

**Analyse der Thermostabilität mitochondrialer
Proteine anhand der Protein-Disaggregation durch
Hsp78 in Bäckerhefe**

Dissertation

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

vorgelegt von
Witold Jaworek
aus
Bonn

Bonn, Mai 2020



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

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Voos

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höhfeld

Tag der Promotion: 29.01.2021

Erscheinungsjahr: 2021

Publikationen

Originale Artikel

Bruderek M., **Jaworek W.**, Wilkening A., Rüb C., Cenini G., Sylvester M. & Voos W. (2018). "IMiQ: a novel protein quality control compartment protecting mitochondrial functional integrity". **Molecular Biology of the Cell (Vol. 29, No.3)**
DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0027>

Review Artikel

Voos W., **Jaworek W.**, Wilkening A. & Bruderek M. (2016). "Protein quality control at the mitochondrion". **Essays in Biochemistry (Vol.60, Issue 2)**
DOI: <https://doi.org/10.1042/EBC20160009>

Nicht publiziert

Jaworek W., Sylvester M., Cenini G. & Voos W. (2020). "Hsp78 involvement in the thermo tolerance of the mitochondrial proteome". **JBC**

Poster

"Trapping Hsp78 substrates"(2017). **Annual BFB-meeting**, Hennef

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Abstract	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2. Einleitung	5
2.1 Protein Qualitätskontrolle	6
2.1.1 Proteinbiosynthese	6
2.1.2 Proteinfaltung und Rückfaltung durch Chaperone	6
2.1.3 Protein Degradation	12
2.2 Mitochondrien	13
2.3 Protein Homöostase in Mitochondrien	16
2.3.1 Biosynthese von mitochondrialen Proteinen	16
2.3.2 Import in Mitochondrien	17
2.3.3 Proteinfaltung und Aggregation	19
2.3.4 Proteinrückfaltung, Degradation oder Aggregatablagerung	20
2.4 AAA+ Protein Substratstudien	22
2.5 Phosphorylierung von Ssc1	24
3. Ziel der Arbeit	27
3.1 Ausrichtung der Arbeit	27
3.2 Hsp78-Substratstudie	27
3.3 Phosphorylierung von Ssc1	28
4. Material und Methoden	29
4.1 Material	29
4.1.1 Chemikalien, Medien und Puffer	29
4.1.2 Primer, Plasmide und Stämme	32
4.1.3 Enzyme und Antikörper	34
4.1.4 Analysekits und Säulen	35
4.1.5 Laborgeräte	36
4.2 Methoden	37
4.2.1 Klonierung	37
4.2.2 Zellkultur	38

4.2.2.1 Kultivierung von Bakterien	38
4.2.2.2 Transformation von Bakterien	38
4.2.2.3 Kultivierung von Hefen	39
4.2.2.4 Transformation von Hefen	39
4.2.2.5 SILAC	40
4.2.3 Wachstumsanalyse von Hefe (Spotttest)	41
4.2.4 Isolation von Mitochondrien	41
4.2.5 Protein Analyse	42
4.2.5.1 TCA Fällung	42
4.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford	43
4.2.5.3 SDS-PAGE	43
4.2.5.4 BN-PAGE zur Analyse der Hsp78-Komplexbildung	44
4.2.5.5 2D-PAGE zur Analyse der Ssc1 Modifikation	44
4.2.5.6 Western Blotting	46
4.2.5.7 Hsp78 Ni-NTA Affinitätsaufreinigung aus <i>E.coli</i>	46
4.2.5.8 Hsp78 Ni-TED Affinitätsaufreinigung aus isolierten Hefe Mitochondrien	47
4.2.5.9 Ssc1 Ni-NTA Affinitätsaufreinigung aus isolierten Hefe Mitochondrien	48
4.2.5.10 Größenausschlusschromatographie für Hsp78-Komplexanalyse	49
4.2.5.11 Crosslinking mit Glutaraldehyd	50
4.2.5.12 ATPase-Aktivitätsbestimmung von Hsp78	50
4.2.5.13 <i>In vitro</i> Transkription und Translation	51
4.2.6 Mitochondriale <i>in organello</i> Experimente	52
4.2.6.2 Mitochondrialer Import	52
4.2.6.3 Degradation importierter Proteine	53
4.2.6.4 Disaggregation importierter Proteine	54
4.2.6.5 Aconitase-Assay	54
4.2.6.6 Ketoglutaratdehydrogenase-Assay	55
4.2.6.7 Aggregation und Disaggregation in Pellets	56
4.2.6.8 Aggregation und Bindung von Hsp78 in mitochondrialen Lysaten	57
4.2.6.9 Bestimmung des ATP-Gehalts	58
4.2.6.10 Radioaktive Markierung von Proteinen in isolierten Mitochondrien	58
4.2.7 LC-MS/MS	59
4.2.7.1 Hsp78-Interaktionsstudie über Proteinaufreinigung	60
4.2.7.2 Hsp78-abhängige <i>in organello</i> Aggregations- und Disaggregationsanalyse	60
4.2.7.3 Phosphorylierung von Ssc1	61

4.2.7.4 Peptidvorbereitung	62
4.2.7.5 LC-MS Messungen der Peptide (AuD/KoAuf)	62
4.2.7.6 LC-MS Messungen der Peptide (Ssc1 Phos.)	63
4.2.7.7 Analyse der Daten (AuD/KoAuf)	63
4.2.7.8 Analyse der Daten (Ssc1 Phosphorylierung)	64
4.2.8 Auswertung der MS Daten	65
4.2.8.1 Auswertung der Koaufräinigungsdaten	65
4.2.8.2 Auswertung der Aggregations- und Disaggregationsdaten	65
4.2.8.3 Gesamtauswertung der MS Daten	66
5. Ergebnisse	67
5.1 Konstruktion und <i>in vitro</i> Test der hsp78 _{TR} -Mutante	67
5.2 <i>In organello</i> Test der hsp78 _{TR} -Mutante	71
5.3 Koaufräinigung von Substraten	77
5.4 <i>In organello</i> Aggregations- und Disaggregationsexperiment	85
5.5 Hsp78-Einfluss auf mitochondriale Funktionen	91
5.6 Funktionelle Kategorisierung als Interaktionsnetzwerk	93
5.7 Ssc1 Phosphorylierungsstudie	95
6. Diskussion	105
6.1 Proteinaggregation in isolierten Mitochondrien	105
6.2 Hsp78-ATPase-Mutante als Substratfänger	105
6.3 Substrat Koaufräinigung	108
6.4 Substratidentifikation durch Aggregation	111
6.5 Hsp78 als zentraler Disaggregator	113
6.6 Potentielle Phosphorylierung von Ssc1	117
6.7 Polyacetylierung von Ssc1	120
7. Abkürzungsverzeichnis	122
8. Abbildungsverzeichnis	126
9. Literaturverzeichnis	127
10. Danksagung	139

1. Zusammenfassung / Abstract

1.1 Zusammenfassung

Alle Organismen zeichnen sich durch spezifische auf ihre Lebensbedingungen angepasste Charakteristika aus. Hefen, darunter auch die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, besitzt eine Vielzahl an spezialisierten Proteinen, welche ihnen das Leben unter den gegebenen Bedingungen ermöglichen. Ein wesentlicher Faktor dabei ist die Erhaltung der Proteinhomöostase. Bei der Untersuchung von Hitzeschockproteinen ist das in Mitochondrien vorkommende Hitzeschockprotein 78 (Hsp78), welches der Hitzeschockprotein 100 (Hsp100) Familie angehört, als eine Art mitochondrialer Sonderfall identifiziert worden.

Dieses besitzt im Gegensatz zu anderen Proteinen keinen Homolog in humanen Organismen. Die Untersuchung dieses Proteins, seiner Bedeutung und Funktion sind deshalb von speziellem Interesse, um mögliche unbekannte Protein-protective Mechanismen in Mitochondrien zu identifizieren. Grundsätzlich ist bekannt, dass Hsp78 in der Lage ist unter Hitzeeinfluss aggregierte Proteine wieder aufzulösen, um deren Abbau oder eine Rückfaltung in ihre funktionelle Form zu begünstigen. Hierbei wurden bereits einige Substrate identifiziert, jedoch noch keine Hsp78-basierte Proteomstudie in Mitochondrien durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, welche mitochondrialen Proteine grundsätzlich eine Thermosensitivität aufzeigen und welche mitochondrialen Funktionen und die damit verbundenen Proteine von einer Bindung an das Hsp78-Chaperon beeinflusst werden? Hierbei sollten weitere Hsp78-Substrate identifiziert und der intramitochondriale Einfluss des Chaperons definiert werden. Experimentell wird dabei in Anlehnung an andere Hsp100 Substratstudien auf eine Mutante mit defizienter ATPase-Funktion zurückgegriffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese neue Hsp78-Mutante als hsp78_{TR} bezeichnet und zuerst im Vergleich mit dem Wildtyp charakterisiert. Hierbei zeigte sich für die Mutante ein ATPase-Aktivitätsverlust mit veränderten Komplexbildungs- und Substratbindungseigenschaften. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde diese in Experimenten mit stabiler Isotopenmarkierung von Aminosäuren in Zellkultur (engl.: stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC)) für die Koaufräufung mit anschließender massenspektrometrischer (MS) Analyse eingesetzt. Des Weiteren

wurden in einem *in organello* Aufbau, thermo-sensitive mitochondriale Proteine und mögliche Hsp78-Substrate über eine aktive Auflösung hitzeinduzierter Aggregate bestimmt. Abschließend wurden beide MS-Datensätze bioinformatisch zusammengeführt und ein deutlicher Einfluss des Hsp78-Chaperons auf eine Vielzahl wichtiger mitochondrialer Funktionen aufgezeigt. Besonders auffallend war die Aggregation von Proteinen, welche Bindungsreaktionen vermitteln. Darüber hinaus zeigt das mitochondriale Proteom eine starke Beeinträchtigung durch Hitzestress bei der mitochondrialen Translation. In diesem Zusammenhang scheint Hsp78 ein zentraler Faktor bei der Reaktivierung translationaler Komponenten zu sein und darüber hinaus auch andere Funktionen wie die Energieproduktion und den Aminosäuremetabolismus stark zu beeinflussen. Die gewonnenen Informationen könnten zukünftig dafür genutzt werden, das Aggregationsverhalten von anderen Proteinen zu erforschen oder um die Kapazität bzw. Effizienz von anderen Disaggregasen zu beeinflussen.

Bei der Untersuchung der Rolle von Hsp78 in der Reaktivierung von mitochondrialen Komponenten nach Hitzestress wurde Ssc1 als wichtiges Substrat bestätigt. Gleichzeitig wird vermutet, dass das Hsp70 Chaperon auch als funktioneller Interaktionspartner bei der Stimulation der ATPase-Aktivität von Hsp78 fungiert, während es grundsätzlich als wichtige Komponente der Importmaschinerie Membran-gebunden arbeitet. Um die hohe funktionelle Diversität von Ssc1 zu beleuchten wurden potentielle posttranslationale Modifikationen des Proteins mittels verschiedener experimenteller Ansätze untersucht.

1.2 Abstract

Organisms exhibit specific characteristics making them suitable for their given environmental conditions. Thus yeast cells including bakers yeast *Saccharomyces cerevisiae* owe a multitude of specialised proteins maintaining protein homeostasis and making survival possible under given circumstances. A group of these specialised proteins is represented by the heat shock protein family.

Analysing heat shock proteins, the yeast mitochondrial Hsp100 family protein Hsp78 seems to have a notable role since it has no homologue in human mitochondria. Therefore the investigation of its impact and function could lead to the discovery of an unknown proteoprotective mechanism for the mitochondrial organelle. In principle it is known that Hsp78 is in charge of the resolubilisation of aggregated proteins after heat stress, thereby supporting refolding of substrates into their native structure or subsequent degradation. Up to date some single substrates have been identified, but no Hsp78-based proteomic analysis has been performed.

From this point of view the present thesis aims on the identification of proteins that have a tendency to aggregate under thermal stress and which individual proteins are being influenced by Hsp78 chaperone binding? In this regard Hsp78 substrates were identified and the characterisation of its functional impact inside mitochondria was investigated. The experimental approach refers to other Hsp100 substrate studies including ATPase-deficient mutants of the target chaperone.

In the context of this study this new Hsp78 ATPase-deficient mutant was termed hsp78_{TR} and was characterised in contrast to its equivalent wildtype. The mutant is showing a strongly impaired ATPase activity with altered complex formation and substrate binding attributes. In the further process of this work the mutant was utilised in stable isotope labelling of amino acids in cell culture (SILAC) based copurification experiments with adjacent mass spectrometric measurements (MS). In addition an *in organello* setup was used to identify thermo-sensitive mitochondrial proteins and potential Hsp78 substrates being actively resolubilised from heat induced aggregate pellets. In conclusion both MS-datasets were bioinformatically consolidated in order to present the overall impact of Hsp78 for mitochondrial functionality. Data analysis revealed aggregation tendency for proteins being involved in different types of binding reactions as well as a statistically significant impairment for components of the mitochondrial translation machinery. In this

regard Hsp78 seems to be a key factor for the reactivation of mitochondrial translation after heat stress while also having strong impact on energy production and amino acid metabolism. The obtained information could be used for the further investigation of protein aggregation processes or to control the capacity and efficiency of other protein disaggregases.

Analysing the role of Hsp78 in the reactivation of mitochondrial components after heat stress, Ssc1 was found to be major substrate. While it is supposed that Ssc1 could be an important Hsp78 interaction partner stimulating its ATPase activity, it is known to be a key player of the mitochondrial import machinery. In order to elucidate this functional diversity the analysis of potential posttranslational modifications of Ssc1 by different experimental approaches was performed.

2. Einleitung

Alle Lebewesen sind in ständiger Interaktion mit ihrer Umwelt. Hoch entwickelte Organismen sind in der Lage ihre Umgebung zu beeinflussen, um sich günstigere Lebensbedingungen zu schaffen, welche es ihnen ermöglichen auf bestimmte körpereigene Beschaffenheiten zu verzichten. Bakterien hingegen sind darin jedoch stärker eingeschränkt. Trotzdem haben sie unter den unterschiedlichsten äußeren Bedingungen gelebt und besiedeln bis heute die verschiedensten für den Menschen ungünstigen Lebensräume. Um dies zu bewerkstelligen, besitzen Bakterien unterschiedliche Protein Qualitätskontrollsysteme, welche es ihnen ermöglichen durch schnelle Biosynthese neue Proteine herzustellen, einen effektiven Abbau beschädigter Proteine zu vermitteln und beeinträchtigte Proteine als auch Schäden am Erbgut zu reparieren. In Betracht der Tatsache, dass diese vermeidlich einfachen Organismen nicht im Stande waren sich ihren Lebensraum spezifisch auszusuchen oder größere Umstrukturierungen dessen vorzunehmen, ist den Protein-Qualitätskontrollsystemen eine immense Bedeutung zuzuschreiben. Die Exposition durch erhöhte Temperaturen, Druck oder Strahlung sind für speziell angepasste Bakterienarten kein Problem. Das Vorhandensein spezifischer Qualitätskontroll-Proteine ist für die jeweilige Art der äußeren Einflüsse angepasst. Eine der interessantesten Proteingruppen sind hierbei die Hitzeschockproteine, welche ihrem Namen entsprechend, bei erhöhten Temperaturen eine bedeutende Rolle spielen. Bakterien, Hefen oder Pflanzen sind über den Tages oder Jahresverlauf unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und können sich diesen nicht oder kaum entziehen. Im Kontrast dazu ist der *homo sapiens* mobil und kann solche Situationen aktiv vermeiden.

Evolutionär gesehen sind diese Kontrollmechanismen bis heute in allen Organismen vertreten und ermöglichen durch die Erhaltung der zellinneren Protein Homöostase den Bestand der jeweiligen Lebewesen in ihrer Umgebung. Aufgrund des bakteriellen Ursprungs von Mitochondrien lassen sich so über die Forschung an Bakterien selbst, beziehungsweise an Hefe-Mitochondrien, schnell und einfach interessante Rückschlüsse auf die Eigenschaften menschlicher Mitochondrien ziehen (Gray, 2012). Die Arbeit an *Saccharomyces cerevisiae* ermöglicht einen schnellen Zugang zu größeren Mengen an Probenmaterial und liefert so zuverlässig ausreichende Datenmengen zur Analyse von Proteinen. In dieser Arbeit wird die Bedeutung des

Hitzeschockproteins 78 (Hsp78), der mitochondrialen Matrix, unter Einfluss erhöhter Temperaturen festgestellt und eine Studie über die Aggregation von mitochondrialen Proteinen und deren Auflösung durch das Hsp78 durchgeführt.

2.1 Protein Qualitätskontrolle

2.1.1 Proteinbiosynthese

Die Synthese von Proteinen findet zu einem Großteil an Ribosomen im Zytoplasma statt. An den Ribosomen wird die im Kern synthetisierte mRNA in die codierte Polypeptidsequenz übersetzt. Im Zytoplasma wird die entstehende Polypeptidkette spontan oder unter Hilfe von Faltungsproteinen in ihre durch die Aminosäuresequenz vorbestimmte Struktur gefaltet. Die entstandenen Proteine werden anschließend an ihren Zielort transportiert. Hierbei werden sie durch angefügte Signalsequenzen für den Import in bestimmte Zellkompartimente wie den Zellkern, das ER oder Mitochondrien, markiert. Der Import von frisch synthetisierten Proteinen in das ER ist bereits gut erforscht und erfolgt kotranslational über spezifische Adapterproteine direkt aus dem ribosomalen Tunnel in das ER hinein (Gemmer and Förster, 2020). Für andere Zellkompartimente werden ähnliche Prozesse vermutet, sind jedoch nicht eindeutig nachgewiesen, wodurch man annehmen kann das Proteine sowohl kotranslational, als auch post-translational importiert werden können (Becker et al., 2019).

2.1.2 Proteinfaltung und Rückfaltung durch Chaperone

Prinzipiell falten sich Proteine anhand ihrer Primärstruktur (Aminosäuresequenz) über die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren, durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, in Sekundärstrukturen wie α -Helices oder β -Faltblatt Strukturen. Aus diesen können weitere Domänen bzw. Untereinheiten entstehen, welche sich über Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen oder Ionenbindungen ausbilden (Eichmann et al., 2010). Darüber hinaus können sich über Cysteinreste, welche durch die Faltung der Polypeptidkette in räumliche Nähe gelangen auch Disulfidbrücken ausbilden. Diese haben eine besondere Bedeutung für sekretorische Proteine, welche über das ER ausgeschleust werden. Das ER besitzt speziell dafür eine besondere Chaperon-Gruppe, welche die Ausbildung von Disulfidbrücken unterstützt, koordiniert und kontrolliert (McCaffrey and Braakman,

2016). Letztlich können auch einzelne autonome Proteindomänen in Interaktionen treten und übergeordnete Strukturen bilden, welche als Quartärstruktur bezeichnet werden.

Die einzelnen Prozesse, welche die Faltung einer neu synthetisierten Polypeptidkette in ein funktionelles Protein ausmachen, können relativ simpel, aber auch höchst komplex sein. Im Falle von sensiblen katalytischen Zentren oder anderen funktionellen Segmenten, kann es nötig sein, dass die entstandenen Abschnitte zusätzlich stabilisiert oder geschützt werden müssen, um nicht in ungewollte Interaktionen mit anderen Proteinen der Umgebung zu geraten. Weiterhin gibt es auch komplexe Proteine, welche eine hydrophobe Faltungsmatrix und aktive Konformationsänderungen benötigen um ihre gewünschte Struktur zu erlangen. Hierfür sind Chaperone nötig, welche aktiv und unter Verbrauch von Energie, Proteine in ihre funktionelle Struktur falten können. Physikalisch gesehen entspricht die Faltung einer Polypeptidkette, hin zur nativen Struktur, der Minimierung der freien Energie des Proteins (Anfinsen, 1973). Die Ausbildung von Strukturen schafft so einen energetisch günstigeren Zustand. Die Erlangung dieses Zustandes erfolgt meist nicht auf direktem Weg und kann bei komplexen Proteinen über mehrere Zwischenfaltungsstufen erfolgen, welche lokale Energieminima darstellen (Zwanzig et al., 1992). Um die benötigte Aktivierungsenergie bereitzustellen, damit ein niedrigeres Energieniveau erreicht, oder eine bestimmte Zwischenstruktur stabilisiert werden kann, sind Chaperone nötig (Kiefhaber, 1995; Kim et al., 2013). In besonderem Maße beeinflusst die Umgebung, welche in biologischen Systemen meist hydrophil ist, die Faltung der Proteine. Üblicherweise sind hydrophile Aminosäurereste außen auf der Proteinoberfläche exponiert und hydrophobe Einheiten finden sich im Inneren zusammen. Bei Membranproteinen hingegen sind spezielle Segmente für die Integration in eine hydrophobe Umgebung exponiert. Da die Proteinfaltung einen energetisch hoch komplexen Mechanismus darstellt und durch viele Faktoren beeinflusst werden kann, gibt es für die Faltung von Proteinen in allen größeren Kompartimenten spezifische Chaperone (Buchner, 2019). Prinzipiell lassen sich Chaperone in zwei größere Klassen unterteilen. Auf der einen Seite die ATP-abhängigen oder auch als "Foldase" bezeichneten Proteine Hsp60, Hsp70, Hsp90, sowie Hsp100 und auf der anderen Seite Proteine der Hsp40 Familie und kleine Hitzeschockproteine (sHsps), welche kein ATP verbrauchen und als

“Holdasen“ bezeichnet werden. Darüber hinaus sind Chaperone nicht lediglich für die *de novo*-Faltung von synthetisierten Proteinen zuständig, sondern können auch fehlgefaltete Proteine erkennen, disaggregieren oder rückfalten (Richter et al., 2010). Als eine der bedeutendsten und am besten charakterisierten Chaperon-Familien ist die Hsp60 bzw. auch Chaperonin-Familie für die Faltung von Proteinen essentiell. Zwei aus je sechs Hsp60 Untereinheiten aufgebaute Ringkomplexe liegen übereinander und bilden so im Inneren einen geschützten Hohlraum. Hierdurch werden Polypeptidketten bei der Faltung von äußeren Einflüssen geschützt und die Faltung unter ATP-Verbrauch unterstützt. In Bakterien wird der Hsp60 Komplex durch Hsp10 Proteine unterstützt. Diese schließen den Hohlraum nach erfolgter Substratbindung jeweils nach außen ab. Im Gegensatz dazu arbeitet in Eukaryoten das zytoplasmatische Hsp60, welches auch als Thermosom bezeichnet wird, eigenständig (Horwich et al., 2007). Aufgrund der vorhandenen Symmetrie und der relativ geringen Flexibilität wurde das bakterielle Hsp60 (GroEL) bzw. der Komplex mit Hsp10 (GroES), als eines der ersten Chaperone entdeckt und strukturell charakterisiert (Bukau and Horwich, 1998).

Im Vergleich dazu sind Proteine der vielleicht wichtigsten Chaperon-Familie, der Hsp70 Klasse, sehr flexibel in ihren Funktionen (Mayer and Bukau, 2005). Hsp70 Chaperone kommen beispielsweise in *Saccharomyces cerevisiae* in allen größeren Zellkompartimenten vor und dabei oft auch parallel in verschiedenen homologen Formen (Radons, 2016; Raviol et al., 2006). Als Beispiel dafür sind in *Saccharomyces cerevisiae* die mitochondrialen Hsp70 Proteine Ssc1 und die verwandten Ssq1 und Ssc3 zu nennen (Kominék et al., 2013). Alle drei Proteine besitzen innerhalb der mitochondrialen Matrix unterschiedliche Funktionen (Pareek et al., 2011; Strub et al., 2002). Die funktionelle Vielfalt wird für Hsp70 Proteine durch die Kooperation mit der Hsp40 Chaperon-Familie und Hsp90 Proteinen nochmals erweitert (Genest et al., 2019; Kampinga and Craig, 2010). Als eine Art zentrales Instrument sind Hsp70 Chaperone in viele zelluläre Prozesse involviert und erhalten durch die Stabilisierung und Faltung von neu synthetisierten Proteinen, die Rückfaltung und Disaggregation von fehlgefalteten Proteinen, den aktiven Transport durch Membranen und die Unterstützung des Proteinabbaus durch Proteasen die zelluläre Proteinhomöostase aufrecht (Mayer and Bukau, 2005). Strukturell gesehen besitzen Hsp70 Proteine eine N-terminale ATP-Bindungsdomäne und eine C-terminale Substratbindungsdomäne.

Nach Bindung von ATP befindet sich das Chaperon in einem hoch-affinen Zustand, welcher die Bindung von Substraten begünstigt. Nach Bindung von Substratproteinen wird durch Hydrolyse von ATP die Substratbindungsdomäne verschlossen und das Protein gefangen. Die Freisetzung des gebildeten ADPs ermöglicht wiederum die Öffnung und die Freisetzung des gebundenen Substrates im sogenannten niedrig-affinen Zustand. Das Chaperon steht anschließend für einen weiteren Zyklus bereit. Die ATP-Hydrolyse wird durch Kooperation mit Hsp40 Proteinen, welche auch als J-Proteine bezeichnet werden, unterstützt. Die typische J-Domäne, welche in allen Hsp40 Proteinen vorkommt, ist in der Lage die ATPase-Aktivität des Hsp70 Proteins zu stimulieren (Fernández-Fernández and Valpuesta, 2018). Zusätzlich können Hsp40 Proteine auch als Adapter für bestimmte Substrattypen dienen und somit Substratproteine rekrutieren. Hsp70 besitzt weitere Kochaperone, welche unter anderem dessen ATPase-Aktivität stimulieren und so die Hsp70 Effizienz steigern können. Nicht nur die ATP-Hydrolyse kann stimuliert werden, sondern die Freisetzung des ADP kann ebenfalls unterstützt werden. Hierfür interagieren sogenannte Nukleotidaustauschfaktoren mit dem Hsp70 Protein und fördern die ADP Freisetzung und folglich die Substratfreisetzung. Damit steigert sich die Umsatzrate des Hsp70 Chaperons. Speziell in Stresssituationen in welchen eine erhöhte Aktivität erforderlich ist, kann so schnell in das System eingegriffen werden, ohne neues Hsp70 Protein bereitstellen zu müssen (Kampinga and Craig, 2010; Laufen et al., 1999).

Die bereits angeführte Hsp90 Chaperon-Familie bedient sich ebenfalls einiger solcher Kochaperone um verschiedene Stadien seines Zyklus zu beeinflussen (Schopf et al., 2017). Es ist bekannt dass Aha1 die konformationellen Änderungen im Hsp90 Dimer beschleunigen kann und so zu einer höheren Umsetzungsrate des Chaperons führt. Darüber hinaus können sich Kochaperone gegenseitig beeinflussen, wie am Beispiel von Aha1, welches durch p23 wiederum vom Hsp90 Dimer abgelöst wird. Folglich sind Kochaperone dafür zuständig bestimmte Chaperon-Konformationen zu begünstigen bzw. zu stabilisieren oder den Zerfall solcher Konformationen zu beschleunigen (Li et al., 2012). Chaperone der Hsp90 Familie sind ebenfalls in verschiedenen Zellkompartimenten anzutreffen. Ihre Funktionen sind jedoch nicht für alle Typen genau erforscht. Das zytoplasmatische Hsp90 ist für die Faltung und Stabilisierung von einigen Signaltransduktionsproteinen zuständig und interagiert

dafür mit weiteren Kochaperonen wie dem Cdc37 Protein, welches spezifisch Kinasen an den Hsp90 Komplex rekrutiert (Gaiser et al., 2010; Verba and Agard, 2017). Weitere Isoformen finden sich im Endoplasmatischen Retikulum und beispielsweise in humanen Mitochondrien. Im ER ist das Hsp90 Chaperon unter anderem für die korrekte Faltung von sekretorischen Proteinen zuständig (Yang et al., 2007). In Mitochondrien als TRAP-1 bezeichnet, scheint es als eine Art Regulator der mitochondrialen Integrität zu fungieren. Hierbei spielt es eine Rolle in der Apoptose, Autophagie und weiteren Signaltransduktionsmechanismen (Altieri et al., 2012).

Die letzte große Chaperon Familie ist die Hsp100 Familie und zählt zu der Klasse der AAA+ Proteine (ATPasen assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten). Die Chaperone der Hsp100 Familie werden nochmals, anhand der Anzahl ihrer Nukleotidbindungsdomänen (NBD), in die Klasse I mit zwei Domänen und die Klasse II mit einer einzelnen NBD eingeteilt. Jede NBD selbst besteht aus zwei höchst konservierten Motiven, welche als Walker A und Walker B bezeichnet werden. Beiden Motiven ist eine spezielle Funktion in der ATP-Hydrolyse zuzuordnen. Während das Walker A-Motiv primär die Bindung von ATP vermittelt, ist das Walker B-Motiv für die Hydrolyse zuständig (Schirmer et al., 1996). Im Walker B-Motiv selbst ist die enthaltene Glutaminsäure und ihr negativer Charakter wichtig für die Bindung von Wassermolekülen, welche für die Hydrolase von ATP entscheidend ist. Gleichzeitig vermittelt die vorhandene Asparaginsäure die Bindung von Magnesium, welches für die ATP-Hydrolyse benötigt wird (Hanson and Whiteheart, 2005; Walker et al., 1982). Das mittlere Segment des Proteins, welches beide Domänen verbindet, wird als Hsp70 Interaktionspunkt gesehen und soll über den Hsp70 Einfluss die ATPase-Funktion des Chaperons erhöhen können (Lee et al., 2013). Strukturell gesehen bilden Hsp100 Monomere der Klasse I unter ATP-Einfluss höhere Oligomere in Form von Hexameren (Schirmer et al., 1996). Die Analogie zu Hsp60 Proteinen ist unverkennbar, da ebenfalls hexamere Ringe gebildet werden, jedoch ist der Durchmesser des Innenraumes von Hsp100 Proteinen deutlich geringer. Eine unterstützte Faltung ganzer Proteine im Hohlraum ist daher unwahrscheinlich. Vielmehr kann man sich den Innenraum als Nadelöhr vorstellen, durch welches Polypeptidketten aktiv gezogen werden, um diese zu entfalten (Deville et al., 2017; Lee et al., 2010). Dadurch bekommen Hsp100 Proteine eine besondere Bedeutung

unter proteotoxischem Stress. Sie sind in der Lage aggregierte Proteine aktiv zu entfalten, um diese zur Rückfaltung über das Hsp70 System oder zum Abbau durch Proteasen bereitzustellen (Mogk et al., 2015). Der Mechanismus, welcher über das Schicksal der rückgefalteten Proteine entscheidet, ist weitestgehend unerforscht. Wie anderen Chaperonen, können auch Hsp100 Proteinen kompartiment-spezifische Eigenschaften zugeordnet werden. So sind beispielsweise das bakterielle ClpB und seine Homologen in anderen Organismen von unterschiedlicher Bedeutung für die Entfaltung von Proteinen und werden deshalb auch als Disaggregasen bezeichnet (Haslberger et al., 2008; Kirstein et al., 2009). In eukaryotischen Mitochondrien von Bäckerhefen findet sich ein homologes ClpB-Protein, das Hsp78 (Abrahão et al., 2017). Hsp78 ist zwar nicht essentiell für die mitochondriale Funktion unter Normalbedingungen, jedoch von großer Bedeutung nach Hitzestress bei der Wiederherstellung des mitochondrialen Netzwerkes und der Auflösung von Proteinaggregaten (von Janowsky et al., 2006; Leonhardt et al., 1993; Lewandowska et al., 2006). Bisherige Analysen an Hsp78 zeigen lediglich ein kleines Protein-Interaktom auf und könnten auch keine eindeutigen Aussagen über seine strukturelle Dynamik treffen. Bisher wurden vielfach Hexamere, aber für das homologe bakterielle ClpB, zusätzlich Heptamere identifiziert (Kim et al., 2000; Krzewska et al., 2001; Leidhold et al., 2006). Hierbei stellt sich die Frage, in welchem Zustand Hsp78 funktionell ist und ob das Chaperon verschiedene strukturelle Formen durchläuft. Des Weiteren wäre es von großem Interesse das Interaktom des Chaperons unter verschiedenen Bedingungen zu beleuchten, um mögliche Substratpopulationen zu identifizieren und diese zu charakterisieren. Als interessante Substrate wurden bisher unter anderem Chaperone wie Ssc1, aber auch andere Proteine wie Lys4 und Ilv5 festgestellt (Bateman et al., 2002; Erives and Fassler, 2015; Leidhold et al., 2006). Im Gegensatz dazu besitzen humane Mitochondrien kein Hsp100 Homolog. Es wird hier vermutet, dass dieses evolutionär durch die kooperative Funktion von Hsp70 und Tid1 abgelöst wurde (Iosefson et al., 2012). Dennoch finden sich auch andere, noch nicht ausreichend erforschte, Clp-Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten zahlreicher Organismen.

Als letzte Chaperon Familie sind noch die bereits oben angeführten kleinen Hitzeschockproteine zu nennen. Sie zeichnen sich durch ihre Vielseitigkeit und Kooperativität aus. Wie bereits erwähnt agieren sHsps ATP-unabhängig und binden

aktiv an ungefaltete Proteine bzw. Proteindomänen um diese zu stabilisieren (Mogk and Bukau, 2017). Die konservierte α -Kristallin Domäne, welchen allen sHsps gemein ist, verleiht auch dem bekanntesten Vertreter der sHsp-Familie seinen Namen. Studien zu α -Kristallin zeigen die Dynamik, mit welcher sHsp Monomere unter verschiedenen Bedingungen, zu unterschiedlichen Oligomeren kooperieren. Hierbei können Einheiten von 9 bis hin zu 50 Monomeren zusammenfinden, um die Aggregation bestimmter Proteine zu verhindern (Haslbeck, 2002).

2.1.3 Protein Degradation

Zur Erhaltung der zellulären Proteinhomeostase ist es wichtig Proteine, welche nicht benötigt werden oder beschädigt sind und nicht mehr repariert werden können, abzubauen. Gleichzeitig liefert die Spaltung dieser Polypeptidketten verfügbare Aminosäuren für die Proteinbiosynthese oder kann über spezifische Spaltprodukte Signale oder Funktionen vermitteln. Das Zytoplasma von Eukaryoten besitzt als eines der größten Zellkompartimente keine klassischen Proteasen, wie Lon oder Clp-Proteasen, für den Abbau geschädigter Proteine. Stattdessen ist das sogenannte Ubiquitin-Proteasom-System dafür zuständig die Degradation von Proteinen zu bewerkstelligen (Berner et al., 2018). Beschädigte Proteine werden über Ubiquitin-Ligasen erkannt und mit Ubiquitin gekoppelt, um diese so für den Abbau im 26S Proteasom zu markieren. Das 26S Proteasom selbst ist ein zylindrischer Komplex bestehend aus der proteolytisch-aktiven 20S Untereinheit und der regulatorischen 19S Untereinheit. Die 20S Untereinheit besteht aus vier aufeinanderliegenden Ringkomplexen, welche wiederum aus je 7 Untereinheiten aufgebaut sind. Die inneren Ringe sind für die proteolytische Spaltung der Polypeptidketten zuständig, während die äußeren Ringe die ATP-Hydrolyse vermitteln (Naujokat and Hoffmann, 2002). Die regulatorische 19S Untereinheit ist in Analogie zu den Hsp100 Chaperonen unter ATP-Verbrauch für die Substratentfaltung und Translokation zuständig und kann die Öffnung der 20S Untereinheit verschließen (Grice and Nathan, 2016).

Obwohl sich Proteasom-Komplexe auch in anderen Zellorganellen, wie dem Zellkern vorfinden, besitzen die meisten Organellen andere Systeme für den Proteinabbau. So enthalten Bakterien und eukaryotische Organellen wie das Lysosom, Endoplasmatisches Retikulum oder Mitochondrien verschiedene lösliche oder

Membran gebundene Proteasen. Als bekannteste Vertreter können die mitochondrialen Proteasen Lon und ClpP gezählt werden. Beide besitzen eine hohe Ähnlichkeit zu den Hsp100 Chaperonen, da sie ebenfalls zur Gruppe der AAA+ Proteine gehören und ringförmige Komplexe bilden. Da der Großteil dieser Proteasen keine eigene Substratentfaltungsaktivität aufweist, müssen die Substrate zuvor teilweise aktiv entfaltet werden. Es wird angenommen, dass die Lon Protease einen N-terminalen entfaltenen Polypeptidteil benötigt, um am Substrat angreifen zu können und proteolytisch zu spalten. Zur Entfaltung der Substrate werden Hsp100 Chaperone benötigt, welche mit den Proteasen kooperieren (Kirstein et al., 2009; Sauer and Baker, 2011). In Analogie zu den bereits angeführten Hitzeschockproteinen werden in Hefen Proteasen unter bestimmten Stressbedingungen ebenfalls hochreguliert. Besonders bei Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species (ROS)), wodurch in der Zelle fehlmodifizierte Proteine akkumulieren, spielen Proteasen eine wichtige Rolle (Bender et al., 2010; Quirós et al., 2016). Im Kontrast dazu kann angenommen werden, dass bei mildem Temperaturstress, Proteine eher aggregieren und dann disaggregiert und zurückgefaltet werden. In diesem Kontext kann der Hsp100 Chaperon Familie eine besondere Rolle zugesprochen werden, da sie Substrate sowohl zur Degradation als auch zur Rückfaltung vermittelt (Voos, 2013).

Eine weitere Form des Proteinabbaus repräsentiert die Autophagie. Bei diesem Prozess werden bestimmte Strukturen spezifisch oder unspezifisch von einer Doppelmembran umgeben und ein sogenanntes Autophagosom gebildet. Dieses fusioniert anschließend mit der Vakuole oder Lysosomen, welche naturgemäß viele Proteasen besitzen und so die Proteine abbauen können (Nakatogawa et al., 2009).

2.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind durch die Endosymbiose von prokaryotischen Zellen mit anderen Einzellern entstanden. Das aufgenommene Bakterium hat sein Genom größtenteils mit dem Einzeller fusioniert und dadurch die Bildung eines Zellkernes vorangetrieben. Dennoch sind Gene in dem Organell verblieben, wodurch Mitochondrien eine eigene spezifische Proteinbiosynthese-Maschinerie besitzen. Aufgrund der bakteriellen Abstammung besitzen mitochondriale Proteine eine hohe Ähnlichkeit zu bakteriellen Proteinen. Trotzdem sind aufgrund der regulatorischen

Mechanismen, welche durch die Einbettung der Organelle ins Zellgefüge von Eukaryoten entstanden sind, einige Unterschiede festzustellen. (Martin et al., 2015; Mehta et al., 2018). Diese zeigen sich beispielsweise in dem Aufbau der Doppelmembran des Organells. Hier finden sich spezifische membrangebundene oder membranintegrierte Proteine für den Proteintransport und andere Moleküle, welche einen konstanten Austausch mit dem Zytoplasma ermöglichen (Chacinska et al., 2009; Palmieri et al., 2011).

Die Proteinkomplexe der Atmungskette, welche in die innere mitochondriale Membran eingebettet sind, bauen einen Protonengradienten zwischen Intermembranraum und mitochondrialer Matrix auf. Dieser wird wiederum dafür genutzt um den ATP-Synthase Komplex anzutreiben, welcher schließlich ATP synthetisiert. Gekoppelt ist dieses System mit dem Citratzyklus, welcher in der mitochondrialen Matrix abläuft und verschiedene metabolische Produkte herstellt und die Atmungskette mit Substraten versorgt. Der Citratzyklus wiederum benötigt energiereiche Ausgangsstoffe und kann so sowohl Fettsäuren über Acetyl-CoA, Kohlenhydrate über Pyruvat oder Proteine über Aminosäuren verstoffwechseln. Folglich spielen Mitochondrien eine bedeutende Rolle im Fettsäurestoffwechsel, dem Aminosäurehaushalt und der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten (Evans and Neuman, 2016; Smith et al., 2012). Darüber hinaus kann das Mitochondrium über Membran-Kontakte mit anderen Organellen interagieren und so beispielsweise überschüssiges Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum abpuffern. Diese Membran-Kontakte sind Gegenstand aktueller Forschungsansätze und können gegebenenfalls weitere Funktionen aufweisen (Lee and Min, 2018). Weiterhin kann das Mitochondrium durch Ausschleusen von Degradationsfragmenten oder Signalmolekülen andere zelluläre Prozesse einleiten, sowie beeinflussen. In diesem Kontext ist speziell der Prozesse des induzierten Zelltodes durch Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien (intrinsische Apoptose) zu nennen (Jeong and Seol, 2008) (Abbildung 1).

Darüber hinaus ist auch der Prozess der Mitophagie von entscheidender Bedeutung für die Zellhomöostase. Hierbei werden geschädigte Mitochondrien über spezifische Membranproteine markiert und analog zur Autophagie abgebaut. Fehler in diesem Prozess werden mit neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson in Verbindung gebracht (Pickrell and Youle, 2015). In Einklang mit den Beobachtungen bei

Parkinson spielen mitochondriale Defekte auch eine entscheidende Rolle bei Alzheimer. Erkenntnisse zeigen, dass durch Aggregationsprozesse von kurzen Amyloid Beta Peptiden es unter anderem zu mitochondrialen Defekten kommt, welche wiederum zum Absterben von den betroffenen Nervenzellen führen (Canevari et al., 2004; Cenini et al., 2016). Prinzipiell spielen Mitochondrien in allen Zellen eine fundamentale Rolle, allerdings scheint es vor allem in Zelltypen mit hohem Energiebedarf entscheidend zu sein, die mitochondriale Funktionalität aufrecht zu erhalten. Im Besonderen sind Zellen betroffen deren Erneuerungsrate gering ist und sich somit toxische Substanzen über die Zeit anreichern können. Gleichzeitig sind diese Zellen für den betroffenen Organismus zu wichtig um sie durch Apoptose zu beseitigen, wodurch es schließlich zu den genannten Krankheitsmustern kommt (Fivenson et al., 2017).

Bis es jedoch zur Mitophagie oder sogar zur Apoptose von Zellen kommt, sind Mitochondrien in der Lage sich durch ihre eingebauten Protein-Qualitätskontrollsysteme oder durch ihre dynamischen Eigenschaften, zu behelfen. Mitochondrien entstehen grundsätzlich nicht *de novo*, sondern werden durch Abschnürung aus bereits vorhandenen Clustern gebildet. Gleichzeitig können mitochondriale Strukturen auch miteinander fusionieren und somit mitochondriale Proteine umverteilen. Diese Dynamik wird in Bäckerhefe unter anderem durch die Aktivität der Proteine Fis1 und Fzo1 ermöglicht. Das Protein Fis1 ist für die Rekrutierung von DRP-Proteinen zuständig, welche die Abschnürung von Mitochondrien vermitteln. Im Gegensatz dazu werden das äußere Membranprotein Fzo1 und das Protein Opa1 für die Fusion von mitochondrialen Clustern benötigt (Mishra and Chan, 2014). Folglich ist das mitochondriale Netzwerk in der Lage sich durch seine Dynamik vor der Akkumulation von Schäden im gesamten Netzwerk zu schützen. Speziell der Erhalt des mitochondrialen Erbgutes ist hierbei wichtig, da durch die Fusion von verschiedenen Clustern Mutationen komplementiert werden können (Kowald and Kirkwood, 2011). Äußerliche Stressoren so wie Hitze führen hingegen zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes, um so eine schnelle Degradation von beschädigten Clustern über Mitophagie zu begünstigen (Fedoseeva et al., 2017). Darüber hinaus können beispielsweise Aggregate innerhalb des Netzwerkes zusammengetragen werden und dann abgeschnürt werden, um die Funktionalität des Clusters zu erhalten (Bruderek et al., 2018).

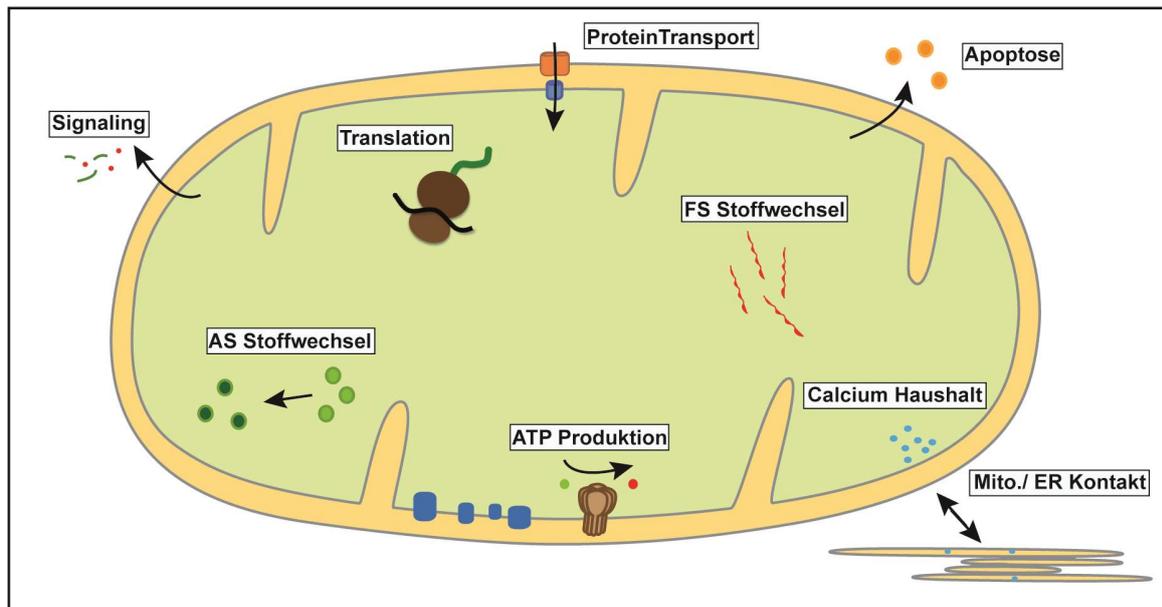


Abbildung 1: Funktion von Mitochondrien

Exemplarische Übersicht über die verschiedenen Funktionen von Mitochondrien. Abgebildet ist eine vereinfachte Darstellung eines Mitochondriums, welches in Kontakt mit Teilen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) steht. AS (Aminosäure); FS(Fettsäure)

2.3 Protein Homöostase in Mitochondrien

2.3.1 Biosynthese von mitochondrialen Proteinen

Zusätzlich zur Proteinbiosynthese im Zytoplasma befinden sich ebenfalls Ribosomen im Inneren der mitochondrialen Matrix. Das mitochondriale Genom umfasst im Menschen 13 Proteine, aber auch weitere rRNAs, tRNAs und mRNAs (Gustafsson et al., 2016). Zusammengefasst liegt die Zahl aller Hefevarianten bei 30 bis 40 verschiedenen Genen im mitochondrialen Genom. Von diesen fällt der Großteil auf tRNAs und rRNAs der großen und kleinen ribosomalen Untereinheiten, aber umfasst auch bis zu 15 weitere Proteine bzw. Proteinuntereinheiten (Freel et al., 2015). Alle benötigten Komponenten für die Transkription und Translation werden extern über die Importmaschinerie eingeschleust und in der Matrix assembliert (Herrmann et al., 2013; Mick et al., 2011). Die mitochondriale Proteinbiosynthese unterscheidet sich von der zytoplasmatischen Proteinbiosynthese. Zum einen besitzt das mitochondriale Genom eine unterschiedliche Codon-Nutzung (Ott et al., 2016). Zum anderen weisen die mitochondrialen Ribosomen eine andere Struktur auf. Der Grund für die Erhaltung dieser Maschinerie liegt in den besonderen Eigenschaften der mitochondrial-codierten Proteine. Diese besitzen aufgrund der Tatsache, dass sie als

Atmungskettenkomplex-Untereinheiten membranständig sind, eine besonders hohe Hydrophobizität. Diese macht sie wiederum äußerst anfällig für unerwünschte Interaktionen mit Proteinen in ihrem unmittelbaren Umfeld und bedarf deshalb einer direkten kotranslationalen Insertion in die Innere mitochondriale Membran durch einen spezifischen Proteininsertionskomplex namens Oxa. Hierdurch minimiert sich die Wahrscheinlichkeit ungewollter Aggregationsprozesse (Hildenbeutel et al., 2012). Gleichzeitig bedarf dieses System jedoch einer feinen Koordination mit der Assemblierung der zytoplasmatisch translatierten Atmungskettenkomplex-Untereinheiten. Folglich müssen die Prozesse des Imports und der Translation aller beteiligten Proteine genau abgestimmt sein, um nicht aus dem Gleichgewicht zu geraten. Dieser Zustand kann jedoch durch äußere Stressoren gestört werden und benötigt deshalb zusätzlicher Schutzmechanismen zu dessen Erhaltung (Giegé et al., 2005; Ott et al., 2016).

2.3.2 Import in Mitochondrien

Die Versorgung von Mitochondrien mit neu-synthetisierten Proteinen aus dem Zytoplasma ist fundamental für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase und der Funktionalität. Deshalb wird mitochondriale System dauerhaft mit den benötigten Substraten und Proteinen aus dem Zytoplasma versorgt. Dieser Prozess wird als Import bezeichnet und stellt einen koordinierten und streng regulierten Ablauf dar. Im Falle einer untypischen Situation können jedoch auch Proteine spezifisch aus dem Zytoplasma eingeschleust werden. Die im Nukleus codierten Proteine werden im Zytoplasma an Ribosomen translatiert und besitzen eine vordefinierte Zielsequenz, welche sie für den Import in die mitochondriale Matrix markiert (Avenidaño-Monsalve et al., 2020). Diese 15 bis 50 Aminosäuren lange Sequenz befindet sich meistens am N-terminalen Ende und ist durch eine erhöhte Anzahl von hydrophoben und positiv geladenen Aminosäuren gekennzeichnet. Diese Sequenzen können amphipatische Helices bilden (Moberg et al., 2004; Saitoh et al., 2007; Taylor et al., 2001). Ein Protein mit angefügter Zielsequenz wird als Präprotein bezeichnet. Da Mitochondrien von einer Doppelmembran umgeben sind, bedarf es weiterer interner Zielsequenzen, welche eine Verbleib im Intermembranraum oder die Insertion in eine der beiden Membranen, durch enthaltene Stop-Sequenzen, vermitteln können. Der Import selbst

wird durch spezialisierte Membranproteine und Adapter in beiden Membranen ermöglicht. Eine besondere Rolle dabei spielen die beiden Translokationskomplexe TOM (engl. Translocase of the outer membrane) und TIM (engl. Translocase of the inner membrane). Der TOM-Komplex besteht unter anderen aus den beiden Rezeptorproteinen Tom20 und Tom70, welche die Präproteine auf zytoplasmatischer Seite erkennen und an das membranintegrierte Kanalprotein Tom40 weiterleiten (Ahting et al., 2001; Model et al., 2008; Saitoh et al., 2007). Im Intermembranraum angekommen kann es je nach Art der weiteren internen Zielsequenzen über den Sam-Komplex in die äußere Membran eingebaut werden, über den TIM22-Komplex in die innere Membran eingebaut werden, über die Peptidase Mia in den Intermembranraum freigesetzt werden oder an den inneren Translokations-Komplex TIM23 weitergeleitet werden (Chacinska et al., 2004, 2005; Rehling et al., 2003; Wiedemann et al., 2003). Hier wird durch das vorliegende Membranpotential eine Translokation bewerkstelligt, bis ein Teil der N-terminalen Proteinsequenz durch das Matrix-Chaperon Ssc1 gebunden und in die Matrix gezogen werden kann (Krayl et al., 2007).

In diesem Fall wird das mitochondriale Hsp70 über die Proteine Pam16, Pam18 und Tim44 an die innere Membran gebunden und bildet so mit weiteren Proteinen den PAM-Komplex, welcher auch als Import-Motor-Komplex bezeichnet wird (Chacinska et al., 2009). Der Nukleotidaustausch erfolgt unter Hilfe von Mge1 (Voos et al., 1994). Gleichzeitig wird über das Zinkfingerprotein Zim17 die Substratspezifität vom Ssc1 bestimmt (Lewrenz et al., 2013). Das zeigt die Vielseitigkeit von Ssc1, da es sonst in der Matrix, als eines der wichtigsten Proteine, an Proteinfaltungsprozessen beteiligt ist. Eben diese Vielseitigkeit könnte gegebenenfalls durch spezifische Modifikationen des Chaperons reguliert werden. Wir vermuten, dass posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, die Funktionalität beeinflussen könnten. In der mitochondrialen Matrix angekommen wird letztlich die Zielsequenz des importierten Proteins durch die mitochondriale-prozessierungs-Peptidase MPP abgespalten und das importierte Protein in seine funktionelle Struktur gefaltet (Chacinska et al., 2009).

2.3.3 Proteinfaltung und Aggregation

Nach der Bindung der Präproteine durch das Ssc1, deren vollständiger Translokation und der abschließenden Prozessierung durch MPP, wird das importierte Protein durch das mitochondriale Hsp60 gefaltet. Dieser Prozess ist dem Proteinfaltungsmechanismus des bereits beschriebenen, bakteriellen GroEL sehr ähnlich und bedarf ebenfalls der Kooperation eines Hsp10 Kochaperons (Voos, 2013).

Kommt es während der Lebensdauer eines mitochondrialen Proteins zur Beschädigung und einer daraus resultierenden Fehlfaltung, können Aggregate entstehen. Da in Mitochondrien eine Vielzahl biochemischer Prozesse parallel abläuft und dabei reaktive Nebenprodukte entstehen können, kann es zu unerwünschten Modifikationen von Proteinen kommen. Als prominentes Beispiel in Mitochondrien ist die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Atmungskette zu nennen. Diese wiederum können Proteine unwiderruflich oxidieren und zu deren Aggregation führen (Choksi et al., 2004). Zusätzlich lässt sich bekanntlich die Struktur von Proteinen durch Zufuhr externer Energie beeinflussen. In diesem Zusammenhang kann es durch Exposition mit Hitze, aufgrund äußerer Temperatureinflüsse, als auch durch intrinsische Wärmeentstehung bei Stoffwechselprozessen, zu einer erhöhten Temperaturbelastung der Proteine kommen (Slimen et al., 2014). Als Folge können Aggregationsprozesse auftreten. Darüber hinaus können Mutationen oder Schäden an Komponenten des Qualitätskontrollsystems, wie den Matrix-Chaperonen Hsp60 oder Hsp70, aber auch die Beeinträchtigung der Degradation, zu einer Akkumulation von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen führen (Bender et al., 2010, 2011; Morano et al., 2012). Eine Studie in humanen Mitochondrien konnte aufzeigen, dass das mitochondriale Proteom relativ robust ist und lediglich eine geringe Anzahl an Proteinen aggregiert. Es konnte ein Mechanismus für den Stopp der mitochondrialen Translation durch die Aggregation des wichtigen Elongationsfaktors Tufm identifiziert werden. Im Zusammenhang mit den Informationen über eine temperaturbedingte Reduktion des Proteinimports aus dem Zytoplasma, resultiert dadurch eine Form der Synchronisation der beiden Kompartimente. Fällt der Import von zytoplasmatisch-translatierten Proteinen aus, bedarf es keiner intramitochondrialen Translation von Atmungskettenkomponenten (Wilkening et al., 2018). Im Kontrast dazu konnten in

Hefe Mitochondrien bereits einige thermolabile Proteine festgestellt werden, welche in ihrer Funktionalität einen großen Einfluss auf die interne Proteinhomöostase haben (Bender et al., 2010, 2011; Lewandowska et al., 2006). Gleichzeitig wird angenommen, dass die vorherrschende Temperatur im Inneren von Mitochondrien aufgrund der Vielzahl metabolischer Prozesse dauerhaft erhöht sein könnte (Chrétien et al., 2018). Dies würde jedoch bedeuten, dass mitochondriale Proteine durch ihren Aufbau eine höhere Stabilität aufweisen sollten oder dass die Aktivität der Chaperone dauerhaft erhöht sein sollte. Experimente zur Thermoinduktion von mitochondrialen Chaperonen, zeigen mit der Ausnahme für Hsp78 und Mdj1, jedoch keine so hohe Induktivität, wie in anderen Kompartimenten. Die beiden Chaperone Ssc1 und Hsp60 bleiben auch unter Hitzestress auf einem konstanten Niveau (Bender et al., 2010).

2.3.4 Proteinrückfaltung, Degradation oder Aggregatablagerung

Sind Proteine durch einen der eben beschriebenen Prozesse aggregiert, ist es für die Zelle wichtig die daraus resultierenden schädlichen Prozesse zu minimieren. Durch das Vorkommen von unlöslichen Proteinaggregaten können Aggregationsprozesse anderer Proteine begünstigt werden. Grundsätzlich ist hierbei die exponierte hydrophobe Oberfläche maßgebend (Wang and Roberts, 2018). Das Protein-Qualitätskontrollsystem ist in der Lage, je nach Art der aggregierten Proteine, unterschiedliche Lösungsoptionen einzuleiten. Für wichtige und zelleigene Proteine ist es prinzipiell sinnvoll eine Disaggregation und anschließende Rückfaltung in die native Struktur durchzuführen. Hsp70 Proteine bzw. Ssc1 können zum Beispiel in der mitochondrialen Matrix an aggregierte Proteine binden (Liu et al., 2001). In dieser Rolle interagiert Ssc1 typischerweise mit dem J-Protein Mdj1, aber auch mit dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Prip-Buus et al., 1996; Westermann et al., 1995). Mit Hilfe der Disaggregationsaktivität von Hsp78, können diese anschließend entfaltet und abschließend über Ssc1 oder in Kooperation mit Hsp60, wieder in die funktionelle Struktur gefaltet werden. Zusätzlich können Proteine, welche beispielsweise durch den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies irreversibel beschädigt worden sind, nach der Entfaltung durch Hsp78 an die Lon Protease Pim1 zur Degradation weitergeleitet werden (Krzewska et al., 2001; Voos, 2013; Wagner et al., 1994).

Bei einer Überlastung dieses Systems oder dem Auftreten größerer Mengen Fremdprotein in einem Organell oder dem Zytoplasma, kann es zu einer gerichteten Aggregatablagerung kommen. In diesem Zusammenhang wird besonders die Rolle der Degradation, als maßgebend angesehen. Beim Ausfall der Degradation oder einer Überlastung dieser, werden Proteinaggregate zu größeren Aggregatstrukturen zusammengetragen bzw. bilden spezifische Aggregatablagerungsstrukturen. Bereits bekannte Proteinaggregatablagerungs-Kompartimenten finden sich im Zytoplasma (IPOD/CytoQ) oder in Zusammenhang mit dem Zellkern (JUNQ/INQ)(Escusa-Toret et al., 2013; Hill et al., 2017). Für spezifische Proteine, wie das Alzheimer assoziierte Amyloid Beta Protein, sind verschiedene oligomere Strukturen bis hin zu amyloiden Fibrillen bekannt. Im letzteren Fall scheint es durch die Ausbildung fibrillärer Strukturen zu einer Oberflächenminimierung zu kommen, welche somit die exponierten hydrophoben Proteinstrukturen verringert und Koaggregationsprozesse beschränkt. Demzufolge sind kleinere Oligomere deutlich reaktiver und toxischer für die zelluläre Protein-Homöostase (Hoshino, 2016; Stefani and Dobson, 2003). Auch dieser Prozess scheint die Beteiligung des Hsp78-Proteins in Hefe zu benötigen. In Mitochondrien erfolgt diese Ablagerung an den Zellkern (IMiQ) und wird durch die mitochondriale Dynamik aus Fusion und Abschnürung vermittelt (Bruderek et al., 2018) (Abbildung 2).

Das mitochondriale Matrix-Chaperon Hsp78 ist in Hefe ein zentraler Regulator für die Auflösung von aggregierten Proteinen und in der Lage verschiedene Prozesse zur Detoxifizierung einzuleiten (Röttgers et al., 2002). Hsp78 kann die mitochondriale Translation nach Inaktivierung durch Hitzestress reaktivieren und hat über die Rückfaltung von Ssc1 ebenfalls Einfluss auf den Proteinimport (von Janowsky et al., 2006; Schmitt, 1996). Eine genaue Analyse dieser Mechanismen und die Beleuchtung der Substratpopulationen, sowie eine mögliche situationsbedingte Substrat-Hierarchie, sind daher von fundamentalem Interesse.

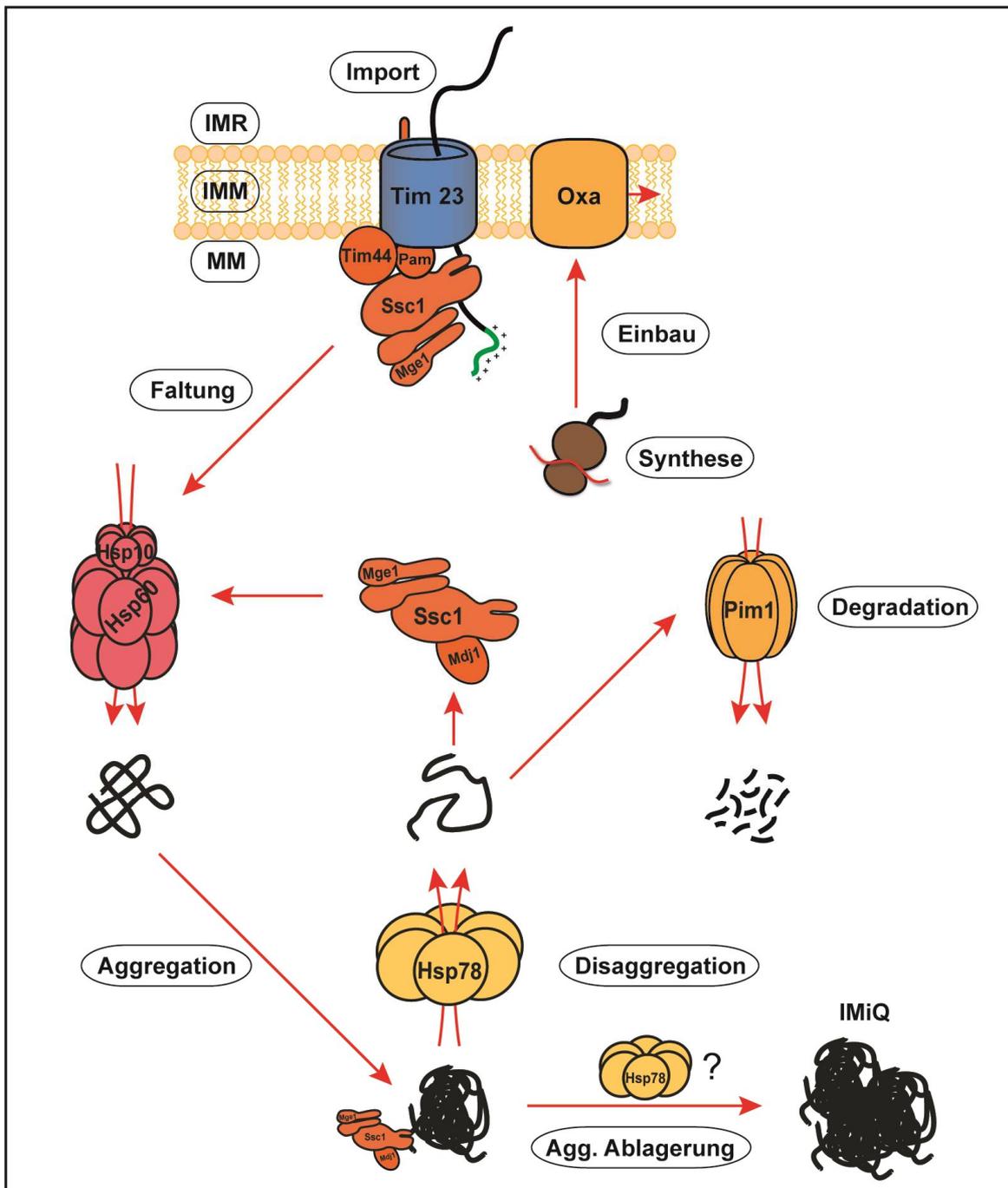


Abbildung 2: Proteinhomöostase in Hefemitochondrien

Schematische Darstellung der Proteinhomöostase in Hefemitochondrien. IMR (Intermembranraum); IMM (innere mitochondriale Membran); MM (mitochondriale Matrix); IMiQ (engl.: intramitochondrial protein quality control compartment)

2.4 AAA+ Protein Substratstudien

Zur Identifizierung von Substratproteinen, sowie anderen Interaktionspartnern für AAA+ Proteine, werden verschiedene Analysemethoden kombiniert. Grundlage für das effektive "Einfangen" von Substraten im Englischen auch als "trapping"

bezeichnet, bildet die genetische Modifikation des AAA+ Proteins, welches für die jeweilige Studie analysiert werden soll. Die hergestellten Protein Mutanten werden folglich auch als "Trap-Mutanten" bezeichnet. Der Austausch katalytisch aktiver Aminosäuren führt je nach Art der eingebrachten Aminosäure zum völligen Verlust der Enzymaktivität oder zu einer Reduktion der Aktivität (Mogk et al., 2003; Weibezahn et al., 2003). Die typische AAA+ Struktur mit je zwei NBD ist stark konserviert und bereits gut charakterisiert. Die Walker A-Motive sind für die Bindung des ATP und die Walker B-Motive für dessen Spaltung zuständig (Hanson and Whiteheart, 2005; Walker et al., 1982). Als Chaperone benötigen AAA+ Proteine für die Bindung von Substraten die simultane Bindung von ATP. In diesem hoch affinen, ATP-gebundenen Zustand, können Substrate im Inneren des AAA+ Proteins eingefangen werden. Da typischerweise eine direkte Hydrolyse des in dem Walker B-Motiv gebundenen Wassermoleküls stattfindet, ist dieser Zustand äußerst kurzlebig. Die Hydrolyse des gebundenen ATP führt zum Verlust der Affinität zum Substratprotein. Eine Inaktivierung des Walker B-Motives, bei simultaner Erhaltung des Walker A-Motives, führt in dieser Kombination zur temporären Aufrechterhaltung eines hoch affinen Intermediärzustands (Flynn et al., 2003, 2004; Krzewska et al., 2001; Neher et al., 2006).

Viele bisherige *in vivo* "trapping"-Experimente wurden an katalytisch inaktivierten Proteasen durchgeführt. Hierbei kann man durch die Substitution einer enzymatisch aktiven Aminosäure im aktiven Zentrum der Protease, die Spaltung der Polypeptidkette unterbinden. Hierdurch wird das zuvor gebundene Substrat eingefangen. Bisherige Studien wurden an verschiedenen Clp-Proteasen wie ClpP, ClpX und ClpS, sowie Lon durchgeführt (Rei Liao and van Wijk, 2019). Bei der Betrachtung von ClpB, dem bakteriellen Homolog von Hsp78, wurden bereits Aggregations- und Disaggregationsstudien durchgeführt. Hierbei konnte durch 2D-Gelelektrophorese und SDS-PAGE, die Aggregation bestimmter Proteine festgestellt werden und deren Auflösung in Anwesenheit und Abwesenheit des Chaperons untersucht werden. Es konnten Komponenten der Transkription (RNA Polymerase) und Translationsfaktoren identifiziert werden, aber auch Proteasen wie Lon und ClpX. Es wurde vermutet, dass die Abschaltung der Transkription/Translation auf einen Schutzmechanismus hindeuten könnte und die Beteiligung von Proteasen lediglich auf deren erhöhte Aktivität unter Stressbedingungen zurückzuführen ist

(Mogk et al., 1999). In einer anschließenden Studie konnte dann eine ClpB-Trap-Mutante kloniert und charakterisiert werden. Für diese konnte erstmals eine stabile Bindung von Substraten, nach der Modifikation beider Walker B-Motive, nachgewiesen werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Anwesenheit von ATP und dessen Bindung an das Chaperon, für die Bildung der ClpB-Oligomere und somit auch für die Substratbindung, von entscheidender Bedeutung ist (Weibezahn et al., 2003).

2.5 Phosphorylierung von Ssc1

Die Beeinflussung von Proteinen durch posttranslationale-Modifikationen erhöht die zelluläre Diversität von Proteinen. Aus der Vielzahl von Modifikationen wie verschiedenen Glykosilierungsarten, Acetylierungen oder Methylierungen, ist die Kinase-abhängige Phosphorylierung von Proteinen eines der am stärksten erforschten Gebiete in der Biochemie (Ptacek et al., 2005; Wold, 1981). Kinasen und deren Gegenspieler die Phosphatasen sind biochemisch gesehen in fast alle zellulären Signaltransduktionsprozesse involviert. Durch die chemische Natur der Phosphatgruppe resultiert an der Phosphorylierungsstelle eine negative Ladung. Diese hat wiederum Einfluss auf ihr direktes Umfeld und kann so zu Konformationsänderungen im Protein führen. Typischerweise erfolgen Phosphorylierungen an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin, welche alle Hydroxylgruppen in der Aminosäureseitenkette aufweisen. Weitere Phosphorylierungsarten sind bekannt, treten jedoch sehr selten auf (Truman et al., 2012).

Bei der Suche nach bekannten Phosphorylierungsmechanismen mitochondrialer Proteine ist beispielsweise der Translokationskomplex TOM zu nennen. Für diesen wurden Phosphorylierungen der Proteine Tom20, Tom22 durch die Casein Kinase 2 (CK2) und für Tom70 durch die Protein Kinase A (PKA) identifiziert. Diese Modifikationen scheinen eine Art Regulierungsmechanismus des Imports darzustellen und können selektiv bestimmte Transportwege begünstigen (Schmidt et al., 2011). Zusätzlich konnte die Phosphorylierung des Präproteins von Tom40 festgestellt werden. Diese erfolgt wiederum durch die Protein Kinase A und reguliert so dessen Verbleib in der äußeren mitochondrialen Membran (Rao et al., 2012). Alle

genannten Modifikationen erfolgen jedoch im Zytoplasma und werden durch zytoplasmatische Kinasen vermittelt.

Bei Betrachtung der mitochondrialen Matrix fanden sich für lange Zeit wenige, eindeutig zugeordnete Kinasen und Phosphatasen, welche eine Regulierung von Proteinen und gegebenenfalls eine Signaltransduktion mittels Phosphorylierung vermitteln könnten. Neuerlich wurde diese These zumindest abgeschwächt und eine Vielzahl an möglichen Kinasen und Phosphatasen Mitochondrien zugeordnet. Es finden sich bekannte Kinasen wie PINK1 oder JNK mit Einfluss auf die mitochondriale Außenmembran, aber auch Vertreter, welche scheinbar in die mitochondriale Matrix vordringen können. Hierfür sind die Src-Kinasen, Protein Kinase A oder Protein Kinase C zu nennen. Grundsätzlich erfolgt eine Zuordnung mitochondrialer Proteine durch die Identifikation angefügter Importsignale und deren Prozessierung. Für den Großteil dieser Kinasen sind diese jedoch nicht nachgewiesen. Deshalb werden für diese Kinasen andere Importmechanismen über spezifische Adaptermoleküle angenommen. Für einige Phosphatasen wie MKP1, PTPs und PTEN sind jedoch bereits mögliche Importsignale für Mitochondrien identifiziert worden. Im Umkehrschluss macht dies auch ein Auftreten von Kinasen in Mitochondrien wahrscheinlich (Lim et al., 2016). Folglich scheint eine intramitochondriale Regulierung von Proteinen durch Kinasen möglich, darf jedoch weiterhin kritisch untersucht werden.

Für das mitochondriale Ssc1 finden sich 42 Serine, 40 Threonine und 7 Tyrosine. Aus dieser Vielzahl an potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden die beiden Positionen Thr137 und Thr330 bereits in Hochdurchsatz-Phosphorylierungsanalysen mittels Massenspektrometrie identifiziert, jedoch nicht weiter untersucht oder bestätigt (Albuquerque et al.; Reinders et al., 2007). Im Besonderen erscheint die Beleuchtung der dualen Rolle des Hsp70 Proteins sinnvoll. So fungiert es in der mitochondrialen Matrix als Faltungschaperon und an der inneren mitochondrialen Membran als Motorprotein für den Import neu synthetisierter Proteine ins Mitochondrium (Voos and Röttgers, 2002). Eine Phosphorylierung könnte möglicherweise die jeweilige Funktion definieren (Abbildung 3). Einerseits könnte die Modifikation zur Änderung des Substratspektrums führen, aber auch bestimmte Interaktionspartner beeinflussen. Der Nachweis von potentiellen Phosphorylierungen

von Ssc1 würde somit weitere Informationen über den Einfluss auf die Funktion des Chaperons, sowie auf den Bindungspartner Hsp78 liefern.

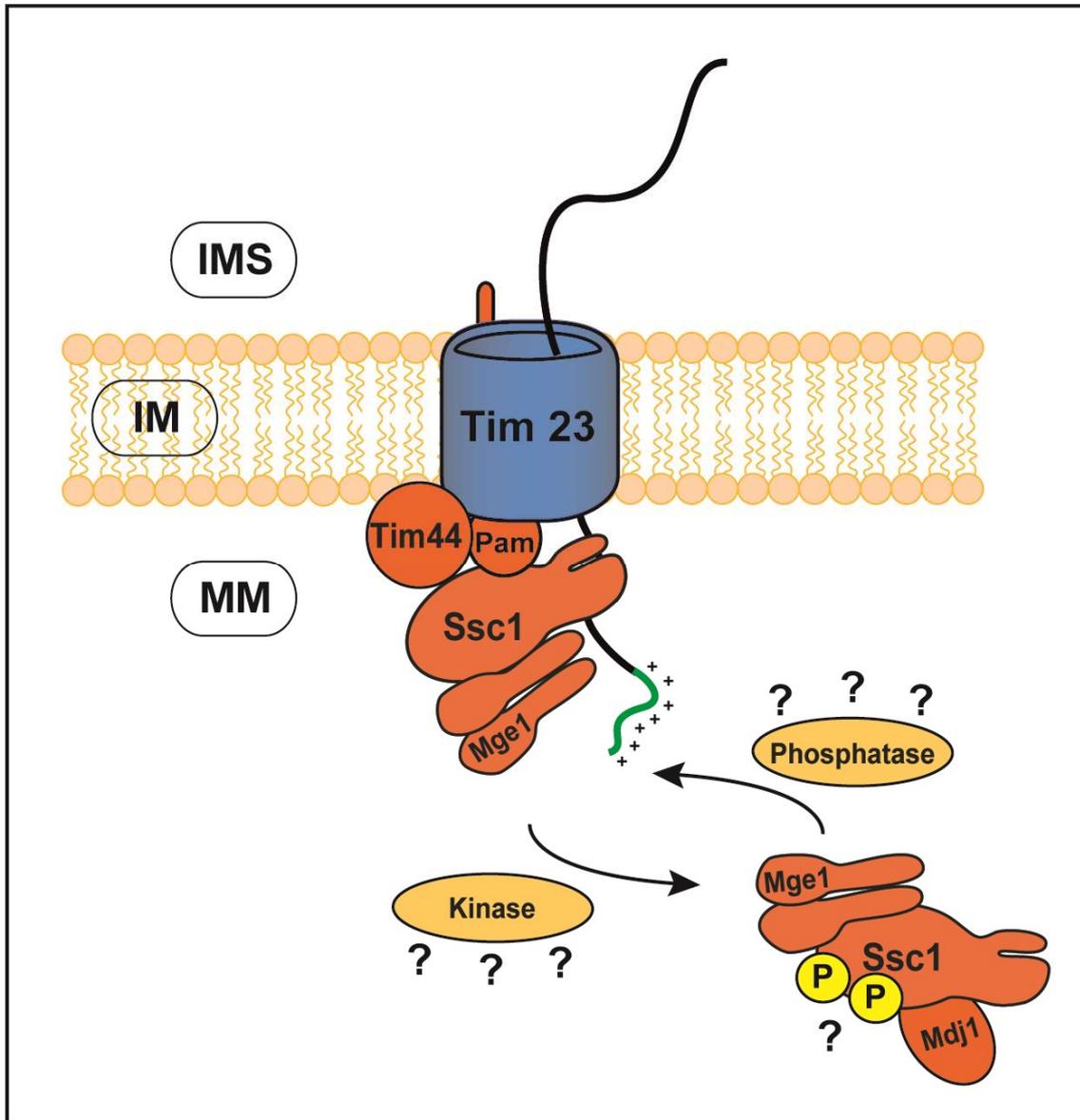


Abbildung 3: Ssc1 Phosphorylierung

Darstellung eines hypothetischen Mechanismus für die Regulierung der unterschiedlichen Funktionen von Ssc1 durch Phosphorylierung. IMR (Intermembranraum); IMM (innere mitochondriale Membran); MM (mitochondriale Matrix); P (Phosphorylierung)

3. Ziel der Arbeit

3.1 Ausrichtung der Arbeit

Die Arbeit fokussiert sich auf das Mitochondrium, welches durch seine Vielzahl an Funktionen, essentiell für das Überleben der Zelle ist. Als eigenständiges Organell besitzt das Mitochondrium ein spezifisches Proteinensemble, welches durch äußere Einflüsse, wie eine erhöhte Temperaturbelastung, beeinträchtigt werden kann. Folglich kann es zu einer thermoinduzierte Aggregation von Proteinen kommen.

In diesem Zusammenhang spielt das Protein-Qualitätskontrollsystem des Mitochondriums in der Aufrechterhaltung der Homöostase, sowie der Regeneration und dem Abbau von aggregierten oder beschädigten Proteinen, eine zentrale Rolle. Deshalb ist es von fundamentalem Interesse die genauen Zusammenhänge für die Aggregation von Proteinen zu beleuchten und die zelleigenen Prozesse, welche dieser entgegenwirken zu verstehen. Das mitochondriale Hsp100 Protein Hsp78 ist durch seine Funktion bei der Auflösung von Aggregaten, aber auch durch seine Kooperation mit dem Rückfaltungssystem (Ssc1/Hsp60) und dem Abbau von Proteinen durch Pim1 eine Art Schnittstelle.

3.2 Hsp78-Substratstudie

Das Ziel der Arbeit war die Konstruktion einer Hsp78-ATPase-Mutante in Anlehnung an das homologe bakterielle ClpB. Es konnte an bakteriellem ClpB bereits demonstriert werden, dass Mutationen in den Walker B-Motiven der beiden ATPase-Domänen zu Veränderungen der Substrataffinität führen. Mit dieser Mutante sollte über SILAC-basierte massenspektrometrische Messungen, das gesamte Hsp78-Substratspektrum identifiziert werden. Eine bioinformatische Analyse sollte die Identifizierung betroffener Proteinfamilien, deren funktionelle Einteilung im Zellkontext und die Feststellung der zugrunde liegenden Relevanz von Hsp78 ermöglichen.

Da die zugrunde liegenden Mechanismen über die Ablagerung von Aggregaten in Mitochondrien an den Zellkern (IMIQ) noch nicht aufgeklärt sind, jedoch eine Beteiligung von Hsp78 festgestellt wurde, war die Identifizierung Hsp78-abhängiger Proteinaggregate von enormer Bedeutung. Gleichzeitig könnten für die Abschnürung von Aggregaten involvierte Proteine einer Abhängigkeit von der Disaggregaseaktivität

von Hsp78 unterliegen. Für diese Fragestellung sollte nach möglichen Proteinen der Fusions- und Abschnürungsmaschinerie gesucht werden.

Des Weiteren sollte in diesem Zusammenhang eine Studie über das Aggregationsverhalten mitochondrialer Proteine durchgeführt werden. Über eine erhöhte Temperaturexposition sollte die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen induziert werden. Ziel war es mögliche Erkenntnisse über Proteineigenschaften, die eine Neigung zur Aggregation begünstigen und zusätzlich Informationen über besonders anfällige Proteinpopulation, deren Struktur oder Funktion sich ähnelt, zu gewinnen.

3.3 Phosphorylierung von Ssc1

Der genaue Mechanismus der Regulierung des Ssc1 Proteins für die jeweilige Rekrutierung der nötigen Adapterproteine, sowie ein möglicher Funktionswechsel sind noch nicht erforscht. Daher stellt sich die Frage ob Ssc1 als Motorprotein von der Membran dissoziieren kann und dann in der Matrix Interaktionen mit Hsp78 oder Mdj1 eingehen kann oder ob spezifische Modifikationen dafür nötig sind. Zwei ältere massenspektrometrische Proteomstudien zeigen, dass Ssc1 an mehreren Positionen phosphoryliert sein könnte. Die Phosphorylierung von Ssc1 könnte strukturelle Änderungen hervorrufen und eine konformationelle Anpassungen, für die Bindung verschiedener Adapterproteine bewirken. Es sollte eine massenspektrometrische Bestimmung der genauen Phosphorylierungsstellen erfolgen, sowie eine Bestätigung dieser mittels radioaktiver Phosphatmarkierung und zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese. Dies sollte als Grundlage für weitere Studien zur Regulation von Ssc1 dienen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Medien und Puffer

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien besaßen Analysequalität und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Carl-Roth, Merck, MP Biomedicals oder Sigma-Aldrich bezogen. Die speziellen Chemikalien sind in Tabelle I aufgeführt.

Tabelle I: Spezielle Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Adenosintriphosphat (ATP)	Carl Roth, DE
α -Ketoglutarat	Sigma Aldrich, DE
Amino Acid Mixture Minus Methionine and Cysteine	Promega, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich, DE
Ampicillin	AppliChem, DE
Antimycin A,	Sigma-Aldrich, DE
Bakto Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Co., US
Bakto Pepton	Becton, Dickinson and Co., US
Bakto Trypton	Becton, Dickinson and Co., US
Coenzym A (CoA)	Sigma-Aldrich, DE
Digitonin	Calbiochem, DE
EXPRESS ^[35] S Protein Labeling Mix	Perkin Elmer
Hefe-Stickstoffbasismedium ohne Aminosäuren	Carl Roth, DE
Heringspermien-DNS	Promega, DE
Imidazol	Carl Roth, DE
Isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	Carl Roth, DE
Kanamycin	Carl Roth, DE
Kreatinphosphat	Sigma-Aldrich, DE
L-Lysin (0), 2HCl (D9)	EURISO-TOP GmbH, DE
L-Lysin (+4), 2HCl (4.4.5.5-D4)	EURISO-TOP GmbH, DE
L-Lysin (+8), 2HCl (U-13C6, U-15N2)	EURISO-TOP GmbH, DE

Natriumdesoxycholat	Merck, DE
n-Dodecyl β -D-Maltosid	Sigma Aldrich, DE
Nickel-TED Säulenmaterial	Macherey-Nagel, DE
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	Carl Roth, DE
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, DE
Oligomycin	Sigma-Aldrich, DE
Polyethylene Glycol (PEG4000)	Sigma-Aldrich, DE
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, DE
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, DE
Proteaseinhibitor Cocktail Plus	Carl Roth, DE
synthetisches Kompletmedium (CSM)	MP Biomedicals, DE
synthetisches Kompletmedium (SILAC)	Foremedium LTD, EN
Thiaminpyrophosphat (TPP)	Sigma-Aldrich, DE
Valinomycin	Sigma-Aldrich, DE

Die für die Kultivierung von Bakterien und Hefen verwendeten Medien wurden selbst hergestellt. Die Tabelle II zeigt die Zusammensetzung der Medien.

Tabelle II: Medien

Medientyp	Komponenten
Bakterien (LB)	1 % (w/v) Bakto Trypton, 0,5 % (w/v) Bakto Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl
Hefe(YPD)	1 % (w/v) Bakto Hefeextrakt, 2 % (w/v) Bakto Pepton, 2 % (w/v) Glukose
Hefe (YPG)	1 % (w/v) Bakto Hefeextrakt, 2 % (w/v) Bakto Pepton, 3 % (v/v) Glycerol
Hefe (YPE)	1 % (w/v) Bakto Hefeextrakt, 2 % (w/v) Bakto Pepton, 3 % (v/v) Ethanol
Hefe (CSM-URA)	0,077 % (w/v) synthetisches Kompletmedium ohne Uracil, 0,67 % (w/v) Bakto Hefe-Stickstoffbasismedium ohne Aminosäuren, 2 % (w/v) Glukose/3 % (v/v) Glycerol/3 % (v/v) Ethanol

Hefe (CSM-LEU)	0,069 % (w/v) synthetisches Komplettmedium ohne Leucin, 0,67 % (w/v) Bakto Hefe-Stickstoffbasismedium ohne Aminosäuren, 2 % (w/v) Glukose/3 % (v/v) Glycerol/3 % (v/v) Ethanol
Hefe (-URA/-LYS) SILAC	0,072% (w/v) synthetisches Komplettmedium ohne Uracil und Lysin, 0,67 % (w/v) Bakto Hefe-Stickstoffbasismedium ohne Aminosäuren, 3 % (v/v) Ethanol + 50 mg/l der isotopenreinen Lysin Variante (0/+4/+8)

Für Platten wurden 2 % Agarose beigemischt. Die verwendeten Antibiotika wurden in der Abkühlphase dem Medium in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugegeben.

Die Tabelle III beinhaltet alle verwendeten Puffer, sofern diese nicht innerhalb der einzelnen Methoden genannt werden.

Tabelle III: Puffer

Puffer	Komponenten
Acrylamid BN	49 % Acrylamid, 3 % Bisacrylamid
Anodenpuffer (1x)	50 mM Bis-Tris
Blockierlösung	5% (w/v) Milchpulver in Dekosalt/TBS mit 0,5% Tween
CBB-Färbelösung A	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250
CBB-Färbelösung B	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250
DNA-Ladungs-Puffer (6x)	60% Glycerol, 60 mM Tris/HCl pH 8,0, 12 mM EDTA, 60 mg Bromphenol Blau
Deko-Salt (1x)	50 mM Tris, 150 mM NaCl pH etwa 9,5 (nicht eingestellt)
Entfärberlösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Fixierlösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Gel-Puffer (3x) BN	200 mM ε-amino-n-Caprinsäure, 150 mM Bis-Tris pH 7,0
Kathodenpuffer (1x) BN	50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris pH 7,0

Ladepuffer BN	5 % (v/v) Coomassie Brilliant Blau G250, 500 mM E-amino-n-Caprone Säure, 10 mM Bis-Tris pH 7,0
Lämmli-Probenpuffer (4x)	200 mM Tris/HCl pH 6,8, 8 mM EDTA, 4 % (w/v) SDS, 4 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 40 % (v/v) Glycerol, 5 mg/ml Bromphenolblau
Regenerationspuffer	250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2, 10 mM KPi pH 7,2, 10 mM Kreatinphosphat, 5 mM MgCl ₂ , 4 mM NADH, 3 mM ATP, 50 μ g/ml Kreatinkinase
Resuspensionspuffer	250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 10 mM MOPS/KOH pH 7,2, 5 mM MgCl ₂
Sammelgelpuffer (1x)	800 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
SEM-Puffer	250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF
TAE Puffer (1x)	40 mM Tris, 0,114 % (v/v) Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,0
TBS (1x)	20 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl
Trenngelpuffer (1x)	1,87 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS
Western Blot-Transferpuffer (1x)	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

4.1.2 Primer, Plasmide und Stämme

Die Tabellen IV und V vermerken alle zur Klonierung und Expression eingesetzten Primer und Plasmide.

Tabelle IV: Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
1	D386Mf	GCGTTGGAAAAGGACCTAGAAATGAAAAATGATGAATTAACAGG
2	D386Mr	CCTGTTTAATTCATCATTTCATTCTAGGTCCTTTTCCAACGC
3	TR-CyTB2f	GAATTCATTTAGGTGACACTATAGAATACGCCGCCACCATGGTAAA ATACAAACCTTTACTAA
4	TR-DHFR-C2r	GCAAGCTTTTATCATTAGTCTTTCTTCTCGTAGAC

Tabelle V: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pHSP78	pYES2, AmpR URA3 2 μ , HSP78 GAL induzierbare ÜE	Mike Ryan
pKR09	pYES2, AmpR URA3 2 μ , HSP78-6xHis GAL induzierb. ÜE	Karin Röttgers
pKR11	pUHE24, AmpR, b ₂ (107) Δ -DHFR _{ds}	Karin Röttgers
pRS315	Leervektor, AmpR LEU2 CEN	Wolfgang Voos
pTB10	pRS315, AmpR LEU2 CEN, Hsp78 ORF +/- 500 bp	Tom Bender
pTB25	pet28b, KanR2, HSP78-6x-His, M385D	Tom Bender
pNP-B04	pGEM4, AmpR, b ₂ (167) Δ -DHFR	Bernard Guiard
pWJ01	pet28b, KanR2, HSP78(E216Q)-6x-His, M385D	Witold Jaworek
pWJ02	pet28b, KanR2, HSP78(E216Q/E614Q)-6x-His, M385D	Witold Jaworek
pWJ04	pRS315, AmpR LEU2 CEN, HSP78(E216Q/E614Q)-6x-His, M385D	Witold Jaworek
pWJ05	pRS315, AmpR LEU2 CEN, HSP78(E216Q/E614Q)-6x-His	Witold Jaworek
pWJ07	pYES2, AmpR URA3 2 μ , HSP78(E216Q/E614Q)-6xHis GAL induzierbare ÜE	Witold Jaworek

Die Tabelle VI zeigt alle verwendeten bakteriellen Stämme und Hefestämme.

Tabelle VI: Bakterielle Stämme und Hefestämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
BL21C+	BL21C+Wildtyp für bakterielle Expression	Agilent
pTB25	BL21C+ mit pTB25	T. Bender
pWJ02	BL21C+ mit pWJ02	W.Jaworek
BY4741	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0	Euroscarf
NZY2	MATa, ade2-101, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, lys2-801, SSC1-6xHis::HIS3	W. Voos
WJY02	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, ydr258c::kanMX4 mit pTB10	W. Jaworek
WJY04	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, ydr258c::kanMX4 mit pWJ05	W. Jaworek
WJY07	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, mit pRS315	W. Jaworek
WJY08	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, ydr258c::kanMX4 mit pRS315	W. Jaworek

WJY11	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, hsp78 Δ ::kanMX4 mit pKR09	W. Jaworek
WJY12	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, hsp78 Δ ::kanMX4 mit pWJ07	W. Jaworek
WJY13	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, hsp78 Δ ::kanMX4 mit pHSP78	W. Jaworek
Y03617-ES	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, ydr258c::kanMX4	Euroscarf
Y13617-ES	MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, hsp78 Δ ::kanMX4	Euroscarf
YPH499	MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1- Δ 63, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, Wildtyp	W. Voos

4.1.3 Enzyme und Antikörper

In Tabelle VII sind alle Enzyme gelistet, welche den Puffern zugesetzt wurden.

Tabelle VII: Enzyme und Marker

Enzym/Marker	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Thermo Scientific, DE
Apyrase	Sigma-Aldrich, DE
GeneRuler 1 kb DNA Marker	Thermo Scientific, DE
Isozitat Dehydrogenase	Sigma Aldrich, DE
Kreatinkinase	Roche, DE
NativeMark™ Proteinmarker	Invitrogen, DE
PageRuler Prestained Proteinmarker	Thermo Scientific, DE
Phusion DNA-Polymerase	Thermo Scientific, DE
Proteinase K	Sigma-Aldrich, DE
Restriktionsenzyme	Thermo Scientific, DE
Roti®-Mark Proteinmarker	Carl Roth, DE
SigmaMarker™ Low Range Proteinmarker	Sigma Aldrich, DE
T4 DNA-Ligase	Thermo Scientific, DE
Zymolyase-20T	Amsbio, UK

Die Tabelle VIII zeigt die verwendeten Antikörper, welche ausschließlich für die Durchführung von Antikörper-abhängigen Nachweisreaktionen verwendet wurden.

Tabelle VIII: Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Organismus	Bezugsort
α -Aco1	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Hase IgG	1:5000	Ziege	Sigma-Aldrich, DE
α -Hsp78	1:500	Maus	T. Madson
α -Hsp60	1:2500	Hase	AG Pfanner
α -Ilv2	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Kgd1	1:2500	Hase	AG Pfanner
α -Kgd2	1:1000	Hase	AG Pfanner
α -Maus IgG	1:5000	Ziege	Sigma-Aldrich, DE
α -Mdh1	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Mdj1	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Mrpl40	1:1000	Hase	AG Pfanner
α -Pim1	1:1000	Hase	AG Pfanner
α -Pgk1	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -pThreonin	1:500	Maus	Invitrogen, DE
α -Rip1	1:1000	Hase	AG Pfanner
α -Ssc1	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Tom40	1:5000	Hase	AG Pfanner

4.1.4 Analysekits und Säulen

Die Tabelle IX beinhaltet die zugekauften Kits zur schnelleren Verarbeitung von Proben und für bestimmte Experimente.

Tabelle IX: Kits

Kit	Hersteller
ATP Determination Kit	Invitrogen, DE
Gel Filtration Calibration Kit HMW	GE Healthcare, US
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, DE

mMESSAGE mMACHINE transcription Kit	Invitrogen, DE
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel, DE
Pharmalyte™ 3-10 NL	GE Healthcare, US
PiColorLock™ Gold Phosphate Detection System	Innova Bioscience, DE
Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega, DE
Reticulocyte Lysate Translation System	Promega, DE
Roti®-Quant Bradfordreagenz	Carl Roth, DE
ServaLight EoSUltra CL HRP WB Substrate Kit	Serva, DE

Die Tabelle X benennt alle Säulen, welche zur Aufreinigung von Proteinen eingesetzt wurden.

Tabelle X: Säulen und weitere Materialien

Typ	Bezeichnung	Hersteller
Entsalzungssäule	PD MiniTrap G-25	GE Healthcare, US
Größenausschlusschromatographiesäule	HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg	GE Healthcare, US
Immobilinstreifen	pH 2-13, 13 cm	GE Healthcare, US
Ni-NTA Affinitätssäule	His-Trap FF crude (1 ml)	GE Healthcare, US
Ni-NTA Agarose	Ni-NTA Agarose	Invitrogen, DE
Ni-TED Affinitätssäule (selbstgep.)	Protino® Ni-TED	Macherey-Nagel, DE
Polyvinylidenfluorid Membran (PVDF)	Roti® PVDF	Carl Roth, DE
Säule zur Konzentrierung	Vivaspin 6 50.000 MWCO	Vivascience AG, DE
Vorgefertigte Säulen zum Befüllen	Poly-Prep Säulen	BioRad, DE

4.1.5 Laborgeräte

Die Tabelle XI listet alle verwendeten Geräte auf. Die gewöhnlichen Laborzentrifugen, Schüttler und Kühlschränke sind nicht aufgeführt.

Tabelle XI: Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blue Native Apparatur	Hoefler SE600	Hoefler Chemie, DE
CCD Kamera	LAS-400 mini	Fujifilm, JP
Detektionsschirm	BAS-IP MS 2025	Fujifilm, JP
Elektrophorese System	Ettan DALTsix	GE Healthcare,
Gelscanner	Perfection V700 Photo	Epson, JP
Inkubator	Innova 42	New Brunswick Scient., US
Isoelektrisches Fokussierungssystem	Ettan IPGphor 3	GE Healthcare, US
Laser-Imager	FLA-5100	Fujifilm, JP
Mikrotiterplatten-Gerät	Infinite M200 pro	Tecan, CH
Nanodrop-Aufsatz	TrayCell 105.800	Hellma Analytics, DE
PCR-Block	Biometra T3 Thermocycler	Analytik Jena AG, DE
Photometer	BioPhotometer plus	Eppendorf, DE
Potter	50 ml P. mit Reservoir	B. Braun Melsungen AG, DE
Proteinaufreinigungssystem	Äkta Purifier 100	GE Healthcare, US
Rotor Ultrazentrifuge (klein)	TLA-55	Beckman Coulter, IR
Rotor Ultrazentrifuge (groß)	SW41 Ti Swinging-B.	Beckman Coulter, IR
Ultraschall	Sonifier 250	Branson Ultrasonics™, US
Ultrazentrifuge (klein)	Optima Max-XP	Beckman Coulter, IR
Ultrazentrifuge (groß)	Optima L-80 XP	Beckman Coulter, IR
Wärmebad	Julabo TW8	Sigma-Aldrich, DE
Western Blot Apparatur	Semi-Dry-Blotter	Peqlab Biotech. GmbH, DE
Zentrifuge (groß)	Avanti J-E Centrifuge	Beckman Coulter, US

4.2 Methoden

4.2.1 Klonierung

Die in dieser Studie verwendeten DNS-Konstrukte wurden mittels konventioneller Klonierungsmethoden hergestellt. Die hsp78_{TR}-Mutante wurde in zwei Schritten aus

dem wildtyp Hsp78-Gen generiert (pWJ02). Im Rahmen dieser Arbeit wurde darüber hinaus durch Punktmutagenese eine unerwünschte Mutation an der Position 386 regeneriert. Hierfür wurden die Primer 1 und Primer 2 verwendet. Für die Erstellung des Konstrukts zur Affinitätsaufreinigung wurde das mutierte Gen über BamHI und AvrII in den bestehenden Vektor pKR09 (Hsp78-6xHis) inseriert, in welchem dadurch das wildtyp Gen ersetzt wurde. Das neu erstellte Konstrukt wurde als pWJ07 bezeichnet. In den verwendeten pYes-Plasmiden konnte somit die Expression über den enthaltenen Gal10/1 Galaktose-induzierbaren Promotor gesteuert werden. Die Konzentration der DNS wurde über einen Nanodrop-Aufsatz photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Isolierung der Plasmid-DNS wurde über das GeneJet Plasmid Miniprep Kit durchgeführt.

4.2.2 Zellkultur

4.2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Bakterienstämme der Gattung *Escherichia Coli* DH5 α und XL1-blue wurden für die Klonierungsarbeiten verwendet. Für die Expression von Proteinen wurde der Stamm BL 21-CodonPlus eingesetzt. Alle Bakterien wurden unter den gleichen Kulturbedingungen angezüchtet. Für die Anzucht wurden LB-Medien verwendet und unterschiedliche Antibiotika zugesetzt. Ampicillin wurde in einer finalen Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, während bei Kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurden. Die Kulturen wurden entweder unspezifisch zur Vervielfältigung und DNS-Isolation über Nacht inkubiert oder für einen bestimmten Zeitraum spezifisch inokuliert. Die Inkubation erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 130 rpm. Die optische Dichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

4.2.2.2 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von Bakterien mit den gewünschten Plasmiden wurden die bei -80°C gelagerten Bakterien-Aliquots langsam aufgetaut. Es wurden etwa 100 ng isolierte Plasmid-DNS hinzugegeben und die Suspension auf Eis für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 42°C für 45 Sekunden aufgeheizt und wiederum für etwa 2 Minuten auf Eis gestellt. Darüber hinaus wurde der Suspension 1 ml frisches LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 45 Minuten bei 37°C und

unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Probe bei 12.000 x g abzentrifugiert und der Überstand größtenteils verworfen. Die Zellmasse wurde abschließend in der übrigen Medienflüssigkeit resuspendiert und auf vorgefertigte LB-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden ebenfalls bei einer Temperatur von 37°C über Nacht inkubiert.

4.2.2.3 Kultivierung von Hefen

Die Kultivierung von Hefezellen erfolgte standardmäßig zur Vervielfältigung der Zellzahl, um ausreichend Material für die Isolation von Mitochondrien zu gewinnen. Hierfür wurden die Zellen aus Glycerolstocks erst auf Platten ausgestrichen und daraus kleine 5 ml Vorkulturen angeimpft. Als Medien wurden synthetisches Komplettmedium oder Selektivmedium verwendet und diesem jeweils die gewünschte Kohlenstoffquelle hinzugegeben. Hierfür wurde 2% Glukose oder Raffinose benutzt, um die Zellen unter Fermentation schnell anzüchten zu können. Für das mitochondrial-bedingte Wachstum und die Isolation der Mitochondrien, wurden als nicht fermentierbare Kohlenstoffquellen je 3% Glycerol oder Ethanol verwendet. Hierfür wurden die Kulturen bei einer OD600 von 0,1 inokuliert und bei einer OD600 von 1, durch 2 minütige Zentrifugation mit 3000 x g, geerntet. Für die Expression von Galaktose-induzierbaren Konstrukten, wurden die Zellen nach dem Ernten in Medium aufgenommen das 2% Galaktose enthielt und für die gewünschte Zeit exprimiert. Die Expression der Proteine erfolgte grundsätzlich für eine Zeit von 3 bis 4 Stunden. Abschließend wurden die Zellen geerntet, mit ddH₂O gewaschen und die Mitochondrien nach Protokoll isoliert. Die Anzucht für die Durchführung von Experimenten zur Wachstumsanalyse ist in dem jeweiligen Experiment selbst beschrieben.

4.2.2.4 Transformation von Hefen

Für die Transformation von Hefezellen wurden die Hefezellen zuerst über Nacht auf entsprechendem Medium, flüssig angezogen. Durch Zentrifugation für 1 Minute bei 12.000 x g wurde 0,5 ml Zellsuspension sedimentiert und das Pellet in 0,5 ml PLATE-Mix (40% (v/v) PEG4000, 100 mM Lithium Acetat , 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) resuspendiert. Zusätzlich wurde 2 µl Heringsspermien-DNS, 20 µl 1 M DTT und 2-3 µl Plasmid-DNS hinzugefügt und gemischt. Der Ansatz wurde über Nacht bei

Raumtemperatur inkubiert und am Folgetag für 10 Minuten bei 42°C hitzebehandelt. Nachfolgend wurde der Ansatz für 1 Minute bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand größtenteils abgenommen. Das Pellet wurde in den Resten des Überstandes wieder aufgelöst und die Suspension auf entsprechenden Selektivplatten, zur Anzucht von Hefen, ausgestrichen und bei 30°C im Inkubator gelagert. Nach 2 bis 3 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien einzeln auf neue Platten überführt, um Einzelkolonien zu selektieren. Dies wurde zweifach durchgeführt.

4.2.2.5 SILAC

Um eine Interaktionsstudie für ein mitochondriales Matrix-Protein wie Hsp78 aus der Bäckerhefe durchzuführen, müssen weitere Besonderheiten beachtet werden. Grundsätzlich bedarf es der effektiven Kultivierung der Hefezellen in einem Medium mit nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle. In unserem Fall wurden Medien mit Galaktose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle verwendet. Hierdurch wurde garantiert, dass die Hefe von der mitochondrialen Energiegewinnung abhängt und nicht ausschließlich Energie aus der Glykolyse gewinnt. Gleichzeitig musste ein spezifischer Hefestamm verwendet werden, welcher die effektive Inkorporation der beigefügten isotopenreinen Aminosäuren garantiert. Da mit bis zu drei verschiedenen Lysin-Varianten gearbeitet wurde, musste ein Lysin defizienter Hefestamm verwendet werden. Hierfür wurde ein bereits bestehender *hsp78Δ* gewählt und mit den induzierbaren Hsp78-Plasmiden transformiert. Durch den Einsatz dreier Lysin-Isotope kann somit das Hsp78-Protein (Wildtyp) mit angefügtem Polyhistidin-Tag, die *hsp78_{TR}*-Mutante mit Polyhistidin-Tag und eine Hsp78-Variante (Wildtyp) ohne Polyhistidin-Tag als Kontrolle, gleichzeitig im Massenspektrometer vermessen werden. Dieses Vorgehen ermöglicht einen vergleichbaren experimentellen Rahmen, um das Auftreten spezifischer Interaktionspartner für Hsp78 nachzuweisen. Dem verwendeten synthetischen Medium ohne Lysin und Uracil, wurde das isotopenreine Lysin zusätzlich hinzugefügt. Es wurden jeweils 50 mg/L L-Lysin (0), L-Lysin (+4) und L-Lysin (+8) verwendet. Die eingesetzten Plasmide zur Expression der Hsp78-Varianten wurden über Uracil selektiert. Nach erfolgreicher Isolation der Mitochondrien konnte anschließend eine Hsp78-Affinitätsaufreinigung durchgeführt werden. Das

gewonnene Hsp78-Eluat wurde im gleichen Verhältnis gemischt, über eine SDS-PAGE aufgetrennt, proteolytisch verdaut und im Massenspektrometer vermessen.

4.2.3 Wachstumsanalyse von Hefe (Spottest)

Für die Analyse der erworbenen Thermotoleranz bei verschiedenen transformierten Hefezellen (WJY11/12), wurden zuerst Vorkulturen über Nacht bei 30°C im Inkubator auf dem passenden Selektivnährmedium mit 3% Raffinose als Kohlenstoffquelle inokuliert. Am Folgetag wurde diese Zellen auf eine OD von 0,05 in Selektivnährmedium mit 3% Ethanol als Kohlenstoffquelle angeimpft. Die Expression der transformierten Konstrukte wurde bei einer OD von 1 gestartet. Dafür wurden die Zellen zunächst bei 12.000 x g abzentrifugiert und dann in Selektivnährmedium mit 2% Galaktose aufgenommen. Nach dreistündiger Expression wurden die Zellen für 60 Minuten bei 42°C im Wasserbad hitzebehandelt und anschließend für 30 Minuten bei 30°C regeneriert. Abschließend wurden die Zellen im Wasserbad einer Temperatur von 48°C für 60 Minuten ausgesetzt. Nach der Messung der optischen Dichte wurde eine definierte Zellzahl von 10^6 Zellen abgenommen und eine Verdünnungsreihe in 1:3 Schritten, bis zu einer Verdünnung von 1:810, auf einer 96-Well Mikrotiterplatte hergestellt. Jeweils 7 µl der Zellsuspensionen wurden mittels Multikanalpipette auf Platten mit passendem Selektivnährmedium pipettiert und bei 30°C inkubiert. Zur Identifizierung von mitochondrial-abhängigen Phänotypen, wurden die Zellen auf Platten mit nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (Glycerol) ausplattiert. Als Kontrolle wurde dies parallel auf Glukose ebenfalls durchgeführt.

4.2.4 Isolation von Mitochondrien

Die Isolation von Hefemitochondrien erfolgt nach einer Standardprozedur, welche 2001 von Diekert et al. beschrieben wurde. Wie bereits genannt wurden die Hefezellen in Abhängigkeit davon, ob ein Gen von einem Plasmid exprimiert werden sollte oder ob wildtypische Zellen gezüchtet wurden, unterschiedliche Anzuchtmethoden verwendet (siehe 4.2.2.3). Zum waschen der Zellen wurden die Suspensionen bei 3000 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nachdem die Zellen geerntet und gewaschen waren, wurden sie in einer vorgewärmten DTT-Lösung (100 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM DTT) aufgenommen und für 40 Minuten bei 30°C und 100 rpm inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen in 50 ml Zymolyasepuffer (20

mM KPi pH 7,2, 1,2 M Sorbitol) gewaschen und in 7 ml vorgewärmten Zymolyasepuffer pro Gramm Zellpellet resuspendiert. Anschließend wurde 3 mg Zymolyase pro Gramm Zellpellet hinzugegeben und die Suspension für 30 Minuten bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Verdau der Hefezellwand wurden die entstandenen Spheroblasten nochmals mit 50 ml Zymolyasepuffer gewaschen. Für den Aufschluss der Zellen wurden die Spheroblasten in 6,5 ml kaltem Homogenisierungspuffer (1 mM Tris/HCl pH 7,4, 0.6 Sorbitol, 0.5% (w/v) BSA, 1 mM PMSF) pro Gramm Pellet aufgenommen und in einen vorgekühlten Potter gefüllt. Die Hefezellen wurden anschließend im Potter mit 20 Hieben lysiert. Das entstandene Lysat wurde dann bei 1500 rpm und 4°C für 2 Minuten zentrifugiert (große Zentrifuge). Im weiteren Verlauf der Isolation wurde jeweils der Überstand behalten und das entstandene Pellet verworfen. Der Überstand wurde nacheinander bei 3000 rpm für 4 Minuten, bei 4000 rpm für 5 Minuten und anschließend für 15 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Nach dem letzten Schritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet in etwa 50 ml SEM-Puffer gelöst. Wiederum wurde bei 4000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abschließend nochmals bei 12.000 rpm für 10 Minuten. Die Konzentration der gewonnen Mitochondrien wurde mittels Bradford-Assay bestimmt und die Mitochondrien in passenden Mengen aliquotiert. Hefemitochondrien können in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und bei -80°C bis zum jeweiligen Experiment gelagert werden.

4.2.5 Protein Analyse

4.2.5.1 TCA Fällung

Die TCA Fällung wurde als Methode zur Fällung von Proteinen aus größeren Probenlösungen verwendet. Die Verminderung der Probenvolumina war gelegentlich nötig, um eine ausreichende Beladung von SDS/BN-Gelen aus Überständen, zu ermöglichen. Der Probenlösung wurden zunächst 20% des Endvolumens an 72-prozentiger Trichloressigsäure hinzugegeben und der Ansatz gevortext. Anschließend wurde die Probe für mindestens 45 Minuten bei 4°C inkubiert und bei gleicher Temperatur für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch vorsichtiges Abgießen verworfen und das meist kaum sichtbare Pellet zweimal mit je 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das verbleibende Aceton durch Inkubation bei 37°C mit offenem Deckel

langsam verdampft. Die verbleibende Probe wurde in 1x Lämmli Probenpuffer aufgenommen und konnte für die SDS-PAGE verwendet werden.

4.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford

Für den Vergleich von Versuchsansätzen war es meistens nötig vergleichbare bzw. gleiche Mengen Protein verwenden zu können. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Proteinaufreinigungen, nach der Herstellung von Lysaten oder nach der Isolation von Mitochondrien, wurde der Bradford Assay eingesetzt. Als Vergleichsprotein wurde eine Eichproteinlösung Bovinen Serum Albumin (BSA) verwendet und entsprechend von 0,1 mg/ml bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml verdünnt. Je 5 µl Proteinprobe wurde in einem Volumen von 250 µl Bradfordreagenz gelöst und nach 10 minütiger Inkubationsphase in einem Mikrotiterplatten-Gerät, die Absorption bei 595 nm gemessen.

4.2.5.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse wurden die Proben mit Lämmli-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und auf 10 prozentige wahlweise 12,5 prozentige SDS-PAGE (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Gele geladen. Die Elektrophorese wurde für 3 Stunden bei einem konstanten Strom von 30 mA durchgeführt. Das verwendete System für die Gelplatten und die Laufkammer sind aus eigener Herstellung (13 cm x 11 cm) und besitzen eine etwa doppelte Höhe und Breite im Vergleich zu Standard Minigelen. Für Crosslinking-Experimente wurden die Proteinbanden auf dem Gel anschließend über eine Silber Färbung angefärbt. Dafür wurde das Gel zweimal für je 15 Minuten in Fixierlösung (30% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert und dann für 30 Minuten in Thiosulfatpuffer (30% (v/v) Ethanol, 0,1 M NaAc pH 6,0 in 100 ml ddH₂O mit 100 mg Na₂S₂O₃). Anschließend wurde dreimal für je 10 Minuten in ddH₂O gewaschen und das Gel für 25 Minuten in Silbernitratlösung (0.1% (w/v) AgNO₃ in 100 ml ddH₂O mit 25 l 37% Formaldehyd) gefärbt. Nach dem Färben wurde das Gel kurz in ddH₂O gewaschen und zweifach kurz in Entwicklerlösung (2,5% (w/v) Na₂CO₃ in 100 ml ddH₂O mit 50 l 37% Formaldehyd) inkubiert, bis Proteinbanden sichtbar waren. Abschließend wurde die Färbereaktion durch die Zugabe von 1 ml Essigsäure gestoppt und dreifach für je 5 Minuten mit ddH₂O gewaschen. Das Gel

wurde über einem Epson Scanner digitalisiert. Gele, welche für die massenspektrometrische Analyse gedacht waren, wurden für 60 Minuten in einer Fixierlösung inkubiert und anschließend über Nacht in CBB-Färbelösung B angefärbt. Am Folgetag wurde das Gel mit ddH₂O über mehrere Stunden entfärbt.

4.2.5.4 BN-PAGE zur Analyse der Hsp78-Komplexbildung

Zur Analyse der Hsp78-Komplexbildung innerhalb von isolierten Mitochondrien wurde mit den Proben eine BN-PAGE (engl.: blue native polyacrylamide gel electrophoresis) durchgeführt. Dafür wurden zuerst 100 µg isolierte Mitochondrien in einem Regenerationspuffer (250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2, 10 mM KPi pH 7,2, 10 mM Kreatinphosphat, 5 mM MgCl₂, 4 mM NADH, 3 mM ATP, 50 µg/ml Kreatinkinase) oder einem Inhibitionsbuffer (250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2, 1 mM EDTA, 0,01 u/µl Apyrase) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Reisolation der Mitochondrien durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 x g und 4°C, wurden die Mitochondrien in 100 µl gekühltem Lysepuffer (50 mM KCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10% (v/v) Glycerol, 1% (w/v) Digitonin) durch Pipettieren (25x) lysiert. Als Gel wurde ein natives Gradienten-Gel von 5 bis 15 Prozent verwendet und 70 µl entsprechend 70 µg Mitochondrien, in Ladepuffer für BN-PAGE, geladen. Zur Kontrolle wurde 30 µl der Probe parallel auf ein 12,5% SDS-PAGE Gel geladen und nach Standardprotokoll verfahren. Zusätzlich zu der Analyse für intakte Mitochondrien wurde eine BN-PAGE Analyse für aufgereinigtes Hsp78-Protein, welches in *E. coli* exprimiert wurde, durchgeführt. Um gleichzeitig die Komplexstabilität zu untersuchen, wurde jeweils 4 µg Protein in einem Volumen von 60 µl Protein Puffer L (50 mM KCl, 30 mM HEPES, pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 4 mM ATP, 2 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerol) oder Protein Puffer H (400 mM KCl, 30 mM HEPES, pH 7,4, 2 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerol) verdünnt. Nach kurzer Inkubation wurde den Proben 6 µl Ladepuffer für BN-PAGE hinzugegeben und die Elektrophorese nach Standardprotokoll durchgeführt (Fiala et al., 2011).

4.2.5.5 2D-PAGE zur Analyse der Ssc1 Modifikation

Zur Identifizierung möglicher posttranslationaler Modifikationen an Ssc1 und im Speziellen der Untersuchung von Phosphorylierungen, wurde eine 2D-

Elektrophorese mit gereinigtem Ssc1 durchgeführt. Das Protein wurde aus Hefemitochondrien über Affinitätschromatographie gewonnen. Anschließend wurde 10 µg Protein mittels TCA gefällt und das Pellet in 400 µl Rehydrierungspuffer (8 M Harnstoff, 2 M Thio-Harnstoff, 2% (w/v) CHAPS, 20 mM DTT, 0.8% (v/v) Pharmalyte 3-10 NL, Spatelspitze Bromphenolblau) aufgenommen. Die Probe wurde dann bei 20°C für 1 Stunde und bei 1100 rpm geschüttelt. Anschließend wurde eine Isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt. Hierfür wurde die Probe auf einen trockenen 13 cm langen (pH 2-11) Immobilinstreifen aufgetragen und der Streifen in ein isoelektrisches-Fokussierungssystem eingelegt. Die nachfolgende Tabelle XII stellt das verwendete Programm zur IEF dar.

Tabelle XII: IEF Programm

13 cm Streifen	Spannung	Zeit (Stunden)
Rehydration	30 V	12
konstant	200 V	1
konstant	500 V	1
konstant	1000 V	1
Gradient	1000-8000 V	2,5
konstant	8000 V	3
Gradient	8000-500 V	2.5

Für die zweite Dimension wurde ein 12,5% SDS-Trenngel ohne Sammelgel hergestellt. Der fokussierte Streifen wurde zuerst in Äquilierungspuffer (6 M Harnstoff, 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 50 % (v/v) Glycerol, 1 % (w/v) SDS) mit 1 % (w/v) DTT zur Reduktion und anschließend in Äquilierungspuffer mit 2,5 % Iodacetamid zur Alkylierung, für je 15 Minuten im Dunklen, behandelt. Abschließend wurde der Streifen auf das SDS-Trenngel gesetzt und durch Zugabe einer verflüssigten Agarose-Lösung (0,5 % (w/v) Agarose in 1x SDS-Puffer) fixiert. Die Elektrophorese wurde für 3 Stunden bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Zur Visualisierung der Proteine, wurde das Gel nach dem Western Blot Verfahren auf eine PVDF Membran transferiert und über Immunodekoration nachgewiesen, sowie eine CBB-Färbung mit der CBB-Färbelösung A durchgeführt.

4.2.5.6 Western Blotting

Für den korrekten Nachweis von Proteinen, die bereits über SDS-PAGE nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt wurden, wurde ein Western Blot durchgeführt, in welchem über spezifische Antikörper das Protein nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden ausschließlich Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen verwendet, welche zuvor in Methanol aktiviert wurden. Über eine Western Blot Apparatur wurden die Proteine aus dem SDS-Gel nach dem Semi-Dry Verfahren auf die PVDF Membran transferiert. Die Übertragung wurde für 2 Stunden bei 220 mA in Transferpuffer durchgeführt. Die Membran wurde im Anschluss mit einer CBB-Färbelösung A für 10 Minuten angefärbt und anschließend in Entfärberlösung entfärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Membran musste dann für 1 Stunde in einer Blockierlösung mit 5% Milchpulver oder wahlweise mit 5% BSA (α -pThreonin WB) und dem entsprechenden Puffer TBS/Deko Salt mit 0,5% (v/v) Tween blockiert werden. Die Inkubation mit Primärantikörperlösungen wurde bei 4°C über Nacht, ebenfalls in TBS/Deko Salt mit 0,5% (v/v) Tween, durchgeführt. Die entsprechenden Maus, Hasen bzw. Ziegen Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:500 in TBS/Deko Salt mit 0,5% (v/v) Tween eingesetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Einsatz der Antikörperlösungen wurde jeweils dreifach mit dem eingesetzten Puffer TBS/Deko Salt gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Die Sekundärantikörper waren an Meerrettichperoxidase gekoppelt, über welche durch Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrats (SeraLight EoSUltra), das jeweilige Zielprotein über Chemilumineszenz nachgewiesen werden konnte. Zur Aufnahme der Lumineszenz wurde eine spezielle CCD Kamera verwendet.

4.2.5.7 Hsp78 Ni-NTA Affinitätsaufreinigung aus *E.coli*

Für die Affinitätsaufreinigung von Proteinen mit Histidin-Tag aus *E. coli* Stämmen (pTB25, pWJ02), wurden die Zellen zuvor nach Protokoll angezüchtet und eine Expression durchgeführt. Die bei -80°C eingefrorenen Zellpellets wurden dann in einem Eisbad langsam aufgetaut und mit 5 ml gekühltem Lysepuffer (40 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 30 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM Imidazol, 2 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 20% (v/v) Glycerol, 1 mg/ml Lysozym, 1x Proteaseinhibitor) pro Gramm Pellet resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und

anschließend durch eine Ultraschallbehandlung (50% duty cycle, output control 5) für 10x 10 Sekunden aufgeschlossen. Das gewonnene Lysat wurde bei 4°C und 10.000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert und der Überstand weiter verwendet. Es wurden Ni-NTA Affinitätsäulen mit 10 ml Lysepuffer äquilibriert und das Lysat doppelt durch die Säule gespült. Die Säule wurde fünffach mit Lysepuffer und zehnfach mit Waschpuffer (40 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 30 mM Tris/HCl pH 7,4, 20 mM Imidazol, 2 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 20% (v/v) Glycerol) gespült. Die Elution der Proteine erfolgte durch zehnmalige Spülung mit je 500 µl Elutionspuffer (40 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 30 mM Tris/HCl pH 7,4, 200 mM Imidazol, 2 mM ATP, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 20% (v/v) Glycerol). Für die Dokumentation der Aufreinigung wurden in allen Schritten Testproben abgenommen und auf ihren Proteingehalt über ein SDS-Gel mit CBB-Färbung B getestet. Zur weiteren Verarbeitung wurden die gewünschten Fraktionen gegebenenfalls vereinigt. Die Proteinkonzentration wurde abschließend über Bradford ermittelt und die Proteinlösungen entweder direkt über Zentrifugation mit Vivaspin 6 (50.000 MWCO) Röhrchen aufkonzentriert oder erst in einen anderen Puffer überführt. Zur Lagerung wurde die Proteinlösung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die korrekte Reinigung wurde darüber hinaus über einen Antikörper-spezifischen Nachweis bestätigt.

4.2.5.8 Hsp78 Ni-TED Affinitätsaufreinigung aus isolierten Hefe Mitochondrien

Für die Koafreinigung der Substrate von Hsp78 wurde das Protein zuerst in Hefezellen (WJY11/12/13) nach Protokoll exprimiert und anschließend Mitochondrien isoliert. Es wurden 0,5 mg isolierte Mitochondrien auf Eis aufgetaut und entweder lediglich in SEM Puffer resuspendiert, in SEM-Puffer für 20 Minuten bei 42°C inkubiert oder nach der Inkubation zusätzlich durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 12.000 rpm reisoliert und in 2 ml Regenerationspuffer resuspendiert. Die Regeneration der Mitochondrien erfolgte dann für 60 Minuten bei 25°C. Nach dieser Behandlung wurden die Mitochondrien wiederum reisoliert und in 1 ml Lysatpuffer2 (80 mM KCl, 50 mM Na_xH_xPO₄ pH 7,8, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,5 mM PMSF, 5% Glycerol, 0,5% Triton-X100, 1 x PIs) vollständig resuspendiert. Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei 4°C bei 1500 rpm geschüttelt und bei 14.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 50 mg Ni-TED Säulenmaterial, welches zuvor in Lysatpuffer2 äquilibriert wurde, vermischt. Die Suspension wurde

für 15 Minuten bei 4°C unter langsamer Rotation inkubiert. Die Suspension wurde anschließend auf eine vorgefertigte Mini-Säule zum Befüllen gegeben und dreifach mit je 1 ml Lysepuffer 2 und dreifach mit je 1 ml Waschpuffer 2 (80 mM KCl, 50 mM Na_xH_xPO₄ pH 7,8, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,5 mM PMSF, 5% Glycerol, 1 x PIs) gewaschen. Abschließend wurde das gebundene Protein durch dreifache Zugabe von 1 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol, 80 mM KCl, 50 mM Na_xH_xPO₄ pH 7,8, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,5 mM PMSF, 5% Glycerol, 1 x PIs) eluiert. Zur Kontrolle wurden in allen Schritten Testproben abgenommen und über eine 12,5% SDS-PAGE und Western Blot, die Aufreinigung von Hsp78 nachgewiesen. Für die weitere Analyse über Massenspektrometrie, wurde mit den Eluaten eine TCA Fällung durchgeführt.

4.2.5.9 Ssc1 Ni-NTA Affinitätsaufreinigung aus isolierten Hefe Mitochondrien

Es wurden 10 mg isolierte Mitochondrien (Stamm NZY2) in einem Volumen von 2 ml Lysepuffer 3 (100 mM KCl, 30 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 5% Glycerol, 0,5% Triton X-100) resuspendiert und für 10 Minuten mit 1500 rpm bei 4°C geschüttelt. Das Lysat wurde dann für 5 Minuten bei 4°C und 14.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das gleiche Volumen (2 ml) an Ni-NTA Agarose hinzugegeben, welche zuvor in Lysat-Puffer äquilibriert wurde. Der Ansatz wurde für 30 Minuten unter langsamer Rotation bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend in vorgefertigte Mini-Säulen zum Befüllen gegossen. Es wurde mit 2 ml Lysepuffer 3 und mit 8 ml Waschpuffer (100 mM KCl, 30 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM Imidazol, 5% Glycerol) gewaschen. Abschließend wurde das Protein in fünf Fraktionen mit je 500 µl Elutionspuffer (100 mM KCl, 30 mM Tris/HCl pH 7,4, 250 mM Imidazol, 5% Glycerol) eluiert. Die Fraktionen wurden über SDS-PAGE und CBB-Färbung B auf Protein getestet und vereinigt. Für weitere Experimente wurde ein Teil des Proteins zweifach, in je hundertfachem Volumen Dialysepuffer (100 mM KCl, 30 mM Tris/HCl pH 7,4, 5% Glycerol), für je 5 Stunden dialysiert. Zum Ende wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt.

Für die Feststellung der Phosphorylierung von Ssc1 wurde der Stamm NZY2 in Hefemedium mit 3% Glycerol nach Anleitung angezogen. Als Kontrolle wurde der Wildtyp Hefestamm YPH499 ebenfalls angezüchtet. In dem gewählten Stamm NZY2 wurde das Wildtyp Ssc1 Gen durch eine Wildtyp Variante mit angefügtem Histidin-

Tag ersetzt. Da Ssc1 essentiell ist, konnte in diesem Fall nicht mit induzierbaren Plasmiden gearbeitet werden. Gleichzeitig garantiert die genomische Insertion des Konstrukts, welches für eine Affinitätsaufreinigung geeignet ist, eine unverfälschte Isolation des Proteins. Hierfür wurden Mitochondrien aus unterschiedlich-behandelten Zellen isoliert und das Zielprotein wiederum aus diesen aufgereinigt. Die Zellen wurden dafür entweder nicht behandelt, für 30 Minuten bei 30°C inkubiert, für 60 Minuten mit 0,4 mM Menadion oder für 60 Minuten mit 1 mM Menadion behandelt. Da die Isolation den Aufschluss der Mitochondrien bedingt und dadurch gegebenenfalls Phosphatasen aus dem Zytoplasma in Kontakt mit phosphoryliertem Ssc1 kommen könnten, wurde den Puffern zusätzlich zu dem üblich verwendeten Proteaseinhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor zugesetzt (1% v/v gelöst in DMSO).

4.2.5.10 Größenausschlusschromatographie für Hsp78-Komplexanalyse

Zur Analyse von Hsp78-Proteinkomplexen und deren Stabilität wurde mit affinitäts-gereinigtem Hsp78-Protein (aus *E.coli*) eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Als Pumpe wurde ein Äkta purifier 100 System verwendet und eine Superdex 200 hr 10/30 Säule angeschlossen. Für die Durchführung wurde 1 mg Protein verwendet und die Proben in 500 µl Gesamtvolumen GF Puffer L (50 mM KCl, 30 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 20% Glycerol) oder GF Puffer H (400 mM KCl, 30 mM HEPES, pH 7.4, 2, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 20% Glycerol) verdünnt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Säule wurde ebenfalls mit den gleichen Puffern äquilibriert und verwendet. Als Referenzproteine wurden 1 mg Tyroglobulin (669 kDa), 100 µg Ferritin (440 kDa), 1 mg Aldolase (158 kDa) und 1 mg Ovalbumin (43 kDa) in GF Puffer L eingesetzt. Die Versuche wurden mit 0,1 ml/min Fluss für ein Minimalvolumen von 24 ml, bei 4°C und einem Maximaldruck von 1,5 mPa, durchgeführt und parallel das UV Signal bei 280 nm gemessen. In allen Experimenten wurden Fraktionen von genau 500 µl gesammelt. Die Proben wurden anschließend entweder direkt auf ein 12,5% SDS-PAGE geladen und das Zielprotein über Western Blot spezifisch nachgewiesen oder für andere Zwecke zusammengeführt und über Vivaspin 6 Säulen aufkonzentriert.

4.2.5.11 Crosslinking mit Glutaraldehyd

Für das Crosslinking von gereinigten Hsp78-Proteinen wurden die Proteinlösungen aus der Größenausschlusschromatographie, für die *in vitro* Hsp78-Komplexanalyse, über Vivaspin 6 Säulen aufkonzentriert und anschließend über eine PD G-25 Entsalzungssäule, in einen CL-Puffer (400 mM KCl, 30 mM HEPES pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT) überführt. Dafür wurde die Säule zunächst mit 10x 500 µl CL-Puffer äquilibriert und die komplette Proteinlösung geladen. Nachdem die Lösung komplett in die Säule eingedrungen war, wurde 10x 200 µl CL-Puffer zugegeben und Fraktionen mit je 200 µl aufgefangen. Die Fraktionen wurden über Bradford auf ihren Proteingehalt überprüft. Für die Crosslinking-Reaktionen wurde das Protein zunächst auf eine Standardkonzentration von 0,102 µg/µl, in einem Volumen von 495 µl CL-Puffer, verdünnt. Für die Ansätze mit ATP, wurde dieses in einer finalen Konzentration von 10 mM eingesetzt, während für die Proben ohne ATP lediglich das entsprechende Volumen CL-Puffer hinzugefügt wurde. Alle Proben wurden für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Crosslinking-Reaktion wurde durch die Zugabe von 2,6% (v/v) Glutaraldehyd in einer finalen Konzentration von 0,05% (v/v) gestartet. Die Proben wurden bei Raumtemperatur inkubiert und aus dem Gesamtvolumen wurden zu den Zeitpunkten 2/4/6/8 Minuten je 106,5 µl Lösung entnommen und mit dem gleichen Volumen 1 M Glycin (pH 6) vermischt. Zusätzlich wurde als Kontrolle, ein weiterer Ansatz ohne die Zugabe von Glutaraldehyd für 8 Minuten inkubiert. Anschließend wurde eine TCA Fällung, mit 1,5 µg/µl Natriumdesoxycholat zur Verbesserung der Proteinregenerationsrate, durchgeführt. Abschließend wurden die Proben in 1xLämmli aufgenommen und über eine 3,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proteinkomplexe im Gel wurde an dem Gel eine Silberfärbung durchgeführt (siehe 4.2.5.3).

4.2.5.12 ATPase-Aktivitätsbestimmung von Hsp78

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität der beiden aus Hefe Mitochondrien isolierten (Ni-TED) Hsp78-Varianten, wurde mit Hilfe eines Kits ein *in vitro* ATPase-Assay durchgeführt. Das verwendete PiClorLock™ Gold Phosphate Detection System ermöglicht die Messung der Phosphatfreisetzung über eine gekoppelte enzymatischen Reaktion. Zur Ermittlung der Phosphatmenge wurde eine Verdünnungsreihe mit einem mitgelieferten Phosphatstandard zwischen 0 bis 50 µM

hergestellt und vermessen. Zusätzlich wurden Kontrollproben für alle Puffer, die Proteine und das eingesetzte ATP, jeweils ohne die anderen Komponenten vermessen. Für die Proteinreaktionen wurden die Proteine in einer Konzentration von 0,08 µg/µl in einem Volumen von 500 µl Reaktionspuffer (80 mM KCl, 30 mM Tris, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,25 mM ATP) verdünnt. Die Versuchsansätze wurden bei 37°C inkubiert und aus dem Reaktionsansatz bis zu einer Gesamtdauer von 20 Minuten, alle 5 Minuten 90 µl Proben entnommen. Die Kontrollproben für ATP und die Proteine, ohne weitere Komponenten, wurden lediglich nach der Gesamtdauer vermessen. Den entnommenen Proben wurde jeweils in einem Verhältnis von 1:5 Reaction Gold mix hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde 10% (v/v) Stabilisatorlösung zupipettiert und die Proben für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen Phosphatkomplexe wurden im Mikrotiterplatten-Gerät bei einer Absorption von 635 nm detektiert und über den Standard quantifiziert.

4.2.5.13 *In vitro* Transkription und Translation

Die radioaktiv markierte Substratproteine cytb₂-(107)_Δ-DHFR_{ds} und cytb₂-(167)_Δ-DHFR wurden über separate *in vitro* Transkription und *in vitro* Translation produziert. Für die Transkription wurden die Plasmide pKR11 und pNP-B04 über das "GeneJet Plasmid Miniprep Kit" isoliert und eingesetzt. Es wurde ein spezifisches Primer-Paar (3+4) zur Vervielfältigung der Substratprotein-DNS aus den Plasmiden designt und über eine Standard-PCR amplifiziert. Die DNS wurde über das "NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit" aufgereinigt und für die Transkriptionsreaktion mit Hilfe des "mMACHINE SP6 transcription Kits" eingesetzt. Die entstandene RNS wurde über eine Lithiumchlorid Präzipitation isoliert und die RNS-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Anschließend wurde eine *in vitro* Translation unter Einsatz des "Rabbit Reticulocyte Lysate Systems" mit dem "Amino Acid Mix Minus Methionine and Cysteine", in Gegenwart von ³⁵S-Methionin/Cystein, durchgeführt. Die hergestellten Substratproteine wurden über 12,5% SDS-PAGE und nach 18-stündiger Exposition eines Detektionsschirms, über einen Laser-Imager ausgelesen.

4.2.6 Mitochondriale *in organello* Experimente

4.2.6.1 Expressionsniveaus

Zur Überprüfung der Expressionsniveaus, der eingesetzten Hsp78-Konstrukte, wurden Hefezellen (WJY11/12/13) zuerst über Nacht bei 30°C in Selektivmedium mit 3% Raffinose angezüchtet. Am Folgetag wurden die Zellen in ein Medium mit 3% Ethanol als Kohlenstoffquelle überführt. Die Expression wurde bei einer optischen Dichte von 1 durch die Zugabe von 2% Galaktose gestartet und die Expression über einen Zeitraum von 4 Stunden verfolgt. Zu den einzelnen Zeitpunkten wurde jeweils eine Zellmenge von 1 OD Zellen abgenommen und in 500 µl Lösung mit 250 mM NaOH und 1,2% β-Mercaptoethanol hinzugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 10 Minuten auf Eis wurde eine TCA Fällung durchgeführt und für jeden Zeitpunkt jeweils 0,2 OD Probe auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen. Zur Analyse wurde über einen Western Blot die Menge an Hsp78 bestimmt und mit einer Tim23-, sowie einer Tom40-Ladekontrolle verglichen.

4.2.6.2 Mitochondrialer Import

Das benötigte Substratprotein für die nachfolgenden *in organello* Experimente, musste zuvor in ausreichender Menge in isolierte Mitochondrien importiert werden. Um dies zu garantieren wurden Importexperimente in Vorbereitung auf die nachfolgenden Degradationsversuche bzw. Disaggregationsversuche durchgeführt. Für die Import-Reaktionen wurden pro Ansatz 15 µg (Degradation)/ 25 µg (Disaggregation) isolierte Mitochondrien auf Eis aufgetaut und in P80 Importpuffer (250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 10 mM MOPS/KOH pH 7,2, 5 mM MgCl₂, 3% BSA) gelöst und 50 mM KPi pH 7,2, 2 mM ATP und 2 mM NADH frisch hinzugefügt. Für mehrere Ansätze wurde entsprechend ein Vielfaches der Mitochondrien-Menge eingesetzt. Jeder Importansatz wurde für 2 Minuten bei 25°C vorgewärmt und durch die Zugabe von 2 µl radioaktiv markiertem Präprotein, die Importreaktion gestartet. Die Menge an zugegebenem Präprotein wurde über SDS-PAGE und Radiographie abgeschätzt und war wesentlich vom Alter der ³⁵S-Methionin/Cystein Lösung, die für die Produktion der Präproteine eingesetzt wurde, abhängig. Eine genaue Feststellung war im diesem Versuchsrahmen nicht nötig, da die anschließenden Versuche das gegebene Maximalsignal als Referenzpunkt definieren. Der Import wurde für 20 Minuten bei 25°C inkubiert und abschließend durch die Zugabe von einem Prozent

100x Valinomycin gestoppt. Zur Kontrolle positiver Importversuche wurden einzelne Importansätze mit Proteinase K, in einer finalen Konzentration von 0,12 mg/ml für 20 Minuten auf Eis, behandelt (Lim, 2001). Diese Proben wurden anschließend für 10 Minuten zusätzlich mit einer finalen Konzentration von 1,5 mM PMSF behandelt. Danach wurden die Mitochondrien zweifach in SEM mit 1 mM PMSF gewaschen und für die SDS-PAGE vorbereitet. Die unbehandelten Proben wurden nach dem Import bei 12.000 x g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und in den anderen Versuchsteilen weiterverarbeitet.

4.2.6.3 Degradation importierter Proteine

Nach einem vorgelagerten Importversuch mit dem Degradations-Substratprotein $\text{cytb}_2\text{-(167)}_{\Delta}\text{-DHFR}$ in isolierte Mitochondrien (WJY02/WJY04/WJY07/WJY08) (siehe 4.2.6.2), wurden die nicht mit Proteinase K behandelten Mitochondrien in 900 μl Regenerationspuffer mit 0,1 % BSA (250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 10 mM KPi pH 7,2, 10 mM Kreatinphosphat 10 mM MOPS/KOH pH 7,2, 5 mM MgCl_2 , 4 mM NADH, 3 mM ATP, 50 $\mu\text{g/ml}$ Kreatinkinase, 0,1% BSA) gelöst und bei 25°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0/0/30/60/120/180/240 Minuten) wurden je 100 μl Probe (entsprechend 15 μg Mitochondrien) entnommen. Die Proben wurden direkt für 10 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und mit 180 μl SEM Puffer mit 1 mM PMSF gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 20 μl 1x Lämmli aufgenommen und für 5 Minuten bei 1500 rpm geschüttelt, für 5 Minuten bei 95°C gekocht und abschließend wiederum, für 5 Minuten unter den gleichen Bedingungen wie zuvor, geschüttelt. Die Proben wurden über eine 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, ein Western Blot durchgeführt und die Membran mit einem Detektionsschirm bedeckt. Nach mindestens 48 Stunden Exposition wurde der Schirm über einen Laser-Imager ausgelesen und die Banden des eingesetzten Substratproteins über die Software MultiGauge quantifiziert. Es wurde sowohl die Abnahme des maturierten Substratproteins, als auch das Auftreten eines Degradationsfragmentes ausgewertet. Anschließend wurde ein Quotient aus dem Signal des maturierten Substratproteins und einer auftretenden Abbaufragmentbande berechnet. Aufgrund hoher Schwankungen für beide Nullproben (0 min), wurde das Signal bei 30 min als Startpunkt der Degradation definiert.

4.2.6.4 Disaggregation importierter Proteine

Nach einem vorgelagerten Importversuch mit dem Disaggregations-Substratprotein $\text{cytb}_2\text{-}(107)_\Delta\text{-DHFR}_{\text{ds}}$ in isolierte Mitochondrien (WJY02/WJY04/WJY07/WJY08) (siehe 4.2.6.2), wurden die nicht mit Proteinase K behandelten Mitochondrien in 900 μl Regenerationspuffer gelöst und bei 25°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Vergleichsprobe in Inhibitionsbuffer gelöst. Es wurde direkt eine Kontrollprobe abgenommen und die Suspension bei 42°C für 5 Minuten inkubiert. Nach dieser Behandlung wurde wiederum eine Probe abgenommen und die verbleibende Lösung für 60 Minuten bei 25°C inkubiert. Abschließend wird eine Probe nach der Regeneration abgenommen (von Janowsky et al., 2006). In allen Fällen wurde 100 μl Probe (entsprechend 25 μg Mitochondrien) entnommen. Die Proben wurden direkt für 10 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und dann mit 250 μl SEM Puffer mit 1 mM PMSF gewaschen. Die Mitochondrien werden erneut reisoliert und in 100 μl Lysepuffer 4 (200 mM KCl, 30 mM Tris, pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5% Triton X-100, 1x Proteaseinhibitor) durch Pipettieren aufgeschlossen. Die entstandenen Lysate wurden bei 125.000 x g und 4°C in einer Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und eine TCA Fällung durchgeführt. Das Pellet wurde wiederum in 50 μl Lysepuffer 4 aufgenommen und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor in der Ultrazentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 20 μl 1x Lämmli aufgenommen. Die Proben wurden dann für 5 Minuten bei 1500 rpm geschüttelt, für 5 Minuten bei 95°C gekocht und abschließend wiederum für 5 Minuten, unter den gleichen Bedingungen wie zuvor, geschüttelt. Die Proben wurden über eine 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, ein Western Blot durchgeführt und die Membran mit einem Detektionsschirm bedeckt. Nach mindestens 48 Stunden Exposition wurde der Schirm über einen Laser-Imager ausgelesen und die Banden des eingesetzten Substratproteins über die Software MultiGauge quantifiziert. Es wurde der Anteil des nach der Aggregation wieder gelösten Substratproteins bestimmt.

4.2.6.5 Aconitase-Assay

Die Untersuchung der Aconitase-Aktivität wurde an Mitochondrien, welche aus Hefezellen (WJY11/12) isoliert wurden, durchgeführt. Es wurden je 200 μg isolierte Mitochondrien auf Eis aufgetaut und in 800 μl Resuspensionspuffer gelöst. Die

Suspension wurde für 5 Minuten bei 25°C inkubiert und dann für 20 Minuten bei 42°C behandelt. Die Mitochondrien wurden bei 12.000 rpm und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 800 µl Regenerationspuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde anschließend für 120 Minuten bei 25°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine weitere Probe für 125 Minuten bei 25°C inkubiert und dann für 20 Minuten bei 42°C behandelt. Eine Kontrollprobe wurde für die Gesamtzeit von 145 Minuten lediglich bei 25°C belassen. Alle Proben wurden anschließend gleichzeitig bei 12.000 rpm und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Lysepuffer 5 (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1% Laurylmaltosid) aufgenommen. Die Suspension wurde bei 1500 rpm und 4°C für 10 Minuten geschüttelt. In der Zwischenzeit wurden alle Komponenten der Reaktionslösung A (50 mM Tris pH 7,4, 5 mM Natriumcitrat, 0,6 mM MnCl₂, 0,2 mM NADP⁺, 0,1 mg/ml Isocitratdehydrogenase) gemischt und das Grundsignal über 100 Sekunden bei 340 nm in einem Mikrotiterplatten-Gerät überprüft. Zusätzlich wurde die Reaktionslösung, auch ohne Substratzugabe, kontrolliert. Anschließend wurden für die Kontrollansätze je 50 µl Lysepuffer 5 und für die Versuchsansätze je 50 µl mitochondriales Lysat, in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Mittels Multikanalpipette wurden dann für die Kontrollproben je 200 µl Reaktionslösung ohne Substrat und für die Versuchsansätze je 200 µl Reaktionslösung hinzugegeben und gemischt. Die Reaktion wurde unmittelbar nach dem Mischen im Mikrotiterplatten-Gerät vermessen. Gemessen wurde die Zunahme des gebildeten NADPH bei 340 nm alle 15 Sekunden, für einen Zeitraum von 20 Minuten. Für die Auswertung wurde die Steigung der Enzymkurven im linearen Bereich über einen Zeitraum von 60 Sekunden bestimmt und verglichen.

4.2.6.6 Ketoglutaratdehydrogenase-Assay

Der enzymatische Assay zur Untersuchung der Ketoglutaratdehydrogenase-Aktivität wurde an Mitochondrien, welche aus Hefezellen (WJY11/12) isoliert wurden, durchgeführt. Es wurden je 200 µg isolierte Mitochondrien auf Eis aufgetaut und in 800 µl Resuspensionspuffer gelöst. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 25°C inkubiert und dann für 20 Minuten bei 42°C behandelt. Die Mitochondrien wurden bei 12.000 rpm und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 800 µl Regenerationspuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde

anschließend für 120 Minuten bei 25°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine weitere Probe für 125 Minuten bei 25°C inkubiert und dann für 20 Minuten bei 42°C und eine weitere Kontrollprobe für die Gesamtzeit von 145 Minuten lediglich bei 25°C belassen. Alle Proben wurden anschließend gleichzeitig bei 12.000 rpm und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Lysepuffer 6 (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,5% Laurylmaltoside) aufgenommen. Die Suspension wurde bei 1500 rpm und 4°C für 10 Minuten geschüttelt. In der Zwischenzeit wurden alle Komponenten der Reaktionslösung B (50 mM KCl, 30 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 mM α -Ketoglutarat, 0,4 mM NAD⁺, 0,3 mM TPP, 0,3 mM CoA, 0,2 mM MgCl₂) gemischt und das Grundsignal über 100 Sekunden bei 340 nm in einem Mikrotiterplatten-Gerät kontrolliert. Zusätzlich wurde die Reaktionslösung, auch ohne Substratzugabe, überprüft. Anschließend wurden für die Kontrollansätze je 50 µl Lysepuffer und für die Versuchsansätze je 50 µl mitochondriales Lysat, in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Mittels Multikanalpipette wurden dann für die Kontrollproben je 200 µl Reaktionslösung ohne Substrat und für die Versuchsansätze je 200 µl Reaktionslösung hinzugegeben und gemischt. Die Reaktion wurde unmittelbar nach dem Mischen im Mikrotiterplatten-Gerät vermessen. Gemessen wurde die Zunahme des gebildeten NADH bei 340 nm alle 15 Sekunden, für einen Zeitraum von 20 Minuten. Für die Auswertung wurde die Steigung der Enzymkurven im linearen Bereich über 60 Sekunden bestimmt und verglichen.

4.2.6.7 Aggregation und Disaggregation in Pellets

Zur Analyse der temperaturabhängigen Aggregationstendenz und zur Bestimmung des Disaggregationspotentials des mitochondrialen Proteoms, wurden je 50 µg isolierte Mitochondrien in 200 µl Resuspensionspuffer gelöst. Eine unbehandelte Probe wurde für die Gesamtdauer von 145 Minuten bei 25°C belassen. Für die Bestimmung der Aggregation wurde eine Probe für 125 Minuten bei 25°C inkubiert und zum Schluss für 20 Minuten bei 42°C gestresst. Als Regenerationsansatz wurde eine weitere Probe nach 5 Minuten bei 25°C und einer nachfolgenden Inkubation bei 42°C für 20 Minuten, zuerst reisoliert und anschließend in 200 µl Regenerationspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde dann für 120 Minuten bei 25°C inkubiert. Alle Proben wurden gleichzeitig fertiggestellt und anschließend die Mitochondrien reisoliert. Die Mitochondrien wurden in 100 µl Lysepuffer 7 (50 mM

Tris/HCl pH 7,4, 1% Triton-X-100) aufgenommen und durch Pipettieren (20x) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben bei 125.000 x g in der kleinen Ultrazentrifuge für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und eine TCA Fällung durchgeführt. Das Pellet wurde in 50 µl Lysepuffer 7 aufgenommen und unter gleichen Bedingungen wie zuvor, in der kleinen Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 µl 1x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden über eine 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und verschiedene Proteine nach einem Western Blot über Antikörper nachgewiesen.

4.2.6.8 Aggregation und Bindung von Hsp78 in mitochondrialen Lysaten

Zur Analyse der Proteinlöslichkeit von Hsp78 und der Bindung von Aggregaten durch Hsp78, wurden 3x 200 µg isolierte Hsp78Δ Mitochondrien für 20 Minuten bei 45°C inkubiert und somit Aggregate hergestellt. Diese Mitochondrien wurden in 800 µl Lysepuffer 8 (200 mM KCl, 30 mM Tris, pH 7,4, 4 mM NADH, 3 mM ATP, 0,5 mM PMSF, 0,5% Triton X-100, 1x Proteaseinhibitor) aufgenommen und durch Pipettieren (20x) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Lysate bei 125.000 x g in der kleinen Ultrazentrifuge für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert und die Überstände verworfen. Parallel wurden Lysate aus 120 µg isolierten Mitochondrien mit Hsp78-Überexpression, nach dem gleichen Verfahren hergestellt. Diese wurden unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert, jedoch wurden die Überstände weiterverwendet. Für das geplante Aggregationsexperiment wurde 160 µl (entsprechen 40 µg Mitochondrien) dieses Lysats auf das Pellet (entsprechend 200 µg Mitochondrien) aus dem ersten Versuchsteil gegeben und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Abschließend wurden die Versuchsansätze wiederum unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und sowohl die Überstände, als auch die Pellets behalten. Während der Überstand direkt durch eine TCA Fällung weiterverarbeitet wurde, wurden die Pellets nochmals mit 150 µl SEM Puffer gewaschen. Zusätzlich wurden Kontrollproben ohne Aggregatzugabe unter den gleichen Bedingungen behandelt. Alle Proben wurden in 1x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen, über eine 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot und Immunodekoration das Verhalten von Hsp78 nachgewiesen.

4.2.6.9 Bestimmung des ATP-Gehalts

Zur Bestimmung des ATP-Gehalts der isolierten Mitochondrien (WJY11/12) wurden je 100 µg isolierte Mitochondrien in 400 µl Resuspensionspuffer gelöst. Die unbehandelte Probe wurde für die Gesamtdauer von 145 Minuten bei 25°C belassen. Für die Bestimmung der Aggregation wurde eine Probe für 125 Minuten bei 25°C inkubiert und zum Schluss für 20 Minuten bei 42°C gestresst. Als Regenerationsansatz wurde eine weitere Probe nach 5 Minuten bei 25°C und einer nachfolgenden Inkubation bei 42°C für 20 Minuten zuerst reisoliert und anschließend in 800 µl Regenerationspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde dann für 120 Minuten bei 25°C inkubiert. Alle Proben wurden gleichzeitig fertiggestellt und die Mitochondrien nochmals mit 200 µl Resuspensionspuffer gewaschen, um das im Regenerationspuffer zugegebene ATP vollständig zu entfernen. Die zur Bestimmung benötigte Reaktionslösung 2 (1 mM DTT, 0,5 mM Luciferin, 2,5 µg/ml Luciferase, 1x Reaktionspuffer) und die Reaktionslösung 2 mit Triton (1 mM DTT, 0,5 mM Luciferin, 2,5 µg/ml Luciferase, 0,5% Triton-X-100, 1x Reaktionspuffer) wurden hergestellt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden bei allen Proben die Überstände entfernt und die Mitochondrien in 33,3 µl Reaktionslösung 2 mit Triton resuspendiert. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit 1400 rpm geschüttelt und davon je 10 µl in 100 µl Reaktionslösung 2 gegeben. Die Reaktionslösung 2 (je 100 µl) wurde zuvor auf einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Zur Feststellung der ATP-Konzentration wurde eine ATP-Standardreihe (0,1 µM/ 50 nM/ 25 nM/ 12,5 nM/ 6,25 nM/ 3,125 nM) hergestellt und gleichzeitig vermessen. Final wurde die Lumineszenz für einen Zeitraum von 1000 ms im Mikrotiterplatten-Gerät bei 28°C, nach 4 Minuten Inkubationszeit, gemessen.

4.2.6.10 Radioaktive Markierung von Proteinen in isolierten Mitochondrien

Nach der Isolation der Mitochondrien wurden jeweils 2 mg für 4 Minuten bei 12.000 rpm abzentrifugiert und in 250 µl Markierungspuffer (Resuspensionspuffer + 3mM ADP, 4 mM NADH) resuspendiert. Dieser Suspension wurden 6 µl entsprechend 10 pMol radioaktiven ³³P hinzugefügt. Die Proben wurden für 30 Minuten unter leichter Bewegung bei 30°C inkubiert. Abschließend wurden die markierten Mitochondrien dreifach mit Resuspensionspuffer gewaschen. Hierfür wurden die Proben jeweils bei 12.000 rpm für 4 Minuten abzentrifugiert und in 250 µl Puffer gelöst.

4.2.7 LC-MS/MS

Für die Durchführung einer Substratstudie an einem modifizierten AAA+ Protein, wird dieses in einen geeigneten Modelorganismus eingebracht und über einen induzierbaren Promotor überexprimiert. Anschließend wird das Zielprotein über eine Affinitätsaufreinigung isoliert. Die abschließende Analyse mittels Massenspektrometrie ermöglicht die Identifizierung der Substratproteine sowie anderer Bindungspartner. Da bei Affinitätsaufreinigungen unspezifische Interaktionen mit dem Zielprotein, anderen abundanten Proteinen oder der Affinitätsmatrix auftreten können, bedarf es einer Negativkontrolle (Graham et al., 2013; Rei Liao and van Wijk, 2019). Durch den Einsatz von Stabilisotop-markierten Aminosäuren bei der Kultivierung der Modellorganismen, können unterschiedliche Proben simultan vermessen werden. So kann als Negativkontrolle die entsprechende Affinitätsaufreinigung, ohne eine Überexpression des AAA+ Proteins, bzw. ein Knockout verwendet werden. Zusätzlich können auch Proben unter anderen experimentellen Bedingungen angefügt werden. Grundsätzlich ist diese Technik jedoch durch die Verfügbarkeit isotoopenreiner-Aminosäuren begrenzt (Ong et al., 2002). Typisch wird eine Kombination von Lysin und Arginin Varianten verwendet (Dannenmaier et al., 2018). Die abschließende biochemische Einordnung der Ergebnisse stellt einen fundamentalen Schritt der Substratidentifizierung dar. Hierbei müssen die Ergebnisse in einen sinnvollen Kontext gestellt werden. Physikalisch unrealistische Ergebnisse und Kontaminationen müssen berücksichtigt werden. Durch den Einsatz von Proteindatenbanken werden den Ergebnissen weitere Informationen hinzugefügt und ein biochemischer Kontext hergestellt (Abbildung 4).

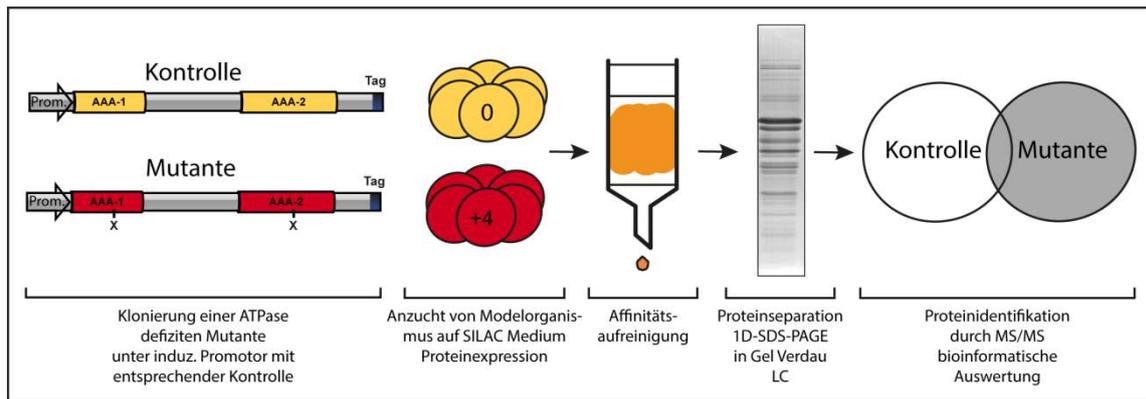


Abbildung 4: AAA+ Substratstudien

Abbildung für den technischen Ablauf einer AAA+-Substratstudie. LC (flüssig Chromatographie)

4.2.7.1 Hsp78-Interaktionsstudie über Proteinaufreinigung

Zur Analyse der Bindung von Proteinen an Hsp78 wurde eine Koaufräufungsstudie durchgeführt. Dafür wurden Mitochondrien aus Zellen isoliert, welche zuvor auf unterschiedlichen Medien mit verschiedenen Lysin Isotopen, gewachsen waren. Für den Kontrollansatz ohne Affinitätstag wurde leichtes Lysin(+0)-Isotop verwendet, während für Hsp78-6xHis das schwere Lysin(+8)-Isotop und für hsp78_{TR}-6xHis das mittlere Lysin(+4)-Isotop eingesetzt wurde. Die isolierten Mitochondrien wurden anschließend nach dem Protokoll (siehe 4.2.5.8) weiterbehandelt. Die TCA gefällten Proteinproben wurden in gleichen Volumenanteilen zusammengeführt und über eine 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurde ein verkürzter Lauf für 90 Minuten durchgeführt und das Gel nach Protokoll (siehe 4.2.5.3) mit CBB-Färbelösung B gefärbt. Zum Schluss wurde das Gel in Stücke geschnitten, welche unterschiedliche Massenbereiche abdecken. Die Analyse wurde in der MS Core Facility der Universität Bonn durchgeführt (Marc Silvester). Die weitere Bearbeitung der Proben ist im Teil Massenspektrometrische Messungen (4.2.7.7) beschrieben.

4.2.7.2 Hsp78-abhängige *in organello* Aggregations- und Disaggregationsanalyse

Auch in diesem Fall wurde SILAC zur simultanen Analyse beider Versuchsansätze genutzt. Darüber hinaus war es erforderlich jeweils unbehandelte, hitzebehandelte und regenerierte Proben zu vermessen. Dieses Vorgehen ermöglichte die Unterscheidung von hitzeinduzierten Aggregaten und Proteinen, welche unter den gegebenen experimentellen Bedingungen, ohne Hitzebehandlung, bereits von selbst

sedimentieren. Durch den Vergleich der gemessenen Protein-Abundanzen in der unbehandelten Probe und dem hitzebehandelten Ansatz, konnte man Rückschlüsse auf die Aggregation ziehen. Weiterhin könnten die aggregierenden Proteine beim Vergleich der Abundanzen zur Regenerationsprobe, als Hsp78-Substrate kategorisiert werden. Hierbei sollte ein Hsp78-Substrat, im Vergleich zwischen hitzebehandelter Probe und Regenerationsprobe, einerseits eine reduzierte Abundanz aufweisen und gleichzeitig eine höhere Minderung (Disaggregation) für Hsp78, als für hsp78_{TR}, aufzeigen. In einem direkten Vergleich beider Konstrukte sollte ein Abbau der Proteinaggregate durch Proteasen als irrelevant betrachtet werden.

Für die Hsp78-abhängige *in organello* Aggregations- und Disaggregationsanalyse wurde eine größere Menge isolierte Mitochondrien aus Hefezellen (WJY11/12) auf einen Mehrschicht-Saccharose-Gradienten gegeben. Die Trennung anderer Zellbestandteile war essentiell für eine spezifische Analyse der mitochondrialen Proteine. Der Saccharose-Gradient wurde aus drei Schichten mit 4 ml 32%, 1,5 ml 23% und 1,5 ml 15% Saccharose (w/v) in EM Puffer (10 mM MOPS/KOH, pH 7.2, 1 mM EDTA) hergestellt. Die Mitochondrien wurden oben auf den Gradienten gegeben und mit 1,5 ml EM Puffer überschichtet. Nach der Zentrifugation in der großen Ultrazentrifuge bei 125.000 x g, und 4°C für 60 Minuten, wurden die Mitochondrien vom Boden des Röhrchens extrahiert und in Resuspensionspuffer aufgenommen. Nachfolgend wurde die Konzentration mittels Bradford bestimmt und auf eine Konzentration von 200 µg/ml mit Resuspensionspuffer eingestellt. Jeweils 50 µg beider Proben wurden zusammengeführt und nach Protokoll (siehe 4.2.6.7) behandelt. Abschließend wurden die Proben wie im Protokoll (siehe 4.2.5.3) über SDS-PAGE aufgetrennt und weiterverarbeitet. Die weitere Bearbeitung der Proben ist im Teil Massenspektrometrische Messungen (4.2.7.7) beschrieben.

4.2.7.3 Phosphorylierung von Ssc1

Das Protein für die massenspektrometrische Untersuchung von Ssc1 wurde nicht dialysiert und je 100 µg in 4x Lämmli-Probenpuffer pro Geltasche, auf ein 10% SDS-Gel geladen. Das Gel wurde nach dem Lauf nach Standardverfahren fixiert, über Nacht gefärbt und am Folgetag für mehrere Stunden in ddH₂O entfärbt (siehe 4.2.5.3). Die deutlich sichtbare Ssc1 Proteinbande bei 70 kDa wurde mit einem Skalpell

ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß transferiert. Die weitere Bearbeitung der Proben ist im Teil Massenspektrometrische Messungen (4.2.7.6) beschrieben.

4.2.7.4 Peptidvorbereitung

Die Peptidvorbereitung wurde von Marc Silvester von der MS Core Facility der Universität Bonn nach folgendem Protokoll durchgeführt. Proteine in Gelstücken wurden durch In-Gel-Verdau in Peptide überführt (Jenö et al., 1995; Rosenfeld et al., 1992). Dazu wurden die Gelstücke nacheinander mit Wasser, 50% Acetonitril (ACN) und 100% ACN gewaschen. Proteine wurden mit 20 mM DTT in 50 mM Ammonium Hydrogencarbonat („ABC50“) reduziert und mit 40 mM Acrylamid (ebenfalls in ABC50) alkyliert. Die Gelstücke wurden erneut gewaschen und mit ACN dehydriert. Die getrockneten Polyacrylamidstücke wurden mit 250 ng Trypsin („sequencing grade“, Promega GmbH, Mannheim) in ABC50-Puffer über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Peptid-Extrakte wurden separiert und die Gelstücke mit 50% ACN gewaschen, um verbleibende Peptide zu extrahieren. Peptide wurden in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet und bei -20°C gelagert.

4.2.7.5 LC-MS Messungen der Peptide (AuD/KoAuf)

Die LC-MS Messungen wurden von M. Silvester von der MS Core Facility der Universität Bonn nach folgendem Protokoll durchgeführt. Die getrockneten Peptide wurden in 10 µl Lösungsmittel A (0,1% Ameisensäure, (AS)) gelöst. Es wurden 3 µl auf eine selbst gefertigte C18 Vorsäule geladen (20 mm Länge, 100 µm Innendurchmesser, ReproSil-Pur C18-AQ, 5 µm, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen). Dort gebundene Peptide wurden auf eine C18 Trennsäule eluiert (200 mm Länge, 75 µm Innendurchmesser, ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1,9 µm). Die Peptide wurden bei einem Fluss von 250 nl/min über einen linearen Gradienten von 2 bis 35% Lösungsmittel B (90% ACN, 0,1% AS) innerhalb von 83 bis 90 min aufgetrennt. Die nanoUPLC war mit einem LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer verbunden (Thermo Fisher Scientific, Bremen). Peptidionen zwischen 330 und 1600 m/z wurden im Orbitrap-Detektor mit einer Auflösung von 60.000 bei 400 m/z gemessen (maximale Füllzeit 400 ms, AGC Target 10⁶). Die 22 abundantesten Peptidionen (Mindestintensität 3000, Isolierungsbreite 1,0-1,2 Da) wurden mit Collision Induced Dissociation (CID, normalisierte Energie 35) fragmentiert und die Produkte in der

Ionenfalle gemessen. Fragmentierte Peptidionen wurden für 15-20 s von erneuter Analyse ausgeschlossen.

4.2.7.6 LC-MS Messungen der Peptide (Ssc1 Phos.)

Die LC-MS Messungen wurden von M. Silvester von der MS Core Facility der Universität Bonn nach folgendem Protokoll durchgeführt. Die Peptide wurden in 10 µl 0,1% Trifluoressigsäure gelöst und 0,5 µl (nominal 1 µg) wurden auf eine selbst gefertigte C18 Vorsäule geladen (20 mm Länge, 100 µm Innendurchmesser, ReproSil-Pur C18-AQ, 5 µm, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen). Dort gebundene Peptide wurden auf eine C18 Trennsäule eluiert (200 mm Länge, 75 µm Innendurchmesser, ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 3 µm, mit 0,1% AS als Lösungsmittel A). Die Peptide wurden bei einem Fluss von 330 nl/min über einen linearen Gradienten von 2 bis 40% Lösungsmittel B innerhalb von 40 min aufgetrennt. Die nanoUPLC war mit einem LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer verbunden (Thermo Fisher Scientific, Bremen). Peptidionen zwischen 380 und 1850 m/z wurden im Orbitrap-Detektor mit einer Auflösung von 30.000 bei 400 m/z gemessen (maximale Füllzeit 400 ms, AGC Target 10⁶). Die 25 abundantesten Peptidionen (Mindestintensität 3000, Isolierungsbreite 1,5 Da) wurden mit Collision Induced Dissociation (normalisierte Energie 35%) fragmentiert, wobei die Neutralverluste von Phosphorylierungen Multiple Stage Activation auslösten. Die Produkte wurden in der Ionenfalle gemessen. Fragmentierte Peptidionen wurden für 15 s von erneuter Analyse ausgeschlossen.

4.2.7.7 Analyse der Daten (AuD/KoAuf)

Die Analyse der Daten wurde von M. Silvester von der MS Core Facility der Universität Bonn nach folgendem Vorgehen durchgeführt. Für die Peptidanalyse wurde die Rohdatenprozessierung und Datenverwaltung der Proteome Discoverer Software 2.1.1.21 (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Für Peptididentifizierungen wurde Mascot Server 2.5.1 (Matrix Science Ltd, London, Vereinigtes Königreich) eingesetzt. MS2-Daten wurden mit *Saccharomyces cerevisiae* Sequenzen aus SwissProt (Version 2017_10) abgeglichen. Die m/z-Toleranz für Peptidionen betrug 8 ppm und für Fragmentationen 0,5 Da. Tryptische Peptide mit bis zu zwei Fehlsplaltungen wurden gesucht. Propionamid wurde als statische Modifikation von

Cystein definiert. Die Oxidation von Methionin, sowie die Isotopenmarkierungen $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ und $^2\text{H}_4$ für Lysin, wurden als dynamische Modifikationen gesetzt. Den Mascot-Ergebnissen wurde durch den Percolator-Algorithmus ein q-Wert (korrigierter p-Wert) zugeordnet (Version 2.05, Proteome Discoverer-Implementation) (Mellacheruvu et al., 2013). Für Spektren mit q-Werten unter 1% wurde eine zweite Datenbanksuche mit semitryptischer Spezifität durchgeführt (eine Fehlsplaltung zugelassen). Die MS1 Toleranz betrug hierbei 10 ppm und Propionamid wurde als dynamische Modifikation für Cystein gesetzt. Proteine wurden berücksichtigt, wenn mindestens zwei Peptide mit <1% False-Discovery-Rate (FDR) identifiziert wurden. Typische False-Discovery-Rates waren $\leq 1\%$ (Peptid-Spektrum-Zuordnung, PSM), 1,2% (Peptide) und <1% (Proteine). Nur Protein-spezifische Peptide wurden für die Proteinquantifizierung berücksichtigt.

4.2.7.8 Analyse der Daten (Ssc1 Phosphorylierung)

Die Analyse der Daten wurde von M. Silvester von der MS Core Facility der Universität Bonn nach folgendem Ablauf durchgeführt. Für die Peptidanalyse wurden die Rohdaten mittels der Proteome Discoverer Software 1.4 (Thermo Fisher Scientific) prozessiert und die Datenbanksuche eingeleitet. Peptididentifizierungen wurden mit einem Mascot Server (Version 2.4.1, Matrix Science Ltd, London, Großbritannien) durchgeführt. Zunächst wurden die MS2-Daten gegen eine Datenbank mit häufigen Kontaminanten (cRAP) abgeglichen. Die m/z-Toleranz für Peptidionen betrug 10 ppm und die Toleranz für Fragmentationen 0,6 Da. Es wurden tryptische Peptide mit bis zu einer Fehlsplaltung gesucht. Carbamidomethylierung von Cysteinen wurde als statische Modifikation definiert. Die Oxidation von Methionin und die N-terminale Acetylierung von Proteinen wurden als dynamische Modifikationen zugelassen. Den Mascot-Resultaten wurden durch den Percolator-Algorithmus Posterior Error Probabilities (PEP) zugewiesen (als Implementation von Proteome Discoverer). Spektren deren PEP 1% überschritten hatte, wurden einer zweiten Suche zugeführt, bei der gegen *Saccharomyces cerevisiae* Sequenzen aus SwissProt abgeglichen wurde. Hierbei waren bis zu zwei Fehlsplaltungen und die zusätzliche Suche nach Phosphorylierungen an Serin und Threonin als dynamische Modifikationen gesetzt. Eine dritte Suche wurde mit denselben Parametern angeschlossen, jedoch mit semitryptischer Spezifität und der dynamischen

Modifikationen von Cystein durch Carbamidomethyl oder Propionamid, sowie der Acetylierung an Lysin. Proteine wurden berücksichtigt, wenn mindestens zwei Peptide identifiziert wurden. Phosphorylierungsstellen wurde mit dem phosphoRS-Modul 3.1 im Proteome Discoverer bewertet.

4.2.8 Auswertung der MS Daten

4.2.8.1 Auswertung der Koaufräinigungsdaten

Die gemessenen Abundanzen wurden für alle identifizierten Proteine in den verschiedenen Versuchsansätzen jeweils für alle Kanäle mit einer Minimalabundanz (10.000) ergänzt, falls kein Messwert festgestellt werden konnte. Es wurden jeweils Quotienten der beiden Proben gegen die Werte der Kontrollprobe bestimmt. Aus den gemessenen Werten für das "Bait"-Protein wurde ein Korrekturfaktor errechnet und auf alle gegen die Kontrollprobe angereicherten Proteine angewendet. Anschließend wurden die Mittelwerte berechnet und eine Kategorisierung anhand der gemessenen Peptidzahlen (mindestens 3) und des Auftretens in den drei Kanälen und Replikaten durchgeführt. Aus den ermittelten Daten wurde für die Visualisierung der binäre Logarithmus berechnet. Die Verarbeitung der Daten wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel durchgeführt und die Visualisierung mit Hilfe der Software GraphPad PRISM 6 verwirklicht. Es wurden zusätzliche Informationen über die identifizierten Proteine über die Proteindatenbank UniProt hinzugefügt.

4.2.8.2 Auswertung der Aggregations- und Disaggregationsdaten

Von den gemessenen Abundanzen wurden Mittelwerte berechnet. Für Proteine, welche in den unterschiedlichen Versuchsansätzen nicht identifiziert werden konnten, wurde eine Minimalabundanz (10.000) als Mittelwert festgelegt. Für alle Proteine wurde über die Summe aller Abundanzen, ein prozentualer Anteil berechnet. Anschließend wurden Quotienten aus den gemittelten prozentualen Abundanzen für die Versuchsansätze Aggregation (42°C)/Kontrolle (25°C) und Aggregation/Regeneration berechnet. Im Fall, dass ein Protein beim ersten Quotienten einen Wert über 1 aufwies, konnte das Protein somit als aggregierend definiert werden. Im Fall, dass der zweite Quotient größer als 1 war, konnte auf eine Auflösung aus dem Aggregatpellet geschlossen werden. Die Verarbeitung der Daten wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel durchgeführt und die

Visualisierung mit Hilfe der Software GraphPad PRISM 6 verwirklicht. Es wurden zusätzliche Informationen über die identifizierten Proteine über die Proteindatenbank UniProt hinzugefügt.

4.2.8.3 Gesamtauswertung der MS Daten

Zur Visualisierung der gewonnenen Erkenntnisse wurden die Daten über die online Datenbank STRING analysiert und visualisiert. Zusätzlich wurden signifikant angereicherte Proteinmerkmale identifiziert.

5. Ergebnisse

5.1 Konstruktion und *in vitro* Test der hsp78_{TR}-Mutante

Zur Generierung einer Hsp100-Mutante mit veränderten Substratbindungseigenschaften wurde in Anlehnung an die von Weibezahn et al. untersuchten ClpB-Mutanten eine Hsp78-Variante hergestellt, welche ebenfalls in beiden ATPase-Domänen mutiert wurde. Wie in Abbildung 5 skizziert wurde in beiden Walker B-Motiven die katalytisch aktive Glutaminsäure durch Glutamin ausgetauscht (E216Q/E614Q). Die parallele Erhaltung eines funktionellen Walker A-Motives sollte so die Bindung des benötigten ATP ermöglichen, während die Spaltung de Nukleotids nicht mehr möglich ist. Gleichzeitig wurden Konstrukte hergestellt, welche eine effektive Affinitätsaufreinigung mittels Polyhistidin-Tag ermöglichen (Abbildung 5).

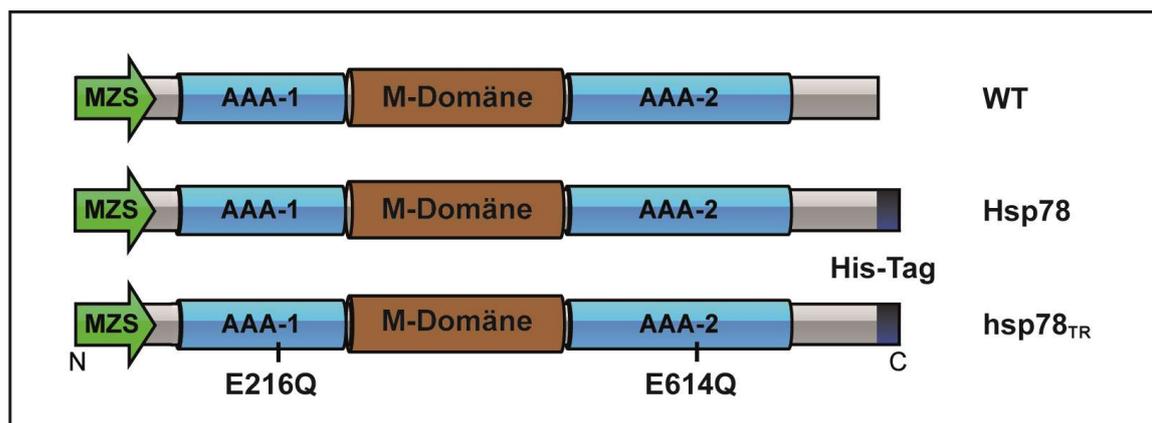


Abbildung 5: Hsp78-Konstrukte

Schematische Abbildung der eingesetzten Proteinkonstrukte des Wildtyps ohne Histidin-Tag (WT), des Wildtyps mit Histidin-Tag (Hsp78) und der Mutante mit Histidin-Tag (hsp78_{TR}). Gekennzeichnet in grün ist die mitochondriale Zielsequenz (MZS), in braun die mittlere Domäne (M-Domäne) des Proteins, in hellblau die beiden ATPase-Domänen (AAA) und in dunkelblau der angehängte Polyhistidin-Tag (His-Tag). Für die Mutante sind beide AAA-Domänen in den Walker B-Motiven durch einen Aminosäureaustausch von Glutaminsäure gegen Glutamin modifiziert.

Für den weiteren Einsatz dieser Mutante wurden sowohl die Expression, die ATPase-Aktivität, als auch die Wachstumseigenschaften transformierter Zellen untersucht. Zuerst wurde die Expression der hergestellten Konstrukte getestet und verglichen. Der Einsatz von Galaktose-induzierbaren Promotoren ermöglicht die regulierte Induktion der Konstrukte und einen Abbruch der Expression, falls benötigt. Die

Verwendung *hsp78Δ* Hefestämmen sollte eine Verunreinigung der Mutante mit wildtyp Hsp78-Proteinen verhindern. Für den Expressionsvergleich wurden das wildtyp Hsp78, das mutierte *hsp78_{TR}-6xHis* mit Polyhistidin-Tag und eine wildtyp Variante Hsp78-6xHis mit Polyhistidin-Tag verwendet. Die Analyse der Expression erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender CBB-Färbung der Zellysate, sowie Immunodetektion von Hsp78. Die Beladung der SDS-PAGE mit den entsprechenden Zellysaten wurde durch die Immunodetektion des zytoplasmatischen PGK und des mitochondrialen Tim23 Proteins überprüft. Die Expression aller drei Proteinkonstrukte konnte durch SDS-PAGE und Antikörperdetektion, klar nachgewiesen werden. Allerdings zeigte ein Vergleich des Expressionsniveaus, dass die Expression der beiden mit dem Polyhistidin-Tag gekoppelten Proteine, gegenüber dem wildtyp Hsp78, reduziert war. Darüber hinaus konnte durch die Entnahme verschiedener Proben nach unterschiedlichen Expressionszeiten, die optimale Expressionsdauer von 3 bis maximal 4 Stunden definiert werden (Abbildung 6A).

Zur Feststellung der ATPase-Aktivität wurden die beiden Protein-Varianten mit Polyhistidin-Tag in *E.coli* exprimiert und über eine Ni-NTA basierte Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mit den aufgereinigten Proteinen wurde ein ATPase-Assay durchgeführt. Wie man in Abbildung 6B erkennen kann, weist die *hsp78_{TR}*-Mutante, eine Reduktion der ATPase-Aktivität um 70% im Vergleich zum wildtyp Hsp78 auf. Dies zeigt, dass die Polyhistidin-Varianten aktiv sind und dass der Aminosäureaustausch die ATPase-Aktivität verringert.

Desweiteren wurde der Einfluss der Mutation auf die Hsp78-Funktion im Gesamtorganismus untersucht. In diesem Zusammenhang wurde erwartet, dass die durch Hsp78-vermittelte Thermotoleranz für Hefezellen mit *hsp78_{TR}* vermindert sein sollte. Hierfür wurde ein Wachstumsassay verwendet. Die entsprechenden Hefestämme wurden nach Vorbehandlung bei 42°C, sowie einem Hitzeschock bei 48°C auf ihr Wachstum überprüft. In der Tat zeigt die *hsp78_{TR}*-Mutante ein verringertes Wachstum als der Wildtyp. Im Gegensatz zur nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (Glycerol), wurde dieser Effekt beim Wachstum auf einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle (Glukose), nicht beobachtet (Abbildung 6C). Das zeigt die Abhängigkeit von der mitochondrialen Funktionalität.

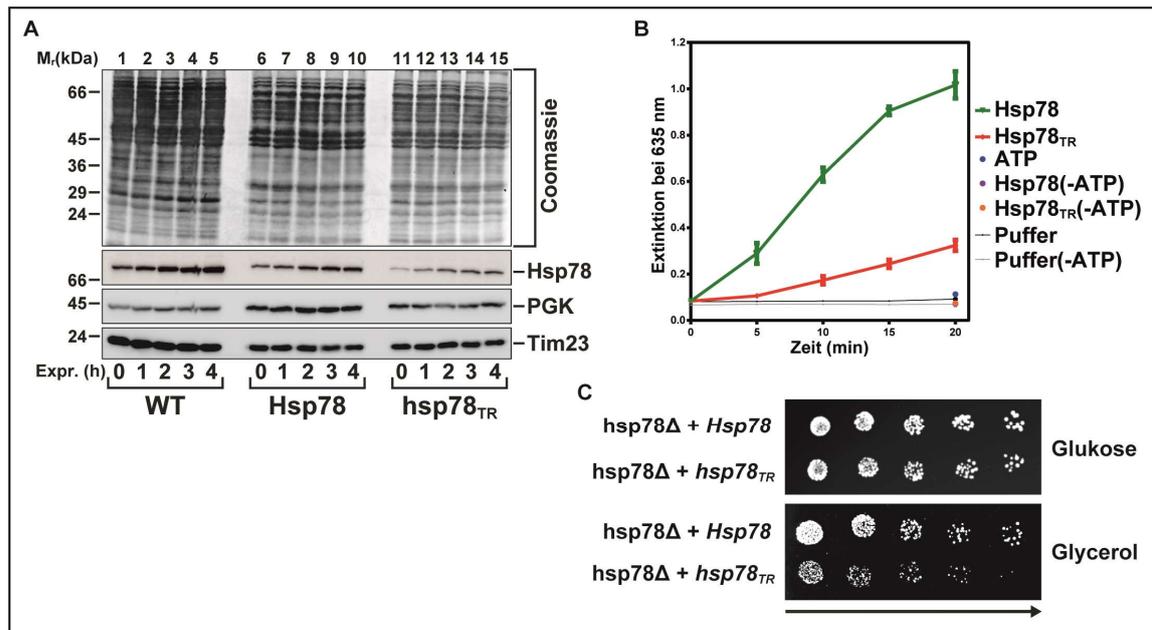


Abbildung 6: Charakterisierung der hsp78_{TR}-Mutante

A, Analyse der Hsp78-Proteinexpression für transformierte Hefezellen über einen Zeitraum von 4 Stunden, mittels SDS-PAGE und Western Blot. Als Ladekontrollen wurden die Proteine Tim23 und Tom40 untersucht. **B**, Bestimmung der ATPase-Aktivität für aus *E. coli* isoliertes Hsp78 (grüner Graph) und hsp78_{TR} (roter Graph) und weitere Kontrollansätze über einen Zeitraum von 20 Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Experimente mit Standardfehler. **C**, Hefe Zellwachstumsanalyse auf Nährplatten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen für den direkten Vergleich des Einflusses von Hsp78 und hsp78_{TR}. Die einzelnen Spalten stellen eine Verdünnungsreihe von 1:3 dar.

Da Proteine der Hsp100 Familie aktive Komplexe aus mehreren Untereinheiten bilden wurde auch diese Eigenschaft überprüft. Typischerweise bilden sich aktive Hexamere aus. Die Analyse der isolierten Mitochondrien mittels BN-PAGE kombiniert mit einer Hsp78-Immunodekoration, ermöglicht die Visualisierung der Proteinkomplexe unter *in vivo* Bedingungen. So konnte die Ausbildung von Hexameren, sowie Trimeren (ggf. Dimeren), im unteren Massenbereich gezeigt werden. Darüber hinaus konnten für die Mutante unter ATP-regenerierenden Bedingungen auch weitere Signale im oberen Massenbereich identifiziert werden (Abbildung 7A). Diese könnten auf mögliche Substratkomplexe hindeuten. Zusätzlich ist die Information über die Ausbildung gleicher Proteinstrukturen zwischen hsp78_{TR} und Hsp78, ein weiterer Hinweis auf eine ansonsten intakte Struktur der hsp78_{TR}-Mutante. Um die Komplexe weiter zu untersuchen, wurden auch die in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten Proteine, direkt über eine BN-PAGE aufgelöst, sowie eine Größenausschlusschromatographie mit diesen Proteinen durchgeführt. In beiden

Experimente wurde mit verschiedenen Salzkonzentrationen gearbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp bei hohen Salzkonzentrationen zu kleineren Komplexen tendiert, während die Mutante keine Unterschiede aufgezeigt und weiterhin in höheren Oligomeren vorliegt (Abbildung 7B/7D). Der Proteinkomplex der Mutante ist somit stabiler als der Wildtyp-Komplex. Die Bildung der Hsp78-Proteinkomplexe wurde für den Wildtyp abschließend nochmals über ein Glutaraldehyd-Crosslinking Experiment nachverfolgt. Hierbei sollte die Bildung höherer Proteinkomplexe nochmals bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich das in *E.coli* exprimierte Hsp78-Protein ähnlich verhält, wie andere Hsp100-Proteine, welche ebenfalls als Hexamere in Crosslinking-Experimenten identifiziert worden sind (Abbildung 7C). In der Größenausschlusschromatographie war eindeutig zu erkennen, dass beide Varianten bei niedriger Salzkonzentration auf der Höhe von Tyroglobulin eluieren, während eine Behandlung mit höherem Salzgehalt für das wildtyp Hsp78 zu einer Verschiebung der Elution zur Aldolase-Referenz führte. Dies entsprach einer deutlich kleineren Komplexgröße und deutete auf eine Dissoziation der wildtyp Komplexe hin, während sich die Komplexe der Mutante unter diesen Bedingungen nicht verändert haben (Abbildung 7D). Wir konnten aus den bisherigen Ergebnissen schlussfolgern, dass es sich bei der neu-generierten hsp78_{TR}-Mutante, um eine ATPase-defiziente-Variante des Hsp78 handelt, welche potentiell in der Lage sein sollte, Substratproteine zu binden. Gleichzeitig konnte durch die Minderung der Thermotoleranz von Hefezellen nachgewiesen werden, dass die funktionelle Störung des Hsp78-Proteins, Einfluss auf die Zellviabilität besitzt.

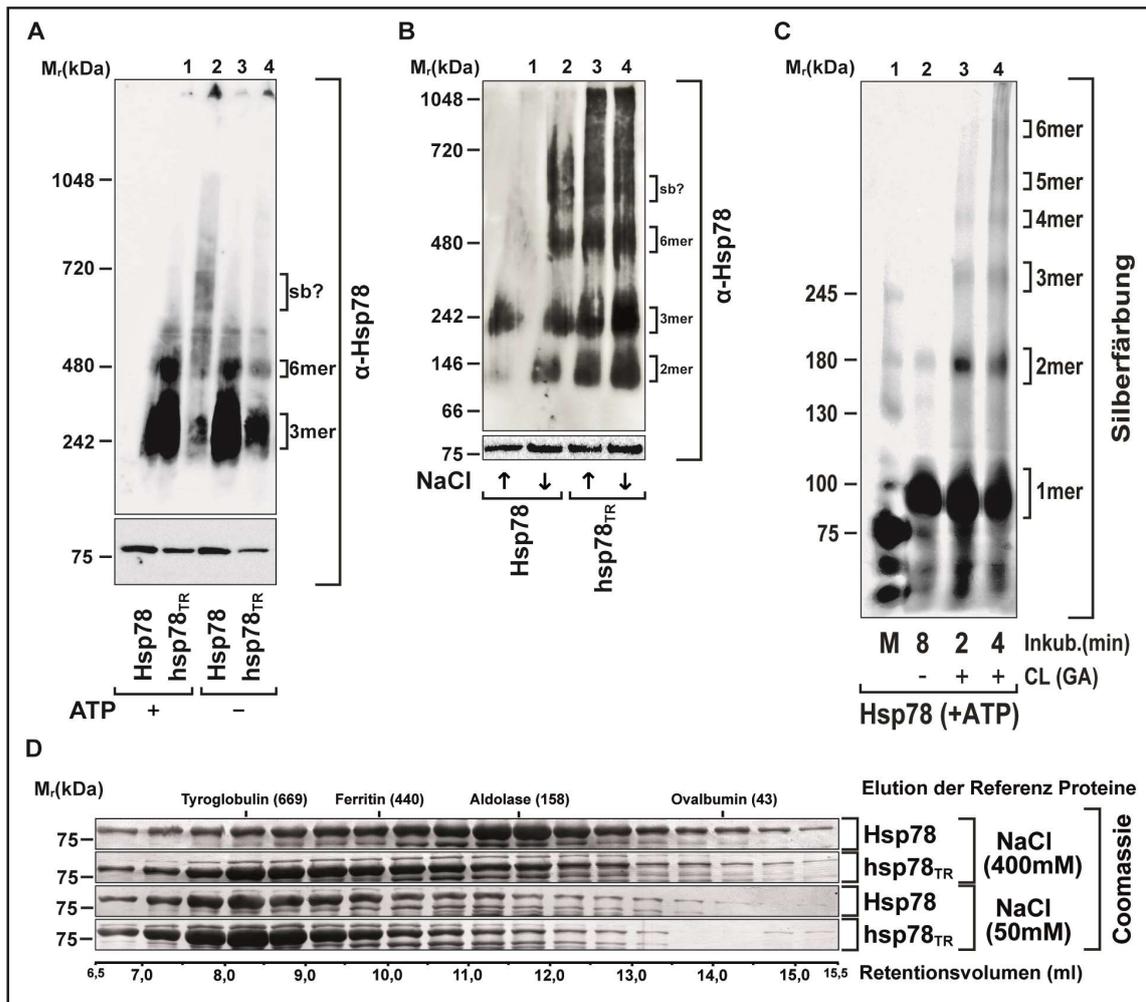


Abbildung 7: Hsp78-Komplexbildung

A, BN-PAGE (oberes Segment) und 12,5% SDS-PAGE (unteres Segment) mit WB und Immunodekoration von Hsp78 aus isolierten Mitochondrien (WJY11/WJY12), resuspendiert mit (+ATP) oder ohne ATP (-ATP). **B**, BN-PAGE (oberes Segment) und 12,5% SDS-PAGE Ladekontrolle (unteres Segment) mit Immunodekoration gegen Hsp78. Geladen wurde aus *E.coli* isoliertes Protein, welches über eine Affinitätschromatographie (Ni-NTA) aufgereinigt wurde. Die Proben wurden zuvor in Puffer mit hoher und niedriger Salzkonzentration inkubiert. **C**, 3,5% SDS-PAGE Gel, mit Silberfärbung. Durch M gekennzeichnet ist der HWM Marker. Eingesetzt wurde je μg 10 isoliertes Hsp78 unter ATP-Zugabe, welches durch Affinitätschromatographie und anschließende Größenausschlusschromatographie aufgereinigt wurde. Für potentielle Hsp78-Komplexe im oberen Massebereich über 245 kDa handelt es sich um eine Schätzung. Eine Probe ohne Glutaraldehyd (-) und zwei unterschiedliche Inkubationszeiten (+) sind zusätzlich dargestellt. **D**, Größenausschlusschromatographie (Sephacryl) mit isoliertem Protein aus *E.coli* (siehe A). Die gesammelten Fraktionen (je 0,5 ml) wurden über eine 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und über eine CBB-Färbung visualisiert. Die Proben wurden ebenfalls in unterschiedlichen Puffern vorinkubiert.

5.2 In organello Test der hsp78_{TR}-Mutante

Um die Eigenschaften der neu-generierte Mutante im zellulären Kontext zu testen, sowie deren Bedeutung für die aktive Entfaltung aggregierter Proteine zu

untersuchen, wurden mehrere *in organello* Experimente an isolierten Mitochondrien durchgeführt. Da Hsp100-Proteine durch ihre Entfaltungsaktivität Proteine sowohl zur Rückfaltung, als auch zum Abbau vermitteln können, wurden Disaggregationsexperimente und Degradationsexperimente mit verschiedenen Modelsubstratproteinen durchgeführt.

Für die Messung einer aktiven Entfaltung der eingesetzten Modelsubstratproteine, wie auch für die Feststellung eines möglichen Abbaus durch Proteasen, müssen diese zuerst in die mitochondriale Matrix importiert werden. Dort angekommen werden die charakteristischen Eigenschaften der beiden eingesetzten Modelproteine ausgenutzt. Bei dem für die Disaggregation eingesetzten Protein handelte es sich um ein selbst hergestelltes, radioaktiv markiertes Konstrukt. Dieses besitzt als Präsequenz eine verkürzte Variante des Cytochrom-b₂-Peptids der inneren mitochondrialen Membran, welches an eine thermo-sensitive Dihydrofolatreduktase-Domäne (DHFR) gekoppelt ist. Die DHFR stellt ein Mausprotein dar und kommt somit nicht natürlich in der mitochondrialen Matrix vor. Durch drei spezifische Mutationen (C7S, S42C, R49C) ist das Protein instabil und besitzt eine Tendenz zur hitzeinduzierten Aggregation. Diese Kombination ermöglicht also einen effektiven mitochondrialen Import und ist in aggregierter Form ein geeignetes Hsp78-Substrat. Gleichzeitig ist das Modelprotein durch die verkürzte ungefaltete N-terminale Domäne, kein potentes Substrat für die mitochondriale Matrix-Protease Pim1, wodurch es sonst durch Proteolyse zu einem Signalverlust kommen könnte. Die Verwendung von ³⁵S-Methionin markierten Proteinen ermöglicht zusätzlich eine zuverlässige Detektion (Abbildung 8 unten).

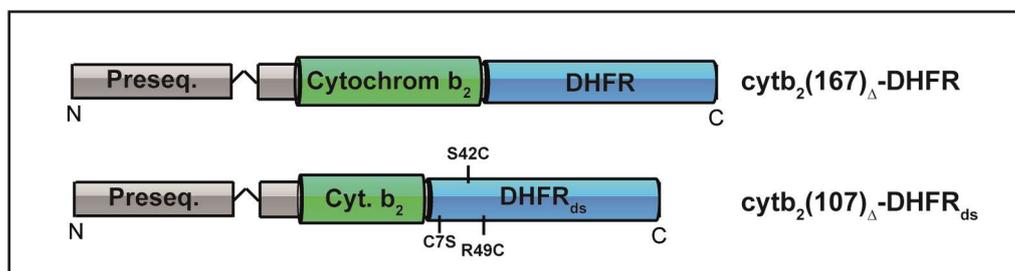


Abbildung 8: DHFR Konstrukte

Schematische Darstellung der cytb₂-DHFR-Konstrukte. Oben abgebildet ist cytb₂(167)_Δ-DHFR Fusionsprotein bestehend aus der mitochondrialen Zielsequenz (Präsequenz (grau)), dem amino-terminalen Segment von Cytochrom b₂ (grün) und der fusionierten Dihydrofolatreduktase (blau). Die Brücke deutet auf eine partielle Deletion der Zielsequenz

für den Intermembranraum hin. Unten abgebildet ist das verkürzte $\text{cytb}_2(107)_\Delta$ -DHFR_{ds} Konstrukt mit einer destabilisierten DHFR-Domäne. Die drei eingebrachten Punktmutationen sind gekennzeichnet.

Für die Disaggregation wurden zuerst die isolierten Mitochondrien mit dem importierten Modelprotein bei einer Temperatur von 42°C behandelt, damit eine Aggregation der Proteine induziert wird. Nach einer definierten Regenerationsphase wurde abschließend die Resolubilisierung des Modelproteins verfolgt, wofür das Sedimentationsverhalten nach Ultrazentrifugation betrachtet wurde. Die aktive Auflösung der Aggregate ist in dem Fall, gleichbedeutend mit der ATP-abhängigen Minimierung des radioaktiven Signals im Pellet, bei parallelem Wiederauftreten im Überstand. Es konnte zuerst klar nachgewiesen werden, dass die Disaggregation ein ATP-abhängiger Prozess ist und bei Depletion des ATP, keine Disaggregation des Modellsubstrats auftritt (Abbildung 9A). Bei Verwendung verschiedener isolierter Mitochondrien-Typen (Hsp78-Varianten), konnte gezeigt werden, dass die Disaggregation bei Überexpression des Hsp78 gegenüber dem Normalniveau (WT), kaum verstärkt war. Gleichzeitig war für die hsp78_{TR} -Mutante eine signifikante Reduktion der Disaggregationsaktivität zu beobachten. Im Vergleich mit dem hsp78_Δ konnte für die Mutante eine ähnliche Aktivität festgestellt werden. Beide Messwerte entsprachen in etwa dem Wert für die Disaggregationseffizienz in Abwesenheit von ATP (Abbildung 9B-C).

Für die weitere Charakterisierung der Substratbindungsfähigkeit der Mutante im Vergleich zum Wildtyp, wurde ein Substratbindungsexperiment durchgeführt, in dem es ebenfalls möglich war die Aggregation bzw. Löslichkeit der Hsp78-Varianten zu vergleichen. Die Inkubation von hitzebehandelten mitochondrialen hsp78_Δ Lysaten (AP), gemeinsam mit geklärten Hsp78/ hsp78_{TR} -Überständen (S), ermöglicht die Untersuchung des Bindungsverhaltens. Gleichzeitig kann im ersten Schritt die Löslichkeit der Hsp78-Varianten überprüft werden (Abbildung 9D). Es zeigt sich, dass die hsp78_{TR} -Mutante eine minimale Tendenz zur Sedimentation ins Pellet (P) besitzt, während der Wildtyp komplett löslich bleibt (S). Weiterhin konnte jedoch beobachtet werden, dass beide Varianten nach Zugabe der hitzebehandelten Lysate (AP), aktiv von der löslichen Phase (S.AP+S) ins Pellet (P.AP+S) gelangten. Im Fall der Mutante war dieses Verhalten sogar noch ausgeprägter. Die gleich behandelten Kontrollproben (SM und PM) zeigten dieses Verhalten jedoch nicht (Abbildung 9E).

Diese Eigenschaften deuten auf eine aktive Bindung der Hsp78-Varianten an mögliche Substrate der Pellet-Fractionen hin, wobei die Mutante eine höhere Affinität aufweist.

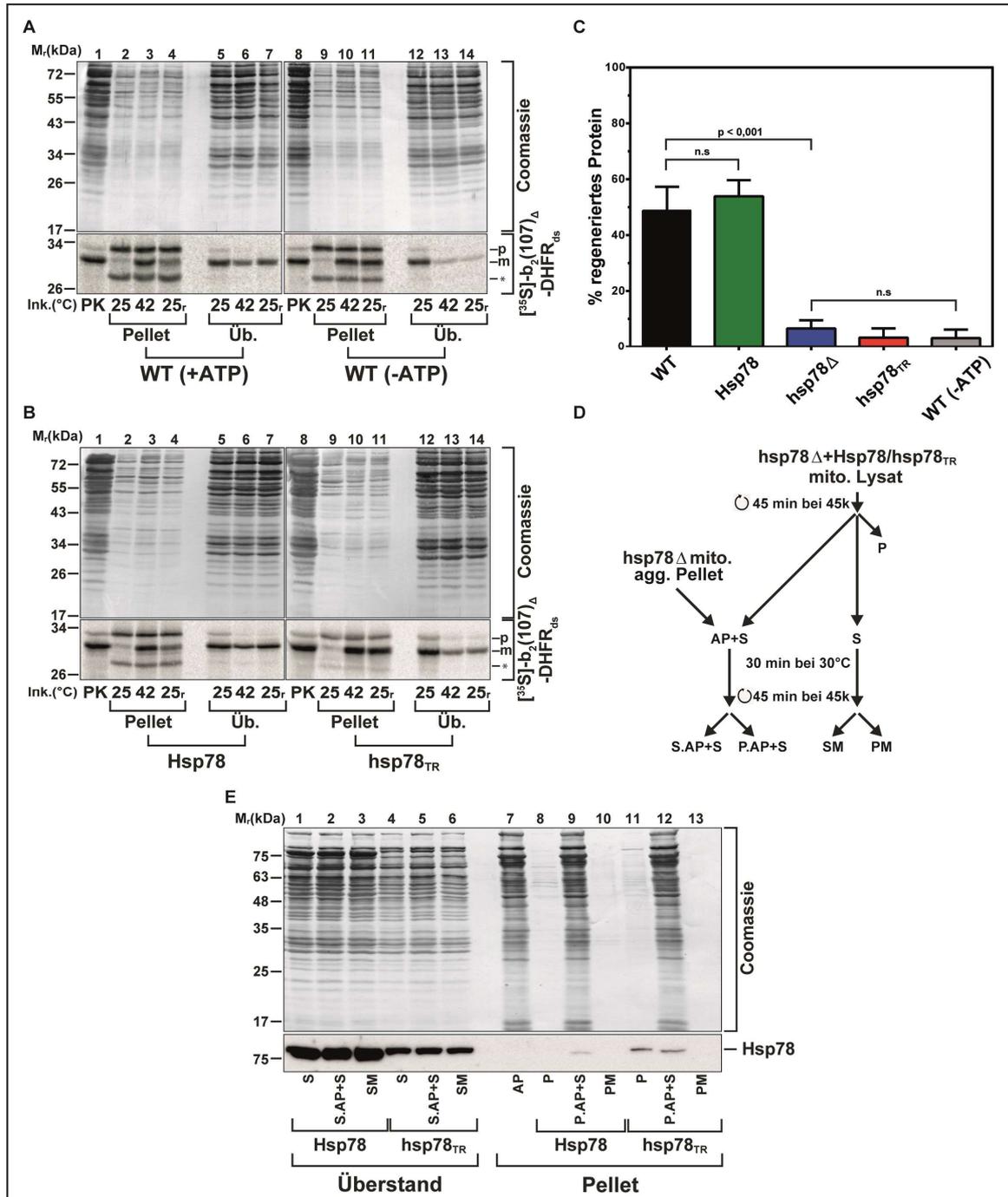


Abbildung 9: In organello Funktionen von Hsp78

A, Kontrollversuch für die Hsp78-abhängige Disaggregation von Modellsubstratprotein cytb₂-(107)_Δ-DHFR_{ds}. Isolierte Mitochondrien wurden in verschiedenen Puffern (+ATP/-ATP) vorbehandelt. Nicht-importiertes Präprotein (p) wurden exemplarisch durch einen Proteinase K Verdau von der maturierten Form (m) unterscheiden. Die Sternchen deuten auf weitere Translationsprodukte hin. Im unteren Segment ist die Detektion des radioaktiven

Signals abgebildet, während im oberen Segment als Ladekontrolle eine CBB-Färbung beigefügt wurde. **B**, Direkter Vergleich der Hsp78-abhängigen Disaggregation von Modelsubstratprotein $\text{cytb}_2\text{-}(107)\Delta\text{-DHFR}_{\text{ds}}$ durch Hsp78 und hsp78_{TR} in Analogie zu **A**. **C**, Quantitative Auswertung von mehreren Disaggregationsexperimenten (siehe **A/B**). Hierbei wurden zusätzlich die experimentellen Daten von $\text{hsp78}\Delta$ Mitochondrien hinzugefügt. Dargestellt sind Säulendiagramme mit Standardfehler ($n=5-7$; $n=2$ (-ATP)) und eine Varianzanalyse (one-way Anova) mit multiplen Vergleichen. **D**, Schematische Darstellung des Löslichkeitsversuches mit Substratbindungsanalyse. S (Überstand); P (Pellet); AP (Aggregatpellet \triangleq Hsp78-Substrat) **E**, Experiment zur Untersuchung der Löslichkeit und Substratbindung durch Hsp78 und hsp78_{TR} . Western Blot mit Immunodekoration von Hsp78 (unteres Segment), mit CBB-Färbung als Ladekontrolle (oberes Segment). Der Vergleich der verschiedenen Fraktionen zeigt die Unterschiede in der Löslichkeit der Proteine (Spalte 8/11) und der Aggregatbindung durch die Hsp78-Varianten (Spalte 9/12). Kontrollexperimente ohne Aggregatpellet (10/13).

Zur Untersuchung der Degradation in der mitochondrialen Matrix wurde ein weiteres Modelprotein eingesetzt. Das $\text{cytb}_2(167)\Delta\text{-DHFR}$ ist ein Substrat, welches sich durch eine längere ungefaltete N-terminale Domäne auszeichnet und nicht thermo-sensitiv ist (Abbildung 8 oben). Hierdurch wird eine Pim1 abhängige Degradation begünstigt, da diese Protease lediglich Substrate mit längeren ungefalteten Domänen prozessieren kann. Nach Import konnte die Degradation des $\text{cytb}_2(167)\Delta\text{-DHFR}$ Konstrukts für den Wildtyp, über die Entstehung von Degradationsfragmenten nachgewiesen werden. In Abwesenheit von ATP findet diese jedoch nicht statt und stellt damit einen ATP-abhängigen Prozess dar (Abbildung 10A). Bei der Messung der Degradationskinetiken, für die eingesetzten Mitochondrientypen, zeigte sich grundsätzlich ein ähnliches Ergebnis. Nur für $\text{hsp78}\Delta$ konnte eine zu Beginn beschleunigte Abbaugeschwindigkeit festgestellt werden (Abbildung 10B). Es wäre möglich, dass ein Anteil der Substratproteine ggf. nach dem Import nicht korrekt gefaltet oder sogar aggregiert ist und dadurch an Hsp78 gefunden wird. Dies würde eine Verzögerung für alle anderen Hsp78-Varianten erklären. Zusammenfassend lässt sich allerdings feststellen, dass für ein nicht aggregierendes Substrat, Hsp78 keinerlei Entfaltungsaktivität und Kooperation mit Pim1 zu leisten scheint.

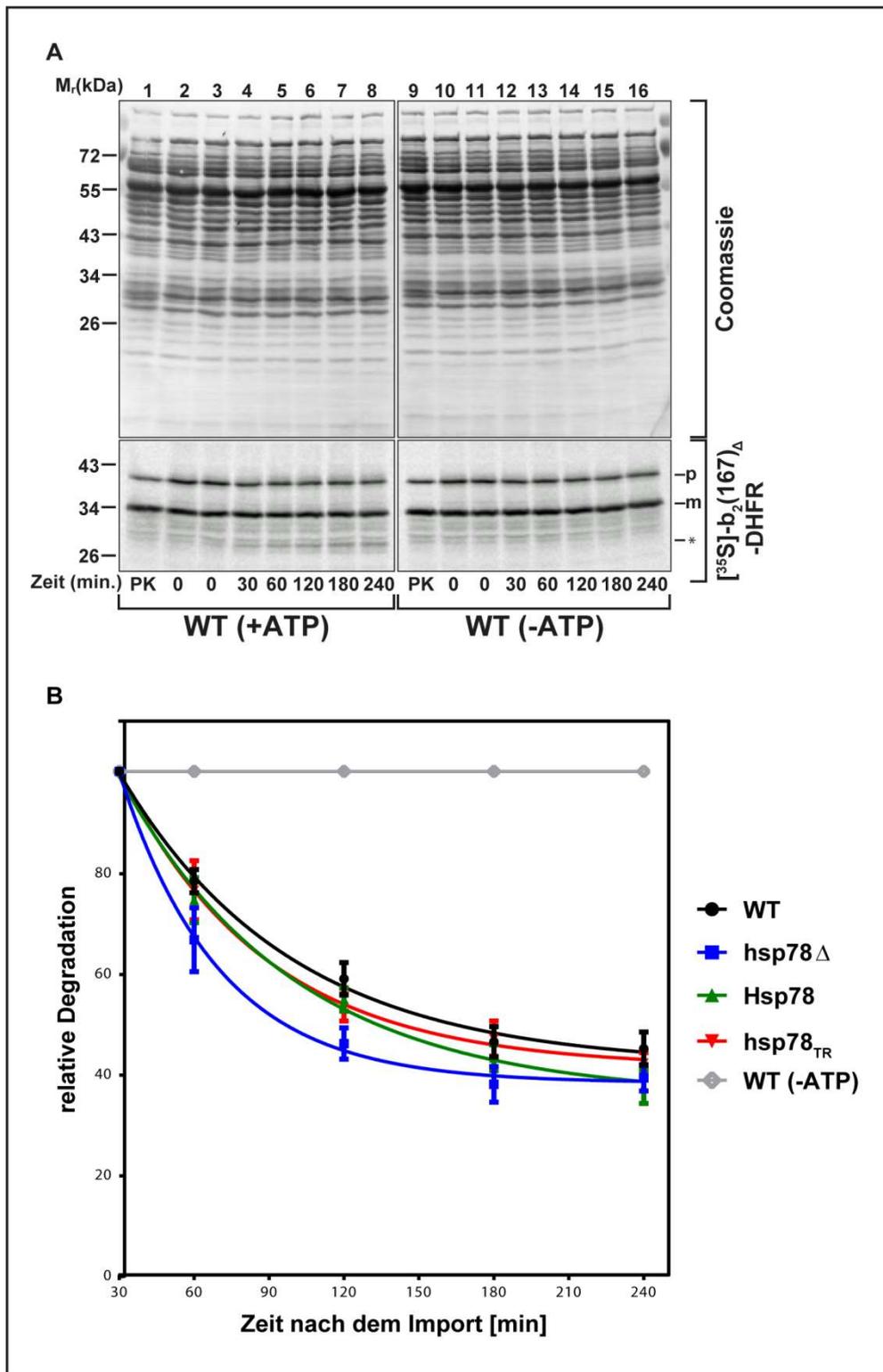


Abbildung 10: *In organello* Degradation von $\text{cytb}_2(167)_\Delta$ -DHFR

A, Kontrollversuch für die Hsp78-abhängige Degradation von Modells substratprotein $\text{cytb}_2(167)_\Delta$ -DHFR. Isolierte Mitochondrien wurden in verschiedenen Puffern (+ATP/-ATP) vorbehandelt. Nicht-importiertes Präprotein (p) wurden exemplarisch durch einen Proteinase K Verdau von der maturierten Form (m) unterscheiden. Die Sternchen deuten auf Degradationsfragmente hin. Im unteren Segment ist die Detektion des radioaktiven Signals abgebildet, während im oberen Segment als Ladekontrolle eine CBB-Färbung beigelegt wurde. **B**, Quantitative Auswertung der Degradation für den Abbau eines importierten

Degradationssubstrates in verschiedenen isolierten Mitochondrien. Dargestellt sind die Abbaukinetiken über einen Zeitraum von 210 Minuten für wildtyp Mitochondrien (WT) (schwarz), hsp78 Δ (blau), Hsp78-Überexpression (grün), hsp78_{TR}-Überexpression (rot) und eine Kontrolle für wildtyp Mitochondrien unter ATP-Depletion (grau). Da die Doppelnullproben deutliche Schwankungen aufzeigten, wurden die Messwerte nach 30 Minuten als Startpunkt definiert. Angezeigt sind die Mittelwerte aus WT (9), Hsp78 Δ (7), Hsp78 ÜE (7), hsp78_{TR} (7) und WT (-ATP) (2) unabhängigen Experimenten mit Standardfehler.

5.3 Koaufrreinigung von Substraten

Nachdem gezeigt wurde, dass die hsp78_{TR}-Mutante eine höhere Bindungsaffinität aufweist, konnte mit dieser eine Substratstudie durchgeführt werden. Hierfür wurden die Hsp78-Proteine überexprimiert und anschließend Mitochondrien isoliert. Die Mitochondrien wurden unterschiedlich behandelt. Für alle drei Hsp78-Varianten wurden die Ansätze entweder unbehandelt (25°C) belassen, bei 42°C gestresst oder gestresst und für eine Stunde regeneriert (25°C). Nach Lyse und Ni-TEF Affinitätschromatographie wurden die über Lysin-Isotope markierten Proben gemischt und massenspektrometrisch vermessen (Abbildung 11). Das eingesetzte Ni-TEF Säulenmaterial besitzt lediglich eine Koordinierungsstelle und liefert so eine hohe Selektivität bei der Aufrreinigung. Der Ansatz mit Hsp78 ohne His-Tag (WT) wurde als Kontrollansatz betrachtet und zeigt die unspezifische Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial bzw. andere Verunreinigungen, welche als Hintergrundsignal definiert wurden.

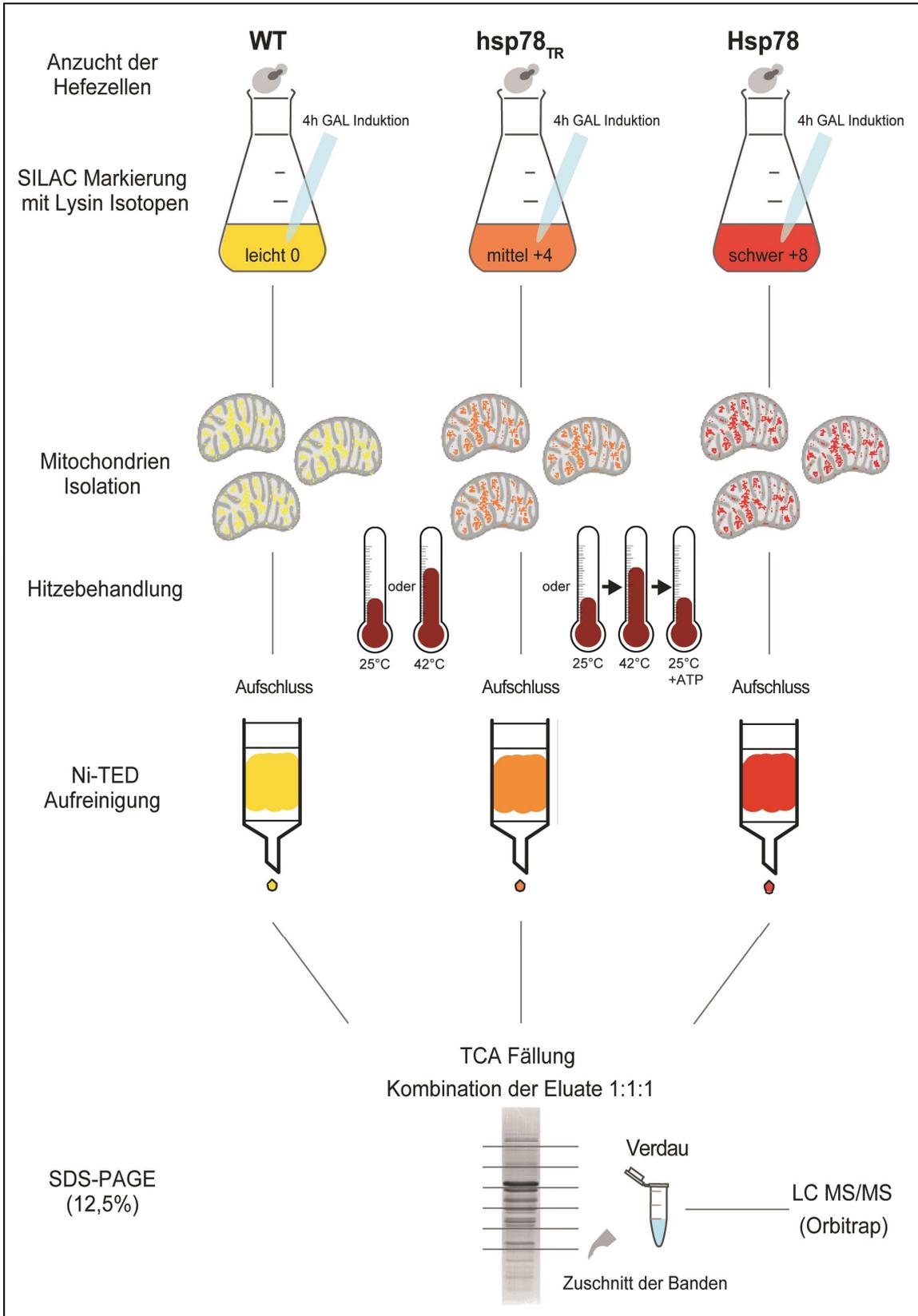


Abbildung 11: Arbeitsablauf für das Koaufräumungsexperiment

Um einen erfolgreichen experimentellen Ablauf nachzuweisen, wurde die Aufreinigung der Hsp78-Varianten über eine Western Blot Analyse überprüft. Während die His-Tag-gekoppelten Varianten Hsp78 und hsp78_{TR} nach Aufreinigung nachgewiesen werden konnten, zeigte der Wildtyp ohne His-Tag (WT) in allen Eluatfraktionen kein Hsp78-Signal. Als Kontrolle diente das Protein Tom40 der inneren mitochondrialen Membran (IMM), welches nicht aufgereinigt wurde (Abbildung 12A). Darüber hinaus wurde ebenfalls ein Kontrollgel für die Proben, welche massenspektrometrisch untersucht wurden angefertigt und über eine CBB-Färbung die Anwesenheit weiterer Proteinbanden bestätigt (Abbildung 12B).

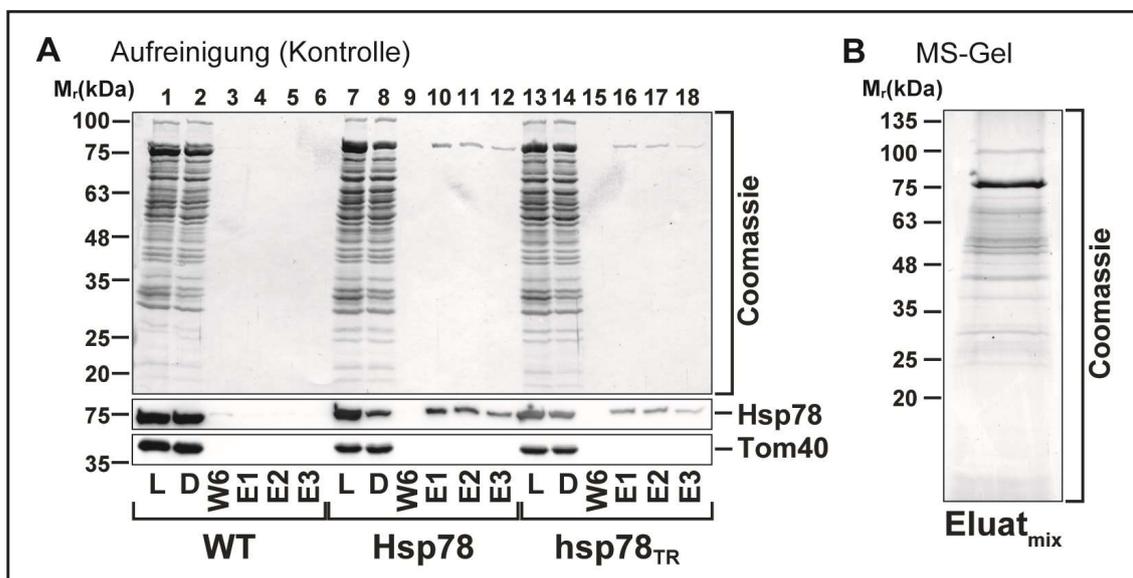


Abbildung 12: Aufreinigung von Hsp78-Proteinen und MS-Kontrollgel

A, 12,5% SDS-PAGE Kontrollgel mit CBB-Färbung für die Ni-TED Affinitätschromatographie von Hsp78. Im mittleren Segment Western Blot gegen Hsp78 und gegen Tom40 im unteren Segment. Für jede Koaufrreinigung (WT/Hsp78/hsp78_{TR}) wurden die Lysate (L), die Durchflüsse (D) und die letzte Waschfraktion (W6), sowie drei Eluate (E1/2/3) analysiert. **B**, 12,5% SDS-PAGE Kontrollgel mit CBB-Färbung für die MS-Probenvorbereitung. Geladen wurde aufkonzentriertes Eluat, der drei Hsp78-Varianten in einem Volumenverhältnis von 1:1:1.

Nach massenspektrometrischer Analyse wurden im ersten Auswertungsschritt alle gefundenen Proteine anhand der UniProt Datenbank in verschiedene Kategorien eingeteilt. Hierbei wurde die intrazelluläre bzw. intramitochondriale Lokalisation berücksichtigt und weitere Informationen, wie die Funktion der Proteine, angefügt. Bei den unbehandelten Proben liegt der Wert für nicht-mitochondriale Proteine bei 23% für das Hsp78 und bei 14% für hsp78_{TR}. Unter Hitzestress und

Regenerationsbedingungen liegt der Anteil nicht mitochondrialer Proteine für beide Varianten bei etwa 5%. Bei genauerer Betrachtung der Unterschiede für die unbehandelten Proben, zeigt sich für hsp78_{TR}, mit 62% gegenüber 48% für Hsp78, deutlich affiner für mitochondriale Matrix-Proteine (MM), wobei der Anteil der Proteine aus der inneren mitochondrialen Membran (IMM) mit 10% identisch ist. Weiterhin ist die Lokalisationsverteilung für die Ansätze bei 42°C und die regenerierte Probe, mit einem Anteil von 50% für MM Proteine ähnlich. Gleichzeitig ist der Prozentsatz der IMM und sonstigen mitochondrialen Proteine (SM) für beide Varianten bei 42°C ähnlich (>20%), während nach der Regeneration fast ausschließlich IMM Proteine überwiegen (40%) (Abbildung 13A). Somit sind die identifizierten Proteine größtenteils mitochondrial.

Im weiteren Verlauf der Datenauswertung wurde das Hintergrundsignal berücksichtigt und die angereicherten Proteinsignale auf die Menge des aufgereinigten Hsp78 bzw. hsp78_{TR} korrigiert. Alle angereicherten Proteine wurden anhand der UniProt Annotationen in funktionelle Kategorien sortiert. Die weniger abundanten Kategorien wurden unter dem Begriff Sonstige zusammengefasst. Diese Gruppe beinhaltet Proteine die am Import, der Degradation, der Redox-Homöostase, der Atmungskette, der genomischen Erhaltung und dem Fettsäuremetabolismus, beteiligt sind. Alle anderen abundanten Kategorien sind einzeln dargestellt. Bei Betrachtung der Gesamtabundanzen für die verschiedenen Bedingungen, können starke Unterschiede zwischen Hsp78 und hsp78_{TR} beobachtet werden. Während Hsp78 einer klaren Temperaturabhängigkeit unterliegt, zeigt hsp78_{TR} unter allen Bedingungen ähnliche Ergebnisse. Die Gesamtabundanz für die gebundenen Proteine steigt im Besonderen für Hsp78 bei 42°C deutlich an. Hier zeigt sich eine klare Zunahme in den Kategorien ATP-Synthese, Citratzyklus und bei Chaperonen. Darüber hinaus kann nach Hitzestress für Hsp78 eine geringe und für hsp78_{TR} eine starke Abnahme, der Menge von Komponenten der intramitochondrialen Proteinsynthese, festgestellt werden (Abbildung 13B). Zusammenfassend wird gezeigt, dass alle wichtigen mitochondrialen Funktionen von Hsp78 beeinflusst werden. Weiterhin wird deutlich, dass beide Hsp78-Varianten an ihrer funktionellen Lokalisation, der mitochondrialen Matrix, Substratproteine binden. Zusätzlich ergibt sich für Hsp78 eine für Chaperone typische Temperaturabhängigkeit, welche nicht bei hsp78_{TR} festzustellen ist.

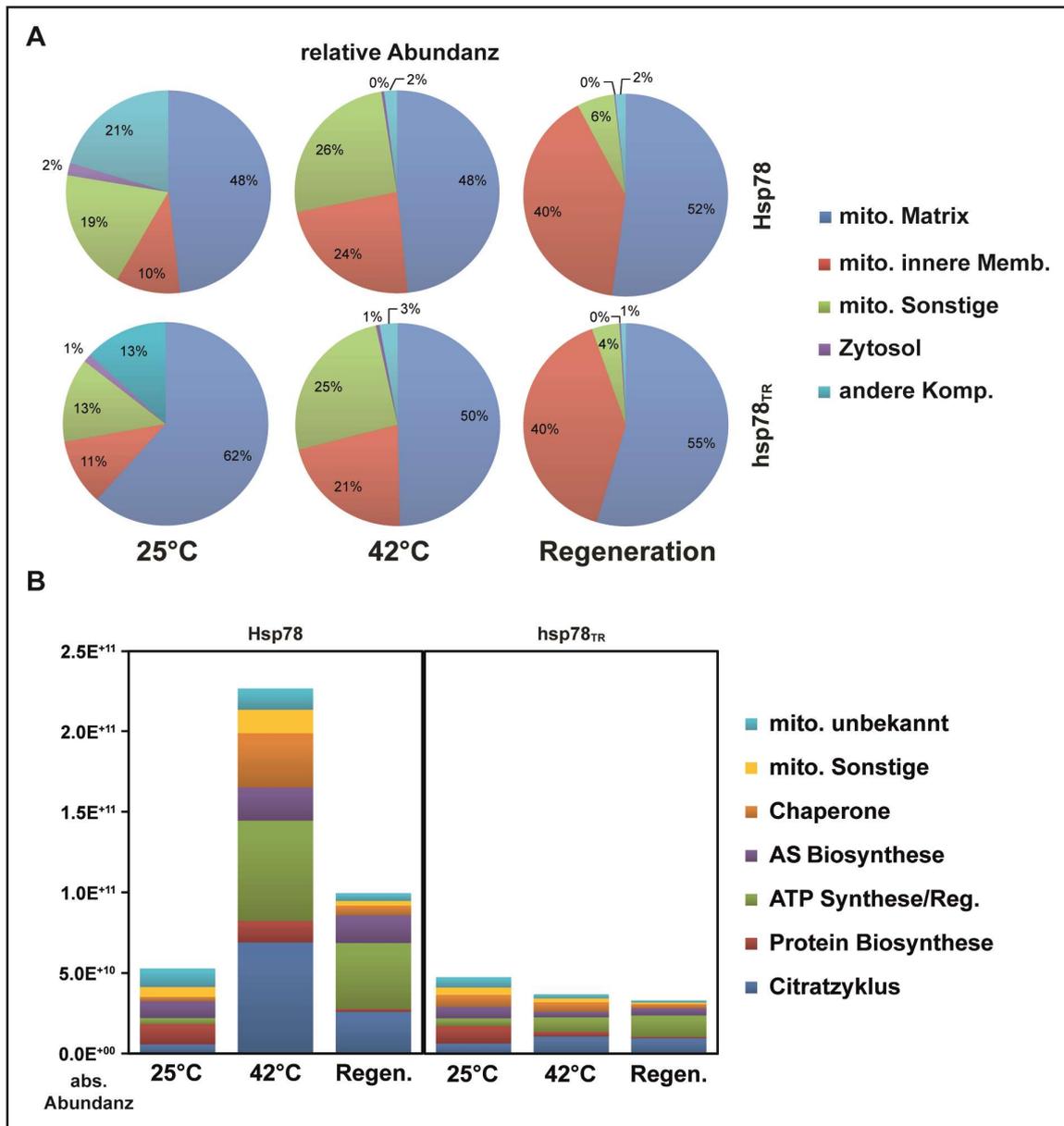


Abbildung 13: Lokalisation und funktionelle Kategorisierung

A, Kuchendiagramme veranschaulichen die Anteile, der zellulären Lokalisationen, der an Hsp78 gebundenen Proteine. Die Daten (n=3) wurden über die Verwendung von UniProt Proteininformationen kategorisiert. Die aufgeführten Werte beziehen sich auf die Rohdaten und werden durch den Anteil der Summe der kategorisierten absoluten Einzelabundanz an der Gesamtabundanz ermittelt. **B**, Gestaffelte Säulendiagramme mit der berechneten Summe der kategorisierten absoluten Einzelabundanz. Die Abundanz mitochondrialer Proteine wurden auf die Bait-Protein-Signalstärke normalisiert und zeigen sieben funktionelle Kategorien, welche über UniProt-Informationen zugeordnet wurden (n=3).

Betrachtet man im nächsten Schritt, aus der Gesamtheit aller identifizierten Proteine, ausschließlich die über die Affinitätschromatographie angereicherten, erhält man ein interessantes Bild von einer kleinen Gruppe von Proteinen mit hoher Abundanz.

Hierbei zeigt sich, dass schon 5 Proteine einen Anteil von 50% des Hsp78-gebundenen Materials ausmachen. Im Fall des unbehandelten Hsp78 umfasst diese die Proteine Ilv1 (20%), Ilv2 (15%), Prx1 (11%), Mcr1 (11%) und Alt1 (9%). Etwa 50% des Gesamtsignales kommt von einer Mischung weniger abundanter Proteine. Bei 42°C wird das Hsp70 Chaperon Ssc1 mit fast 50% zum Hauptbindungspartner, danach folgen Kgd2 (14%), Aco1 (8%), Gut2 (6%) und Sdh2 (5%). Nach der einstündigen Regenerationsphase vermindert sich das Ssc1 Signal auf 10%, während die Proteine Ald4 (25%), Fum1 (11%), Gut2 (8%) und Alt1 (7%) eine höhere Abundanz zeigen. Die Gesamtheit der weniger abundanten Proteine steigt im Vergleich zur 42°C Probe wieder deutlich an (Abbildung 14A). Für hsp78_{TR} ist unter allen Bedingungen etwa ein Drittel des Gesamtsignales aus weniger abundanten Proteinen zusammengesetzt. Im Kontrast zum Hsp78 ist für hsp78_{TR} das Auftreten von Ssc1 mit 53% für die unbehandelte Probe auffällig. Die Proteine Mcr1, Sdh2, Prx1 und Lpd1 liegen alle bei etwa 5% und sind damit deutlich schwächer vertreten als das Hsp70 Chaperon. Für den Ansatz bei 42°C findet man die Proteine Kgd2 (20%), Lsc2 (18%), Hem1 (10%), Aco1 (10%) und Prx1 (8%), während Ssc1 keine besondere Gewichtung besitzt. Für die regenerierten Proben werden Alt1 (20%), Ald4 (19%), Lpd1 (15%), Ssc1 (8%) und Fum1 (4%) als wichtigste Proteine festgestellt (Abbildung 14A).

Insgesamt konnten 183 mitochondriale Proteine bei der Koaufrreinigung identifiziert werden. Eine Interaktion mit Hsp78 von abundanten Proteinen mit Aggregationstendenz, wurde nachfolgend über eine Western Blot Analyse unabhängig bestätigt. Zwar können alle untersuchten Proteine nachgewiesen werden, jedoch nicht unter allen experimentellen Bedingungen (Abbildung 14B). Besonders die schlechte Detektion für die regenerierten Proben ist auffällig. Gleichzeitig zeigt sich hier jedoch auch der "trapping"-Effekt für hsp78_{TR} unter Normalbedingungen. Da man bereits bei der Aufrreinigung nach Hitzestress weniger Protein detektiert und der Western Blot weniger sensitiv ist, ist diese Methode allerdings auch nicht geeignet Protein-Abundanzen unter diesen Bedingungen zu vergleichen. Als Kontrolle wurde zusätzlich gegen Mdh1 getestet, welches nicht in den aufgereinigten Proben detektiert werden konnte, obwohl es grundsätzlich gut detektierbar ist. Es kann vermutet werden, dass Mdh1 möglicherweise nicht aggregiert bzw. durch Hsp78 gebunden wird (Abbildung 14B).

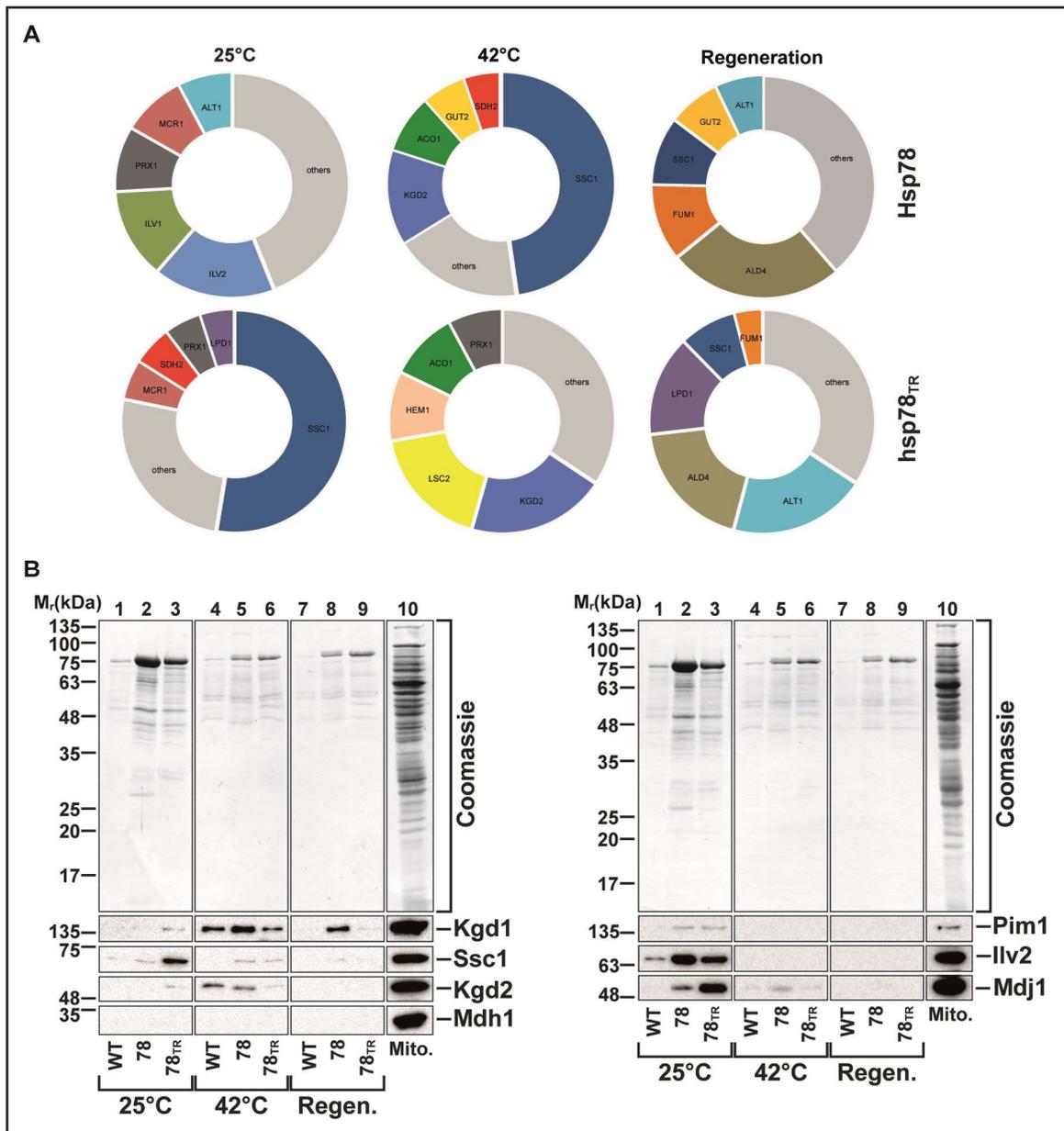
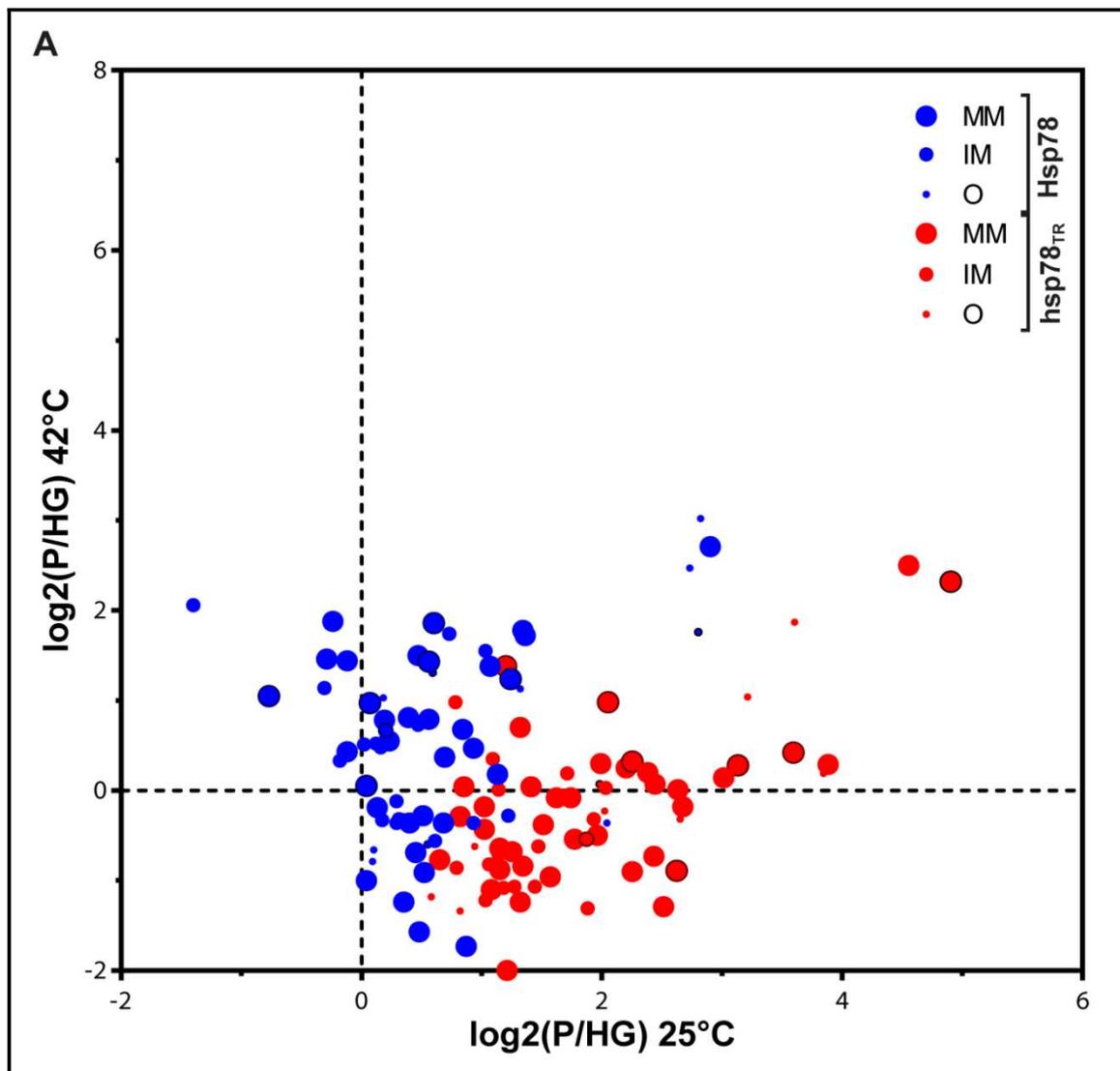


Abbildung 14: Abundante Proteine und individuelle Koafreinigung

A, Kreisdiagramm mit den abundantesten Proteinen (im Uhrzeigersinn sortiert), welche unter allen Bedingungen für beide Protein-Varianten identifiziert wurden. Das Diagramm enthält die gemittelten Rohdatenwerte aus 3 Experimenten im Verhältnis zur Gesamtabundanz. **B**, 12,5% SDS-PAGE mit verschiedenen Immunodetektionen zur Überprüfung individueller Proteine bei der Koafreinigung. Geladen wurden Eluate aus Koafreinigungsversuchen mit unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. In Spalte 10 ist jeweils unbehandeltes mitochondriales Lysat (25 µg), als Kontrolle beigegefügt. 78 (Hsp78); 78_{TR} (hsp78_{TR})

Zur Darstellung der Anreicherung der Proteine unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen, wurde aus den Anreicherungsquotienten der Logarithmus zur Basis zwei berechnet und für beide Hsp78-Varianten gemeinsam

aufgetragen. Bei 25°C kann ein klarer Unterschied in der Proteinbindung zwischen beiden Proben festgestellt werden. Das hsp78_{TR} zeigt für MM- und IMM-Proteine eine stärkere Anreicherung als Hsp78. Im Kontrast dazu kann für den Ansatz bei 42°C ein gegensätzliches Verhalten beobachtet werden. Hier lässt sich eine höhere Anreicherung von Substratproteinen für Hsp78 feststellen (Abbildung 15A). Beim Vergleich der Varianten zwischen 42°C und dem Regenerationsansatz zeigt sich dann für Hsp78 eine Rückkehr zum Ausgangszustand, während hsp78_{TR} wiederum eine stärkere Substratbindung aufweist. Die Verteilung für beide Populationen ist jedoch ähnlicher als bei 25°C (Abbildung 15B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hsp78_{TR} eine stärkere Bindung unter Normalbedingungen besitzt, während Hsp78 einer typischen Affinitätssteigerung unter Stress unterliegt.



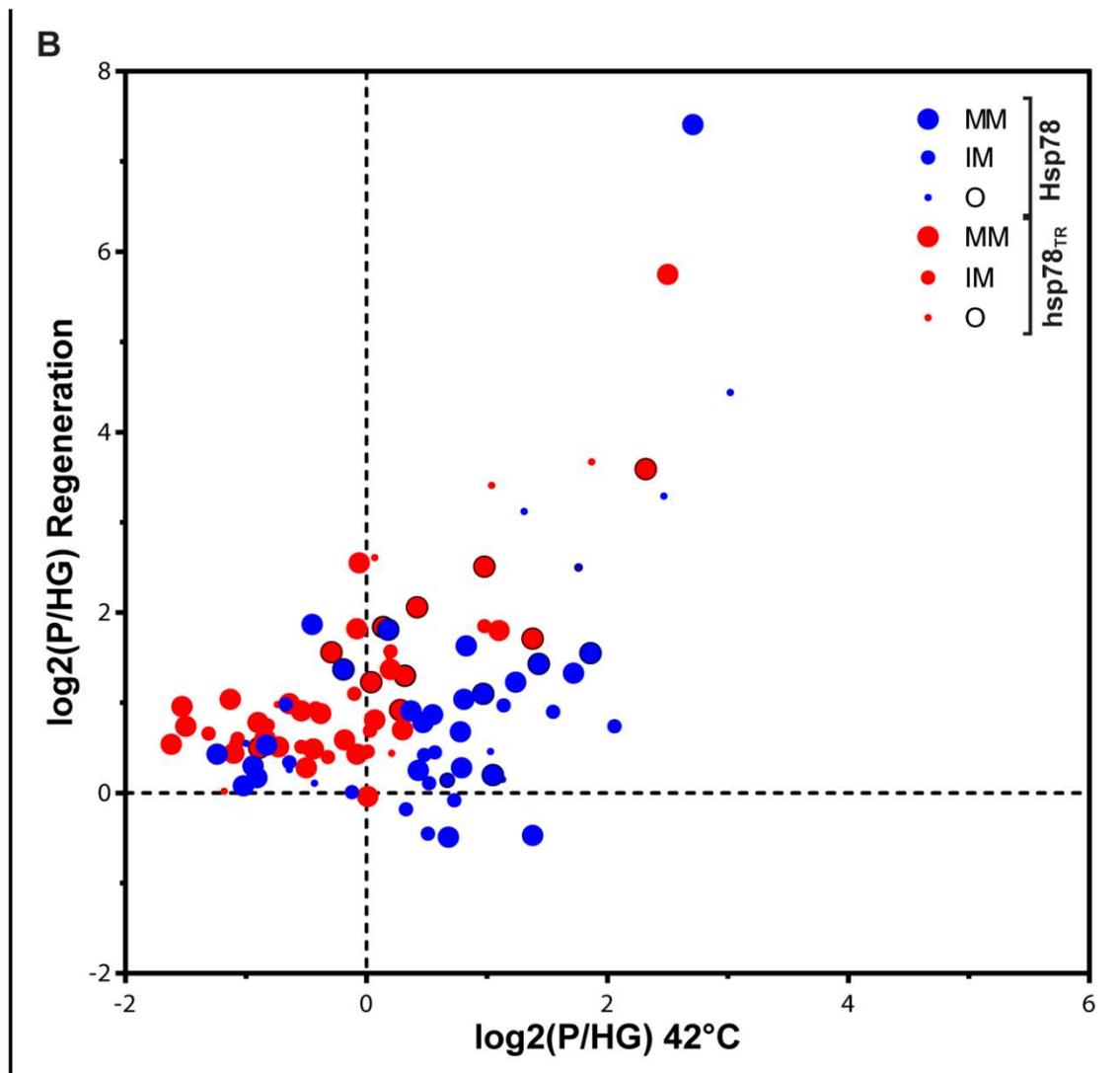


Abbildung 15: Proteinanreicherung

A, Rasterdiagramm für die Anreicherung der identifizierten Proteine für Hsp78 (blau) und hsp78_{TR} (rot). Die MM-Proteine heben sich durch einen größeren Punktdurchmesser gegenüber den Proteinen aus der IM und der Gruppe von nicht zugeordneten mitochondrialen Proteinen (O) bzw. Proteinen der äußeren Membran (kleiner Durchmesser) ab. Die Achsen sind als Logarithmus zur Basis 2 definiert. Sie zeigen das Verhältnis der gemessenen Protein-Abundanzen (P) zu den entsprechenden Hintergrundabundanzen (HG), unter den gegebenen Bedingungen. Die Werte basieren auf dem Mittelwert drei unabhängiger Experimente und unabhängigen MS-Messungen. Proteine, welche nicht angereichert wurden, sind ausgeschlossen. Proteine mit hoher absoluter Abundanz wurden durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet. **B**, Rasterdiagramm (siehe A) zum Vergleich der festgestellten Werte unter Hitzestress mit den Daten nach der Regeneration.

5.4 *In organello* Aggregations- und Disaggregationsexperiment

Die Bindung vieler Proteine an Hsp78 zeigt bereits die Bedeutung des Chaperons. Trotzdem benötigt man zur Beurteilung des Einflusses auf die intramitochondriale Proteostase weitere Informationen. Die Tatsache, dass Proteine an Hsp78 binden,

definiert sie nicht obligatorisch als Substrate, sondern könnte auch andere funktionelle Ursachen für das Chaperon selbst haben. Wie Ssc1 bereits vermuten lässt, könnte das Hsp70 Chaperon sowohl Substrat, als auch Bindungspartner sein. Zur Spezifizierung der gewonnenen Daten wurde daher eine weitere SILAC-basierte massenspektrometrische Studie an Mitochondrien durchgeführt. Da hsp78_{TR} eine signifikant reduzierte Disaggregation für Substrate aufweist, wurde diese Eigenschaft genutzt um eine *in organello* Aggregations- und Disaggregationsanalyse durchzuführen. Hier wurde davon ausgegangen, dass Proteine welche aggregiert und anschließend in Abhängigkeit von Hsp78 aufgelöst werden, für die hsp78_{TR} eine verminderte Disaggregation aufzeigen sollten. Isolierte Mitochondrien wurden identisch zum Substratbindungsexperiment inkubiert. Für dieses Experiment wurden lediglich die beiden Varianten mit Affinitätstag untersucht. Voraussetzung für eine mögliche Disaggregation durch Hsp78 ist die thermo-induzierte Aggregation bzw. Sedimentation in unserem Versuchsaufbau (Abbildung 16). So wurden die bei 25°C inkubierten Proben als Referenz für die Löslichkeit der mitochondrialen Proteine gesetzt. Proteine die unter diesen Umständen im Pellet gefunden wurden, sedimentieren bei der Ultrazentrifugation aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften. Die Identifikation neuer Proteine im Pellet des 42°C Ansatzes ermöglichte nun Rückschlüsse auf die Thermosensitivität dieser Proteine zu ziehen. Gleichzeitig sind diese aggregierenden Proteine potentielle Hsp78-Substrate. Im zweiten Schritt wurde diese Proteinpopulation im Pellet des Disaggregationsexperimentes verfolgt und mit den Daten des 42°C Ansatzes verglichen. Proteine welche eine reduzierte Abundanz aufwiesen, müssen zwangsläufig aufgelöst oder degradiert worden sein. Findet sich in diesem Fall jedoch eine stärkere Abundanz-Reduktion für Hsp78 im Vergleich zu hsp78_{TR}, deutet dies definitiv auf eine Hsp78-Abhängigkeit hin.

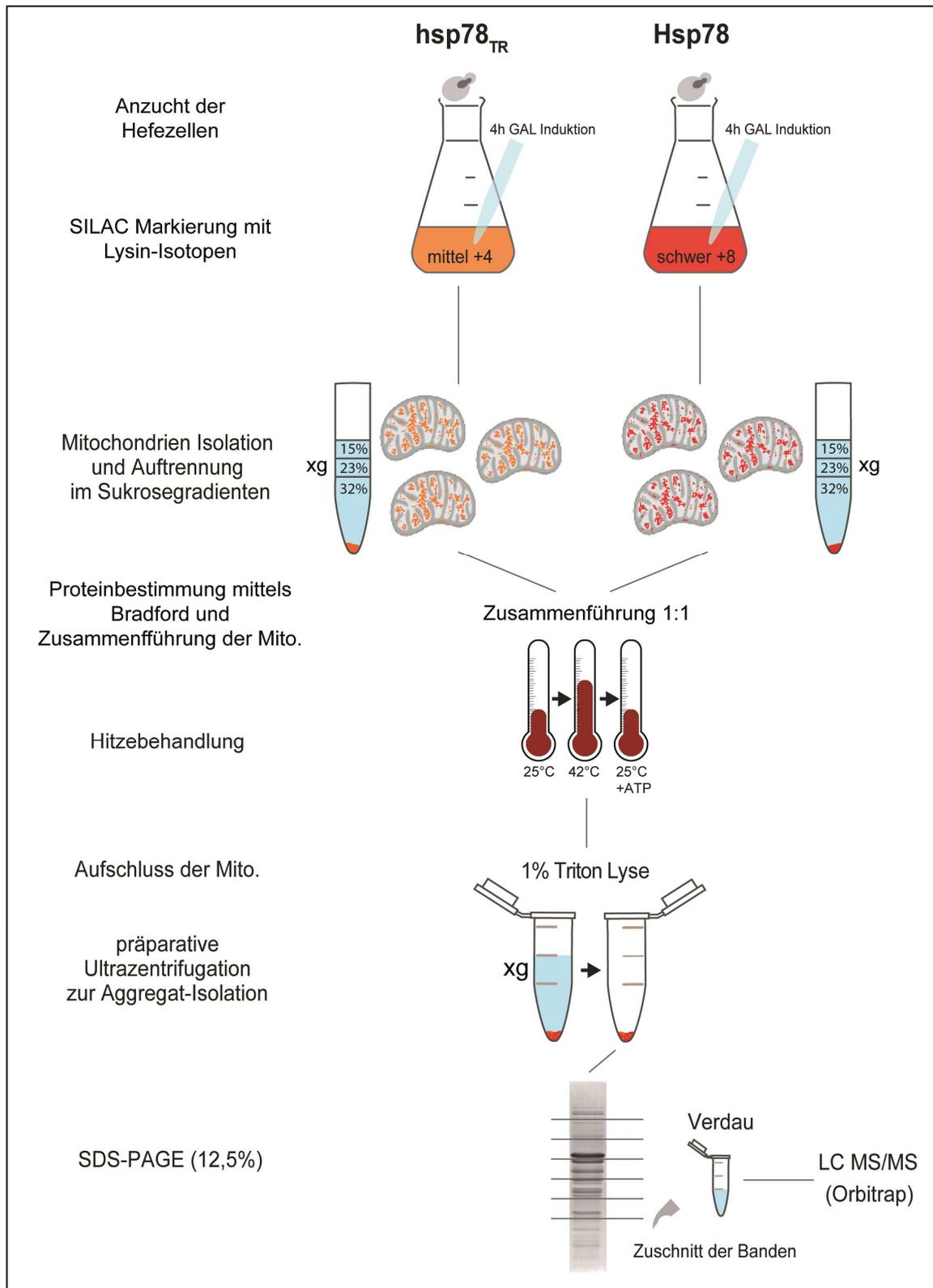


Abbildung 16: Arbeitsablauf Aggregations- und Disaggregationsexperiment

Einige der Proteine sind bereits für ihre Tendenz zur Aggregation bekannt und wurden deshalb nochmals über eine Western Blot Analyse überprüft. Die Proteine Aco1, Ilv2, Pim1, Rip1 und Ssc1 konnten somit als aggregierende Proteine bestätigt werden (Bender et al., 2011). Darüber hinaus zeigt sich für hsp78_{TR} bereits bei 25°C eine leicht erhöhte Sedimentation der genannten Proteine im Vergleich zu Hsp78. Dies deutet auf eine verstärkte Substratbindung durch hsp78_{TR} hin bzw. könnte auch auf eine grundsätzliche Hsp78-Abhängigkeit dieser Proteine hindeuten. Die weitere Analyse der Western Blots zeigt, dass die Proteine Aco1, Pim1, Rip1 und Ssc1 disaggregiert wurden und davon Pim1, Rip1 und Ssc1 eine stärkere Disaggregation für Hsp78 besitzen. Für Ilv2 konnte keine Disaggregation im Western Blot nachverfolgt werden. Mrlp40 wurde als Kontrolle hinzugefügt und sedimentierte als ribosomales Protein bereits unter 25°C (Abbildung 17A-B). Anders als vermutet konnte für größere Proteine keine stärkere Aggregationstendenz detektiert werden (Abbildung 17C).

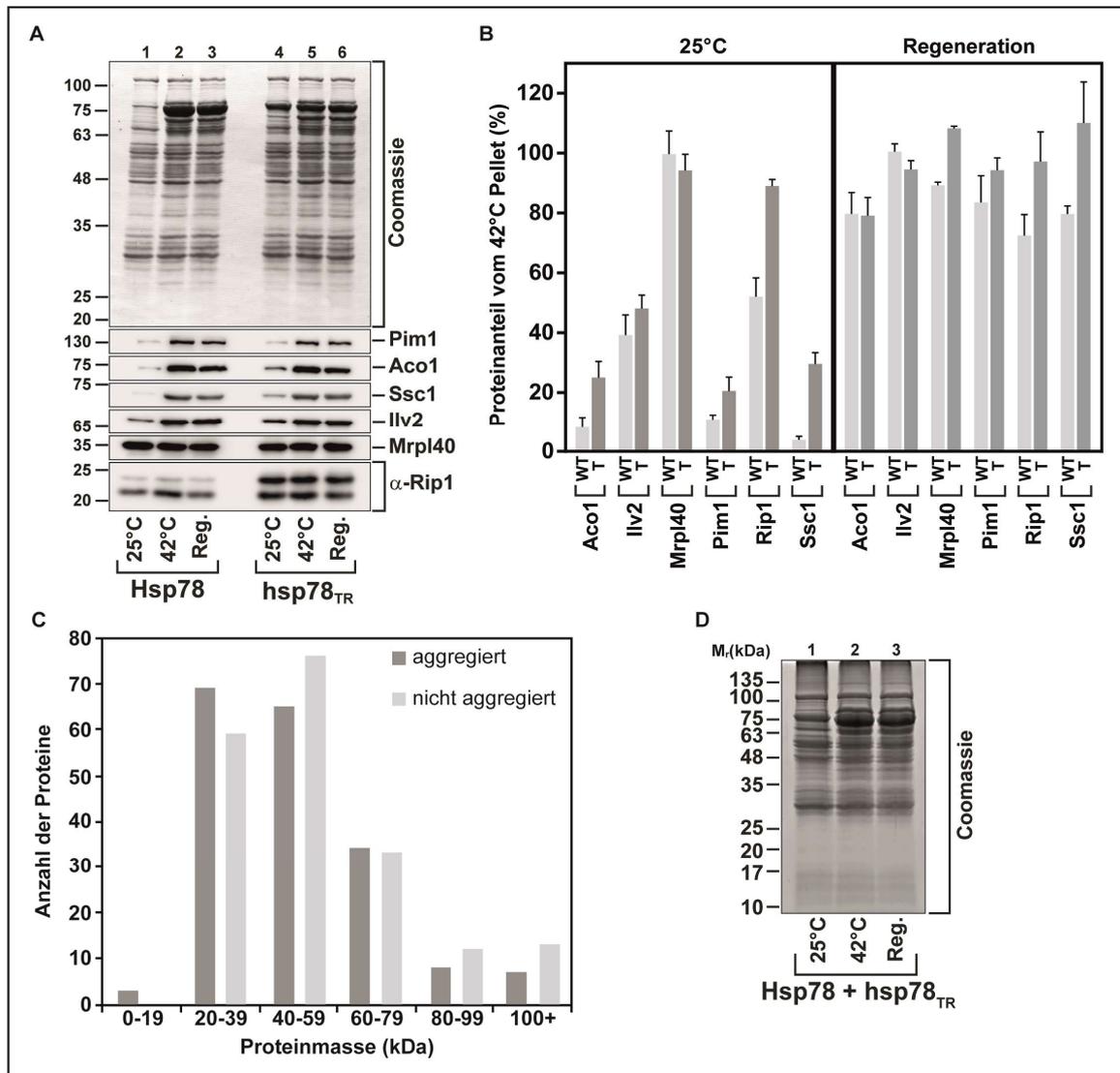


Abbildung 17: Kontrolle individueller Proteine mit quantitativer Auswertung

A, 12,5% SDS-PAGE mit CBB-Färbung (oberes Segment) als Kontrolle und Western Blot gegen verschiedene mitochondriale Proteine (untere Segmente). **B**, Säulendiagramm für die quantitative Auswertung der Western Blot Ergebnisse (siehe B) gemeinsam mit weiteren Daten (nicht dargestellt; n=3). Abgebildet sind die Werte mit Standardfehler für 25°C und nach Regeneration im Verhältnis zu den Signalen bei 42°C. **C**, Histogramm für die Korrelation der Masse von den identifizierten Proteinen (UniProt) mit der Aggregationstendenz (MS Ergebnisse). **D**, 12,5% SDS-PAGE mit CBB-Färbung als Ladekontrolle für die Proben der MS-Messung. Geladen wurden die Pellet-Fractionen von Hsp78 und hsp78_{TR}- im 1:1 Verhältnis.

Aus der Gesamtheit, der in diesem Experiment identifizierten Proteine, waren 205 Proteine anfällig für eine Erhöhung der Temperatur auf 42°C. Diese Proteine wurden im Pellet der 42°C Proben gefunden und waren zuvor bei 25°C nicht sedimentiert. Wiederum wurde für die Hälfte dieser Proteine, nach einstündiger Regeneration, eine Abundanz-Reduktion im Pellet festgestellt (Anhang I). Die logarithmische Darstellung

der Quotienten ergibt im oberen Rechten Sektor des Graphen die gesuchte Proteinpopulation, welche aggregiert und anschließend aufgelöst wird (Abbildung 18). In der Summe wurden 129 Proteine als Hsp78-Substrate im Aggregations- und Disaggregationsexperiment identifiziert.

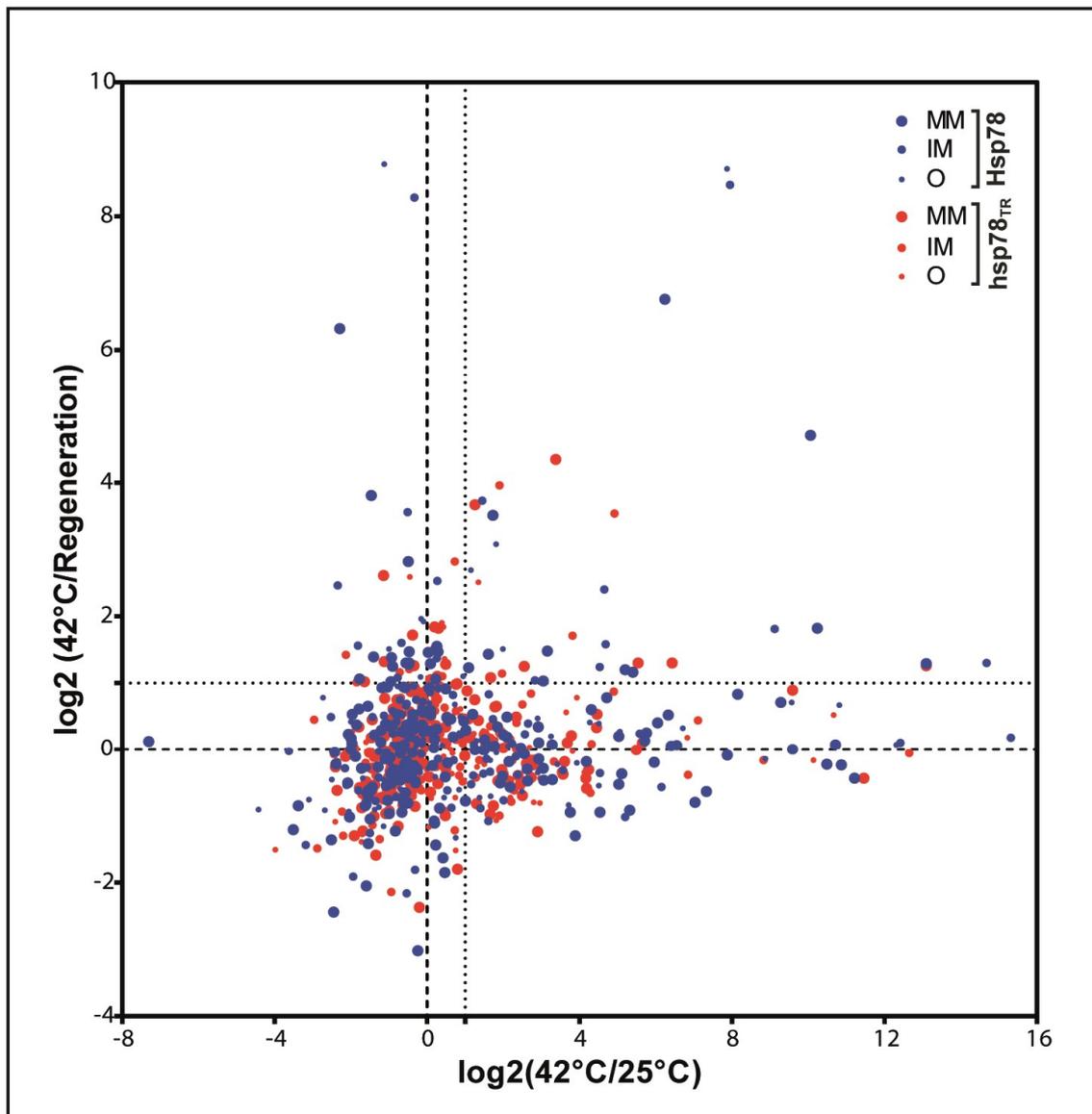


Abbildung 18: Aggregation und Disaggregation in Pellets

Rasterdiagramm der identifizierten Proteine für Hsp78 (blau) und hsp78_{TR} (rot). Die MM-Proteine heben sich durch einen größeren Punktdurchmesser gegenüber den Proteinen aus der IMM und der Gruppe von nicht zugeordneten mitochondrialen Proteinen (O) bzw. Proteinen der äußeren Membran (kleiner Durchmesser) ab. Die Achsen sind als Logarithmus zur Basis 2 definiert. Sie zeigen das Verhältnis der gemessenen Protein-Abundanzen aus den unterschiedlichen Bedingungen. Die Werte basieren auf dem Mittelwert drei unabhängiger Experimente und unabhängigen MS-Messungen. Hierbei zeigen Werte über Null auf der X-Achse die Aggregation von Proteinen an, während Werte über Null auf der Y-Achse die Disaggregation implizieren.

5.5 Hsp78-Einfluss auf mitochondriale Funktionen

Um den Einfluss der Disaggregationsaktivität von Hsp78 im zellulären Kontext einschätzen zu können, wurden weitere Experimente durchgeführt, welche die mitochondriale Funktionalität beleuchten sollten. Hierfür wurden zum einen enzymatische Messungen für zwei MM Proteine durchgeführt, als auch der intramitochondriale ATP-Gehalt bestimmt. In Mitochondrien in denen lediglich das mutierte hsp78_{TR} exprimiert wurde, ist die Reaktivierung von Enzymen nach einem Hitzeschock gemindert. Die Reaktivierung für Hsp78 liegt höher, beträgt aber nur etwas über 20%. Der Unterschied ist für beide Enzyme jedoch signifikant, zwischen Hsp78 und hsp78_{TR} (Abbildung 19A).

Bei Messung des intramitochondrialen ATP-Gehalts, kann ein klarer Abfall des ATPs bei Hitzeschock gemessen werden. Nach zweistündiger Regeneration in ATP-Puffer ist wiederum ein deutlicher Anstieg des ATPs zu verzeichnen. Dieser beträgt sogar mehr als das doppelte des Standardwertes. Vergleicht man die beiden Hsp78-Varianten untereinander, zeigt sich für alle Bedingungen ein durchweg höherer ATP-Gehalt für hsp78_{TR}. Bei Betrachtung der absoluten Werte zeigt sich bei 25°C ein Wert von 2 nM für Hsp78 gegenüber 9 nM für die Mutante. Bei 42°C detektiert man kein ATP für Hsp78 gegenüber 7 nM für hsp78_{TR} und nach Regeneration 14 nM für Hsp78, sowie 20 nM für hsp78_{TR} (Abbildung 19B). Diese absolute Differenz zeigt sich für alle Bedingungen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Mutante einen höheren Standardlevel an ATP besitzt.

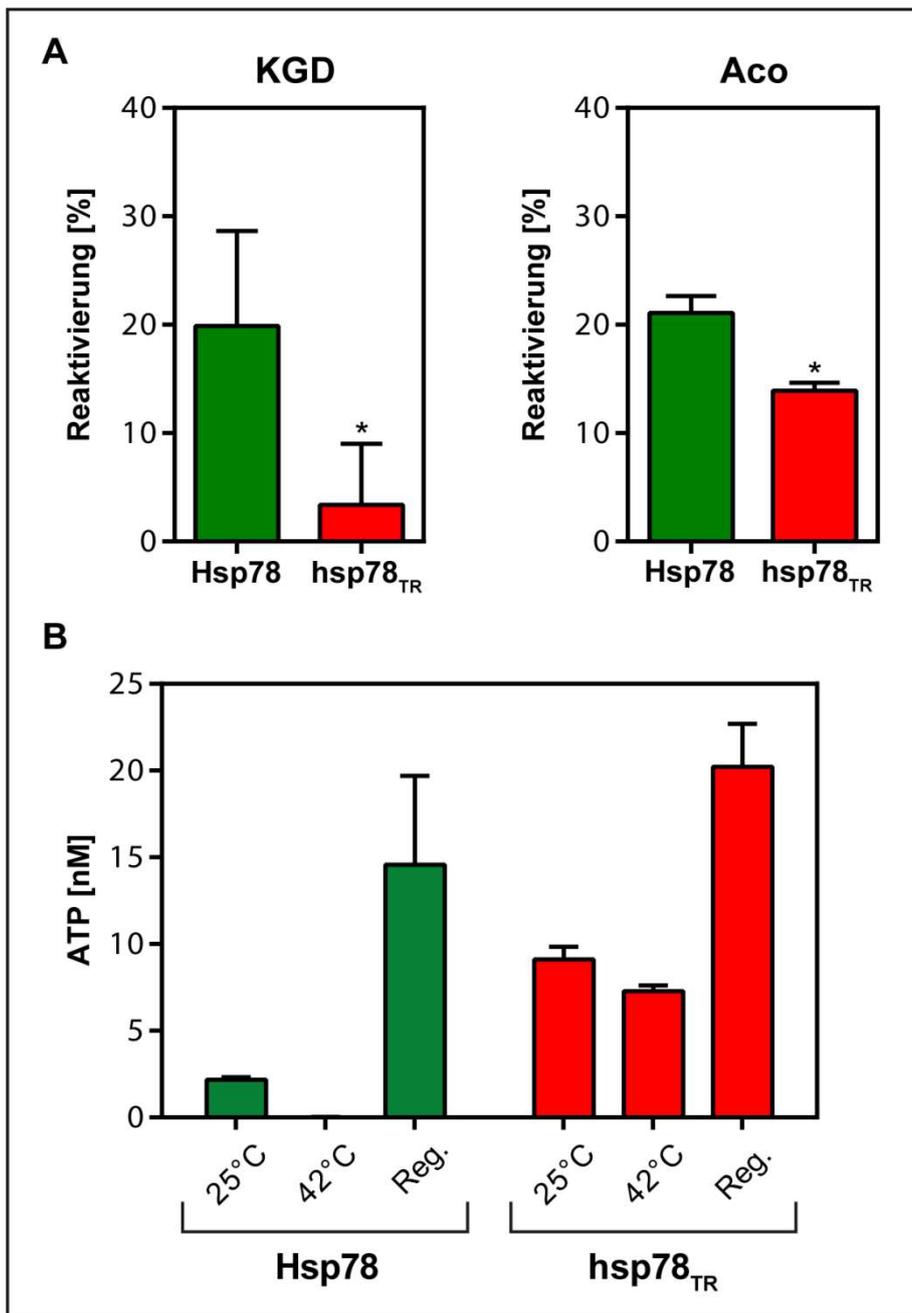


Abbildung 19: Mitochondrialer ATP-Gehalt und Enzymreaktivierung

A, Säulendiagramme für die Enzymreaktivierung durch Hsp78 (grün) und hsp78_{TR} (rot). Abgebildet ist die prozentuale Regeneration der Enzymaktivität von Ketoglutaratdehydrogenase (links) und Aconitase (rechts) durch beide Hsp78-Varianten, nach Inaktivierung durch Hitzestress. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Experimente mit Fehlerbalken, welche den Standardfehler anzeigen. **B**, Säulendiagramme zur enzymatischen Messung des ATP-Gehalts in mitochondrialen Lysaten (je 10µg) von Hsp78 (grün) und hsp78_{TR} (rot). Der Vergleich umfasst die drei Versuchsbedingungen Standard, Hitzestress und nach Regeneration.

5.6 Funktionelle Kategorisierung als Interaktionsnetzwerk

Kombiniert man die angereicherten Proteine aus der Koaufrreinigung, mit den aggregierenden und wieder aufgelösten Proteinen aus dem Aggregations- und Disaggregationsexperiment, erhält man eine Gesamtzahl von 271 Proteinen. Dies entspricht in etwa einem Viertel aller mitochondrialen Proteine. Bei dem Vergleich beider Ergebnisse konnten 41 übereinstimmende Proteine identifiziert werden. Über das Internet-Tool STRING (functional protein association network) können aufgrund experimentell nachgewiesener Proteininteraktionen, Zusammenhänge zwischen den Proteinen visuell dargestellt werden. Finden sich viele Interaktionen innerhalb funktioneller Klassen, deutet dies meist auf einen mechanistischen Zusammenhang hin. So lassen sich die identifizierten Proteine in spezifische Gruppen einteilen und somit deren Funktionen darstellen. Die in Abbildung 20 gewählte Darstellung ist auf interagierende Proteine reduziert und schließt somit alle Proteine aus, welche keinen weiteren Interaktionspartner, außer Hsp78, besitzen. Bei Betrachtung des Interaktionsnetzwerkes wird die Akkumulation von verschiedenen funktionellen Gruppen ersichtlich. Es zeigt sich, dass die mitochondriale Translation mit vielen ribosomalen Proteinen, als auch Translationsfaktoren überrepräsentiert ist. Gleichzeitig finden sich Proteine des Citratzyklus, der oxidativen Phosphorylierung, der ATP-Synthese-Komplex Assemblierung, des Transports, der Aminosäurebiosynthese, der Eisen-Schwefel-Komplex Bindung und Chaperon bedingten Proteinkomplex-Assemblierung. Innerhalb der Gruppen für Translation und des Citratzyklus zeigt sich wiederum eine starke Verbindung der Proteine untereinander, welche im Besonderen für ribosomale Untereinheiten bekannt ist. Einige der Proteine wie Hsp60, Idh2 oder Mrp4/7, welche in beiden Experimenten gefunden wurden, nehmen innerhalb der funktionellen Gruppen eine zentrale Rolle ein. Es wird anschaulich, dass Hsp78 in die Erhaltung vieler mitochondrialer Funktionen involviert ist und mit vielen Proteinen interagiert bzw. sie nach Hitze bedingter Aggregation wieder disaggregiert.

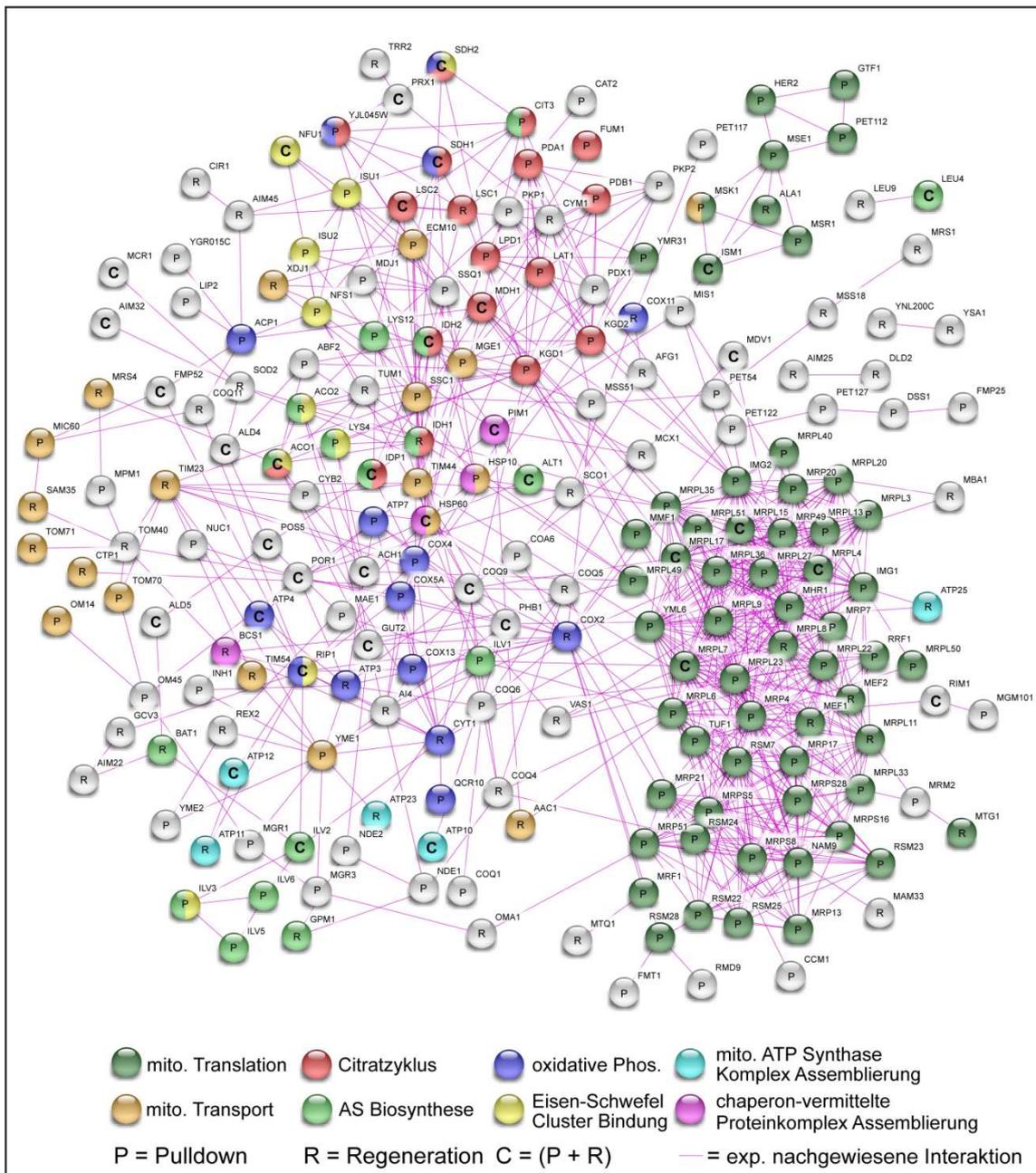


Abbildung 20: Hsp78-Substratnetzwerk

Proteininteraktionsnetzwerk von Hsp78, erstellt durch die Datenbank STRING (functional protein association network). Die Knotenpunkte entsprechen Proteinen und wurden entweder bei der Koaufrreinigung (P), den Aggregations- und Disaggregationsexperimenten (R) oder in beiden Experimenten (C), identifiziert. Die ausgewählten Farben zeigen die Zugehörigkeit zu funktionellen Gruppen. Diese wurden über ihre Annotationen aus der Gruppe mitochondrialer Funktionen (Go annotation), manuell ausgewählt. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die grundlegende Abdeckung der bekannten mitochondrialen Funktionen gelegt. Es sind ausschließlich vernetzte Proteine abgebildet, welche experimentell nachgewiesene Protein-Protein Interaktionen eingehen. Mit 271 Knotenpunkten liegt die statistisch zu erwartende Nummer an Verbindungen bei 213. Dieser Datensatz besitzt 863 Verbindungen und damit einen durchschnittlichen Wert von 6,37 Verbindungen pro Knotenpunkt. Hierbei liegt der p-Wert für die PPI Anreicherung (protein protein interaction p-value) unter $1.0e^{-16}$.

Bei der STRING-Analyse werden zusätzlich zu den funktionellen Clustern auch weitere, in der UniProt-Datenbank hinterlegte Merkmale, auf ihr Vorkommen in dem selektierten Genpool überprüft. Darunter finden sich typische Merkmale wie die zelluläre Lokalisation der Proteine, aber auch Information über spezifische Stoffwechselwege oder Bindungsreaktionen. Diese können über das Merkmal "Molecular Function (GO)" nachverfolgt werden. Diese Analyse stellt heraus das Hsp78 eine hohe Anzahl an Proteine beeinflusst, welche an Bindungsreaktionen beteiligt sind. Von den identifizierten Proteinen sind 121 von 271 für dieses Merkmal ausgeprägt (Abbildung 21).

Molecular Function (GO)			
Stoffwechselweg ID	Beschreibung (Bindung von)	Anzahl	FDR
GO:0005488	Bindungsreaktionen allgemein	121	6.24e-05
GO:0043167	Ionen	94	0.000305
GO:0097159	zyklischen organischen Stoffen	90	6.24e-05
GO:1901363	heterozyklischen Stoffen	90	5.31e-05
GO:0036094	kleinen Molekülen	62	0.00334
GO:0000166	Nukleotiden	60	0.00334
GO:0043168	Anionen	60	0.00339
GO:0048037	Kofaktoren	26	1.1e-07
GO:0050662	Koenzymen	18	1.22e-05
GO:0051536	Eisen-Schwefel-Clustern	13	4.04e-07
GO:0050660	Flavin-Adenin-Dinukleotiden	10	1.22e-05
GO:0051539	4 Eisen-4 Schwefel-Clustern	7	0.00147
GO:0051537	2 Eisen-2 Schwefel-Clustern	5	0.00978

Abbildung 21: Übersicht der STRING-Analyse für Bindungsreaktionen

Auflistung der durch STRING nach UniProt (Molecular Function (GO)) prozessierten und angereicherten Bindungstypen für den gesamten Genpool. Abgebildet ist die Information über den Stoffwechselweg (Stoffwechselweg ID), die Beschreibung der Art des Bindungstyps, der Anzahl der aus dem Genpool zugeordneten Proteine und die FDR (False Discovery Rate).

5.7 Ssc1 Phosphorylierungsstudie

Um potentielle Phosphorylierungsstellen eines spezifischen Proteins zu identifizieren, wurde vorab eine Homologie-Analyse von einigen bekannten Modelorganismen bzw. Homologen Proteinen aus dem gleichen Organismus durchgeführt. Die Übereinstimmung bestimmter Aminosäuren bzw. Aminosäuremuster kann Informationen über eine zugrunde liegende Konservierung dieser Sequenzen liefern. Beim Vergleich der Aminosäuren an Position Thr137, fand sich weder für das zytoplasmatische Ssa1 in Hefe eine Konservierung, noch für die anderen aufgeführten Modelorganismen. Im Falle des Thr330 zeigte der Vergleich

eine partielle Konservierung, da in *A. thaliana* ein Threonin und in *D. melanogaster*, sowie in *E. coli*, ein Serin an dieser Position vorzufinden ist (Abbildung 22).

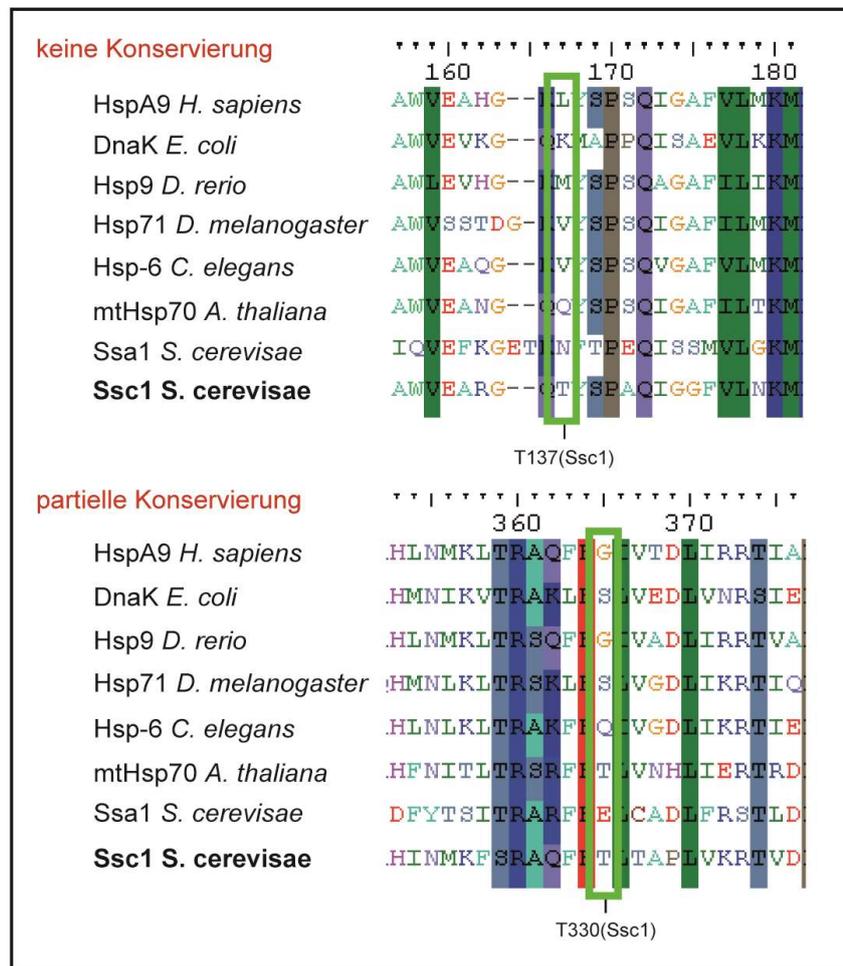


Abbildung 22: Ssc1 Sequenzvergleich

Homologievergleich für die potentiellen Phosphorylierungsstellen an Ssc1, erstellt mit BioEdit. Abgebildet sind die beiden Positionen T137 und T330 mit den flankierenden Sequenzen verschiedener Modellorganismen und weiteren Hsp70 Varianten. Die Farbhinterlegung deutet auf eine Konservierung der Aminosäuren hin.

Bei der Betrachtung der Ssc1 Proteinoberfläche über das Tool Swiss-PdbViewer lassen sich in der räumlichen Nähe der beiden relevanten Threonine, jeweils hydrophobe Regionen lokalisieren (Abbildung 23 Vergrößerung). Gleichzeitig sind beide Positionen für den Angriff einer Kinase bzw. Phosphatase äußerlich exponiert. Die Struktur wurde in einer ATP-gebundenen Konformation unter Zuhilfenahme einer DnaK (*e. Coli*) Leitstruktur modelliert. Besonders die Position Thr330 liegt günstig um einen strukturellen Einfluss auf die hydrophobe Oberfläche zu haben. Bei genauerer Betrachtung der Schnittfläche aus der ATPase-Domäne (blau) und dem C-

terminalen Deckel (rot) wird auch ersichtlich, dass diese Strukturen den C-terminalen Deckel umfassen (Abbildung 23 Gesamtstruktur).

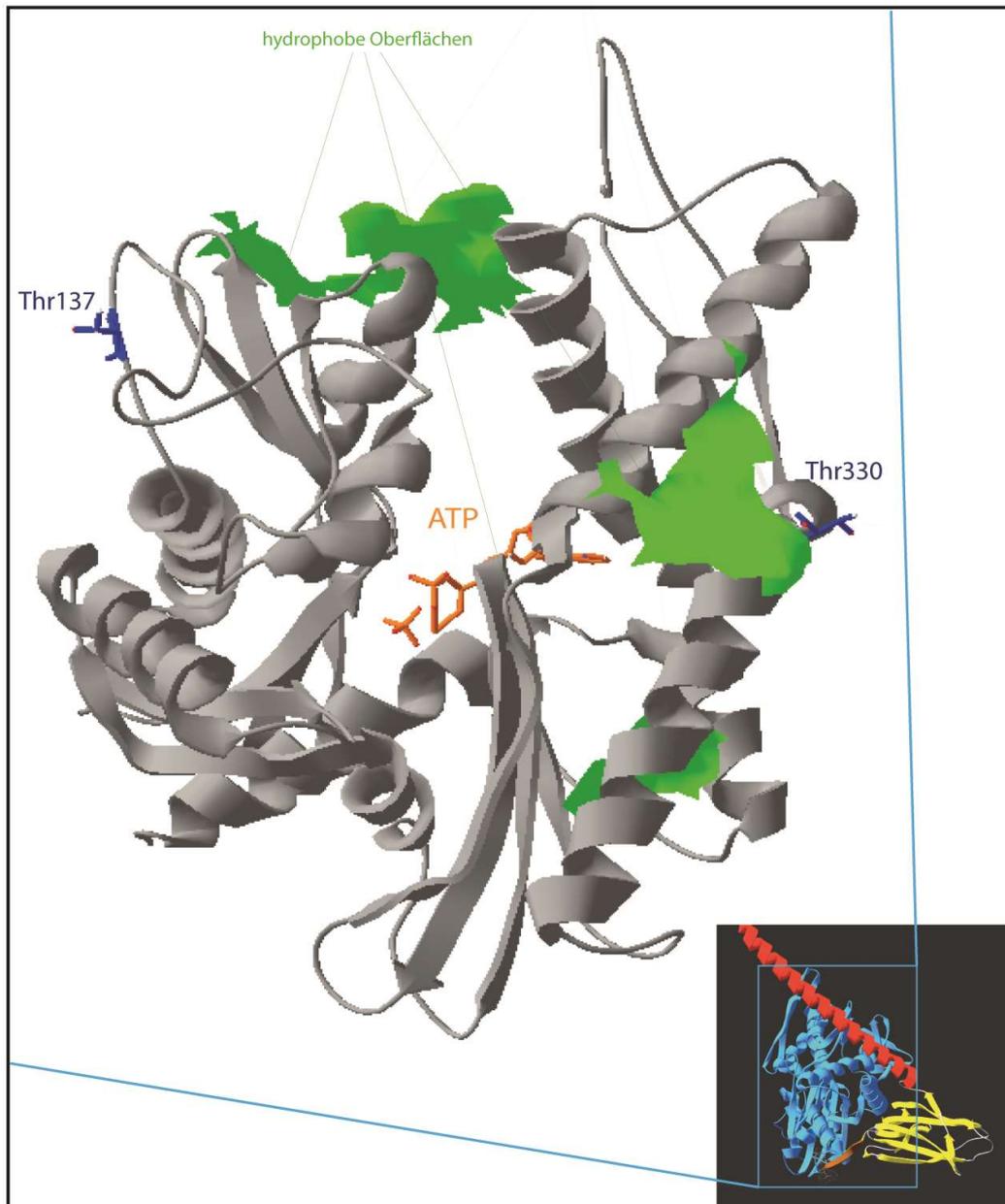


Abbildung 23: Hsp78-Struktur und hydrophobe Oberflächen

Darstellung der Ssc1-Proteinstruktur mit vergrößertem Ausschnitt der ATPase-Domäne in ATP-gebundenen Zustand. In der Vergrößerung sind die hydrophoben Flächen (grün) in unmittelbarer Nähe zu den ebenfalls markierten Phosphorylierungsstellen (blau). Im kleinen Ausschnitt sind die ATPase-Domäne (blau), der Linker im Mittelsegment (braun), Substratbindungsdomäne (gelb) und der C-terminale Deckel (rot) dargestellt. Die Abbildung wurde mittels Swiss PDB Viewer erstellt. Es handelt sich um modellierte Proteinstrukturen.

Zur Analyse der Phosphorylierung wurden mehrere Experimente durchgeführt. Da es sich bei der verwendeten Ssc1 Variante um einen genomischen Tag mit Polyhistidin-

Sequenz handelt, wurde zuerst eine Ni-NTA Affinitätschromatographie durchgeführt, um das Zielprotein zu isolieren. Hierbei wurden Phosphatasehemmer eingesetzt um eine mögliche Dephosphorylierung des Ssc1 Proteins in den Lysaten zu verhindern. Obwohl diese Aufreinigung aus isolierten Mitochondrien erfolgte, könnten Phosphatasen des Intermembranraums oder externe Verunreinigungen aus dem Zytoplasma bzw. anderen Zellkompartimenten zu einem Verlust der Modifikation führen. Die Aufreinigung ist grundsätzlich gelungen, jedoch scheinen die Eluate nicht ausschließlich Ssc1 zu beinhalten. Die Immunodetektion gegen Ssc1 zeigt jedoch auch für die anderen Banden Signale. Hier wäre es möglich, dass Ssc1 zerfällt bzw. degradiert wird und deshalb weitere Signale in den Eluatfraktionen (E1 - E2) auftreten (Abbildung 24).

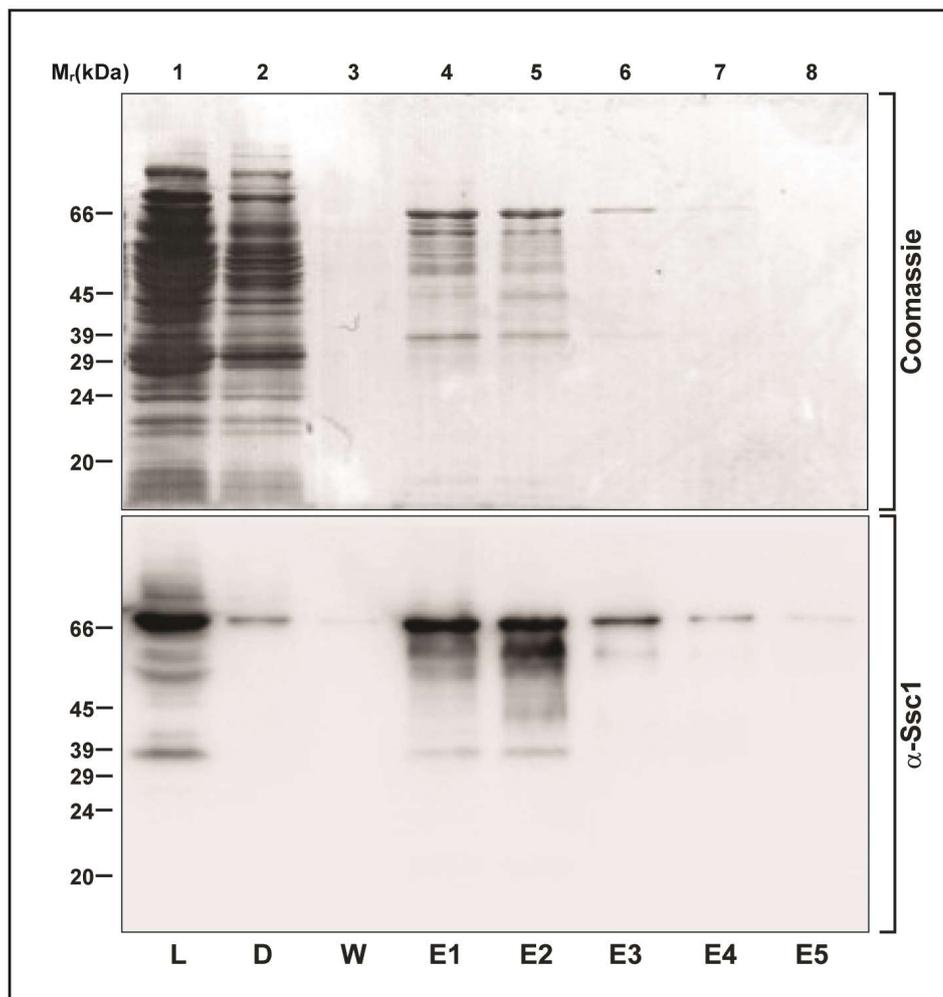


Abbildung 24: Ssc1 Affinitätsaufreinigung

Abbildung einer 12,5% SDS-PAGE für die Ni-NTA Affinitätsaufreinigung von Ssc1. Dargestellt sind verhältnismäßige Proteinmengen für das Lysat (L), den Durchfluss (D), den letzten

Waschschrift (W) und fünf aufeinanderfolgende Eluatfraktionen (E1-E5). Im oberen Segment ist eine CBB-Färbung dargestellt, während im unteren Segment ein Western Blot gegen Ssc1 abgebildet ist.

Anschließend wurde eine Phosphothreonin-Immunodekoration über Western Blot für mitochondriale Lysate, sowie für das aufgereinigte Ssc1 durchgeführt. Die Detektion von Phosphothreonin hängt von der Phosphorylierung des Zielproteins ab. Der Western Blot zeigt trotz BSA-Blockierung ein starkes Hintergrundsignal. Dennoch können in den Lysaten verschiedene phosphorylierte Proteine detektiert werden, auch wenn das Signal nicht kontinuierlich ist. Auf der Höhe der Ssc1-Bande (vgl. Abbildung 24), konnte kein Phosphothreonin identifiziert werden (Abbildung 25A). Zusätzlich wurde für eine genauere Detektion die Phosphothreonin-Immunodekoration für das aufgereinigte Protein als 2-dimensionale Variante, mit vorheriger isoelektrischer Fokussierung, durchgeführt. Die Isoelektrische Fokussierung trennt die verschiedenen Ssc1 Varianten mittels eines pH-Gradienten auf. Bei einer Phosphorylierung sollte ein Versatz zu geringeren pH-Wert erfolgen. Es kann auch hier keine dem Ssc1 Protein entsprechende Bande, auf dem α -pThreonin Western Blot festgestellt werden. Eine nachträgliche Immunodekoration gegen Ssc1 weist jedoch ein Muster aus 4 verschiedenen Ssc1 Spezies im niedrigeren pH-Bereich nach (Abbildung 25B).

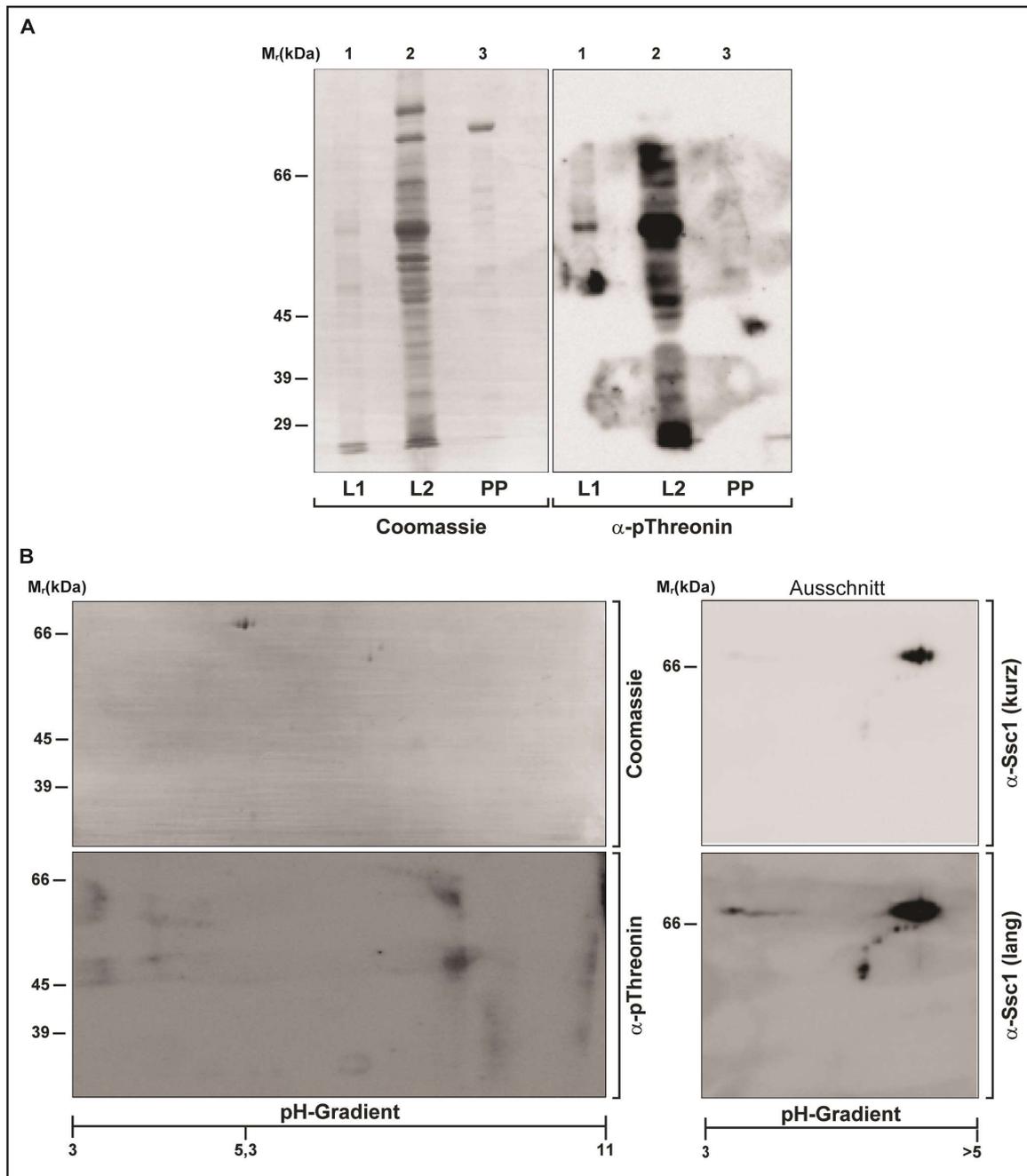


Abbildung 25: pT-Blot und 2D-PAGE

A, 12,5% SDS-PAGE für 2 μg Zelllysate (L1), 50 μg mitochondriales Lysat (L2) jeweils aus Hefezellen und 2 μg isoliertes Ssc1 Protein (PP). Im linken Segment ist eine CBB-Färbung und im rechten Segment ein Western sBlot gegen phosphoryliertes Threonin dargestellt. **B**, 2D-PAGE für 10 μg isoliertes Ssc1-Protein. Im linken Segment sind eine CBB-Färbung (oben) und eine gegen phosphoryliertes Threonin gerichtete Immunodekoration (unten) abgebildet. Im rechten Segment sind zwei Ausschnitte eines Western Blots gegen Ssc1 mit unterschiedlichen Detektionszeiten (kurz/lang) dargestellt. Es handelt sich um den linken Abschnitt (pH 3 bis >5), der im linken Segment abgebildeten Gele.

Aufgrund der geringen Sensitivität von Western Blots für die unspezifische Detektion von Phosphorylierungen und aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse aus der 2D-

Analyse, wurden weitere Detektionsmethoden angeschlossen. Der Einsatz von radioaktivem ^{33}P -ATP zur Markierung von Proteinen dient der sensitiven Detektion von Phosphat. Unter geeigneten Bedingungen wird dieses in die mitochondriale Matrix transportiert und in die entsprechenden Proteine inkorporiert. In verschiedenen Testexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine geeignete Inkubationszeit mit dem ^{33}P -Isotop zwischen 30 Minuten und 120 Minuten liegt (Abbildung 26A).

In Anschluss wurde für die mitochondrialen Lysate durch Überlagerung aus radioaktiver-Exposition, CBB-Färbung und α -Ssc1 Immunodekoration, der Phosphorylierungsstatus untersucht. Hierbei wurden Lysate aus Wildtyp-Mitochondrien und Ssc1-6xHis-Mitochondrien verglichen. Unter Verwendung eines SDS-PAGE-Gradienten können auch kleinere Masseunterschiede aufgelöst werden. Sowohl bei der CBB-Färbung, als auch bei der Immunodekoration gegen Ssc1, zeigt sich ein geringer Versatz der Ssc1-6xHis Band hin zu einer größeren Masse. Da auch in der Immunodekoration eine markierte Bande im Massebereich von knapp über 70 kDa detektiert wird, könnte von einer Ssc1 Phosphorylierung ausgegangen werden. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich jedoch für diese Bande kein Versatz zwischen beiden Varianten (Abbildung 26B).

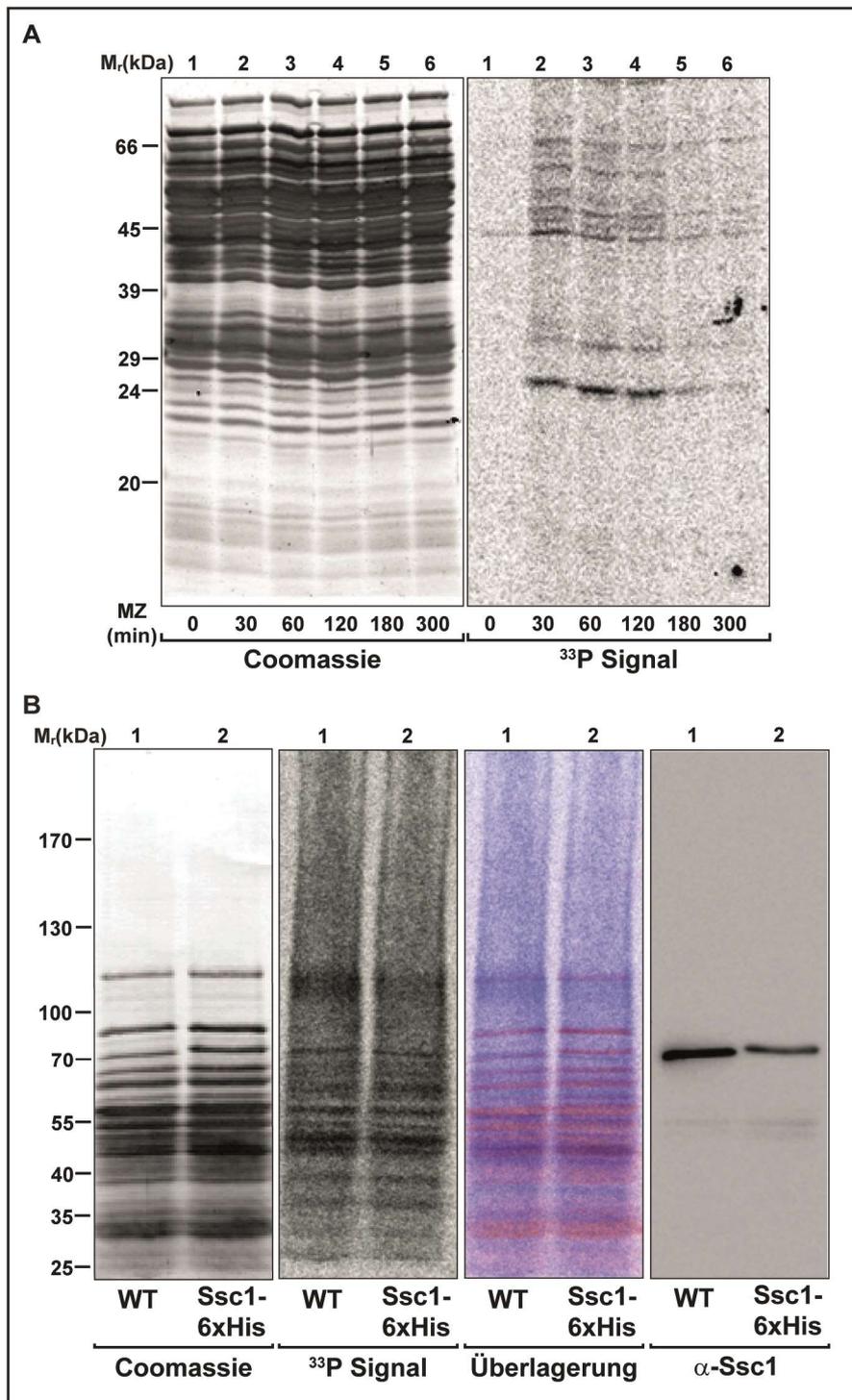


Abbildung 26: ³³P-Isotopenmarkierung von Mitochondrien und Lysaten

A, Darstellung der Zeitabhängigkeit für die ³³P-Isotopenmarkierung von isolierten Mitochondrien. Abgebildet sind pro Spalte je 50 µg mitochondriales Lysat in einer 12,5% SDS-PAGE mit CBB-Färbung (links) und radioaktiver Detektion (rechts). Es wurden sechs verschiedene Markierungszeiten (MZ) getestet. **B**, Abbildungen für die Isotopenmarkierung von mitochondrialen Lysaten mit Ssc1-Detektion und Massenverschiebung für zwei verschiedene Ssc1-Varianten. Dargestellt sind von links nach rechts die CBB-Färbung, das detektierte radioaktive Signal, eine Überlagerung beider vorherigen Abbildungen und ein gegen Ssc1 gerichteter Western Blot.

Letztlich wurde das aufgereinigte Ssc1-6xHis massenspektrometrisch analysiert. Hierbei wurden die eingesetzten Mitochondrien vor der Isolation des Zielproteins unterschiedlich behandelt. Es wurden unbehandelte Mitochondrien mit Proben aus 30-minütigen Hitzestress bei 42°C und zwei mit Menadion-behandelten Ansätzen (0,4/ 1 mM) verglichen. Trotz einer guten Sequenzabdeckung zwischen 70% und 83%, konnten unter allen Bedingungen keine Phosphorylierungen nachgewiesen werden. In der zweiten Analyse sind für die Position Thr137 eine Zahl von 120 Peptiden und für Thr330 insgesamt 169 Peptide für eine Phosphorylierung negativ detektiert worden. Es sind jedoch insgesamt 6 verschiedene Acetylierungen detektiert worden. Es handelt sich hierbei um drei Aminosäurepaare an den Positionen Lys50/53, Lys150/152 und Lys544/546 (Abbildung 27). Diese könnten, da sie gepaart auftreten, möglicherweise eine Art der Regulation darstellen.



Abbildung 27: MS-Ergebnisse für die posttranslationale Modifikation von Ssc1

Abgebildet sind zwei Bildkopien aus der MS-Software, mit der Zusammenfassung der Ssc1-MS-Analyse. Dargestellt ist die Sequenzabdeckung und die identifizierten Sequenzabschnitte bzw. Peptide. Zusätzlich sind die identifizierten Modifikationen A (Acetylierung) und O (Oxidation) vermerkt. Analyse ohne äußere Stressfaktoren (oberes Segment) und Ssc1-Analyse nach Stress (unteres Segment). Darunter jeweils die Quantifizierung der relevanten Peptide für die potentielle Phosphorylierung.

6. Diskussion

6.1 Proteinaggregation in isolierten Mitochondrien

Um die bioinformatische Komplexität deutlich zu vermindern wurde für die massenspektrometrischen Analysen mit isolierten Mitochondrien gearbeitet. Hierdurch ergibt sich eine deutliche Reduktion der bioinformatischen Datenmenge, die im Vergleich zu Gesamtzellextrakten generiert werden würde. Zusätzlich lässt sich durch bereits vorliegende Informationen über die Charakteristik von mitochondrialen Proteinen, deren Zuordnung nochmals verbessern. Bereits einfache Sequenzinformationen, wie das Vorhandensein einer mitochondrialen Zielsequenz, aber auch funktionelle Informationen über die Zugehörigkeit zu einem der spezifischen Stoffwechselprozess, lassen anhand vorliegender Informationen über Protein-Datenbanken oder spezifischer Publikationen, eine klare Einteilung der identifizierten Proteine zu. Trotzdem finden sich in den untersuchten Proben auch andere Proteine, wie beispielsweise aus dem Zytoplasma oder dem Endoplasmatischen Retikulum. Die intrazelluläre Dynamik, welcher Mitochondrien unterliegen, aber auch die Kooperation mit anderen Organellen wie dem Endoplasmatischem Retikulum (Ermes-Komplex), führen zu Verunreinigungen bei der Isolation.

6.2 Hsp78-ATPase-Mutante als Substratfänger

Zur Verwirklichung der Substratidentifikation wurde in Analogie zu einer bereits bekannten Studie am bakteriellen Hsp100 Protein ClpB, eine ATPase-defiziente Hsp78-Variante hergestellt (Weibezahn et al., 2003). Diese wurde als hsp78_{TR} bezeichnet und soll damit die stärkere Bindung ("trapping") an potentielle Substrate unterstreichen. Zuerst wurde diese Mutante auf ihre relevanten biochemischen Eigenschaften hin getestet. Die in dieser Variante eingebrachten Punktmutationen in den Walker B-Motiven der beiden ATPase-Domänen konnten die ATP-Hydrolyse unterdrücken. Parallel wird die ATP-Bindung durch die Walker A-Motive erhalten (Hanson and Whiteheart, 2005). Der jeweilige Aminosäureaustausch von Glutamat gegen Glutamin sollte dabei im Bezug auf das räumliche Ausmaß einen möglichst analogen Austausch garantieren. Gleichzeitig wurde jedoch durch die Wegnahme der negativen Ladung ein ähnlicher Effekt wie in einer typischen Alanin-Substitution

erreicht (Hanson and Whiteheart, 2005). Die ATPase-Aktivität des Hsp78 konnte stark reduziert werden, jedoch nicht wie im Falle der Alanin-Substitution für die ClpB-Mutante komplett inhibiert werden (Mogk et al., 2003). Es kann angenommen werden, dass der Austausch gegen ein Glutamin zwar keine absolute ATPase-Inhibition vermittelt, jedoch durch seine analoge räumliche Ausdehnung, keine weiteren Einflüsse auf die unmittelbare Proteinstruktur nimmt. Essentiell ist hierbei die Wegnahme der negativen Ladung, welche für die Bindung von Wassermolekülen zuständig ist. Diese wiederum induzieren durch einen nukleophilen Angriff die finale ATP-Hydrolyse (Hanson and Whiteheart, 2005).

Wie bereits in anderen Studien bestätigt, konnte anschließend mit Hilfe von importierten Reporter-Konstrukten gezeigt werden, dass Hsp78 durch Hitze aggregierte Substratproteine wieder disaggregieren kann (von Janowsky et al., 2006). Im Gegensatz dazu war die generierte hsp78_{TR}-Mutante nicht im Stande diese Aggregate aufzulösen. Durch den ATPase-Defekt ist das Protein in einer Konformation festgesetzt und kann die für einen Entfaltungsprozess nötigen Konformationsänderungen nicht sequentiell durchlaufen (Deville et al., 2017). Passend zu diesen Ergebnissen konnte der Einfluss des ATPase-Defizits auf die erworbene Thermotoleranz von Hefezellen nachverfolgt werden. Eine erhöhte Thermosensitivität wurde bereits in einer anderen Studie als typische Hsp78-Störung definiert (Schmitt, 1996). Unter Verwendung eines weiteren Reporter-Konstrukts zur Untersuchung der Degradation, konnte für nicht aggregierende Proteine kein Einfluss auf die Degradation festgestellt werden. Man sollte annehmen das Hsp78 keinerlei Rolle bei der Vermittlung dieser Proteine an Pim1 spielt, da das eingesetzte Konstrukt nicht aggregiert. Dies steht jedoch in Widerspruch zu Beobachtungen, welche eine generelle Hsp78-Einflussnahme auf die Degradation von cytb2-DHFR-Reporterkonstrukten durch Pim1 aufzeigen (Röttgers et al., 2002). Diese Degradationsuntersuchungen wurden mit hohen Substratmengen durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit, lediglich radioaktiv markierte Reporterkonstrukte eingesetzt. Diese liegen nach *in vitro* Translation in einer deutlich geringeren Konzentration vor und konnten in der CBB-Färbung nicht nachgewiesen werden. Es ist wahrscheinlich, dass aufgrund der geringen Substratsättigung keine Hsp78-Abhängigkeit vorliegt. Folglich scheint eine Hsp78-Einflussnahme auf die Pim1-Degradation erst unter Stressbedingungen

(Substratsättigung) notwendig. Ob dieser Transfer einen direkten Kontakt zwischen Disaggregase und Protease benötigt, bleibt unklar. Trotzdem sollte hierbei berücksichtigt werden, dass ähnlich wie für andere Proteasen der Clp Familie, eine entfaltete Leitstruktur für die Bindung des Substrates an Pim1 benötigt wird (von Janowsky et al., 2005).

Mit dem Wissen über die typische Struktur von Hsp100 Proteinen, welche in der aktiven Form hexamere Komplexe ausbilden, wurde zudem eine Strukturanalyse mittels BN-PAGE für isolierte Mitochondrien durchgeführt (Schirmer et al., 1996). Hsp78-Monomere formen Dimere und Trimere, welche sich wiederum zu Hexameren zusammensetzen können. Auch diese Ergebnisse sind im Einklang mit den bereits bekannten Daten (Krzewska et al., 2001; Leidhold et al., 2006). Ein interessanter Punkt hierbei ist die Komplexstabilität, denn während die Ausbildung von Hexameren die Substratbindung begünstigt, vermittelt der Zerfall dieser die Substratfreisetzung (Haslberger et al., 2008). Beide Vorgänge sind somit für eine aktive Disaggregation von Proteinaggregaten nötig. Beim direkten Vergleich von Hsp78 und hsp78_{TR} zeigen sich ähnliche Grundstrukturen. Trotzdem konnte durch eine Behandlung mit verschiedenen Salzkonzentrationen, sowohl mit Hilfe der BN-PAGE, als auch über eine Größenausschlusschromatographie, eine höhere Stabilität für die Mutante festgestellt werden. Die Bildung stabilerer Oligomere könnte durch das ATPase-Defizit in der Mutante hervorgerufen werden. Es wurde bereits festgestellt das die Oligomerisierung mit einer Erhöhung der ATP-Umsatzrate einhergeht (Krzewska et al., 2001). Die stärkere Oligomerisierung könnte eine Art Kompensation darstellen. Zusätzlich konnten für die Mutante auch noch weitere Formationen identifiziert werden, welche größeren Komplexen entsprechen, als den typischen Hexameren. Das könnte durch die stabilisierte Bindung von Substratproteinen an die Mutante hervorgerufen werden oder in der Formation von Heptameren begründet sein, die bereits für ClpB nachgewiesen wurden (Kim et al., 2000). Aufgrund der höheren Substrataffinität im ATP-gebundenen Zustand, sollte die Mutante im Stande sein Substrate fest zu binden. Dieser Zustand sollte durch die gestörte ATP-Hydrolyse verstärkt werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Mutante eine höhere Bindungsdauer aufweist, da die Substratfreisetzung durch eine höhere Komplexstabilität verzögert wird. Die *in vitro* Experimente zur Löslichkeit und Substratbindung durch Hsp78, in welchen die Bindung von

aggregierten Proteinen an beide Protein-Varianten getestet wurde, bestätigen diese Eigenschaften. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass hsp78_{TR} eine höhere Tendenz zur Selbstaggregation besitzt. Das hsp78_{TR} zeigte definitiv einen höheren Anteil an unlöslichem Protein, dies könnte durch Fehlfaltung, aber auch durch die Bindung möglicher Substratproteine in der mitochondrialen Ausgangsprobe, hervorgerufen werden. Weitere Studien sind nötig um festzustellen in wie fern die Proteinstabilität durch die beiden Mutationen im direkten Vergleich zum Wildtyp Protein verändert ist. Hierbei könnten CD-Messungen an isolierten Proteinen Hinweise liefern. Darüber hinaus könnte man weitere Bindungsexperimente mit bekannten Substratproteinen durchführen.

Es konnte gezeigt werden, dass die hsp78_{TR}-Mutante ein ATPase-Defizit aufweist. Es bildet ähnliche Proteinkomplexe aus wie der Wildtyp, jedoch mit einer erhöhten Stabilität. Diese Unterschiede zeigen sich schließlich auch bei der *in organello* Untersuchung typischer Prozesse und besitzen Einfluss auf die *in vivo* Thermotoleranz, welche typischerweise durch Hsp78 vermittelt werden. Die neu generierte hsp78_{TR}-Mutante scheint in ihren Eigenschaften, genau die Charakteristika zu besitzen, welche für die Bindung von Substratproteinen durch ein Hsp100 Protein benötigt werden.

6.3 Substrat Koaufrreinigung

Die hergestellte ATPase-Mutante wurde verwendet um mittels einer Koaufrreinigung Substratproteine zu binden und diese anschließend über eine MS-Analyse zu identifizieren (Rei Liao and van Wijk, 2019). Es zeigt sich, dass die identifizierten Proteine hauptsächlich mitochondrialen Ursprungs sind und der Hauptteil der Proteine aus der mitochondrialen Matrix stammt, da dort die funktionelle Lokalisation des Hsp78-Proteins liegt. Zudem ist eine erhöhte Matrix-Protein-Bindung für die hsp78_{TR}-Mutante bei Standardbedingungen gegeben, welches den "trapping"-Effekt widerspiegelt. Dennoch wurden auch nicht mitochondriale Proteine identifiziert. Es ist bekannt, dass bei der Isolation von Mitochondrien Kontaminationen aus anderen membranumschlossenen Kompartimenten auftreten. In unserem Beispiel wurden Proteine aus dem Golgi, Lysosomen, aber im Besonderen auch aus dem endoplasmatischen Retikulum gefunden. Dies ist aufgrund von Membraninteraktionen bzw. spezifischen Prozessen, welche die Interaktion

verschiedener Zellorganellen benötigen, unumgänglich. Der sogenannte ERMES-Komplex stellt hierbei ein mittlerweile gut erforschtes eigenes Forschungsgebiet in *S. cerevisiae* dar (Kundu and Pasrija, 2020). Darüber hinaus wird bei der Isolation von Mitochondrien eine Zellyse durchgeführt, bei welcher es durch den Zusammenbruch der Zellstruktur zu untypischen Membraninteraktionen kommen kann. Bei den anschließenden Zentrifugationszyklen, können dann mögliche Membrankontakte erhalten bleiben oder aber zufällig Vesikel oder andere Membranstrukturen, mit ähnlicher Dichte wie der Mitochondrien auftreten. Hierdurch würde die mitochondriale Fraktion verunreinigt. Bei der Einordnung der intramitochondrialen Zusammensetzung zeigt sich jedoch auch, dass nicht ausschließlich Matrix-Proteine identifiziert wurden. Prinzipiell ist jedoch auch die Interaktion mit Proteinen der inneren Membran möglich. Fehlgefaltete Membranproteine könnten so auch über Hsp78 zurückgefaltet werden. Sinnvoll wäre dabei eine Kooperation mit dem Oxa-Komplex oder möglichen anderen Proteinen, welche die Membraninsertion unterstützen (Stiller et al., 2016). Es ist auch möglich, dass Proteine nach der Lyse der Mitochondrien in Kontakt treten, welche normalerweise keine Interaktion eingehen könnten. Hierbei könnten typische Domänen homologer Proteine aus den bereits genannten Organellen oder dem Zytoplasma verantwortlich sein. So konnte beispielsweise das zytoplasmatische Ssa1 identifiziert werden, welches möglicherweise aufgrund seiner Homologie zu Ssc1 gebunden wurde, jedoch kein natürliches Substrat bzw. einen Interaktionspartner darstellt. Um grundsätzlich alle unspezifisch aufgereinigten Proteine auszuschließen wurde eine Probe ohne Polyhistidin-Tag hinzugefügt und die dort gemessenen Protein-Abundanzen für die anderen Proben berücksichtigt.

Für die Analyse der MS-Daten wurde unter anderem eine Gesamtsumme aller Protein-Abundanzen berechnet. Diese Summe zeigt eine deutliche Steigerung für die Hitze behandelten Proben bei 42°C. Hier kann angenommen werden, dass das wildtyp Hsp78 in der Lage ist, sich durch konformationelle Änderungen, an die veränderten Bedingungen anzupassen. So könnten möglicherweise die Oligomerisierung zu den aktiven Hexameren gefördert werden, um die Bindung von Substraten zu steigern. Desweiteren könnte auch durch andere Proteine oder Chaperone wie Ssc1, welche Einfluss auf die ATPase-Aktivität von Hsp78 haben könnten, eine Aktivierung unter Hitzestress erfolgen. Für hsp78_{TR} zeigen sich im

Vergleich für alle drei Versuchsbedingungen sehr ähnliche Abundanz-Summen. Das Protein scheint in einer Art aktiven Form gefangen zu sein, die eine erhöhte Bindung unter Standardbedingungen gewährleistet, aber nicht in der Lage seine Aktivität zu verändern. Es wurde bereits für Hsp104 gezeigt, dass die Bindung von Substraten am C-terminalen-Ende des Proteins, Einfluss auf die zweite AAA-Domäne besitzt und diese wiederum zu konformationellen Änderungen in der M-Domäne führt, welche Einfluss auf die erste AAA-Domäne ausübt. Dieser sogenannte "interdomain signal transduction pathway" ist bei der hsp78_{TR}-Mutante durch die den ATPase-Defizit unterbrochen. Für den Wildtyp zeigt sich nach einer einstündigen Regenerationsphase wiederum eine reduzierte Bindung. Hier könnten bereits einige Substrate wieder gelöst sein bzw. bestimmte Proteine noch gebunden sein, die später oder langsamer disaggregiert werden. Es zeigt sich somit, dass die generierte Mutante ein gutes Werkzeug für die Analyse unter Standardbedingungen ist, jedoch die Ergebnisse für das wildtyp Hsp78 bei 42°C von großer Relevanz sind, da dieses bei 42°C einer natürlichen Affinitätssteigerung unterliegt. Nach der Einteilung der Proteine in funktionelle Kategorien zeigt sich für Hsp78 unter Hitzestress eine deutliche Ansammlung von Komponenten des Citratzyklus, der ATP-Synthese und von Chaperonen. Hierbei treten besonders die Proteine Ssc1, Kdg2, Aco1 und Ilv2 als abundante Substrat-Kandidaten auf. Diese wurden bereits als aggregierende Proteine charakterisiert (Bender et al., 2011). Aus dieser Gruppe ist Ssc1 bereits für eine Interaktion mit Hsp78 bekannt und zeigt deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante (von Janowsky et al., 2006). Die genaue Rolle des Hsp70 Proteins scheint in diesem Zusammenspiel nicht klar, da Ssc1 selbst aggregiert, aber gleichzeitig auch als Interaktionspartner bzw. Kochaperon von Hsp100 Chaperonen in Frage kommt. In dieser Rolle könnte es bei Bedarf die ATPase-Aktivität des Hsp78 erhöhen. Diese Fähigkeit ist für das Zusammenspiel aus Hsp100 und Hsp70 Proteinen im Zytoplasma bereits bekannt (Lee et al., 2013). Auch für das Hsp78 wäre die Mitteldomäne geeignet um eine Interaktion mit Ssc1 zu ermöglichen, da diese in gefalteter Struktur äußerlich exponiert ist. Im Kontrast dazu ist die Mutante nicht in der Lage seine ATPase-Aktivität über Ssc1 zu regulieren und bindet Ssc1, ohne dass dieses eine Aktivierung hervorrufen kann, weil beide ATPase-Domänen mutiert sind. Hierfür ist die Anreicherung von Ssc1 bei der Mutante ein Indikator. Die Ergebnisse

für die Regeneration sind wiederum ähnlicher, da der Hitzestress bereits abgeklungen ist.

Die neu generierte hsp78_{TR}-Mutante stellt ein geeignetes Werkzeug zur Identifikation von Proteinsubstraten unter Normalbedingungen dar. Parallel liefern die Daten für Hsp78 unter Hitzestress weitere Einblicke in mögliche Substrate. Folglich erscheint es sinnvoll beide Datensätze weiterzuverwenden und die Ergebnisse aus allen Bedingungen zusammenzuführen. Hierbei ist die Kombination mit einem funktionellen Ansatz für beide Hsp78-Varianten sinnvoll, welcher das ATPase-Defizit und die damit einhergehende Reduktion der Substratdisaggregation nutzt.

6.4 Substratidentifikation durch Aggregation

Unter Ausnutzung der Erkenntnisse aus den Koaufräumungsexperimenten wurde ein weiterer *in organello* Versuchsansatz entwickelt, welcher den funktionalen Unterscheid beider Protein-Varianten ausnutzt, um die Disaggregation aller zuvor aggregierten Proteine festzustellen. Erwartet werden konnte in diesem Fall eine verminderte Disaggregationskapazität für hsp78_{TR} im Vergleich zu Hsp78. Proben wurden vor und direkt im Anschluss an die Hitzebehandlung entnommen, sowie eine Probe nach einer einstündigen Regenerationsphase. Zur Definition von potentiellen Hsp78-Substraten sollten die gesuchten Proteine grundsätzlich eine Tendenz zur Aggregation aufweisen. Die in unserem Versuchsaufbau gewählte thermoinduzierte Aggregation, liefert hierbei eine einfache Technik für die methodische Umsetzung, allerdings können auch andere Prozesse eine Proteinaggregation induzieren. Im Besonderen ist für Mitochondrien die unerwünschte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, innerhalb der Atmungskette, zu nennen. Die entnommenen Mitochondrien wurden lysiert und anschließend Aggregate über eine Ultrazentrifugation isoliert (Bender et al., 2011; Mogk et al., 1999). Der Vergleich der gemessenen relativen Protein-Abundanzen, zwischen Standardprobe und 42°C-Probe, sowie 42°C-Probe und Regenerationsprobe, ist hierbei die entscheidende Größe zur Bestimmung der Aggregationstendenz bzw. Regeneration der individuellen Proteine. Zusätzlich liefert der anschließende Vergleich der relativen Abundanzen zwischen Hsp78 und hsp78_{TR} Hinweise über einen aktiven Disaggregationsprozess, da dieser im Falle der Mutante vermindert sein sollte.

Es zeigen sich bei erster Betrachtung der CBB-gefärbten SDS-PAGE Gele keine deutlich sichtbaren Unterscheide zwischen den Proben. Lediglich eine erhöhte Proteinmenge in der Aggregationsprobe, welche aus der Hitzebehandlung resultierte, ist zu erkennen. In diesem Fall ermöglicht die Massenspektrometrie eine Erfassung robuster und aussagekräftiger Daten für die gegebene Proteinvielfalt und eine Detektion geringer Unterschiede. Grundsätzlich liefert dieser Versuchsaufbau zwei unabhängige Datensätze. Im ersten Analyseschritt kann mit Hilfe der relativen Protein-Abundanzen eine Proteinpopulation für Mitochondrien definiert werden, welche einer thermoinduzierten Aggregation unterliegt. Da bereits einige Aggregationsstudien für individuelle Proteine durchgeführt wurden, jedoch noch keine ganzheitliche mitochondriale Proteomanalyse, lassen sich die identifizierten Proteine mit den bekannten Proteinen vergleichen und somit der Datensatz auf seine Konsistenz hin prüfen. Es konnte unter anderem die Aggregation für die Proteine Aco1, Atp1, Atp2, Cit3, Gut2, Hsp60, Ilv2, Leu4, Lsc2 und Ssc1 bestätigt werden (Bender et al., 2011). Besonders interessant ist die Aggregation von Ssc1. In Abwesenheit von Zim17 ist für Ssc1 bereits eine starke Aggregationstendenz beschrieben (Blamowska et al., 2010). Möglicherweise spielt Ssc1 in diesem Zusammenhang viele unterschiedliche Rollen. Es könnte sowohl bei der Stimulation von Hsp78 beteiligt sein, an Aggregate binden oder bereits disaggregierte Proteine rückfalten. In den genannten Beispielen könnte es in Abwesenheit von Zim17 anfälliger für eine Aggregation sein. Als prominente Beispiele konnte jedoch für Mge1 und Mdj1 keine Aggregationstendenz festgestellt werden. Dies könnte sich jedoch durch die unterschiedlichen verwendeten Hitzeschock-Temperaturen von 42°C im Vergleich zu 48°C für hervorgerufen werden (Lewandowska et al., 2006). Desweiteren könnte auch die kürzere Inkubationszeit eine Rolle spielen (Lewandowska et al., 2006). Aufgrund des bakteriellen Ursprungs von Mitochondrien ist ein Abgleich mit homologen Proteinen aus *E.coli* ebenfalls sinnvoll. Hierbei zeigen sich unter anderem Put2 (PutA), Adh4 (AdhE), Aco1 (AcnB), Pim1 (Lon), Mae1 (SfcA), Sdh1 (SdhA), Lat1 und Fum1 (FumA) als bereits bekannte, aggregierende Proteine (Mogk et al., 1999). Zusätzlich zeigt sich für den Translationsfaktor Tuf1, des in HELA-Zellen aggregierenden Homologes Tufm, ebenfalls eine Aggregation. Diese könnte gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Abschaltung der intramitochondrialen Translation liefern (Schmitt, 1996; Wilkening et al., 2018). Insgesamt wurden 205

aggregierende Proteine identifiziert, von denen 165 sowohl in den Ansätzen für Hsp78 und hsp78_{TR} aggregierten. Im Fall von hsp78_{TR} aggregierten auch einige Membranproteine und weitere nicht genau zugeordnete Proteine. Für Hsp78 wurden zusätzlich noch einige Matrix-Proteine gefunden und zwei bekannte Substrate mit Rip1 und Gut1. Für beide Proteine findet sich für die Mutante keine nach unserer Definition beschriebene Aggregation, da diese bereits in der Standardprobe unlöslich sind. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass diese konstitutiv von Hsp78 disaggregiert werden müssen. Besonders für das Membranprotein Gut1 ist dies jedoch nicht direkt schlüssig, da es ein Membranprotein ist. Grundsätzlich ergibt sich jedoch eine relativ kleine Population an Proteinen, die von Hsp78 in Lösung gehalten werden müssen und ohne Hitzestress bereits in der Mutante aggregieren.

Da Hsp78 bei der Abschnürung von mitochondrialen Aggregaten an den Zellkern beteiligt zu sein scheint, ist die Suche nach Proteinen, welche in die mitochondriale Dynamik involviert, ebenfalls sinnvoll (Bruderek et al., 2018). In diesem Zusammenhang konnten die Proteine Fzo1, Ugo1 und Fis2 identifiziert werden. Sowohl für Fzo1, als auch für Ugo1, konnte jedoch keine Aggregation nachgewiesen werden. Im Fall von Fis2 findet sich jedoch eine Aggregationstendenz bei der Mutante, welche nicht im Wildtyp auftritt. Aufgrund einer zu schwachen Identifikation in der Regenerationsprobe konnte keine Hsp78-abhängige Disaggregation des Proteins überprüft werden. Trotzdem könnte Fis2 gegebenenfalls durch Hsp78 disaggregiert werden und somit die Abschnürung von Mitochondrien und damit möglicherweise auch auf die Aggregatablagerung in Mitochondrien Einfluss nehmen (Mozdy et al., 2000; Tieu and Nunnari, 2000).

6.5 Hsp78 als zentraler Disaggregator

Im zweiten Schritt wurde für alle aggregierenden Proteine eine Disaggregation und damit eine Minderung der relativen Abundanz in der Pellet-Fraktion überprüft. Hierbei wurden die relativen Abundanzen für die Regeneration, mit denen in der 42° Probe, verglichen. Es kann angenommen werden, dass die Signalminderung für Aggregate nicht direkt durch eine Pim1 abhängige Degradation hervorgerufen werden kann, sondern erst sequentiell über Hsp78 laufen muss. Daraus begründet sich auch der Vergleich der gefundenen Hsp78-Substrate mit den Substraten von Pim1. Proteine die aggregiert und für den Abbau bestimmt sind, sollten sequentiell an

beide Chaperone binden (Major et al., 2006; Röttgers et al., 2002). Diese Analyse zeigt, dass alle bekannten Pim1 Substrate auch in der vorliegenden Studie aggregieren. Zusätzlich wurden die Proteine Ilv5 und Lys4 in der Interaktionsstudie identifiziert und die Proteine Aco1, Ilv2 und Lsc2, sowohl als Interaktionspartner, aber auch als Substrat erkannt. Aus der Gesamtheit aller aggregierenden Proteine wurden in den Hsp78-Proben 111 Proteine und für hsp78_{TR} 104 Proteine regeneriert. Davon sind 92 Proteine in beiden Datensätzen enthalten. Aus der Gruppe der 111 regenerierten Proteine für Hsp78 sind 69 Proteine stärker disaggregiert, als in der Mutante. In dieser Gruppe befinden sich wiederum 29 mitochondriale Matrix-Proteine. Unter anderem finden sich die Proteine Leu4, Sod2, Aco2, Lsc2, Adh4, Mef1/2 und vier Mrpl Proteine. Zusätzlich finden sich für die Hsp78-Proben exklusiv die Proteine Mtq1 und Gcv2, als relativ stark regenerierte Proteine. Mtq1 bedingt die Methylierung des Translationsfreisetzungsfaktors Mrf1 und besitzt somit Einfluss auf die mitochondriale Translation (Polevoda et al., 2006). Gcv2 spielt eine Rolle bei der Verstoffwechslung von Glycin und zählt somit zum Aminosäuremetabolismus (Sinclair et al., 1996). In Betracht bereits vorhandener Informationen zeigt die Studie die Disaggregation von Ssc1 und eine Interaktion von Hsp78 mit den Proteinen Mge1 und Mdj1, welche selbst mit Ssc1 kooperieren (von Janowsky et al., 2006; Moczko et al., 1995).

Trotzdem sollte ein Gesamtbild aller gefundenen Interaktionspartner und Substrate dargestellt werden, um weitere funktionelle Verknüpfungen aufzudecken. Hierfür wurden nicht nur die Proteine, für welche eine Disaggregation (Substrate) nachgewiesen wurde berücksichtigt, sondern auch alle in der Koaufrreinigung identifizierten Proteine (Bindungspartner), sowie Proteine, welche grundsätzlich aus dem Pellet aufgelöst wurden, berücksichtigt. Die Kombination beider Datensätze wurde unter Zuhilfenahme der Proteininteraktionssoftware STRING durchgeführt. Betrachtet man die Schnittmenge aus Koaufrreinigung und funktionellem Assay finden sich 41 Übereinstimmungen unter denen wiederum einige ribosomale Proteine, aber auch bekannte Proteine wie Leu4, Ilv2, Hsp60, Aco1 und Pim1 zu finden sind. Zusätzlich wurden funktionelle Informationen aus der Proteindatenbank UniProt hinzugefügt. Über diese Eigenschaft lassen sich funktionelle Zusammenhänge identifizieren und somit eine gesamtheitliche Hsp78-Einflussnahme auf die mitochondriale Homöostase abbilden.

Bei Betrachtung dieser Analyse und der daraus resultierenden spezifischen Merkmale, ergibt sich in STRING eine statistische Anhäufung (>44%) von Proteinen, welche in Bindungsreaktionen verwickelt sind. Es zeigen sich unter anderem 94 Ionen-bindende Proteine, 60 Nukleotid-bindende Proteine, 18 Koenzym-bindende Proteine und 13 Proteine, welche eine Verbindung mit Eisen-Schwefel-Clustern eingehen. Es wird angenommen, dass größere und flexiblere Proteine eine höhere Aggregationstendenz besitzen (Leuenberger et al., 2017). Hier weist der Datensatz eine eindeutige Tendenz für Proteine auf, welche in Bindungsreaktionen eingebunden sind. Es zeigt sich jedoch keine Abhängigkeit von der Proteinmasse. Die strukturelle Beschaffenheit von Proteinen, welche in variablen Kontakt mit anderen Proteinen treten, bedingt deren Flexibilität, welche mit einer Tendenz zur Instabilität bzw. Aggregationsanfälligkeit einhergeht. Desweiteren häufen sich überdurchschnittlich viele Proteine der mitochondrialen Translation bzw. ribosomale Komponenten (62 Proteine). Diese zeigen sowohl eine deutliche Aggregationstendenz, aber eben auch für einige Kandidaten eine Reaktivierung durch Hsp78. Solche Eigenschaften zeigen sich bereits in anderen Studien, welche den negativen Einfluss von Hitze auf die Translation und DNA Replikation beschreiben (Bender et al., 2010; Duchniewicz et al., 1999; Krajewska et al., 2018; Leuenberger et al., 2017; Schmitt, 1996; Wilkening et al., 2018). Die Abschaltung von Prozessen deren Integrität für die Homöostase fundamental ist und deren Fehlfunktion zu einer Intensivierung des Problems führen würde, scheint nötig zu sein. In dieser Rolle kann Hsp78 als zentraler Disaggregator die intramitochondriale Proteinsynthese nach Abklang der äußeren Stressfaktoren reaktiveren (Schmitt, 1996). Darüber hinaus zeigt sich im Datensatz auch die Anreicherung von Chaperonen und Proteinen der Energiegewinnung. Die Aktivierung der Chaperon-Maschinerie, sowie die Bereitstellung der benötigten Energie, scheinen bei der Rückgewinnung der Proteinhomöostase essentiell zu sein (von Janowsky et al., 2006; Krajewska et al., 2018). Obwohl Hsp78 keinen Phänotyp bei Deletion unter Normalbedingungen aufzeigt, spielt das Chaperon eine entscheidende Rolle während und nach einem Hitzeschock. Es garantiert folglich die Wiedergewinnung der Proteinhomöostase. Als weiteres interessantes Beispiel ist die festgestellte Interaktion von Hsp78 mit Lys4 und Aco2 zu nennen. Beide Proteine sind in Analogie zum Fehlen eines Hsp78-Homologes ebenfalls nicht in vielzelligen Tieren vertreten. Hierbei kann eine funktionelle Abhängigkeit vermutet werden (Erives and Fassler,

2015). Hier sollten weitere Experimente angeschlossen werden, welche diese Ergebnisse genauer untersuchen.

Grundsätzlich zeigt sich, dass mitochondriale Proteine, welche an Bindungsreaktionen beteiligt sind, von einer Aggregationstendenz betroffen sind. Für diese könnten möglicherweise bestimmte konformationelle Intermediärzustände besonders anfällig sein. Aggregieren dadurch essentielle Proteine eines bestimmten mitochondrialen Prozesses, wie der Translation, dem AS-Stoffwechsel, dem FS-Stoffwechsel, den Eisen-Schwefel-Clustern, von Chaperonen, der ATP-Produktion oder sogar der Aggregatablagerung, führt dies zwangsweise zu einem Ausfall dieser Mechanismen. Hsp78 spielt bei der Disaggregation und Reaktivierung dieser Proteine nach Aggregation, eine fundamentale Rolle und ist der zentrale Disaggregator in der mitochondrialen Matrix für die Erhaltung der Proteinhomöostase (Abbildung 28).

Die gewonnenen Erkenntnisse könnten durch weitere Studien gefestigt werden und durch Messungen unter anderen Bedingungen ergänzt werden. So würden die Messung von weiteren Regenerationszeiten, aber auch anderen Stresstemperaturen sinnvoll sein. Hierbei könnten nicht nur die Aggregatpellets sondern gleichzeitig auch die Überstände analysiert werden. Ein Wechsel aus dem *in oranello* Kontext in ein *in vivo* Umfeld, wäre hier auch vorstellbar. Hierfür könnte der direkte Einfluss des Imports von neu synthetisierten Proteinen aus dem Zytoplasma, aber auch eine mögliche Kompensation bzw. Abmilderung der Stressfaktoren durch das gesamte Zellgefüge untersucht werden. Weitere Prozesse wie die intrazelluläre Proteinsequestration, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, aber auch Mitophagie-ähnliche Mechanismen, könnten betrachtet werden. Auch eine strukturelle Studie an Hsp78 erscheint sinnvoll, um die Interaktion mit Ssc1 und eine mögliche Einflussnahme auf die Hsp78-ATPase-Aktivität zu beleuchten. Die Suche nach einem äquivalenten Protein zu Hsp78 in Mammalia wäre ebenfalls interessant. Hsp70 scheint diese Funktion zwar in Zusammenarbeit mit Tid1 zu übernehmen, aber es stellt sich die Frage ob höhere Organismen diese Eigenschaft überhaupt benötigen oder ob die schnelle Ablagerung und anschließende Degradation über potente Proteasen effektiver ist. So könnte es möglich sein, dass lediglich einige wenige Proteine überhaupt disaggregiert werden. Diese spezifischen Proteine zu identifizieren wäre maßgeblich für weitere Forschungen.

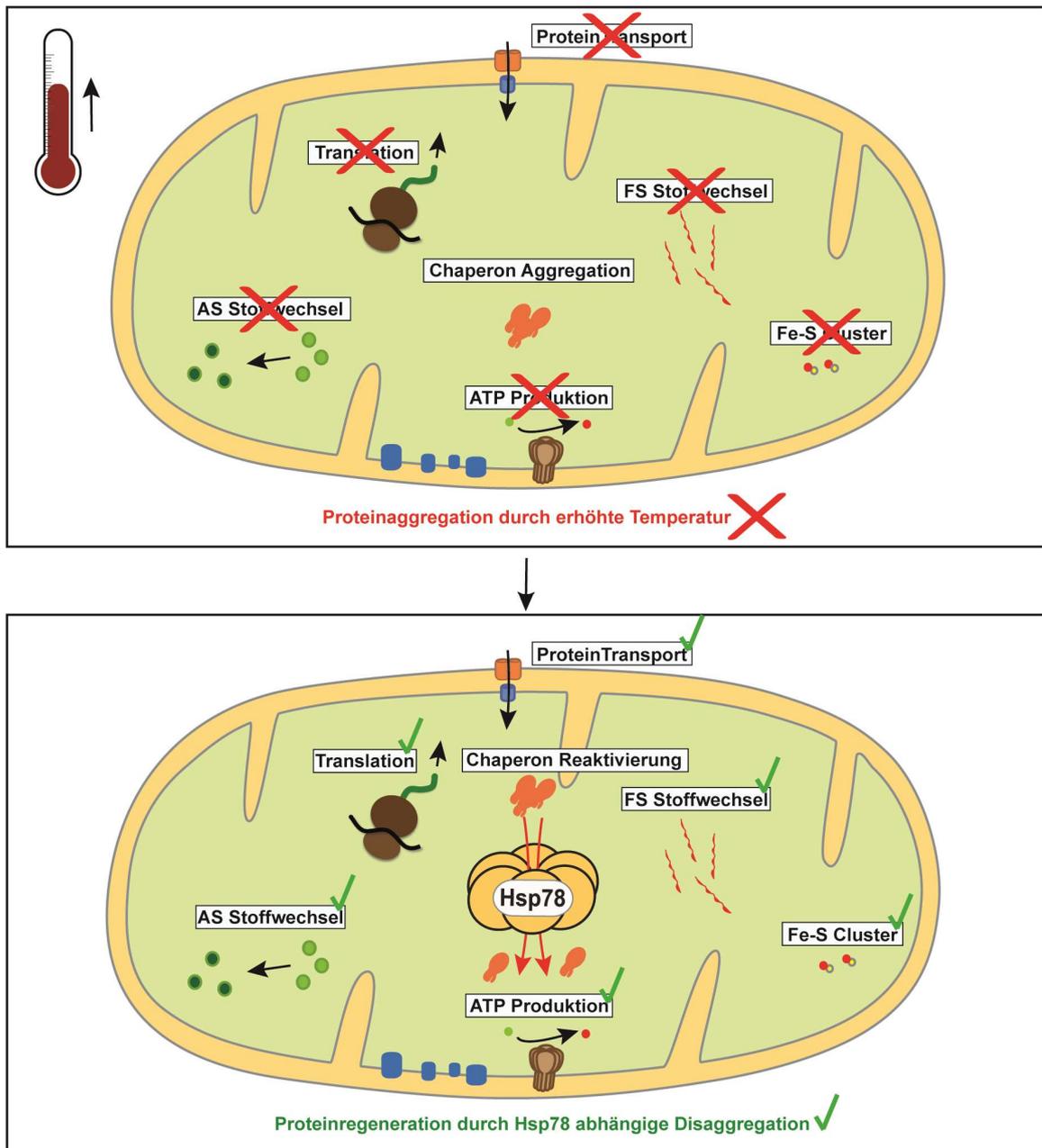


Abbildung 28: Hsp78-Model

Model zur Darstellung der gewonnenen Erkenntnisse für die Beeinflussung der mitochondrialen Proteinhomöostase durch Hsp78. Die Abbildung bezieht sich auf das in der Studie untersuchte Hsp78-Interaktom und die daraus abgeleiteten Funktionen der involvierten Proteine.

6.6 Potentielle Phosphorylierung von Ssc1

Das Hsp70 Protein Ssc1 spielt im mitochondrialen Chaperon-Netzwerk eine zentrale Rolle. Es beeinflusst durch Kooperation mit anderen Chaperonen den Lebenszyklus von Proteinen. Hierbei werden die Proteinfaltung über Hsp60, die Rückfaltung über Hsp78 und die Degradation durch Pim1 unterstützt (Voos, 2013). Weiterhin ist es

durch Bindung an den Importkanal, bei der Translokation von neu synthetisierten Proteinen aus dem Zytoplasma beteiligt (Becker et al., 2008). Daher ist es nicht überraschend, dass Ssc1 äußerst abundant ist. Folglich finden sich besonders in massenspektrometrischen Experimenten oft Daten über Ssc1, auch wenn diese meist nicht im Fokus der jeweiligen Studie liegen. In solch einem Kontext wurden unter anderem auch zwei potentielle Phosphorylierungsstellen für Ssc1 an den Positionen Thr137 und Thr330 identifiziert, jedoch nicht weiter bestätigt (Albuquerque et al.; Reinders et al., 2007). Grundsätzlich kann eine Phosphorylierung strukturelle Veränderungen an Proteinen hervorrufen. Hierbei ist auch vorstellbar, dass posttranslationale Modifikationen an Ssc1 verschiedene Isoformen definieren und ineinander überführen können. Im Fall von Ssc1 könnte dadurch ein Wechsel von der Matrix-Form in eine Membran-gebundene Isoform erfolgen. Das zytoplasmatische Ssc1 Homolog Ssa1 wird an Position Thr36 durch Cdk1 phosphoryliert und dadurch seine Substratinteraktion verändert (Truman et al., 2012). Ähnliches findet sich auf der Außenseite von Mitochondrien, wo durch die Kasein Kinase 2 und die Protein Kinase A verschiedene Tom-Komponenten phosphoryliert werden und dadurch der Proteinimport reguliert wird (Schmidt et al., 2011).

Die Betrachtung gegebener Sequenzkonservierungen innerhalb der Hsp70 Proteinfamilie in Bäckerhefe, aber auch zwischen verschiedenen Modelorganismen, zeigt für beide potentiellen Phosphorylierungsstellen keine eindeutige Konservierung. Des Weiteren deutet die vorhandene hydrophobe Fläche in unmittelbarer Nähe der Phosphorylierungsstelle Thr330 nicht zwingend auf die Bindung einer Kinase, sondern könnte lediglich den C-terminalen Deckel beeinflussen, welcher für die Substratbindung beeinflusst. Der Versuch die Modifikationen über einen α -pThreonin Western Blot nachzuweisen ist sowohl für mitochondriale Lysate, als auch für isoliertes Ssc1 negativ ausgefallen. Grundsätzlich zeigen gegen universale Phosphatmodifikationen gerichtete Antikörper, jedoch oft keine eindeutigen Informationen im Western Blot und sollten durch weitere Experimente gestützt werden. Durch die erfolgreiche Isolierung des Ssc1 Proteins mittels Affinitätschromatographie konnte ebenfalls eine 2D-PAGE durchgeführt werden. Da ein bereits getesteter und sensitiver α -Ssc1 Antikörper vorlag, konnten nach isoelektrischer Fokussierung und Größenauftrennung unterschiedliche Ssc1 Signale identifiziert werden. Hierbei wurden zusätzlich zum Auftreten einer großen

Ssc1 Proteinpopulation mit verschiedenen Harnstoffmodifikationen, weitere Signale im niedrigeren pH-Bereich lokalisiert. Grundsätzlich führt eine Phosphorylierung zu solch einer Verschiebung im Gradienten, kann jedoch auch durch andere posttranslationale Modifikationen, wie Acetylierungen, hervorgerufen werden. Dies kann durch eine massenspektrometrische Analyse eindeutig nachgewiesen werden. Da solche Modifizierungen auch nur unter bestimmten Bedingungen auftreten können, wurden die Proben zusätzlich zur Standardprobe unterschiedlich behandelt. Trotz einer guten Ssc1 Sequenzabdeckung, konnte weder unter Standardbedingungen, Hitzestress, noch unter verschiedenen Menadion-Konzentrationen, eine Phosphorylierung identifiziert werden. Ein weiterer Versuch mitochondriale Phosphorylierungen über radioaktiv markiertes ATP zu identifizieren wurde durchgeführt. Diese Methode führt zur Inkorporation des zugegebenen ATPs in den mitochondrialen Stoffwechsel und folglich auch zur Markierung aller phosphorylierten Proteine. Somit kann durch Überlagerung der Banden aus CBB-Färbung, der radioaktiven Markierung und des α -Ssc1 Western Blots, eine Zuordnung der Signale getroffen werden. Das parallele Auftragen von mitochondrialen Lysaten mit wildtyp-Ssc1 und einer Variante mit Histidin-Tag, ermöglicht hierbei unter Verwendung einer Gradienten-SDS-PAGE, einen direkten Vergleich im Laufverhalten. Es traten zwar radioaktive Signale im Massebereich der Ssc1 Banden auf, allerdings konnte diesen keine Massenverschiebung, im Vergleich beider Varianten, zugeordnet werden. Bei der Suche nach möglichen Proteinen, welche im Massebereich von 70 kDa auftreten und Phosphorylierungen aufweisen, konnten mit Jen1 und Tom70 gleich zwei multiphosphorylierte Proteine identifiziert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gefundenen potentiellen Phosphorylierungsstellen nicht experimentell bestätigt werden konnten und eine Regulierung von Ssc1 durch Phosphorylierung daher unwahrscheinlich ist.

Nichtsdestotrotz ist es möglich, dass eine vorgelagerte Ssc1 Affinitätsaufreinigung lösliche Spezies begünstigt und somit eine potentiell phosphorylierte membrangebundene-Form von Ssc1 in der massenspektrometrischen Analyse benachteiligt. Dies ist jedoch aufgrund der Triton-Zelllyse eher unwahrscheinlich. Desweiteren sind die Bedingungen für das Auftreten einer phosphorylierten Isoform des Ssc1 nicht eindeutig bekannt. Hierbei wurden mögliche Stressbedingungen getestet, jedoch kein Einfluss auf das mitochondriale Erbgut (Albuquerque et al.).

Typischerweise werden bei MS-Messungen für Phosphoproteomanalysen Phosphopeptidanreicherungen vorgelagert. Der Einsatz einer starken Kationenaustauschchromatographie oder einer Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie, kann hierbei besonders bei komplexeren Proben eine höhere Ausbeute an Phosphopeptiden liefern (Carrera et al., 2017). Die massenspektrometrische Messung wurde jedoch für bereits isoliertes Ssc1 durchgeführt und zeigte eine hohe Sequenzabdeckung mit über 83%. Hierbei wurden die Positionen Thr137 und Thr330 vielfach abgedeckt. Gleichzeitig konnte die Wahrscheinlichkeit für einen Verlust der Modifizierungen, durch den Einsatz von Phosphataseinhibitoren während der Isolation, gemindert werden. Eine weitere Analyse schien in diesem Fall nicht zielführend. Ein möglicher neuer Ansatz könnte auf der Basis einer neu entwickelten Methode der Phosphatmimese begründet werden. Hierbei kann durch den Einsatz von semisynthetisch phosphorylierten PDZ-Domänen, eine Phosphorylierung spezifisch an einer geeigneten Aminosäure eingeführt werden, ohne einen Aminosäureaustausch durchführen zu müssen (Ma et al., 2020).

6.7 Polyacetylierung von Ssc1

Die gewonnenen Ergebnisse aus 2D-PAGE lassen sich mit den Daten aus der Massenspektrometrie ergänzen. So könnte die pH-Verschiebung der kleinen Ssc1 Population auch durch Acetylierungen hervorgerufen werden. Im vorliegenden Fall konnten sechs Acetylierungen in der MS-Analyse identifiziert werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Proteinacetylierung durch variierende Acetyl-CoA Konzentrationen in der mitochondrialen Matrix sehr dynamisch ist. Dabei treten Acetylierungen nicht ausschließlich enzymatisch und funktionell ausgerichtet auf, sondern können durch die hohen Acetyl-CoA Konzentrationen auch spontan an Lysinresten auftreten (Weinert et al., 2014). Zusammenfassend scheint die posttranslationale Modifikation von mitochondrialen Proteinen stärker durch Acetylierungen bestimmt zu werden, als durch Phosphatmodifikationen (Ciregia, 2019; Eiyama and Okamoto, 2015; Galdieri et al., 2014; Weinert et al., 2011). Auf der anderen Seite könnten Acetylierungen starken Einfluss auf die Struktur mitochondrialer Proteine haben und so durch viele verschiedene Modifikationen in der Lage sein unterschiedliche Proteinisoformen zu definieren. Hierbei stellt sich

jedoch aufgrund der hohen spontanen Acetylierungsfrequenz die Frage, ob ein solches System nicht zu instabil ist. Eine Lösung könnte hierbei auch die spezifische Deacetylierung von Lysinen durch Enzyme liefern. Es finden sich in der mitochondrialen Matrix zum Beispiel die Deacetylasen SIRT3/4/5, welche in der Lage wären spezifische Proteinmodifikationsmuster zu erhalten. Von diesen reguliert jedoch nur SIRT3 die Deacetylierung von Nährstoffe und Proteinen, wohingegen SIRT4 und SIRT5 längere Acetylderivate (Malonyl, Succinyl oder Glutaryl) des Citratzyklus oder Aminosäuremetabolismus entfernen (Carrico et al., 2018; Hirschey and Zhao, 2015). Die Analyse dieser Prozesse stellt jedoch durch die hohe Dynamik der Acetylierungen unter *in vivo* Bedingungen eine besondere Herausforderung dar.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
μ	Micro (10 ⁻⁶)
μg	Microgramm
μl	Microliter
μM	Micromolar
°C	Grad Celsius
%	Prozent
³³ P	Phosphorisotop 33
³⁵ S	Schwefelisotop 35
2D	zweidimensional
6xHis	Protein-Tag bestehend aus 6 Histidinen
A	Ampere
AAA+	ATPasen assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten
Abb.	Abbildung
ABC50	Ammoniumhydrogencarbonat
ACN	Acetonitril
Aco1	Aconitase 1
Aco2	Aconitase 2
Adh3	Alkohol Dehydrogenase (Protein 3)
Adh4	Alkohol Dehydrogenase (Protein 4)
ADP	Adenosindiphosphat
AGC	Engl. Automatic gain control
Aha1	Engl.: Activator of Heat shock protein 90 ATPase
Alt1	Alanin Transaminase (Protein 1)
Ald4	Aldehyd Dehydrogenase (Protein 4)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Ameisensäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Atp1	ATP Synthase (Protein 1)
Atp2	ATP Synthase (Protein 2)
ATPase	Adenosintriphosphatase
AuD	Aggregation und Regeneration
BN	Blue Native
BSA	Engl.: Bovine serum albumin
C	Cystein
CBB	Engl.: Coomassie Brilliant Blue
CCD	Engl.: Charge-coupled device
CD	Circulardichroismus
Cdc37	Engl.: Cell Division Cycle (protein 37)
Cdk1	Engl.: Cyclin-dependent kinase (protein1)
CHAPS	Engl.: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
Cit1	Citratsynthase (Protein 1)
CK2	Engl.: Casein kinase 2
Clp	Caseinolytische Peptidase
ClpB	Caseinolytische Peptidase B
ClpP	Caseinolytische Peptidase P
ClpS	Caseinolytische Peptidase S
ClpX	Caseinolytische Peptidase X
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
CSM	Engl.: Complete synthetic medium
cytb ₂	Cytochrom-b2
Da	Dalton
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser

DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHFR _{DS}	Destabilisierte Dihydrofolatreduktase
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Engl.: Deoxyribonucleic acid
Dnm1	Engl.: Dynamin-related (protein 1)
DNS	Deoxyribonucleinsäure
Drp	Engl.: Dynamin related protein
DTT	Dithioreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	Lat.: et alii
FDR	Engl.: False-Discovery-Rate
Fis1	Engl.: Mitochondrial fission (protein 1)
Fum1	Fumarase (Protein 1)
Fzo1	Engl.: Fuzzy Onions homolog (protein 1)
g	Gramm
Gcv2	Engl.: Glycine cleavage (protein 2)
Gut1	Engl.: Glycerol utilization (protein 1)
Gut2	Engl.: Glycerol utilization (protein 2)
h	Stunde
Hem1	Engl.: Heme biosynthesis (protein 1)
HG	Hintergrundabundanz
His-Tag	Histidin-Tag (6 Histidine)
HMW	Engl.: High molecular weight
Hsp10	Hitzeschockprotein 10
Hsp40	Hitzeschockprotein 40
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
Hsp78	Hitzeschockprotein 78
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
Hsp100	Hitzeschockprotein 100
IEF	Engl.: Isoelectric focusing
IMiQ	Engl.: Intra-mitochondrial quality compartment
IMM	Innere mitochondriale Membran
IMR	Intermembranraum
INQ	Engl.: Intranuclear quality compartment
IPOD	Engl.: Insoluble protein deposit
Ilv1	Engl.: IsoLeucine-plus-Valine requiring (protein 1)
Ilv2	Engl.: IsoLeucine-plus-Valine requiring (protein 2)
Ilv5	Engl.: IsoLeucine-plus-Valine requiring (protein 5)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Jen1	Engl.: Carboxylic acid transporter homologue (protein 1)
JNK	Engl.: c-Jun N-terminal kinase
JUNQ	Juxta nuclear quality control compartment
k	Kilo (10 ³)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalto
Kgd1	alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase (Protein 1)
Kgd2	alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase (Protein 2)
KoAuf	Koaufräumung
L	Liter
Lat1	Engl.: Large Amino Acid Transporter (protein 1)
LB	Engl.: lysogeny broth
Leu4	Engl.: Leucine biosynthesis (protein 4)
Lpd1	Lipoamid Dehydrogenase (Protein 1)
Lsc2	Engl.: Ligase of Succinyl-CoA (protein 2)
Lys	Lysin

Lys4	Engl.: Lysin requiring (protein 4)
m	Masse oder Milli (10^{-3})
M	Molar
mA	Milliampere
Mae1	Engl.: Malic Enzyme (protein 1)
Mcr1	Engl.: Mitochondrial NADH-Cytochrome b5 Reductase (protein 1)
Mdh1	Malatdehydrogenase (Protein 1)
Mdj1	Mitochondriales DnaJ (Protein 1)
Mdv1	Engl.: Mitochondrial division (protein 1)
Mef1	Engl.: Mitochondrial Elongation Factor (protein 1)
Mef2	Engl.: Mitochondrial Elongation Factor (protein 2)
mg	Milligramm
Mge1	Mitochondriales GrpE (Protein 1)
Min	Minute
MKP1	Engl.: mitogen-activated protein kinase phosphatase 1
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MM	Mitochondriale Matrix
ml	Milliliter
mPa	Millipascal
MPP	Engl.: Mitochondrial processing peptidase
Mrf1	Engl.: Mitochondrial peptide chain release factor (protein 1)
Mrpl	Engl.: Mitochondrial ribosomal protein, large subunit
Mrpl40	Engl.: Mitochondrial ribosomal protein, large subunit (protein 40)
M_r	Relative Molkülmasse
Mrf1	Engl.: Mitochondrial translation release factor (protein 1)
mRNA	Engl.: Messenger ribonucleic acid
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MS1	Primärionenanalyse
MS2	Primärionenfragmentierungsanalyse
Mtq1	Methyltransferase (Protein 1)
MWCO	Engl.: Molecular weight cut-off
n	Nano (10^{-9})
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
Ni-NTA	Engl.: Nickel nitrilotriacetic acid
Ni-TED	Engl.: Nickel triscarboxymethylethylene diamine
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
Opa1	Engl.: Dynamin-like 120 kDa protein
Oxa	Engl.: Oxidase assembly
P	Pico (10^{-12})
P	Protein-Abundanz
p23	Engl.: Co-chaperone p23
p53	Engl.: Cellular tumor antigen p53
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pam16	Engl.: Presequence translocase-Associated Motor (protein 16)
Pam18	Engl.: Presequence translocase-Associated Motor (protein 18)
PCR	Engl.: Polymerase chain reaction
Pda1	Pyruvat-Dehydrogenase Alpha (Protein 1)
PEG	Polyethyleneglycol
PEP	Engl.: Posterior Error Probabilities
Pgk1	3-Phosphoglycerat Kinase (Protein 1)
pH	Lat.: Pondus Hydrogenii
PI	Proteaseinhibitor
Pim1	Engl.: Proteolysis In mitochondria (protein1)

PINK1	Engl.: PTEN-induced kinase 1
PKA	Protein Kinase A
pMol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Engl.: Protein-protein interaction
ppm	Engl.: Parts per million
Prx1	Peroxiredoxin (Protein 1)
PSM	Peptid-Spektrum-Zuordnung
PTEN	Engl.: Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase
PTP	Engl.: Protein tyrosine phosphatase
Put2	Engl.: Proline utilization (protein 2)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
Rip1	Engl.: Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske
RNS	Ribonucleinsäure
ROS	Engl.: Reactive oxygen species
Rpm	Engl.: Rounds per minute
s	Sekunde
S	Serin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sdh1	Sorbitdehydrogeanse (Protein 1)
Sdh2	Sorbitdehydrogeanse (Protein 2)
sHsp	Engl.: Small heat shock protein
SILAC	Engl.: Stable isotope labeling of aminoacids in cell culture
SM	Sonstige mitochondriale Proteine
Sod2	Superoxiddismutase
Ssa1	Engl.: Stress-Seventy subfamily A (protein 1)
Ssc1	Engl.: Stress-Seventy subfamily C (protein 1)
Ssc3	Engl.: Stress-Seventy subfamily C (protein 3)
Ssq1	Engl.: Stress-Seventy subfamily Q (protein 1)
STRING	Engl.: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
T	Threonin
TBS	Engl.: Tris buffered saline
TCA	Engl.: Trichloroacetic acid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamin
Thr	Threonin
Tid1	Engl.: DnaJ homolog subfamily A member 3
Tim	Engl.: Translocase of the inner membrane
Tim22	Engl.: Translocase of the inner membrane (protein 22)
Tim23	Engl.: Translocase of the inner membrane (protein 23)
Tim44	Engl.: Translocase of the inner membrane (protein 44)
Tom	Engl.: translocase of the outer membrane
Tom20	Engl.: Translocase of the outer membrane (protein 20)
Tom40	Engl.: Translocase of the outer membrane (protein 40)
Tom70	Engl.: Translocase of the outer membrane (protein 70)
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris(hydroxylmethyl)aminomethan
Tuf1	Engl.: Mitochondrial translation elongation factor (protein 1)
Ugo1	Engl.: Mitochondrial fusion and transport (protein 1)
v	Volumen
V	Volt
v/v	Engl.: Volume per volume
w/v	Engl.: Weight per volume
x g	Zentrifugalkraft
z	Ladung
Zim17	Engl.: zinc finger protein essential for protein import (protein 17)

8. Abbildungsvezeichnis

Abbildung 1: Funktion von Mitochondrien	16
Abbildung 2: Proteinhomöostase in Hefemitochondrien	22
Abbildung 3: Ssc1 Phosphorylierung	26
Abbildung 4: AAA+ Substratstudien	60
Abbildung 5: Hsp78-Konstrukte	67
Abbildung 6: Charakterisierung der hsp78 _{TR} -Mutante	69
Abbildung 7: Hsp78-Komplexbildung	71
Abbildung 8: DHFR Konstrukte	72
Abbildung 9: <i>In organello</i> Funktionen von Hsp78	74
Abbildung 10: <i>In organello</i> Degradation von cytb2(167) _Δ -DHFR	76
Abbildung 11: Arbeitsablauf für das Koaufrreinigungsexperiment	78
Abbildung 12: Aufrreinigung von Hsp78-Proteinen und MS-Kontrollgel	79
Abbildung 13: Lokalisation und funktionelle Kategorisierung	81
Abbildung 14: Abundante Proteine und individuelle Koaufrreinigung	83
Abbildung 15: Proteinanreicherung	85
Abbildung 16: Arbeitsablauf Aggregations- und Disaggregationsexperiment	87
Abbildung 17: Kontrolle individueller Proteine mit quantitativer Auswertung	89
Abbildung 18: Aggregation und Disaggregation in Pellets	90
Abbildung 19: Mitochondrialer ATP-Gehalt und Enzymreaktivierung	92
Abbildung 20: Hsp78-Substratnetzwerk	94
Abbildung 21: Übersicht der STRING-Analyse für Bindungsreaktionen	95
Abbildung 22: Ssc1 Sequenzvergleich	96
Abbildung 23: Hsp78-Struktur und hydrophobe Oberflächen	97
Abbildung 24: Ssc1 Affinitätsaufrreinigung	98
Abbildung 25: pT-Blot und 2D-PAGE	100
Abbildung 26: ³³ P-Isotopenmarkierung von Mitochondrien und Lysaten	102
Abbildung 27: MS-Ergebnisse für die posttranslationale Modifikation von Ssc1	104
Abbildung 28: Hsp78-Model	117

9. Literaturverzeichnis

- Abrahão, J., Mokry, D.Z., and Ramos, C.H.I. (2017). Hsp78 (78 kDa Heat Shock Protein), a Representative AAA Family Member Found in the Mitochondrial Matrix of *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Mol Biosci* 4.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., and Nussberger, S. (2001). Tom40, the Pore-Forming Component of the Protein-Conducting Tom Channel in the Outer Membrane of Mitochondria. *J Cell Biol* 153, 1151–1160.
- Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Eng, J., and Zhou, H. A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis*□S. 8.
- Altieri, D.C., Stein, G.S., Lian, J.B., and Languino, L.R. (2012). TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 767–773.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* 181, 223–230.
- Avenidaño-Monsalve, M.C., Ponce-Rojas, J.C., and Funes, S. (2020). From cytosol to mitochondria: the beginning of a protein journey. *Biol. Chem.*
- Bateman, J.M., Iacovino, M., Perlman, P.S., and Butow, R.A. (2002). Mitochondrial DNA instability mutants of the bifunctional protein Ilv5p have altered organization in mitochondria and are targeted for degradation by Hsp78 and the Pim1p protease. *J. Biol. Chem.* 277, 47946–47953.
- Becker, D., Krayl, M., and Voos, W. (2008). In vitro analysis of the mitochondrial preprotein import machinery using recombinant precursor polypeptides. *Methods Mol. Biol.* 457, 59–83.
- Becker, T., Song, J., and Pfanner, N. (2019). Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria. *Trends Cell Biol.* 29, 534–548.
- Bender, T., Leidhold, C., Ruppert, T., Franken, S., and Voos, W. (2010). The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics* 10, 1426–1443.
- Bender, T., Lewrenz, I., Franken, S., Baitzel, C., and Voos, W. (2011). Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Molecular Biology of the Cell* 22, 541–554.
- Berner, N., Reutter, K.-R., and Wolf, D.H. (2018). Protein Quality Control of the Endoplasmic Reticulum and Ubiquitin-Proteasome-Triggered Degradation of Aberrant Proteins: Yeast Pioneers the Path. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 751–782.
- Blamowska, M., Sichting, M., Mapa, K., Mokranjac, D., Neupert, W., and Hell, K. (2010). ATPase Domain and Interdomain Linker Play a Key Role in Aggregation of Mitochondrial Hsp70 Chaperone Ssc1. *Journal of Biological Chemistry* 285, 4423–4431.
- Bruderek, M., Jaworek, W., Wilkening, A., Rüb, C., Cenini, G., Förtsch, A., Sylvester, M., and Voos, W. (2018). IMiQ: a novel protein quality control compartment protecting mitochondrial functional integrity. *Molecular Biology of the Cell* 29, 256–269.

- Buchner, J. (2019). Molecular chaperones and protein quality control: an introduction to the JBC Reviews thematic series. *J. Biol. Chem.* *294*, 2074–2075.
- Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* *92*, 351–366.
- Canevari, L., Abramov, A.Y., and Duchen, M.R. (2004). Toxicity of amyloid beta peptide: tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochem. Res.* *29*, 637–650.
- Carrera, M., Cañas, B., and Lopez-Ferrer, D. (2017). Fast Global Phosphoproteome Profiling of Jurkat T Cells by HIFU-TiO₂-SCX-LC-MS/MS. *Anal. Chem.* *89*, 8853–8862.
- Carrico, C., Meyer, J.G., He, W., Gibson, B.W., and Verdin, E. (2018). The Mitochondrial Acylome Emerges: Proteomics, Regulation by Sirtuins, and Metabolic and Disease Implications. *Cell Metabolism* *27*, 497–512.
- Cenini, G., Rüb, C., Bruderek, M., and Voos, W. (2016). Amyloid β -peptides interfere with mitochondrial preprotein import competence by a coaggregation process. *MBoC* *27*, 3257–3272.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuán Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO Journal* *23*, 3735–3746.
- Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A.E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Truscott, K.N., Guiard, B., et al. (2005). Mitochondrial Presequence Translocase: Switching between TOM Tethering and Motor Recruitment Involves Tim21 and Tim17. *Cell* *120*, 817–829.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. *Cell* *138*, 628–644.
- Choksi, K.B., Boylston, W.H., Rabek, J.P., Widger, W.R., and Papaconstantinou, J. (2004). Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1688*, 95–101.
- Chrétien, D., Bénit, P., Ha, H.-H., Keipert, S., El-Khoury, R., Chang, Y.-T., Jastroch, M., Jacobs, H.T., Rustin, P., and Rak, M. (2018). Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C. *PLOS Biology* *16*, e2003992.
- Ciregia, F. (2019). Mitochondria Lysine Acetylation and Phenotypic Control. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1158*, 59–70.
- Dannenmaier, S., Stiller, S.B., Morgenstern, M., Lübbert, P., Oeljeklaus, S., Wiedemann, N., and Warscheid, B. (2018). Complete Native Stable Isotope Labeling by Amino Acids of *Saccharomyces cerevisiae* for Global Proteomic Analysis. *Anal Chem* *90*, 10501–10509.
- Deville, C., Carroni, M., Franke, K.B., Topf, M., Bukau, B., Mogk, A., and Saibil, H.R. (2017). Structural pathway of regulated substrate transfer and threading through an Hsp100 disaggregase. *Sci Adv* *3*, e1701726.

- Duchniewicz, M., Germaniuk, A., Westermann, B., Neupert, W., Schwarz, E., and Marszalek, J. (1999). Dual Role of the Mitochondrial Chaperone Mdj1p in Inheritance of Mitochondrial DNA in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* *19*, 8201–8210.
- Eichmann, C., Preissler, S., Riek, R., and Deuerling, E. (2010). Cotranslational structure acquisition of nascent polypeptides monitored by NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 9111–9116.
- Eiyama, A., and Okamoto, K. (2015). Protein N-terminal Acetylation by the NatA Complex Is Critical for Selective Mitochondrial Degradation. *J. Biol. Chem.* *290*, 25034–25044.
- Erives, A.J., and Fassler, J.S. (2015). Metabolic and Chaperone Gene Loss Marks the Origin of Animals: Evidence for Hsp104 and Hsp78 Chaperones Sharing Mitochondrial Enzymes as Clients. *PLOS ONE* *10*, e0117192.
- Escusa-Toret, S., Vonk, W.I.M., and Frydman, J. (2013). Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nature Cell Biology* *15*, 1231–1243.
- Evans, A., and Neuman, N. (2016). The Mighty Mitochondria. *Mol. Cell* *61*, 641.
- Fedoseeva, I., Pyatrikas, D., Stepanov, A., Fedyaeva, A., Varakina, N., Rusaleva, T., Borovskii, G., and Rikhvanov, E. (2017). The role of flavin-containing enzymes in mitochondrial membrane hyperpolarization and ROS production in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions. *Scientific Reports* *7*.
- Fernández-Fernández, M.R., and Valpuesta, J.M. (2018). Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. *F1000Res* *7*.
- Fiala, G.J., Schamel, W.W.A., and Blumenthal, B. (2011). Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for analysis of multiprotein complexes from cellular lysates. *J Vis Exp*.
- Fivenson, E.M., Lautrup, S., Sun, N., Scheibye-Knudsen, M., Stevnsner, T., Nilsen, H., Bohr, V.A., and Fang, E.F. (2017). Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochem. Int.* *109*, 202–209.
- Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.-I., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2003). Proteomic Discovery of Cellular Substrates of the ClpXP Protease Reveals Five Classes of ClpX-Recognition Signals. *Molecular Cell* *11*, 671–683.
- Flynn, J.M., Levchenko, I., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2004). Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes Dev.* *18*, 2292–2301.
- Freel, K.C., Friedrich, A., and Schacherer, J. (2015). Mitochondrial genome evolution in yeasts: an all-encompassing view. *FEMS Yeast Res* *15*.
- Gaiser, A.M., Kretschmar, A., and Richter, K. (2010). Cdc37-Hsp90 complexes are responsive to nucleotide-induced conformational changes and binding of further cofactors. *J. Biol. Chem.* *285*, 40921–40932.
- Galdieri, L., Zhang, T., Rogerson, D., Lleshi, R., and Vancura, A. (2014). Protein Acetylation and Acetyl Coenzyme A Metabolism in Budding Yeast. *Eukaryot Cell* *13*, 1472–1483.

- Gemmer, M., and Förster, F. (2020). A clearer picture of the ER translocon complex. *J. Cell. Sci.* *133*.
- Genest, O., Wickner, S., and Doyle, S.M. (2019). Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling. *J. Biol. Chem.* *294*, 2109–2120.
- Giegé, P., Sweetlove, L.J., Cognat, V., and Leaver, C.J. (2005). Coordination of Nuclear and Mitochondrial Genome Expression during Mitochondrial Biogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* *17*, 1497–1512.
- Graham, J.W., Lei, M.G., and Lee, C.Y. (2013). Trapping and Identification of Cellular Substrates of the Staphylococcus aureus ClpC Chaperone. *Journal of Bacteriology* *195*, 4506–4516.
- Gray, M.W. (2012). Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*, a011403.
- Grice, G.L., and Nathan, J.A. (2016). The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 3497–3506.
- Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., and Larsson, N.-G. (2016). Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* *85*, 133–160.
- Hanson, P.I., and Whiteheart, S.W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 519–529.
- Haslbeck, M. (2002). sHsps and their role in the chaperone network. *Cell. Mol. Life Sci.* *59*, 1649–1657.
- Haslberger, T., Zdanowicz, A., Brand, I., Kirstein, J., Turgay, K., Mogk, A., and Bukau, B. (2008). Protein disaggregation by the AAA+ chaperone ClpB involves partial threading of looped polypeptide segments. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 641–650.
- Herrmann, J.M., Woellhaf, M.W., and Bonnefoy, N. (2013). Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1833*, 286–294.
- Hildenbeutel, M., Theis, M., Geier, M., Haferkamp, I., Neuhaus, H.E., Herrmann, J.M., and Ott, M. (2012). The membrane insertase Oxa1 is required for efficient import of carrier proteins into mitochondria. *J. Mol. Biol.* *423*, 590–599.
- Hill, S.M., Hanzén, S., and Nyström, T. (2017). Restricted access: spatial sequestration of damaged proteins during stress and aging. *EMBO Reports* *18*, 377–391.
- Hirsche, M.D., and Zhao, Y. (2015). Metabolic Regulation by Lysine Malonylation, Succinylation, and Glutarylation. *Mol Cell Proteomics* *14*, 2308–2315.
- Horwich, A.L., Fenton, W.A., Chapman, E., and Farr, G.W. (2007). Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 115–145.
- Hoshino, M. (2016). Fibril formation from the amyloid- β peptide is governed by a dynamic equilibrium involving association and dissociation of the monomer. *Biophys Rev* *9*, 9–16.

- Iosefson, O., Sharon, S., Goloubinoff, P., and Azem, A. (2012). Reactivation of protein aggregates by mortalin and Tid1--the human mitochondrial Hsp70 chaperone system. *Cell Stress Chaperones* *17*, 57–66.
- von Janowsky, B., Knapp, K., Major, T., Krayl, M., Guiard, B., and Voos, W. (2005). Structural properties of substrate proteins determine their proteolysis by the mitochondrial AAA+ protease Pim1. *Biological Chemistry* *386*.
- von Janowsky, B., Major, T., Knapp, K., and Voos, W. (2006). The Disaggregation Activity of the Mitochondrial ClpB Homolog Hsp78 Maintains Hsp70 Function during Heat Stress. *Journal of Molecular Biology* *357*, 793–807.
- Jenö, P., Mini, T., Moes, S., Hintermann, E., and Horst, M. (1995). Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* *224*, 75–82.
- Jeong, S.-Y., and Seol, D.-W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* *41*, 11–22.
- Kampinga, H.H., and Craig, E.A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *11*, 579–592.
- Kiefhaber, T. (1995). Protein folding kinetics. *Methods Mol. Biol.* *40*, 313–341.
- Kim, K.I., Cheong, G.W., Park, S.C., Ha, J.S., Woo, K.M., Choi, S.J., and Chung, C.H. (2000). Heptamer ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *303*, 655–666.
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* *82*, 323–355.
- Kirstein, J., Molière, N., Dougan, D.A., and Turgay, K. (2009). Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nature Reviews Microbiology* *7*, 589–599.
- Kominek, J., Marszalek, J., Neuvéglise, C., Craig, E.A., and Williams, B.L. (2013). The Complex Evolutionary Dynamics of Hsp70s: A Genomic and Functional Perspective. *Genome Biol Evol* *5*, 2460–2477.
- Kowald, A., and Kirkwood, T.B.L. (2011). Evolution of the mitochondrial fusion-fission cycle and its role in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 10237–10242.
- Krajewska, J., Arent, Z., Zolkiewski, M., and Kędzierska-Mieszkowska, S. (2018). Isolation and Identification of Putative Protein Substrates of the AAA+ Molecular Chaperone ClpB from the Pathogenic Spirochaete *Leptospira interrogans*. *Int J Mol Sci* *19*.
- Krayl, M., Lim, J.H., Martin, F., Guiard, B., and Voos, W. (2007). A Cooperative Action of the ATP-Dependent Import Motor Complex and the Inner Membrane Potential Drives Mitochondrial Preprotein Import. *Molecular and Cellular Biology* *27*, 411–425.
- Krzewska, J., Konopa, G., and Liberek, K. (2001). Importance of two ATP-binding sites for oligomerization, ATPase activity and chaperone function of mitochondrial Hsp78 protein 1 Edited by M. Yaniv. *Journal of Molecular Biology* *314*, 901–910.
- Kundu, D., and Pasrija, R. (2020). The ERMES (Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Encounter Structures) mediated functions in fungi. *Mitochondrion*.

- Laufen, T., Mayer, M.P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1999). Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 5452–5457.
- Lee, S., and Min, K.-T. (2018). The Interface Between ER and Mitochondria: Molecular Compositions and Functions. *Mol. Cells* *41*, 1000–1007.
- Lee, J., Kim, J.-H., Biter, A.B., Sielaff, B., Lee, S., and Tsai, F.T.F. (2013). Heat shock protein (Hsp) 70 is an activator of the Hsp104 motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 8513–8518.
- Lee, S., Sielaff, B., Lee, J., and Tsai, F.T. (2010). CryoEM structure of Hsp104 and its mechanistic implication for protein disaggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 8135–8140.
- Leidhold, C., Janowsky, B. von, Becker, D., Bender, T., and Voos, W. (2006). Structure and function of Hsp78, the mitochondrial ClpB homolog. *Journal of Structural Biology* *156*, 149–164.
- Leonhardt, S.A., Fearson, K., Danese, P.N., and Mason, T.L. (1993). HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Molecular and Cellular Biology* *13*, 6304–6313.
- Leuenberger, P., Gansch, S., Kahraman, A., Cappelletti, V., Boersema, P.J., von Mering, C., Claassen, M., and Picotti, P. (2017). Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermostability. *Science* *355*, eaai7825.
- Lewandowska, A., Gierszewska, M., Marszalek, J., and Liberek, K. (2006). Hsp78 chaperone functions in restoration of mitochondrial network following heat stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1763*, 141–151.
- Lewrenz, I., Rietzschel, N., Guiard, B., Lill, R., van der Laan, M., and Voos, W. (2013). The functional interaction of mitochondrial Hsp70s with the escort protein Zim17 is critical for Fe/S biogenesis and substrate interaction at the inner membrane preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* *288*, 30931–30943.
- Li, J., Soroka, J., and Buchner, J. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 624–635.
- Lim, J.H. (2001). The mitochondrial Hsp70-dependent import system actively unfolds preproteins and shortens the lag phase of translocation. *The EMBO Journal* *20*, 941–950.
- Lim, S., Smith, K.R., Lim, S.-T.S., Tian, R., Lu, J., and Tan, M. (2016). Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Biosci* *6*.
- Liu, Q., Krzewska, J., Liberek, K., and Craig, E.A. (2001). Mitochondrial Hsp70 Ssc1: Role in Protein Folding. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 6112–6118.
- Ma, S., Strømgaard, K., and Clemmensen, L.S. (2020). Site-Specific Phosphorylation of PDZ Domains. *Methods Mol. Biol.* *2133*, 235–261.
- Major, T., von Janowsky, B., Ruppert, T., Mogk, A., and Voos, W. (2006). Proteomic Analysis of Mitochondrial Protein Turnover: Identification of Novel Substrate Proteins of the Matrix Protease Pim1. *Molecular and Cellular Biology* *26*, 762–776.

- Martin, W.F., Garg, S., and Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- McCaffrey, K., and Braakman, I. (2016). Protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Essays Biochem.* 60, 227–235.
- Mehta, A.P., Supekova, L., Chen, J.-H., Pestonjamas, K., Webster, P., Ko, Y., Henderson, S.C., McDermott, G., Supek, F., and Schultz, P.G. (2018). Engineering yeast endosymbionts as a step toward the evolution of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 11796–11801.
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A.L., Lambert, J.-P., St-Denis, N.A., Li, T., Miteva, Y.V., Hauri, S., Sardi, M.E., Low, T.Y., et al. (2013). The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat. Methods* 10, 730–736.
- Mick, D.U., Fox, T.D., and Rehling, P. (2011). Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 14–20.
- Mishra, P., and Chan, D.C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 634–646.
- Moberg, P., Nilsson, S., Ståhl, A., Eriksson, A.-C., Glaser, E., and Måler, L. (2004). NMR Solution Structure of the Mitochondrial F1 β Presequence from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Journal of Molecular Biology* 336, 1129–1140.
- Moczko, M., Schönfisch, B., Voos, W., Pfanner, N., and Rassow, J. (1995). The Mitochondrial ClpB Homolog Hsp78 Cooperates with Matrix Hsp70 in Maintenance of Mitochondrial Function. *Journal of Molecular Biology* 254, 538–543.
- Model, K., Meisinger, C., and Kühlbrandt, W. (2008). Cryo-Electron Microscopy Structure of a Yeast Mitochondrial Preprotein Translocase. *Journal of Molecular Biology* 383, 1049–1057.
- Mogk, A., and Bukau, B. (2017). Role of sHsps in organizing cytosolic protein aggregation and disaggregation. *Cell Stress Chaperones* 22, 493–502.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H., and Bukau, B. (1999). Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* 18, 6934–6949.
- Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J., and Bukau, B. (2003). Roles of Individual Domains and Conserved Motifs of the AAA+ Chaperone ClpB in Oligomerization, ATP Hydrolysis, and Chaperone Activity. *Journal of Biological Chemistry* 278, 17615–17624.
- Mogk, A., Kummer, E., and Bukau, B. (2015). Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2, 22.
- Morano, K.A., Grant, C.M., and Moye-Rowley, W.S. (2012). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 1157–1195.

- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., and Shaw, J.M. (2000). Dnm1p Gtpase-Mediated Mitochondrial Fission Is a Multi-Step Process Requiring the Novel Integral Membrane Component Fis1p. *J Cell Biol* 151, 367–380.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 458–467.
- Naujokat, C., and Hoffmann, S. (2002). Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab. Invest.* 82, 965–980.
- Neher, S.B., Villén, J., Oakes, E.C., Bakalarski, C.E., Sauer, R.T., Gygi, S.P., and Baker, T.A. (2006). Proteomic Profiling of ClpXP Substrates after DNA Damage Reveals Extensive Instability within SOS Regulon. *Molecular Cell* 22, 193–204.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 376–386.
- Ott, M., Amunts, A., and Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 77–101.
- Palmieri, F., Pierri, C.L., De Grassi, A., Nunes-Nesi, A., and Fernie, A.R. (2011). Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J.* 66, 161–181.
- Pareek, G., Samaddar, M., and D’Silva, P. (2011). Primary Sequence That Determines the Functional Overlap between Mitochondrial Heat Shock Protein 70 Ssc1 and Ssc3 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 19001–19013.
- Pickrell, A.M., and Youle, R.J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson’s disease. *Neuron* 85, 257–273.
- Polevoda, B., Span, L., and Sherman, F. (2006). The yeast translation release factors Mrf1p and Sup45p (eRF1) are methylated, respectively, by the methyltransferases Mtq1p and Mtq2p. *J. Biol. Chem.* 281, 2562–2571.
- Prip-Buus, C., Westermann, B., Schmitt, M., Langer, T., Neupert, W., and Schwarz, E. (1996). Role of the mitochondrial DnaJ homologue, Mdj1p, in the prevention of heat-induced protein aggregation. *FEBS Letters* 380, 142–146.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., et al. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679–684.
- Quirós, P.M., Mottis, A., and Auwerx, J. (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 213–226.
- Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* 21, 379–404.
- Rao, S., Schmidt, O., Harbauer, A.B., Schönfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2012). Biogenesis of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: protein kinase A phosphorylates the precursor of Tom40 and impairs its import. *MBoC* 23, 1618–1627.

- Raviol, H., Sadlish, H., Rodriguez, F., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2006). Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J* 25, 2510–2518.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kühlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N., and Pfanner, N. (2003). Protein Insertion into the Mitochondrial Inner Membrane by a Twin-Pore Translocase. *Science* 299, 1747–1751.
- Rei Liao, J.-Y., and van Wijk, K.J. (2019). Discovery of AAA+ Protease Substrates through Trapping Approaches. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Reinders, J., Wagner, K., Zahedi, R.P., Stojanovski, D., Eyrich, B., van der Laan, M., Rehling, P., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2007). Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. *Mol. Cell Proteomics* 6, 1896–1906.
- Richter, K., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell* 40, 253–266.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C., and Ferrara, P. (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 203, 173–179.
- Röttgers, K., Zufall, N., Guiard, B., and Voos, W. (2002). The ClpB homolog Hsp78 is required for the efficient degradation of proteins in the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* 277, 45829–45837.
- Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T., and Kohda, D. (2007). Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *The EMBO Journal* 26, 4777–4787.
- Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2011). AAA+ Proteases: ATP-Fueled Machines of Protein Destruction. *Annual Review of Biochemistry* 80, 587–612.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 21, 289–296.
- Schmidt, O., Harbauer, A.B., Rao, S., Eyrich, B., Zahedi, R.P., Stojanovski, D., Schönfisch, B., Guiard, B., Sickmann, A., Pfanner, N., et al. (2011). Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* 144, 227–239.
- Schmitt, M. (1996). The molecular chaperone Hsp78 confers compartment-specific thermotolerance to mitochondria. *The Journal of Cell Biology* 134, 1375–1386.
- Schopf, F.H., Biebl, M.M., and Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 345–360.
- Sinclair, D.A., Hong, S.P., and Dawes, I.W. (1996). Specific induction by glycine of the gene for the P-subunit of glycine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 19, 611–623.
- Slimen, I.B., Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Mrad, M.B., and Abdrabbah, M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *International Journal of Hyperthermia* 30, 513–523.

- Smith, R.A.J., Hartley, R.C., Cochemé, H.M., and Murphy, M.P. (2012). Mitochondrial pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* 33, 341–352.
- Stefani, M., and Dobson, C.M. (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* 81, 678–699.
- Stiller, S.B., Höpker, J., Oeljeklaus, S., Schütze, C., Schrempp, S.G., Vent-Schmidt, J., Horvath, S.E., Frazier, A.E., Gebert, N., van der Laan, M., et al. (2016). Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins. *Cell Metab.* 23, 901–908.
- Strub, A., Röttgers, K., and Voos, W. (2002). The Hsp70 peptide-binding domain determines the interaction of the ATPase domain with Tim44 in mitochondria. *EMBO J.* 21, 2626–2635.
- Taylor, A.B., Smith, B.S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A., and Deisenhofer, J. (2001). Crystal Structures of Mitochondrial Processing Peptidase Reveal the Mode for Specific Cleavage of Import Signal Sequences. *Structure* 9, 615–625.
- Tieu, Q., and Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 151, 353–366.
- Truman, A.W., Kristjansdottir, K., Wolfgeher, D., Hasin, N., Polier, S., Zhang, H., Perrett, S., Prodromou, C., Jones, G.W., and Kron, S.J. (2012). CDK-Dependent Hsp70 Phosphorylation Controls G1 Cyclin Abundance and Cell-Cycle Progression. *Cell* 151, 1308–1318.
- Verba, K.A., and Agard, D.A. (2017). How Hsp90 and Cdc37 Lubricate Kinase Molecular Switches. *Trends Biochem. Sci.* 42, 799–811.
- Voos, W. (2013). Chaperone–protease networks in mitochondrial protein homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 388–399.
- Voos, W., and Röttgers, K. (2002). Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1592, 51–62.
- Voos, W., Gambill, B.D., Laloraya, S., Ang, D., Craig, E.A., and Pfanner, N. (1994). Mitochondrial GrpE is present in a complex with hsp70 and preproteins in transit across membranes. *Mol Cell Biol* 14, 6627–6634.
- Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T., and Neupert, W. (1994). Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.* 13, 5135–5145.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945–951.
- Wang, W., and Roberts, C.J. (2018). Protein aggregation - Mechanisms, detection, and control. *Int J Pharm* 550, 251–268.

- Weibezahn, J., Schlieker, C., Bukau, B., and Mogk, A. (2003). Characterization of a trap mutant of the AAA+ chaperone ClpB. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 32608–32617.
- Weinert, B.T., Wagner, S.A., Horn, H., Henriksen, P., Liu, W.R., Olsen, J.V., Jensen, L.J., and Choudhary, C. (2011). Proteome-wide mapping of the *Drosophila* acetylome demonstrates a high degree of conservation of lysine acetylation. *Sci Signal* 4, ra48.
- Weinert, B.T., Iesmantavicius, V., Moustafa, T., Schölz, C., Wagner, S.A., Magnes, C., Zechner, R., and Choudhary, C. (2014). Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Syst. Biol.* 10, 716.
- Westermann, B., Prip-Buus, C., Neupert, W., and Schwarz, E. (1995). The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *EMBO J* 14, 3452–3460.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* 424, 565–571.
- Wilkening, A., Rüb, C., Sylvester, M., and Voos, W. (2018). Analysis of heat-induced protein aggregation in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* 293, 11537–11552.
- Wold, F. (1981). In Vivo Chemical Modification of Proteins (Post-Translational Modification). *Annual Review of Biochemistry* 50, 783–814.
- Yang, Y., Liu, B., Dai, J., Srivastava, P.K., Zammit, D.J., Lefrançois, L., and Li, Z. (2007). Heat Shock Protein gp96 Is a Master Chaperone for Toll-like Receptors and Is Important in the Innate Function of Macrophages. *Immunity* 26, 215–226.
- Zwanzig, R., Szabo, A., and Bagchi, B. (1992). Levinthal's paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 20–22.

10. Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Prof. Wolfgang Voos bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat meine Dissertation in seinem Labor durchzuführen. Besonders entscheidend dabei waren die wissenschaftliche Freiheit und die gemeinsame Diskussion über Forschungsinhalte, um eine eigenständige Identität als Wissenschaftler zu entwickeln.

Ein ganz herzlicher Dank geht an alle weiteren Laborkollegen und alle Mitarbeiter des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie, welche durch den täglichen Kontakt und Austausch sicherlich einen großen Einfluss auf meine Arbeit hatten. Besonders entscheidend waren dabei Dr. Giovanna Cenini, welche mir bei der Analyse der Hsp78 Komplexe mittels BN-PAGE geholfen hat und Dr. Marc Sylvester, welcher die mit mir gemeinsam die Planung und Durchführung der MS-Messungen verwirklicht hat. Weiterhin haben Dr. Michael Bruderek, Dr. Anne Wilkening und Dr. Cornelia Rüb, sowie Karen Pollecker starken Einfluss auf meine wissenschaftliche Arbeit gehabt und haben mir zu jeder Zeit durch ihre Unterstützung geholfen.

Außerdem danke ich Prof. Jörg Höfeld für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie allen anderen Mitgliedern der Prüfungskommission.

Abschließend möchte ich von ganzem Herzen meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin Dr. Katharina Dietz danken, welche mich in dieser Zeit begleitet und in vielen Situationen unterstützt haben.

Anhang I

Gen	Accession	mito. Lokal.	MW [kDa]	log2 (% des \emptyset) Hsp78 (42°C/25°C)	log2 (% des \emptyset) hsp78 _{TR} (42°C/25°C)	log2 (% des \emptyset) Hsp78 (42°C/rec)	log2 (% des \emptyset) hsp78 _{TR} (42°C/rec)
COQ5	P49017	IM	34,7	15,32	4,32	0,18	0,08
AFG1	P32317	IM	58,2	14,68	4,90	1,30	0,87
LEU9	Q12166	MM	67,2	13,10	13,10	1,29	1,26
BCS1	P32839	IM	51,1	12,42	12,65	0,10	-0,06
ATP12	P22135	O	36,5	12,31	4,12	0,07	-0,17
PUT1	P09368	MM	53,2	11,22	2,11	-0,44	-0,48
CCP1	P00431	MM	40,3	10,87	1,65	-0,24	0,16
YSA1	Q01976	O	26,1	10,82	10,67	0,67	0,52
YOR022C	Q12204	MM	81,7	10,72	0,94	0,07	0,19
ARG8	P18544	MM	46,7	10,49	11,46	-0,23	-0,44
ALA1	P40825	MM	110	10,24	6,43	1,82	1,30
TRR2	P38816	MM	37,1	10,06	3,38	4,71	4,35
PTC7	P38797	MM	37,8	9,59	3,61	0,00	-0,19
AIM32	C7GS66	O	36	9,57	3,93	0,71	0,78
REX2	P54964	MM	30,9	9,28	9,59	0,71	0,89
ATP11	P32453	IM	36,8	9,12	0,15	1,81	0,28
ERG6	P25087	O	43,4	8,88	10,14	-0,15	-0,17
CYC1	P00044	O	12,2	8,17	1,57	-0,93	-0,20
ADH4	P10127	MM	41,1	8,15	4,24	0,83	-0,31
RIP1	P08067	IM	23,4	7,95	-0,02	8,47	0,25
DLD2	P46681	MM	59,2	7,88	2,37	-0,09	0,01
GUT1	P32190	O	79,8	7,87	-0,60	8,71	0,08
MRS4	P23500	IM	33,3	7,72	8,16	1,88	-1,09
HEM1	P09950	MM	59,3	7,33	2,50	-0,64	-0,70
PUS4	P48567	MM	45,2	7,03	1,82	-0,80	0,65
AIM9	P40053	O	72,4	6,71	5,04	0,32	0,26
ALT1	P52893	MM	66,4	6,55	3,68	0,06	0,10
FAU1	P40099	MM	24	6,42	6,35	6,93	7,11
LSC2	P53312	MM	46,9	6,41	5,49	0,05	-0,01
LSC1	P53598	MM	35	6,33	4,46	0,52	0,53
MTQ1	P53944	MM	35,8	6,24	1,74	6,76	-0,85
SCO2	P38072	IM	34,9	6,15	6,85	-0,57	-0,39
LEU4	P06208	MM	68,4	6,05	4,45	0,40	0,33
MSF1	P08425	MM	54,8	5,96	4,17	-0,20	-0,44
MEF1	P25039	MM	84,5	5,76	2,00	0,25	0,02
GCV3	P39726	MM	18,8	5,71	3,79	0,13	0,21
SCO1	P23833	IM	33,1	5,58	7,11	0,24	0,44
NFU1	P32860	MM	29,2	5,40	2,55	1,16	1,25
SSQ1	Q05931	MM	72,3	5,32	1,66	-0,92	-0,98
CYC3	P06182	IM	30,1	5,20	4,29	-1,02	-0,66

TUM1	Q08686	MM	34,2	5,20	5,54	1,20	1,30
MAS2	P11914	MM	53,3	5,11	3,55	-0,37	-0,35
CYM1	P32898	O	112,1	5,06	1,80	0,27	0,15
ACO2	P39533	MM	86,5	5,03	5,65	0,20	0,10
FUM1	P08417	MM	53,1	5,03	3,57	-0,53	-0,38
ADK2	P26364	MM	25,2	4,72	-0,60	0,78	-0,19
TIM23	P32897	IM	23,2	4,69	3,82	1,58	1,71
COX2	P00410	IM	28,5	4,65	4,92	2,40	3,54
COQ6	P53318	IM	53,5	4,54	2,03	-0,36	-0,37
IMO32	P53219	MM	38,5	4,54	4,19	-0,95	-0,59
CIR2	Q08822	IM	69,6	4,53	1,97	1,24	1,14
EHT1	P38295	O	51,2	4,51	6,83	0,39	0,18
MRX12	P47084	O	59,7	4,51	2,96	-0,55	-0,44
POS5	Q06892	MM	46,2	4,31	1,05	0,60	0,88
GEP7	P53171	O	32,9	4,27	4,43	0,41	0,29
ILV5	P06168	MM	44,3	4,18	2,91	-0,19	-0,16
AIM17	P23180	O	53,1	3,93	3,44	-0,21	-0,22
LIP2	Q06005	MM	37,2	3,89	2,90	-1,30	-1,24
QRI7	P43122	MM	45,5	3,76	0,80	-0,95	-1,80
YDR061W	Q12298	O	61,2	3,72	2,96	-0,84	-0,81
MSS51	P32335	IM	50,8	3,57	2,21	-0,32	-0,79
TOM70	P07213	O	70,1	3,42	4,13	-0,23	-0,35
MAS1	P10507	MM	51,1	3,29	2,14	-0,46	-0,48
ACO1	P19414	MM	85,3	3,28	2,15	0,07	0,15
GUT2	P32191	O	72,3	3,25	3,82	0,20	-0,03
MEF2	P39677	MM	91,2	3,16	1,67	1,48	1,08
LYS4	P49367	MM	75,1	3,06	2,73	-0,47	-0,43
TUF1	P02992	MM	47,9	3,05	1,96	-0,29	-0,31
VAS1	P07806	MM	125,7	3,05	0,79	1,03	0,99
FMP40	Q08968	O	78,3	2,94	1,69	-0,32	-0,36
ILV3	P39522	MM	62,8	2,93	2,77	-0,15	-0,24
Hsp60	P19882	MM	60,7	2,93	1,50	0,10	0,23
AIM45	Q12480	MM	36,8	2,92	1,93	0,34	0,26
YLF2	P38746	O	45,7	2,91	1,31	-0,35	-0,27
MCR1	P36060	O	34,1	2,90	3,65	0,47	0,56
COQ9	Q05779	IM	29,9	2,83	2,73	1,04	0,84
SDH1	Q00711	IM	70,2	2,65	1,66	0,39	0,35
PPA2	P28239	MM	35,6	2,64	2,39	-0,48	-0,40
ARH1	P48360	MM	56,2	2,63	2,65	-0,30	-0,16
CIR1	P42940	IM	28,7	2,57	2,35	0,23	0,40
YHB1	P39676	MM	44,6	2,55	2,79	-0,07	-0,17
ALO1	P54783	O	59,5	2,49	2,80	-0,64	-0,80
PRX1	P34227	MM	29,5	2,46	1,78	0,02	0,64
MPM1	P40364	IM	28,5	2,38	3,33	-0,39	-0,19
TIM50	Q02776	IM	55,1	2,33	2,24	-0,11	-0,17
SDH2	P21801	IM	30,2	2,23	0,84	0,09	-0,40

SLM3	Q12093	MM	47	2,18	0,48	-0,57	-1,00
TGL2	P54857	MM	37,5	2,15	2,45	-0,19	-0,53
TOM40	P23644	O	42	2,13	2,69	0,05	0,03
RIM1	P32445	MM	15,4	2,10	1,25	0,49	0,75
BAT1	P38891	MM	43,6	2,10	0,32	0,19	0,27
IDH1	P28834	MM	39,3	2,01	1,35	0,22	0,44
ICP55	P40051	IM	58	2,01	2,29	-0,77	-0,62
AIM22	P47051	O	47	1,99	0,88	1,51	0,61
ILV6	P25605	MM	34	1,98	1,86	-0,41	-0,48
SSC1	P0CS90	MM	70,6	1,92	0,29	-0,51	-0,52
ILV2	P07342	MM	74,9	1,85	2,34	0,34	0,49
BNA3	P47039	O	50,1	1,82	0,62	-0,05	0,00
SOV1	Q04748	O	104,7	1,81	0,43	3,08	1,84
IDH2	P28241	MM	39,7	1,77	1,13	0,05	0,18
YNL200C	P40165	O	27,5	1,74	1,64	7,58	8,11
ICL2	Q12031	MM	64,9	1,73	-0,89	3,51	0,61
COX11	P19516	IM	34	1,73	1,74	0,46	0,43
ALD4	P46367	MM	56,7	1,72	-0,24	0,04	-0,15
ATG33	Q06485	O	20,4	1,67	1,82	-0,71	-1,07
ILV1	P00927	O	63,8	1,66	1,50	-0,17	-0,23
QCR2	P07257	IM	40,5	1,65	1,37	-0,34	-0,17
MBA1	P38300	IM	31,8	1,62	2,50	0,83	0,68
COQ1	P18900	IM	52,5	1,61	1,90	-1,08	-1,00
GCV2	P49095	MM	114,4	1,61	-0,10	1,43	-0,22
CYB2	P00175	IM	65,5	1,56	8,83	-0,15	-0,17
YPL107W	Q02873	O	28,6	1,52	1,62	0,19	0,01
CBS2	P14905	MM	44,6	1,51	-0,79	0,15	-0,45
PKP1	P40530	MM	45,4	1,50	0,99	-0,01	-0,10
TIM44	Q01852	IM	48,8	1,48	1,94	-0,37	-0,43
DLD1	P32891	IM	65,3	1,46	0,94	-0,03	0,09
GGC1	P38988	IM	33,2	1,45	1,90	3,73	3,96
YJL045W	P47052	IM	69,3	1,40	0,73	-0,89	-1,22
PTC6	P25646	O	49,4	1,38	-0,01	-0,73	-0,31
YPL109C	Q02981	O	76,1	1,36	2,21	0,01	-0,62
YKR070W	P36151	O	39,4	1,30	1,48	0,13	0,28
MTF2	P10849	MM	51,2	1,26	0,28	-0,01	-0,23
TIM54	P47045	IM	54,1	1,23	1,50	0,07	0,06
COR1	P07256	IM	50,2	1,21	0,87	-0,40	-0,27
PIM1	P36775	MM	127	1,20	1,08	0,53	0,46
HEM14	P40012	IM	59,7	1,16	1,28	-0,53	-0,43
FMP52	P40008	O	25,1	1,15	1,35	2,69	2,51
SOD2	P00447	MM	25,8	1,09	0,27	1,23	1,10
ALD5	A6ZR27	MM	56,7	1,02	0,49	0,29	0,09
ATP4	P05626	IM	26,9	1,02	0,91	0,30	0,49
EHD3	P28817	MM	56,3	1,01	1,30	-0,78	-0,82
MSS18	P08593	O	30,9	0,97	0,05	0,24	-1,17

MTO1	P53070	MM	74,2	0,97	2,61	0,43	-0,22
YGR053C	P53234	O	32,2	0,95	0,80	1,10	1,03
POR1	P04840	O	30,4	0,89	0,91	0,49	0,40
ATP3	P38077	IM	34,3	0,88	0,76	0,23	0,58
TCD2	P36101	O	50,2	0,85	1,23	0,25	0,24
PTC5	Q12511	O	63,6	0,84	2,19	-0,61	-0,73
BNA4	P38169	O	52,4	0,75	0,75	-1,33	-1,52
CBR1	P38626	O	31,5	0,73	1,24	0,68	0,55
CYT1	P07143	IM	34	0,70	1,11	-0,17	0,17
MAM33	P40513	MM	30,1	0,69	-0,06	0,19	0,33
MTG1	Q03151	IM	42,1	0,68	-0,81	0,82	0,16
MRX8	Q05473	MM	35,6	0,66	0,37	8,87	9,21
ATP2	P00830	IM	54,8	0,64	-0,21	-0,88	-0,57
MDH1	P17505	MM	35,6	0,62	0,52	0,46	0,49
XDJ1	P39102	O	51,3	0,55	0,44	0,39	-0,11
MAE1	P36013	MM	74,3	0,54	0,44	-0,21	-0,24
ATP1	P07251	IM	58,6	0,53	-0,15	-0,62	-0,46
MNE1	P24720	MM	77,2	0,52	0,25	0,48	0,76
ISM1	P48526	MM	115,7	0,49	0,18	0,91	0,86
CIT3	P43635	MM	53,8	0,48	0,06	-0,42	-0,42
PUT2	P07275	MM	64,4	0,47	-0,59	-1,85	-0,66
TCD1	P38756	O	48,9	0,45	0,74	-0,73	-0,73
PET130	P47065	MM	39,8	0,42	-0,44	-1,63	-0,42
NCA2	Q12374	O	70,8	0,40	0,67	0,06	-0,06
LYS12	P40495	MM	40	0,33	-0,31	-0,89	-0,86
OMA1	P36163	IM	39,3	0,30	0,21	0,92	0,58
ETR1	P38071	MM	42	0,29	0,23	1,47	1,51
YME1	P32795	IM	81,7	0,29	0,94	-0,15	-0,49
AAC1	P04710	IM	34,1	0,27	0,73	2,53	2,82
MRX3	P38172	MM	30,5	0,26	0,49	0,31	0,34
ATP25	A6ZMF5	IM	70,4	0,26	0,40	1,37	1,10
COQ11	Q05892	MM	31,5	0,26	0,49	1,55	1,28
MRPL8	P22353	MM	26,9	0,23	0,31	1,06	0,95
MSR1	P38714	MM	73,6	0,23	-0,63	-1,44	-0,84
AIM39	Q08223	O	45,8	0,22	0,44	-0,42	-0,37
COQ4	O13525	IM	38,6	0,21	0,35	0,11	0,24
MRPL15	P36523	MM	28,2	0,20	0,23	0,16	0,36
MRX5	P47007	MM	44,8	0,20	0,77	-1,11	0,17
MRM2	P53123	MM	37,4	0,19	0,49	-1,08	-0,29
MSY1	P48527	MM	55,3	0,18	-0,16	0,02	-0,06
MIC60	P36112	IM	61	0,16	0,52	-0,25	-0,25
ARG5,6	Q01217	MM	94,8	0,15	0,23	-0,25	-0,25
ATP10	P18496	IM	32,1	0,15	0,24	0,28	0,23
CTP1	P38152	IM	32,2	0,13	0,21	0,56	0,33
ACH1	P32316	MM	58,7	0,09	-0,61	0,59	0,35
MRS1	P07266	MM	41,3	0,09	0,76	0,52	0,98

MRPL4	P36517	MM	36,9	0,09	0,10	1,29	1,05
PHB1	P40961	IM	31,4	0,08	0,18	0,86	0,94
MCX1	P38323	MM	57,9	0,06	-0,08	0,28	0,28
UBP16	Q02863	O	56,9	0,06	-0,24	0,70	0,20
MRPL17	P36528	MM	32,2	0,05	0,09	0,93	0,89
MRPL11	P36521	MM	28,5	0,04	0,10	0,58	0,51
PDH1	Q12428	O	57,6	0,03	-0,23	-0,29	-0,26
MRPL7	P36519	MM	33,1	0,03	0,20	1,46	1,84
MSC6	Q08818	MM	79,9	-0,07	0,09	0,28	0,18
SAM35	P14693	O	37,4	-0,08	0,41	0,40	0,14
YNR040W	P53736	O	28,6	-0,09	0,43	1,92	0,96
TOM71	P38825	O	71,8	-0,10	0,16	0,15	0,04
ATP23	A6ZS94	IM	26,9	-0,14	0,12	0,09	0,23
AIM46	A6ZTA5	O	34,1	-0,14	0,06	0,33	0,31
AIM25	P47140	O	37,5	-0,15	0,39	1,96	1,90
ORT1	Q12375	IM	31,5	-0,15	0,46	0,62	0,63
COQ8	P27697	O	56,7	-0,25	0,11	-0,46	-0,74
NDE2	Q07500	O	61,6	-0,31	0,65	-0,25	-0,37
YGR012W	P53206	O	42,8	-0,35	0,25	-0,32	-0,28
FBA1	P14540	MM	39,6	-0,46	0,50	0,20	-0,22
IDP1	P21954	MM	48,2	-0,49	0,30	2,82	1,82
AGC1	Q12482	IM	104,2	-0,55	0,21	0,66	0,72
FIS2							
(MDV1)	P47025	O	80	-0,70	0,24	-0,60	0,67
GPM1	P00950	O	27,6	-0,77	0,46	0,95	1,36
OSM1	P21375	MM	55	-0,99	0,09	-0,97	-0,65
MSP1	P28737	O	40,3	-1,14	0,47	-1,16	-0,91
AI4	P03878	MM	63,3	-2,29	1,26	6,32	3,67

Tabelle für aggregierende Proteine

In der Tabelle sind die aggregierenden Proteine aus dem Aggregations- und Disaggregationsexperiment aufgelistet. Die Proteine sind nach der Aggregation für Hsp78 in absteigender Reihenfolge aufgelistet. In Schwarz sind die Proteine eingefärbt, welche für beide Hsp78-Varianten aggregieren und in Grau die Proteine, welche nur für jeweils eine Variante aggregieren. Zusätzlich sind die Werte für die Disaggregation dieser Proteine angegeben.