRE Färbung (**B**, rot). Skala: 100  $\mu\text{m}$ .

Die zeitliche Analyse der Aggregatbildung in Lon gKD Zellen zeigte, dass die Beispielzelle nach ~18 Stunden mehrere kleine Aggregate bildete. Nach ~25 Stunden fragmentierte das mitochondriale Netzwerk dieser Zelle. Die Aggregate bewegen sich innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes und begannen nach ~28 Stunden ein großes Aggregat zu bilden. Nach ~30 Stunden zeigte das mitochondriale Netzwerk wieder eine normale tubuläre Struktur. In der Zeit bis  $t = 38:30$  bewegte sich das große Aggregat (Typ 2) nur noch geringfügig im mitochondrialen Netzwerk, welches eine durchgängig eine tubuläre Struktur aufwies (Abb. 27).

Die Analyse der Zeitabhängigkeit der Aggregatbildung zeigte, dass es nicht möglich war einen Zeitpunkt festzulegen, nachdem die einzelnen Aggregattypen erreicht worden sind. In den gewählten Beispielen zeigten beide Zelllinien die Tendenz ein oder mehrere großen Aggregate zu bilden. Die Zeit bei diesen Beispielzellen war ähnlich. Da ein spezifischer Zeitverlauf nur bedingt reproduzierbar war und die Anzahl der untersuchten Zellen zu gering war, ist eine genauere Aussage über die Lon-bedingte, zeitabhängige Aggregatbildung nicht möglich. Dennoch ist ein genereller zeitlicher Verlauf zu beobachten, bei dem sich erst viele kleine Aggregate (Typ 1) und anschließend mehrere größere Aggregate bilden (Typ 2).



**Abbildung 27: Zeitabhängigkeit der Aggregatbildung in Lon gKD Zellen**

Analyse der Zeitabhängigkeit (t) der mitochondrialen Aggregatbildung nach der Transfektion mit mtQ115 (grün) in Lon gKD Zellen mittels *Live Cell*-Mikroskopie. Skala: 100  $\mu$ m.

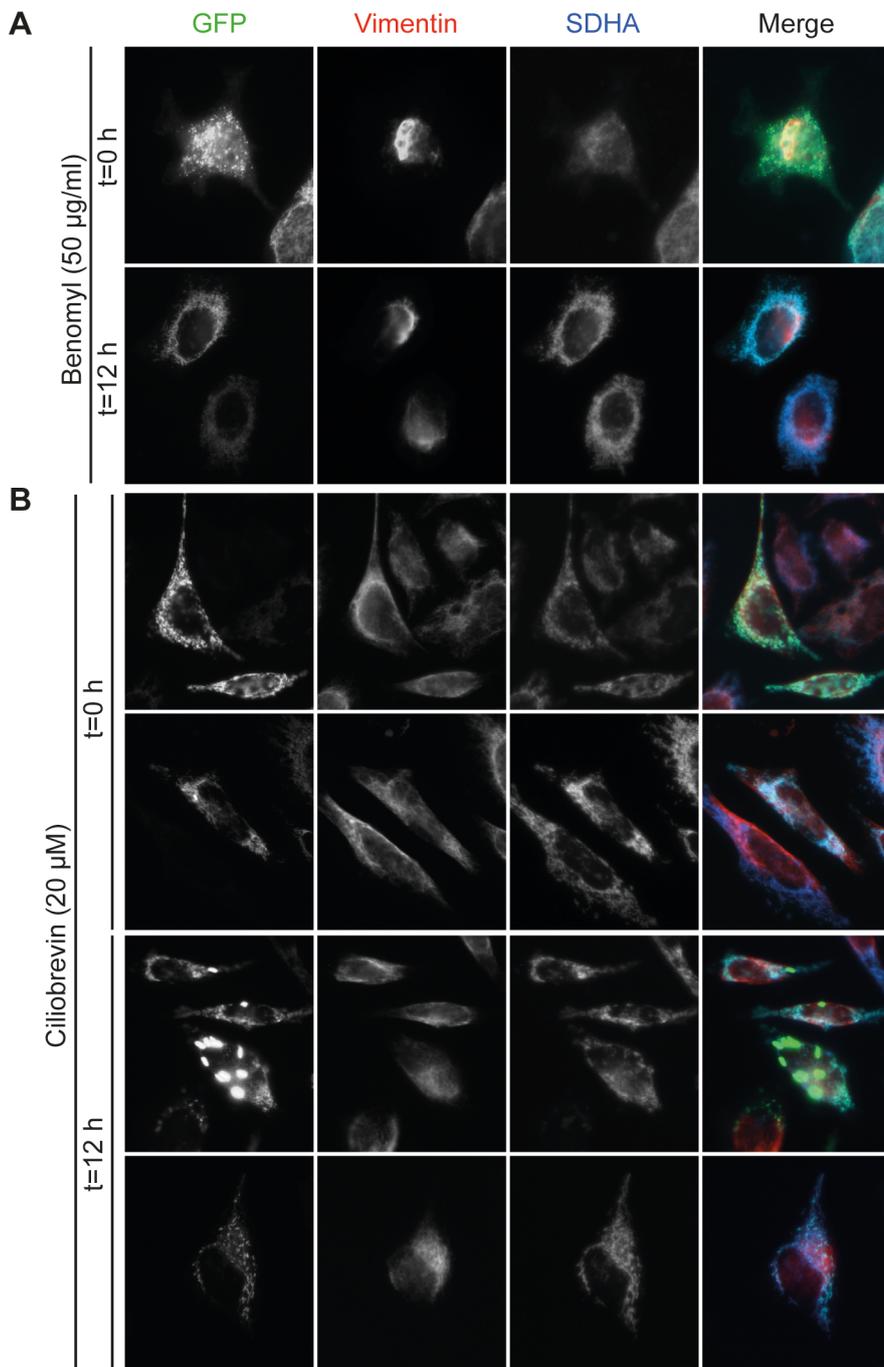
#### 5.4.5 Abhängigkeit der Aggregatbildung von Mikrotubuli

Fraglich ist, wie diese großen Aggregate zum Schutz der Mitochondrien gebildet werden. Mitochondrien werden entlang des Mikrotubulus durch die Zelle transportiert und diese Bewegung könnte der Mechanismus sein, der zu einer Aggregatablagerung innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes führt. Für eine Untersuchung dieser Hypothese wurden WT Zellen, nach der Transfektion mit mtQ115, mit Mikrotubuli-Inhibitoren direkt, oder 12 Stunden nach der Transfektion behandelt. Zum einen wurde Benomyl verwendet, es dimerisiert die Untereinheiten des Mikrotubulus, was zu dessen Zerfall führt. Des Weiteren wurde Cilibrevin genutzt, es hemmt das Motorprotein Dynein, welches sich entlang des Mikrotubulus zum Minusende bewegt und somit die Mitochondrien innerhalb der Zelle zum Nukleus transportiert. Anschließend wurden die Zellen weitere 48 bzw. 36 Stunden kultiviert, fixiert und eine Immunzytochemie gegen das mitochondriale Protein SDHA und das zytosolische Vimentin durchgeführt. Die Expression des Konstrukts war ausreichend und die GFP-Fluoreszenz konnte direkt mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Die Benomyl-Behandlung führte dazu, dass nur sehr wenige Zellen diese Prozedur überlebten. Die detektierten Zellen zeigten eine starke Fragmentierung der Mitochondrien nach 12-stündiger Pause zwischen Transfektion und Benomyl-Zugabe. Zudem konnten, bei den wenigen überlebenden Zellen, keine Aggregate innerhalb gefunden werden (Abb. 28A).

Deutlich mehr Zellen überlebten die Behandlung mit Cilibrevin. Zellen, die direkt nach der Transfektion mit Cilibrevin behandelt wurden, zeigten eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes und sehr viele kleine Aggregate (Typ 3). Wurde Cilibrevin 12 Stunden nach der Transfektion hinzugegeben, bildeten sich mehrere große Aggregate (Typ 2). Es wurden allerdings auch Zellen mit fragmentierten Mitochondrien und vielen kleinen Aggregaten gefunden (Abb. 28B). Die Hemmung des Motorproteins Dynein scheint ausreichend zu sein, die Bildung von wenigen großen Aggregaten zu verhindern. Wurde Dynein erst nach 12 Stunden gehemmt, hatten die Zellen noch die Möglichkeit viele Aggregate an mehreren Orten abzulagern bzw. mehrere große Aggregate zu bilden. In einem vergleichbaren Zeitraum zeigten unbehandelte Zellen die Ausbildung von ein bis

zwei große Aggregate (vergleiche Abb. 25A). Die Benomyl-Behandlung ist zu schwerwiegend, sodass nur wenige Zellen diese Behandlung überlebten.



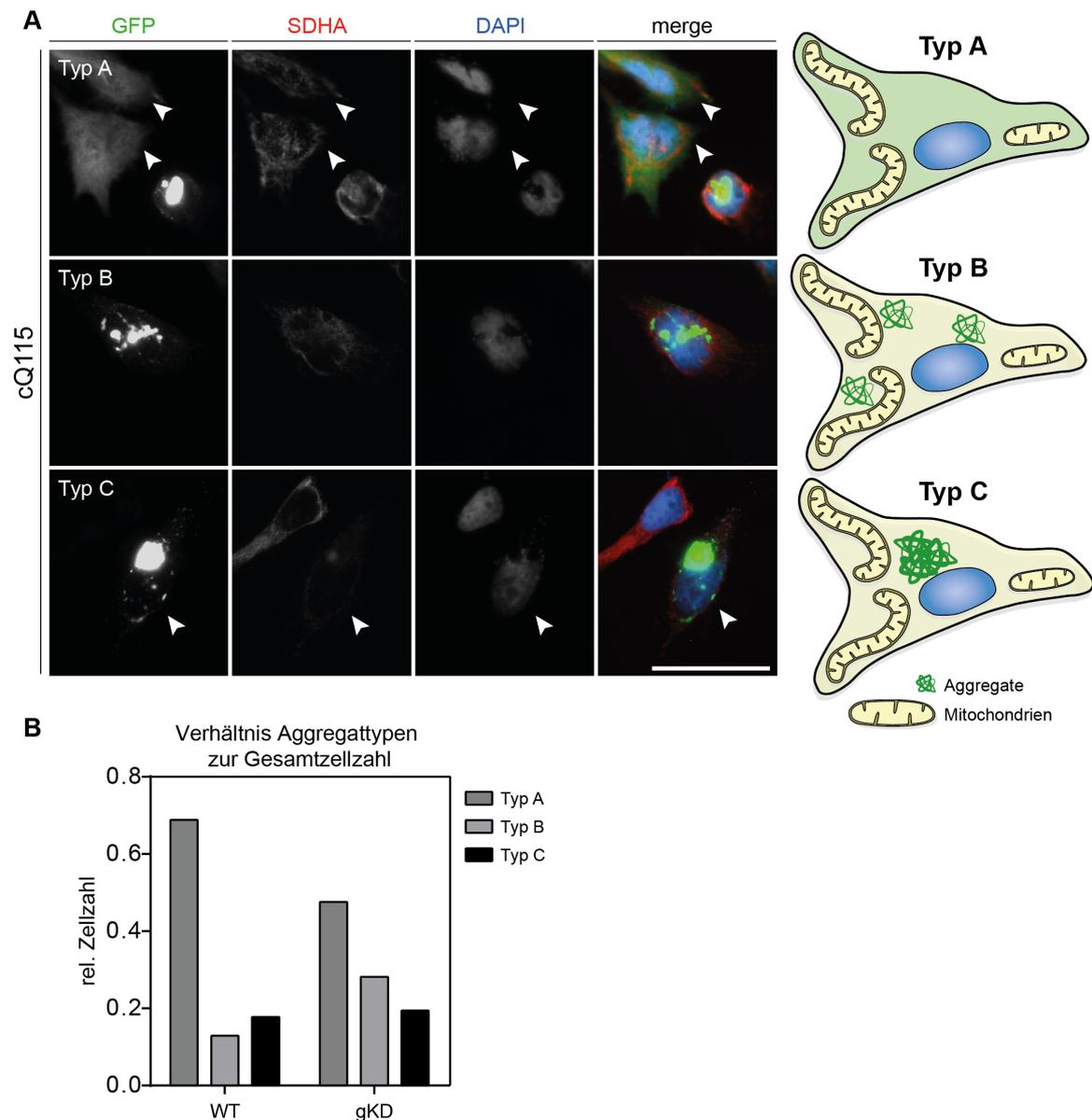
**Abbildung 28: Abhängigkeit der Aggregatbildung von Mikrotubuli**

Untersuchung der Abhängigkeit der Aggregatbildung von der mitochondrialen Bewegung entlang des Mikrotubulus. Nach Transfektion mit mtQ115 (grün) wurden WT Zellen direkt oder nach 12 Stunden mit Benomyl (**A**) oder Ciliobrevin (**B**) für weitere 48 bzw. 36 Stunden behandelt. Nach der Fixierung und Immunzytochemie konnten Vimentin (rot) und SDHA (blau) detektiert werden. Skala: 100 µm.

### 5.4.6 Charakterisierung zytosolischer Aggregatbildung

Die morphologische Untersuchung der zytosolischen Aggregatbildung wurden zunächst die Zellen mit dem cQ115-Konstrukt transzient und nach 48 Stunden Expression fixiert und mittels Immunzytochemie detektiert.

Bei der Fluoreszenz-Mikroskopie wurden zwei verschiedene zytosolische Aggregatstypen gefunden. Viele kleine zytosolische Aggregat wurden dem Typ B zugeordnet. Diese waren unregelmäßig innerhalb des Zytoplasmas verteilt. Bildeten sich aus diesen kleinen Aggregaten ein großes, welches nahe dem Nukleus lokalisiert war, wurden als Typ C bezeichnet. Waren keine Aggregate detektierbar und zeigten die Zellen ein gleichmäßig verteiltes, schwaches und gleichmäßiges GFP-Signal innerhalb des Zytoplasmas, wurden diese Zellen dem Typ A zugeordnet (Abb. 29A). Das Verhältnis der Aggregattypen zu Gesamtzellzahl zeigte, dass 13% der WT Zellen mit kleinen Aggregaten und 18% der WT Zellen ein großes Aggregat aufwiesen. Im Vergleich, zeigten deutlich mehr Lon gKD Zellen den Aggregattyp B, ähnlich viele Lon gKD Zellen, 20% wiesen den zweiten Aggregattyp auf. Lon gKD Zellen wiesen doppelt so häufig den Aggregattyp B, im Vergleich zu WT Zellen (Abb. 29B). Lon gKD Zellen scheinen deutlich häufiger kleinere Aggregate auszubilden. Dieses könnte auf eine verlangsamte Verarbeitung der Aggregate in den Lon gKD Zellen bzw. einer verlangsamten Stressantwort hinzuweisen. Des Weiteren könnte diese verlangsamte Ablagerung eine Folge der verringerten Stressresistenz der Lon gKD Zellen zu sein.



**Abbildung 29: Charakterisierung zytosolischer Aggregate**

**A** Die Charakterisierung der zytosolischen Aggregate nach Transfektion mit cQ115 nach 48-stündiger Expression mittels Immunzytochemie. Das Fusionsprotein cQ115 ist durch eGFP (grün) detektierbar und zeigt keine Kollokalisierung mit dem mitochondrialen SDHA (rot). Typ A: Das GFP-Signal ist gleichmäßig im Zytosol verteilt und es sind keine Aggregate erkennbar. Typ B: Im Zytosol sind kleinere Aggregate detektierbar. Typ C: Bildung eines großen Aggregates im Zytosol. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Die Pfeile deuten auf die jeweiligen Zellen. Skala: 100 µm. **B** Verhältnis der Zellzahlen zu den jeweiligen Typen in WT und Lon gKD Zellen nach 48-stündiger Expression des Reporterproteins cQ115.

---

## 6. Diskussion

### 6.1 Auswirkungen des partiellen Lon-Verlustes

Lon ist eine der wichtigsten Proteasen in der mitochondrialen Matrix, ein vollständiger Verlust ist sowohl embryonal letal im Mausmodell (Quirós et al. 2014), als auch nicht überlebensfähig im zellulären Modell (Gibellini et al. 2014; Bota, Ngo, and Davies 2005). Für die Analyse der Lon Funktion anhand eines Funktionsverlust-Modells, wurde ein genetischer, CRISPR/ Cas-vermittelter Knockdown durchgeführt. Die entwickelte Zelllinie zeigte ein konstant verringertes Lon-Proteinlevel von 27%. Im Vergleich zu früheren Studien zeigte diese Zelllinie einen eher milderen Phänotyp, da die meisten untersuchten mitochondrialen Funktionen kaum Änderungen zeigten.

Die mitochondriale Morphologie der Lon gKD Zellen ist unverändert, somit scheint Lon keinen direkten Einfluss auf diese zu haben. Viele Studien untersuchten diesen Einfluss des Funktionsverlustes von Lon anhand eines siRNA Lon Knockdowns. Eine dieser Studien zeigte einen starken Einfluss auf das mitochondriale Netzwerk, welches nach der Induzierung des Lon Knockdowns durch Doxycyclin fragmentierte (Gibellini et al. 2014). Allerdings wurde dieser Knockdown mittels einer relativ hohen Dosis Doxycyclin induziert. Mangels notwendiger Kontrollen ist jedoch fraglich ob diese Fragmentierung durch den Lon-Verlust oder durch die relativ hohe Doxycyclin Dosis hervorgerufen wurde. Da es sich bei Doxycyclin um einen Inhibitor für die mitochondriale Translation handelt (Moullan et al. 2015), könnte Doxycyclin als mitochondrialer Stressor für die Fragmentierung verantwortlich sein. Weitere Studien zeigten in humanen Fibroblasten (Bota, Ngo, and Davies 2005) oder in Hefe Zellen (Suzuki et al. 1994) ebenfalls einen stark veränderten Phänotyp mit einem teilweisen bis vollständigen Verlust der mitochondrialen Cristae-Struktur. Allerdings war die Lon bzw. Pim1 Proteinmenge in diesen Studien um mehr als 95% reduziert. Aufgrund der unterschiedlichen Herstellungsweisen der Zellen, wurden unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen beobachtet. In einer weiteren Studie führte der siRNA Knockdown von Lon allerdings zu einem vergleichbar milden Phänotyp (Bayot et al. 2014) und ist somit eher vergleichbar mit der hier vorgestellten Lon gKD Zelllinie. Die Veränderung in den zuvor beschriebenen siRNA Lon-Knockdown-

Studien hängt sehr wahrscheinlich mit einer sehr starken Schädigung der Mitochondrien durch den Verlust von Lon zusammen. Ist die Lon-Proteinmenge zu stark reduziert, werden die Mitochondrien sehr stark geschädigt, welches zu einer starken Stress-bedingten Fragmentierung führte. Die hier erstellte Lon gKD Zelllinie hat mit 27% eine Lon-Proteinmenge, die auszureichen scheint die mitochondriale Morphologie intakt zu halten.

Interessanterweise zeigt der hier vorgestellte Lon gKD eine Degradationsfunktion, die nicht so stark verringert ist, wie die verbleibende Lon-Proteinmenge es vermuten lässt. Eine mögliche Erklärung ist, dass alle Lon-Hexamere in Lon gKD Zellen durch den Abbau der Reporterproteine belegt sind, während es noch freie Lon-Komplexe in WT Mitochondrien gibt. Allerdings ist diese Beobachtung nicht in anderen Studien zu finden, da in den meisten Studien die Lon-Proteinmenge deutlich geringer war. Die deutliche Abnahme der ATP Konzentration innerhalb der Lon gKD Mitochondrien könnte auf eine verringerte Proteinmenge der Atmungskettekomplexe bzw. der am Metabolismus beteiligten Proteine, zurückzuführen sein. So gehört NDUF5 (Untereinheit Komplex 1) zu den Proteinen, die in Lon gKD Mitochondrien am stärksten reduziert waren. Allerdings gehört NDUF4 zu den Proteinen, die am stärksten erhöht waren. Daher lässt sie keine einheitliche Aussage über eine generelle Ab- bzw. Zunahme der Atmungskettekomplexe treffen. Eine kürzlich erschienene Studie zeigte, dass ein Verlust von Lon zu einer verringerten metabolischen Aktivität und somit zu einer verringerten ATP Konzentration führt. Als Gründe wurden hier eine veränderte Expression von Proteinen aufgeführt, die am Metabolismus beteiligt sind (Hamon et al. 2020). Zudem zeigte eine weitere Studie, dass nach einem Lon siRNA Knockdown nur noch 50% der ATP Konzentration vorhanden war. Hier wurde verringerte Proteinmengen des Komplex 1 als Ursache genannt. Allerdings zeigten diese Zellen auch ein verringertes Membranpotential, sowie die Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks (Quirós et al. 2014). Es ist daher fraglich ob die verwendeten Zellen mit den Lon gKD Zellen vergleichbar sind. Zudem könnten die reduzierte ATP Konzentration in den Lon gKD Mitochondrien darauf hindeuten, dass sie deutlich mehr Energie brauchen um überlebenswichtige Funktionen zu erhalten und eine mögliche Apoptose zu verhindern. So führt eine fast vollständige Reduzierung der Lon-Proteinmenge zu einer erhöhten Caspase-3 induzierten Apoptose (Bota, Ngo, and Davies 2005; Gibellini et al. 2014; 2015).

Dafür spricht auch, dass eine Lon Überexpression zu einer verringerten Apoptoserate führt (Sung et al. 2018; Quirós et al. 2014).

In unbehandelten Lon gKD Zellen ist keine Akkumulation von oxidierten Proteinen zu detektieren, die vorhandene Lon-Proteinmenge scheint auszureichen um diese Proteine zeitnah abzubauen. Allerdings reagieren diese Zellen deutlich sensitiver auf die Behandlung mit Menadion als WT Zellen. Menadion führt zu einer Zunahme der oxidierten Proteine (White and Clark 1988), die im Normalfall durch Lon abgebaut werden (Bota and Davies 2002; Ngo and Davies 2009; Pinti et al. 2015; Bender et al. 2010). In den Lon gKD Zellen scheint die verbleibenden Lon-Hexamere nicht auszureichen um die erhöhte Menge an oxidierten Proteinen abzubauen. Alle Lon Proteasen scheinen mit dem Abbau von diesen Proteinen belegt zu sein und somit akkumulieren oxidierte Proteine. Folglich brauchen die Lon gKD Zellen länger um die gleiche Menge beschädigter Proteine abzubauen. Dieses wird durch frühere Untersuchungen am Hefe Modell bestätigt, *pim1Δ* Zellen reagieren ebenfalls sensitiver auf den Stress durch oxidierte Proteine (Bender et al. 2010). Eine andere mögliche Erklärung für diese erhöhte Sensitivität und Accumulation von freien Superoxidradikale ist die Reduktion der SOD2-Proteinmenge. SOD2 ist das „Entgiftungsenzym“ und schützt Mitochondrien vor der Beschädigung durch ungewollte Oxidation indem es freie Superoxidradikale bindet (MacMillan-Crow and Thompson 1999). Die Regulation von Lon und SOD2 scheinen zusammen zu hängen, da auch in heterozygoten SOD2 Mäusen die Lon-Proteinmenge verringert ist (Bota, Van Remmen, and Davies 2002). Allerdings wurde noch kein direkter Zusammenhang beschrieben.

Eine weitere interessante Korrelation ist die Reduktion der CLPP Protease in Lon gKD Zellen, theoretisch wäre eine Zunahme von CLPP als Kompensation für den partiellen Verlust von Lon zu erwarten. Allerdings sind die Kompensationseigenschaften von CLPP nur bedingt vorhanden, da bereits gezeigt wurde, dass CLPP nicht alle Lon Substrate, wie STaR oder ACADM abbauen kann (Granot et al. 2007; Hansen, Gregersen, and Bross 2005). Überraschenderweise ist die CLPP-Proteinmenge nicht verändert nachdem Lon mittels Doxycyclin-induzierten siRNA Knockdown reduziert wurde (Bayot et al. 2014). Die verringerte CLPP-Proteinmenge in Lon gKD Zellen führt möglicherweise dazu, dass die negativen Effekte des Lon-Verlustes nicht mehr kompensiert werden können.

Möglicherweise bedingt Lon zudem die Prozessierung des CLPP/X Komplexes, zumal eine weitere Studie eine Akkumulation von nicht-prozessierten CLPX nach einem Lon siRNA Knockdown gezeigt hat. Hier wurde vermutet, dass Lon mit MPP physikalisch interagiert um die MPP-Funktion zu aktivieren (Zurita Rendón and Shoubridge 2018). Es ist zudem möglich, dass Lon für die Prozessierung und Reifung von SOD2 und CLPP, in einer noch nicht bekannten Weise, notwendig ist oder essentiell an deren Assemblierung beteiligt ist.

Diese Lon gKD Zelllinie hat in Vergleich zu den sonst verwendeten siRNA Modellen mehr Zeit gehabt, sich an die stabile Reduktion von Lon zu adaptieren. Diese Adaptionsmöglichkeit ermöglicht die Ausbildung eines milden Phänotyps sowie die Umstrukturierung des gesamten Proteoms. In den meisten Fällen ist die Proteinmenge mitochondrialer Proteine, nach Lon gKD, erhöht. Zu erwarten wäre eine Abnahme der Lon-Substrate nach Lon gKD, da die fehlenden Lon-Enzyme nicht mehr in der Lage sind die Substrate zu degradieren. So führt ein siRNA Knockout von Lon zu einer Zunahme der Tfam Konzentration in *Drosophila* (Matsushima, Goto, and Kaguni 2010). Überraschenderweise, ist die Menge der bekannten Lon Substrate wie Aco2 (Bota, Van Remmen, and Davies 2002) und Tfam (Li, Hou, and Hao 2017) in der Lon gKD Zelllinie nicht verändert. Ähnliches wurde auch in einer MS Studien an heterozygoten Lon Mäusen gefunden, auch hier waren die Proteinmengen von Tfam und Aco2 nicht verändert (Key et al. 2019). In heterozygoten SOD2 Mäusen, in denen die Lon-Proteinmenge verringert war, wurden ebenfalls keine auffälligen Veränderungen von Aco2 beobachtet (Bota, Van Remmen, and Davies 2002). Neben den unveränderten Lon Substraten, gab es allerdings andere auffällig Adaptionen der Lon gKD Zelllinie. Vor allem wurden verschiedene Mitglieder des mitochondrialen PAM-Komplexes, sowie Untereinheiten von Tim und Tom hochreguliert. Allerdings zeigte der Import des radioaktiven Reporterprotein keinen Unterschied zwischen WT und Lon gKD Zellen. Die Hochregulierung der Untereinheiten des PAM-Komplexes GRPEL2 und DNAJC19 könnte, zum einen, ein Hinweis auf mögliche Lon Substrate sein. Zum anderen könnte es ein Hinweis auf einen Kompensationseffekt sein, um den mitochondrialen Import zu normalisieren. Auffällig ist die Zunahme der Importrezeptoren Tom20 und Tim21. Tom20 ist für die Erkennung der positiv geladenen Präsequenzen zuständig (Becker, Böttinger, and Pfanner 2012) und eine höhere Tom20 Proteinmenge könnte somit die Importeffizienz steigern. Diese

Effizienzsteigerung war im Experiment mit den hier verwendeten Reporterproteinen nicht detektierbar. Allerdings könnte der mitochondriale Import in Lon gKD Zellen verringert sein und durch die Hochregulierung von Tom20 und den Untereinheiten des PAM-Komplexes ausgeglichen und somit nicht detektierbar sein.

Ein weiterer Kompensationseffekt könnte die Veränderung der Translationsrate von ATP8 und ND4 sein. Die Translation beider mitochondrial codierten Untereinheiten ist leicht verringert, während die Translation von ND4L erhöht ist. Dies könnte die Folge der verringerten Proteinmenge von verschiedenen Translationskomponenten sein (GATB, PARS, MRPS11). Lon zeigt bekanntlich drei wesentliche Funktionen von denen eine die Regulation der Replikation und Transkription durch das Binden der mtDNA ist (G. K. Fu and Markovitz 1998; T. Liu et al. 2004). Ein Verlust von Lon kann daher zu einer veränderten Transkription, gefolgt von einer veränderten Translation führen, dieses wurde auch bereits in einer anderen Studie gezeigt (Zurita Rendón and Shoubridge 2018). Des Weiteren könnte diese Veränderungen auch auf eine Verringerung der mtDNA Menge zurückzuführen sein. Dieses wurde bereits in Krebszellen beobachtet worden, in denen Lon herunterreguliert war (Quirós et al. 2014).

Die verschiedenen Kompensationen zeigen, dass sich die Lon gKD Zellen an den Lon-Verlust adaptieren konnten, auch wenn sie nicht mehr so stressresistent sind wie Zellen mit einer normalen Lon-Proteinmenge. Der Lon Mangel führt zudem zu einer verringerten Degradationsrate, allerdings ist die Aktivität der einzelnen Proteasen erhöht um die negativen Effekte möglichst gering zu halten.

## 6.2 Lon-abhängige, Hitze-induzierte Proteinaggregation

Für die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Hitze-induzierten Aggregation von mitochondrialen Proteinen und der Protease Lon wurden aggregierte Proteine nach Hitzestress von WT und Lon gKD Mitochondrien mittels MS untersucht. Von Interesse ist, ob es eine Korrelation zwischen dem Verlust von Lon und der Zunahme der Proteinaggregation nach Hitzestress gibt. Eine frühere Studie zeigte, dass der Verlust von Lon zu einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen führt (Pareek et al. 2018). Analog zu einer vorherigen Studie, in der aufgrund der angewendeten Methodik nur Tufm und Lon als aggregierende Proteine gefunden wurden (Wilkening et al. 2018), zeigte die MS Analyse hier, dass deutlich mehr Proteine aggregierten. Das Aggregationsverhalten von Lon ist sehr hoch, ähnlich wie in ein einer früheren Studie (Wilkening et al. 2018). Lon wies sowohl in WT als auch in Lon gKD eine ähnliche Aggregationstendenz nach Hitzestress auf, daher liegt die Vermutung nahe, dass die prinzipielle Struktur und Physiologie des Lon-Hexamers unverändert ist, da Lon gleich auf den Hitzestress reagiert.

Generell zeigen mehr Proteine in Lon gKD Mitochondrien eine erhöhte Aggregationstendenz als Proteine in WT Mitochondrien. Im Gegensatz, zeigte eine vorangegangene Studie in Hefe, dass eine Pim1 Überexpression zu einer verringerten Aggregationstendenz, im Vergleich zu WT Hefezellen, führt (Bender et al. 2011). In der MS Analyse der Lon gKD Mitochondrien wurden sechs Proteine gefunden, die eine besonders starke Lon-abhängige und Hitze-induzierte Proteinaggregation aufweisen. Die Proteingröße scheint dabei keinen Einfluss auf die Aggregationstendenz zu haben, da sowohl COA6 mit 15 kDa, als auch QRSL1 mit 57 kDa besonders stark aggregieren. Viele der Proteine mit einer erhöhten Lon-abhängigen Aggregationstendenz sind zudem auch vermehrt in Lon gKD Mitochondrien vertreten. Die Problematik an dieser Beobachtung ist, dass nicht unbedingt davon ausgegangen werden kann, dass diese Proteine besonders stark aggregieren. Sie können sowohl potentielle Lon Substrate sein, als auch nur aggregieren, da sie aufgrund der Adaption an den Lon-Verlust, verstärkt in diesen Zellen vorkommen. Diese Proteine sollten nicht vollständig ausgeschlossen werden, allerdings sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

Die Analyse der Proteine mit verringerter Aggregationstendenz zeigt, dass hier verstärkt Membranproteine zu finden sind. In einer vorangegangenen Studie wurden Membranproteine als nicht-aggregierende Kontrolle verwendet (Wilkening et al. 2018). Allerdings wurden in den Lon gKD Mitochondrien einige Membranproteine auch verstärkt in der Fraktion der aggregierten Proteine gefunden. So zeigte Tim29 eine erhöhte Lon-abhängige Aggregationstendenz und kam zudem weniger häufig in Lon gKD Zellen vor. Das Membranprotein Tim29 besitzt zudem einen Matrixloop (Kang et al. 2016) und ist somit auch ein mögliches Lon Substrat. Eine vergleichbare Matrix Domäne besitzen auch die Lon Substrate der ATP Synthase  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit (Bayot et al. 2010; Bulteau et al. 2017).

Die Proteine, die verstärkt nach Hitzestress in Lon gKD Zellen aggregieren, fallen in drei verschiedenen Funktionsklasse, der  $\beta$ -Oxidation, RNA Reifung und Proteinassemblierung. ACADM ist prominent an der  $\beta$ -Oxidation beteiligt und ein weiteres bekanntes Lon Substrat (Hansen, Gregersen, and Bross 2005). ACADM zeigt eine sehr hohe Aggregationstendenz wobei die ACADM Proteinmenge in den Lon gKD Zellen nicht erhöht ist. Des Weiteren ist LACTB in Lon gKD Zellen verringert, aggregiert allerdings sehr stark nach Hitzestress. Da LACTB2 in der Reifung der mRNA beteiligt ist und somit essentiell für die mitochondriale Transkription ist, zeigte ein LACTB2 siRNA Knockdown eine Akkumulation von mitochondrialen Transkriptionsprodukten (Levy et al. 2016). Die generelle Reduktion von LACTB2 kann die verringerte mitochondriale Translationsrate von ATP8 und ND4 erklären. Des Weiteren kann die schnelle Aggregation von LACTB2 eine ähnliche Folge haben, wie die schnelle Aggregation von dem Elongationsfaktor der Translation Tufm (Wilkening et al. 2018). Vermutlich aggregieren Komponenten der mitochondrialen Translation sehr schnell um die Translations der mitochondriell-kodierten Proteinen zu stoppen. Dies könnte ein Kompensationsmechanismus sein, der die Lon gKD Zelle während des Hitzestress vor fehlgefalteten, mitochondrial kodierten Proteinen schützen soll. Da es bei einem Verlust von Lon bereits zu einer Akkumulation von nicht prozessierten Proteinen kommt, da Lon physikalisch mit MPP interagieren soll und durch das Fehlen von Lon es zu einer Inaktivierung von MPP kommen soll (Zurita Rendón and Shoubridge 2018), kann eine schnellere LACTB2 Aggregation vor dieser Akkumulation ebenfalls schützen.

## 6.3 Mitochondriale Proteinablagerung von Aggregaten als

### Schutzmechanismus

#### 6.3.1 Lon-abhängige Ablagerung von Aggregaten in Mitochondrien

Da sich die Aggregationstendenz der mitochondrialen Proteine in Lon gKD Zellen veränderte, war eine weitere Frage, wie und ob sich die Ablagerung von Aggregaten in Zellen mit einer verringerten Lon-Proteinmenge verändert. Eine vorangegangene Arbeit zeigte, dass einen Zusammenhang zwischen Pim1 und der Aggregatbildung im Hefeorganismus besteht. In Zellen, die ein destabilisiertes Reporterprotein exprimieren, führt die Pim1 Überexpression zu einem Schutz vor der Akkumulation von Aggregaten (Bruderek et al. 2018). Die hier entstandenen Aggregatablagerungen im mitochondrialen Netzwerk zeigten große Ähnlichkeiten mit der zuvor in Hefe beschriebene Ablagerungsstelle mitochondrialer Aggregate, dem IMiQ (Bruderek et al. 2018). Ähnlich wie das IMiQ, weisen Mitochondrien mit der Aggregatablagerung im humanen System ebenfalls kein mitochondriales Membranpotential auf und scheint vom restlichen mitochondrialen Netzwerk abgetrennt zu sein. Die mögliche Funktion dieses Kompartiments könnte der Erhalt der mitochondrialen Proteostase sein, indem die Integrität des restlichen mitochondrialen Netzwerkes intakt bleibt. Dies führt wiederum zur Erhaltung der mitochondrialen Funktion und zum Überleben der Zelle. Somit kann die Aggregatablagerung in humanen Zellen ebenfalls als IMiQ oder IMiQ-ähnlich bezeichnet werden. Die Lon gKD Zellen zeigten eine ähnliche zeitliche Abhängigkeit in der Bildung der PolyQ Aggregate. Lon gKD Zellen benötigen länger für die Ausbildung eines großen mitochondrialen Aggregats (Typ 2). Daher besteht die Vermutung, dass Lon gKD Zellen weniger resistent gegenüber proteotoxischen Stress als WT Zellen sind. Prinzipiell sind auch die Lon gKD Zellen in der Lage IMiQs zu bilden, allerdings brauchen diese Zellen deutlich länger als die WT Zellen.

Ein wichtiger Faktor für die Verarbeitung von Aggregaten scheint die Menge der fehlgefalteten Proteine zu sein. Besonders unterscheiden sich die verschiedenen Typen von mitochondrialen Aggregaten anhand der Intensität der Fluoreszenz. Wenn sich das eGFP des Reporterproteins nicht verändert und somit seine Fluoreszenzeigenschaft nicht verliert, kann davon ausgegangen werden,

dass sich die Fluoreszenz-Intensität von eGFP proportional zu der Proteinmenge des PolyQ-Konstrukts verhält. Aufgrund der verwendeten Methodik konnten nicht alle Zellen mit der gleichen Menge an Plasmid transfiziert werden, somit gab es keine vergleichbare Menge des PolyQ Reporterproteins. In den Zellen mit sehr hohen Fluoreszenz-Intensität wurden dementsprechend auch eine große Menge an Reporterprotein exprimiert. Unter dieser Voraussetzung zeigten Typ 1 und 2 mitochondrialer Aggregate eine ähnliche geringe Intensität, wie die Zellen ohne Anzeichen von Aggregaten. Lediglich die Zellen mit fragmentierten Mitochondrien und vielen größeren Aggregaten (Typ 3) zeigten eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz-Intensität. Somit ist die Proteinmenge in den Typ 3 Zellen auch deutlich erhöht, was wiederum zu einer Zunahme des proteotoxischen Stress führt. In den Zellen, die einen Aggregationstyp 1 oder 2 zeigen, scheint die Proteostase durch die Ausbildung der größeren Aggregate geschützt zu sein, indem die proteotoxischen Effekte von kleineren Aggregaten verringert werden (Miller, Mogk, and Bukau 2015). Wenn die Menge an ungefalteten Proteinen zu hoch ist, sodass die Ablagemechanismen des mtPQC Systems überlastet sind, fragmentieren die Mitochondrien.

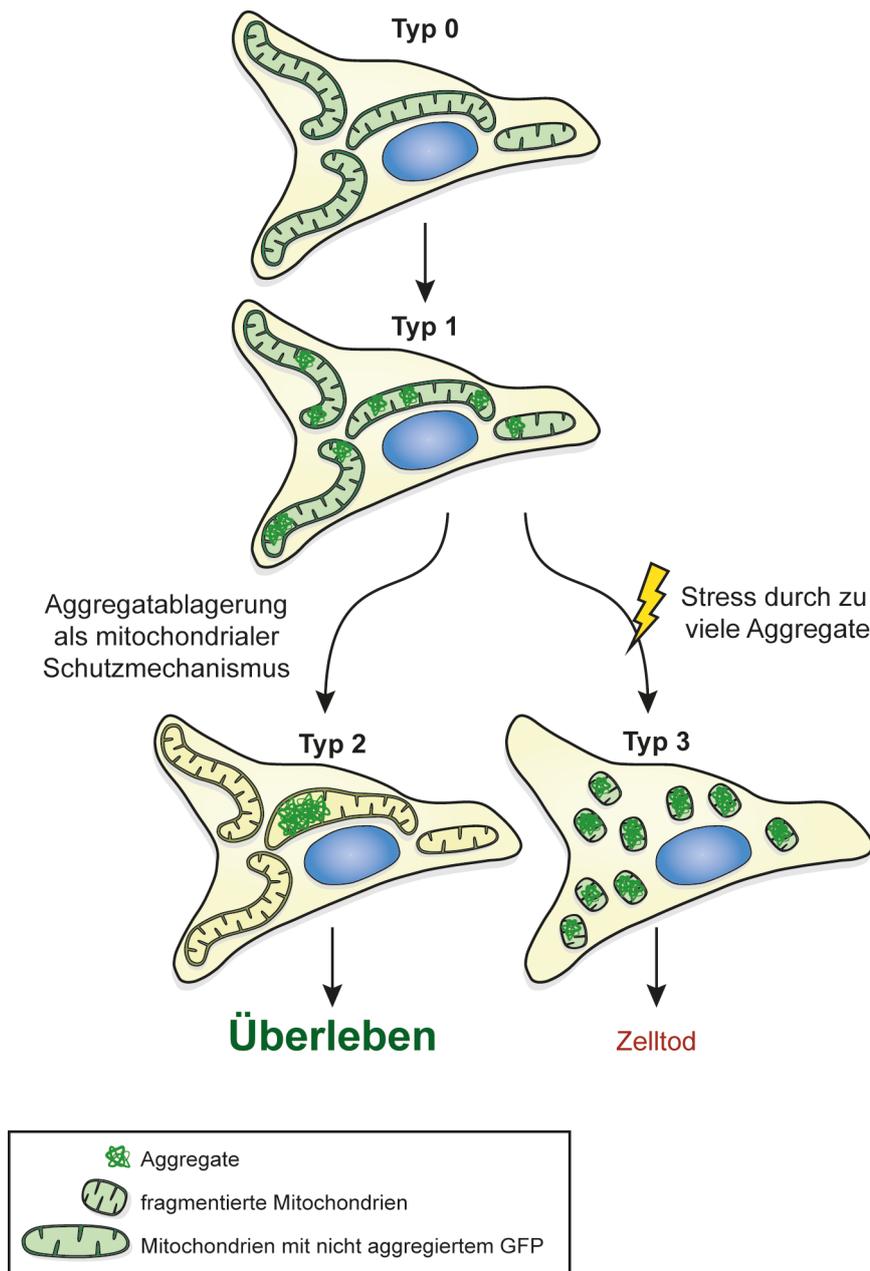
Die Mechanismen der Aggregatablagerungen im Zytosol scheinen sehr ähnlich zu denen der beobachteten Ablagerung der mitochondrialen Aggregate zu sein. Zur Bildung des Aggresoms werden die fehlgefalteten Proteine über Dynein zum MTOC am Nukleus transportiert. Dort kann das entstandene Aggresom durch das Lysosom abgebaut werden (Olzmann and Chin 2008). Durch die Inhibierung von Dynein wird deutlich, dass ein ähnlicher Mechanismus auch bei der Ansammlung der mitochondrialen Aggregate eine Rolle spielen muss, da sich weniger eindeutige IMiQs nach der Hemmung von Dynein bildeten. Allerdings scheint hier eine Bildung der Vimentin-Hülle nicht notwendig zu sein, da das Aggregat und damit die freiliegenden hydrophoben Seitenketten, durch die mitochondrialen Membranen geschützt ist. Die Frage besteht, ob das entstandene IMiQ, ähnlich wie das Aggresom, auch von den Lysosomen bzw. über Mitophagie abgebaut wird. Allerdings ist der Mitophagie-Marker LC3 nicht verändert. In Lon<sup>gKD</sup> Zellen ist die Autophagie in allen untersuchten Zellen erhöht, was darauf hindeutet, dass mehr Mitochondrien durch den Lon-Verlust geschädigt sind. Es ist daher möglich, dass diese Zellen empfindlicher auf den Stress durch die Transfektion und den proteotoxischen Stress reagieren.

Eine andere Studie in menschlichen Zellen zeigte keine Aggregation eines PolyQ-Konstrukts mit ähnlicher Anzahl an Glutamin-Wiederholungen in Mitochondrien (Rousseau et al. 2004). Diese Studie verwendete ein Konstrukt aus einer MTS sowie dem Exon 1 des humanen Huntingtins mit einer Glutamin-Wiederholung von Q119. Ein wesentlicher Unterschied des Konstrukts und dem hier verwendeten Fusionskonstrukt ist das eGFP, welches hier zu Detektion diente. Überraschenderweise konnte in der Rousseau-Studie keine Aggregation detektiert werden, während hier eindeutig Aggregate innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes gefunden wurden. Des Weiteren wurden die Aggregate an mehreren Orten, ähnlich des IMiQs, innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes abgelagert. Die Unterschiede der Aggregatbildung von beiden Konstrukten könnten mit einem fehlerhaften mitochondrialen Import des Konstruktes ohne eGFP erklärt werden. Mitochondriale Proteine werden, nach allgemeiner Meinung (Becker, Böttiger, and Pfanner 2012), zunächst vollständig im Zytosol translatiert und anschließend in das Mitochondrium importiert. Das Rousseau-Konstrukt könnte im Zytosol bereits aggregieren und somit nicht mehr importierbar sein, da es nicht mehr durch die Importkanäle passt. Allerdings ist damit der vollständige Import des hier verwendeten Konstrukts nicht erklärbar. Es besteht die Möglichkeit, dass Mitochondrien, ähnlich wie das ER, Proteine kotranslational importieren. Die Zellen könnten zunächst den N-Terminus mit der MTS des Reporterproteins translatieren und bis zum PAM-Komplex in der inneren Matrix importieren. Angetrieben durch den PAM-Komplex würde das Reporterprotein anschließend in die Matrix gezogen werden, während es parallel translatiert wird. Daher würde der PolyQ Domäne keine Möglichkeit zur Aggregation gegeben werden. Somit schützt der Aufbau und die damit verbundene Länge während des Imports vor einer verfrühten Aggregation im Zytosol. Dieses würde zudem die Ähnlichkeit des hier gefundenen Aggregationsverhalten zu dem in der Rousseau-Studie beobachteten Aggregationsverhalten im ER erklären (Rousseau et al. 2004). Diese Studie zeigte zudem, dass mitochondriale Netzwerk fragmentierte, während in dieser Arbeit das mitochondriale Netzwerk weitestgehend intact zu seinen schien, sofern die Menge an Reporterprotein nicht zu hoch war. Es besteht die Möglichkeit, dass die PolyQ-Konstrukte ohne eGFP die Importkanäle durch eine Aggregation im Zytosol verstopfen und somit die Mitochondrien stressen (Rassow et al. 1989), was wiederum die Fragmentierung

des mitochondrialen Netzwerkes erklären könnte. Das Fusionskonstrukt aus MTS, eGFP und Q115 scheint demzufolge ohne zytosolische Aggregation importiert werden zu können. Zudem besteht die Möglichkeit, dass das eGFP, ähnlich der Carrier Proteine, während der Expression an zytosolische Chaperone bindet, welche wiederum auch das Q115 binden könnten und somit vor einer Aggregation im Zytosol schützen. Nach dem mitochondrialen Import verbleiben die Chaperone im Zytosol und es kommt zur Aggregation im Mitochondrium. Ähnlich sind auch die gefundenen Aggregate im ER zu erklären (Rousseau et al. 2004). Dieses muss allerdings noch genauer untersucht werden.

### **6.3.2 Modell: mitochondriale Antwort auf Aggregate als Stressantwort**

Anhand der Beobachtungen aus der Untersuchung der Ablagerung von mitochondrialen Aggregaten an einem Punkt innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes, ergibt sich ein Modell zur Stressantwort auf mitochondriale Aggregate. Dieses Modell zeigt zwei mögliche Varianten, wie die Zellen auf den proteotoxischen Stress innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes reagieren können. Aufgrund der Akkumulation der ungefalteten Proteine bilden sich zunächst viele kleine Aggregate (Typ 1; Abb. 30). Als Schutzmechanismus werden die Aggregate an einem Ort innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes abgelagert und bilden ein großes Aggregat (Typ 2; Abb. 30). Dieses sichert die Integrität des mitochondrialen Netzwerkes und somit das Überleben der Zelle. Ist die Aggregatmenge und somit der proteotoxische Stress zu hoch, fragmentiert das mitochondriale Netzwerk und die Zelle stirbt (Typ 3; Abb. 30).



### Abbildung 30: Modell zur Stressantwort auf mitochondriale Aggregate

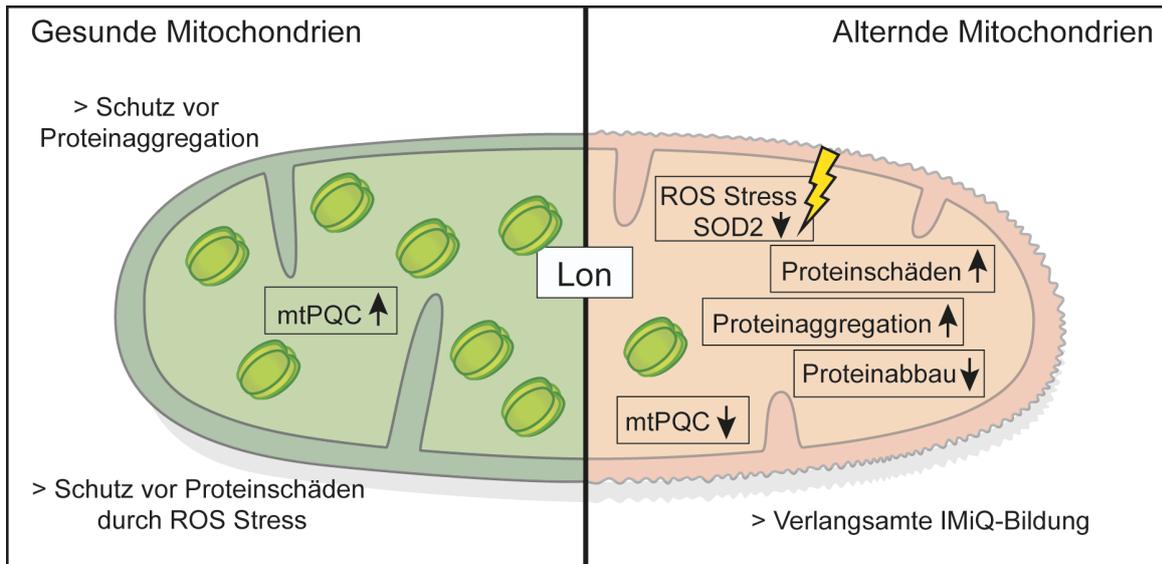
Das Modell zur Ablagerung von mitochondrialen Aggregaten zeigt zwei mögliche Abläufe, wie Zellen auf proteotoxischen Stress innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes reagieren. Zunächst bilden sich viele kleine Aggregate (Typ 1). Zum Schutz bildet das mitochondriale Netzwerk ein großes Aggregat, welches über Dynein zum Kern transportiert und abgelagert wird (Typ 2). Somit kann die Zelle überleben. Ist die Menge der fehlgefalteten und aggregierten Proteine zu hoch, fragmentieren die Mitochondrien und die Zellen sterben (Typ 3).

## 6.4 gKD Lon Zellen als zelluläres Modell für das Altern

Der Zusammenhang zwischen dem Verlust von Lon und Alterungsprozessen ist bereits länger bekannt, da alternde Zellen eine Zunahme an Stress durch ROS zeigen und Lon die einzige bekannte Protease ist, die oxidativ-beschädigte Proteine abbauen kann (Ngo and Davies 2007; Bota, Van Remmen, and Davies 2002). Werden diese Proteine nicht zeitnah abgebaut besteht die Gefahr, dass diese modifizierten Proteine aggregieren (Bota, Van Remmen, and Davies 2002). Durch diese Aggregate verlieren Mitochondrien ihre Funktion, was zum Zelltod führen kann. Alternde Zellen zeigen zudem einen verlangsamten Abbau beschädigter Proteine und eine daraus resultierende Zunahme an mitochondrialen Aggregaten sowie der Apoptoserate (Bota, Van Remmen, and Davies 2002; Bota, Ngo, and Davies 2005). Die hier vorgestellten Lon gKD Zellen zeigten eine stabile Reduzierung der Lon-Proteinmenge und können sich, ähnlich der Adaption an das Alter, an diesen Verlust gewöhnen und sie durch Kompensierungs-mechanismen ausgleichen. In den früher verwendeten Modellen wurde die Lon Reduktion durch einen herkömmlichen siRNA Knockdown herbeigeführt. Die untersuchten Zellen hatten keine Möglichkeiten den Lon-Verlust auszugleichen und dienen daher nur unzureichend als Modell für Alterungsprozesse.

Die Lon gKD Zellen reagieren deutlich sensitiver auf den Stress durch ROS, produzieren weniger ATP und zeigen eine verringerte SOD2 Proteinmenge. In Muskelzellen alternder Mäuse wurde ebenfalls eine reduzierte Lon-Proteinmenge gefunden. Zudem zeigten Mäuse mit einer reduzierten SOD2 Proteinmenge ebenfalls eine verringerte Lon-Proteinmenge (Bota, Van Remmen, and Davies 2002). In alternden Ratten zeigte sich zwar keine Reduktion in der Lon-Proteinmenge, allerdings war die Aktivität von Lon reduziert was wiederum zu der Akkumulation von beschädigten Proteinen führt (Bakala et al. 2003).

Unabhängige Untersuchungen zeigen eine Reduktion von Lon während Alterungsprozessen, sowie eine Zunahme der Aggregation von beschädigten Proteinen. Zudem zeigen sich Ähnlichkeiten zwischen dem Mausmodellen und der humanen Lon gKD Zelllinie (Bota and Davies 2002; Bota, Van Remmen, and Davies 2002; Bota and Davies 2016; Erjavec et al. 2013). Daher bietet das vorgestellte Lon gKD Modell eine gute Möglichkeit, Alterungsprozessen am humanen Zellmodell zu untersuchen (Abb. 31).



**Abbildung 31: Lon gKD Zellen als zelluläres Alterungsmodell**

Gesunde Mitochondrien besitzen ein funktionierendes mtPQC-System mit Lon als wichtiger Matrix Protease. Lon schützt vor Proteinschäden, indem Lon diese Proteine zeitnah abbaut. In Alternden Zellen ist die Proteinmenge von Lon dauerhaft verringert. Der Verlust von Lon hat viele negativen Folgen. Im Alter erhöht sich der Stress durch ROS und die Proteinmenge von SOD2 ist verringert. Hierdurch kommt es zu einer Zunahme der Proteinschäden, was zu der Zunahme an Aggregaten führt, da die beschädigten Proteine nicht mehr zeitnah durch Lon abgebaut werden können. Zudem ist die Bildung von IMiQ-ähnlichen Aggregatablagerungen innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes verlangsamt. Als wichtiger Bestandteil des mtPQC-Systems führt der Verlust zu einer Verschlechterung der mtPQC Funktion.

## 6.5 Offene Fragen und Ausblicke

Das zelluläre Lon gKD Modell, welches in dieser Arbeit etabliert wurde, zeigt eine gute Möglichkeit die Abhängigkeit verschiedener mitochondrialer Prozesse von der Protease Lon zu untersuchen. Es existieren noch einige Abläufe und mitochondriale Funktionen, die noch untersucht werden könnten.

In dieser Arbeit wurde sowohl ein leichter Effekt von Lon auf die mitochondriale Translation beobachtet, zudem waren Komponenten der Translation in den Lon gKD Zellen herunterreguliert. Eine Frage ergibt sich aus diesen Beobachtungen: Ist neben der mitochondrialen Translation auch die Replikation und Transkription durch den Verlust von Lon verändert. Des Weiteren besteht die Überlegung, ob sich die Menge der mtDNA durch die Reduktion von Lon verändert und ob dies negative Auswirkungen haben könnte. Da dieses Modell eine verringerte ATP Konzentration aufweist, besteht weiterhin die Frage was diese Reduktion auslöst hat. Ursachen wie eine Änderung der metabolischen Funktion sowie Veränderung der mitochondrialen Respiration hierfür verantwortlich sein und sollte untersucht werden. Zudem sollte die Zusammensetzung der Atmungskett Komplexe analysiert werden, um mögliche Veränderungen durch die Änderung der Proteinmenge der Atmungskettenuntereinheiten nachzuweisen.

Da es durch den partiellen Verlust von Lon zu einer Veränderung des mitochondrialen Proteom gekommen ist, besteht die Vermutung, dass sich auch das restliche, zelluläre Proteom adaptiert hat. Daher könnte noch das restliche Proteom analysiert werden, ob zum Beispiel Effekte auf den Apoptose- oder Mitophagie-Regulationswege zu beobachten sind.

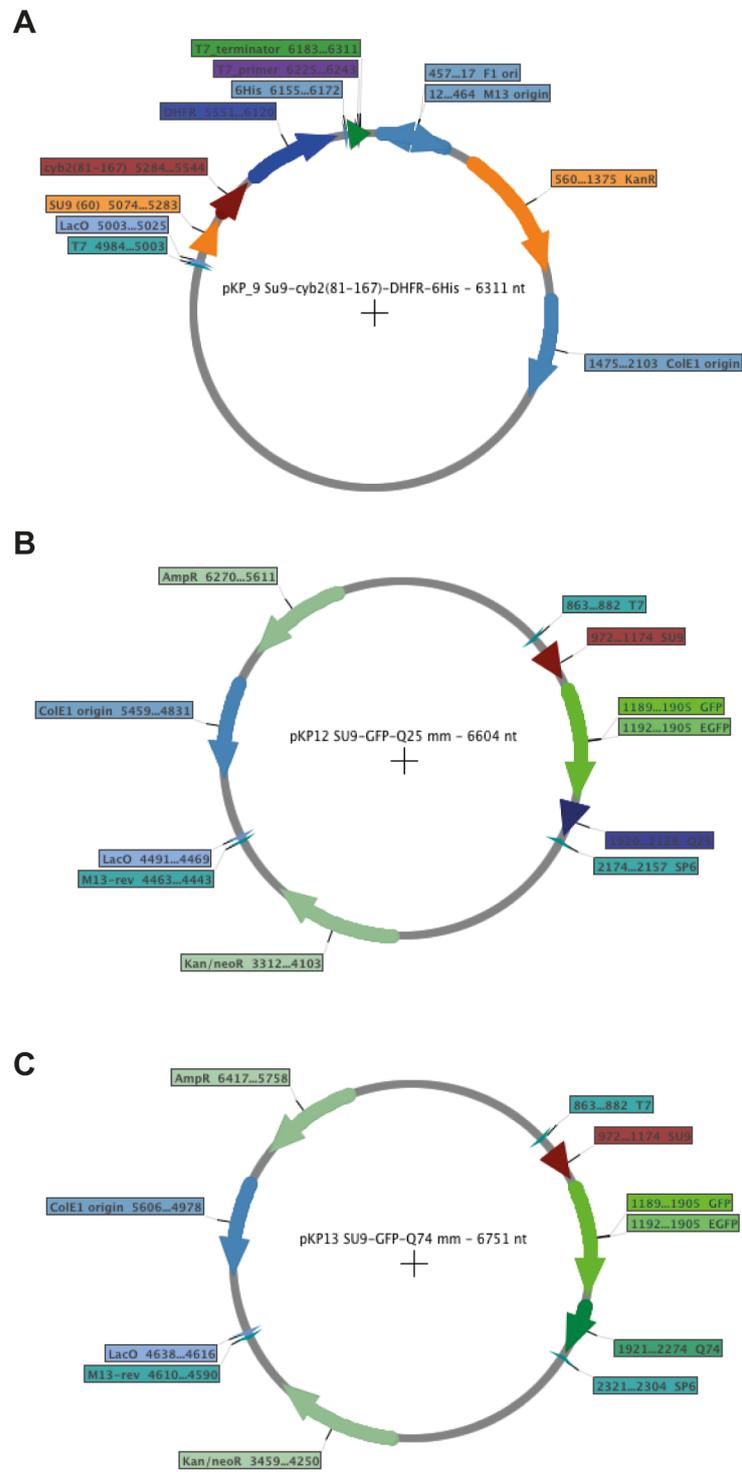
Eine weitere Frage, die nach der Analyse der Hitze-induzierten Aggregation aufkam war, inwiefern sich die Aggregation auf verschiedene zelluläre Prozesse auswirkt. Da bislang das Aggregationsverhalten in isolierten Mitochondrien untersucht wurde, könnte man dieses im gesamten zellulären System wiederholen. Gibt es hier besonders auffällige Änderungen der Proteostase oder werden Mitochondrien in gestressten Zellen häufiger abgebaut?

Die Abhängigkeit der Aggregatablagerung von Dynein sollte noch weitreichender analysiert werden, zumal dieses bislang nur in WT Zellen untersucht wurde. Hierfür bietet sich eher Ciliobrevin als Benomyl als Inhibitor an,

da die Schädigung des gesamten zellulären Systems durch Benomyl zu groß ist. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob die Bildung von IMiQs in humanen Zellen zu einem besseren Überleben der Zelle führt.

Eine Untersuchung dieser Fragestellungen würde zu einem besseren Verständnis der Lon Funktion in Alterungsprozessen und der damit verbundenen Akkumulation von Proteinaggregaten innerhalb von Mitochondrien führen.

# Anhang



(Beschriftung siehe S. 120)

**Abbildung S1: Plasmidekarten der erstellten Reporterprotein-Konstrukte**

**A** Plasmidkarte für pKP09, für das Reporterprotein Su9- $\Delta$ Cytb (62-167)-DHFR mit T7 Promotor für die *in vitro* Transkription in Kanninchen Reticulozyten Lysate (Promega). Plasmidkarte für pKP12 (**B**) und pKP13 (**C**), die das PolyQ-Reporterprotein für humane Expression durch den CMV Promotor kodieren. Die Konstrukte bestehen aus einer mitochondrialen Zielsequenz (MTS, engl.: mitochondrial targeting sequenz) der ATPase Untereinheit 9 (Su9) aus dem Organismus *Neurospora crassa*. Als Reporter besitzen die Konstrukte ein eGFP der Viktoriaqualle *Aequorea victoria* (engl.: enhanced green fluorescence protein) und das Huntingtin Exon 1 (Abb. 20A, rot) mit verschiedenen Glutamin-Wiederholungen von Q25 bzw. Q74. Alle Plasmide eine Kanamycin Resistenz (KanR) zur bakteriellen Selektion.

**Tabelle S1: Proteomänderung nach Lon gKD**

Änderung des Proteoms nach Lon gKD in isolierten Mitochondrien. Angegeben sind Name, Uniprot-ID, die mitochondriale Lokalisation (Lok), die Proteingröße sowie die Veränderung (log<sub>2</sub>).

Name	Uniprot ID	Beschreibung	Lok	Größe [kDa]	Änderung (log <sub>2</sub> )
UQCRHL	A0A096LP55	Cytochrome b-c1 complex subunit 6-like, mitochondrial	im	10.7	0.30
TMEM223	A0PJW6	Transmembrane protein 223	m	22	0.94
VWA8	A3KMH1	von Willebrand factor A domain-containing protein 8	o	214.7	-0.46
NUDT19	A8MXV4	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 19	o	42.2	0.25
SGK1	O00141	Serine/threonine-protein kinase Sgk1	m	48.9	0.94
HAX1	O00165	HCLS1-associated protein X-1	o	31.6	-0.20
NDUFS8	O00217	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	m	23.7	0.00
CLIC1	O00299	Chloride intracellular channel protein 1	o	26.9	0.49
PDHX	O00330	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	m	54.1	0.14
POLRMT	O00411	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial	m	138.5	-0.80
NDUFA4	O00483	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4	im	9.4	5.65
DDX3X	O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	om	73.2	0.24
ACACB	O00763	Acetyl-CoA carboxylase 2	om	276.4	-1.15
COX7R	O14548	Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein, mitochondrial	im	12.6	-1.30
BCKDK	O14874	[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase [lipoamide]] kinase, mitochondrial	m	46.3	1.04
TIM23	O14925	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23	im	21.9	0.63
UQCRCQ	O14949	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	im	9.9	1.08
RAB7L	O14966	Ras-related protein Rab-7L1	o	23.1	1.05
ATP2A1	O14983	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	o	110.2	0.12
MRPP3	O15091	Mitochondrial ribonuclease P catalytic subunit	m	67.3	0.82
DEGS1	O15121	Sphingolipid delta(4)-desaturase DES1	o	37.8	0.50
GNPAT	O15228	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase	o	77.1	-0.05
MRPS12	O15235	28S ribosomal protein S12, mitochondrial	im	15.2	-0.17
BCAT2	O15382	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	m	44.3	-0.05

CYB5B	O43169	Cytochrome b5 type B	om	16.3	-1.01
NDUFS4	O43181	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	im	20.1	0.88
EMC8	O43402	ER membrane protein complex subunit 8	o	23.8	0.00
HTRA2	O43464	Serine protease HTRA2, mitochondrial	ims	48.8	0.41
TIM44	O43615	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	im	51.3	-0.23
NDUFB5	O43674	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial	im	21.7	-0.26
NDUFB3	O43676	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3	im	11.4	0.87
MCAT	O43772	Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein	im	32.9	0.26
SCO2	O43819	Protein SCO2 homolog, mitochondrial	im	29.8	0.27
IDH3B	O43837	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial	m	42.2	0.49
NRD1	O43847	Nardilysin	m	131.5	-1.48
NDUFS5	O43920	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	im	12.5	-0.26
TIM8A	O60220	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A	im	11	0.28
OPA1	O60313	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	mt	111.6	0.57
KIF1B	O60333	Kinesin-like protein KIF1B	om	204.3	-1.79
FADS1	O60427	Fatty acid desaturase 1	m	51.9	0.16
PPL	O60437	Periplakin	o	204.6	-1.14
ACSL4	O60488	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	om	79.1	0.93
TIM17B	O60830	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17-B	im	18.3	-0.76
ABCB7	O75027	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial	im	82.6	0.65
PTCD1	O75127	Pentatricopeptide repeat-containing protein 1, mitochondrial	m	78.8	-0.15
HIP1R	O75146	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	o	119.3	-0.67
COQ9	O75208	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	im	35.5	0.07
NDUFS7	O75251	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	m	23.5	-2.05
NDUFS2	O75306	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	m	52.5	0.31
NIPSNAP2	O75323	Protein NipSnap homolog 2	om	33.7	-0.23
NDUFS6	O75380	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	im	13.7	0.22
CS	O75390	Citrate synthase, mitochondrial	m	51.7	0.40
MTX2	O75431	Metaxin-2	om	29.7	0.42
PMPCB	O75439	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	m	54.3	0.24
NDUFS3	O75489	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	m	30.2	0.26
ECI2	O75521	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	m	43.6	-0.31
MTRF1	O75570	Peptide chain release factor 1, mitochondrial	m	52.3	1.05
KBL	O75600	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial	im	45.3	-0.14
ERAL1	O75616	GTPase Era, mitochondrial	m	48.3	0.32
MTU1	O75648	Mitochondrial tRNA-specific 2-thiouridylase 1	m	47.7	-0.78
CMC1	O75746	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	im	74.7	0.28
IDH1	O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	m	46.6	0.21
GATB	O75879	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B, mitochondrial	m	61.8	-3.68
SCO1	O75880	Protein SCO1 homolog, mitochondrial	ims	33.8	0.28
ATP5H	O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial	im	18.5	0.23
ATP5L	O75964	ATP synthase subunit g, mitochondrial	im	11.4	0.00

CLPX	O76031	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	m	69.2	0.33
JTB	O76095	Protein JTB	o	16.3	-0.42
TOM70	O94826	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	om	67.4	0.34
GLSK	O94925	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	m	73.4	0.52
NDUFB6	O95139	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	im	15.5	0.69
MFN2	O95140	Mitofusin-2	om	86.3	0.65
NDUFB4	O95168	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	im	15.2	0.31
NDUFB8	O95169	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	im	21.8	-0.15
NDUFA7	O95182	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	im	12.5	-1.04
LETM1	O95202	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	im	83.3	0.33
NDUFA10	O95299	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	im	40.7	-0.25
SYFM	O95363	Phenylalanine--tRNA ligase, mitochondrial	m	52.3	-0.82
MPC2	O95563	Mitochondrial pyruvate carrier 2	im	14.3	4.25
ETHE1	O95571	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	m	27.9	0.14
ACSL3	O95573	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	om	80.4	0.30
CDS2	O95674	Phosphatidate cytidyltransferase 2	im	51.4	0.43
AIFM1	O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	ims	66.9	0.26
DDAH2	O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	m	29.6	0.35
TRUB2	O95900	Mitochondrial mRNA pseudouridine synthase TRUB2	m	36.7	0.30
NDUFB10	O96000	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	im	20.8	0.30
TOM40	O96008	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	om	37.9	0.12
GLUD1	P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	m	61.4	0.21
DHFR	P00374	Dihydrofolate reductase	m	21.4	0.51
NB5R3	P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3	om	34.2	0.23
GSHR	P00390	Glutathione reductase, mitochondrial	m	56.2	1.28
COX2	P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	im	25.5	1.45
GOT2	P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	m	47.5	0.11
ASS1	P00966	Argininosuccinate synthase	om	46.5	-0.41
NU4M	P03905	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	im	51.5	0.38
CAT	P04040	Catalase	o	59.7	0.36
SOD2	P04179	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	m	24.7	-0.53
OAT	P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	m	48.5	0.25
TYMS	P04818	Thymidylate synthase	im	35.7	-0.12
ARG1	P05089	Arginase-1	om	34.7	nd
ALDH2	P05091	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	m	56.3	0.44
ANT2	P05141	ADP/ATP translocase 2	im	32.8	0.36
PCCA	P05165	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	m	80	-0.12
PCCB	P05166	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	m	58.2	0.05
ATPB	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	m	56.5	0.14
QCR6	P07919	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	im	10.7	-0.82
FH	P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	m	54.6	0.17
HSP90B	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	o	83.2	0.02
PHE1A	P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	m	43.3	0.49
CYC1	P08574	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	im	35.4	0.37
MRPL3	P09001	39S ribosomal protein L3, mitochondrial	im	38.6	0.12
GSTP1	P09211	Glutathione S-transferase P	o	23.3	0.33
CNP	P09543	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	o	47.5	-0.29

DLDH	P09622	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	m	54.1	0.37
COX6C	P09669	Cytochrome c oxidase subunit 6C	im	8.8	0.04
PARP1	P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	m	113	-0.13
CISD3	P0C7P0	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 3, mitochondrial	m	14.2	3.14
HSP72	P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A	o	70	0.58
FDX1	P10109	Adrenodoxin, mitochondrial	m	19.4	0.35
ARAF	P10398	Serine/threonine-protein kinase A-Raf	o	67.5	nd
DLAT	P10515	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	m	69	0.22
COX5B	P10606	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	im	13.7	0.56
MGST1	P10620	Microsomal glutathione S-transferase 1	om	17.6	0.77
HSP60	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	m	61	0.27
CLUS	P10909	Clusterin	om	52.5	-0.04
PHE1B	P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	m	39.2	0.27
ODB2	P11182	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial	m	53.5	-0.08
MACAD	P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	m	46.6	-0.21
PYC	P11498	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	m	129.6	0.53
ANT1	P12235	ADP/ATP translocase 1	im	33	nd
ANT3	P12236	ADP/ATP translocase 3	im	32.8	0.36
CKMT	P12532	Creatine kinase U-type, mitochondrial	im	47	-1.79
ODBA	P12694	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial	m	50.4	0.24
UNG	P13051	Uracil-DNA glycosylase	o	34.6	0.70
COX4I1	P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	im	19.6	0.04
ETFA	P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	m	35.1	0.63
MTHFD2	P13995	Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial	m	37.9	0.70
UQCRB	P14927	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	im	13.5	0.19
NDPKA	P15531	PDZ domain-containing protein 8	om	17.1	0.76
ACADS	P16219	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	m	44.3	nd
GJA1	P17302	Gap junction alpha-1 protein	om	43	-0.47
NDUFB7	P17568	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	im	16.4	0.64
HK1	P19367	Hexokinase-1	om	102.4	0.69
NDUFV2	P19404	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	im	27.4	1.12
COX5A	P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	im	16.8	0.05
MAOA	P21397	Amine oxidase [flavin-containing] A	om	59.6	0.72
VDAC1	P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	om	30.8	0.19
SDHB	P21912	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	im	31.6	-0.30
ODBB	P21953	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	m	43.1	0.31
TGM2	P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	o	77.3	0.03
MUT	P22033	Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial	m	83.1	0.41
SCP2	P22307	Non-specific lipid-transfer protein	o	59	0.53
FDXR	P22570	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	im	53.8	-0.58
UQCRC2	P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	im	48.4	0.26
FECH	P22830	Ferrochelatase, mitochondrial	im	47.8	1.51

ME2	P23368	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	m	65.4	0.10
RPS3	P23396	40S ribosomal protein S3	m	26.7	0.25
GCSH	P23434	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	m	18.9	0.43
CPT2	P23786	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	im	73.7	-0.34
ATP5F1	P24539	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	im	28.9	-0.22
ACAT1	P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	m	45.2	0.23
MPST	P25325	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	m	33.2	0.02
TNR6	P25445	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6	o	37.7	1.39
ATPA	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	im	59.7	0.22
IVD	P26440	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	m	46.3	0.25
AK4	P27144	Adenylate kinase 4, mitochondrial	m	25.3	0.44
APEX1	P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	m	35.5	-0.37
NDUFS1	P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	im	79.4	0.17
ODPAT	P29803	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, testis-specific form, mitochondrial	m	42.9	0.48
AL4A1	P30038	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	m	61.7	-1.85
PRDX5	P30044	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	m	22.1	0.21
PRDX3	P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	m	27.7	0.06
ATPD	P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	im	17.5	5.17
ECHS1	P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	m	31.4	0.27
PPIF	P30405	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	im	22	0.48
AL1B1	P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	m	57.2	0.25
SDHA	P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	im	72.6	0.13
CPS1	P31327	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	im	164.8	-0.71
DNAJA1	P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1	m	44.8	-0.57
UQCRC1	P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	im	52.6	0.31
HIBADH	P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	m	35.3	-0.30
GK	P32189	Glycerol kinase 3	om	61.2	0.59
PYCR1	P32322	Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial	m	33.3	-0.06
ACSL1	P33121	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	om	77.9	0.34
DUT	P33316	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	m	26.5	0.01
SHMT2	P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	m	56	0.12
PHB	P35232	Prohibitin	im	29.8	-0.10
HMGCL	P35914	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	m	34.3	0.14
ATPG	P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	im	33	0.24
CPOX	P36551	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	ims	50.1	0.74
LONP1	P36776	Lon protease homolog, mitochondrial	m	106.4	-1.91
DLST	P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	m	48.7	0.07
ETFB	P38117	Electron transfer flavoprotein subunit beta	m	27.8	0.90
mtHSP70	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	m	73.6	0.18
MDH2	P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	m	35.5	0.23
HADHA	P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	m	82.9	0.38
PNPLA4	P41247	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 4	o	28	1.14
ECI1	P42126	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	m	32.8	-0.13
LRPPRC	P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	m	157.8	0.15
ACAA2	P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	m	41.9	0.30

GP2	P43304	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	im	80.8	0.56
TSFM	P43897	Elongation factor Ts, mitochondrial	m	35.4	0.35
VDAC2	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	om	31.5	0.15
ACADSB	P45954	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	m	47.5	-0.74
MTIF2	P46199	Translation initiation factor IF-2, mitochondrial	m	81.3	0.47
QARS	P47897	Glutamine--tRNA ligase	m	87.7	0.49
UQCRC1	P47985	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	im	29.6	0.06
ATPO	P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	im	23.3	0.11
IDH2	P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	m	50.9	0.01
NRAM2	P49281	Natural resistance-associated macrophage protein 2	om	62.2	-0.25
MRPL19	P49406	39S ribosomal protein L19, mitochondrial	m	33.5	0.10
TUFM	P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial	m	49.5	0.39
AL7A1	P49419	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	m	58.5	-0.26
GLUD2	P49448	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	m	61.4	0.22
HARS2	P49590	Probable histidine--tRNA ligase, mitochondrial	m	56.9	-0.05
ACADVL	P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	m	70.3	0.61
ACOT2	P49753	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	m	53.2	0.49
NDUFV1	P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	im	50.8	0.18
LIG3	P49916	DNA ligase 3	m	112.8	-0.10
IDH3A	P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	m	39.6	0.56
PPOX	P50336	Protoporphyrinogen oxidase	im	50.7	0.29
CPT1A	P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	om	88.3	0.25
DAP3	P51398	28S ribosomal protein S29, mitochondrial	m	45.5	0.23
IDH3G	P51553	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial	m	42.8	0.62
SSADH	P51649	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	m	57.2	1.05
NDUFA8	P51970	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	im	20.1	-0.12
HK2	P52789	Hexokinase-2	om	102.3	nd
MRPL12	P52815	39S ribosomal protein L12, mitochondrial	im	21.3	0.08
TXTP	P53007	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	im	34	0.20
SUCA	P53597	Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	m	36.2	0.13
CCHL	P53701	Cytochrome c-type heme lyase	im	30.6	0.33
POLG	P54098	DNA polymerase subunit gamma-1	m	139.5	-0.39
AK2	P54819	Adenylate kinase 2, mitochondrial	im	26.5	-0.08
P5CS	P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	im	87.2	0.09
P5CS	P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	o	51.3	0.25
SCOT	P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	m	56.1	-0.70
ATPK	P56134	ATP synthase subunit f, mitochondrial	im	10.9	-1.59
ATP5I	P56385	ATP synthase subunit e, mitochondrial	im	7.9	-0.83
NDUA6	P56556	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	im	15.1	0.15
SYNJ2BP	P57105	Synaptojanin-2-binding protein	om	15.9	0.85
ABCE1	P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1	m	67.3	-0.62
HSPE1	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	m	10.9	0.27
MRPS22	P82650	28S ribosomal protein S22, mitochondrial	im	41.3	0.21
MRPS25	P82663	28S ribosomal protein S25, mitochondrial	im	20.1	0.54
MRPS35	P82673	28S ribosomal protein S35, mitochondrial	im	36.8	0.39
MRPS5	P82675	28S ribosomal protein S5, mitochondrial	im	48	0.22

MRPS36	P82909	28S ribosomal protein S36, mitochondrial	im	11.5	-0.28
MRPS11	P82912	28S ribosomal protein S11, mitochondrial	im	20.6	-1.04
MRPS15	P82914	28S ribosomal protein S15, mitochondrial	im	29.8	0.58
MRPS21	P82921	28S ribosomal protein S21, mitochondrial	im	10.7	0.47
MRPS34	P82930	28S ribosomal protein S34, mitochondrial	im	25.6	0.19
MRPS6	P82932	28S ribosomal protein S6, mitochondrial	im	14.2	-0.64
MRPS9	P82933	28S ribosomal protein S9, mitochondrial	im	45.8	0.33
LACTB	P83111	Serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitochondrial	m	60.7	0.65
CYCS	P99999	Cytochrome c	ims	11.7	0.18
TFAM	Q00059	Transcription factor A, mitochondrial	m	29.1	0.06
MPCP	Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial	im	40.1	0.00
SORD	Q00796	Sorbitol dehydrogenase	o	38.3	-0.22
DHODH	Q02127	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial	im	42.8	0.25
OGDH	Q02218	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	m	115.9	0.08
MMSDH	Q02252	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	m	57.8	0.42
BDH1	Q02338	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	m	38.1	-0.63
FKBP4	Q02790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	?	51.8	0.10
SLC25A11	Q02978	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	im	34	0.26
SSBP1	Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	m	17.2	0.40
YWHAH	Q04917	14-3-3 protein eta	?	28.2	-0.29
FOLC	Q05932	Folylpolyglutamate synthase, mitochondrial	m	64.6	0.92
C1QBP	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	m	31.3	0.35
BAX	Q07812	Apoptosis regulator BAX	om	21.2	4.25
BCL2L1	Q07817	Bcl-2-like protein 1	o	26	0.36
PMPCA	Q10713	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	m	58.2	0.24
GRSF1	Q12849	G-rich sequence factor 1	m	53.1	0.38
TRAP1	Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	m	80.1	0.12
ECH1	Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	m	35.8	0.20
COASY	Q13057	Bifunctional coenzyme A synthase	m	62.3	0.09
MRPL28	Q13084	39S ribosomal protein L28, mitochondrial	im	30.1	0.01
MRPL49	Q13405	39S ribosomal protein L49, mitochondrial	im	19.2	0.22
NNT	Q13423	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	im	113.8	0.14
MTX1	Q13505	Metaxin-1	om	51.4	0.35
RAB32	Q13637	Ras-related protein Rab-32	om	25	0.41
AUH	Q13825	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial	m	35.6	-0.54
COX17	Q14061	Cytochrome c oxidase copper chaperone	ims	6.9	-0.36
MRPL58	Q14197	Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial	m	23.6	-0.80
ENDOG	Q14249	Endonuclease G, mitochondrial	m	32.6	0.69
FKBP8	Q14318	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8	o	44.5	0.35
GK3P	Q14409	Glycerol kinase 3	om	60.6	0.59
FASTKD3	Q14CZ7	FAST kinase domain-containing protein 3, mitochondrial	m	75.6	0.12
LARS2	Q15031	Probable leucine--tRNA ligase, mitochondrial	m	101.9	0.14
KARS	Q15046	Lysine--tRNA ligase	m	68	0.19
OXA1L	Q15070	Mitochondrial inner membrane protein OXA1L [Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)]	im	48.5	0.34
PDK1	Q15118	kinase isozyme 1, mitochondrial	m	49.2	0.91
PDK3	Q15120	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 3, mitochondrial	m	46.9	0.57
TOMM20	Q15388	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	om	16.3	4.90
MTFR1	Q15390	Mitochondrial fission regulator 1	o	37	1.77
SURF1	Q15526	Surfeit locus protein 1	ims	33.3	0.29

TOMM34	Q15785	Mitochondrial import receptor subunit TOM34	om	34.5	-0.44
ETFDH	Q16134	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	im	68.5	0.17
FXN	Q16595	Frataxin, mitochondrial	m	23.1	0.41
PDHK4	Q16654	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 4, mitochondrial	m	46.4	-1.99
CYP1B1	Q16678	Cytochrome P450 1B1	o	60.8	-1.34
DECR1	Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	m	36	0.33
NDUFA5	Q16718	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	im	13.5	-0.18
CLPP	Q16740	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial	m	30.2	-0.62
TST	Q16762	Thiosulfate sulfurtransferase	m	33.4	0.14
GLO2	Q16775	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	m	33.8	3.01
NDUFA9	Q16795	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	im	42.5	0.22
ME3	Q16798	NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial	m	67	1.70
PCK2	Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	m	70.7	-0.12
HADH	Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	m	34.3	-0.09
MIC60	Q16891	MICOS complex subunit MIC60	im	83.6	0.15
PGS1	Q32NB8	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase, mitochondrial	m	62.7	1.19
TRM5	Q32P41	tRNA (guanine(37)-N1)-methyltransferase	m	58.2	-0.77
NDUFAF6	Q330K2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 6	im	38.2	0.64
HSDL1	Q3SXM5	Inactive hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 1	o	37	1.89
ALDH1L2	Q3SY69	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	m	101.7	0.71
TIM50	Q3ZCQ8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	im	39.6	0.15
NADK2	Q4G0N4	NAD kinase 2, mitochondrial	m	49.4	-0.37
ACSF3	Q4G176	Acyl-CoA synthetase family member 3, mitochondrial	m	64.1	-0.57
CCDC58	Q4VC31	Coiled-coil domain-containing protein 58	o	16.6	0.45
AGK	Q53H12	Acylglycerol kinase, mitochondrial	im	47.1	0.01
LACTB2	Q53H82	Endoribonuclease LACTB2	m	32.8	-1.47
FASTKD1	Q53R41	FAST kinase domain-containing protein 1, mitochondrial	m	97.3	nd
MTX3	Q5HY17	Metaxin-3	om	35.1	0.56
COQ5	Q5HYK3	2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial	m	37.1	-1.78
EARS2	Q5JPH6	Probable glutamate--tRNA ligase, mitochondrial	m	58.7	0.05
PITRM1	Q5JRX3	Presequence protease, mitochondrial	m	117.3	0.37
COA6	Q5JTJ3	Cytochrome c oxidase assembly factor 6 homolog	ims	14.1	0.51
AARS2	Q5JTZ9	Alanine--tRNA ligase, mitochondrial	m	107.3	-0.33
SLC27A3	Q5K4L6	Long-chain fatty acid transport protein 3	o	78.6	-0.67
COX20	Q5RI15	Cytochrome c oxidase assembly protein COX20, mitochondrial	ims	13.3	-0.61
TIMM23B	Q5SRD1	Putative mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23B	im	28	0.63
VARS2	Q5ST30	Valine--tRNA ligase, mitochondrial	m	118.4	1.32
RARS2	Q5T160	Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial	m	65.5	0.41
THEM4	Q5T1C6	Acyl-coenzyme A thioesterase THEM4	m	27.1	0.55
CHCHD2P9	Q5T1J5	Putative coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein CHCHD2P9, mitochondrial	o	15.5	0.47
MRPL2	Q5T653	39S ribosomal protein L2, mitochondrial	m	33.3	-0.13
ATAD3B	Q5T9A4	ATPase family AAA domain-containing protein 3B	o	72.5	0.16

ATP11	Q5TC12	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	im	36.4	-0.11
NDUFAF5	Q5TEU4	Arginine-hydroxylase NDUFAF5, mitochondrial	im	38.9	nd
LYRM7	Q5U5X0	Complex III assembly factor LYRM7	im	11.9	0.10
MARC1	Q5VT66	Mitochondrial amidoxime-reducing component 1	o	37.5	0.29
KANK2	Q63ZY3	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2	o	91.1	-1.63
TTC19	Q6DKK2	Tetratricopeptide repeat protein 19, mitochondrial	im	42.4	-0.01
MRM1	Q6IN84	rRNA methyltransferase 1, mitochondrial	m	38.6	-0.07
ACAD10	Q6JQN1	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	m	118.8	-0.22
PDE12	Q6L8Q7	2',5'-phosphodiesterase 12	m	67.3	0.54
SLC25A24	Q6NUK1	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	im	53.3	0.05
HIBCH	Q6NVY1	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	m	43.5	-0.02
RPUSD3	Q6P087	Mitochondrial mRNA pseudouridine synthase RPUSD3	m	38.4	0.54
MRPL54	Q6P161	39S ribosomal protein L54, mitochondrial	m	15.8	3.44
MRPL14	Q6P1L8	39S ribosomal protein L14, mitochondrial	m	15.9	1.54
SFXN4	Q6P4A7	Sideroflexin-4	im	38	0.24
FDX2	Q6P4F2	Ferredoxin-2, mitochondrial	m	19.5	0.91
FAHD1	Q6P587	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	m	24.8	0.15
DARS2	Q6PI48	Aspartate--tRNA ligase, mitochondrial	m	73.5	0.33
TMEM65	Q6PI78	Transmembrane protein 65	im	25.5	-3.12
C1TM	Q6UB35	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	m	105.7	0.04
MIC27	Q6UXV4	MICOS complex subunit MIC27	im	29.1	0.56
COX15	Q7KZN9	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog	im	46	1.25
TM10C	Q7L0Y3	tRNA methyltransferase 10 homolog C	m	47.3	0.50
DHX30	Q7L2E3	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	m	133.9	0.38
ARMX2	Q7L311	Armadillo repeat-containing X-linked protein 2	o	65.6	-0.13
PARS2	Q7L3T8	Probable proline--tRNA ligase, mitochondrial	m	53.2	-3.20
NDUFAF7	Q7L592	Protein arginine methyltransferase NDUFAF7, mitochondrial	im	49.2	0.34
FAKD5	Q7L8L6	FAST kinase domain-containing protein 5, mitochondrial	m	86.5	0.17
MRPL21	Q7Z2W9	39S ribosomal protein L21, mitochondrial	im	22.8	0.26
GLUCM	Q7Z3D6	D-glutamate cyclase, mitochondrial	m	66.4	0.74
DHX29	Q7Z478	ATP-dependent RNA helicase DHX29	m	155.1	-0.37
MTERF4	Q7Z6M4	Transcription termination factor 4, mitochondrial	m	43.9	0.52
MRPL55	Q7Z7F7	39S ribosomal protein L55, mitochondrial	im	15.1	0.22
MRPL10	Q7Z7H8	39S ribosomal protein L10, mitochondrial	im	29.3	0.27
COXM1	Q7Z7K0	COX assembly mitochondrial protein homolog	ims	12.5	0.64
GLRX5	Q86SX6	Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial	m	16.6	0.30
BPHL	Q86WA6	Valacyclovir hydrolase	m	32.5	-0.11
TMEM173	Q86WV6	STimulator of interferon genes protein	om	42.2	-0.44
DLP1	Q86YH6	Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 2	m	44.1	0.30
TMEM126B	Q8IUX1	Complex I assembly factor TMEM126B, mitochondrial	im	25.9	1.20
MCAT MT	Q8IVS2	Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial	m	42.9	0.06
MFN1	Q8IWA4	Mitofusin-1	om	84.1	1.06
HSCB	Q8IWL3	Iron-sulfur cluster co-chaperone protein HscB, mitochondrial	m	27.4	3.59
RHOT2	Q8IXI1	Mitochondrial Rho GTPase 2	om	68.1	-0.14
RHOT1	Q8IXI2	Mitochondrial Rho GTPase 1	om	70.7	1.00
MSRB3	Q8IXL7	Methionine-R-sulfoxide reductase B3	m	20.7	0.13
MRPL41	Q8IXM3	39S ribosomal protein L41, mitochondrial	m	15.4	-0.87
SUV3	Q8IYB8	ATP-dependent RNA helicase SUPV3L1, mitochondrial	m	87.9	0.32

MICU2	Q8IYU8	Calcium uptake protein 2, mitochondrial	im	49.6	0.44
CLYBL	Q8N0X4	Citramalyl-CoA lyase, mitochondrial	m	37.3	-0.71
NDUFAF2	Q8N183	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 2	im	19.8	-0.31
SLC35F6	Q8N357	Solute carrier family 35 member F6	o	40.2	-0.03
MIA40	Q8N4Q1	Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40	ims	16	0.12
CBR4	Q8N4T8	Carbonyl reductase family member 4	m	25.3	nd
MRPL50	Q8N5N7	39S ribosomal protein L50, mitochondrial	im	18.3	0.63
MCATL	Q8N8R3	Mitochondrial basic amino acids transporter	im	32	-0.16
MRPL43	Q8N983	39S ribosomal protein L43, mitochondrial	im	23.4	0.03
SPATA5	Q8NB90	Spermatogenesis-associated protein 5	o	97.8	-0.23
RDH13	Q8NBN7	Retinol dehydrogenase 13	im	35.9	0.12
NOA1	Q8NC60	Nitric oxide-associated protein 1	im	78.4	-0.15
PDPR	Q8NCN5	Pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit, mitochondrial	m	99.3	-0.05
NNRE	Q8NCW5	NAD(P)H-hydrate epimerase	m	31.7	-0.17
MCU	Q8NE86	Calcium uniporter protein, mitochondrial	im	39.8	0.32
PDZD8	Q8NEN9	PDZ domain-containing protein 8	o	128.5	1.11
FLAD1	Q8NFF5	FAD synthase	m	65.2	-0.17
ABHD11	Q8NFV4	Protein ABHD11	?	34.7	4.79
COQ8A	Q8NI60	Atypical kinase COQ8A, mitochondrial	m	71.9	0.75
GRPEL2	Q8TAA5	GrpE protein homolog 2, mitochondrial	m	25.4	4.50
PLINP1	Q8TAE8	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	m	25.4	-0.57
GDAP1	Q8TB36	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	om	41.3	0.85
NUBPL	Q8TB37	Iron-sulfur protein NUBPL	m	34.1	0.01
SLC25A40	Q8TBP6	Solute carrier family 25 member 40	im	38.1	0.01
MRPL30	Q8TCC3	39S ribosomal protein L30, mitochondrial	im	18.5	nd
PNPT1	Q8TCS8	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	m	85.9	0.31
PTPMT1	Q8WUK0	Phosphatidylglycerophosphatase and protein-tyrosine phosphatase 1	im	22.8	1.59
PTCD2	Q8WV60	Pentatricopeptide repeat-containing protein 2, mitochondrial	m	43.9	-0.10
TFB1M	Q8WVM0	Dimethyladenosine transferase 1, mitochondrial	m	39.5	0.17
MAIP1	Q8WWC4	m-AAA protease-interacting protein 1, mitochondrial	im	32.5	0.31
CTL1	Q8WWI5	Choline transporter-like protein 1	om	73.3	-0.31
RTN4IP1	Q8WWV3	Reticulon-4-interacting protein 1, mitochondrial	om	43.6	-0.08
BRI3BP	Q8WY22	BRI3-binding protein	om	27.8	-0.05
DHB8	Q92506	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	m	27	0.02
MRPS27	Q92552	28S ribosomal protein S27, mitochondrial	m	47.6	0.28
MRPS31	Q92665	28S ribosomal protein S31, mitochondrial	m	45.3	-0.34
AKAP1	Q92667	A-kinase anchor protein 1, mitochondrial	om	97.3	0.34
BAD	Q92934	Bcl2-associated agonist of cell death	om	18.4	0.41
GCDH	Q92947	Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	m	48.1	0.14
RRF2M	Q969S9	Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial	m	86.5	0.49
MUL1	Q969V5	Mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFKB 1	m	39.8	2.20
FASTKD4	Q969Z0	FAST kinase domain-containing protein 4	m	70.7	0.28
FAM162A	Q96A26	Protein FAM162A	om	17.3	-0.40
MRPL24	Q96A35	39S ribosomal protein L24, mitochondrial	m	24.9	-0.05
TB1	Q96AG3	Solute carrier family 25 member 46	om	46.1	0.41
MCUR1	Q96AQ8	Mitochondrial calcium uniporter regulator 1	im	39.7	0.50
CHCHD1	Q96BP2	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 1	m	13.5	0.20
COA7	Q96BR5	Cytochrome c oxidase assembly factor 7	im	25.7	0.45
TAM41	Q96BW9	Phosphatidate cytidyltransferase, mitochondrial	im	51	-0.11
PYCR2	Q96C36	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	m	33.6	0.32

NSUN4	Q96CB9	5-methylcytosine rRNA methyltransferase NSUN4	m	43.1	0.64
RPUSD4	Q96CM3	Mitochondrial RNA pseudouridine synthase RPUSD4	m	42.2	0.31
ACSF2	Q96CM8	Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial	m	68.1	2.03
FOXRED1	Q96CU9	FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1	im	53.8	0.59
COQ8B	Q96D53	Atypical kinase COQ8B, mitochondrial	m	60	0.18
TIM14	Q96DA6	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14	im	12.5	0.93
ECHDC3	Q96DC8	Enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 3, mitochondrial	m	32.6	0.13
FMT1	Q96DP5	Methionyl-tRNA formyltransferase, mitochondrial	m	43.8	1.20
MRPL38	Q96DV4	39S ribosomal protein L38, mitochondrial	m	44.6	-0.15
MRRF	Q96E11	Ribosome-recycling factor, mitochondrial	m	29.3	0.38
MTERF3	Q96E29	Transcription termination factor 3, mitochondrial	m	47.9	1.13
MALSU1	Q96EH3	Mitochondrial assembly of ribosomal large subunit protein 1	m	26.2	0.18
MRPS24	Q96EL2	28S ribosomal protein S24, mitochondrial	m	19	0.19
MRPL53	Q96EL3	39S ribosomal protein L53, mitochondrial	m	12.1	4.49
DNAJA3	Q96EY1	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	m	52.5	0.33
MRPS39	Q96EY7	Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	m	78.5	0.28
MMAB	Q96EY8	Cob(1)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase, mitochondrial	m	27.4	0.05
MRPL48	Q96GC5	39S ribosomal protein L48, mitochondrial	im	23.9	0.27
MARS2	Q96GW9	Methionine--tRNA ligase, mitochondrial	m	66.5	-0.07
MYO19	Q96H55	Unconventional myosin-XIX	om	109.1	-0.27
OXNAD1	Q96HP4	Oxidoreductase NAD-binding domain-containing protein 1	om	34.8	1.11
PGAM5	Q96HS1	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	om	32	0.15
DHTKD1	Q96HY7	Probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1, mitochondrial	m	103	-0.20
NARS2	Q96I59	Probable asparagine--tRNA ligase, mitochondrial	m	54.1	0.17
SUCLG2	Q96I99	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	m	46.5	0.23
USMG5	Q96IX5	Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5	m	6.5	7.77
FAM210B	Q96KR6	Protein FAM210B, mitochondrial	om	20.4	-0.60
DNAJC30	Q96LL9	DnaJ homolog subfamily C member 30	im	25.9	2.71
FAM210A	Q96ND0	Protein FAM210A	o	30.8	0.48
MCEE	Q96PE7	Methylmalonyl-CoA epimerase, mitochondrial	m	18.7	-2.88
TRNT1	Q96Q11	CCA tRNA nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	m	50.1	0.29
TEFM	Q96QE5	Transcription elongation factor, mitochondrial	m	41.7	-0.14
EFG	Q96RP9	Elongation factor G, mitochondrial	m	83.4	0.45
MCCA	Q96RQ3	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	m	80.4	0.11
TWINK	Q96RR1	Twinkle protein, mitochondrial	m	77.1	0.36
CDK5RAP1	Q96SZ6	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1	o	67.6	0.83
YME1L1	Q96TA2	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1L1	ims	86.4	0.13
RMDN3	Q96TC7	Regulator of microtubule dynamics protein 3	ims	52.1	0.00
PARK7	Q99497	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	o	19.9	0.84
VAT1	Q99536	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	om	41.9	-0.28
TIM17	Q99595	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17-A	im	18	0.20
PHB2	Q99623	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens	im	33.3	-0.15
HSD17B10	Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	m	26.9	0.19

TXN2	Q99757	Thioredoxin, mitochondrial	m	18.4	0.97
ATP5S	Q99766	ATP synthase subunit s, mitochondrial	im	24.9	nd
MIPEP	Q99797	Mitochondrial intermediate peptidase	ims	80.6	-0.86
ACO2	Q99798	Aconitate hydratase, mitochondrial	m	85.4	0.06
COQ7	Q99807	5-demethoxyubiquinone hydroxylase, mitochondrial	im	24.3	nd
RNF5	Q99942	E3 ubiquitin-protein ligase RNF5	o	19.9	0.42
MICU1	Q9BPX6	Calcium uptake protein 1, mitochondrial	im	54.3	0.20
ELAC2	Q9BQ52	Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2	m	92.2	0.32
ECSIT	Q9BQ95	Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial	im	49.1	0.21
MRPL57	Q9BQC6	Ribosomal protein 63, mitochondrial	im	12.3	0.41
MGME1	Q9BQP7	Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1	m	39.4	-0.03
MRPL45	Q9BRJ2	39S ribosomal protein L45, mitochondrial	im	35.3	0.32
MIC25	Q9BRQ6	MICOS complex subunit MIC25	im	26.4	0.65
AIFM2	Q9BRQ8	Apoptosis-inducing factor 2	om	40.5	-0.46
UQCC2	Q9BRT2	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2	o	14.9	0.33
AGMAT	Q9BSE5	Agmatinase, mitochondrial	o	37.6	0.09
TIM29	Q9BSF4	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim29	im	29.2	-0.50
TACO1	Q9BSH4	Translational activator of cytochrome c oxidase 1	m	32.5	0.51
MTG1	Q9BT17	Mitochondrial ribosome-associated GTPase 1	m	37.2	0.21
TMEM70	Q9BUB7	Transmembrane protein 70, mitochondrial	im	29	-0.77
EFHD1	Q9BUP0	EF-hand domain-containing protein D1	im	26.9	0.47
MIC23	Q9BUR5	MICOS complex subunit MIC26	im	22.3	-0.43
ABHD6	Q9BV23	Monoacylglycerol lipase ABHD6	o	38.3	-0.07
MECR	Q9BV79	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondrial	m	40.4	0.02
TRMT61B	Q9BVS5	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase, mitochondrial	m	52.9	0.28
TIM21	Q9BVV7	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21	im	28.2	4.90
NUDT9	Q9BW91	ADP-ribose pyrophosphatase, mitochondrial	m	39.1	0.19
TARS2	Q9BW92	Threonine--tRNA ligase, mitochondrial	m	81	0.18
FUNDC2	Q9BWH2	FUN14 domain-containing protein 2	om	20.7	0.36
SFXN3	Q9BWM7	Sideroflexin-3	o	35.5	0.55
HINT2	Q9BX68	Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	o	17.2	0.83
RAB11FIP5	Q9BXF6	Rab11 family-interacting protein 5	om	70.4	-0.38
BCL2L13	Q9BXK5	Bcl-2-like protein 13	om	52.7	0.17
HDHD5	Q9BXW7	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing 5	o	46.3	0.37
MRPL20	Q9BYC9	39S ribosomal protein L20, mitochondrial	im	17.4	-0.10
MRPL13	Q9BYD1	39S ribosomal protein L13, mitochondrial	im	20.7	0.02
MRPL9	Q9BYD2	39S ribosomal protein L9, mitochondrial	im	30.2	-0.35
MRPL4	Q9BYD3	39S ribosomal protein L4, mitochondrial	im	34.9	0.04
MRPL1	Q9BYD6	39S ribosomal protein L1, mitochondrial	im	36.9	0.36
MRPS26	Q9BYN8	28S ribosomal protein S26, mitochondrial	im	24.2	0.58
NLN	Q9BYT8	Neurolysin, mitochondrial	ims	80.6	0.57
MRPL37	Q9BZE1	39S ribosomal protein L37, mitochondrial	im	48.1	0.22
SLIRP	Q9GZT3	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	m	12.3	0.13
COA1	Q9GZY4	Cytochrome c oxidase assembly factor 1 homolog	im	16.7	2.85
MFF	Q9GZY8	Mitochondrial fission factor	om	38.4	1.24
MTFR1L	Q9H019	Mitochondrial fission regulator 1-like	om	31.9	0.29
TMEM126A	Q9H061	Transmembrane protein 126A	im	21.5	0.69
CLPB	Q9H078	Caseinolytic peptidase B protein homolog	m	78.7	0.09
QRSL1	Q9H0R6	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A, mitochondrial	m	57.4	3.11

MRPL18	Q9H0U6	39S ribosomal protein L18, mitochondrial	im	20.6	0.13
ISCU	Q9H1K1	Iron-sulfur cluster assembly enzyme ISCU, mitochondrial	m	18	-0.45
SLC25A18	Q9H1K4	Mitochondrial glutamate carrier 2	im	33.8	0.32
MFT	Q9H2D1	Mitochondrial folate transporter/carrier	im	35.4	0.82
PPA2	Q9H2U2	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	m	37.9	0.17
MRPL46	Q9H2W6	39S ribosomal protein L46, mitochondrial	im	31.7	0.33
TRIT1	Q9H3H1	tRNA dimethylallyltransferase	m	52.7	-0.82
GHITM	Q9H3K2	Growth hormone-inducible transmembrane protein	im	37.2	1.08
OSGEPL1	Q9H4B0	Probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase, mitochondrial	m	45.1	0.33
TFB2M	Q9H5Q4	Dimethyladenosine transferase 2, mitochondrial	m	45.3	0.64
OPA3	Q9H6K4	Optic atrophy 3 protein	o	20	-1.66
METTL17	Q9H7H0	Methyltransferase-like protein 17, mitochondrial	m	50.7	-0.65
ACAD9	Q9H845	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	im	68.7	0.38
SLC25A22	Q9H936	Mitochondrial glutamate carrier 1	im	34.4	0.20
SFXN1	Q9H9B4	Sideroflexin-1	o	35.6	0.30
MRPL44	Q9H9J2	39S ribosomal protein L44, mitochondrial	im	37.5	0.03
L2HGDH	Q9H9P8	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial	im	50.3	0.06
CARS2	Q9HA77	Probable cysteine--tRNA ligase, mitochondrial	m	62.2	-0.35
GRPEL1	Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	m	24.3	0.59
MYG1	Q9HB07	UPF0160 protein MYG1, mitochondrial	o	42.4	-0.05
SLC25A19	Q9HC21	Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier	im	35.5	-0.39
MRM3	Q9HC36	rRNA methyltransferase 3, mitochondrial	m	47	0.26
GLOD4	Q9HC38	Glyoxalase domain-containing protein 4	o	34.8	-0.02
MCCC2	Q9HCC0	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	m	61.3	0.17
MRPL47	Q9HD33	39S ribosomal protein L47, mitochondrial	im	29.4	0.17
TXNRD2	Q9NNW7	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	m	56.5	0.18
ABCB6	Q9NP58	ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial	om	93.8	0.53
SARS2	Q9NP81	Serine--tRNA ligase, mitochondrial	m	58.2	0.15
MRPS30	Q9NP92	39S ribosomal protein S30, mitochondrial	im	50.3	0.06
TIMMDC1	Q9NPL8	Complex I assembly factor TIMMDC1, mitochondrial	im	32.2	nd
MRPL40	Q9NQ50	39S ribosomal protein L40, mitochondrial	im	24.5	0.03
XPNPEP3	Q9NQH7	Xaa-Pro aminopeptidase 3	o	57	-0.34
DIABLO	Q9NR28	Diablo homolog, mitochondrial	ims	27.1	0.41
ABCB10	Q9NRK6	ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial	im	79.1	-0.16
MRPL17	Q9NRX2	39S ribosomal protein L17, mitochondrial	im	20	0.12
PLSCR3	Q9NRY6	Phospholipid scramblase 3	ims	31.6	-0.55
GLRX2	Q9NS18	Glutaredoxin-2, mitochondrial	m	18	0.49
TOM22	Q9NS69	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	om	15.5	0.12
IARS2	Q9NSE4	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	m	113.7	0.17
ECHDC1	Q9NTX5	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase	m	33.7	0.01
ABHD10	Q9NUJ1	Mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase, mitochondrial	m	33.9	0.30
DDX28	Q9NUL7	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX28	m	59.5	0.05
UQCC1	Q9NVA1	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1	im	34.6	0.50
DNAJC11	Q9NVH1	DnaJ homolog subfamily C member 11	im	63.2	0.26
TMLHE	Q9NVH6	Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial	m	49.5	-0.44
ATAD3A	Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	im	71.3	-0.08
MRPS18A	Q9NVS2	39S ribosomal protein S18a, mitochondrial	im	22.2	-0.26
MTPAP	Q9NVV4	Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial	m	66.1	0.65
DMAC2	Q9NW81	Distal membrane-arm assembly complex protein 2	im	29.2	1.29

MCUB	Q9NWR8	Calcium uniporter regulatory subunit MCUB, mitochondrial	im	39.1	-0.71
RMND1	Q9NWS8	Required for meiotic nuclear division protein 1 homolog	m	51.6	0.21
AURKAIP1	Q9NWT8	Aurora kinase A-interacting protein	m	22.3	0.11
OXSM	Q9NWU1	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial	m	48.8	0.17
MRPL22	Q9NWU5	39S ribosomal protein L22, mitochondrial	im	23.6	-0.55
NDUFB11	Q9NX14	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial	im	17.3	0.48
SDHAF2	Q9NX18	Succinate dehydrogenase assembly factor 2, mitochondrial	m	19.6	0.80
MRPL16	Q9NX20	39S ribosomal protein L16, mitochondrial	im	28.4	0.06
ADPRHL2	Q9NX46	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3	m	38.9	0.30
MARCH5	Q9NX47	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH5	om	31.2	0.41
CHCHD3	Q9NX63	MICOS complex subunit MIC19	im	26.1	0.17
MRPL39	Q9NYK5	39S ribosomal protein L39, mitochondrial	im	38.7	0.06
FASTKD2	Q9NYY8	FAST kinase domain-containing protein 2, mitochondrial	m	81.4	0.40
CISD1	Q9NZ45	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	om	12.2	0.31
MRPL35	Q9NZE8	39S ribosomal protein L35, mitochondrial	im	21.5	0.55
COQ3	Q9NZJ6	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase, mitochondrial	m	41	0.03
MTCH1	Q9NZJ7	Mitochondrial carrier homolog 1	im	41.5	-0.14
MRPL15	Q9P015	39S ribosomal protein L15, mitochondrial	im	33.4	0.37
NDUFAF4	Q9P032	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 4	im	20.3	-0.48
HACD3	Q9P035	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	m	43.1	0.23
NDUFA13	Q9P0J0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	im	16.7	-0.37
PDP1	Q9P0J1	[Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]]-phosphatase 1, mitochondrial	m	61	0.86
MRPL27	Q9P0M9	39S ribosomal protein L27, mitochondrial	im	16.1	-0.18
C6orf203	Q9P0P8	Uncharacterized protein C6orf203	o	27.9	-1.45
COX16	Q9P0S2	Cytochrome c oxidase assembly protein COX16 homolog, mitochondrial	im	12.3	nd
TMEM14C	Q9P0S9	Transmembrane protein 14C	ims	11.6	nd
SUCLA2	Q9P2R7	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	m	50.3	-0.60
SLC25A10	Q9UBX3	Mitochondrial dicarboxylate carrier	im	31.3	0.07
AASS	Q9UDR5	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial	m	102.1	-1.26
MTFP1	Q9UDX5	Mitochondrial fission process protein 1	im	18	0.64
WARS2	Q9UGM6	Tryptophan--tRNA ligase, mitochondrial	m	40.1	0.16
ARMCX3	Q9UH62	Armadillo repeat-containing X-linked protein 3	om	42.5	0.17
AMACR	Q9UHK6	Alpha-methylacyl-CoA racemase	m	42.4	-0.46
CYB5R1	Q9UHQ9	NADH-cytochrome b5 reductase 1	m	34.1	0.36
NDUFA12	Q9UI09	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	im	17.1	-0.27
MRM2	Q9UI43	rRNA methyltransferase 2, mitochondrial	m	27.4	nd
ATPIF1	Q9UII2	ATPase inhibitor, mitochondrial	im	12.2	-0.48
AK3	Q9UIJ7	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	m	25.6	0.25
SLC25A13	Q9UJS0	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	im	74.1	0.09
STOML2	Q9UJZ1	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	im	38.5	0.21
OGDHL	Q9ULD0	2-oxoglutarate dehydrogenase-like, mitochondrial	m	114.4	0.15
NFU1	Q9UMS0	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial	m	28.4	0.75
SPG7	Q9UQ90	Paraplegin	im	88.2	0.03

BCS1	Q9Y276	Mitochondrial chaperone BCS1	ims	47.5	0.62
VDAC3	Q9Y277	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	om	30.6	0.41
MRPS33	Q9Y291	28S ribosomal protein S33, mitochondrial	im	12.6	-0.12
EXOG	Q9Y2C4	Nuclease EXOG, mitochondrial	im	41.1	-0.12
MRPS28	Q9Y2Q9	28S ribosomal protein S28, mitochondrial	im	20.8	0.68
COA3	Q9Y2R0	Cytochrome c oxidase assembly factor 3 homolog, mitochondrial	im	11.7	1.44
MRPS17	Q9Y2R5	28S ribosomal protein S17, mitochondrial	im	14.5	-0.05
MRPS7	Q9Y2R9	28S ribosomal protein S7, mitochondrial	im	28.1	0.32
POLDIP2	Q9Y2S7	Polymerase delta-interacting protein 2	m	42	0.37
MTO1	Q9Y2Z2	Protein MTO1 homolog, mitochondrial	m	79.9	0.12
YARS2	Q9Y2Z4	Tyrosine--tRNA ligase, mitochondrial	m	53.2	0.24
COQ6	Q9Y2Z9	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondrial	m	50.8	-0.19
ACOT9	Q9Y305	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	m	49.9	0.82
NDUFAF1	Q9Y375	Complex I intermediate-associated protein 30, mitochondrial	im	37.7	0.50
MRPS2	Q9Y399	28S ribosomal protein S2, mitochondrial	im	33.2	0.43
MRPL11	Q9Y3B7	39S ribosomal protein L11, mitochondrial	im	20.7	-0.27
REXO2	Q9Y3B8	Oligoribonuclease, mitochondrial	m	26.8	0.10
MSRB2	Q9Y3D2	Methionine-R-sulfoxide reductase B2, mitochondrial	m	19.5	0.43
MRPS16	Q9Y3D3	28S ribosomal protein S16, mitochondrial	im	15.3	0.91
FIS1	Q9Y3D6	Mitochondrial fission 1 protein	om	16.9	0.96
PAM16	Q9Y3D7	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM16	im	13.8	0.31
MRPS23	Q9Y3D9	28S ribosomal protein S23, mitochondrial	m	21.8	0.20
PTRH2	Q9Y3E5	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	m	19.2	0.29
AFG3L2	Q9Y4W6	AFG3-like protein 2	im	88.5	0.19
SAM50	Q9Y512	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	om	51.9	0.05
TIM22	Q9Y584	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim22	im	20	0.35
TIM10B	Q9Y5J6	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10 B	im	11.6	0.71
TIM13	Q9Y5L4	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13	im	10.5	-0.26
DNAJC15	Q9Y5T4	DnaJ homolog subfamily C member 15	im	16.4	-0.19
FLVCR1	Q9Y5Y0	Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1	ims	59.8	0.26
PUS1	Q9Y606	tRNA pseudouridine synthase A	m	47.4	0.34
SLC25A15	Q9Y619	Mitochondrial ornithine transporter 1	im	32.7	-0.36
MRPS18B	Q9Y676	28S ribosomal protein S18b, mitochondrial	im	29.4	0.24
CLIC4	Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4	om	28.8	-0.33
NFS1	Q9Y697	Cysteine desulfurase, mitochondrial	m	50.2	-0.14
MTCH2	Q9Y6C9	Mitochondrial carrier homolog 2	im	33.3	0.26
MRPL42	Q9Y6G3	39S ribosomal protein L42, mitochondrial	im	16.7	0.38
CHCHD2	Q9Y6H1	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2	ims	15.5	0.56
NDUFB9	Q9Y6M9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	im	21.8	0.16
SQOR	Q9Y6N5	Sulfide: quinone oxidoreductase, mitochondrial	im	49.9	0.66

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
[ <sup>35</sup> S]	radioaktives Schwefelisotop
°C	Grad Celsius
α-	Anti- / Gegen
AAA+	engl.: ATPase associated activity, with a wide variety of cellular functions
AASS	engl.: Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial
Abb.	Abbildung
ACADM	engl.: Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
ACAT1	engl.: Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial
Aco2	Aconitase 2
ACSF2	engl.: Medium-chain acyl-CoA ligase ACSF2, mitochondrial
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Aggregationsfaktor
AFG3L2	engl.: AFG3-like protein 2 (Paraplegin-like protein)
AGG	Aggregation
AmpR	Amphicillin-Resistenz
APEX1	engl.: DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATPD	engl.: ATP synthase subunit delta, mitochondrial
AVO	AnTimycin A, Valinomycin, Oligomycin
BAX	engl.: Apoptosis regulator BAX (Bcl-2-like protein 4)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	Beziehungsweise
c	engl.: cytosolic
CII	engl.: respiratory chain complex II
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cas9	engl.: CRISPR-associated endonuclease 9
CCDC58	engl.: coiled-coil domain-containing protein 58
CHCHD1	engl.: coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 1
Chl <sub>a</sub>	Chloramphenicol
Chx	Cycloheximid
CK	Kreatinkinase (engl.: Creatinekinase)
CLPB	engl.: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpB-like, mitochondrial
CLPP	engl.: ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial
CLPX	engl.: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial
CMV	humaner Cytomegalovirus
COA6	engl.: Cytochrome c oxidase assembly factor 6 homolog

COII/III	engl.: Cytochrome c oxidase subunit 2/3
CODAS	engl.: cerebral, ocular, dental, auricular, skeletal
COQ6	engl.: Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondrial
COX20	engl.: Cytochrome c oxidase assembly protein COX20, mitochondrial
CP	Kreatinphosphat (engl.: Creatine phosphate)
cQ115	Huntingtin Exon 1 mit 115 Glutamin Wiederholungen, c engl.: cytosolic
CRISPR	engl.: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cytb	Cytochrom b
Δ	Delta
Da	Dalton
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylidol
DDAH2	engl.: N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAJA3	engl.: DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial
DNAJC19	engl.: Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14
DSB	Doppelstrangbruch
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4- Dithiothreitol
Δψ	mitochondriales Membranpotential
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFG	engl.: Elongation factor G, mitochondrial
eGFP	engl.: Enhanced Green Fluorescent Protein
engl.:	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Degradation
ERQC	engl.: ER associated quality compartment
<i>et al.</i>	<i>lat. Et alii</i>
ETFA	engl.: Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial
ETHE1	engl.: Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial
EtOH	Ethanol
f	Fragment
F1β	engl.: Mitochondrial ATP synthase F1-beta-subunit
FAM162A	engl.: Protein FAM162A (E2-induced gene 5 protein)
FKS	Fatales Kälberserum
FUNDC2	engl.: FUN14 domain-containing protein 2
g	Zentrifugalkraft
GAPDH	engl.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,
GATB	engl.: Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B, mitochondria
GFP	grün fluoreszierende Protein

gKD	genetischer Knockdown
GRPEL1	engl.: GrpE protein homolog 1, mitochondrial
GRPEL2	engl.: GrpE protein homolog 2, mitochondrial
h	engl.: hour
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HCl	Salzsäure
HeLa	Henrietta Lacks, Humane Cervixkarzinom Zelllinie
HMGCL	engl.: Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial
HSCB	engl.: Iron-sulfur cluster co-chaperone protein HscB
HSP10	Hitze-Schock-Protein 10 kDa, mitochondrial
HSP60	Hitze-Schock-Protein 60 kDa, mitochondrial
Htt	Huntingtin
HtrA2	engl.: high temperature requirement protein A2
i-AAA	Intermembranraum AAA+ Protease
IDH3B	engl.: Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial
IF	engl.: Immunzytochemie with fluorescence labelling
Ig	Immunglobulin
IM	Innere Mitochondrien Membran
IMiQ	engl.: Intra-mitochondrial protein quality compartment
IMS	engl.: Intermembrane space
IPOD	engl.: perivacuolar insoluble protein deposit
JUNQ	engl.: juxtannuclear quality-control compartment
k	Kilo ( $10^3$ )
KanR	Kanamycin-Resistenz
KOH	Kaliumhydroxid
KPi	Kaliumphosphat Puffer, ionisch
L	Lysin
LACTB2	engl.: Endoribonuclease LACTB2 (Beta-lactamase-like protein 2)
<i>lat.</i>	latein
LB	Luria Bertani
LC3 A/B-I/II	engl.: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
Lok.	Lokalisation
<i>m</i>	engl.: Mature-form
m	Milli ( $10^{-3}$ )
M	molar
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
mA	Milliamper
m-AAA	Matrix AAA+ Protease
MARCH5	engl.: embrane-associated RING finger protein 5
MCEE	engl.: mitochondrial Methylmalonyl-CoA epimerase
Mdh2	Malatedehydrogenase, mitochondrial
Me	Menadion

ME2	engl.: NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MgCl	Magnesiumchlorid
mGFP	engl.: Enhanced Green Fluorescent Protein with MTS
MGME1	engl.: Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1
min	Minuten
mM	mitochondriale Matrix
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPC2	engl.: Mitochondrial pyruvate carrier 2
MPP	engl.: Mitochondrial-processing peptidase
mQ115	Huntingtin Exon 1 mit 115 Glutamin Wiederholungen mit MTS
mQ25	Huntingtin Exon 1 mit 25 Glutamin Wiederholungen mit MTS
mQ74	Huntingtin Exon 1 mit 74 Glutamin Wiederholungen mit MTS
Mr	relative Molekülmasse
mRNA	engl.: Messenger ribonucleic acid
MRPL	engl.: ribosomal protein large subunit, mitochondrial
MRPS	engl.: ribosomal protein small subunit, mitochondrial
MS	Quantitative Massenspektrometrie
MSRB2	engl.: Methionine-R-sulfoxide reductase B2, mitochondrial
mt	mitochondrial
MTERF3	engl.: Transcription termination factor 3, mitochondrial
MTFR1L	engl.: Mitochondrial fission regulator 1-like
mtHSP70	Hitze-Schock-Protein 70 kDa, mitochondrial
MTIF2	engl.: Translation initiation factor IF-2, mitochondrial
MTOC	engl.: microtubule organization center
mtPQC	engl.: mitochondrial protein quality control
MTS	Mitochondriale Zielsequenz
MTU1	engl.: Mitochondrial tRNA-specific 2-thiouridylase 1
mtUPR	engl.: mitochondrial unfolded protein response
MTX2	engl.: Mitochondrial outer membrane import complex protein 2
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NaCl	Natriumchlorid
ND	engl.: NADH dehydrogenase
NDUFA4	engl.: Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4
NDUFA6	engl.: Cytochrome c oxidase subunit NDUFA6
NDUFS3	engl.: Cytochrome c oxidase subunit NDUFS3
NDUFS5	engl.: Cytochrome c oxidase subunit NDUFS5
NDUFS7	engl.: Cytochrome c oxidase subunit NDUFS7
NHEJ	engl.: nonhomologous end joining
NLS	Nuklear Lokalisationssignal
nt	Nukleotid

O	Oligomycin
o	engl.: other
om	engl.: outer mitochondrial membrane
P	Pellet
p	Präform
PAM16	engl.: Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM16
PAM-Komplex	engl.: presequence translocase-associated motor
PAM Sequenz	engl.: protospacer adjacent motif
PARS2	engl.: Probable proline-tRNA ligase, mitochondrial
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PDK3	engl.: Pyruvate dehydrogenase kinase 3, mitochondrial
PFA	Paraformaldehyd- Lösung
pH	lat. Podus Hydrogenii
PI	Protease Inhibitor Cocktail Plus
Pim1	engl.: proteolysis in mitochondria 1
Pink1	engl.: PTEN-induced putative kinase 1
PK	Proteinase K
PM	Proteinmengenänderung nach Lon gKD
PMPC A/B	MPP Untereinheit alpha/beta
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POLDIP1	engl.: Polymerase delta-interacting protein 1
PolyA	engl.: polyadenylation signal
PolyQ	Polyglutamin
PQC	engl.: protein quality control
PTCD2	engl.: Pentatricopeptide repeat-containing protein 2, mitochondrial
PuroR	Puromycin-Resistenz
PVDF	Polyvinylidenfluorid Membran
QRSL1	engl.: Glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A, mitochondrial
R	Arginin
REXO2	engl.: Oligoribonuclease, mitochondrial
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	engl.: Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur (~20°C)
S	Überstand (engl.: Supernatant)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCO2	engl.: Protein SCO2 homolog, mitochondrial
SDHA	engl.: Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, mitochondrial
SDS	Sodium dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	engl.: Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamid Gelelektrophoreses
SEM	Standard Fehler des Mittelwerts (engl.: standard error of the mean)
SILAC	engl.: stable isotope labelling with amino acids in cell culture
siRNA	engl.: small interfering RNA

SLC25A18	engl.: Mitochondrial glutamate carrier 2, GC-2
SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
SPG7	engl.: Paraplegin
Su9	ATPase Untereinheit 9 (engl.: Subunit)
SV40 NLS	engl.: large T-antigen protein from SV40 virus with nuclear localization signal
t	engl.: Time
T	total
T2A	engl.: 2A self-cleaving peptide
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAM41	engl.: Phosphatidate cytidyltransferase, mitochondrial
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl.: Tris-buffered saline)
TCA	Trichloressigsäure
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
Temp.	Temperatur
Tfam	Transkriptionsfaktor A, mitochondrial
Tim	engl.: Mitochondrial import inner membrane translocase
TMRE	Tetramethylrhodaminmethylester
Tom	engl.: Mitochondrial translocase of the outer membrane
Trap1	engl.: Tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRUB2	engl.: Mitochondrial mRNA pseudouridine synthase
TSFM	Elonginatiofaktor Ts, mitochondrial
TUFM	Elonginatiofaktor Tu, mitochondrial
TXNRD2	engl.: Thioredoxin reductase 2, mitochondrial
U	units
UPR	engl.: Unfolded protein response
UQCC2	engl.: Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2
URPmt	engl.: Unfolded protein response, mitochondrial
USMG5	engl.: ATP synthase membrane subunit DAPIT, mitochondrial
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/o	engl.: without
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: wight per volume)
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
YME1L1	engl.: ATP-dependent zinc metalloprotease YME1L1
μ	Micro (10 <sup>-6</sup> )
μg	Microgramm

---

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schutzmechanismen der Aggregatablagerung in verschiedenen zellulären Systemen.....	9
Abbildung 2: Mitochondriale Proteinimport Maschinerie und Proteinprozessierung .....	15
Abbildung 3: Lon Funktionen und Einfluss auf das zelluläre System .....	19
Abbildung 4: Plasmidkarte CRISPR/Cas9 Vektor PX459.....	35
Abbildung 5: CRISPR/Cas-vermittelter Lon Knockdown und Sequenzierung .....	53
Abbildung 6: Lon-Proteinlevel in quantitativer Massenspektrometrie und Immunzytochemie .....	54
Abbildung 7: Morphologie der Lon gKD Zellen.....	55
Abbildung 8: Proteinmengen verschiedener Proteine nach Lon gKD.....	56
Abbildung 9: Analyse verschiedener mitochondrialer Funktionen .....	57
Abbildung 10: <i>In organello</i> Proteinimport von radioaktiv markierten Reporterproteine und <i>in vivo</i> Import von endogenen Trap1 .....	60
Abbildung 11: <i>In organello</i> Degradation von Reporterproteinen.....	62
Abbildung 12: <i>In organello</i> Translation von mitochondrial codierten Proteinen .....	63
Abbildung 13: Proteomänderung nach Lon gKD in isolierten Mitochondrien.....	66
Abbildung 14: Veränderung der Proteinmenge von bekannten Lon Substrate und Interaktionspartnern.....	68
Abbildung 15: Änderung der Proteinmenge von Chaperonen, Co-Chaperonen, Proteasen und mitochondriale Importkomponenten .....	69
Abbildung 16: Proteinaggregation in Mitochondrien nach Hitzestress .....	72
Abbildung 17: Arbeitsablauf für quantitative Massenspektrometrie.....	73
Abbildung 18: Coomassie Färbung und Lokalisation der detektierten Proteine .....	74
Abbildung 19: Lon-abhängige, Hitze-induzierte Aggregation in isolierten Mitochondrien.....	77
Abbildung 20: Konstrukt- und Experimentaufbau zur Analyse der mitochondrialen Aggregatbildung .....	83
Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vimentin-Hüllenbildung .....	85
Abbildung 22: Charakterisierung der mitochondrialen Aggregatbildung .....	88
Abbildung 23: Aggregatbildung nach der Transfektion mit mtQ25 .....	89
Abbildung 24: Aggregatbildung nach der Transfektion mit mtQ74 .....	92
Abbildung 25: Aggregatbildung nach der Transfektion mit mtQ115 .....	94
Abbildung 26: Zeitabhängigkeit der Aggregatbildung in WT Zellen.....	96
Abbildung 27: Zeitabhängigkeit der Aggregatbildung in Lon gKD Zellen .....	98
Abbildung 28: Abhängigkeit der Aggregatbildung von Mikrotubuli.....	100
Abbildung 29: Charakterisierung zytosolischer Aggregate.....	102

Abbildung 30: Modell zur Stressantwort auf mitochondriale Aggregate.....	114
Abbildung 31: Lon gKD Zellen als zelluläres Alterungsmodell.....	116
Abbildung S1: Plasmidekarten der erstellen Reporterprotein-Konstrukte.....	120

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lon-abhängiger Aggregationsfaktor .....	79
Tabelle S1: Proteomänderung nach Lon gKD.....	120

---

## Literaturverzeichnis

- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, et al. 1981. 'Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome'. *Nature* 290 (5806): 457–65. <https://doi.org/10.1038/290457a0>.
- Baertling, Fabian, Mariel A M van den Brand, Jozef L. Hertecant, Aisha Al-Shamsi, Lambert P van den Heuvel, Felix Distelmaier, Ertan Mayatepek, Jan A. Smeitink, Leo G. J. Nijtmans, and Richard J. T. Rodenburg. 2015. 'Mutations in COA6 Cause Cytochrome c Oxidase Deficiency and Neonatal Hypertrophic Cardiomyopathy'. *Human Mutation* 36 (1): 34–38. <https://doi.org/10.1002/humu.22715>.
- Bakala, Hilaire, Evelyne Delaval, Maud Hamelin, Jeanne Bismuth, Caroline Borot-Laloi, Bruno Corman, and Bertrand Friguet. 2003. 'Changes in Rat Liver Mitochondria with Aging. Lon Protease-like Reactivity and N(Epsilon)-Carboxymethyllysine Accumulation in the Matrix'. *European Journal of Biochemistry* 270 (10): 2295–2302.
- Bayot, Aurélien, Monique Gareil, Laurent Chavatte, Marie-Paule Hamon, Caroline L'Hermitte-Stead, Florian Beaumatin, Muriel Priault, et al. 2014. 'Effect of Lon Protease Knockdown on Mitochondrial Function in HeLa Cells'. *Biochimie* 100 (May): 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.12.005>.
- Bayot, Aurélien, Monique Gareil, Adelina Rogowska-Wrzesinska, Peter Roepstorff, Bertrand Friguet, and Anne-Laure Bulteau. 2010. 'Identification of Novel Oxidized Protein Substrates and Physiological Partners of the Mitochondrial ATP-Dependent Lon-like Protease Pim1'. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (15): 11445–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065425>.
- Becker, Thomas, Lena Böttinger, and Nikolaus Pfanner. 2012. 'Mitochondrial Protein Import: From Transport Pathways to an Integrated Network'. *Trends in Biochemical Sciences* 37 (3): 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.004>.
- Beckman, K. B., and B. N. Ames. 1998. 'The Free Radical Theory of Aging Matures'. *Physiological Reviews* 78 (2): 547–81. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>.
- Bender, Tom, Claudia Leidhold, Thomas Ruppert, Sebastian Franken, and Wolfgang Voos. 2010. 'The Role of Protein Quality Control in Mitochondrial Protein Homeostasis under Oxidative Stress'. *Proteomics* 10 (7): 1426–43. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800619>.
- Bender, Tom, Ilka Lewrenz, Sebastian Franken, Catherina Baitzel, and Wolfgang Voos. 2011. 'Mitochondrial Enzymes Are Protected from Stress-Induced Aggregation by Mitochondrial Chaperones and the Pim1/LON Protease'. *Molecular Biology of the Cell* 22 (5): 541–54. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0718>.
- Bota, Daniela A., and Kelvin J. A. Davies. 2002. 'Lon Protease Preferentially Degrades Oxidized Mitochondrial Aconitase by an ATP-Stimulated Mechanism'. *Nature Cell Biology* 4 (9): 674–80. <https://doi.org/10.1038/ncb836>.
- . 2016. 'Mitochondrial Lon Protease in Human Disease and Aging: Including an Etiologic Classification of Lon-Related Diseases and Disorders'. *Free Radical Biology & Medicine* 100: 188–98. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.031>.
- Bota, Daniela A., Jenny K. Ngo, and Kelvin J. A. Davies. 2005. 'Downregulation of the Human Lon Protease Impairs Mitochondrial Structure and Function and Causes Cell Death'. *Free Radical Biology & Medicine* 38 (5): 665–77. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.017>.
- Bota, Daniela A., Holly Van Remmen, and Kelvin J. A. Davies. 2002. 'Modulation of Lon Protease Activity and Aconitase Turnover during Aging and Oxidative Stress'. *FEBS Letters* 532 (1–2): 103–6.
- Boyault, Cyril, Yu Zhang, Sabrina Fritah, Cécile Caron, Benoit Gilquin, So Hee Kwon, Carmen Garrido, et al. 2007. 'HDAC6 Controls Major Cell Response Pathways to Cytotoxic Accumulation of Protein Aggregates'. *Genes & Development* 21 (17): 2172–81. <https://doi.org/10.1101/gad.436407>.

- Bradford, M. M. 1976. 'A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding'. *Analytical Biochemistry* 72 (May): 248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Bruderek, Michael, Witold Jaworek, Anne Wilkening, Cornelia Rüb, Giovanna Cenini, Arion Förtsch, Marc Sylvester, and Wolfgang Voos. 2018. 'IMiQ: A Novel Protein Quality Control Compartment Protecting Mitochondrial Functional Integrity'. *Molecular Biology of the Cell* 29 (3): 256–69. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0027>.
- Bulteau, Anne-Laure, and Aurelien Bayot. 2011. 'Mitochondrial Proteases and Cancer'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1807 (6): 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2010.12.011>.
- Bulteau, Anne-Laure, Masao Ikeda-Saito, and Luke I. Szveda. 2003. 'Redox-Dependent Modulation of Aconitase Activity in Intact Mitochondria'. *Biochemistry* 42 (50): 14846–55. <https://doi.org/10.1021/bi0353979>.
- Bulteau, Anne-Laure, Natalia P. Mena, Françoise Auchère, Irene Lee, Annick Prigent, Christian S. Lobsiger, Jean-Michel Camadro, and Etienne C. Hirsch. 2017. 'Dysfunction of Mitochondrial Lon Protease and Identification of Oxidized Protein in Mouse Brain Following Exposure to MPTP: Implications for Parkinson Disease'. *Free Radical Biology & Medicine* 108: 236–46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.036>.
- Cairns, Rob A., Isaac S. Harris, and Tak W. Mak. 2011. 'Regulation of Cancer Cell Metabolism'. *Nature Reviews. Cancer* 11 (2): 85–95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>.
- Callegari, Sylvie, Frank Richter, Katarzyna Chojnacka, Daniel C. Jans, Isotta Lorenzi, David Pacheu-Grau, Stefan Jakobs, et al. 2016. 'TIM29 Is a Subunit of the Human Carrier Translocase Required for Protein Transport'. *FEBS Letters* 590 (23): 4147–58. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12450>.
- Chang, Howard H. Y., Nicholas R. Pannunzio, Noritaka Adachi, and Michael R. Lieber. 2017. 'Non-Homologous DNA End Joining and Alternative Pathways to Double-Strand Break Repair'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (8): 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>.
- Chaput, M., J. Brygier, Y. Lion, and A. Sels. 1983. 'Potentiation of Oxygen Toxicity by Menadione in *Saccharomyces Cerevisiae*'. *Biochimie* 65 (8–9): 501–12. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(83\)80132-1](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(83)80132-1).
- Chiti, Fabrizio, and Christopher M. Dobson. 2017. 'Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade'. *Annual Review of Biochemistry* 86: 27–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>.
- Clabough, Erin B. D. 2013. 'Huntington's Disease: The Past, Present, and Future Search for Disease Modifiers'. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 86 (2): 217–33.
- Cohen, Ehud, Jan Bieschke, Rhonda M. Perciavalle, Jeffery W. Kelly, and Andrew Dillin. 2006. 'Opposing Activities Protect against Age-Onset Proteotoxicity'. *Science (New York, N. Y.)* 313 (5793): 1604–10. <https://doi.org/10.1126/science.1124646>.
- Crowley, Lisa C., Melinda E. Christensen, and Nigel J. Waterhouse. 2016. 'Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining'. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016 (12). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087361>.
- Desautels, M., and A. L. Goldberg. 1982. 'Demonstration of an ATP-Dependent, Vanadate-Sensitive Endoprotease in the Matrix of Rat Liver Mitochondria'. *The Journal of Biological Chemistry* 257 (19): 11673–79.
- Detmer, Scott A., and David C. Chan. 2007. 'Functions and Dysfunctions of Mitochondrial Dynamics'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (11): 870–79. <https://doi.org/10.1038/nrm2275>.
- Drummond, D. Allan, and Claus O. Wilke. 2008. 'Mistranslation-Induced Protein Misfolding as a Dominant Constraint on Coding-Sequence Evolution'. *Cell* 134 (2): 341–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.042>.

- Ekstrand, Mats I., Maria Falkenberg, Anja Rantanen, Chan Bae Park, Martina Gaspari, Kjell Hultenby, Pierre Rustin, Claes M. Gustafsson, and Nils-Göran Larsson. 2004. 'Mitochondrial Transcription Factor A Regulates MtDNA Copy Number in Mammals'. *Human Molecular Genetics* 13 (9): 935–44. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh109>.
- Erjavec, Nika, Aurélien Bayot, Monique Gareil, Nadine Camougrand, Thomas Nystrom, Bertrand Friguet, and Anne-Laure Bulteau. 2013. 'Deletion of the Mitochondrial Pim1/Lon Protease in Yeast Results in Accelerated Aging and Impairment of the Proteasome'. *Free Radical Biology & Medicine* 56 (March): 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.019>.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. 'Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (21): 7413–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>.
- Fu, G. K., and D. M. Markovitz. 1998. 'The Human LON Protease Binds to Mitochondrial Promoters in a Single-Stranded, Site-Specific, Strand-Specific Manner'. *Biochemistry* 37 (7): 1905–9. <https://doi.org/10.1021/bi970928c>.
- Fu, Lianwu, Ya-Sheng Gao, Albert Tousson, Anish Shah, Tung-Ling L. Chen, Barbara M. Vertel, and Elizabeth Sztul. 2005. 'Nuclear Aggregates Form by Fusion of PML-Associated Aggregates'. *Molecular Biology of the Cell* 16 (10): 4905–17. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-01-0019>.
- Fukuda, Ryo, Huafeng Zhang, Jung-whan Kim, Larissa Shimoda, Chi V. Dang, and Gregg L. Semenza. 2007. 'HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells'. *Cell* 129 (1): 111–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.047>.
- García-Mata, R., Z. Bebök, E. J. Sorscher, and E. S. Sztul. 1999. 'Characterization and Dynamics of Aggresome Formation by a Cytosolic GFP-Chimera'. *The Journal of Cell Biology* 146 (6): 1239–54.
- Garcia-Mata, Rafael, Ya-Sheng Gao, and Elizabeth Sztul. 2002. 'Hassles with Taking out the Garbage: Aggravating Aggregates'. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3 (6): 388–96. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30602.x>.
- Gibellini, Lara, Lorena Losi, Sara De Biasi, Milena Nasi, Domenico Lo Tartaro, Simone Pecorini, Simone Patergnani, et al. 2018. 'LonP1 Differently Modulates Mitochondrial Function and Bioenergetics of Primary Versus Metastatic Colon Cancer Cells'. *Frontiers in Oncology* 8: 254. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00254>.
- Gibellini, Lara, Marcello Pinti, Regina Bartolomeo, Sara De Biasi, Antonella Cormio, Clara Musicco, Gianluca Carnevale, et al. 2015. 'Inhibition of Lon Protease by Triterpenoids Alters Mitochondria and Is Associated to Cell Death in Human Cancer Cells'. *Oncotarget* 6 (28): 25466–83. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4510>.
- Gibellini, Lara, Marcello Pinti, Federica Boraldi, Valentina Giorgio, Paolo Bernardi, Regina Bartolomeo, Milena Nasi, et al. 2014. 'Silencing of Mitochondrial Lon Protease Deeply Impairs Mitochondrial Proteome and Function in Colon Cancer Cells'. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (12): 5122–35. <https://doi.org/10.1096/fj.14-255869>.
- Granot, Zvi, Oren Kobiler, Naomi Melamed-Book, Sarah Eimerl, Assaf Bahat, Bin Lu, Sergei Braun, et al. 2007. 'Turnover of Mitochondrial Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein by Lon Protease: The Unexpected Effect of Proteasome Inhibitors'. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (9): 2164–77. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0458>.
- Groot, Natalia Sánchez de, and Salvador Ventura. 2006. 'Effect of Temperature on Protein Quality in Bacterial Inclusion Bodies'. *FEBS Letters* 580 (27): 6471–76. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.071>.

- Guardia-Laguarta, Cristina, Estela Area-Gomez, Cornelia Rüb, Yuhui Liu, Jordi Magrané, Dorothea Becker, Wolfgang Voos, Eric A. Schon, and Serge Przedborski. 2014. 'α-Synuclein Is Localized to Mitochondria-Associated ER Membranes'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (1): 249–59. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2507-13.2014>.
- Hamon, Marie-Paule, Rachel Gergondey, Aurore L'honoré, and Bertrand Friguët. 2020. 'Mitochondrial Lon Protease - Depleted HeLa Cells Exhibit Proteome Modifications Related to Protein Quality Control, Stress Response and Energy Metabolism'. *Free Radical Biology & Medicine* 148 (January): 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.039>.
- Hansen, Jakob, Niels Gregersen, and Peter Bross. 2005. 'Differential Degradation of Variant Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase by the Protein Quality Control Proteases Lon and ClpXP'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (4): 1160–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.024>.
- Hori, Osamu, Fusae Ichinoda, Takashi Tamatani, Atsushi Yamaguchi, Naoya Sato, Kentaro Ozawa, Yasuko Kitao, et al. 2002. 'Transmission of Cell Stress from Endoplasmic Reticulum to Mitochondria: Enhanced Expression of Lon Protease'. *The Journal of Cell Biology* 157 (7): 1151–60. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108103>.
- Johnston, J. A., C. L. Ward, and R. R. Kopito. 1998. 'Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins'. *The Journal of Cell Biology* 143 (7): 1883–98.
- Kaganovich, Daniel, Ron Kopito, and Judith Frydman. 2008. 'Misfolded Proteins Partition between Two Distinct Quality Control Compartments'. *Nature* 454 (7208): 1088–95. <https://doi.org/10.1038/nature07195>.
- Kang, Yilin, Michael James Baker, Michael Liem, Jade Louber, Matthew McKenzie, Ishara Atukorala, Ching-Seng Ang, Shivakumar Keerthikumar, Suresh Mathivanan, and Diana Stojanovski. 2016. 'Tim29 Is a Novel Subunit of the Human TIM22 Translocase and Is Involved in Complex Assembly and Stability'. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17463>.
- Kao, T.-Y., Y.-C. Chiu, W.-C. Fang, C.-W. Cheng, C.-Y. Kuo, H.-F. Juan, S.-H. Wu, and A. Y.-L. Lee. 2015. 'Mitochondrial Lon Regulates Apoptosis through the Association with Hsp60-MtHsp70 Complex'. *Cell Death & Disease* 6 (February): e1642. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.9>.
- Kawaguchi, Yoshiharu, Jeffrey J. Kovacs, Adam McLaurin, Jeffery M. Vance, Akihiro Ito, and Tso Pang Yao. 2003. 'The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress'. *Cell* 115 (6): 727–38. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00939-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00939-5).
- Key, Jana, Aneesha Kohli, Clea Bárcena, Carlos López-Otín, Juliana Heidler, Ilka Wittig, and Georg Auburger. 2019. 'Global Proteome of LonP1+/- Mouse Embryonal Fibroblasts Reveals Impact on Respiratory Chain, but No Interdependence between Eral1 and Mitochondria'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184523>.
- Kim, Insil, Sara Rodriguez-Enriquez, and John J. Lemasters. 2007. 'Selective Degradation of Mitochondria by Mitophagy'. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462 (2): 245–53. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.034>.
- Korbel, Daniel, Stephanie Wurth, Michael Käser, and Thomas Langer. 2004. 'Membrane Protein Turnover by the M-AAA Protease in Mitochondria Depends on the Transmembrane Domains of Its Subunits'. *EMBO Reports* 5 (7): 698–703. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400186>.
- Kukat, Christian, Karen M. Davies, Christian A. Wurm, Henrik Spähr, Nina A. Bonekamp, Inge Kühl, Friederike Joos, et al. 2015. 'Cross-Strand Binding of TFAM to a Single MtDNA Molecule Forms the Mitochondrial Nucleoid'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (36): 11288–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512131112>.

- Kukat, Christian, Christian A. Wurm, Henrik Spåhr, Maria Falkenberg, Nils-Göran Larsson, and Stefan Jakobs. 2011. 'Super-Resolution Microscopy Reveals That Mammalian Mitochondrial Nucleoids Have a Uniform Size and Frequently Contain a Single Copy of MtDNA'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (33): 13534–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109263108>.
- Labbadia, Johnathan, and Richard I. Morimoto. 2015. 'The Biology of Proteostasis in Aging and Disease'. *Annual Review of Biochemistry* 84: 435–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>.
- Lee, C. K., R. G. Klopp, R. Weindruch, and T. A. Prolla. 1999. 'Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction'. *Science (New York, N.Y.)* 285 (5432): 1390–93. <https://doi.org/10.1126/science.285.5432.1390>.
- Levy, Shiri, Charles K. Allerton, Varda Liveanu, Mouna R. Habib, Opher Gileadi, and Gadi Schuster. 2016. 'Identification of LACTB2, a Metallo- $\beta$ -Lactamase Protein, as a Human Mitochondrial Endoribonuclease'. *Nucleic Acids Research* 44 (4): 1813–32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw050>.
- Li, P. Andy, Xiaolin Hou, and Shaocai Hao. 2017. 'Mitochondrial Biogenesis in Neurodegeneration'. *Journal of Neuroscience Research* 95 (10): 2025–29. <https://doi.org/10.1002/jnr.24042>.
- Liu, Tong, Bin Lu, Irene Lee, Gabriela Ondrovicová, Eva Kutejová, and Carolyn K. Suzuki. 2004. 'DNA and RNA Binding by the Mitochondrial Lon Protease Is Regulated by Nucleotide and Protein Substrate'. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (14): 13902–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309642200>.
- Liu, Yongzhang, Linhua Lan, Kate Huang, Rongrong Wang, Cuicui Xu, Yang Shi, Xiaoyi Wu, et al. 2014. 'Inhibition of Lon Blocks Cell Proliferation, Enhances Chemosensitivity by Promoting Apoptosis and Decreases Cellular Bioenergetics of Bladder Cancer: Potential Roles of Lon as a Prognostic Marker and Therapeutic Target in Bladder Cancer'. *Oncotarget* 5 (22): 11209–24. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2026>.
- Lu, Bin, Tong Liu, Juan A. Crosby, Jennifer Thomas-Wohlever, Irene Lee, and Carolyn K. Suzuki. 2003. 'The ATP-Dependent Lon Protease of *Mus musculus* Is a DNA-Binding Protein That Is Functionally Conserved between Yeast and Mammals'. *Gene* 306 (March): 45–55.
- Lu, Bin, Swati Yadav, Parul G. Shah, Tong Liu, Bin Tian, Sebastian Pukszta, Nerissa Villaluna, et al. 2007. 'Roles for the Human ATP-Dependent Lon Protease in Mitochondrial DNA Maintenance'. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (24): 17363–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611540200>.
- MacMillan-Crow, L. A., and J. A. Thompson. 1999. 'Tyrosine Modifications and Inactivation of Active Site Manganese Superoxide Dismutase Mutant (Y34F) by Peroxynitrite'. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 366 (1): 82–88. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1202>.
- Martindale, D., A. Hackam, A. Wieczorek, L. Ellerby, C. Wellington, K. McCutcheon, R. Singaraja, et al. 1998. 'Length of Huntingtin and Its Polyglutamine Tract Influences Localization and Frequency of Intracellular Aggregates'. *Nature Genetics* 18 (2): 150–54. <https://doi.org/10.1038/ng0298-150>.
- Matsushima, Yuichi, Yu-ichi Goto, and Laurie S. Kaguni. 2010. 'Mitochondrial Lon Protease Regulates Mitochondrial DNA Copy Number and Transcription by Selective Degradation of Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM)'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (43): 18410–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008924107>.
- Melentijevic, Ilija, Marton L. Toth, Meghan L. Arnold, Ryan J. Guasp, Girish Harinath, Ken C. Nguyen, Daniel Taub, et al. 2017. 'C. Elegans Neurons Jettison Protein Aggregates and Mitochondria under Neurotoxic Stress'. *Nature* 542 (7641): 367–71. <https://doi.org/10.1038/nature21362>.

- Mick, David U., Sven Dennerlein, Heike Wiese, Robert Reinhold, David Pacheu-Grau, Isotta Lorenzi, Florin Sasarman, et al. 2012. 'MITRAC Links Mitochondrial Protein Translocation to Respiratory-Chain Assembly and Translational Regulation'. *Cell* 151 (7): 1528–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.053>.
- Miller, Stephanie B. M., Axel Mogk, and Bernd Bukau. 2015. 'Spatially Organized Aggregation of Misfolded Proteins as Cellular Stress Defense Strategy'. *Journal of Molecular Biology* 427 (7): 1564–74. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.006>.
- Mogk, A., T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rüdiger, D. Röder, H. Langen, and B. Bukau. 1999. 'Identification of Thermolabile Escherichia Coli Proteins: Prevention and Reversion of Aggregation by DnaK and ClpB'. *The EMBO Journal* 18 (24): 6934–49. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6934>.
- Moullan, Norman, Laurent Mouchiroud, Xu Wang, Dongryeol Ryu, Evan G. Williams, Adrienne Mottis, Virginija Jovaisaite, et al. 2015. 'Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research'. *Cell Reports* 10 (10): 1681–91. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.034>.
- Neupert, Walter, and Johannes M. Herrmann. 2007. 'Translocation of Proteins into Mitochondria'. *Annual Review of Biochemistry* 76: 723–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409>.
- Ngo, Jenny K., and Kelvin J. A. Davies. 2007. 'Importance of the Lon Protease in Mitochondrial Maintenance and the Significance of Declining Lon in Aging'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1119 (November): 78–87. <https://doi.org/10.1196/annals.1404.015>.
- . 2009. 'Mitochondrial Lon Protease Is a Human Stress Protein'. *Free Radical Biology & Medicine* 46 (8): 1042–48. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.024>.
- Ngo, Jenny K., Laura C. D. Pomatto, Daniela A. Bota, Alison L. Koop, and Kelvin J. A. Davies. 2011. 'Impairment of Lon-Induced Protection against the Accumulation of Oxidized Proteins in Senescent Wi-38 Fibroblasts'. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 66 (11): 1178–85. <https://doi.org/10.1093/gerona/glr145>.
- Ngo, Jenny K., Laura C. D. Pomatto, and Kelvin J. A. Davies. 2013. 'Upregulation of the Mitochondrial Lon Protease Allows Adaptation to Acute Oxidative Stress but Dysregulation Is Associated with Chronic Stress, Disease, and Aging'. *Redox Biology* 1 (February): 258–64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.015>.
- Oikonomou, Christina, and Linda M. Hendershot. 2020. 'Disposing of Misfolded ER Proteins: A Troubled Substrate's Way out of the ER'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 500 (January): 110630. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110630>.
- Olzmann, James A., and Lih-Shen Chin. 2008. 'Parkin-Mediated K63-Linked Polyubiquitination: A Signal for Targeting Misfolded Proteins to the Aggresome-Autophagy Pathway'. *Autophagy* 4 (1): 85–87. <https://doi.org/10.4161/auto.5172>.
- Ondrovicová, Gabriela, Tong Liu, Kamalendra Singh, Bin Tian, Hong Li, Oleksandr Gakh, Dusan Perecko, et al. 2005. 'Cleavage Site Selection within a Folded Substrate by the ATP-Dependent Lon Protease'. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (26): 25103–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502796200>.
- Ormö, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J. Remington. 1996. 'Crystal Structure of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein'. *Science (New York, N.Y.)* 273 (5280): 1392–95. <https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1392>.
- Osiewacz, Heinz D. 2010. 'Role of Mitochondria in Aging and Age-Related Disease'. *Experimental Gerontology* 45 (7–8): 465. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.05.001>.
- Ozkurede, Ulas, and Richard A. Miller. 2019. 'Improved Mitochondrial Stress Response in Long-Lived Snell Dwarf Mice'. *Aging Cell* 18 (6): e13030. <https://doi.org/10.1111/accel.13030>.
- Pareek, Gautam, Ruth E. Thomas, Evelyn S. Vincow, David R. Morris, and Leo J. Pallanck. 2018. 'Lon Protease Inactivation in Drosophila Causes Unfolded Protein Stress and Inhibition of Mitochondrial Translation'. *Cell Death Discovery* 4: 51. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0110-1>.

- Pinti, Marcello, Lara Gibellini, Sara De Biasi, Milena Nasi, Erika Roat, José-Enrique O'Connor, and Andrea Cossarizza. 2011. 'Functional Characterization of the Promoter of the Human Lon Protease Gene'. *Mitochondrion* 11 (1): 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.010>.
- Pinti, Marcello, Lara Gibellini, Yongzhang Liu, Shan Xu, Bin Lu, and Andrea Cossarizza. 2015. 'Mitochondrial Lon Protease at the Crossroads of Oxidative Stress, Ageing and Cancer'. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 72 (24): 4807–24. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2039-3>.
- Pinti, Marcello, Lara Gibellini, Milena Nasi, Sara De Biasi, Carlo Augusto Bortolotti, Anna Iannone, and Andrea Cossarizza. 2016. 'Emerging Role of Lon Protease as a Master Regulator of Mitochondrial Functions'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1857 (8): 1300–1306. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.025>.
- Quirós, Pedro M., Yaiza Español, Rebeca Acín-Pérez, Francisco Rodríguez, Clea Bárcena, Kenta Watanabe, Enrique Calvo, et al. 2014. 'ATP-Dependent Lon Protease Controls Tumor Bioenergetics by Reprogramming Mitochondrial Activity'. *Cell Reports* 8 (2): 542–56. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.018>.
- Ran, F. Ann, Patrick D. Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A. Scott, and Feng Zhang. 2013. 'Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System'. *Nature Protocols* 8 (11): 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- Rassow, J., B. Guiard, U. Wienhues, V. Herzog, F. U. Hartl, and W. Neupert. 1989. 'Translocation Arrest by Reversible Folding of a Precursor Protein Imported into Mitochondria. A Means to Quantitate Translocation Contact Sites'. *The Journal of Cell Biology* 109 (4 Pt 1): 1421–28. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.4.1421>.
- Rego, A. Cristina, and Catarina R. Oliveira. 2003. 'Mitochondrial Dysfunction and Reactive Oxygen Species in Excitotoxicity and Apoptosis: Implications for the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases'. *Neurochemical Research* 28 (10): 1563–74.
- Richter, Klaus, Martin Haslbeck, and Johannes Buchner. 2010. 'The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death'. *Molecular Cell* 40 (2): 253–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>.
- Rousseau, Erwann, Benjamin Dehay, Léa Ben-Haïem, Yvon Trottier, Michel Morange, and Anne Bertolotti. 2004. 'Targeting Expression of Expanded Polyglutamine Proteins to the Endoplasmic Reticulum or Mitochondria Prevents Their Aggregation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26): 9648–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403015101>.
- Rüb, Cornelia, Anne Wilkening, and Wolfgang Voos. 2017. 'Mitochondrial Quality Control by the Pink1/Parkin System'. *Cell and Tissue Research* 367 (1): 111–23. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2485-8>.
- Scaduto, R. C., and L. W. Grotyohann. 1999. 'Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives'. *Biophysical Journal* 76 (1 Pt 1): 469–77. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77214-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77214-0).
- Scherer, W. F., J. T. Syverton, and G. O. Gey. 1953. 'Studies on the Propagation in Vitro of Poliomyelitis Viruses. IV. Viral Multiplication in a Stable Strain of Human Malignant Epithelial Cells (Strain HeLa) Derived from an Epidermoid Carcinoma of the Cervix'. *The Journal of Experimental Medicine* 97 (5): 695–710. <https://doi.org/10.1084/jem.97.5.695>.
- Scherzinger, E., R. Lurz, M. Turmaine, L. Mangiarini, B. Hollenbach, R. Hasenbank, G. P. Bates, S. W. Davies, H. Lehrach, and E. E. Wanker. 1997. 'Huntingtin-Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-like Protein Aggregates in Vitro and in Vivo'. *Cell* 90 (3): 549–58.
- Shebib, S. M., M. H. Reed, E. P. Shuckett, H. G. Cross, J. B. Perry, and A. E. Chudley. 1991. 'Newly Recognized Syndrome of Cerebral, Ocular, Dental, Auricular, Skeletal Anomalies: CODAS Syndrome--a Case Report'. *American Journal of Medical Genetics* 40 (1): 88–93. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320400118>.

- Song, Ji-Yoon, Jaroslaw Marszalek, and Elizabeth Anne Craig. 2012. 'Cysteine Desulfurase Nfs1 and Pim1 Protease Control Levels of Isu, the Fe-S Cluster Biogenesis Scaffold'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (26): 10370–75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206945109>.
- Stadtman, E. R., and R. L. Levine. 2000. 'Protein Oxidation'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899: 191–208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>.
- Strauss, Kevin A., Robert N. Jinks, Erik G. Puffenberger, Sundararajan Venkatesh, Kamalendra Singh, Iteen Cheng, Natalie Mikita, et al. 2015. 'CODAS Syndrome Is Associated with Mutations of LONP1, Encoding Mitochondrial AAA+ Lon Protease'. *American Journal of Human Genetics* 96 (1): 121–35. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.12.003>.
- Sung, Ya-Ju, Ting-Yu Kao, Cheng-Liang Kuo, Chi-Chen Fan, An Ning Cheng, Wei-Cheng Fang, Han-Yu Chou, et al. 2018. 'Mitochondrial Lon Sequesters and Stabilizes P53 in the Matrix to Restrain Apoptosis under Oxidative Stress via Its Chaperone Activity'. *Cell Death & Disease* 9 (6): 697. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0730-7>.
- Suzuki, C. K., K. Suda, N. Wang, and G. Schatz. 1994. 'Requirement for the Yeast Gene LON in Intramitochondrial Proteolysis and Maintenance of Respiration'. *Science (New York, N.Y.)* 264 (5156): 273–76.
- Tebbenkamp, Andrew T. N., Luis Varela, Jinmyung Choi, Miguel I. Paredes, Alice M. Giani, Jae Eun Song, Matija Sestan-Pesa, et al. 2018. 'The 7q11.23 Protein DNAJC30 Interacts with ATP Synthase and Links Mitochondria to Brain Development'. *Cell* 175 (4): 1088–1104.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.014>.
- Teichmann, U., L. van Dyck, B. Guiard, H. Fischer, R. Glockshuber, W. Neupert, and T. Langer. 1996. 'Substitution of PIM1 Protease in Mitochondria by Escherichia Coli Lon Protease'. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (17): 10137–42.
- Truscott, Kaye N., Wolfgang Voos, Ann E. Frazier, Maria Lind, Yanfeng Li, Andreas Geissler, Jan Dudek, et al. 2003. 'A J-Protein Is an Essential Subunit of the Presequence Translocase-Associated Protein Import Motor of Mitochondria'. *The Journal of Cell Biology* 163 (4): 707–13. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308004>.
- Tyedmers, Jens, Axel Mogk, and Bernd Bukau. 2010. 'Cellular Strategies for Controlling Protein Aggregation'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (11): 777–88. <https://doi.org/10.1038/nrm2993>.
- Vasilyeva, Oxana V., Kristina B. Kolygo, Yulia F. Leonova, Natalia A. Potapenko, and Tatyana V. Ovchinnikova. 2002. 'Domain Structure and ATP-Induced Conformational Changes in Escherichia Coli Protease Lon Revealed by Limited Proteolysis and Autolysis'. *FEBS Letters* 526 (1–3): 66–70. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03117-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03117-4).
- Venkatesh, Sundararajan, Jae Lee, Kamalendra Singh, Irene Lee, and Carolyn K. Suzuki. 2012. 'Multitasking in the Mitochondrion by the ATP-Dependent Lon Protease'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1823 (1): 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.003>.
- Voos, Wolfgang. 2009. 'Mitochondrial Protein Homeostasis: The Cooperative Roles of Chaperones and Proteases'. *Research in Microbiology* 160 (9): 718–25. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.08.003>.
- . 2013. 'Chaperone-Protease Networks in Mitochondrial Protein Homeostasis'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (2): 388–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.005>.
- Voos, Wolfgang, Witold Jaworek, Anne Wilkening, and Michael Bruderek. 2016. 'Protein Quality Control at the Mitochondrion'. *Essays in Biochemistry* 60 (2): 213–25. <https://doi.org/10.1042/EBC20160009>.
- Voos, Wolfgang, and Karen Pollecker. 2020. 'The Mitochondrial Lon Protease: Novel Functions off the Beaten Track?' *Biomolecules* 10 (2). <https://doi.org/10.3390/biom10020253>.
- Wang, N., S. Gottesman, M. C. Willingham, M. M. Gottesman, and M. R. Maurizi. 1993. 'A Human Mitochondrial ATP-Dependent Protease That Is Highly Homologous to Bacterial Lon Protease'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (23): 11247–51.

- Wang, N., M. R. Maurizi, L. Emmert-Buck, and M. M. Gottesman. 1994. 'Synthesis, Processing, and Localization of Human Lon Protease'. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (46): 29308–13.
- Watabe, S., M. Hara, M. Yamamoto, M. Yoshida, Y. Yamamoto, and S. Y. Takahashi. 2001. 'Activation of Mitochondrial ATP-Dependent Protease by Peptides and Proteins'. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 195 (3): 153–61.
- White, E. J., and J. B. Clark. 1988. 'Menadione-Treated Synaptosomes as a Model for Post-Ischaemic Neuronal Damage'. *The Biochemical Journal* 253 (2): 425–33. <https://doi.org/10.1042/bj2530425>.
- Wilkening, Anne, Cornelia Rüb, Marc Sylvester, and Wolfgang Voos. 2018. 'Analysis of Heat-Induced Protein Aggregation in Human Mitochondria'. *The Journal of Biological Chemistry* 293 (29): 11537–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002122>.
- Zou, Jing, Fei Yue, Wenjiao Li, Kun Song, Xianhan Jiang, Jinglin Yi, and Leyuan Liu. 2014. 'Autophagy Inhibitor LRPPRC Suppresses Mitophagy through Interaction with Mitophagy Initiator Parkin'. *PloS One* 9 (4): e94903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094903>.
- Zurita Rendón, Olga, and Eric A. Shoubridge. 2018. 'LONP1 Is Required for Maturation of a Subset of Mitochondrial Proteins, and Its Loss Elicits an Integrated Stress Response'. *Molecular and Cellular Biology* 38 (20). <https://doi.org/10.1128/MCB.00412-17>.

---

---

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Wolfgang Voos für seine ständige Unterstützung bedanken. Er stand mit immer mit gutem Rat zur Seite. Zudem möchte ich mich bei Prof. Oliver Gruss bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, die Zweitbegutachtung zu übernehmen.

Besonders möchte ich bei meinen geschätzten Kollegen bedanken, die die Arbeit an dieser Dissertation um einiges vereinfacht haben, indem sie zu einer sehr guten und entspannten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Wenn die Arbeit so viel Spaß macht wie mit euch, fällt es auch nicht schwer Überstunden über Überstunden zu machen. Danke an Laura Lüdecke, Laura Ruland, Witold Jaworek, Dr. Giovanna Cenini, Abdou Aribi, Stefan Kaatz, Caren Runz, Margarita Fuhrmann und Daniel Putcha. Die gemeinsame Zeit möchte ich auf keinen Fall missen, ihr habt mich immer unterstützt und unter die Arme gegriffen, wenn es mal nicht so gut lief. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Christian Kukat für die guten Ratschläge, bei Daniel Hinze für die Sequenzierung der Lon gKD Klone und bei Dr. Marc Sylvester und Bernd Gehring für die Durchführung der Massenspektrometrie bedanken.

Ohne die Unterstützung meiner Familie und Freunde hätte ich die anstrengende Zeit der Promotion nicht durchgehalten. Besonders möchte ich meinen Eltern danken, Hubert und Petra Pollecker, die mich bereits mein gesamtes Leben unterstützen und bei meiner Schwester Ellen für einfach alles bedanken. Die Selbstverständlichkeit eures Rückhalts und die offenen Ohren waren immer eine großartige Hilfe. Meine Freunde waren immer eine große Unterstützung, wenn ich mal den Kopf frei bekommen musste, Danke besonders an Nele Olbrich, Christine Pöttgen und Jörn Rückstein für die gemeinsame Zeit.

Zuletzt möchte ich mich bei einem Menschen besonders bedanken, meinem Freund Michael Neumann. Deine Liebe und Unterstützung hat mich, vor allem in letzter Zeit, durchhalten lassen und mich immer aufgebaut oder beruhigt, wenn es notwendig war. Bleibt mir zuletzt nur zu sagen dieses ist *nicht prüfungsrelevant*.