
Intra-mitochondriale Proteinaggregatablagerung als Schutzmechanismus der mitochondrialen Qualität

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

MICHAEL BRUDEREK

an der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät,
Fachbereich Molekulare Biomedizin der



Rheinische
Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn

Bonn, September 2016

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Voos
2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Datum der Promotion: 21.12.2016

Erscheinungsjahr: 2017

Publikationen

Wissenschaftlicher Beitrag

Bruderek M., Jaworek W., Wilkening A., Rüb C., Cenini G., Sylvester M. & Voos W.. “IMiQC: a novel protein quality control compartment protecting mitochondrial functional integrity”. (eingereicht)

Cenini G., Rüb C., Bruderek M. & Voos W. (2016). “Amyloid β -peptides interfere with mitochondrial preprotein import competence by an aggregation process”. **MBoC** (akzeptiert).

Voos W., Jaworek W., Wilkening A. & Bruderek M. (2016). “Protein quality control at the mitochondrion”. **Essays in Biochemistry** (im Druck)

Preissler S., Reuther J., Koch M., Scior A., Bruderek M., Frickey T. & Deuerling E. (2015). “Not4-dependent translational repression is important for cellular protein homeostasis in yeast”; **EMBO Journal**; 34(14): 1905-24

Voos W., Rüb C. & Bruderek M. (2014). “Chaperones and proteases of mitochondria: From protein folding and degradation to mitophagy”. **The molecular chaperones interaction networks in protein folding and degradation**; pp 303-327

Herberth S., Shahriari M., Bruderek M., Hessner F., Müller B., Hülkamp M. & Schellmann S. (2012). “Artificial ubiquitylation is sufficient for sorting of a plasma membrane ATPase to the vacuolar lumen of Arabidopsis cells”. **Planta**; 236(1): 63-77

Präsentationen und Poster

“IMiQC: protein quality control compartment in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*”; 2016; Kurzvortrag; Annual BFB-meeting, Hennef

“Sequestration of mitochondrial protein aggregates at the nucleus allows maintenance of mitochondrial quality during proteotoxic stress conditions”; Bruderek & Voos; 2016; Posterpräsentation, EMBO-workshop “Organelle Contact Sites: Intracellular communication and role in disease”; Chia, Sardinien, Italien

“Sequestration of protein aggregates in yeast mitochondria”; Bruderek & Voos; 2015; Posterpräsentation; EMBO-meeting “Molecular chaperones: From molecules to cells and misfolding diseases”; Heraklion, Kreta, Griechenland

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Abstract	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2. Einleitung	5
2.1 Qualitätskontrollsysteme in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.1.1 Proteinbiosynthese und Proteinfaltung	6
2.1.2 Fehlfaltung und Aggregation	8
2.1.3 Proteinfaltung, Disaggregation und Rückfaltung durch das Proteinqualitätskontrollsystem	9
2.1.3.1 Hsp70-Chaperone und die Hsp40 Ko-Chaperonfamilie	10
2.1.3.2 Hsp60-Chaperone / Chaperonine	11
2.1.3.3 Hsp100-Chaperone	12
2.1.3.4 Kleine Hitzeschockproteine (sHSPs)	13
2.1.3.5 Proteinabbau durch Proteasen	14
2.1.3.6 Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System	14
2.1.3.7 Proteinabbau durch Autophagie	15
2.2 Ablagerung von Proteinaggregaten als Schutzmechanismus vor proteotoxischen Proteintypen	16
2.2.1 Bakterielle Ablagerungsstellen	16
2.2.2 Ablagerungsstellen in der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.2.3 Ablagerungsstellen in Säugetierzellen	20
2.2.4 Gemeinsamkeiten der Ablagerung von Proteinaggregaten	20
2.3 Modellproteine, die zur Untersuchung der Proteinqualitätskontroll-systeme verwendet werden.	21
2.4 Mitochondrien sind wichtige Bestandteile des zellulären Systems	23
2.4.1 Mitochondriale Importmaschinerie	26
2.4.1.1 In organello Import zur Untersuchung mitochondrialer Qualität	28
2.4.2 Mitochondriale DNA und mitochondriale Translation	29
2.5 Mechanismen der mitochondrialen Qualitätskontrolle	30
2.5.1 Intramitochondriales Proteinqualitätskontrollsystem	30
2.5.2 Zelluläre Schutzmechanismen von Mitochondrien	33
2.5.2.1 Mitochondriale Antwort auf ungefaltete Proteine	33
2.5.2.2 Mitochondriale Dynamiken: Fusion und Spaltung	34
2.5.2.3 Abbau des gesamten Organells	35

3.	Ziel der Arbeit	37
3.2	Effekte ungefalteter, mitochondrialer Proteine auf die Qualität und Funktionalität von Mitochondrien in der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
3.2	Konstruktion eines rekombinanten, fluoreszierenden Reporterproteins für den <i>in organello</i> Import in isolierten Mitochondrien	39
4.	Ergebnisse	41
4.1	Intra-mitochondriale Proteinaggregatablagerung als Schutzmechanismus der mitochondrialen Qualität	41
4.1.1	Destabilisierte Proteine formen das intra-mitochondriale Proteinqualitätskontrollkompartiment (IMiQC)	41
4.1.2	Die mitochondriale Proteinhomeostase bleibt erhalten in Anwesenheit destabilisierter Proteine durch die Formierung von IMiQC	48
4.1.3	Das mitochondriale Proteinqualitätskontrollsystem ist befreit von destabilisierten Proteinen durch Proteinablagerung in IMiQC	54
4.1.4	Die mitochondriale Qualität und Funktionalität bleiben erhalten durch die IMiQC-Formierung	57
4.1.5	Destabilisierte Reporterproteine beeinflussen Pim1-Funktionalität	64
4.1.6	IMiQC-Aggregate sind am Zellkern abgelagert um die asymmetrische Verteilung während der Zellteilung zu ermöglichen	67
4.1.7	Detoxifizierung und vollständige Formierung des IMiQC-Kompartiments benötigen Spaltung und Fusion der Mitochondrien	71
4.1.8	Amyloide Proteine werden nicht ins IMiQC-Kompartiment abgelagert	74
4.2.	Herstellung eines rekombinanten, fluoreszierenden Importproteins für den <i>in organello</i> Import in Mitochondrien der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78
4.2.1	GFP-ähnliche Fluoreszenzproteine können durch die ko-translationale Importreaktionen <i>in organello</i> in Mitochondrien transportiert werden	78
4.2.2	Herstellung eines rekombinanten fluoreszierenden Proteins, welches in isolierten Mitochondrien der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> importiert wird	80
5.	Diskussion und Ausblick	85
5.1.	Intra-mitochondriale Proteinaggregatablagerung als Schutzmechanismus der mitochondrialen Qualität	85
5.1.1.	IMiQC ist ein neues Proteinqualitätskontrollkompartiment in Mitochondrien von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
5.1.2	Dynamik und Lokalisation des IMiQC-Kompartiments	87
5.1.3	Funktion des IMiQC-Kompartiments in Mitochondrien	88
5.1.4	Beeinträchtigung der Pim1-Funktionalität durch IMiQC	91
5.1.5	Stabilität der Aggregatablagerung	91
5.1.6	Beteiligung der Komponenten des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems in der IMiQC-Formierung	92
5.1.7	Funktionelle Verbindung der mitochondrialen Dynamik mit der IMiQC-Formierung	93

5.1.8	Amyloide werden nicht in IMiQC abgelagert	94
5.1.9	Modell	95
5.2.	<i>In organello</i> Proteinimport eines fluoreszierenden Reporterproteins	98
6.	Materialien und Methoden	101
6.1.	Materialien	101
6.1.1	Chemikalien	101
6.1.2	Wachstumsmedien und generelle Puffer	101
6.1.3	Antibiotika, Induktoren, Inhibitoren und Stressoren	102
6.1.4	Enzyme und Antikörper	103
6.1.5	Farbstoffe, Kits und Marker	104
6.2.	Methoden	105
6.2.1	Plasmide und Klonierungen	105
6.2.2	Transformation in bakterielle Zellen	107
6.2.3	Proteinreinigung durch Sedimentation	107
6.2.4	Proteinrückfaltung nach Proteinreinigung	108
6.2.5	Hefestämme	108
6.2.6	Transformation in Hefe-Zellen	109
6.2.7	Sedimentation von Aggregaten	109
6.2.8	Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Hefezellen	110
6.2.9	Hefe-Wachstumstest mittels Spotttest	111
6.2.10	Wachstumsinhibitionstest	111
6.2.11	Membranpotenzialmessungen in Spheroplasten	111
6.2.12	Isolation von Mitochondrien aus <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	112
6.2.13	<i>In organello</i> Import von radioaktiv-markierten und fluoreszenz-markierten Proteinen in isolierten Mitochondrien	113
6.2.14	<i>In organello</i> Degradation von radioaktiv-markierten Protein in isolierten Mitochondrien	114
6.2.15	<i>In organello</i> Translation	115
6.2.16	2D-PAGE	115
6.2.17	Peptidvorbereitung und LC-MS	116
7.	Abkürzungsverzeichnis	118
8.	Abbildungsverzeichnis	120
9.	Literaturverzeichnis	122
10.	Danksagung	131

1. Zusammenfassung / Abstract

1.1 Zusammenfassung

Experimentelle Beobachtungen der letzten 10 Jahren zeigen zunehmende Evidenzen dafür, dass die aktive Zusammenlagerung von großen Proteinaggregaten einen höchst wirksamen Schutzmechanismus gegen proteotoxische Proteinsubtypen darstellt. Während kleine oligomere Proteinaggregate, durch Verlust ihrer Proteinfunktion sowie durch Auslösung weiterer Proteineaggregation, zu zellulären Schäden führen, wird vermutet, dass die induzierte Akkumulation in große Aggregatkompartimente eine Detoxifizierung dieser Oligomere bewirkt. In dieser Doktorarbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Detoxifizierung von ungefalteten Proteinen durch die Ablagerung von Proteinaggregaten in Aggregatkompartimente auch in Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* existiert. Diese Proteinaggregatablagerung wurde im Rahmen dieser Arbeit als intra-mitochondriales Proteinqualitätskontrollkompartiment (engl.: Intra-Mitochondrial Protein Quality Control Compartiment; IMiQC) definiert und charakterisiert. Vielfältige Analysen zur Proteinhomöostase sowie zur Mitochondrienfunktion in Anwesenheit eines destabilisierten Reporterproteins konnten zeigen, dass die Ablagerung geschädigter Proteine in IMiQC im Wesentlichen drei Aufgaben erfüllt. Erstens wird die mitochondriale Qualität und mitochondriale Proteinhomöostase in Anwesenheit großer Mengen ungefalteter Proteine erhalten. Zweitens führt die Zusammenlagerung ungefalteter und geschädigter Polypeptide zur Entlastung des primären Proteinqualitätskontrollsystems und erhöht dadurch die Fitness der Mitochondrien sowie des gesamten zellulären Systems. Drittens konnte beobachtet werden, dass die Separierung und Immobilisierung von Aggregaten am Zellkern eine asymmetrische Verteilung der geschädigten Proteine während der Zellteilung ermöglicht.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Ablagerung in IMiQC eine sich wiederholende Abfolge von mitochondrialer Spaltung sowie Fusion benötigt. Dies ist Voraussetzung für die erfolgreiche Detoxifizierung schädlicher Proteine und für die effiziente Ablagerung von Aggregaten am Zellkern.

Darüber hinaus ist es uns gelungen nachzuweisen, dass die IMiQC-Formierung nicht nur während der Überexpression destabilisierter Reporterproteine stattfindet, sondern auch mit endogenen mitochondrialen Proteinen während schwerwiegender Stresssituationen.

In einem zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde ein rekombinantes, fluoreszierendes Protein für den *in organello* Proteinimport in isolierten Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* konstruiert. Dadurch konnte ein erfolgreicher Ersatz für den mitochondrialen Import radioaktiver Substrate entwickelt werden.

1.2 Abstract

In the last decade, the active accumulation of large protein aggregate compartments has been described as a protective mechanism against hazardous subspecies of proteins. While small oligomeric aggregates possess the intrinsic tendency to cause proteotoxic effects, due to loss of function or to co-aggregation processes, formation of large protein aggregate compartments causes putatively detoxification of such small oligomeric aggregates. In this study it could be shown, that a detoxification mechanism due to induction of protein aggregate formation exists also in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In accordance with already existing nomenclature of similar aggregation sites, we called this aggregate deposition Intra-Mitochondrial Protein Quality Control Compartment (IMiQC).

Comprehensive analyses of mitochondrial protein homeostasis as well as their functionality in presence of destabilized reporter proteins were performed demonstrating, that the mitochondrial protein quality control compartment fulfills in principle three tasks. First, the mitochondrial quality and mitochondrial protein homeostasis are maintained also in presence of huge amounts of unfolded proteins. Second, the primary protein quality control system is relieved from unfolded proteins by IMiQC formation, which significantly increases the fitness of mitochondria as well that of the cellular system. Third, it could be observed that protein aggregates are separated and immobilized at the nucleus. This allows an asymmetric distribution of damaged proteins during cell division which guarantees efficient elimination of protein aggregates in a cell culture efficiently.

It could be demonstrated, that IMiQC formation depends on serial action of mitochondrial fusion and fission for sufficient detoxification of hazardous proteins and for efficient deposition at the nucleus.

Notably, we were able to show, that IMiQC formation does not take place only in presence of overexpressed destabilized reporter proteins, but also with endogenous mitochondrial proteins under severe stress conditions.

In a second part of this thesis, a recombinant and fluorescent protein for *in organello* protein import in isolated mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was constructed. This allows examination of mitochondrial import without necessity of using radioactively labeled substrates.

2. Einleitung

Der Begriff Stress leitet sich ursprünglich aus der englischen Sprache ab und bedeutet so viel wie Druck oder Anspannung. Auf den menschlichen Körper bezogen, ist Stress eine psychische und physische Reaktion, die durch spezifische äußere Reize hervorgerufen werden kann. Dabei kann eine Stresssituation auch eine positive Wirkung besitzen, indem die Leistungsfähigkeit eines Lebewesens erhöht wird. Andererseits jedoch können bei chronisch anhaltenden Stresssituationen körperliche und geistige Belastung sowie Krankheiten auftreten.

Stress ist jedoch nicht nur auf den gesamten Organismus bezogen, sondern findet schon auf kleinsten Ebenen, wie der molekularen und zellulären, statt. Innerhalb einer Zelle, eines Zellverbandes oder in Kompartimenten eines jeden zellulären Systems können Stresssituationen eine Schädigung der Proteinhomöostase verursachen. Dabei beschreibt der Begriff Proteinhomöostase die Regulationen der Proteinmenge, der korrekten Proteinlokalisierung sowie der posttranslationalen Modifikation individueller Proteine. Eine unausgeglichene Proteinhomöostase führt zu schweren Störungen der Proteinfunktionen, die sich wiederum auf die Qualität und Funktionalität von Kompartimenten und der ganzen Zelle auswirken. So sind bereits verschiedene Krankheiten mit Störungen der Proteinhomöostase in Verbindung gebracht worden, wie zum Beispiel Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Moreno-Gonzalez & Soto, 2011). Die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase auf kompartimentärer und zellulärer Ebene, sowie innerhalb eines Zellverbandes, vor allem unter Stressbedingungen, ist unter anderem eine der wichtigsten Herausforderungen eines jeden Organismus (Morimoto, 2011).

Ein wesentlicher Prozess der zum Erhalt der Proteinhomöostase von enormer Bedeutsamkeit ist, ist der Regulation der funktionellen Proteinmenge innerhalb der Zelle, die durch die Proteinbiosynthese, die korrekte Proteinfaltung sowie den finalen Proteinabbau gesteuert wird.

2.1 Qualitätskontrollsysteme in *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.1 Proteinbiosynthese und Proteinfaltung

Proteine werden durch Ribosomen synthetisiert, welche die genetische Information in eine lineare Abfolge von Aminosäuren übersetzen. Sobald die ersten Bereiche einer neu synthetisierten Polypeptidkette den ribosomalen Tunnel verlassen, beginnt der Prozess der Proteinfaltung durch Ausbildung erster Sekundärstrukturen (Eichmann et al., 2010), welcher jedoch erst nach Abschluss der Proteintranslation durch Ausbildung tertiärer sowie quartärer Strukturen im Zytoplasma beendet ist (Gloge et al., 2014). Der erfolgreiche Abschluss der Proteinfaltung in die native Form des Proteins ist essentiell für die korrekte Funktionalität innerhalb der Zelle. Die Information zur korrekten Faltung liegt bereits in der linearen Aminosäuresequenz eines jeden Proteins, da die tertiären und quartären Proteinstrukturen durch die Ausbildung von nicht-kovalenten Interaktionen innerhalb der Polypeptidkette erreicht wird. Tatsächlich wurde durch Anfinsen (Anfinsen, 1973) gezeigt, dass sich Proteine *in vitro* spontan in die richtige Struktur falten können ohne Hilfe zusätzlicher Faktoren. Jedoch ist die Situation *in vivo* ungleich komplizierter, da die spontane Faltung nur für recht kleine und einfache Proteine gilt. Zum einen ist die Anzahl der Konformationen, die ein Protein theoretisch einnehmen kann, zahlreich. Des Weiteren falten sich Proteine in der Zelle innerhalb von Sekunden (Gruebele, 2005, Kubelka et al., 2004) was gegensätzlich zu den Beobachtungen in den *in vitro* Experimenten ist. Schwerwiegend kommt hinzu, dass Proteine in der Zelle in einer molekular beengten Umgebung synthetisiert werden und daher ständig der Gefahr ausgesetzt sind unerwünschte Interaktionen mit zytosolischen Bestandteilen einzugehen. Zusammengefasst muss es in einer lebenden Zelle also Faktoren geben, welche die korrekte Faltung einer neu synthetisierten Polypeptidkette unterstützen und darüber hinaus inkorrekte Proteinfaltungen erkennen und aussortieren.

Neben der korrekten Faltung sind zudem die posttranslationale Proteinmodifikation sowie die richtige Lokalisation des Proteins von äußerster Notwendigkeit. Zum Beispiel müssen sekretorische Proteine in das Endoplasmatische Retikulum geschleust werden, während mitochondriale Proteine den Import in die Mitochondrien benötigen.

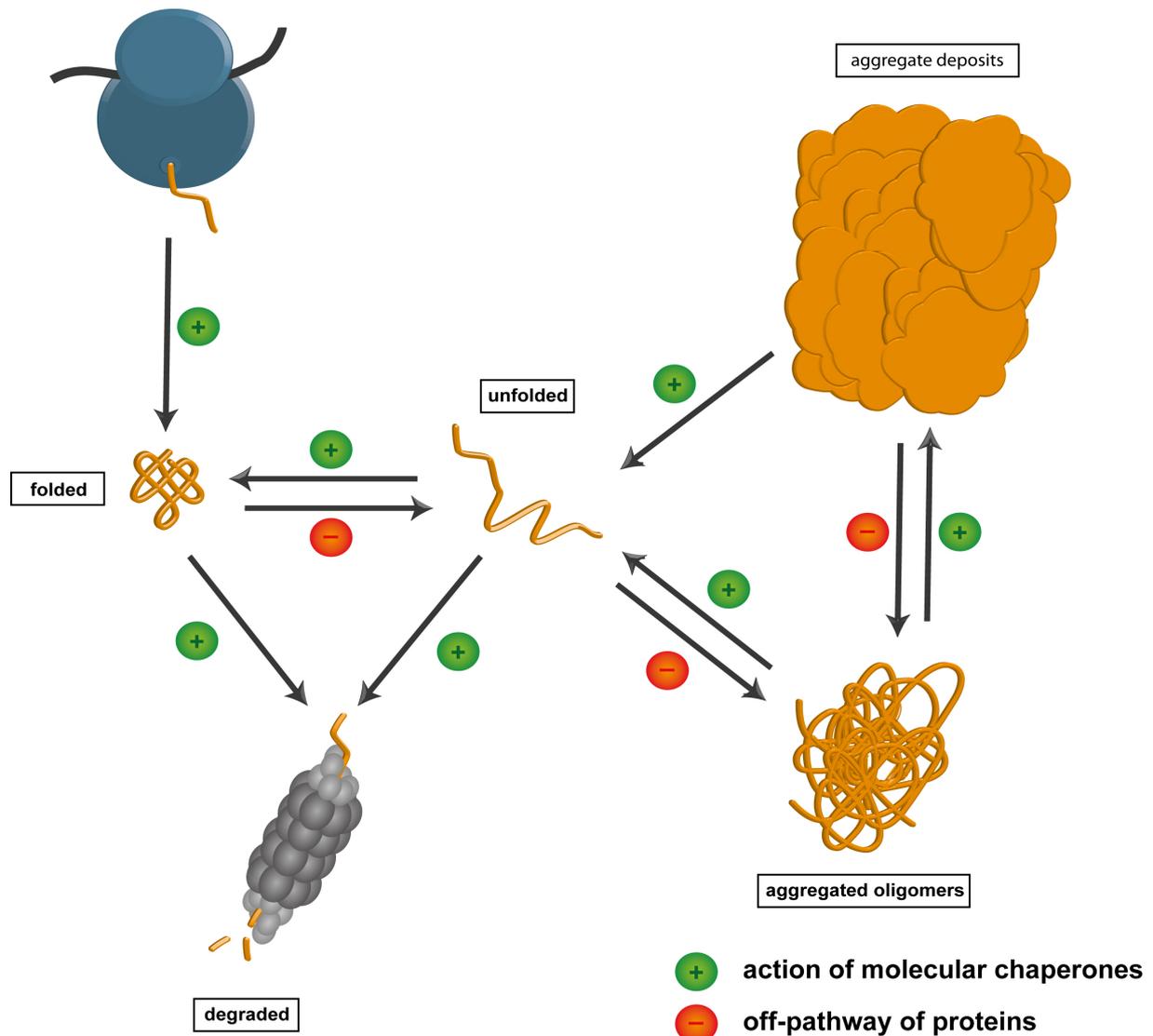


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Schicksals eines Proteins innerhalb seines Lebenszyklus. Die Polypeptidkette wird durch Ribosomen synthetisiert und faltet sich in ko- sowie post-translationalen Faltungsprozessen in die native Form. Proteine unterliegen innerhalb ihres Lebenszyklus ständigen Entfaltungen in partiell gefaltete oder ungefaltete Zustände. Polypeptide am Ende ihres Lebenszyklus oder Proteine, welche nicht mehr in die native Form gefaltet werden können, werden durch das Proteasom abgebaut. Im ungefalteten Zustand können Proteine jedoch auch Konformationen abseits ihrer Bestimmung einnehmen, da ungefaltete Polypeptidketten zur Aggregation neigen (rote Minuszeichen). Proteine formen zunächst kleine zytotoxische Aggregate, können jedoch durch zelluläre Prozesse in große Proteinaggregatablagerungen transportiert werden. Molekulare Chaperone begleiten Proteine während ihres gesamten Lebenszyklus (grüne Pluszeichen). Sie bewerkstelligen die Faltung sowie Rückfaltung, sind jedoch auch am proteolytischen Abbau beteiligt. Zudem ermöglichen molekulare Chaperone die Proteindisaggregation sowie die Ablagerung proteotoxischer Proteinoligomere in große Aggregatkompartimente.

2.1.2 Fehlfaltung und Aggregation

Die meisten Proteine müssen Veränderungen der Konformation durchführen um ihre biologische Funktion ausführen zu können. Aus diesem Grund ist die dreidimensionale Struktur der meisten Proteine eher flexibel und wenig stabil (Weibezahn et al., 2005). Durch ihre flexible Struktur durchlaufen Proteine während ihres Lebenszyklus einen ständigen Wechsel vom gefalteten in den ungefalteten Zustand wobei ebenso Zwischenfaltungsstufen durchlaufen werden (Abb. 1). Besonders häufig treten Entfaltungen bei Proteinen durch innere oder äußere Einflüsse auf: (i) Mutationen in der Gensequenz, die zu Proteinen führen, die nicht falten können (ii) Fehler während der Transkription und Translation, die zu instabilen Proteinen führen (iii) fehlerhafte posttranslationale Modifikation oder falsche Proteinlokalisierung (iv) Einflüsse der Umgebung wie Hitzestress, oxidativer Stress oder die Anwesenheit einer hohen Menge an Metallionen (v) Ko-Aggregationsmechanismen ausgehend von anderen bereits fehlgefalteten Proteinen (Papsdorf & Richter, 2014, Soto, 2001). In einer Situation, in welcher Proteine vermehrt im Zwischenfaltungszustand vorliegen präsentieren diese hydrophoben Aminosäureabschnitte an ihrer Oberfläche, welche normalerweise im Inneren des Proteins verborgen sind. Diese Exposition hydrophober Aminosäureabschnitte birgt eine hohe Gefahr der intramolekularen Fehlfaltung sowie der ungewollten Interaktion mit anderen Proteinen, welche sich ebenfalls im Zwischenfaltungszustand befinden. Diese ungewollten Interaktionen können zum Verklumpen der Proteine führen. Dieser Prozess wird allgemein als Aggregation bezeichnet und die Verklumpungen als Proteinaggregate. Dabei können sich Aggregate grundsätzlich in ihrer internen Organisation unterscheiden, die generell durch den Anteil an β -Faltblättern bestimmt wird (Tyedmers et al., 2010). Proteinaggregate mit niedrigem Anteil an β -Faltblättern zeichnen sich durch eine geringe innere Struktur aus und werden daher als amorphe oder ungeordnete Proteinaggregate bezeichnet. Diese Aggregate sind charakterisiert durch ihre SDS-Löslichkeit sowie durch ihre geringe Resistenz gegenüber Proteasen. Im Gegensatz zu amorphen Aggregaten sind amyloide Fibrillen durch einen hohen Anteil an β -Faltblättern gekennzeichnet. Sie besitzen eine hoch strukturierte interne Ordnung durch die Zusammenlagerung der β -Faltblätter in parallel oder anti-parallel angeordneten Fibrillen. Diese Proteinaggregate weisen eine hohe Proteasenresistenz sowie eine geringe SDS-Löslichkeit auf. Des Weiteren werden Aggregate anhand ihrer Größe klassifiziert. Ungefaltete oder fehlgefaltete Monomere fungieren als Startpunkt des Aggregationsprozesses und führen schnell zu einer Verklumpung von Dimeren bis zu kleineren Multimeren. Diese

Aggregatzwischenzustände (per Definition bis 24-mer) sind als Proteinaggregatoligomere beschrieben (Glabbe, 2006, Walsh & Selkoe, 2007). Bei Proteinaggregaten mit erhöhtem Anteil an β -Faltblättern vergrößern sich Oligomere mit zunehmender Zeit sowie ansteigender Proteinkonzentration zu Protofibrillen, Aggregate die bereits mittels Elektronmikroskopie nachgewiesen werden können, da diese Maße von 4 – 11 nm im Durchmesser und eine Länge von < 200 nm aufweisen (Walsh et al., 1999). Schließlich bilden sich amyloide Fibrillen, welche lange unverzweigte Strukturen mit etwa 10 nm Durchmesser bilden und einer Länge von bis zu einigen Mikrometern erreichen können (Nelson et al., 2005). Obwohl nicht so gut untersucht wie amyloide Fibrillen, wird bei amorphen Proteinaggregaten ebenfalls davon ausgegangen, dass diese Aggregatspezies eine ähnliche Reifung durchlaufen.

Es sei bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass scheinbar nicht die großen Aggregate proteotoxische sowie zytotoxische Auswirkungen auf das zelluläre System zu haben scheinen, sondern vielmehr die oligomeren sowie protofibrillären Proteinaggregatstrukturen. Zum einen lösen diese Aggregatsubtypen die Aggregation weiterer Proteine aus, welche wiederum schwere Auswirkungen auf das zytoplasmatische Reservoir funktioneller Proteine haben kann (Balch et al., 2008). Zum anderen interagieren Aggregatoligomere sowie Protofibrillen mit zellulären Membransystemen und können dadurch überlebenswichtige Funktionen behindern (Guardia-Laguarta et al., 2014).

Daher wurde in den letzten Jahren zunehmend beobachtet, dass das zelluläre System mit einem kontrollierten Aggregationsprozess auf die Anwesenheit kleiner oligomerer Proteinaggregatstrukturen reagiert, wenn primäre zelluläre Schutzmechanismen überfordert sind (Johnston et al., 1998, Miller et al., 2015b, Ventura & Villaverde, 2006). Dieser Prozess wird als Ablagerung von Proteinaggregaten bezeichnet (Abb. 1).

2.1.3 Proteinfaltung, Disaggregation und Rückfaltung durch das Proteinqualitätskontrollsystem

Proteine sind während ihres gesamten Lebenszyklus von der Biosynthese bis zum proteolytischen Abbau der Gefahr ausgesetzt nicht in ihrer funktionell nativen Faltung vorzuliegen. Wie bereits ausgeführt, könnte eine größere Menge un- oder fehlgefalteter Proteine zu schweren toxischen Effekten führen. Daher evolvierte ein Schutzmechanismus, der die richtige Faltung unterstützt und die Fehlfaltung sowie die daraus resultierenden Aggregate verhindert oder beseitigt (Abb. 1). Dieses System wird

Proteinqualitätskontrollsystem (engl.: protein quality control; PQC) genannt und beinhaltet die Aktivität von molekularen Chaperonen und Proteasen. Molekulare Chaperone sind definiert als Proteine, welche mit anderen nicht-nativen Polypeptiden interagieren um deren Überführung in den nativen Zustand zu assistieren (Bukau et al., 2006). Des Weiteren sind Chaperone in diverse Prozesse involviert, die dem Erhalt der Proteinhomöostase dienen. So sind Chaperone an der Rückfaltung von fehlgefalteten Proteinen, der Assemblierung von Proteinoligomeren, sowie an intrazellulären Proteintransport und proteolytischer Degradation beteiligt (Ellis, 2006, Hartl et al., 2011). Eine gemeinsame Eigenschaft, welche die meisten Chaperone teilen, ist die Bindung an hydrophobe Bereiche, die nur exponiert vorliegen, wenn das Substrat nicht vollständig gefaltet oder fehlgefaltet ist. Die Bindung an diese Regionen verhindert die ungewollte Interaktion der Substrate mit anderen hydrophoben Bereichen und fördert dadurch die Faltung in die native Struktur (James et al., 1997, Rudiger et al., 1997, Wegrzyn & Deuring, 2005).

Zusätzlich zu ihren konstitutiven Aufgaben bei der Sicherstellung der Proteinfaltung und -rückfaltung sind die meisten Chaperone zudem während proteotoxischen Stresssituationen aktiv und daher auf Ebene der Transkription verstärkt exprimiert. Aufgrund ihrer Funktion beim Erhalt der Proteinhomöostase stellen Chaperone die vorherrschende Klasse der Hitzeschockproteine (HSPs) dar (Richter et al., 2010). Im Wesentlichen können Chaperone in die zwei Kategorien „foldases“ und „holdases“ unterschieden werden, welche aus der Art ihrer Wirkungsweise hervorgehen. Während „holdases“ Chaperone bezeichnet, die unabhängig von Nukleotiden an Substraten binden (Mitglieder der Hsp40 und sHsp Familien), beinhaltet der Begriff „foldases“ Chaperone die ATP verbrauchen um mit den Substratproteinen zu interagieren (Chaperone der Hsp60, Hsp70 und Hsp90 Familien) (Richter et al., 2010). Nachfolgend sollen die wichtigsten Chaperonfamilien kurz vorgestellt werden.

2.1.3.1 Hsp70-Chaperone und die Hsp40 Ko-Chaperonfamilie

Hsp70-Chaperone sind wesentliche Komponenten innerhalb des zellulären Chaperonnetzwerkes. Sie dienen als Schaltstelle wichtiger Prozesse zum Erhalt der Proteinhomöostase. So sind Hsp70-Chaperone zum Beispiel in der Proteinfaltung neu synthetisierter Proteine, in der Rückfaltung fehlgefalteter Proteine, in der Disaggregation von Proteinaggregaten sowie in der Terminierung final geschädigter Proteine zum proteolytischen Proteinabbau involviert (Goloubinoff & De Los Rios, 2007, Preissler & Deuring, 2012,

Winkler et al., 2012b). Im Zytosol der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt es Mitglieder vier verschiedener Hsp70-Chaperonfamilien, sowie weitere Vertreter der Chaperonklasse in allen subzellulären Kompartimenten, wie zum Beispiel im Endoplasmatischen Retikulum und in Mitochondrien (Raviol et al., 2006, Benyair et al., 2011, Craig et al., 1989). Typische Hsp70-Proteine teilen eine ähnliche Struktur, welche aus einer N-terminalen ATP-bindenden Domäne (40 kDa) und einer C-terminalen Substrat-bindenden Domäne (25 kDa) besteht. Die Erkennung von Substraten erfolgt über kurze hydrophobe Peptidsequenzen, die von positiven Ladungen flankiert sind (James et al., 1997). Durch schnelle Zyklen von Bindung und Freigabe der Substratpolypeptide wird einerseits die Interaktion mit anderen Proteinen verhindert und andererseits das Substratprotein teilweise entfaltet, wodurch die Faltung in die richtige Struktur ermöglicht wird (Ben-Zvi et al., 2004). Der Zyklus der Substratbindung und -freigabe steht in direktem Zusammenhang mit der Hydrolyse von ATP. Die Bindung von Substraten wird durch den Verschluss der Substrat-bindenden Domäne stabilisiert, wobei ATP in der ATP-bindenden Domäne hydrolysiert wird. Durch die Freigabe von ADP wird die Substrat-bindende Domäne wieder geöffnet und ihre Affinität sinkt (Kityk, Kopp et al., 2012). Anschließend kann wiederum ATP binden und der Hsp70-Zyklus erneut ablaufen (Mayer & Bukau, 2005).

Zur Hydrolyse von ATP ist die Kooperation von Hsp70-Chaperonen mit ihren Hsp40 Ko-Chaperonen notwendig. Hsp40-Proteine werden allgemein auch als J-Proteine bezeichnet, da sie typischer Weise eine J-Domäne zur Stimulation der ATP-Hydrolyse des Hsp70-Proteins besitzen. Zusätzlich zur Stimulation sind manche Hsp40-Chaperone ebenfalls in der Lage Substratproteine zu binden und dem zugehörigen Hsp70-Protein zu präsentieren.

Ein weiterer Kofaktor für das Hsp70/40-System ist der Nukleotidaustauschfaktor (engl.: nucleotide exchange factor; NEF). Der Nukleotidaustauschfaktor begünstigt die Freisetzung von ADP und fördert dadurch die Freigabe des Substratproteins.

2.1.3.2 Hsp60-Chaperone/ Chaperonin

Für die erfolgreiche Faltung von Proteinen in ihre native Struktur ist neben dem zentralen Hsp70-Chaperon auch sehr häufig ein großer Chaperonkomplex nötig, welcher eine geschützte Umgebung zur Faltung von Proteinen bietet. Dieser Komplex wird als Chaperonin beziehungsweise Hsp60 bezeichnet (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Chaperonine sind 1 MDa große oligomere Komplexe, welche aus zweireihigen Ringen bestehen, die einen zentralen Hohlraum für Polypeptidketten bilden. Innerhalb des Hohlraums sind Polypeptidketten vor

zytosolischen Einflüssen geschützt und ihre Faltung wird somit unterstützt (Lopez et al., 2015). Chaperonine besitzen eine ATPase-Funktion zur Translokation ihrer Substratproteine. Ähnlich wie bei den Hsp70-Proteinen treten Chaperonine in allen Reichen des Lebens auf, wobei Prokaryoten und Kompartimente der Eukaryoten Chaperonine der Klasse I (Hsp60 in Bakterien, Mitochondrien und Chlorplasten) besitzen, während im Zytosol von Eukaryoten Chaperonine der Klasse II (TRIC/CCT) vorliegen (Horwich et al., 2007). Klasse I Chaperonine besitzen ein Ko-Chaperon namens Hsp10 (Xu et al., 1997), welches zur Verschließung des Hohlrums nach Substratbindung benötigt wird. Im Gegensatz zu Klasse I Chaperoninen, gibt es kein obligatorisches Ko-Chaperon bei Klasse II Chaperoninen.

2.1.3.3 Hsp100-Chaperone

Hsp100-Chaperone agieren abseits der Proteinfaltung. Aufgrund ihrer Fähigkeit mittels ATP-Hydrolyse Proteine aus der gefalteten Struktur in den ungefalteten Zustand zu überführen, sind Hsp100-Proteine hauptsächlich in der Proteinfaltung involviert. Da die Aktivität der Proteinumgestaltung entweder zur Rückfaltung oder zum proteolytischen Proteinabbau führen kann, sind Hsp100-Chaperone während proteotoxischen Stressbedingung von äußerster Wichtigkeit. Hsp100-Proteine gehören zu der Klasse der AAA+ ATPasen (ATPasen assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten), da ihre Struktur ein oder zwei AAA+ Module aufweist die jeweils eine Nukleotid-bindende Domäne (NBD) enthalten. Durch die Anzahl an Nukleotid-bindenden Domänen werden Hsp100-Proteine entweder in Klasse I Hsp100-Chaperone (eine NBD) oder Klasse II Hsp100-Chaperone (zwei NBD) unterteilt. Innerhalb einer Nukleotid-bindenden Domäne sind des Weiteren zwei spezifische Sequenzmotive enthalten, die als Walker A und Walker B bezeichnet werden. Während die Walker A Sequenz zur ATP-Hydrolyse gebraucht wird ist Walker B für die Substratbindung zuständig (Schirmer et al., 1996). Ein weiteres wichtiges Merkmal, welches die Chaperone in die Lage versetzt die Struktur eines Proteins zu verändern ist den Klasse I Hsp100-Chaperonen vorbehalten. Sie oligomerisieren zu einem hexameren ringförmigen Komplex, welcher eine intramolekulare Pore bildet. Während die die Oligomerisierung durch die zweite NBD bewerkstelligt wird, erfolgt eine Zugkraft durch die erste NBD, um das Substratprotein durch die Pore zu ziehen (Weibezahn et al., 2004)

Eine besonders wichtige Rolle innerhalb der Hsp100-Chaperonen übernehmen homologe Proteine des bakteriellen ClpB. Als Clp-Proteine werden bakterielle Proteine bezeichnet die Untereinheiten der caseinolytischen Peptidase darstellen. ClpB-homologe Proteine agieren

zusammen mit dem Hsp70/40-System in der Disaggregation und somit in der Rückfaltung und Reaktivierung von aggregierten Proteinen, wodurch ClpB-Homologe als Disaggregasen bezeichnet werden (DeSantis et al., 2012, Doyle & Wickner, 2009, Seyffer et al., 2012, Winkler et al., 2012a).

Obwohl ClpB-homologe Proteine eine wichtige Rolle zum Erhalt der Proteinhomöostase erfüllen fehlen entsprechende Proteine sowohl im Zytoplasma als auch in Kompartimenten der höheren Eukaryoten. Es wird vermutet, dass Hsp70-Chaperone in diesem Fall die Dissaggregationsaktivität übernehmen (Rampelt et al., 2012).

2.1.3.4 Kleine Hitzeschockproteine (sHsps)

Im Gegensatz zu den bereits vorgestellten Chaperonen, sind kleine Hitzeschockproteine (engl.: small heat shock proteins; sHSPs) „holdases“, die ATP-unabhängig an Substratproteine binden. Obwohl kleine Hitzeschockproteine weit verbreitet sind, stellen sie die heterogenste Chaperonfamilie dar. Sie unterscheiden sich stark in Größe sowie Sequenz, teilen jedoch die konservierte α -Krystallin-Domäne, welche im bekanntesten Vertreter α -Krystallin erstmals beschrieben wurde (Kriehuber et al., 2010, Horwitz, 2003). Kleine Hitzeschockproteine bilden typischerweise dynamische Oligomere, welche bis zu 24 Untereinheiten aufweisen (McHaourab et al., 2009). Sie binden eine große Anzahl komplett oder teilweise ungefalteter Proteine, um ihre Aggregation zu verhindern (Haslbeck et al., 2005). Zur Zeit wird davon ausgegangen, dass kleine Hitzeschockproteine ebenso als Sammelpunkte für ungefaltete Proteine dienen, um kleine oligomere Proteinaggregate zu detoxifizieren und anschließend ihre Rückfaltung durch Hsp100- und Hsp70-Chaperone zu fördern (Haslbeck et al., 2005). Neuste Erkenntnisse deuten darüber hinaus darauf hin, dass kleine Hitzeschockproteine bei der Ablagerung von Proteinaggregaten in spezifische Aggregatablagerungsstellen beteiligt sind (Miller et al., 2015a, Specht et al., 2011).

2.1.3.5 Proteinabbau durch Proteasen

Proteine, die am Ende ihres Lebenszyklus oder final geschädigt sind werden nicht länger in ihre native Struktur zurückgefaltet, sondern durch Proteolyse abgebaut. Dies geschieht in Bakterien und in Kompartimenten eukaryotischer Zellen durch Proteasen. Viele Proteasen, wie beispielsweise die bakteriellen Proteasen Lon und ClpP, sind ähnlich zu Hsp100-Chaperonen Mitglieder der AAA+ ATPase Proteinfamilie (Ambro et al., 2012). Sie bilden ebenfalls große ringförmige Proteinkomplexe, in deren Inneren Polypeptide in einer ATP-abhängigen Reaktion verdaut werden. Die meisten AAA+ Proteasen benötigen des Weiteren einen Kofaktor, Mitglieder der Hsp100-Chaperonfamilie, da Proteasen keine eigene interne Entfaltungsaktivität besitzen, sondern N-terminale, ungefaltete Bereiche des Substratproteins zur proteolytischen Aktivität benötigen. Die bakterielle Protease ClpP beispielsweise agiert zusammen mit verschiedenen Hsp100-Proteinen (ClpA, ClpC oder ClpX) (Thibault et al., 2006). Zusätzlich bestimmt der Kofaktor die Substratspezifität der Protease.

Bemerkenswert ist zudem, dass auch Proteasen während proteotoxischen Stresssituationen transkriptionell hochreguliert werden. Damit sind sie, ähnlich wie Chaperone, ein wesentlicher Bestandteil des Proteinqualitätskontrollsystems (Richmond et al., 1999).

2.1.3.6 Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System

Im Zytoplasma der Eukaryoten sind keine klassischen proteolytischen Proteasen vorhanden. Im Gegensatz zu Eubakterien wird der Proteinabbau von einem Markierungssystem übernommen, welches geschädigte Polypeptide oder Proteine am Ende ihres Lebenszyklus für den Abbau mittels linearer Ubiquitinketten markiert. Anschließend werden die polyubiquitinierten Proteine in einem proteolytischen Komplex degradiert (Abb. 1). Dieses Markierungssystem wird als Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) bezeichnet. Die Degradation wird hierbei durch das 26S Proteasom durchgeführt, welches aus einer proteolytischen 20S Untereinheit besteht und aus der regulatorischen 19S Untereinheit (in Bakterien fehlt diese Untereinheit). Das 20S Proteasom weist eine zylindrische Form auf, die aus vier Ringen mit jeweils sieben Untereinheiten aufgebaut ist. Dabei enthalten die äußeren Ringe α -Untereinheiten mit der ATPase-Funktion und die inneren Ringe β -Untereinheiten mit proteolytischer Funktion. Insgesamt wirkt die gesamte 20S-Untereinheit als multikatalytische Protease (Naujokat & Hoffmann, 2002). Die 19S-Untereinheit hingegen besteht aus sechs ATPase Untereinheiten, welche für die Öffnung des 20S Proteasomes, zur Entfaltung des

Substrates sowie für dessen Translokation verantwortlich sind (Grice & Nathan, 2016). Die Erkennung der Substratproteine via Polyubiquitinketten erfolgt über die Proteine Rpn10 und Rpn13. Substratproteine werden anschließend deubiquitiniert durch Proteasom-assoziierte deubiquitinierende Enzyme (DUBs), wie zum Beispiel Rpn11 oder Usp14.

Ubiquitin ist ein globuläres, etwa 7 kDa großes Protein, welches über eine Isopeptidbindung an Lysinen von Zielproteinen bindet. Polyubiquitinierung über Verknüpfung mehrerer Ubiquitinreste am Lysin 48 dient als Signal für den Proteinabbau. Die Markierung wird über eine Kaskade von E1, E2 und E3 Enzymen durchgeführt. Dabei ist der finale und spezifische Schritt die Ubiquitinierung des Zielproteins durch die E3-Ligase (Clague & Urbe, 2010).

Interessanterweise interagieren in Säugetierzellen zytosolische Hsp70-Proteine mit E3-Ligasen, wodurch eine direkte Verbindung der beiden Hauptzweige des Proteinqualitätskontrollsystems besteht (McDonough & Patterson, 2003).

2.1.3.7 Proteinabbau durch Autophagie

Als Autophagie bezeichnet man konservierte Prozesse, die neben dem proteolytischen Verdau durch Proteasen, zur Degradation von Proteinen führen. Generell wird die Autophagie in spezifische und unspezifische sowie in Mikroautophagie, Makroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie unterteilt (Wang & Klionsky, 2011). Ein wesentlicher Prozess der Autophagie ist die Bildung von Doppelmembranstrukturen, die Autophagosomen genannt werden und, abgesehen von der Mikroautophagie sowie Chaperon-vermittelte Autophagie, bei allen Autophagiearten ausgebildet werden. Dabei entstehen zunächst Phagophoren, die einen Teil des Zytoplasmas oder das Kargo umschließen und schließlich zu Autophagosomen reifen. Diese werden zur Vakuole (in der Hefe) oder zum Lysosom (in höheren Eukaryoten) transportiert, mit welchen sie verschmelzen was schließlich den Abbau des Kargo herbeiführt (Mizushima & Komatsu, 2011). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden bisher 35 verschiedene Proteine beschrieben, die in Zusammenhang mit Autophagie stehen. Diese Proteine werden als ATG- (autophagy related) Proteine bezeichnet (Kanki & Klionsky, 2010). Während 15 Proteine für die generelle Autophagiemaschinerie benötigt werden, vermitteln weitere ATG-Proteine die Spezifität, wie zum Beispiel ATG32 den Abbau von Mitochondrien reguliert. Durch selektive Autophagie kann der Abbau von komplexen zellulären Strukturen eingeleitet werden, wie von Ribosomen, Endoplasmatischem Retikulum oder Mitochondrien.

2.2 Ablagerung von Proteinaggregaten als Schutzmechanismus vor proteotoxischen Proteintypen

Das Auftreten von Proteinaggregaten in einer Zelle oder in Zellverbänden deutet zum einen auf eine schwere Schädigung der Proteinhomöostase hin und ist zum anderen ein Kennzeichen verschiedener Krankheiten, wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson. Jedoch wurde in den letzten Jahren immer mehr herausgearbeitet, dass nicht die großen amyloiden Fibrillen, wie zum Beispiel Plaques in Morbus Alzheimer, die proteotoxischen Arten der Proteinaggregate darstellen. Vielmehr scheinen die kleineren Zwischenstufen, wie Oligomere und Protofibrillen, schädigende Effekte auf die zelluläre Homöostase zu besitzen und die Krankheit hervorzurufen. Darüber hinaus wurden in allen Bereichen des Lebens bereits sehr spezifische Ablagerungsstellen für Proteinaggregate beschrieben, die zur Detoxifizierung von kleinen oligomeren Aggregaten dienen (Abb. 2). Dies ist nicht nur bei amyloiden Proteinaggregaten der Fall, sondern auch bei amorphen, thermolabilen Aggregaten. Somit scheint die Ablagerung von geschädigten Proteinen einen weiteren effizienten Schutzmechanismus darzustellen, der zum Erhalt der zellulären Proteinhomöostase dient und in Aktion tritt, wenn das primäre Proteinqualitätskontrollsystem ausgelastet ist.

2.2.1 Bakterielle Ablagerungsstellen

Während der Überexpression von rekombinanten Proteinen in Bakterien beobachtet man sehr häufig das Ausfallen und Aggregieren des gewünschten Proteins. Während dieser Effekt für die Proteinexpression und -aufreinigung ein Problem darstellt, ist es für das Bakterium ein Schutzmechanismus gegen die Schädigung der zellulären Homöostase (Kopito, 2000, Ventura & Villaverde, 2006). Darüber hinaus reagiert eine bakterielle Zelle mit der Induktion und der Ablagerung von Proteinaggregaten ebenfalls auf Hitze- sowie oxidativen Stresssituationen (Laskowska et al., 2004, Sabate et al., 2010). Die Ablagerung von geschädigten Proteinen erfolgt üblicherweise in ein oder zwei Inklusionskörpern, die an den Zellpolen lokalisiert sind (Abb. 2). Inklusionskörper können zwischen 1,5 % bis 3 % des kompletten Proteomes enthalten und bis zu 200 verschiedene Proteinspezies aufweisen (Winkler et al., 2010). Dabei scheinen Inklusionskörper amyloide Aggregatstrukturen zu bilden (Carrio et al., 2005, de Groot et al., 2009). Wie die Ablagerung der Proteinaggregate erfolgt ist bisher noch nicht komplett verstanden.

Verschiedene Studien deuten auf eine passive Diffusion geschädigter Proteine durch DNA-Ausschluss hin (Winkler et al., 2010), andererseits wurden jedoch auch energiegetriebene Ablagerungsprozesse beschrieben (Rokney et al., 2009). Die Ablagerung von Inklusionskörpern an spezifischen Stellen dient, neben der Detoxifizierung von geschädigten Proteinen sowie kleinen oligomeren Aggregaten, als Ausgangspunkt für die Auflösung und Rückfaltung von Aggregaten durch das bakterielle Proteinqualitätskontrollsystem. So wurde die Aktivität von bakteriellem Hsp70-Chaperon DnaK, Hsp100-Chaperon ClpB sowie von bakteriellen Proteasen an Inklusionskörpern beobachtet (Kirstein et al., 2008, Mogk et al., 1999, Vera et al., 2005).

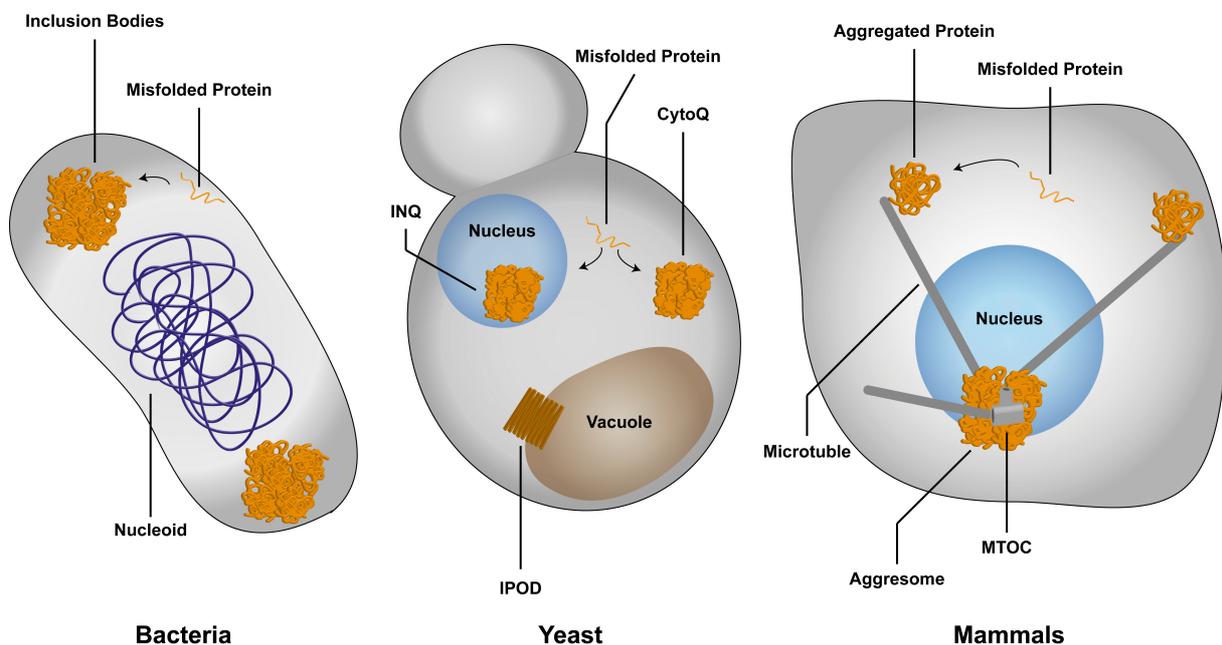


Abbildung 2: Proteinaggregatkompartimente existieren in allen Reichen des Lebens. Proteinaggregatkompartimente stellen konservierte Schutzmechanismen gegen proteotoxische Proteinsubtypen dar. In Bakterien werden bei Überexpression rekombinanter Proteine, fehlgefaltete Polypeptide in Inklusionskörpern abgelagert. Die Ablagerung erfolgt durch Nucleoid-Ausschluss zu den Zellpolen. In der Bäckerhefe werden amorphe Proteinaggregate in das kernlokalisierte Proteinaggregatkompartiment INQ oder in das zytoplasmatische Aggregatkompartiment CytoQ abgelagert. Amyloide Proteinaggregate, welche weder entfaltet noch abgebaut werden können, werden an der Vakuole immobilisiert und formen das Aggregatkompartiment IPOD. In Säugetierzellen werden fehlgefaltete und aggregierte Proteine über den Transport mittels Mikrotubuli am MTOC abgelagert und formen das Aggresom.

2.2.2 Ablagerungsstellen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden bereits vier verschiedene Ablagerungskompartimente von Proteinaggregaten beschrieben (Abb. 2). Diese Vielzahl unterstreicht dabei erneut die Vermutung, dass der Prozess der Aggregatablagerung ein wichtiger Bestandteil der Proteinqualitätskontrolle darstellt (Choe et al., 2016, Miller et al., 2015b). In welche der Ablagerungsstellen geschädigte und aggregierte Proteine transportiert werden, wird durch die Charakteristika des Proteins selbst bestimmt. Geschädigte Proteine, welche amorphe und unstrukturierte Proteinaggregate formen, verbleiben entweder im Zytoplasma und bilden die Proteinaggregatablagerungsstelle CytoQ oder werden in den Nukleus transportiert und als INQ (engl.: intranuclear quality control compartment) abgelagert (Kaganovich et al., 2008). CytoQ stellt dabei einen Sammelbegriff dar, der verschiedene zytoplasmatische Proteinaggregate umfasst, wie zum Beispiel Q-Körper oder Stress-Aggregate. Beide Subtypen der unstrukturierten Proteinaggregate, CytoQ und INQ, entstehen während proteotoxischer Stresssituationen, wie zum Beispiel erhöhter Temperatur, welche zur Entfaltung vieler Proteine führen. Insgesamt wurde für beide Ablagerungsstellen eine Dynamik beobachtet, bei der zunächst mehrere Proteinaggregate an verschiedenen Stellen entstehen, welche nach ein bis zwei Stunden ein großes Proteinaggregat bilden. Die Formierung der Proteinablagerung wird durch kleine Hitzeschockproteine reguliert. Diese binden an hydrophobe Aminosäureabschnitte der ungefalteten Proteine und fungieren als Ausgangspunkt zur Induktion von großen Proteinaggregaten. Für die Ablagerung von un- oder fehlgefalteten Proteinen in CytoQ wird die Aktion des kleinen Hitzeschockproteins Hsp42 benötigt (Specht et al., 2011). Hingegen bindet das kleine Hitzeschockprotein Btn2 geschädigte Proteine im Zytoplasma um diese in den Kern zu translokalisieren und dort die Bildung der Proteinaggregatablagerung zu fördern (Miller et al., 2015a). Warum proteotoxische Proteinsubtypen in den Kern transportiert werden um dort eine Ablagerungsstelle zu formen, ist bisher nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese postuliert, dass Proteinaggregate im Zytoplasma den nukleären Proteinimport stören können, während der Proteinimport vollständig intakt bleibt bei der Anwesenheit der Aggregate im Kern (Woerner et al., 2016). Das könnte nicht nur für Proteinimport in den Kern der Fall sein, sondern auch für weitere Importreaktionen anderer Kompartimente. Nach Abklingen der proteotoxischen Stresssituationen sind beide Ablagerungsstellen Ausgangspunkte für die Aktivität des Proteinqualitätskontrollsystems. Die klassischen Chaperone wie das Hsp70/Hsp40-System sowie die zytoplasmatische Dissaggregase Hsp104 sind in der Lage die

Entfaltung der Aggregate und die Rückfaltung der entfalteten Proteine einzuleiten. Zudem sind beide Aggregatablagerungen Ziel des Ubiquitin-Proteasom-Systems und können daher auch als Basis des proteolytischen Proteinabbaus dienen.

Hingegen werden Proteinaggregate, welche weder entfaltet noch abgebaut werden können, in einem dritten Proteinaggregat abgelagert. Diese Ablagerungsstelle ist an der Vakuole lokalisiert und wird als IPOD (engl.: insoluble protein deposit) bezeichnet (Escusa-Toret et al., 2013). Hauptsächlich werden in IPOD Proteine gelagert, welche amyloide Proteinaggregate mit hoher β -Faltblattstruktur bilden. Maßgeblich handelt es sich dabei um Prione, wie zum Beispiel die Hefeprione Rnq1 und Ure2.

Erst vor kurzem wurde ein Prozess der Aggregatablagerung beschrieben, welches neu synthetisierte Proteine beinhaltet und durch den ribosomassoziierten Proteinqualitätskontrollkomplex eingeleitet wird. Neu synthetisierte Polypeptidketten, welche nicht vollständig und korrekt translatiert werden können und bei denen die Translation anhält, beispielsweise durch den Verlust des Stoppcodons, werden unter physiologischen Bedingungen durch die ribosomassoziierte E3-Ligase Ltn1 für den proteolytischen Abbau markiert. In Situationen, in denen der Abbau der naszierenden Kette nicht mehr zur Qualitätssicherung ausreichend ist, werden diese Polypeptide mittels eines Alanin/Threonin-Anhangs für die Aggregation markiert (Choe et al., 2016, Yang, Hao et al., 2016, Yonashiro et al., 2016). Dabei ist besonders interessant, dass erstmals eine Modifikation beschrieben wurde, die aktiv zur Aggregation von geschädigten Proteinen führt.

Im Übrigen wurden ebenfalls Proteinaggregatablagerungen in Organellen beschrieben. Proteinaggregate, welche im Lumen der Peroxisomen entstehen werden in Proteinablagerungsstellen gesammelt und mittels Autophagie beseitigt (Manivannan et al., 2013).

Somit scheint die Ablagerung entfalteter Proteine in große detoxifizierte Proteinaggregate die zweite Stufe der Gegenwehr gegen proteotoxische Stresssituationen darzustellen.

2.2.3 Ablagerung in Säugetierzellen

Eine besondere Bedeutung scheint der Beobachtung einer Proteinaggregatablagerungsstelle in Säugetierzellen zuzukommen. Geschädigte Proteine die im Zytoplasma vorliegen werden durch Mikrotubuli mittels eines Dynein-abhängigen Transports zum Mikrotubuli-organisierenden-Zentrum (MTOC) transportiert (Garcia-Mata et al., 1999, Kopito, 2000) (Abb. 2). Dort wird durch die Zusammenlagerung der Proteinaggregate das Aggresom gebildet (Johnston et al., 1998). Ein wesentlicher Faktor zur Bildung ist die Histondeacetylase 6 (HDAC6) (Gamerding et al., 2011, Ouyang et al., 2012), welche als Verbindung von ubiquitinierten Substraten mit dem Transportprotein Dynein dient. Darüber hinaus wird durch die Rekrutierung von HDAC6 zu ubiquitinierten Substraten und die damit verbundene Entlassung aus dem HDAC6-Hsp90-Komplex die zelluläre Hitzeschockantwort ausgelöst. Das Aggresom wird nicht über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut, sondern mittels selektiver Autophagie, sogenannte Aggrephagie.

Interessanterweise wurde ebenfalls eine perinukleäre Lokalisation krankheitsrelevanter Proteinaggregate beobachtet, welche mit der Ablagerung im Aggresom korreliert werden kann. Dazu zählen Proteinaggregate gebildet aus α -Synuklein und Huntingtin, charakteristische Proteinaggregate der neurodegenerativen Krankheiten Morbus Parkinson und Chorea Huntington (Opazo et al., 2008, Tanaka et al., 2004, Waelter et al., 2001). Die Detoxifizierung sowie die Beseitigung durch Ablagerung neurotoxischer Proteinsubtypen in Proteinaggregaten scheint somit ein wesentlicher Mechanismus zum Schutz vor neurodegenerativen Prozessen zu sein.

2.2.4 Gemeinsamkeiten der Ablagerung von Proteinaggregaten

Insgesamt führen alle Formen der Proteinaggregatkompartimentierung zu drei wesentliche Eigenschaften, welche dem zellulären System wesentliche Vorteile verschaffen um proteotoxischen Stresssituationen entgegenzuwirken. Zum einen werden proteotoxische Effekte kleiner Proteinoligomere durch Bildung großer Kompartimente reduziert was den Erhalt der Proteinhomöostase erleichtert (Escusa-Toret et al., 2013, Weisberg et al., 2012). Darüber hinaus dienen Aggregatkompartimente der lokalen Akkumulation von geschädigten Proteinen, welche sowohl deren Ent- oder Rückfaltung als auch deren Eliminierung durch das Proteinqualitätskontrollsystem ermöglicht (Kirstein et al., 2008, Weibezahn et al., 2005). Ein wesentlicher Vorteil der Proteinaggregatablagerung ist letztendlich die Möglichkeit zur

asymmetrischen Verteilung der Aggregate während der Zellteilung (Aguilaniu et al., 2003, Spokoini et al., 2012, Tyedmers et al., 2010). In Vertretern aller Bereiche des Lebens konnte gezeigt werden, dass die Proteinaggregatkompartimente in der Mutterzelle verbleiben, während die jüngere Tochterzelle keine Aggregate enthält. Diese asymmetrische Verteilung erlaubt die effiziente Eliminierung von Proteinaggregaten in einer Zellkultur oder in einem Zellverband. In der Bäckerhefe *Sacchachormyces cerevisiae* wurden für die Zurückhaltung von Proteinaggregaten in der Mutterzelle verschiedene Mechanismen postuliert (Miller et al., 2015b). Zum einen wurde beschrieben, dass durch die Bindung von Proteinaggregaten an das Aktin-Zytoskelett die Zurückhaltung in der Mutterzelle sowie der retrograde Transport der Proteinaggregate erfolgt. Jedoch wird auch spekuliert, dass allein die Lokalisation der Aggregate an der Vakuole sowie im Kern ausreichend ist um eine Weitergabe an die Tochterzelle zu verhindern. Eine dritte Möglichkeit beschreibt die Bindung von zytosolischen Proteinaggregaten an der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums sowie der von Mitochondrien (Zhou et al., 2014). Durch die Bindung von Aggregaten an Kompartimente wird ihre Mobilität eingeschränkt wodurch sie während der Zellteilung in der Mutterzelle verharren. Dieses Modell setzt voraus, dass Mitochondrien geschädigte Stellen erkennen und zurückhalten. Tatsächlich ist bekannt, dass ältere sowie oxidativ gestresste Mitochondrien durch Transport über das Aktin-Zytoskelett in der Mutterzelle verbleiben. Wie bereits beschrieben muss jedoch der genaue Mechanismus dahinter näher aufgeklärt werden.

2.3 Modellproteine, die zur Untersuchung der Proteinqualitätskontrollsysteme verwendet werden.

Zur Analyse von Aggregationsprozessen und deren Auswirkungen sowie um die Funktion von Qualitätskontrollsystemen besser zu verstehen, werden Modellproteine mit intrinsischer Aggregationstendenz genutzt. Obwohl die meisten dieser Proteine keine physiologische Situation reflektieren, da sie weder natürliche Substrate von zellulären Proteinaggregaten sind noch in physiologischer Expression vorliegen, birgt die Überexpression dennoch Vorteile zur Erforschung von Aggregationseffekten auf zelluläre Systeme. Aggregationsmodellproteine werden entweder als detektierbare Fusionsproteine eingesetzt oder besitzen in sich eine bestimmte Eigenschaft, welche mittels zellbiologischen oder biochemischen Methoden nachweisbar ist. Als Fusionspartner werden häufig Fluorophore genutzt, wie zum Beispiel das grün fluoreszierende Protein (GFP) oder eines seiner Derivate. Hingegen bedarf Luziferase keines zusätzlichen Fluorophors, da sie die intrinsische Eigenschaft besitzt Licht in Form von

Biolumineszenz zu emittieren. Während aktive Luziferase gefaltet vorliegen muss und daher seine Aktivität bei der Bildung von Aggregaten verliert, kann die Fluoreszenz von GFP auch in Proteinaggregaten verfolgt werden. Neben der guten Nachweisbarkeit, ermöglicht die Expression von Modellproteinen zumeist auch eine Regulation des Proteinlevels durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren. Zudem kann die Expression zu bestimmten Zeitpunkten induziert sowie gestoppt werden, sofern die Expression des Modellproteins unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht. Somit kann zum Beispiel ein Aggregationsprotein für einen kurzen Zeitraum exprimiert werden um anschließend sein Schicksal nach einer zellulären Stresssituation nachzuverfolgen. Ein weiterer Vorteil der Expression von Modellproteinen ist zudem, dass Prozesse entdeckt und nachgewiesen werden können, die unter physiologischen Bedingungen entweder nicht nachweisbar oder durch weitere Prozesse komplementiert werden. Durch die Überexpression von Stressoren kann das zelluläre System in einen Zustand versetzt werden, in welchem die primären Schutzmechanismen überfordert sind und weitere Schutzmechanismen in Kraft treten.

Wie bereits beschrieben unterscheiden sich Aggregate in ihrer internen Struktur. Die Untersuchung amyloider Proteinaggregate und ihrer Auswirkungen wird häufig mittels Prionen durchgeführt (Halfmann et al., 2010). Prione sind selbst replizierende Proteinspezies, welche zur Aggregation neigen und hoch strukturierte Amyloide bilden (Wickner, Edskes et al., 2011). Die Besonderheit von Prionen liegt darin, dass bereits aggregierte und pathogene Prione andere Proteine derselben Familie zur Veränderung ihrer Struktur verleiten können was deren Aggregation einleitet (Marchante et al., 2013). Somit sind Prione auch Ausgangspunkt einiger neurodegenerativer Krankheiten, wie zum Beispiel der Creutzfeld-Jakob-Krankheit. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* existieren ebenfalls Prione, von denen Sup35 und Rnq1 zur Erforschung der Aggregationsdynamik sowie ihrer Auswirkungen besonders häufig verwendet werden (Nakayashiki et al., 2001, Serio & Lindquist, 2001). Ein weiteres Modellprotein, für amyloide Aggregation ist das erste Exon des krankheitsrelevanten Proteins Huntingtin (Dehay & Bertolotti, 2006, Duennwald, 2011). Huntingtin ist ein 348 kDa großes Protein und enthält im ersten Exon einen Bereich mit einer Abfolge von Glutaminen deren Länge von Genom zu Genom sehr stark variiert. Bei einer Aneinanderreihung von 5 - 38 Glutaminen ist die Struktur des Proteins stabil und funktionell, sie tendiert jedoch zur Fehlfaltung und Aggregation bei einer Verlängerung der Abfolge von über 40 Glutaminen (Barton et al., 2007, Krobitch & Lindquist, 2000). Huntingtin ist in seiner aggregierten Form das Protein, welches die neurodegenerative Krankheit Chorea Huntington auslöst (Orr & Zoghbi, 2007).

Um Dynamiken und Auswirkungen von amorphen und unstrukturierten Aggregaten zu untersuchen, werden thermolabile und destabilisierte Proteine genutzt. Dafür werden häufig Mutationen an spezifischen Stellen in das gewünschte Gen eingefügt um die Proteinstabilität negativ zu beeinflussen. Zur Erforschung der Qualitätskontrolle des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in *Saccharomyces cerevisiae* wird sehr häufig eine Mutante der Carboxypeptidase Y (CPY*, Gly255Arg) verwendet (Wolf & Schafer, 2005). Diese Mutante wird zwar in das ER importiert, sie wird aber nicht zur Degradation in die Vakuole transportiert. Die ersten Beschreibungen der Proteinaggregatablagerungen wurden hingegen mit einer thermolabilen Variante des nukleären Proteins Ubc9 (Ubc9_{ts}) durchgeführt (Betting & Seufert, 1996). Ubc9_{ts} ist unter physiologischen Bedingungen sehr kurzlebig, akkumuliert jedoch bei erhöhten Temperaturen in Proteinaggregaten.

Zusammengefasst unterliegt die Wahl eines Modellproteins, zur Analyse von Aggregatdynamiken und deren Auswirkungen verschiedenen Anforderungen: (i) welche Art der Aggregate soll formiert werden (amyloide oder amorphe); (ii) an welcher Stelle des zellulären Systems sollen die Aggregate entstehen (im Zytoplasma oder in einem Kompartiment) und (iii) welche analytischen Methoden sollen zur Detektion der Aggregate angewendet werden (zellbiologische oder biochemische).

2.4 Mitochondrien sind wichtige Bestandteile des zellulären Systems

Die Zelle ist ein komplexes System, welches für Wachstum und Teilung Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide oder Lipide aus kleinen Grundbausteinen bildet. Diese Polymere werden innerhalb der Zelle transportiert oder in große Komplexe eingebaut und müssen regelmäßig ersetzt werden um eine stabile Zellstruktur zu garantieren. Darüber hinaus sind einige Zellen in der Lage sich zu bewegen oder ihre Form zu ändern.

Um den Ablauf dieser Prozesse zu ermöglichen benötigen zelluläre Systeme Energie aus äußeren Quellen, welche in Form von ATP gespeichert wird. Während ein Teil der Energie bereits über den zytosolischen Reaktionsweg der Glykolyse fixiert wird, führt die oxidative Phosphorylierung innerhalb der Mitochondrien zur Steigerung der ATP-Produktion. In eukaryotischen Zellen bilden Mitochondrien ein tubuläres mitochondriales Netzwerk, wobei in *Saccharomyces cerevisiae* zwischen zwei und vier lange tubuläre Mitochondrien existieren, im Gegensatz zu mehreren Hundert in Säugetierzellen. Durch ihren endosymbiontischen Ursprung sind Mitochondrien von einer Doppelmembran umgeben. Zwischen der äußeren

und inneren mitochondrialen Membran befindet sich der Intermembranraum, während die innere Membran die mitochondriale Matrix umgibt. Eine Besonderheit der Innenmembran stellen Einschnürungen dar, als Cristae bezeichnet, welche die Membranoberfläche stark vergrößert. In ihr sind die Atmungskettenkomplexe verankert, welche für der ATP-Gewinnung in eukaryotischen Zellen verantwortlich sind. Sie besteht aus vier Komplexen, welche durch den Transfer von Elektronen einen Protonengradienten zwischen der Matrix und dem Intermembranraum etablieren. Protonen strömen aus dem Intermembranraum in die Matrix wobei Energie zur Verfügung gestellt wird. Diese wird durch die ATP-Synthase, welche ebenfalls in der mitochondrialen Innenmembran verankert ist, genutzt um aus ADP und anorganischem Phosphat ATP zu synthetisieren.

Interessanterweise ist der elektrochemische Gradient, welcher durch die Atmungskette aufgebaut wird, ebenfalls notwendig für den Import von mitochondrialen Vorläuferproteinen aus dem Zytoplasma.

Des Weiteren sind verschiedene metabolische Reaktionswege in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert, wie zum Beispiel wichtige Abschnitte des Lipid- sowie des Aminosäurestoffwechsels.

Mitochondrien sind jedoch nicht nur die „Kraftwerke“ der Zelle und isolierte Gebilde innerhalb des zellulären Systems. Vielmehr dienen Mitochondrien, neben der Energiegewinnung, zudem als Signalgeber oder Plattform für verschiedene regulatorische Prozesse. Bisher ist die Beteiligung von Mitochondrien in der Einleitung des intrinsischen apoptotischen Signalwegs wohl am besten untersucht (Hengartner, 2000). Extrazelluläre Signale sowie DNA-Schäden führen über proapoptotische Faktoren wie Bcl-2 zur Entlassung des mitochondrialen Proteins Cytochrom c in das Zytosol. Durch die dortige Anwesenheit von Cytochrom c werden apoptotische Mechanismen über das Apoptosom ausgelöst was letztendlich zum programmierten Zelltod führt.

Auch der Zellzyklus wird durch Faktoren reguliert, welche an Mitochondrien lokalisiert sind, wie die AMP-Kinase, welche zur Phosphorylierung von p53 führt und somit zum Arrest im Zellzyklus (Hardie, 2005, Jones et al., 2005).

Mitochondrien interagieren darüber hinaus auch mit dem Endoplasmatischen Retikulum und spielen daher eine wichtige Rolle zum Beispiel im Kalziumhaushalt (Hayashi et al., 2009, Kornmann, 2013).

Aufgrund ihrer Verflechtung innerhalb des zellulären Systems sind Mitochondrien auch häufig Ausgangspunkt schwerwiegender Krankheiten. So führen Mutationen in mitochondrial codierten Proteinen oder Schäden in der mitochondrialen Translation zu schwerwiegenden

Erkrankungen wie der Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (LHON) sowie zu Myopathie, Enzephalopathie, Laktatazidose und Schlaganfall-ähnliche Episoden (MELAS) (Vafai & Mootha, 2012). Ein weiterer wesentlicher Faktor, der zur Progression verschiedener Krankheiten beiträgt ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species; ROS), die während des Elektrontransports über die Atmungskette entstehen (Chen et al., 2016). Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Lage Proteine und Lipide dauerhaft zu schädigen und somit zum Ungleichgewicht der mitochondrialen Proteinhomöostase zu führen. So sind Autoimmunstörungen, kardiovaskuläre sowie neurodegenerative Krankheiten und Krebs mit der Produktion von ROS korreliert.

Da Mitochondrien darüber hinaus auch in regulatorischen Prozessen involviert sind, wie zum Beispiel im programmierten Zelltod oder in der Zellzykluskontrolle, können die Kompartimente auf der einen Seite Tumorbildung verhindern, jedoch bei Fehlverhalten ein auslösender Faktor zur Tumorbildung darstellen.

In den letzten Jahren kristallisierte sich die Rolle der Mitochondrien in der Ausbildung von neurodegenerativen Krankheiten besonders heraus (Yerbury et al., 2016). Eine schon länger bekannte Erkrankung dieser Art, die mit einer Dysfunktion der Mitochondrien korreliert ist, ist die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Die Krankheit steht im Zusammenhang mit Aggregation der Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) im Intermembranraum der Mitochondrien und führt zum Absterben von Neuronen, wobei der genaue Mechanismus nicht bekannt ist.

Weitere neurodegenerative Krankheiten, welche mit einer mitochondrialen Störung in Verbindung stehen, sind Morbus Parkinson (MP), hervorgerufen durch Defekte der mitochondrialen Autophagie (Guardia-Laguarta et al., 2014), und Morbus Alzheimer, welcher durch eine erhöhte ROS-Produktion in den Neuronen von Betroffenen gekennzeichnet ist. Darüber hinaus zeigen neuste Ergebnisse, dass A β -Aggregate, welche charakteristisch sind für diese Erkrankung, den Proteinimport in Mitochondrien negativ beeinflussen (Cenini et al., 2016; nicht publiziert) und somit die mitochondriale Proteinhomöostase nachhaltig beeinträchtigen.

2.4.1 Mitochondriale Importmaschinerie

Obwohl Mitochondrien aufgrund ihrer endosymbiontischen Herkunft ihre autonome Proteinbiosynthesemaschinerie erhalten haben, sind ca. 99 % aller mitochondrialer Proteine im nukleären Genom codiert wodurch sie von zytosolische Ribosomen translatiert werden (Dolezal et al., 2006). Daher müssen neu synthetisierte Proteine in die Mitochondrien importiert werden. Für einen erfolgreichen Import besitzen mitochondriale Proteine eine N-terminale Zielsequenz MTS (engl.: Mitochondrial Targeting Sequence). Obwohl mitochondriale Signalsequenzen sehr heterogene Aminosäureabfolgen aufweisen, zeichnen sie sich durch zwei entscheidende Eigenschaften aus: (i) sie sind zwischen 10 und 60 Aminosäuren lang und (ii) haben das Potenzial amphipatische Helices auszubilden, welche durch hydrophobe und positiv geladenen Aminosäureresten charakterisiert sind (Neupert & Herrmann, 2007). Da die meisten Resultate zur Beschreibung des mitochondrialen Proteinimports in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erlangt wurden soll im Folgenden auf die Importmaschinerie der Hefe eingegangen werden.

Die meisten mitochondrialen Proteine sind in der Matrix lokalisiert und müssen daher durch die äußere und innere Membran importiert werden. Sogenannte Preproteine, Proteine die noch im Zytoplasma vorliegen und die MTS enthalten, werden über den Tom-Komplex (engl.: Translocase of the outer membrane) und anschließend über den Tim23-Komplex (engl.: translocase of the inner membrane) in die Matrix transferiert (Becker et al., 2012) (Abb. 3). Dabei werden mitochondriale Proteine durch die Importrezeptoren Tom20 und Tom70 im Zytoplasma erkannt und durch die Translokase Tom40 an den Tim23-Komplex weitergegeben. Die Translokation durch Tim23 wird durch das Membranpotential, welches in der Atmungskette aufgebaut wird, forciert. Sobald die N-terminale Region des Importproteins die Matrix erreicht, wird das Protein durch das mitochondriale Hsp70-Chaperon Ssc1 gebunden und unter ATP-Verbrauch in die Matrix transferiert (Gambill et al., 1993). Dabei liegt das Hsp70-Chaperon in einem Komplex mit den membranständigen Proteinen Tim44 und Pam18 vor. Während Tim44 für die Rekrutierung des Hsp70 verantwortlich ist (von Ahsen et al., 1995), ist Pam18 das benötigte J-Protein zur Katalyse der ATP-Hydrolyse (Truscott et al., 2003). Interessanterweise, wird die Substratspezifität während des Importprozesses für das Hsp70-Chaperon nicht durch Pam18 sichergestellt, sondern durch das Zinkfinger-Protein Zim17 koordiniert (Lewrenz et al., 2013). Innerhalb der Matrix erfährt das Preprotein eine Abspaltung der Importsequenz durch MPP (engl.: mitochondrial-processing

peptidase) und liegt nach der Faltung in die native Struktur als maturiertes Protein vor (Gakh et al., 2002) (Abb. 3).

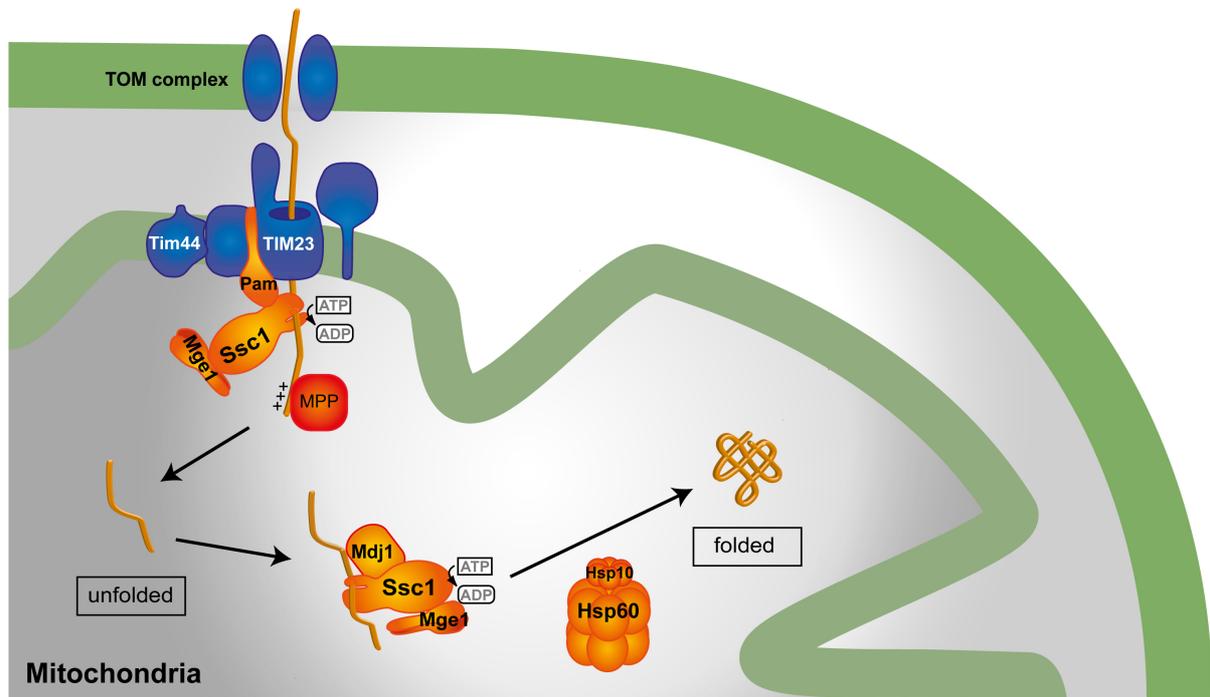


Abbildung 3: Schematische Abbildung der doppelten Funktion des mitochondrialen Hsp70 Chaperons Ssc1 in der mitochondrialen Matrix. Entfaltete Proteine werden aus dem Zytoplasma in die mitochondriale Matrix über den Tom- und Tim23-Komplex importiert. Sobald die erste Proteindomäne die mitochondriale Matrix erreicht bindet das Hsp70 Ssc1 an der ungefalteten Polypeptidkette. Ssc1 wird durch Interaktion mit Tim44 an die mitochondriale Innenmembran gebunden und führt unter ATP-Verbrauch in Kooperation mit den Faktoren Pam18 und Zim17 eine Zugkraft aus, wodurch die Polypeptidkette komplett in die mitochondriale Matrix transportiert wird. Nach vollständigem Proteinimport wird die ungefaltete Polypeptidkette durch das Zusammenspiel von Ssc1 und Hsp60 in den nativen Zustand gefaltet, wobei Ssc1 mit dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 sowie mit dem Hsp40 Ko-Chaperon Mdj1 kooperiert.

Einige Proteine, die für die mitochondriale Außenmembran bestimmt sind, werden ebenfalls über den Tom-Komplex eingebaut, jedoch nicht weiter in den Intermembranraum transloziert (Ahting et al., 2005). Proteine die als β -Fass in der äußeren Membran vorliegen benötigen neben dem Tom-Komplex noch einen weiteren Komplex, der als Sam-Komplex (engl.: sorting and assembly machinery) bezeichnet wird (Wiedemann et al., 2003).

Proteine, deren finale Lokalisation die innere mitochondriale Membran ist, werden mittels drei verschiedener Wege in diese eingebaut: (i) durch den Arrest der Polypeptidkette im Tim23 Kanal und den lateralen Transfer in die Membran, (ii) durch den alternativen Importkomplex, namentlich Tim22 oder (iii) durch die Membraninseratase Oxa1, welche Proteine nach dem vollständigen Import in die Matrix in die Innenmembran inseriert (Chacinska et al., 2009).

2.4.1.1 *In organello* Import zur Untersuchung mitochondrialer Qualität

Um den Transport in Mitochondrien zu untersuchen, wird eine etablierte Methode angewandt, die den Import von *in vitro* synthetisierten Proteinen analysiert. Dafür wird zumeist eine *in vitro* Transkription und Translation eines artifiziellen Fusionsproteins durchgeführt, welches eine N-terminale MTS enthält. Diese Reaktion wird in Anwesenheit von [³⁵S]-Isotopen durchgeführt, um das Protein radioaktiv zu markieren. In vielen Studien wird als mitochondriales Importprotein die bakterielle Dehydrofolatreduktase (DHFR) genutzt, welche entweder mit der MTS der Untereinheit 9 der ATPase aus *Neurospora crassa* oder mit der MTS des Hefeproteins Cytochrom B₂ fusioniert ist. Der erfolgreiche Proteinimport kann allgemein auf drei Wegen kontrolliert werden. Zum einen kann der Import zu unterschiedlichen Zeiten durch einen Anstieg der importierten Proteinmenge analysiert werden. Des Weiteren kann der Proteinimport zusätzlich mit Mitochondrien durchgeführt werden, welche kein Membranpotential mehr besitzen. Anschließend an eine Importreaktion können Mitochondrien mit Proteinase K behandelt werden, um zu testen, welche Proteine vollständig importiert und daher den Verdau der Proteinase K geschützt sind. Zur zusätzlichen Charakterisierung mitochondrialer Importreaktionen können Proben beispielsweise durch das Auftragen der Reaktionen auf ein natives Gel oder durch die Analyse mittels Massenspektrometrie weiter analysiert werden.

Jedoch hat der *in organello* Importansatz gewisse Nachteile. Zum einen kann nicht jedes Protein für den Import genutzt werden. So sind Fusionsproteine, welche ein GFP enthalten nicht für den *in organello* Import geeignet, da nach der Translation das GFP in seine native Struktur faltet und maturiert, wodurch die notwendige Entfaltung des Proteins während des Imports nicht mehr gegeben ist. Des Weiteren ist es nicht möglich die Importeffizienzen mittels radioaktiv markierter Proteine zu bestimmen, da man weder in der Substratsättigung arbeitet noch die Proteinmenge des Substratproteins kennt. Allerdings stellt sich auch der *in organello* Import von rekombinanten Proteinen als äußerst schwierig dar, da das Substratprotein nach bakterieller Überexpression häufig instabil ist.

2.4.2 Mitochondriale DNA und mitochondriale Translation

Mitochondrien haben im Laufe der Evolution ihre Unabhängigkeit fast vollständig aufgegeben, beispielsweise durch Gentransfer in den Zellkern der Wirtszelle oder durch zelluläre Regulation der mitochondrialen Teilung. Dennoch enthalten Mitochondrien noch immer eigene DNA, welche in mehreren Kopien als zirkuläres Genom vorliegt sowie ein eigenes System zur Transkription und Translation. Interessanterweise besitzt die Translationsmaschinerie der Mitochondrien eine Übersetzung des genetischen Codes die weder im eukaryotischen Zytosol noch in den meisten Bakterien gefunden werden kann. Dabei wird das Codon UGA nicht als Stoppkodon genutzt, sondern zum Codieren von Tryptophan. Zudem gibt zusätzlich zu den Stoppcodons UAA und UAG ebenso zwei weitere Codonsequenzen (AGG und AGA) die zur Termination der Translation führen (Anderson et al., 1981), was wahrscheinlich ein Relikt des prokaryotischen Ursprungs ist.

Insgesamt werden in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* acht Proteine durch das mitochondriale Genom codiert, während es in Säugetierzellen 13 Proteine sind (Ott, Amunts et al., 2016). Es wird spekuliert, dass diese Proteine nicht nukleär codiert vorliegen, da es sich um Proteine mit hydrophoben Bereichen handelt (von Heijne, 1986). Eine nukleäre Codierung würde den Proteinimport dieser hydrophoben Proteine erschweren.

Alle mitochondrial synthetisierten Proteine sind Mitglieder der Atmungskettenkomplexe und somit membranständig. Die Assemblierung und der Einbau dieser in die Innenmembran erfolgt ko-translational durch das Protein Oxa1 (engl.: protein oxidase assembly 1) durchgeführt (He & Fox, 1997, Hell et al., 1997). Sobald die naszierende Kette den ribosomalen Tunnel verlässt, bindet Oxa1 an die Polypeptikette und verhindert dadurch zum einen deren die Fehlfaltung in der Matrix und fördert zum anderen die vollständige Assemblierung in die Komplexe der Atmungskette.

Zusammengefasst sind Mitochondrien also wesentliche Bestandteile der eukaryotischen Zelle. Ein Verlust dieses Kompartiments oder dessen Funktion verursacht schwere Schädigungen viele zellulärer Prozesse oder sogar das Absterben der Zelle. Daher sind gut ausbalancierte Schutzmechanismen für den Erhalt der mitochondrialen Qualität unbedingt notwendig.

2.5 Mechanismen der mitochondrialen Qualitätskontrolle

Mitochondrien besitzen aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs die Möglichkeit die mitochondriale Qualität und Proteinhomöostase auf mehreren Ebenen zu überprüfen und zu schützen.

2.5.1 Intra-mitochondriales Proteinqualitätskontrollsystem

Die erste Stufe zur Antwort auf proteotoxische Stresssituationen in Mitochondrien ist, ähnlich wie im Zytosol sowie in anderen Kompartimenten, die Verhinderung der Fehlfaltung und der Aggregation, sowie die Disaggregation und der Abbau geschädigter Proteine. Diese wird in erster Linie durch das mitochondriale Proteinqualitätskontrollsystem bewerkstelligt. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* nimmt das Hsp70-Chaperon Ssc1 die zentrale Position im mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystem ein (Craig et al., 1987, Craig et al., 1989). Ssc1 ist ein typisches Mitglied der Hsp70-Chaperonfamilie, welches innerhalb der Mitochondrien zwei wesentliche Aufgaben übernimmt (Gambill et al., 1993) (Abb. 3). Zum einen erfüllt es die klassische Funktion eines Hsp70-Chaperons während der Faltung neu synthetisierter Polypeptide sowie in der Erkennung und Rückfaltung entfalteter und fehlgefalteter Proteine (Herrmann et al., 1994). Auf der anderen Seite ist Ssc1 auch im mitochondrialen Import neu synthetisierter Proteine involviert (Kang et al., 1990). Ähnlich zu bakteriellen und eukaryotischen Hsp70-Homologen wird die Aktivität von Ssc1 über den ATPase-Zyklus reguliert. Die Kofaktoren des Hsp70-Chaperons unterscheiden sich dabei je nach Funktion. Bei der Proteinfaltung interagiert Ssc1 mit dem Hsp40-Chaperon Mdj1 und dem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Bolliger et al., 1994, Voos et al., 1994). Mge1 dient auch als Kofaktor während des Proteinimports (Laloraya et al., 1994, Westermann et al., 1995), wohingegen die Funktion des J-Proteins bei diesem Prozess aufgeteilt vorliegt, wobei die Substratspezifität durch das Zinkfingerprotein Zim17 determiniert wird (Lewrenz et al., 2013), während die ATP-Hydrolyse durch das membranständige J-Protein Pam18 stimuliert wird (Liu et al., 2003). Zusätzlich ist Ssc1 auch in der Disaggregation im Zusammenspiel mit dem Hsp100-Chaperon Hsp78 (Krzewska et al., 2001) sowie in der Degradation zusammen mit der einzigen löslichen Matrixprotease Pim1 involviert (Wagner et al., 1994).

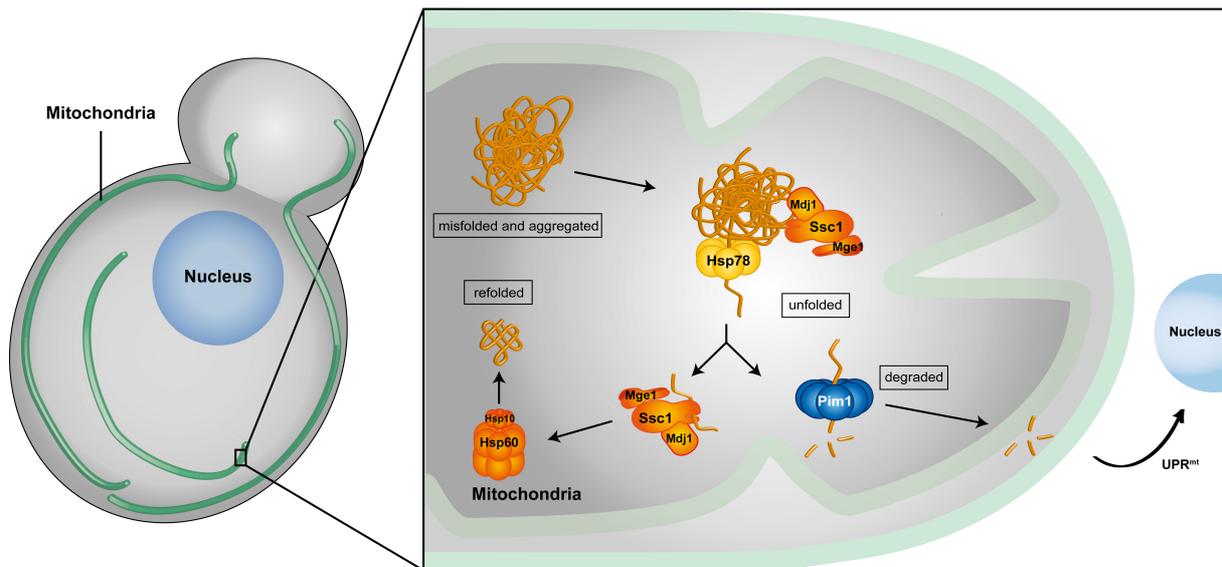


Abbildung 4: Proteinqualitätskontrollsystem in der mitochondrialen Matrix von *Saccharomyces cerevisiae*. Innerhalb der Bäckerhefe bilden Mitochondrien ein Netzwerk aus zwei bis vier mitochondrialen Schläuchen. Ihre Integrität bei proteotoxischen Stresssituationen wird innerhalb der Matrix durch das Proteinqualitätskontrollsystem geschützt. Entfaltete und aggregierte Proteine werden durch die Kooperation des Hsp70-Chaperones Ssc1 mit der mitochondrialen Hsp100-Disaggregase Hsp78 aus dem aggregierten Zustand in den entfalteten Zustand überführt. Das Schicksal der ungefalteten Polypeptidkette wird anschließend durch den grad der Schädigung des Proteins bestimmt. Polypeptidketten, welche nicht terminal geschädigt wurden, können durch das Hsp70/Hsp40-System in Zusammenarbeit mit Hsp60 in die native Faltung zurückgeführt werden. Final geschädigte Protein, welche nicht mehr in ihre funktionelle Konformation gefaltet werden können, werden durch die Matrixprotease Pim1 zu kleinen Peptiden abgebaut. Im Modelorganismus *C.elegans* führt der Export dieser kleinen Peptide, welche durch die dort anwesende Protease ClpP produziert werden, zum Herbeiführen eines retrograden Signalweges zur Regulation mitochondrialer Proteine, inklusive des mitochondrialen Chaperons Hsp60.

Zur Faltung neu importierter Polypeptide sowie während der Rückfaltung von fehlgefalteten Proteinen ist zusätzlich das Chaperonin Hsp60 in Mitochondrien anwesend (Hallberg et al., 1993). Als Homolog des bakteriellen Chaperonins ist das Hsp60 sehr ähnlich strukturiert und bildet einen oligomeren Komplex, welcher einen geschützten Hohlraum zur Faltung von Proteinen bildet. Ebenso ist in Mitochondrien das Ko-Chaperon Hsp10 vorhanden.

Der Proteinabbau von Matrixproteinen wird in Mitochondrien von *S. cerevisiae* durch die einzige Matrixprotease durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Lon-homologe AAA+ Protease, die als Pim1 bezeichnet wird. Auch in Mitochondrien bildet die Protease einen oligomeren Komplex mit proteolytischer Aktivität. Durch die Translokation der Polypeptidkette durch die zentrale Pore unter Verbrauch von ATP erfolgt der Verdau des Proteins (Bota & Davies, 2002). In der Innenmembran der Mitochondrien existieren noch zwei weitere AAA+-Proteasen. Während das proteolytisch-aktive Zentrum der Protease m-AAA der Matrix zugewandt ist, zeigt das aktive Zentrum der Protease i-AAA in den Intermembranraum (Bottinger & Becker, 2012). Beide Proteasen sind hauptsächlich für den Abbau von Proteinen der Innenmembran und des Intermembranraums zuständig.

In Säugetierzellen existiert noch eine weitere Matrixprotease, welche ein Homolog der bakteriellen Protease ClpP darstellt (Alexopoulos et al., 2012, Corydon et al., 1998). Der Kofaktor zur Entfaltung geschädigter Proteine ist das Hsp100-Chaperon ClpX (Corydon et al., 2000), welches auch in der Bäckerhefe vorhanden ist im Gegensatz zur fehlenden Protease ClpP.

Im Gegensatz zu Mitochondrien höher Eukaryoten kommt in den Mitochondrien der *S. cerevisiae* zudem ein Vertreter der ClpB-homologen Proteine vor welcher als Hsp78 bezeichnet wird (Leonhardt et al., 1993). Hsp78 agiert vor allem nach proteotoxischen Stresssituationen, indem es als Disaggregase von aggregierten Proteinen fungiert (Lewandowska et al., 2006). Obwohl Hsp78 eine hohe Homologie zu ClpB aufweist, ist es nur 78 kDa groß (Leidhold et al., 2006), da seine N-terminalen MTS nach erfolgreichem Import abgespalten wird. Bei der Hsp78-vermittelten Disaggregation werden Proteinaggregate in Kooperation mit dem Hsp70/Hsp40-Chaperonsystem erkannt und mittels der Translokation durch die Hsp78-Komplexpore unter Verbrauch von ATP in den entfalteten Zustand versetzt (Abb. 4) (Krzewska et al., 2001). Interessanterweise wird durch die Interaktion von Hsp78 während der Entfaltung das weitere Schicksal der Polypeptidkette entschieden. Solange Hsp78 mit dem Hsp70-Chaperon Ssc1 interagiert, wird die Rückfaltung der Polypeptidkette in ihre native Struktur gefördert (Germaniuk et al., 2002). Darüber hinaus ist auch die Löslichkeit von Ssc1 von der Aktivität von Hsp78 abhängig (von Janowsky et al., 2006). Im Gegensatz dazu werden bei einer Zusammenarbeit von Hsp78 mit der Matrixprotease Pim1 ungefaltete Polypeptidketten zu kleinen Peptiden abgebaut (Bateman et al., 2002, Rottgers et al., 2002). Die Entscheidung zwischen Rückfaltung und Abbau wird im Wesentlichen durch die Art des Stressors getroffen. Bei erhöhter Temperatur werden Proteine zwar entfaltet und deren Aggregationsprozess gefördert, jedoch sind sie nicht nachhaltig in ihrer Struktur geschädigt. Daher erfolgt in dieser Situation eher eine Rückfaltung in die native Struktur sobald die Stresssituation überstanden ist. Im Gegensatz dazu schädigt oxidativer Stress durch die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies die Proteinstruktur nachhaltig durch kovalente Modifikationen. In so einem Fall können geschädigte Proteine nicht in ihre native Struktur zurückgeführt werden und bedürfen des Abbaus durch die Protease Pim1 (Bender et al., 2010).

2.5.2 Zelluläre Schutzmechanismen von Mitochondrien

Mitochondrien können aufgrund ihres geschlossenen Reaktionsraums nicht nur mittels Proteinqualitätskontrollsystemen auf prototoxische Stresssituationen reagieren, sondern sind zudem in der Lage als gesamtes Organell der Schädigung der Proteinhomöostase und mitochondrialen Qualität entgegenzuwirken.

2.5.2.1 Mitochondriale Antwort auf ungefaltete Proteine

Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ist ein retrograder Signalweg vom Kompartiment zum Kern seit längerem beschrieben. Während einer proteotoxischen Stresssituation und in Anwesenheit von nicht-glykosylierten Proteinen im ER, wird eine Signalkette ausgelöst, welche zur transkriptionellen Regulation von ER-Chaperonen und Hitzeschockfaktoren führt um der Schädigung in diesem Kompartiment entgegenzuwirken. Dieser Mechanismus wird als „Antwort auf ungefaltete Proteine“ (engl.: unfolded protein response; UPR) bezeichnet (Benyair et al., 2011, Ron & Walter, 2007).

Erst in den letzten Jahren wurde ein retrograder Signalweg zur Regulation mitochondrialer Proteine beschrieben, der aufgrund von proteotoxischen Stresssituationen ausgelöst wird und zur Qualitätssicherung notwendig ist (Schulz & Haynes, 2015) (Abb. 4). In Anlehnung an den retrograden Signalweg im ER wird der mitochondriale Mechanismus „mitochondriale Antwort auf ungefaltete Proteine“ (engl.: mitochondrial unfolded protein response; UPR^{mt}) genannt. Obwohl ursprünglich zuerst in Säugetierzellen beschrieben, wurden die meisten Erkenntnisse bisher im Wurm-Modellorganismus *C. elegans* gewonnen (Martinus et al., 1996). Das aktuelle Modell UPR^{mt} beschreibt, dass durch die Anwesenheit eines Stressors, und das dadurch vermutliche erhöhte Auftreten ungefalteter Proteine, der Abbau von Polypeptiden durch die Matrixprotease ClpP/ClpX gesteigert wird (Haynes et al., 2007). Die dabei entstehenden Peptide werden anschließend über den Peptidtransporter Haf1 in den Intermembranraum transportiert (Haynes et al., 2010) und den Proteinimport über den Tim23-Komplex blockieren was wiederum als Stresssensor zur Induktion der Proteinexpression mitochondriale Proteine dient. Eine Reduktion des Proteinimports kann dabei auch durch andere Faktoren reguliert werden, beispielsweise durch Verlust des Membranpotentials. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors ATF5 (engl.: activating transcription factor associated with stress 1) ist schließlich der ausführende Faktor, welcher zur Induktion der mitochondrialen Stressantwort führt. ATF5 besitzt eine N-terminale mitochondriale Zielsequenz sowie eine C-terminale nukleäre Lokalisationssequenz und wird unter normalen

Bedingungen in die Mitochondrien importiert (Nargund et al., 2015). Innerhalb der Mitochondrien unterläuft der Transkriptionsfaktor direkt den proteolytischen Abbau. Durch eine Reduktion der Proteinimporteffizienz unter Stress akkumuliert ATFS1 im Zytosol wodurch es in den Kern transportiert werden kann, um dort die Transkription mitochondrialer Proteine, inklusive Mitglieder des Proteinqualitätskontrollsystems, zu induzieren.

Obwohl die transkriptionelle Regulation mitochondrialer Proteine in Anwesenheit von Stressoren ebenfalls in Säugetierzellen beobachtet werden konnte, scheint der Mechanismus zwischen dem Wurm-Modellorganismus und Säugetieren nicht konserviert zu sein (Arnould et al., 2015, Zhao et al., 2002). Hier scheint die Regulation mitochondrialer Proteine durch den Transkriptionsfaktor c-Jun determiniert zu sein, welcher selber durch die c-Jun N-terminale Kinase 2 (JNK2) aktiviert wird. Ein ATFS1-Homolog wurde in Säugetierzellen bisher nicht gefunden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Stresssituationen, wie Hitze, zur Aktivierung von HSF1 und SSBP1 führen und damit eine Hitzeschockantwort auslösen, die sowohl zelluläre als auch mitochondriale Komponenten positiv reguliert (Quiros et al., 2016). In der *S. cerevisiae* konnte bisher keine generelle Regulation mitochondrialer Proteine als Reaktion auf Stresssituationen beobachtet werden. Einzig das Hsp100-Protein Hsp78 wurde während erhöhter Temperatur in erhöhter Proteinmenge vorgefunden, während die Proteinmenge der Matrixprotease Pim1 unter oxidativem Stress erhöht ist (Bender et al., 2010).

2.5.2.2 Mitochondriale Dynamik: Fusion und Spaltung

Mitochondrien bilden innerhalb des zellulären Systems kein starres Gebilde. Vielmehr sind sie ein dynamisches Netzwerk, dessen Struktur eine hohe Mobilität aufweist und einer ständigen Veränderung durch wiederholte Abfolgen von Fusions- und Spaltungsprozessen unterworfen ist (Braun & Westermann, 2011). Diese mitochondriale Dynamik erlaubt eine schnelle und effektive Reaktion auf mitochondriale Schädigung und dadurch den erfolgreichen Erhalt der mitochondrialen Qualität. Dabei werden die dynamischen Prozesse der Fusion und der Spaltung durch die Aktivität von GTPasen durchgeführt (Hoppins et al., 2007). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* erfolgt die mitochondriale Spaltung durch die Rekrutierung Dynamin-ähnlicher Proteine der DRP-Proteinfamilie, zu der die Proteine Dnm1 und Fis1 gehören. Zur Spaltung werden Dnm1-Proteine durch Fis1 rekrutiert, welche anschließend einen spiralförmigen Komplex um die Mitochondrien bilden. Durch die schrittweise Einengung dieses Komplexes erfolgt die Abschnürung der äußeren sowie inneren

Membran (Ingerman et al., 2005). Meist erfolgt die Spaltung an mitochondrialen Stellen, die durch die Interaktion mit dem ER bestimmt werden (Westermann, 2011). Hingegen wird die Fusion von der äußeren mitochondrialen Membran durch das membranständige Protein Fzo1 (engl.: fuzzy onion) durchgeführt (Otera et al., 2013) und die Verschmelzung der Innenmembran durch Opa1 bewerkstelligt (Ishihara et al., 2006).

Die mitochondriale Fusion erlaubt hauptsächlich den Erhalt der mitochondrialen Genomintegrität (Osman et al., 2015). Dabei können DNA-Schädigungen sowie Mutationen einzelner DNA-Kopien, durch die Komplementation mit anderen DNA-Kopien ausgeglichen werden, sodass es nicht zur Produktion von fehlerhaften Translationsprodukten kommt. Hingegen setzt die Spaltung von Mitochondrien vermehrt in Stresssituationen ein, die zur Schädigung der mitochondrialen Proteinhomöostase führen und nicht mehr durch das Proteinqualitätskontrollsystem repariert werden können. Die Spaltung resultiert in einer Vielzahl an kleinen Mitochondrien und erlaubt den anschließenden Abbau geschädigter Mitochondrien durch mitochondrien-spezifische Autophagie (Mitophagie) (Twig et al., 2008, Youle & van der Bliek, 2012). Nicht-geschädigte Mitochondrien hingegen bleiben erhalten und leiten schließlich die mitochondriale Biogenese ein.

2.5.2.3 Abbau des gesamten Organells

Abgeschnürte und separierte Mitochondrien, die beispielsweise durch den Verlust der Importfunktion oder durch schwere Schädigung der Proteinhomöostase final geschädigt sind und nicht repariert werden, können nach Separierung vom mitochondrialen Netzwerk als vollständiges Kompartiment abgebaut werden (Wang & Klionsky, 2011). Dies erfolgt über die Mitochondrien-spezifische Autophagie, welche als Mitophagie bezeichnet wird. In diesem Prozess werden Mitochondrien mit einer Doppelmembran (Autophagosom) umhüllt und anschließend durch Verschmelzung mit lysosomalen oder vakuolären Membranen abgebaut. Dabei unterscheidet man generell zwei Formen der Mitophagie. In der Rezeptor-vermittelten Mitophagie werden autophagosomale Faktoren über Rezeptorproteine rekrutiert und damit die Bildung des Autophagosoms eingeleitet. In der Ubiquitin-vermittelten Mitophagie führt hingegen die Ubiquitinierung mitochondrialer Proteinen zur Bildung des Autophagosoms (Kanki & Klionsky, 2010, Narendra & Youle, 2011). Interessanterweise scheint die Rezeptor-vermittelte Mitophagie innerhalb regulatorischer Prozesse stattzufinden die während der Reifung von Zellen oder zur Anpassung an Umweltbedingungen notwendig sind. So wurde diese Art des mitochondrialen Abbaus zum Beispiel während der Reifung von Retikulozyten

zu Erythrozyten beschrieben, in denen Mitochondrien nicht mehr vorhanden sind (Kanki, 2010). Des Weiteren verläuft die Rezeptor-vermittelte Mitophagie in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* beim Übergang von der Wachstumsphase in die stationäre Phase, welche eine Art Dauerphase darstellt in der die Zellen wenige oder gar keine Kohlenstoffquellen mehr besitzen (Muller et al., 2015). Hingegen scheint die Ubiquitin-vermittelte Mitophagie hauptsächlich während proteotoxischen Stresssituationen oder beim Verlust der mitochondrialen Qualität abzulaufen (Durcan et al., 2014). Damit ist sie eine Form der mitochondrialen Qualitätskontrolle und dient dem Erhalt der mitochondrialen Homöostase (Kurihara et al., 2012). Sie wurde überwiegend in mehrzelligen Eukaryoten beschrieben und erst kürzlich in der Hefe entdeckt. Im Modellorganismus *S. cerevisiae* spielt die Ubiquitin-vermittelte Mitophagie nur eine untergeordnete Rolle, während sie die Hauptform der Mitophagie in Säugetierzellen darstellt (Kanki & Klionsky, 2010, Youle & Narendra, 2011).

3. Ziel der Arbeit

3.2 Effekte ungefalteter, mitochondrialer Proteine auf die Qualität und Funktionalität von Mitochondrien in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Mitochondrien sind wesentliche Bestandteile aller eukaryotischen Organismen und beherbergen essentielle Prozesse für die Entwicklung und das Wachstum zellulärer Systeme. Darüber hinaus stellen Mitochondrien komplexe Gebilde dar, welche zum einen aufgrund ihrer Doppelmembran eine komplizierte morphologische Struktur aufweisen und des Weiteren aufgrund ihrer endosymbiontischen Herkunft eigene Transkriptions- sowie Translationsmaschinerien besitzen. Aus diesen Gründen ist die mitochondriale Qualität und Funktionalität für das gesamte zelluläre System von äußerster Wichtigkeit. Dies wird durch Beobachtungen gestützt, welche schwere Krankheiten mit Schäden der mitochondrialen Funktion assoziieren. Besonders bekannte Erkrankungen sind dabei Friedreich Ataxie und MELAS. Zudem wurden auch neurodegenerative Krankheiten wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson mit mitochondrialer Schädigung in Verbindung gebracht.

In den meisten Studien zur Untersuchung mitochondrialer Schädigungen werden hauptsächlich die Auswirkungen und Reaktionen untersucht, welche mit sehr spezifischen Defekten korrelieren. Zumeist stehen dabei Schädigungen der mitochondrialen DNA oder der Verlust des Membranpotentials und die damit verbundene Reduktion des Proteinimports im Fokus. Hingegen ist nur wenig über die Auswirkung genereller proteotoxischer Stresssituationen bekannt, während derer häufig erhöhte Mengen geschädigter und ungefalteter Proteine in der mitochondrialen Matrix auftreten.

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher im Wesentlichen in der Erforschung und Aufklärung proteotoxischer Effekte ungefalteter sowie potentiell schädlicher Proteine auf die mitochondriale Qualität und Funktionalität. Darüber hinaus standen auch Reaktionen des mitochondrialen sowie zellulären Systems auf ungefalteter Proteine im Fokus, welche eingeleitet werden um proteotoxischen Auswirkungen entgegenzuwirken.

Wichtige Fragen waren:

Was geschieht in der mitochondrialen Matrix mit destabilisierten Proteinen sowie Proteinen die eine starke Tendenz zur Aggregation aufweisen?

Wie wirken sich große Mengen destabilisierter sowie aggregierter Proteine auf die mitochondriale Proteinhomöostase aus?

Wird die mitochondriale Qualität und Funktionalität im zellulären System durch die Anwesenheit destabilisierter sowie aggregierter Proteine beeinträchtigt?

Führt eine mögliche Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion zur Schädigung des gesamten zellulären Systems oder sogar zu zytotoxischen Effekten?

Gibt es Schutzmechanismen, um destabilisierten und potentiell schädlichen Proteinen entgegenzuwirken?

Unterscheiden sich die Auswirkungen und mitochondriale Reaktionen in Anwesenheit amyloider Aggregate im Vergleich zu amorphen Proteinaggregaten?

Um diesen Fragen im Detail zu nachzugehen, wurden umfangreiche Analysen zur Auswirkung geschädigter Proteine, welche in der mitochondrialen Matrix lokalisiert waren, auf drei verschiedenen Ebenen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt: (i) auf molekularer, (ii) auf kompartimentärer und (iii) auf zellulärer Ebene. Auf molekularer Ebene wurde im Wesentlichen mittels biochemischen Analysen die Beeinflussung des mitochondrialen Proteoms untersucht., während auf kompartimentärer Ebene durch biochemischen und zellbiologischen Methoden die Funktionalität der betroffenen Mitochondrien analysiert wurde. Auf zellulärer Ebene wurde das Schicksal betroffener Mitochondrien und ihre Auswirkung auf das Zellwachstum untersucht. Für diese Studien wurden amorphe sowie amyloide Subtypen von Proteinaggregaten eingesetzt.

3.2 Konstruktion eines rekombinanten, fluoreszierenden Reporterproteins für den *in organello* Import in isolierten Mitochondrien

In einen zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollte ein rekombinantes fluoreszierendes Substratprotein zum mitochondrialen Proteinimport konstruiert werden, welches *in organello* sowie *in vivo* verwendet werden kann. Eine Analyse von fluoreszenz-basiertem Import würde zum einen die radioaktive Markierung von Substratproteinen mittels [³⁵S]-Methionin ersetzen und zum anderen eine Quantifizierung der Importeffizienz ermöglichen.

Wichtige Fragen waren:

Kann der in organello Import mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP oder eines seiner Derivate durchgeführt werden?

Welche Alternativen kann man zum grün fluoreszierenden Protein GFP konstruieren?

*Kann das konstruierte fluoreszierende Fusionsprotein in Mitochondrien, isoliert aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder aus Säugetierzellen, importiert werden?*

Zur Überprüfung dieser Fragen wurden im Wesentlichen standardisierte Methoden der Klonierung sowie spezialisierte Methode der *in organello* Importreaktion in isolierten Mitochondrien angewandt.

4. Ergebnisse

4.1 Intra-mitochondriale Proteinaggregatablagerung als Schutzmechanismus der mitochondrialen Qualität

4.1.1 Destabilisierte Proteine formen das intra-mitochondriale Proteinqualitätskontrollkompartiment (IMiQC)

Um die Sensitivität der mitochondrialen Homöostase in Anwesenheit aggregationsanfälliger Proteine zu untersuchen, konstruierten wir ein Fusionsprotein, welches das grün fluoreszierende Protein (GFP) und das Mausprotein Dihydrofolatreduktase (DHFR) enthielt. Dabei wurden drei Mutationen (Cys7Ser; Ser42Cys; Arg49Cys) an spezifischen Stellen in die DHFR eingefügt, welche für die Stabilität des Proteins benötigt werden, um eine destabilisierte (ds) Mutante zu generieren. Zur erfolgreichen Lokalisation des Fusionsproteins in der mitochondrialen Matrix enthielt das Protein zusätzlich die N-terminale mitochondriale Zielsequenz (engl.: mitochondrial targeting sequence; MTS) des hefespezifischen Proteins Cytochrom *b2* (Abb. 5A). Das Fusionsprotein wird im Folgenden als *mtGFP-DHFR_{ds}* bezeichnet. Durch Faltungsschwierigkeiten, welche durch die Mutation in der DHFR verursacht wurden, diente das Fusionsprotein als Reporter zur Analyse der Reaktionen auf geschädigte und ungefaltete Proteine in Mitochondrien des Modelorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (von Janowsky et al., 2005). Als Kontrollproteine wurden zwei mitochondriale Fusionsproteine verwendet, welche entweder GFP mit der wildtypischen DHFR (*mtGFP-DHFR*) oder nur das GFP (*mtGFP*) enthielten. Beide Proteine wiesen zudem die N-terminale MTS zur mitochondrialen Lokalisation auf.

Die Expression aller GFP-Fusionsproteine stand unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors und ihre Induktion führte zu ansteigenden Proteinlevel innerhalb von 24 Stunden (Abb. 5B).

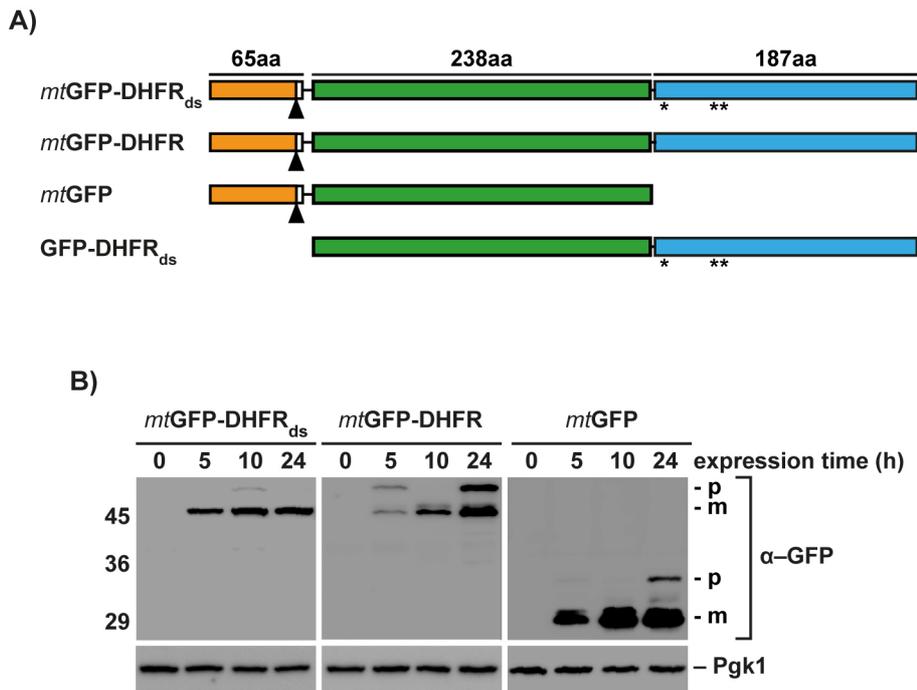


Abbildung 5: Expression aggregationsanfälliger Reporterproteine. A) Schematische Abbildung des destabilisierten Reporterkonstrukts *mtGFP-DHFR_{ds}* und der korrespondierenden Kontrollkonstrukte *mtGFP-DHFR*, *mtGFP* und *GFP-DHFR*. Dargestellt sind die mitochondriale Zielsequenz (orange), die GFP-Domäne von *A. victoria* (grün) und die DHFR-Domäne von *M. musculus* (blau). Destabilisierende Mutation in der DHFR-Domäne sind markiert (*). B) Expression des destabilisierten Reporterproteins *mtGFP-DHFR_{ds}* und der Kontrollproteine für die angegebenen Zeitpunkte. Proteinlevel wurden mittels Western Blot und Immunodekoration mit Antikörpern gegen GFP analysiert. Das zytosolische Protein Pgk1 wurde als Ladekontrolle verwendet. Das Preprotein (p) und das importierte matrierte Protein (m) der Reporterproteine sind gekennzeichnet.

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation wurden Mitochondrien aus den entsprechenden Expressionsstämmen isoliert. Nach der Isolation der Mitochondrien waren alle Reporterproteine gegen die externe Behandlung mit Proteinase K resistent, ähnlich wie das mitochondriale Innenmembranprotein Tim23. Hingegen wurde das Außenmembranprotein Tom40 erfolgreich durch Proteinase K verdaut, welches die effiziente Behandlung demonstrierte (Abb. 6). Durch Lyse der Mitochondrien erfolgte schließlich ebenfalls der Verdau des Innenmembranproteins Tim23 sowie der aller Reporterproteine, wodurch deren potenzielle Sensitivität aufgezeigt wurde. Während des proteolytischen Verdaus entstand bei allen GFP-Fusionsproteinen eine proteaseresistente Bande bei 25 kDa, welche wahrscheinlich die gefaltete proteaseresistente GFP-Domäne repräsentierte. Somit kann man schlussfolgern, dass die Reporterproteine durch die mitochondriale Membran vor proteolytischem Verdau geschützt waren, und somit eine Lokalisation der Proteine in der mitochondrialen Matrix vorlag.

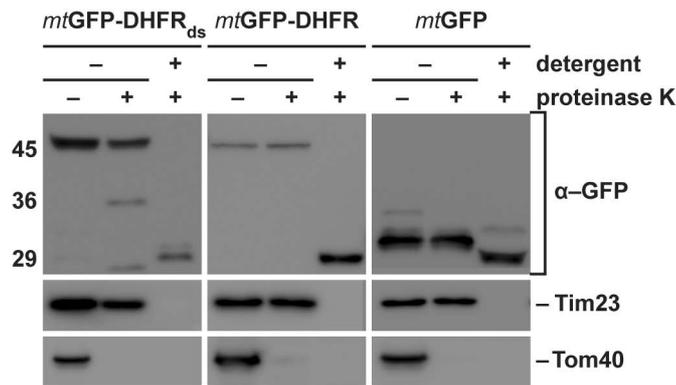


Abbildung 6: Lokalisation der aggregationsanfälligen mitochondrialen Reporterproteine. Behandlung intakter und lysierter Mitochondrien, welche das destabilisierte Reporterprotein *mtGFP-DHFR_{ds}* oder die Kontrollproteine enthielten, mit 2.5 μ M Proteinase K. Mitochondrien wurden mittels Triton X-100 lysiert (Detergenz). Der Proteinase K-Verdau wurde für 20 Minuten bei 4 °C durchgeführt. Reporterproteine und Proteine der Außen- (Tom40) und Innenmembran (Tim23) wurden detektiert mittels Western Blot detektiert.

Um die zelluläre Lokalisation der Reporterkonstrukte weiter zu analysieren, wurde ein Saccharose-Dichtegradient zur Auftrennung der subzellulären Bestandteile mit *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierenden Zellen durchgeführt (Abb. 7A und 7B). Die Migration der Mitochondrien innerhalb des Dichtegradienten wurde anhand des mitochondrialen Matrixproteins Mdh1 und des Außenmembranproteins Tom70 nachvollzogen. Das *mtGFP-DHFR_{ds}* migrierte in späteren Fraktionen des Saccharosegradienten, welche nur einen geringen Anteil an mitochondrialen Proteinen enthielten. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass *mtGFP-DHFR_{ds}* zwar in Mitochondrien vorlag, jedoch nicht mit der Hauptmenge der Mitochondrien ko-lokalisierte.

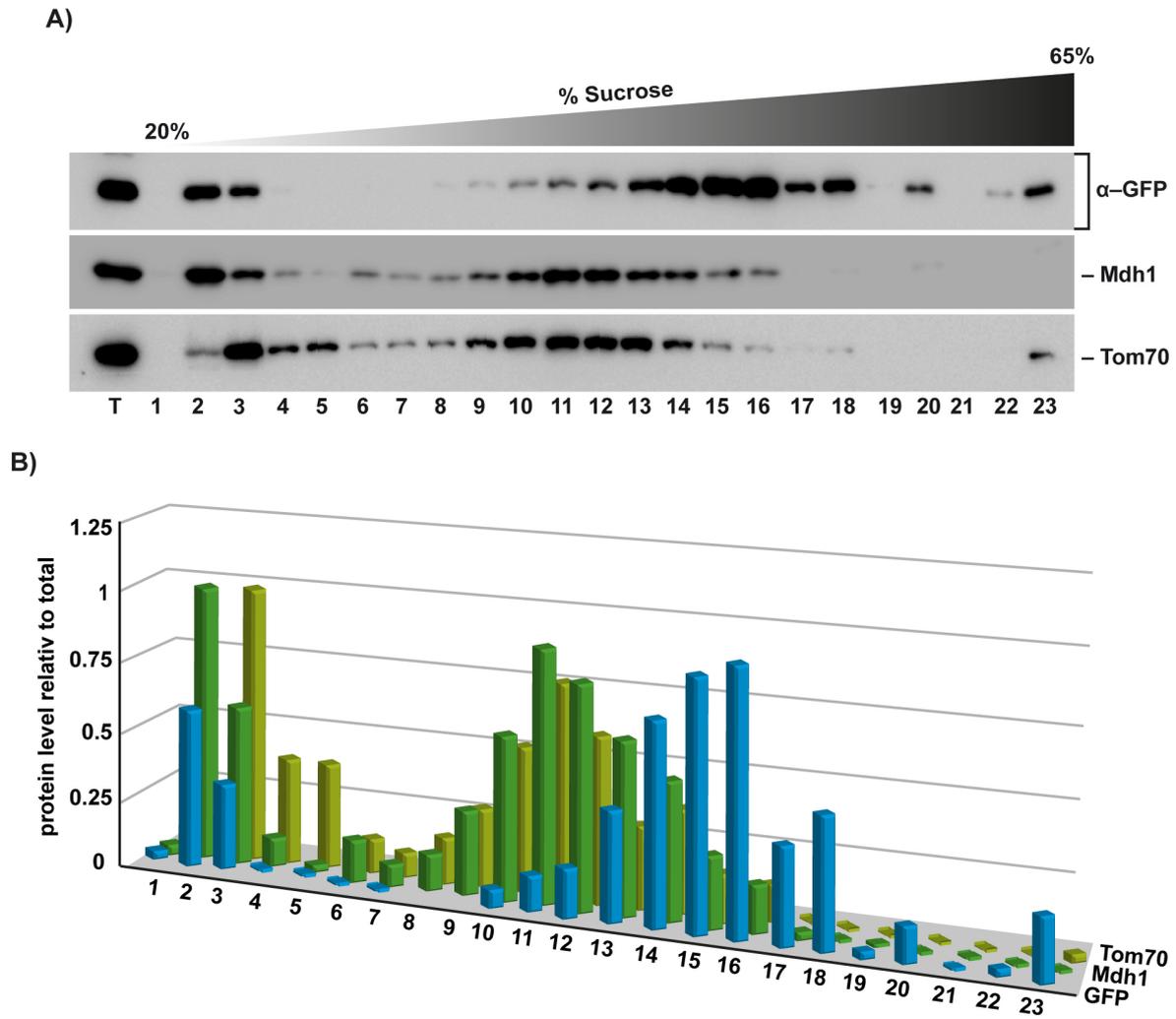


Abbildung 7: Lokalisation der aggregationsanfälligen mitochondrialen Proteine mittels Dichtegradientenzentrifugation. A) Auftrennung zellulärer Bestandteile mittels Saccharosegradienten. Lysierte, Hefezellen, welche das destabilisierte Reporterprotein *mtGFP-DHFR_{ds}* für 10 Stunden exprimierten, wurden auf einen Saccharosegradienten (20 % - 65 %) geladen und anschließend bei 200.000 xg für eine Stunde zentrifugiert. Nach Fraktionierung des Gradienten wurden das destabilisierte Reporterprotein sowie Proteine der Außenmembran (Tom70) und der mitochondrialen Matrix (Mdh1) mittels Western Blot analysiert. B) Quantifizierung der Tom70- (hellgrün) und Mdh1-Signale (dunkelgrün) wurden grafisch dargestellt im Vergleich zu den GFP-Signalen des destabilisierten Reporterproteins (blau).

Analysen mittels Fluoreszenzmikroskopie deuteten darauf hin, dass *mtGFP* sowie *mtGFP-DHFR* gleichmäßig im mitochondrialen Netzwerk verteilt waren und somit eine komplette Löslichkeit der Proteine in den Mitochondrien vorlag (Abb. 8). Die Ko-Lokalisation beider Reporterproteine mit dem konstitutiv exprimierten mitochondrialen Marker mCherry bestätigten des Weiteren die mitochondriale Lokalisation. Hingegen konnte beobachtet werden, dass *mtGFP-DHFR_{ds}* nicht innerhalb des mitochondrialen Netzwerks verteilt war, sondern vielmehr konzentriert in zumeist zwei Agglomeraten vorlag.

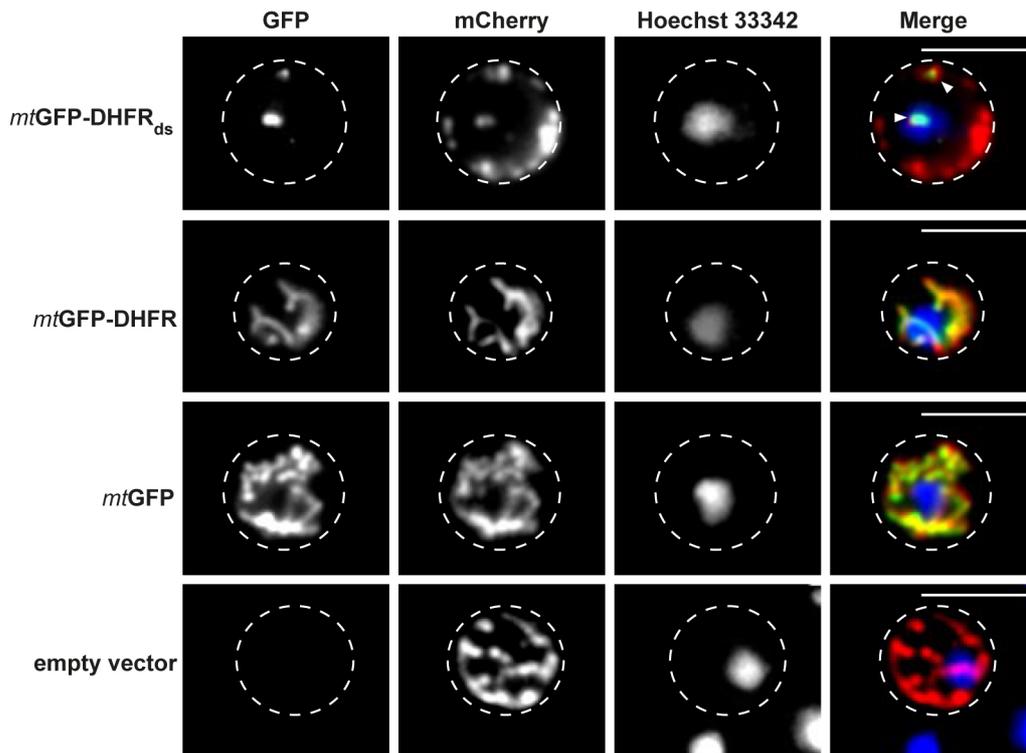


Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Reporterproteine. Analyse von Aggregat-enthaltenden lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Mitochondrien-lokalisierendes mCherry (rot) wurde in Zellen detektiert, welche das destabilisierte Reporterprotein (grün) oder die mitochondrialen Kontrollproteine (grün) für 5 Stunden exprimierten oder in Zellen, welche den Leervektor enthielten. Der Kern wurde mittels Hoechst-33342 Färbung (blau) visualisiert. Maßstab Balken: 10 μ m.

Dieses Ergebnis deutete auf einen Aggregationsprozess des destabilisierten Reporterproteins hin. Die Ko-Lokalisation beider Agglomerate mit dem mitochondrialen Marker mCherry wies darüber hinaus auf eine mitochondriale Lokalisation hin. Dabei konnte die Separierung eines Agglomerates vom mitochondrialen Netzwerk festgestellt werden, wohingegen das zweite im mitochondrialen Netzwerk verblieb. Aus diesem Grund untersuchten wir, inwiefern das abgesonderte Agglomerat innerhalb eines funktionellen Mitochondriums enthalten war. Wir behandelten die exprimierenden Hefezellen mit dem Farbstoff TMRE, welcher Mitochondrien in Abhängigkeit eines intakten Membranpotentials spezifisch anfärbt. Wir beobachteten, dass die TMRE-Färbung in Zellen, welche die stabilen GFP-Fusionsproteine exprimierten, das komplette mitochondriale Netzwerk reflektierte (Abb. 9). Dies deutet auf ein intaktes Membranpotential aller Mitochondrien in diesen Zellen hin. Hingegen wies das Agglomerat enthaltende Mitochondrium keine TMRE-Färbung auf, während das verbleibende mitochondriale Netzwerk weiterhin ein normales Membranpotential besaß.

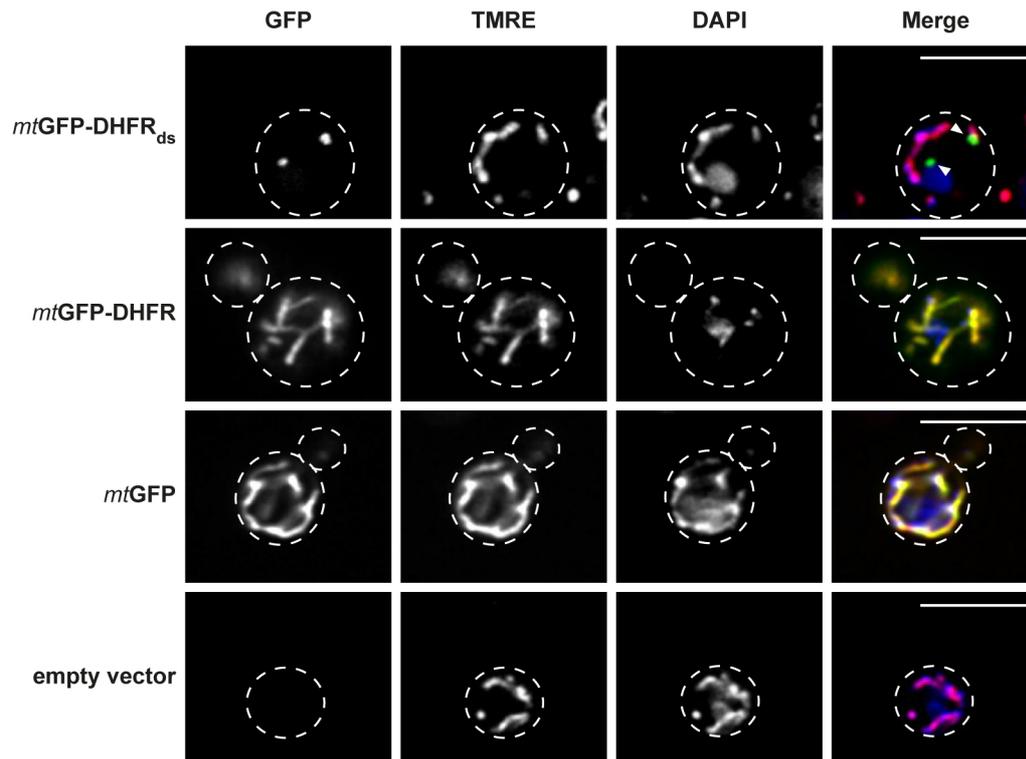


Abbildung 9: Membranpotential-Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie. Zellen, welche das destabilisierte *mtGFP-DHFR_{ds}* oder die Kontrollproteine (grün) für 5 Stunden exprimierten sowie Zellen, die den Leervektor enthielten, wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Das mitochondriale Innenmembranpotential wurde durch TMRE-Färbung (rot) und der Kern durch DAPI-Färbung (blau) visualisiert. Maßstab Balken: 10 μ m.

Diese Resultate zeigen, dass die Mehrheit der Aggregate, geformt durch *mtGFP-DHFR_{ds}*, in spezielle Kompartimente abgelagert wurden, welche in nicht-funktionellen Mitochondrien enthalten waren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Agglomeraten aufgrund ihrer Proteinase- sowie SDS-Sensitivität, um amorphe und unstrukturierte Proteinaggregate handelt.

Wir testeten des Weiteren inwiefern auch endogene mitochondriale Proteine während Stresssituationen in solche Proteinaggregatkompartimente abgelagert werden. Aus diesem Grund verfolgten wir die Lokalisation des mitochondrialen Proteins $F_1\beta$ während der Inkubation von wildtypischen Hefezellen bei 42 °C mittels Immunfluoreszenzanalyse (Abb. 10) Dieses mitochondriale Protein war aus vorherigen Studien bereits als thermolabiles Protein bekannt (Bender et al., 2011).

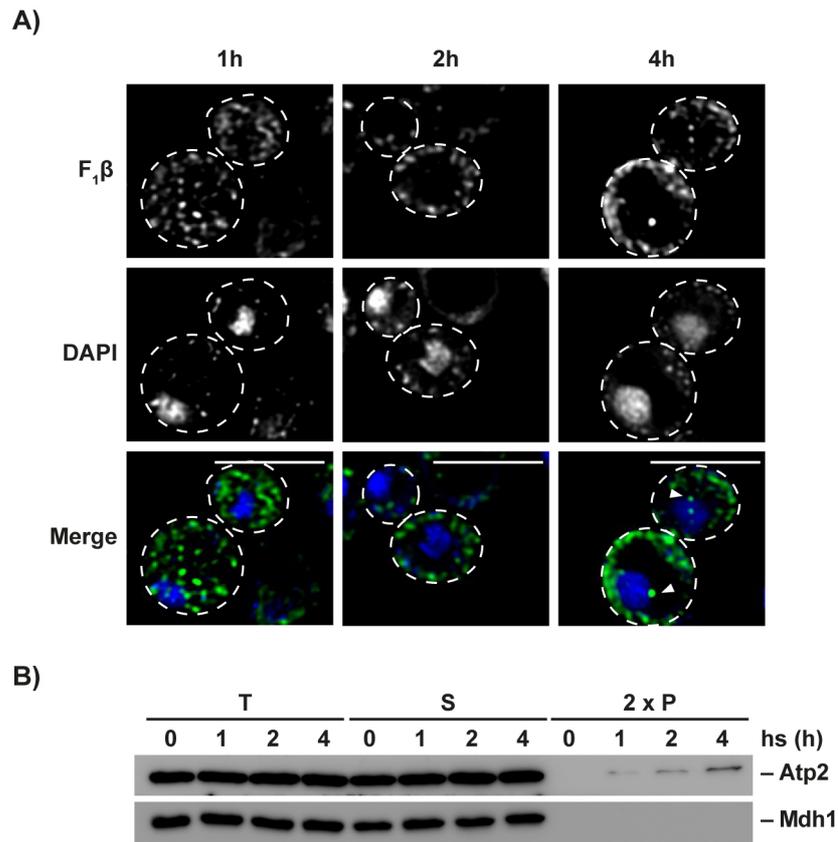


Abbildung 10: Immunofluoreszenz von wildtypischen Hefezellen unter Stresssituationen. A) Wildtypische Hefezellen wurden bei 42 °C für die angezeigte Dauer inkubiert. Mitochondriales Protein F₁β (grün) wurde mittels korrespondierenden Antikörpern und der Zellkern durch DAPI-Färbung (blau) visualisiert. Maßstabbalken: 5µm. B) Wildtypische Hefezellen wurden inkubiert wie in A) beschrieben. Zellen wurden lysiert und anschließend bei 20.000 xg zentrifugiert. Die Totalfraktion (T), die Überstandsfraktion (S) sowie die zweifache Menge der Pelletfraktion (P) wurden auf eine SDS-PAGE geladen und mittels Western Blot analysiert. Mitochondriale Proteine F₁β und Mdh1 wurden mittels entsprechenden Antikörpern detektiert.

Wir konnten zeigen, dass die Inkubation der Hefezellen bei 42 °C nach einer Stunde sowie nach zwei Stunden zur Fragmentierung der Mitochondrien führte. Hingegen führte die Inkubation der Zellen bei 42 °C für vier Stunden zu einer zusätzlichen Formierung eines F₁β-Agglomerats. Die Analyse des Aggregationsverhaltens von F₁β mittels Sedimentation bei 20.000 xg bestätigte, dass F₁β während der Hitzestresssituation aggregierte, während das mitochondriale Protein Mdh1 löslich blieb (Abb. 10B). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass geschädigte endogene Proteine in ein ähnliches Proteinaggregatkompartiment abgelagert werden, wie überexprimiertes *mtGFP-DHFR_{ds}*.

Aufgrund unserer ersten Ergebnisse postulieren wir die Existenz einer Proteinaggregatablagerung geschädigter Proteine in der mitochondrialen Matrix. Basierend auf der bereits etablierten Nomenklatur anderer zellulärer Aggregatkompartimente, bezeichnen wir die neu entdeckten mitochondrialen Aggregatablagerung als intra-mitochondriales Proteinqualitätskontrollkompartiment (engl.: Intra-Mitochondrial Protein Quality Control Compartiment; IMiQC).

4.1.2 Die mitochondriale Proteinhomöostase bleibt erhalten in Anwesenheit destabilisierter Proteine durch die Formierung von IMiQC

Bei zellulären Aggregatablagerungen handelt es sich um detoxifizierende Prozesse von destabilisierten Proteinen (Escusa-Toret et al., 2013). Aus diesem Grund vermuteten wir, dass die Aggregatablagerung in das IMiQC-Kompartiment die mitochondriale Proteinhomöostase vor proteotoxischen Effekten geschädigter Proteine schützt.

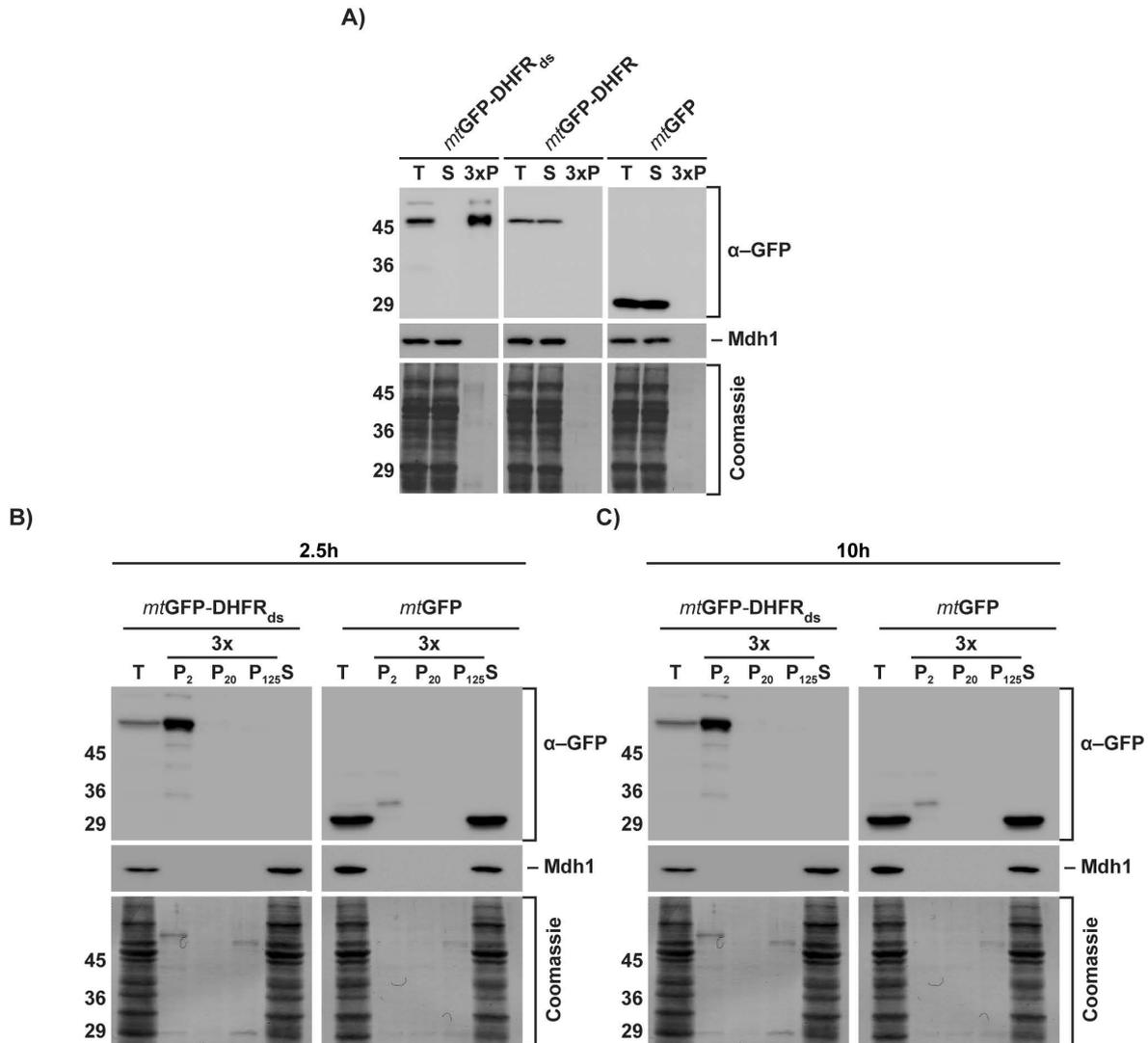


Abbildung 11: Sedimentationseigenschaften von *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregaten. A) Das Aggregationsverhalten des destabilisierten Reporterproteins sowie der Kontrollproteine wurde in wildtypischen Hefezellen nach 10-stündiger Expression analysiert. Zellen wurden lysiert und anschließend bei 20.000 xg zentrifugiert. Die Totalfraktion (T), die Überstandsfraktion (S) sowie die dreifache Menge der Pelletfraktion (P) wurden mittels SDS-PAGE und mittels Western Blot analysiert. Die Reporterproteine wurden durch GFP-Antikörper detektiert. Das mitochondriale Matrixprotein Mdh1 diente als Kontrollprotein. Der Gesamtproteingehalt wurde durch die Coomassie Färbung dargestellt B) und C) Differentielle Zentrifugation wildtypischer Hefezellen, welche das destabilisierte Reporterproteine oder Kontrollproteine für 2.5 bzw. 10 Stunden exprimierten. Die Zellen wurden lysiert und bei 2.000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstände bei 20.000 xg zentrifugiert. Die Totalfraktion (T), die Überstands- (S) sowie die dreifache Menge der Pelletfraktion nach 2.000 xg (P_{20}), 20.000 xg (P_{20}) und 125.000 xg (P_{125}) wurden wie in A) beschrieben analysiert.

Wir analysierten das Aggregationsverhalten des destabilisierten Reporterproteins im Vergleich zu den stabilen Kontrollproteinen, um Informationen über die biochemischen Eigenschaften von IMiQC zu erhalten. Zur Analyse der Proteinaggregation nutzten wir die Dichte und Masse der Proteinaggregate, welche unter nativen Bedingungen mittels Zentrifugation bei 20.000 xg sedimentieren, während lösliche Proteine im Überstand verbleiben.

Beide mitochondrialen Kontrollproteine wurden in der löslichen Fraktion wiedergefunden, während das destabilisierte *mtGFP-DHFR_{ds}* ausschließlich in der Pelletfraktion nachgewiesen wurde (Abb. 11A). Dies demonstrierte erneut, dass das destabilisierte mitochondriale Protein bei physiologischen Wachstumsbedingungen komplett als Proteinaggregat vorlag. Darüber hinaus zeigten Sedimentationsanalysen von *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierenden Zellen zu verschiedenen Expressionszeitpunkten (2.5 Stunden und 10 Stunden), große Proteinaggregate, bereits bei einer Zentrifugation von nur 2.000 xg, sobald diese mittels Western Blot detektierbar waren (Abb. 11B und C).

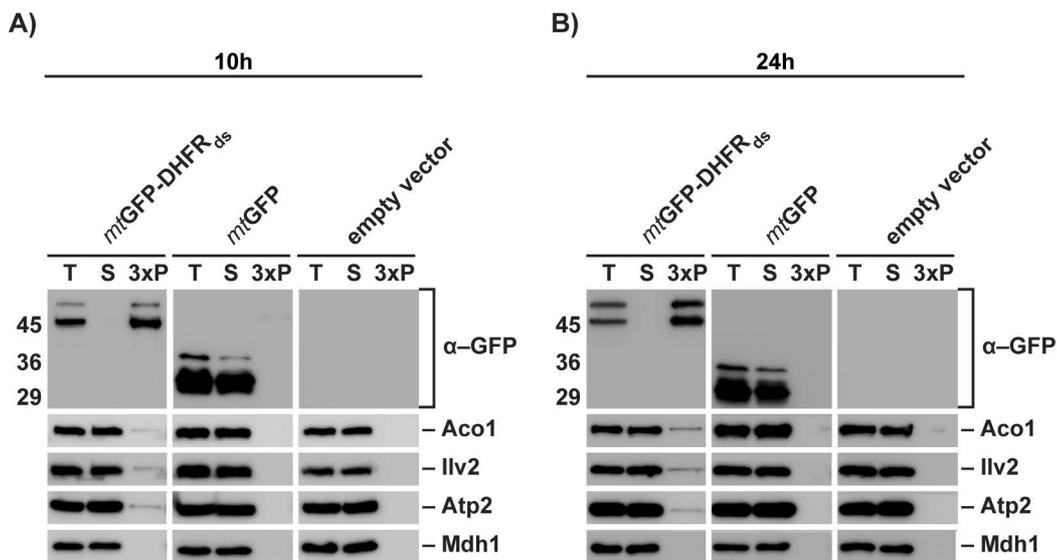


Abbildung 12: Proteinhomöostase in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregaten. A) und B) Ko-Aggregation endogener Proteine innerhalb der mitochondrialen Matrix. Wildtypische Hefezellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* oder die Kontrollproteine für 10 bzw. 24 Stunden exprimierten, wurden lysiert und anschließend bei 20.000 xg zentrifugiert. Die Totalfraktion (T), die Überstands- (S) sowie die dreifache Menge der Pelletfraktion (P) wurden mittels SDS-PAGE und mittels Western Blot analysiert und Reporterproteine durch Antikörper gegen GFP detektiert. Ko-Aggregationsprozesse der Proteine Aco1, Ilv2 und Atp2 wurden mittels korrespondierenden Antikörpern analysiert. Das mitochondriale Matrixprotein Mdh1 diente als Kontrollprotein.

Um die potenziellen proteotoxischen Effekte der mitochondrialen Proteinaggregate auf die mitochondriale Proteinhomöostase zu untersuchen, führten wir Ko-Sedimentationsanalysen anderer mitochondrialer Proteine durch. Hierfür wurden die

Sedimentationseigenschaften von drei Proteinen (Aco1, Ilv2 und Atp2) geprüft, welche bereits als thermolabile Proteine bekannt waren (Bender et al., 2011).

Alle drei mitochondrialen Proteine aggregierten in einer geringen Menge (etwa 1% der gesamten Proteinmenge) zusammen mit *mtGFP-DHFR_{ds}* nach 10-stündiger Expression (Abb. 12A). Die Menge an mitochondrialen Proteinen in der Pelletfraktion erhöhte sich leicht nach einer längeren Expression von 24 Stunden (Abb. 12B). Jedoch verblieb die Mehrheit der drei Proteine Aco1, Ilv2 und Atp2 im löslichen Zustand ungeachtet einer großen Menge destabilisierten und aggregierten *mtGFP-DHFR_{ds}* Proteins.

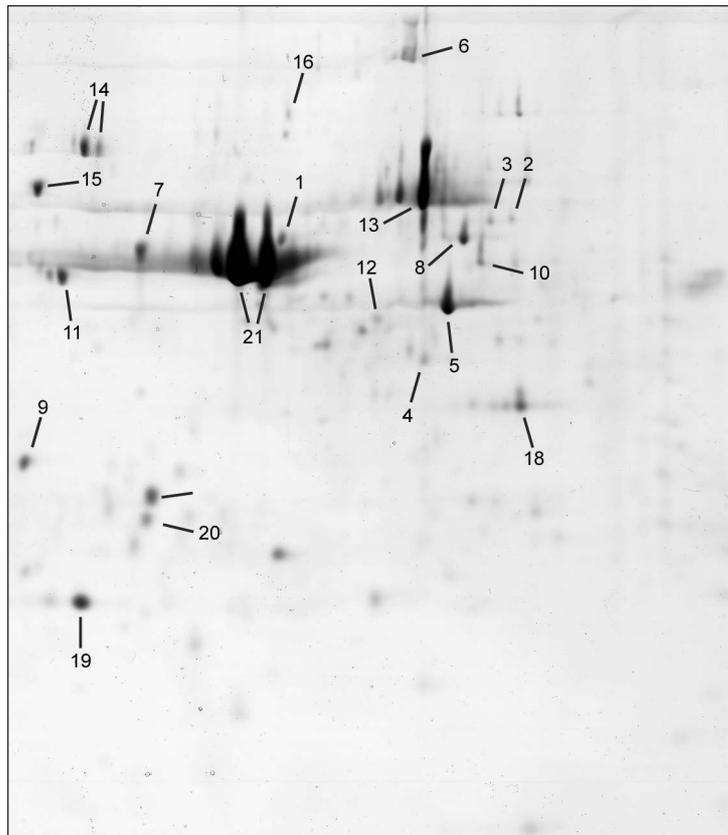


Abbildung 13: 2D-Analyse ko-sedimentierender mitochondrialer Proteine A) Analyse der sedimentierten mitochondrialen Proteine in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* mittels 2D-PAGE. Isolierte Mitochondrien aus wildtypischen Zellen, welche das destabilisierte Reporterprotein nach 10-stündiger Expression enthielten, wurden lysiert und bei 20.000 xg zentrifugiert. Die Pelletfraktion wurde mittels 2D-Gels, wie in den Versuchsdurchführungen beschrieben, analysiert. Proteine im Bereich von 20-140 kDa und einem pI von 3-11 sind abgebildet. Experiment wurde in Kooperation mit Anne Wilkening durchgeführt

Tabelle 1: Identifizierte Proteine nach 2D-Gel, ermittelt durch LC-MS.

a) Proteinbeschreibung nach SGD (Saccharomyces genome database)

b) Subzelluläre oder submitochondriale Lokalisation nach SGD

*c) Molekulares Gewicht der maturierten Proteine (*Molekulares Gewicht des Preproteins)*

d) pI der maturierten Proteine

Nr.	Name	Funktion ^{a)}	Lokalisation ^{b)}	MW [kDa] ^{c)}	pI ^{d)}
1	Ald4	Aminosäurebiosynthese	Matrix	53,9	5,9
2	Ilv1	Aminosäurebiosynthese	Matrix	63,8*	9,3
3	Ilv3	Aminosäurebiosynthese	Matrix	62,8*	8,8
4	Ilv5	Aminosäurebiosynthese	Matrix	39,1	6,7
5	Cit1	TCA-Zyklus	Matrix	49,1	7,0
6	Kgd1	TCA-Zyklus	Matrix	110,9	6,8
7	Kgd2	TCA-Zyklus	Matrix	50,4*	9,4
8	Lpd1	TCA-Zyklus	Matrix	51,5	7,0
9	Pdb1	TCA-Zyklus	Matrix	36,4	4,5
10	Atp1	Elektronentransportkette	Innere Membran	51,6	7,7
11	Atp2	Elektronentransportkette	Innere Membran	51,0	4,8
12	Cor1	Elektronentransportkette	Innere Membran	47,3	6,3
13	Cyb2	Elektronentransportkette	Intermembranraum	56,5	6,5
14	SSC1	Mitochondriale Chaperone	Matrix	68,0	5,0
15	Hsp60	Mitochondriale Chaperone	Matrix	57,7	4,6
16	Mef1	Mitochondriale Translation	Matrix	79,6	5,9
17	Pil1	Komponente des Eisosoms	Lipid droplet	38,3	4,4
18	Gal7	Galactosemetabolismus	Zytosol	42,7	7,9
19	Hsp26	Kleines HSP	Zytosol	23,9	5,2
20	Lsp1	Komponente des Eisosoms	Zytosol	38,0	4,5
21	GFP	Grün fluoreszierendes Protein		26,9	5,6

Um die geringe Ko-Aggregation zu bestätigen, analysierten wir die Teilmenge an ko-aggregierten mitochondrialen Proteinen durch Sedimentation mit anschließender Auftrennung mittels einer 2D-PAGE (Abb. 13 und Tab. I). Die Auswertung zeigte, dass nur 16 mitochondriale Proteine identifiziert werden konnten, welche durch die Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* in die Aggregation verleitet wurden. Bei den identifizierten Proteinen handelte es sich dabei um Proteine des TCA-Zyklus, der Elektronentransportkette sowie um Mitglieder des mitochondrialen PQC-Systems, wie das Hsp70-Chaperon Ssc1 oder das mitochondriale Hsp60. Jedoch konnte auch hier nachgewiesen werden, dass nur eine geringe Menge mitochondrialer Proteine durch die Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* in die Ko-Aggregation verleitet wurde.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse somit, dass die mitochondriale Proteinhomöostase durch die Akkumulation großer Mengen fehlgefalteter Polypeptide nicht signifikant beeinflusst wurde.

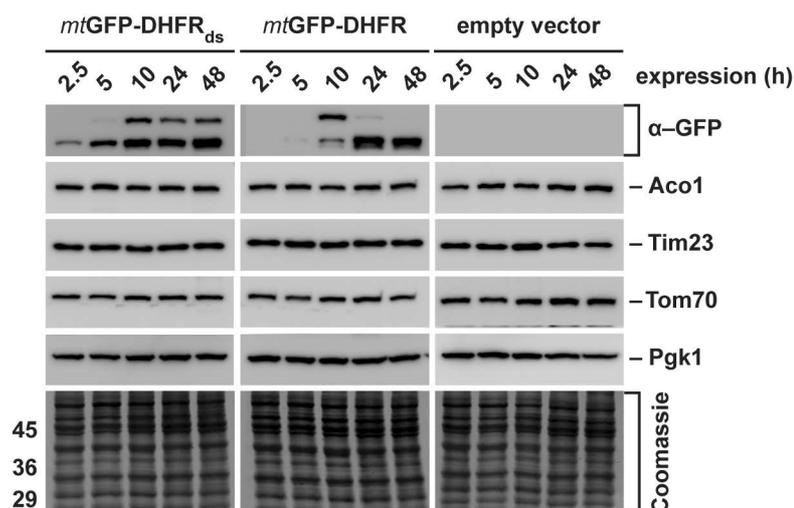


Abbildung 14: Stabilität mitochondrialer Proteine in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregaten. Proben von wildtypischen Hefezellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* oder *mtGFP-DHFR* exprimierten, und Zellen welche den Leervektor enthielten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Das Proteinlevel der GFP-Reporterproteine sowie Proteine der Außen- (Tom70), der Innenmembran (Tim23) sowie der mitochondrialen Matrix (Aco1) wurden mittels Western Blot analysiert und detektiert durch die korrespondierenden Antikörper. Coomassie Färbung sowie Immunodetektion des zytoplasmatischen Proteins Pgk1 dienten als Ladekontrolle.

In einem weiteren Experiment verfolgten wir die Proteinlevel mitochondrialer Proteine über 48 Stunden während der Expression von *mtGFP-DHFR_{ds}*, welche in der mitochondrialen Matrix (Aco1), in der Innenmembran (Tim23) oder in der Außenmembran (Tom40) lokalisiert waren (Abb. 14). Die Analyse zeigte, dass die Mengen aller getesteten Proteine innerhalb des untersuchten Zeitraums stabil blieben. Dadurch konnten wir

Veränderungen in der mitochondrialen Biogenese sowie im Proteinumsatz durch proteotoxischen Stress ausschließen.

Aufgrund der stabilen Proteinhomöostase unter physiologischen Bedingungen, testeten wir anschließend das Sedimentationsverhalten der thermolabilen mitochondrialen Proteine bei erhöhter Temperatur. Wir inkubierten isolierte Mitochondrien für 40 Minuten bei 42 °C zur Induktion von Hitzestressbedingungen und analysierten erneut die Ko-Aggregation zusammen mit *mtGFP-DHFR_{ds}* (Abb. 15). Wir beobachteten, dass obwohl Aco1 sowie Ilv2 in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* bei erhöhter Temperatur aggregierten, sich die Menge der aggregierten Proteine nicht wesentlich unterschied im Vergleich zu Proteinen in Mitochondrien, welche *mtGFP* enthielten. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass selbst während zusätzlichen Stressbedingungen, mitochondriale Aggregationprozesse nicht wesentlich durch die Anwesenheit fehlgefalteter Proteine erhöht waren.

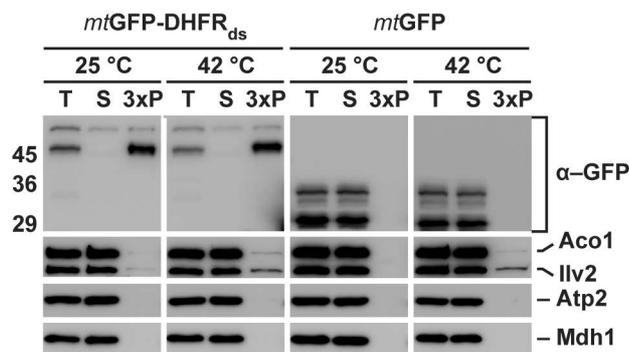


Abbildung 15: Ko-Sedimentation mitochondrialer Proteine in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregaten unter Hitzestressbedingungen. Isolierte Mitochondrien, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* oder *mtGFP* nach 5-stündiger Expression enthielten, wurden für 20 Minuten bei 25 °C oder 42 °C inkubiert. Mitochondrien wurden lysiert und bei 20.000 xg zentrifugiert. Die Totalfraktion (T), die Überstands- (S) sowie die dreifache Menge der Pelletfraktion (P) wurden mittels SDS-PAGE und mittels Western Blot analysiert und durch GFP Antikörper detektiert. Mitochondriale Matrixproteine Aco1, Ilv2 und Atp2 wurden mittels korrespondierenden Antikörpern identifiziert. Mdh1 diente als Kontrollprotein.

Zusammengefasst zeigen die Beobachtungen, dass die Akkumulation destabilisierter Proteine in Aggregatablagerungsstellen, wie IMiQC, eine Möglichkeit bietet toxische Proteinsubtypen zu neutralisieren. IMiQC trägt somit wesentlich zum Erhalt der Proteinhomöostase bei, sogar unter zusätzlichen Stressbedingungen.

4.1.3 Das mitochondriale Proteinqualitätskontrollsystem ist befreit von destabilisierten Proteinen durch die Proteinablagerung in IMiQC

Enzyme des zellulären Proteinqualitätskontrollsystems (PQC), wie zum Beispiel molekulare Chaperone und Proteasen, interagieren mit fehlgefalteten Polypeptiden. Aus diesem Grund stellten wir die Frage, inwiefern Mitglieder des mitochondrialen PQC an Proteinaggregate rekrutiert werden. Wir analysierten erneut die Aggregatformierung mittels Sedimentation zu drei unterschiedlichen Expressionszeiten von *mtGFP-DHFR_{ds}* (Abb. 16). Wir fanden heraus, dass sowohl Hsp78, ein Homolog des bakteriellen ClpB Chaperons, sowie Pim1, die einzige mitochondriale Matrixprotease in Hefen, zu allen Zeitpunkten nicht mit *mtGFP-DHFR_{ds}*-Aggregaten ko-sedimentierten. Dies deutet darauf hin, dass beide Proteine nicht mit Proteinaggregaten interagieren. Wie bereits durch die 2D-PAGE-Analyse festgestellt (Abb.13 und Tab. I), konnten wir jedoch kleine Mengen des mitochondrialen Hsp70-Chaperones Ssc1 zu allen Zeitpunkten in der Pelletfraktion finden (Abb. 16). Die Proteinmenge, welche in der Pelletfraktion vorhanden war, stieg dabei leicht mit der Zeit an. Darüber hinaus, wurde auch das mitochondriale Hsp60 Chaperon nach 10 Stunden sowie 24 Stunden in der Pelletfraktion nachgewiesen. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass beide Chaperone, Ssc1 und Hsp60, an Proteinaggregaten lokalisiert sind. Jedoch war die Proteinmenge, welche an den Aggregaten gefunden wurde, lediglich 1 % der Gesamtmenge beider Proteine. Daher kann daraus geschlossen werden, dass nur eine kleine Teilmenge durch Proteinaggregate in Anspruch genommen wird, während die größte Menge weiter frei vorliegt.

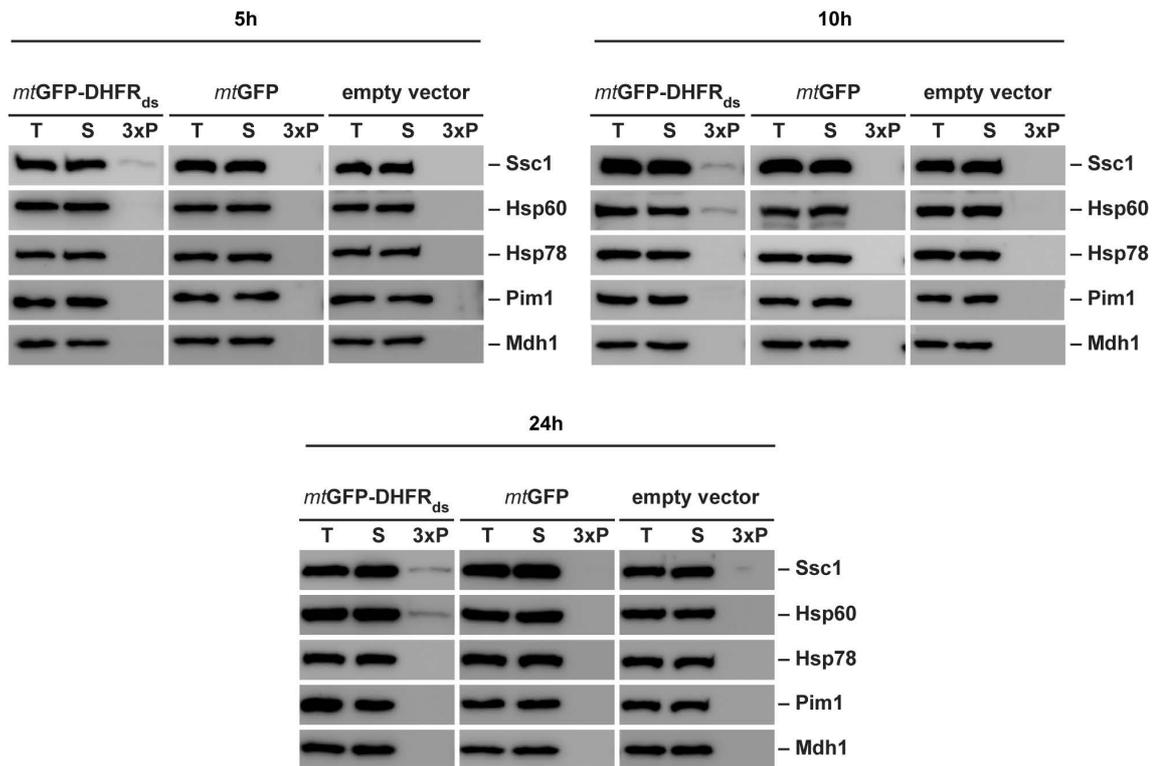


Abbildung 16: Komponenten des PQC in Anwesenheit ungefalteter Proteine. Wildtypische Hefezellen, welche das Reporterprotein *mtGFP-DHFR_{ds}* oder das Kontrollprotein *mtGFP* für 5, für 10 oder für 24 Stunden exprimierten, sowie Zellen, welche den Leervektor enthielten, wurden lysiert und bei 20.000 xg zentrifugiert. Die Totalfraktion (T), die Überstands- (S) sowie die dreifache Menge der Pelletfraktion (P) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die mitochondrialen Mitglieder des Proteinqualitätskontrollsystems Ssc1, Hsp60, Hsp78 und Pim1 wurden mittels korrespondierender Antikörpern detektiert. Mdh1 diente als Kontrollprotein.

Als nächstes testeten wir die Stabilität der von IMiQC sowie die damit verbundene Möglichkeit, dass Mitglieder des mitochondrialen PQC in der Lage sind das Aggregatkompartiment zu resolubilisieren. Zur Analyse der Resolubilisierung stoppten wir die Expression von *mtGFP-DHFR_{ds}* durch Hinzugabe von Glukose nach 2.5 Stunden und inkubierten die Zellen für weitere 21.5 Stunden (Abb. 17). Das mitochondriale destabilisierte Protein war nach 24 Stunden zum einen noch komplett aggregiert und zum anderen blieb das Proteinlevel im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt gleich. Das deutet darauf hin, dass das IMiQC-Kompartiment innerhalb der 24 Stunden weder resolubilisiert noch proteolytisch abgebaut wird.

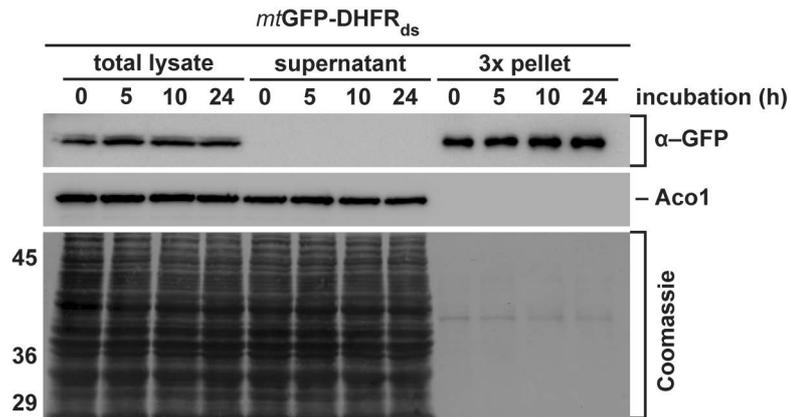


Abbildung 17: Langzeitstabilität des IMiQC-Kompartiments. Die Expression von *mtGFP-DHFR_{ds}* in Hefezellen wurde nach 2.5 Stunden durch die Hinzugabe von 2 % Glukose gestoppt. Die Zellen wurden weiterhin für die angegebene Dauer bei 30 °C inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurden die Aggregate bei 20.000 xg sedimentiert. Die Totalfraktion (T), die Überstands- (S) sowie die dreifache Menge der Pelletfraktion (P) wurden mittels SDS-PAGE und mittels Western Blot analysiert und durch GFP-Antikörper detektiert. Das mitochondriale Matrixprotein Aco1 sowie die unspezifische Coomassie Färbung dienten als Ladekontrolle.

In früheren Studien wurde bereits die Regulation von Komponenten des mitochondrialen PQC während proteotoxischen Stresssituationen in Mitochondrien von Säugetierzellen sowie im Wurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Arnould et al., 2015). Diese Form der Chaperonregulation wird als UPR^{mt} bezeichnet. Wir analysierten daher, inwiefern die Akkumulation von ungefalteten Polypeptiden zur Auslösung der UPR^{mt} in Hefe führte. Wir analysierten die Proteinlevel verschiedener Mitglieder des mitochondrialen PQC zu verschiedenen Zeitpunkten der *mtGFP-DHFR_{ds}*-Expression. Dabei konnten wir jedoch weder nach 5 oder 10 noch nach 24 Stunden der Expression eine Erhöhung der mitochondrialen Chaperone sowie der Matrixprotease Pim1 feststellen (Abb. 18A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregate keine mitochondrialen Stresssignale verursachen. Um zu zeigen, dass Mitochondrien jedoch generell in der Lage sind eine Stressantwort einzuleiten, führten wir eine Hitzestresssituation in wildtypischen Hefezellen für 4 Stunden bei 42 °C herbei (Abb. 18B). Wie erwartet, wurde das ClpB-homologe Chaperon Hsp78 signifikant hochreguliert.

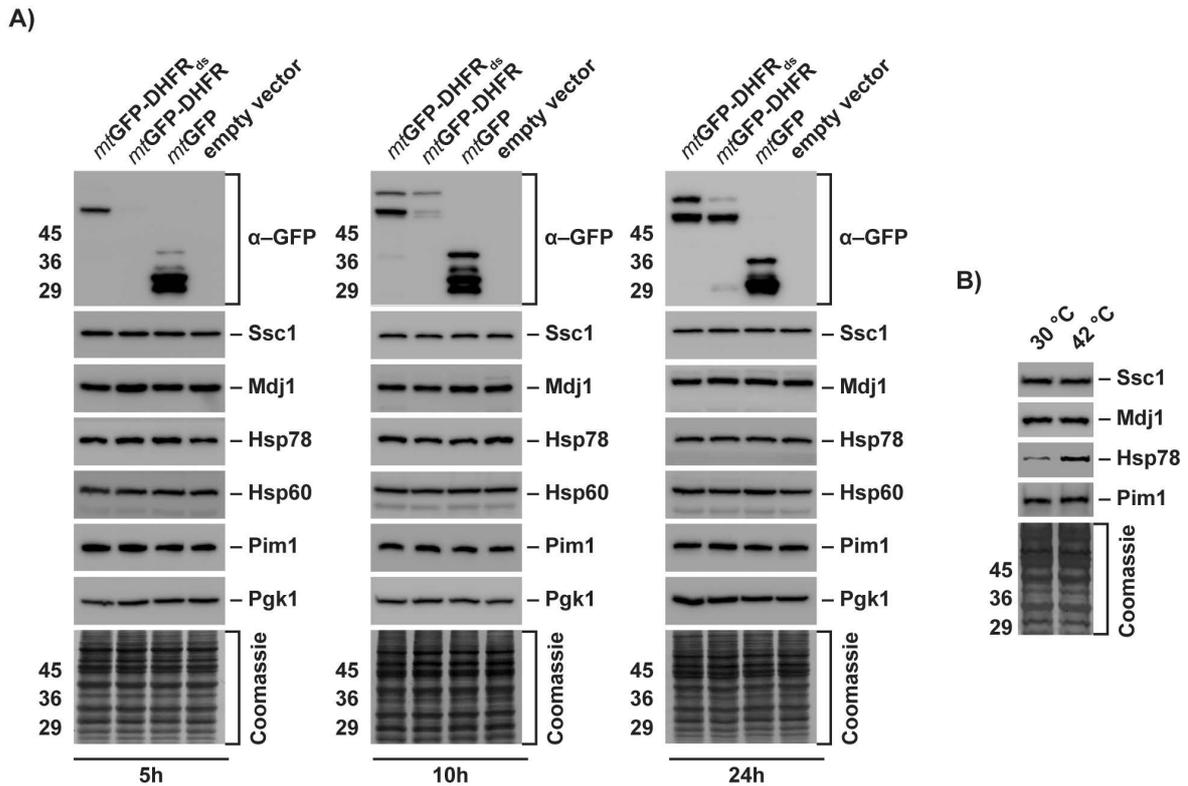


Abbildung 18: UPR^{mt}-Aktivierung in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}*. A) Proteinlevel der Mitglieder des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems in wildtypischen Hefezellen, welche das destabilisierte Reporterprotein oder Kontrollproteine für 5, 10 oder 24 Stunden exprimierten. Die Proteine Ssc1, Mdj1, Hsp78, Hsp60 und Pim1 wurden mittels Western Blot detektiert. Das Proteinlevel des zytosmatischen Proteins Pgk1 sowie die unspezifische Coomassie Färbung diente als Ladekontrolle. B) Die Proteinlevel der Komponenten des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems wurden mittels Western Blot in Zellen analysiert, welche bei 30 °C oder bei 42 °C für 4 Stunden inkubiert wurden. Die unspezifische Coomassie Färbung diente als Ladekontrolle.

Aus diesen Experimenten schließen wir, dass das IMiQC-Kompartiment das mitochondriale PQC von der Belastung durch akkumulierte ungefaltete Proteine befreit. Somit führt die IMiQC-Formierung zu einer Entfernung gefährlicher Proteinsubtypen in eine inerte Aggregatablagerung und verhindert dadurch die Auslastung des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems.

4.1.4 Mitochondriale Qualität und Funktionalität bleiben erhalten durch die IMiQC-Formierung

Zur Aufklärung, inwiefern die mitochondriale Qualität und Funktionalität während der Anwesenheit von akkumulierten ungefalteten Polypeptiden erhalten bleibt, führten wir ausführliche Analysen wichtiger mitochondrialer Prozesse in Anwesenheit des destabilisierten Reporterproteins durch. Um einen Eindruck über die potenzielle Toxizität der *mtGFP-DHFR_{ds}*-Aggregate zu erlangen, untersuchten wir das Wachstum von Zellen,

welche entweder das destabilisierte mitochondriale Protein oder die Kontrollproteine exprimierten. (Abb. 19). Die Zellen wuchsen entweder auf Glukoseplatten, einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle, oder auf Glycerolplatten, einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle.

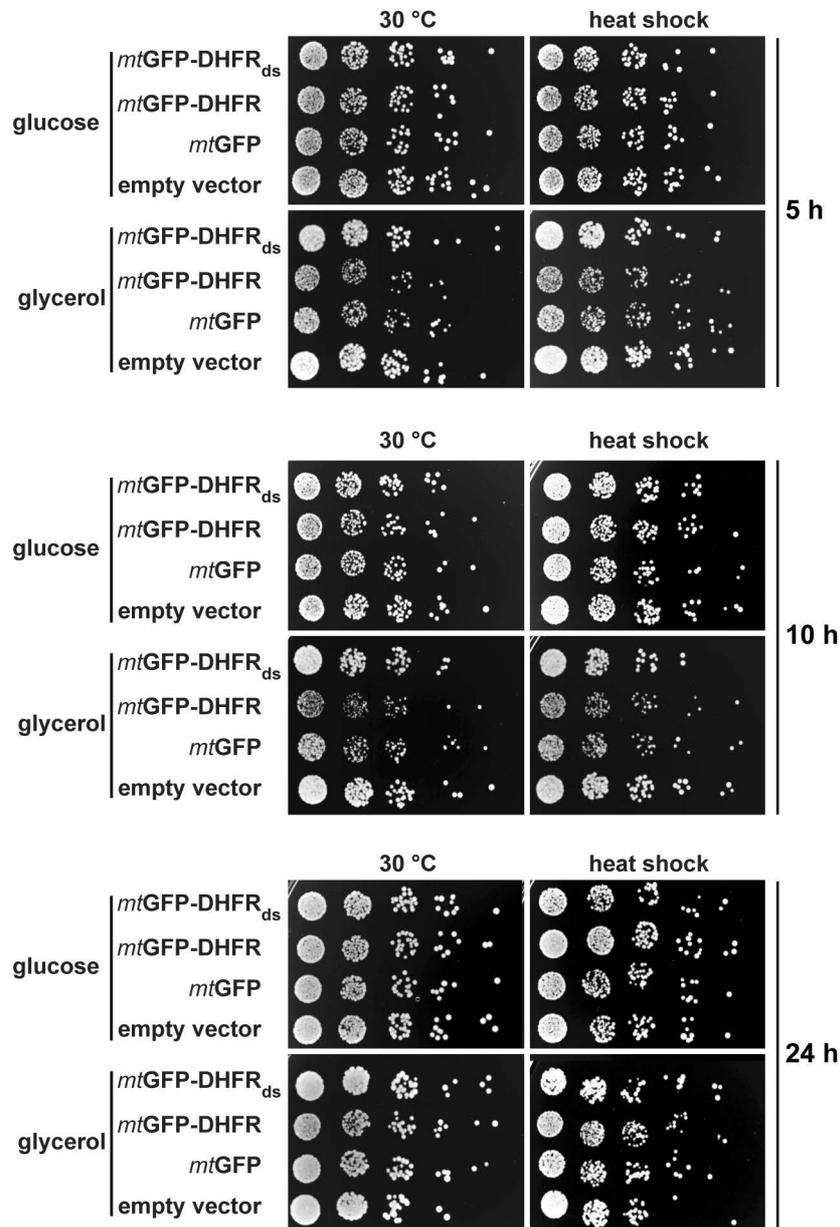


Abbildung 19: Das zelluläre Wachstum wird nicht beeinträchtigt durch die Formierung von IMiQC. Das Wachstum von wildtypischen Hefezellen, welche das destabilisierte Reporterprotein oder die Kontrollproteine für 5, 10 oder 24 Stunden exprimierten wurde analysiert. Zellen bei 30 °C bzw. 42 °C für eine Stunde inkubiert und auf 1×10^6 Zellen eingestellt. Die Zellen wurden in serieller Verdünnung auf Selektionsplatten getropft, welche entweder eine fermentierbare (2 % Glukose) oder nicht-fermentierbare (3 % Glycerol) Kohlenstoffquelle enthielten. Die Platten wurden bei 30 °C für 2 (Glukose) oder 7 Tage (Glycerol) inkubiert

Während das Wachstum auf Glukose generelle Informationen über die zelluläre Überlebensfähigkeit gibt, wird anhand von Glycerol der funktionelle mitochondriale Metabolismus untersucht. Zellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* für 10 Stunden exprimierten, wuchsen auf beiden Kohlenstoffquellen sowie zu allen getesteten Zeitpunkten ähnlich wie Kontrollzellen. Dies deutet darauf hin, dass das destabilisierte Protein innerhalb der Mitochondrien keine toxischen Effekte auf zelluläre sowie mitochondriale Prozesse ausübt. Führte man vor der Plattierung einen Hitzestress von 42 °C für 40 Minuten durch, so ergab sich ebenfalls kein Wachstumsunterschied zwischen *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierenden und Kontrollzellen. Dies zeigt erneut, dass sogar unter zusätzlichen Stresssituationen die *mtGFP-DHFR_{ds}*-Aggregate keine toxischen Effekte auf die mitochondriale Qualität ausübt. Um die mitochondriale Funktionalität mehr im Detail zu untersuchen, verwendeten wir anschließend isolierte Mitochondrien zur Analyse der mitochondrialen Qualität in Anwesenheit oder Abwesenheit destabilisierter Proteine. Zuerst befassten wir uns mit der Messung des mitochondrialen Membranpotentials. Dies wurde mittels des fluoreszierenden Farbstoffs DiSC₃ durchgeführt, welcher seine Fluoreszenz bei der Bindung an Mitochondrien in einem membranpotentialabhängigen Prozess verliert. Die Wiederherstellung der Fluoreszenz durch die Behandlung der Mitochondrien mit Natriumazid (NaN₃) korrelierte direkt mit der Wiederherstellung des Membranpotentials. Dabei unterschied sich die Wiederherstellung der Fluoreszenz in Mitochondrien, welche das destabilisierte Protein enthielten, nicht von der in Kontrollmitochondrien. Wir zeigten somit, dass die mitochondriale Membranintegrität sowie die Atmungseffizienz nicht durch die Anwesenheit der Proteinaggregate beeinflusst werden (Abb. 20).

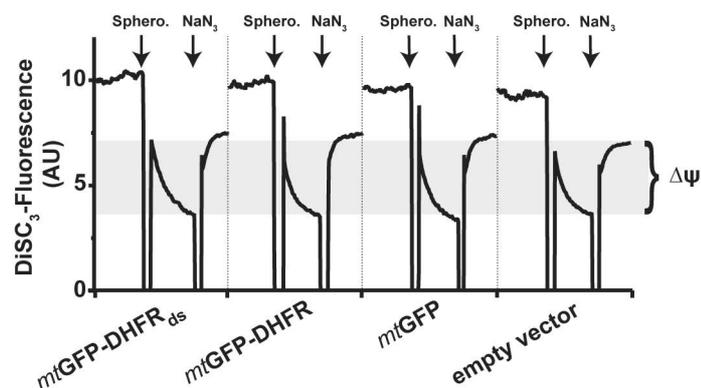


Abbildung 20: Das mitochondriale Membranpotential bleibt in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregaten erhalten. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi$). Spheroblasten wurden aus wildtypischen Hefezellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* oder die Kontrollproteine für 10 Stunden exprimierten generiert. Das Membranpotential wurde mittels DiSC₃-Fluoreszenz analysiert, wie in Versuchsdurchführung beschrieben. Erholung des Membranpotentials nach Natriumazid-Behandlung ist durch den grauen Bereich gekennzeichnet.

Des Weiteren untersuchten wir die Fähigkeit *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierender Mitochondrien die Vorformen von mitochondrialen Proteinen aus dem Zytoplasma zu importieren. Die Beobachtung des Proteinimports stellt eine umfassende Analyse der mitochondrialen Qualität dar, da der Import von Proteinen in die Mitochondrien zum einen essenziell für die mitochondriale Biogenese ist und zum anderen die Funktionalität verschiedener wichtiger mitochondrialer Prozesse voraussetzt. So ist für den erfolgreichen Proteinimport eine funktionelle Importmaschinerie notwendig, sowie eine intakte Atmungskette und ein funktionelles Proteinqualitätskontrollsystem. Zur Analyse des mitochondrialen Proteinimports verwendeten wir ein DHFR-Fusionsprotein, welches die MTS der Untereinheit 9 der mitochondrialen ATPase (Su9(70)-DHFR) enthielt. Das Fusionsprotein wurde in einem *in vitro* Translationsprozess radioaktiv markiert und in einer *in organello* Reaktion in isolierte energiereiche Mitochondrien aus den entsprechenden Expressionsstämmen importiert (Abb. 21).

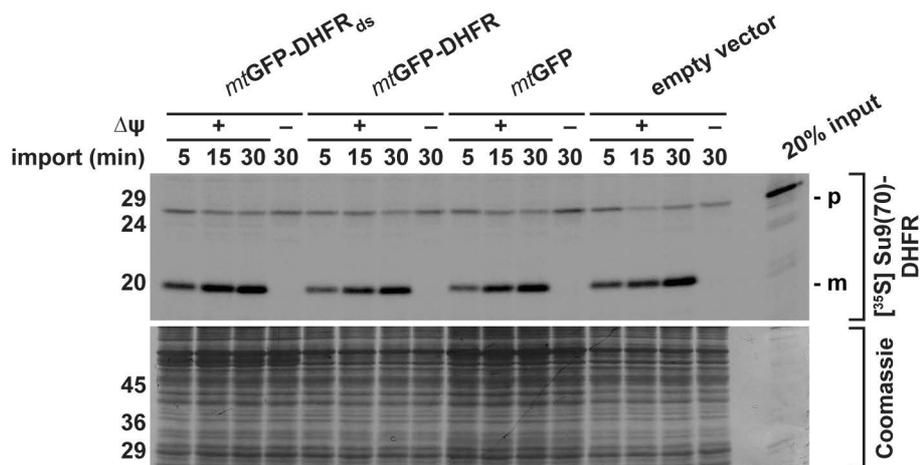


Abbildung 21: *In organello* Import von zytosolischen Vorläuferproteinen in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregaten. [³⁵S] markiertes Su9(70)-DHFR wurde für die angegebene Dauer in isolierte energiereiche Mitochondrien, welche das destabilisierte Reporterprotein oder Kontrollproteine nach 10-stündiger Expression enthielten, wie in der Versuchsdurchführung beschrieben importiert. In (-Δψ) wurde das mitochondriale Membranpotenzial durch die Behandlung mit 8 μM Antimycin A, 0.5 μM Valinomycin und 2 μM Oligomycin aufgehoben. Die Importreaktionen wurden mittels SDS-PAGE und digitaler Autoradiografie analysiert. Das Preprotein (p) und das importierte maturierte Protein (m) sind gekennzeichnet.

Wir beobachteten, dass [³⁵S]-Su9(70)-DHFR effizient in Mitochondrien importiert wurde, ungeachtet der Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}*-Aggregaten. Das Ergebnis deutet somit auf eine aktive Importmaschinerie hin.

Ein weiteres Kennzeichen der Proteinqualitätskontrolle ist der proteolytische Abbau von fehlgefalteten Proteinen. Wir analysierten daher, inwiefern das destabilisierte Reporterprotein mitochondriale Degradationsprozesse beeinflusst, indem wir die Degradation eines radioaktiv markierten Reporterproteins verfolgten, welches zuvor in die mitochondriale Matrix importiert wurde (Abb. 22). Für dieses Experiment nutzen wir ebenfalls ein DHFR-Fusionsprotein, welches in diesem Fall jedoch eine längere MTS des hefespezifischen Proteins Cytochrom b_2 ($b_2(167)_s$ -DHFR) besaß. Die verlängerte MTS führte zu einem längeren ungefalteten N-terminalen Proteinabschnitt, welcher eine bessere Zugänglichkeit für den proteolytischen Abbau ermöglichte.

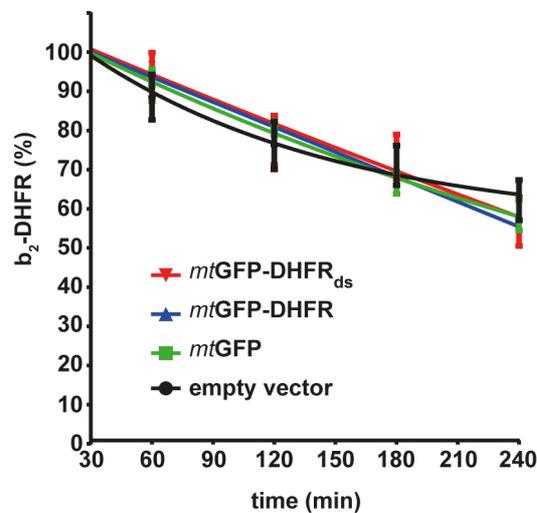


Abbildung 22: Degradationseffizienz isolierter Mitochondrien in Anwesenheit der $mtGFP-DHFR_{ds}$ Aggregate. Radioaktiv markiertes [^{35}S] $cyb_2(167)_D$ -DHFR wurde in die Matrix isolierter Mitochondrien für 20 Minuten importiert, welche das Reporterprotein oder die Kontrollproteine nach 10-stündiger Expression enthielten. Nach der Importreaktion wurden Proben zu angegebenen Zeitpunkten genommen und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die verbleibenden Proteinlevel wurden mittels ImageQuant (Fujifilm) quantifiziert. Der Mittelwert und dessen Standardabweichung ($n=5$) sind dargestellt. Das Experiment wurde in Kooperation mit Witold Jaworek durchgeführt.

Wir stellten fest, dass die Degradationseffizienz in Mitochondrien, welche das destabilisierte Reporterprotein enthielten, ähnlich war im Vergleich zu Kontrollmitochondrien. Erneut konnten wir also zeigen, dass $mtGFP-DHFR_{ds}$ -Aggregate nicht mit einem wesentlichen Prozess der Proteinqualitätskontrolle in der mitochondrialen Matrix interferieren.

Des Weiteren beobachteten wir in einer Folgeanalyse, dass Proteinkomplexe der oxidativen Phosphorylierung (Cox4, Komplex IV; ATP2, mitochondriale ATP-Synthase), des TCA Zyklus (Kgd2, α -Ketoglutaratdehydrogenasekomplex) und der mitochondriale Proteintranslokase (Tom40, TOM-Komplex) nicht durch die Anwesenheit von

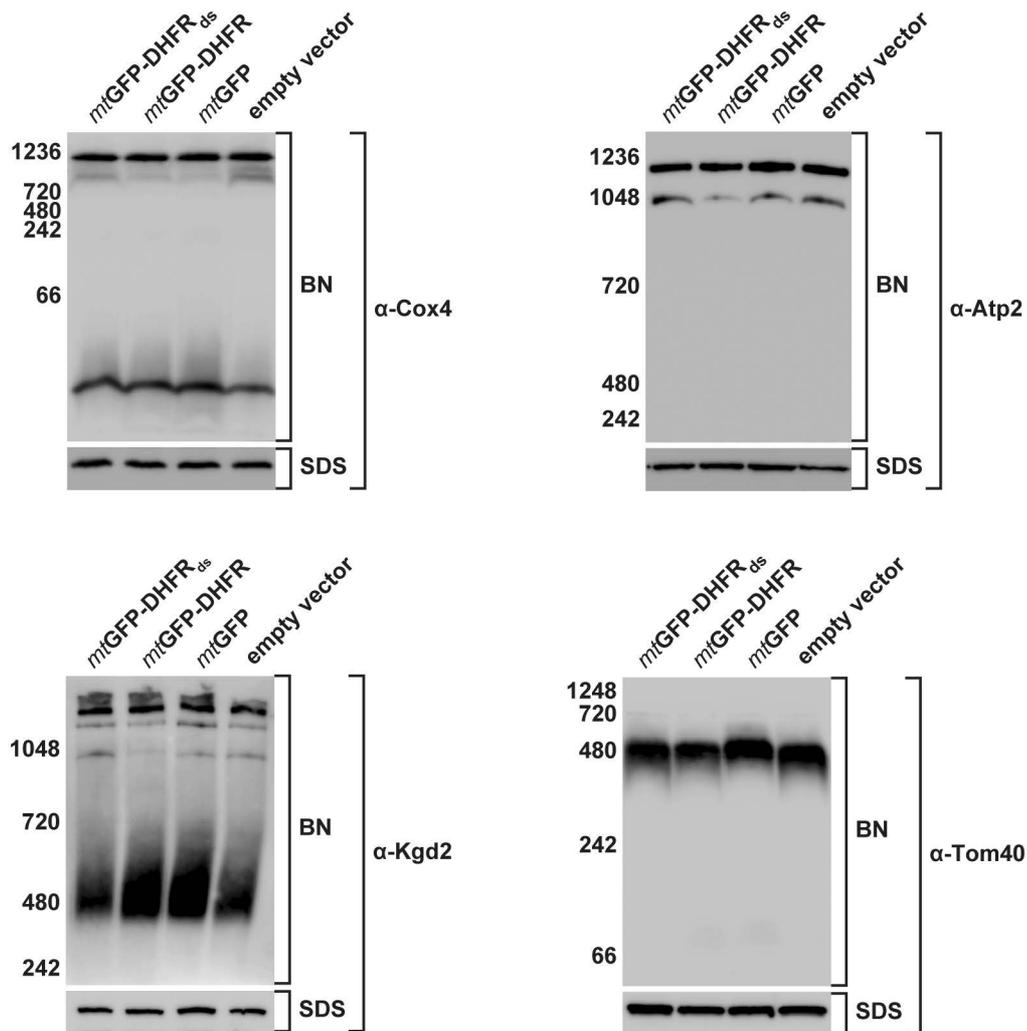


Abbildung 23: Integrität mitochondrialer Proteinkomplexe in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregaten. Die Integrität mitochondrialer Komplexe in isolierten Mitochondrien, welche das destabilisierte Reporterproteine oder Kontrollproteine nach 5-stündiger Expression enthielten, sowie in Mitochondrien aus Hefezellen, welche den Leerkvektor enthielten. Die Mitochondrien wurden durch 0.05 % Digitonin (Detergenz) lysiert und mittels 10 %iger bzw. 12 %iger BN-PAGE analysiert. Proteinkomponenten der mitochondrialen Komplexe der Außenmembran (Tom40, TOM-Translokasekomplex), Innenmembran (Cox4, Atmungskomplex 4) sowie der mitochondrialen Matrix (Atp2, F₁ATPase-Komplex, Kgd2, Ketoglutaratdehydrogenasekomplex) wurden spezifisch detektiert. Als Ladekontrolle wurden isolierte Mitochondrien mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Proteinaggregaten verändert wurden (Abb. 23). Dieses Ergebnis deutet auf eine ungestörte Funktionalität dieser Komplexe hin.

Organismen sind in der Lage bei einer schwerwiegenden Schädigung einzelner Mitochondrien diese spezifisch durch Mitophagie, eine spezielle Form der Autophagie, zu eliminieren. Wir untersuchten, inwiefern die Anwesenheit des IMiQC-Kompartiments in Mitochondrien zu einer Einleitung der Mitophagie führt (Abb. 24). Dazu exprimierten wir entweder *mtGFP-DHFR_{ds}* oder das stabile mitochondriale DHFR-Fusionsprotein für 10 Stunden und stoppten die Expression durch Hinzugabe von Glukose. Anschließend

wurden die Hefezellen für weitere sieben Tage inkubiert. Innerhalb dieser Inkubationszeit erreichten die Hefezellen einen Zustand in dem ihnen keine Kohlenstoffquellen mehr zur Verfügung standen und in dem sie wesentliche Veränderungen im zellulären und kompartimentären Proteom vornahmten, um sich an die limitierenden Konditionen anzupassen. Diese Wachstumsphase wird als stationäre Phase bezeichnet.

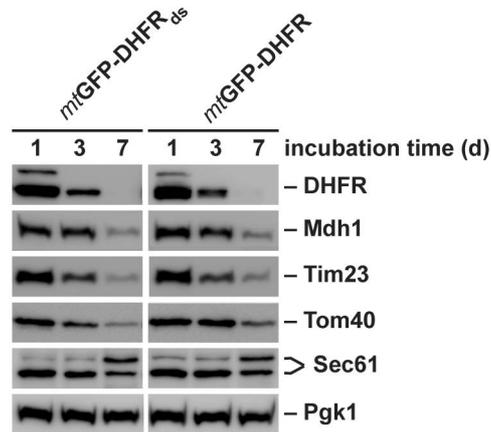


Abbildung 24: Mitochondriale Proteinlevel in der stationären Phase. Bestimmung der Level mitochondrialer Proteine (Mdh1, Tim23 und Tom40) sowie Proteine sowie des Endoplasmatischen Retikulums (Sec61) wurden mittels Western Blot Analyse von wildtypischen Hefezellen, welche das destabilisierte *mtGFP-DHFR_{ds}* oder das Kontrollprotein *mtGFP-DHFR* für 10 Stunden exprimierten und für die angegebene Dauer bei 30 °C inkubierten. Das zytoplasmatische Protein Pgk1 wurde als Ladekontrolle detektiert.

Wir beobachteten in Zellen, welche das destabilisierte Reporterprotein enthielten, eine Abnahme von Proteinen der mitochondrialen Matrix, der Innen- sowie der Außenmembran nach vier Tagen und eine weitere Abnahme nach sieben Tagen. Jedoch war diese Abnahme zu beiden Zeitpunkten ähnlich im Vergleich zu Zellen mit dem stabilen mitochondrialen Fusionsprotein. Die Stabilität eines zytoplasmatischen Proteins (Pgk1) sowie eines Proteins des Endoplasmatischen Retikulums (Sec61) wiesen auf einen spezifischen mitochondrialen Abbau hin. Interessanterweise konnte ebenfalls eine Abnahme des stabilen sowie des destabilisierten DHFR-Fusionsproteins nach vier Tagen beobachtet werden. Beide Reporterproteine waren nach sieben Tagen Inkubationszeit vollständig abgebaut.

Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass die wichtigsten mitochondrialen Funktionen nicht durch eine hohe Menge fehlgefalteter Proteine beeinflusst werden und dies wahrscheinlich durch die Formierung eines großen inerten Proteinaggregatkompartiments ermöglicht wird. Jedoch scheint die Ablagerung geschädigter Proteine im IMiQC-Kompartiment keinen finalen Prozess darzustellen. Vielmehr kann IMiQC in der stationären Phase resolubilisiert und abgebaut werden.

Zusätzlich zeigen die Membranpotentialmessungen mittels zweier unterschiedlicher Methoden, dass der Verlust des Membranpotentials nur an spezifischen Mitochondrien stattfindet, welche das mitochondriale Aggregatkompartiment enthalten, während das mitochondriale Netzwerk vor proteotoxischen Auswirkungen geschützt ist.

4.1.5 Destabilisiertes Reporterprotein beeinflusst Pim1-Funktionalität

Obwohl wir herausfanden, dass der proteolytische Abbau in isolierten Mitochondrien durch *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregate nicht verändert war, konnten wir beobachten, dass andere Prozesse, welche mit der mitochondrialen Protease Pim1 korrelieren, tatsächlich durch die Proteinaggregate beeinflusst wurden. Frühere Experimente in unserem Labor zeigten eine Beteiligung der mitochondrialen Matrixprotease Pim1 bei der Beseitigung von ROS-geschädigten Polypeptiden (Bender et al., 2010). Aus diesem Grund testeten wir das zelluläre Wachstum in Anwesenheit der ROS-induzierenden Chemikalie Menadion.

Wir fanden heraus, dass Zellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* für 5 Stunden exprimierten, eine erhöhte ROS-Resistenz aufwiesen (Abb. 25). Die Zellen zeigten jedoch eine verstärkte Sensitivität gegenüber ROS bei längeren Expressionszeiten was letztendlich in einer signifikant verringerten ROS-Resistenz nach 24 Stunden resultierte. Interessanterweise war das Wachstumsverhalten der Zellen, welche die stabilen Fusionsproteine exprimierten, entgegengesetzt dem von *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierenden Zellen. Während die Zellen eine ROS-Sensitivität nach 5 Stunden aufwiesen, erhöhte sich die ROS-Resistenz mit zunehmender Expressionszeit und war signifikant gesteigert nach 24 Stunden Expression im Vergleich zu Zellen, welche den Leervektor enthielten.

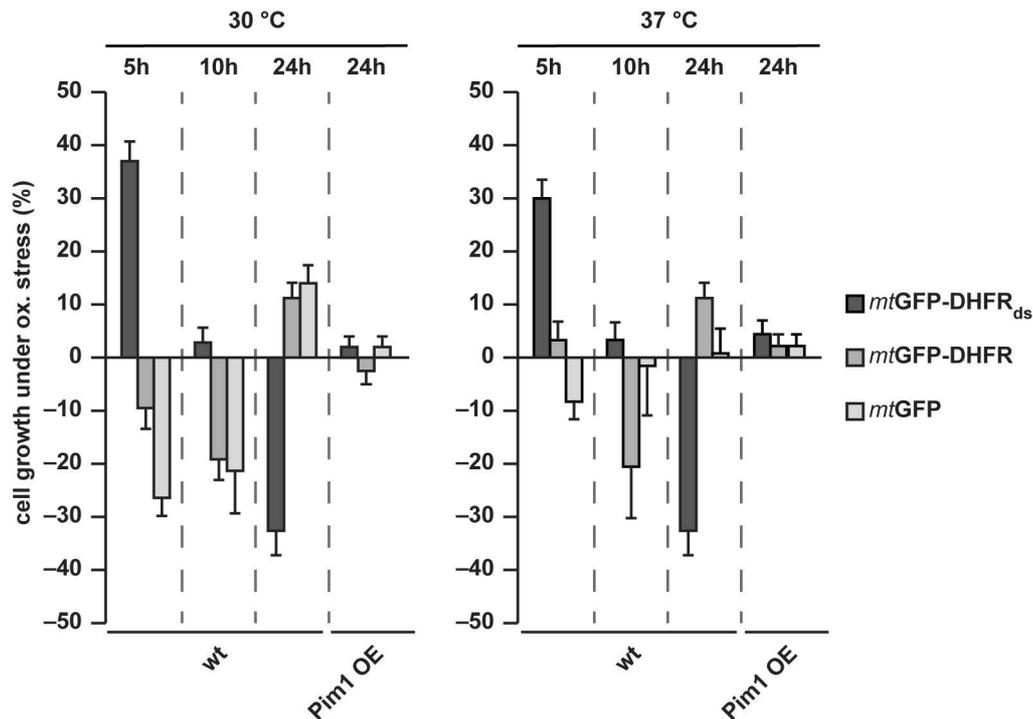


Abbildung 25: ROS-Resistenz IMiQC enthaltender Zellen. Wildtypische Zellen sowie Pim1-überexprimierende Zellen (OE), welche das destabilisierte Reporterprotein oder Kontrollproteine für die angegebenen Zeitpunkte exprimierten, wuchsen auf fermentierbarem Minimalmedium (2 % Glukose) in Anwesenheit von 20 mM Menadion bei 30 °C oder bei 37 °C. Wachstumsinhibitionszonen wurden gemessen und quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwert und dessen Standardabweichung (n=5).

Wir waren in der Lage diese Ergebnisse zu bestätigen, indem wir die ROS-Resistenzanalysen bei einer erhöhten Wachstumstemperatur von 37 °C wiederholten. Auch unter diesen Bedingungen beobachteten wir ein ähnliches Wachstumsverhalten von Zellen, welche das destabilisierte Reporterprotein enthielten. Obwohl Kontrollprotein exprimierende Zellen eine ähnliche Tendenz bei 37 °C wie bei 30 °C aufwiesen, war ihre gesamte ROS-Resistenz leicht reduziert. Die erhöhte ROS-Sensitivität deutet darauf hin, dass die Proteinaggregate nicht komplett inert waren und die Funktion von Pim1 beeinträchtigten. Um diese Annahme zu testen, führten wir die ROS-Resistenzanalyse in Pim1-überexprimierenden Zellen durch, in Anwesenheit oder Abwesenheit von mitochondrialen Aggregaten. Tatsächlich konnte die erhöhte Proteinmenge von Pim1 die ROS-Sensitivität der *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierenden Zellen bei 30 °C sowie bei 37 °C Wachstumstemperatur ausgleichen. Es wurde bereits in früheren Studien beobachtet, dass die Expression mitochondrialer Gene eine Aktivität der mitochondrialen Matrixprotease benötigt, welche unabhängig von ihrer proteolytischen Aktivität ist (van Dyck et al., 1998). Um den Einfluss der mitochondrialen Aggregate auf die mitochondriale Genexpression zu testen, führten wir eine *in organello* Translation durch, welche uns erlaubte die Translation der acht von Mitochondrien codierten Proteine zu verfolgen.

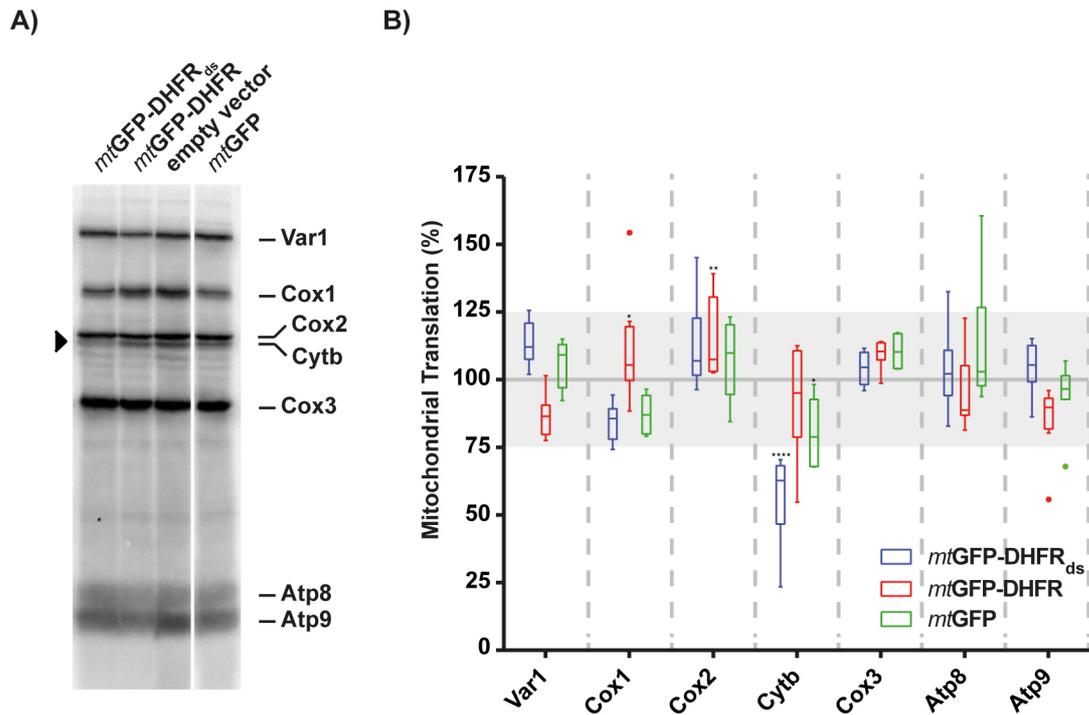


Abbildung 26: In Organello Translationsrate in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}* Aggregaten. A) und B) Die *in organello* Translation wurde in Anwesenheit von 4.4 μCi / Reaktion [^{35}S] Methionin / Cystein in isolierten Mitochondrien durchgeführt, welche das destabilisierte Reporterprotein oder Kontrollproteine nach 10-stündiger Expression enthielten. Die Reaktion fand für 45 Minuten bei 30 °C statt. Die Translationsprodukte wurden mittels eine 15 %iger Urea-SDS-PAGE analysiert und durch digitale Autoradiographie detektiert. B) Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten (repräsentatives Autoradiogramm ist in A) gezeigt). Translationswerte wurden auf die Proteinlevel von Mitochondrien normalisiert, welche aus Zellen isoliert wurden, die den Leervektor enthielten. Die Quantifizierung ist als Tukey-Box-Whisker Blot dargestellt. Der graue Bereich zeigt die Translationsvariabilität innerhalb der Analysen an. Das Experiment wurde in Kooperation mit Cornelia Rüb durchgeführt.

Wir verwendeten intakte energiereiche Mitochondrien, welche aus den entsprechenden Expressionsstämmen isoliert wurden, und inkubierten diese mit [^{35}S]-Methionin um die neu synthetisierten mitochondrialen Translationsprodukte zu markieren.

Die neu synthetisierten Proteine wurden mittels eines 15 % igen Urea-SDS-Gels aufgetrennt und wir waren in der Lage sieben der acht Proteine zu detektieren (Abb. 26A und B). Obwohl die *in organello* Translationseffizienz der individuellen Proteine innerhalb der Experimente um 25 % fluktuierte, war die Translation von Cytochrom *b* in Mitochondrien, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* enthielten, signifikant reduziert. Alle anderen mitochondrial-codierten Proteine waren hingegen in ihrer Translationseffizienz nicht signifikant verändert. Diese Beobachtungen bestätigen eine negative Beeinflussung der *mtGFP-DHFR_{ds}*-Aggregate auf die Pim1-Funktion, da bekannt ist, dass Pim1 für die Reifung der mRNA für Cytochrom *b* in Hefemitochondrien benötigt wird (van Dyck et al., 1998).

4.1.6 *mtGFP-DHFR_{ds}*-Aggregate sind am Zellkern abgelagert um die asymmetrische Verteilung während der Zellteilung zu ermöglichen

Unsere mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 8 und 9) zeigten, dass nur ein paar *mtGFP-DHFR_{ds}*-Aggregate in Zellen formiert wurden, obwohl deren Bildung an vielen Stellen der Mitochondrien stattfinden sollte. Diese Beobachtung führte zu der Überlegung, dass es sich bei IMiQC um ein dynamisches Kompartiment handelt. Zur Analyse dieser Annahme untersuchten wir die Dynamik im Detail indem wir die Anzahl der Proteinaggregate während der *mtGFP-DHFR_{ds}*-Expression über die Zeit verfolgten. Dazu wurden Hefezellen entweder in Anwesenheit von Galaktose im Wachstumsmedium, zum Erhalt der kontinuierlichen Expression, oder nach Zugabe von Glukose nach 2.5 Stunden der Induktion, zur Unterbindung der spezifischen Proteinexpression, inkubiert. Die Anzahl der Aggregate wurde nach 5, 10 und 24 Stunden bestimmt.

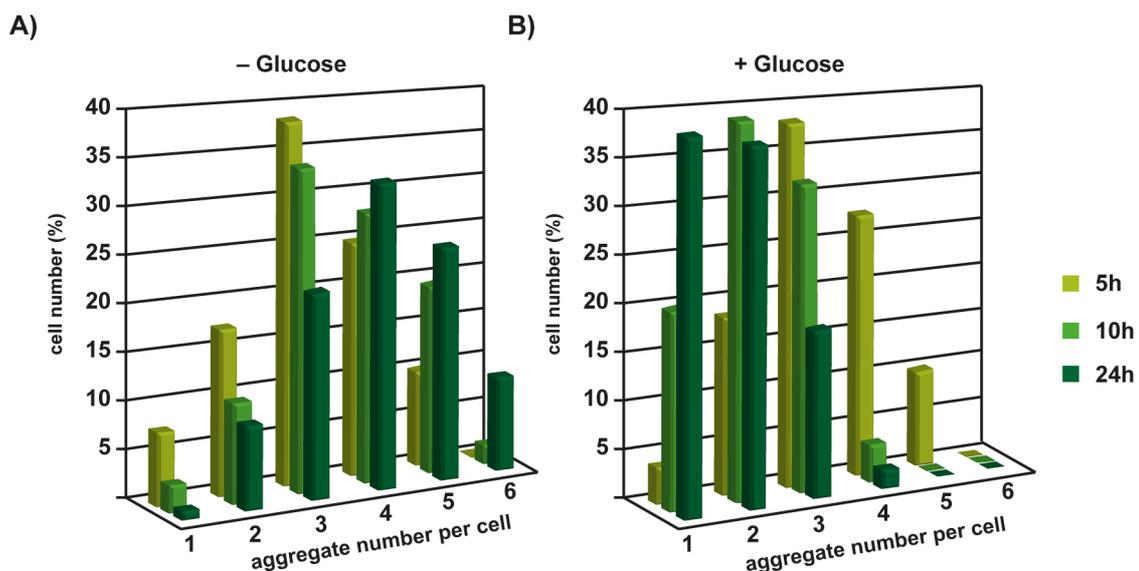
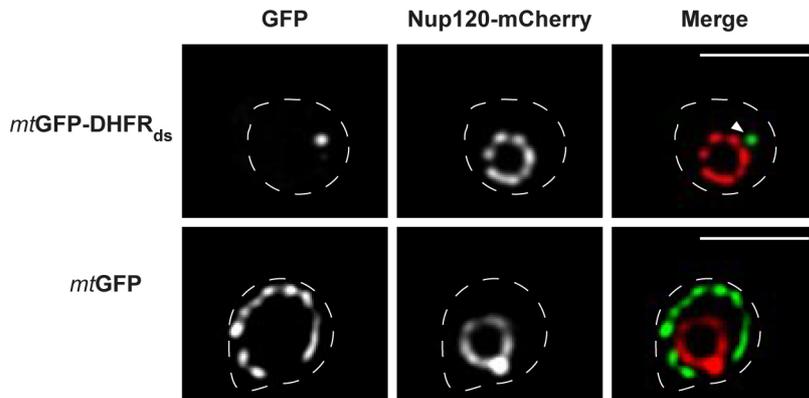


Abbildung 27: Formierung des IMiQC-Kompartiments. A) und B) Quantifizierung der Aggregatanzahl in wildtypischen Hefezellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierten. Die Expression wurde entweder nach 2.5 Stunden durch Hinzugabe von 2 % Glukose (A) gestoppt oder verblieb konstant (B). Lebende Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert und GFP-positive Agglomerate wurden in jeweils 200 exprimierenden Zellen nach 5 (hellgrün), 10 (grün) und 24 Stunden (dunkelgrün) bestimmt. Alle exprimierenden Zellen ergeben in Summe 100%.

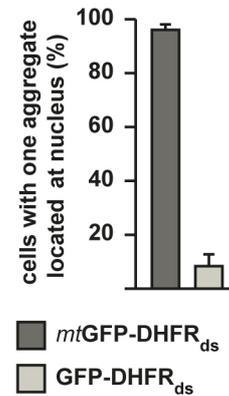
Nach 5 Stunden war die Anzahl der Aggregate ähnlich in Anwesenheit oder bei Abwesenheit von Glukose. Während der kontinuierlichen Expression von *mtGFP-DHFR_{ds}* stieg die Anzahl der Aggregate über die Zeit an und erreichte nach 24 Stunden zwischen vier und sechs Aggregate pro Zelle (Abb. 27A). Hingegen reduzierte sich die Anzahl der Aggregate in Anwesenheit von Glukose über die Zeit, bis nach 24 Stunden nur noch ein

oder zwei Aggregate sichtbar waren (Abb. 27B). Interessanterweise konnten wir ebenso nachweisen, dass sich das Proteinlevel von *mtGFP-DHFR_{ds}* innerhalb der 24 Stunden nicht verändert (Abb. 17). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass fehlgefaltete Proteine über die Zeit ein oder zwei große Inklusionen formieren.

A)



B)



C)

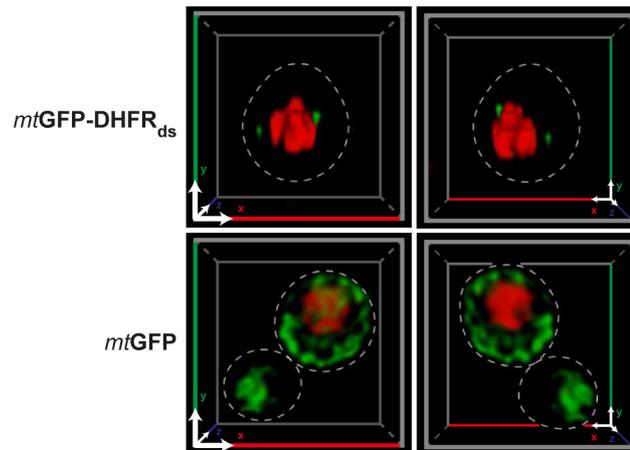


Abbildung 28: Perinukleäre Lokalisation von IMiQC. A) Wildtypische Hefezellen, welche das Kernmembranprotein Nup120-mCherry (rot) enthielten, exprimierten *mtGFP-DHFR_{ds}* (grün) oder *mtGFP* (grün) für 5 Stunden und wurden mittels konvokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Maßstabbalken: 10 μ m. B) Quantifizierung der IMiQC-Lokalisation in wildtypischen Hefezellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* (dunkelgrau) oder das zytoplasmatische *GFP-DHFR_{ds}* (hellgrau) für 5 Stunden exprimierten. Die Lokalisation des IMiQC-Kompartiments wurde in jeweils 100 Zellen in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Der Mittelwert und dessen Standardabweichung sind dargestellt. C) Dreidimensionale Darstellung des IMiQC-Kompartiments (grün) oder des mitochondrialen GFP (grün) in wildtypischen Hefezellen, welche das Kernmembranprotein Nup120-mCherry (rot) exprimierten. Die 3D-Rekonstruktion wurde nach einem Z-Stack-Scan mittels Fiji simuliert.

Darüber hinaus zeigen die mikroskopischen Aufnahmen, dass nach einer Expressionszeit von 5 Stunden typischerweise ein Kompartiment vom mitochondrialen Netzwerk separiert vorliegt, welches in der Nähe des DAPI-gefärbten Zellkerns lokalisiert ist (Abb. 8 und 9).

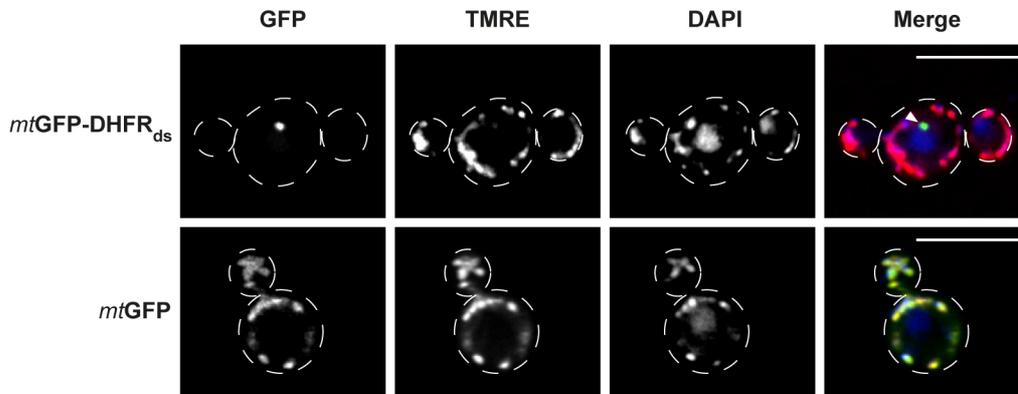
Zur genaueren Analyse der Kernlokalisierung exprimierten wir parallel zu *mtGFP-DFHR_{ds}* oder *mtGFP* das mCherry-markierte Protein Nup120, ein Bestandteil des Kernporenkomplexes (Abb. 28A). Während *mtGFP* das mitochondriale Netzwerk reflektierte und nicht mit dem Zellkern korreliert war, zeigte das IMiQC-Kompartiment zwar eine Lokalisation in der Nähe, jedoch nicht innerhalb des Zellkerns. Diese Beobachtung konnte durch eine dreidimensionale Darstellung der IMiQC-Lokalisation bestätigt werden (Abb. 28C). Wir werteten die Aggregatkompartimentlokalisierung statistisch aus und konnten zeigen, dass in 96 % aller Zellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierten, zumindest ein Aggregat am Zellkern lokalisiert ist (Abb. 28B). Zum Vergleich exprimierten wir ebenso das destabilisierte GFP-DHFR_{ds}-Fusionsprotein ohne eine entsprechende MTS. Obwohl das zytoplasmatische destabilisierte Protein ebenso Aggregate bildete, zeigten nur 8 % der Zellen eine Kernlokalisierung der Aggregate. Diese Ergebnisse zeigen eine perinukleäre Lokalisation der mitochondrialen Aggregate und deuten auf eine spezifische Eigenschaft des IMiQC-Kompartiments hin.

In Studien über zelluläre Aggregatkompartimente wurde mehrfach beschrieben, dass Aggregatablagerungen zu einer ungleichmäßigen Verteilung geschädigter Proteine während der Zellteilung führen. Zur Analyse, inwiefern die Ablagerung fehlgefalteter Proteine in IMiQC auch zu einer ungleichmäßigen Verteilung beiträgt, blockierten wir die Expression des destabilisierten Proteins oder des stabilen Kontrollproteins nach 5 Stunden durch Hinzugabe von Glukose und inkubierten die Zellen für weitere 3 Stunden (Abb. 29A und B). Diese Zeit erlaubte ein bis zwei weitere Zellteilungen und garantierte dadurch, dass GFP-Signale nur in der Tochterzelle lokalisiert sein konnten, wenn sie von der Mutterzelle weitergegeben wurden. Eine Neusynthese wurde durch das Blockieren der Expression ausgeschlossen.

Mikroskopische Analysen zeigten, dass das nicht-aggregierte *mtGFP* in 98 % der Tochterzellen weitergegeben wurde, welche mit einer normalen Weitergabe der Mitochondrien von Mutter- zu Tochterzellen korrelierte. Die mitochondriale Färbung mittels TMRE in Zellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* enthielten, zeigte ebenfalls die Weitergabe der Mitochondrien während der Hefeknospung. Hingegen verblieben jedoch die Inklusionen in 97 % aller exprimierender Zellen in der Mutterzelle. Diese

Beobachtungen deuten darauf hin, dass das IMiQC-Kompartiment nicht an die Tochterzellen vererbt wird.

A)



B)

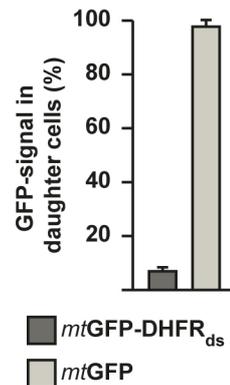


Abbildung 29: IMiQC-Formierung befreit Tochterzellen von ungefalteten Proteinen.
 A) Fluoreszenzmikroskopie lebender Hefezellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* (grün) oder das Kontrollprotein *mtGFP* (grün) für 5 Stunden exprimierten. Die Expression wurde durch die Hinzugabe von 2 % Glukose gestoppt und die Zellen wurden für weitere 3 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Mitochondrien wurden durch TMRE-Färbung (rot) und der Kern mittels DAPI-Färbung (blau) visualisiert. Maßstabballen: 10 µm.
 B) Quantifizierung von Hefezellknospen, welche Aggregatstrukturen enthielten. Zellen, welche die Reporterproteine exprimierten, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie wie in A) beschrieben analysiert. Die Anwesenheit von GFP-positiven Signalen wurde in jeweils 100 Tochterzellen während der Knospung in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Mittelwert und dessen Standardabweichung sind dargestellt.

4.1.7 Detoxifizierung und vollständige Formierung des IMiQC-Kompartiments benötigen die Spaltung und Fusion der Mitochondrien

Zur Aufklärung welche Faktoren in die Formierung des IMiQC-Kompartiments involviert sind analysierten wir das Wachstum verschiedener mutierter Hefestämme, welche das destabilisierte Reporterprotein oder Kontrollproteine exprimierten. Zum einen nutzen wir Stämme denen mitochondriale Chaperone fehlten. Zu den deletierten Chaperonen zählten das mitochondriale Hsp70-Homolog Ssc1 und sein Hsp40 Ko-Chaperon Mdj1 sowie das mitochondriale Hsp100-Homolog Hsp78. Wir testeten darüber hinaus auch Faktoren welche für die Regulation der mitochondrialen Dynamik notwendig sind (Fis1, Fzo1).

Wir beobachteten, dass die *mtGFP-DHFR_{ds}* Expression in Zellen, welchen mitochondriale Chaperone fehlen, keine Veränderung der Wachstumsrate auf fermentierbaren sowie nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen hervorrief (Abb. 30A). Dies deutet auf eine funktionelle Detoxifizierung der Proteinaggregate unabhängig vom mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems hin. Dabei ist zu beachten, dass die Deletion des Hsp40-Chaperones Mdj1 zu Atmungskettendefekten führte und daher die Analyse der Wachstumsrate auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen nicht möglich war.

Hingegen führte die Eliminierung des Faktors Fis1, welcher in der mitochondrialen Spaltung eine Rolle spielt, in Anwesenheit des destabilisierten Reporterproteins zu schwerwiegenden Wachstumsdefekten auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen war der Wachstum jedoch gleich im Vergleich zu Zellen welche Kontrollproteine exprimierten. Die Analyse der Wachstumsrate auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen von Zellen, welchen das FzoI-Gen fehlt, welches für einen Faktor der mitochondrialen Fusion codiert, war aufgrund von Atmungskettendefekten nicht möglich. Jedoch war das Wachstum dieser Mutante auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen in Anwesenheit der *mtGFP-DHFR_{ds}*-Aggregate unverändert. Wir bestätigten den Wachstumsdefekt in Fis1-Deletionszellen in Anwesenheit von *mtGFP-DHFR_{ds}*, indem wir einen letalen Wachstumsdefekt in Anwesenheit vom IMiQC-Kompartiment beobachteten, wenn diese Zellen bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C inkubiert wurden (Abb 30B).

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Beeinträchtigung des mitochondrialen Spaltungsprozesses zur kompletten Aufhebung der schützenden Effekte der IMiQC-Formierung führen.

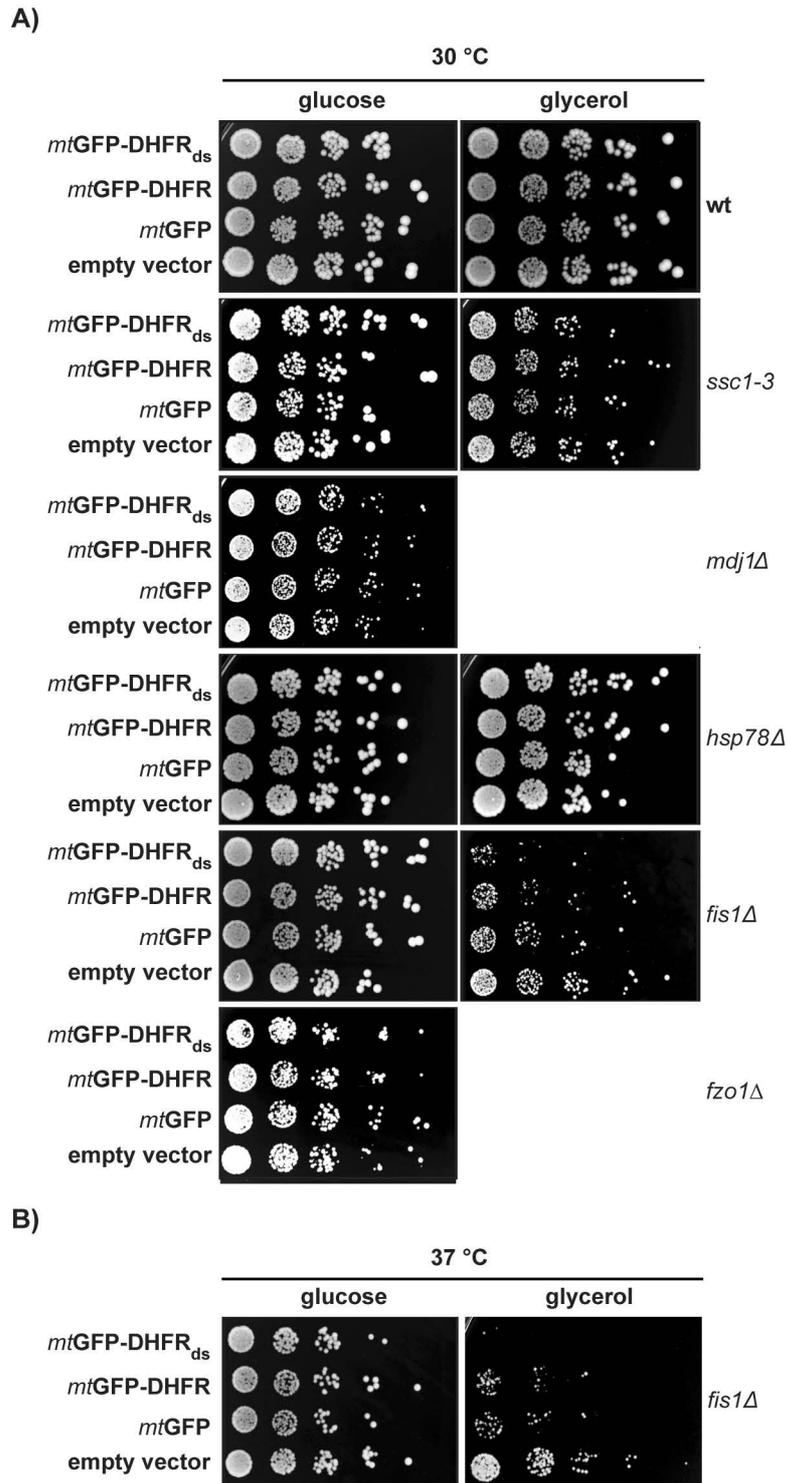


Abbildung 30: Zelluläre Faktoren sind an der IMiQC-Formierung beteiligt. A) Zelluläres Wachstum mutierter Hefezellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* oder Kontrollproteine für 10 Stunden exprimierten. Die Zellen wurden als serielle Verdünnungen auf Selektionsplatten getropft, welche eine fermentierbare (2 % Glukose) oder nicht-fermentierbare (3 % Glycerol) Kohlenstoffquelle enthielten, und wurden bei 30 °C für 2 Tage (Glukose) oder 7 Tage (Glycerol) inkubiert. Die Deletionen von *Mdj1* und *Fzo1* führen zu Atmungskettendefekten und die Stämme zeigen daher kein Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. B) Zelluläres Wachstum von *fis1Δ*-Zellen, welche das destabilisierte Reporterprotein oder die Kontrollproteine für 10 Stunden unter mildem Hitzstress exprimierten. Die Zellen wurden wie in A) beschrieben vorbereitet. Die Platten wurden bei 37°C für 2 Tage (Glucose) oder 7 Tage (Glycerol) inkubiert.

Hsp78 ist ein wichtiger Faktor des mitochondrialen POCs, welcher in Disaggregationsprozessen der Hefen involviert ist. Wir analysierten daher die Thermotoleranz von Zellen, welchen Hsp78 fehlte, in Anwesenheit oder Abwesenheit der Proteinaggregate. Wir inkubierten Zellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* oder Kontrollproteine für 10 Stunden exprimierten, für eine weitere Stunde bei 42 °C. Anschließend ließen wir die Zellen bei 30 °C für 30 Minuten regenerieren und inkubierten sie dann für eine Stunde bei der normalerweise letalen Temperatur von 50 °C (Abb. 31).

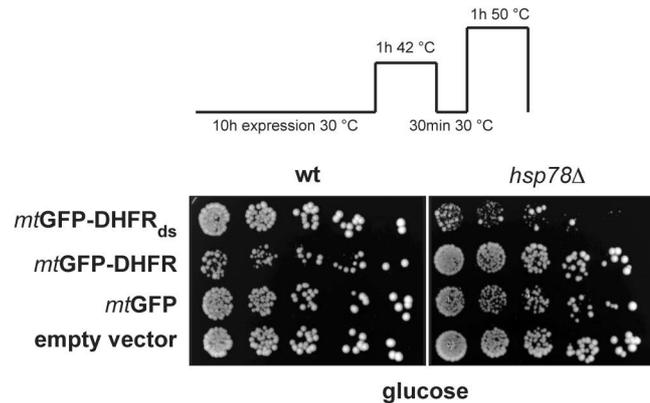


Abbildung 31: Thermotoleranz von *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierenden Hsp78-Deletionszellen. Analyse der erworbenen Thermotoleranz wildtypischer sowie in *hsp78Δ* Hefezellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}* oder die Kontrollproteine für 10 Stunden exprimierten. Nach Proteinexpression bei 30 °C wurden die Zellen einem kurzen Hitzestress bei 42 °C ausgesetzt und regeneriert wie im Schema angegeben. Anschließend wurden die Zellen bei der letalen Temperatur von 50 °C für 1 Stunde inkubiert. Serielle Verdünnung wurde auf Selektionsplatten getropft, welche 2 % Glukose enthielten. Die Platten wurden bei 30 °C für 2 Tage inkubiert.

Wir fanden heraus, dass die Thermotoleranz in *hsp78Δ*-Zellen, welche *mtGFP-DHFR_{ds}*-Aggregate enthielten, deutlich herabgesetzt war. Dieses Ergebnis deutet auf eine Rolle von Hsp78 in der Detoxifizierung von ungefalteten Proteinen durch die IMiQC-Formierung hin. Darüber hinaus stellten wir fest, dass die Anzahl der Aggregate in *fzo1Δ*-Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen geringer war (Abb. 32A). Die Anzahl war jedoch in Zellen, welchen das Protein Fis1 fehlt, nicht verändert. Ebenso wie in *fzo1Δ*-Zellen war die Anzahl der Aggregate auch in *hsp78Δ*-Zellen verringert. Des Weiteren war die Lokalisation der Aggregate am Kern in beiden Stämmen und im Vergleich zu exprimierenden wildtypischen Zellen um 27 % (*hsp78Δ*) bzw. um 23 % (*fzo1Δ*) der exprimierenden Zellen reduziert (Abb. 32B). Es scheint, dass die Fusion von Mitochondrien notwendig ist für Formierung des perinukleären IMiQC-Kompartiments.

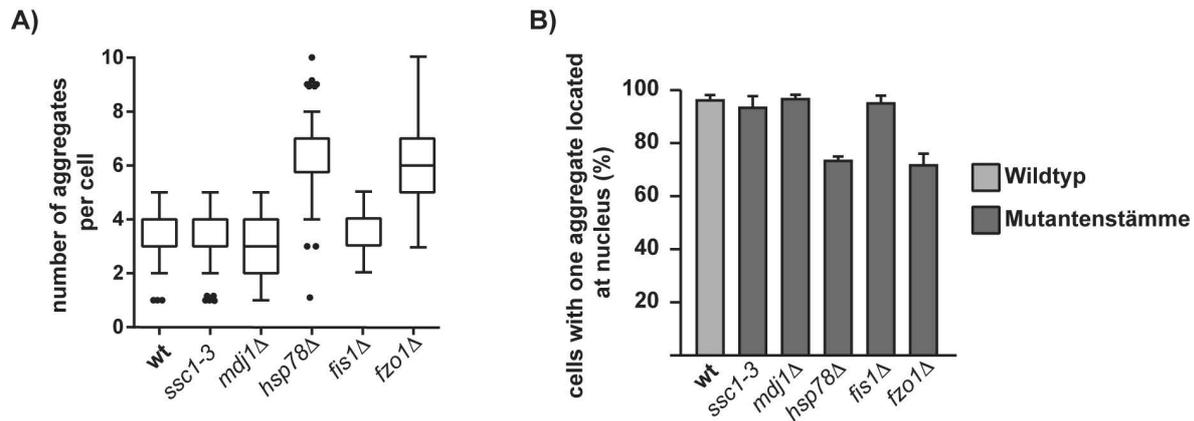


Abbildung 32: Anzahl der Aggregate und perinukleäre Lokalisation in Mutantenstämmen. A) Anzahl der Aggregate in mutierten Stämmen. Wildtypische Hefezellen und verschiedene Mutantenstämmen, welche *mtGFP-DFHR_{ds}* oder die Kontrollproteine für 10 Stunden exprimierten, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. In jeweils 200 Zellen wurde die GFP-positive Aggregatanzahl evaluiert und als Tukey Box-Whisker Diagramm dargestellt. B) Die Lokalisation der GFP-positiven Aggregate wurde in jeweils 100 wildtypischen Hefezellen (hellgrau) sowie in 100 Zellen der verschiedenen Mutantenstämmen (dunkelgrau) analysiert. Dargestellt sind Mittelwert und dessen Standardabweichung (n=3).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Detoxifizierung geschädigter und ungefalteter Proteine von der mitochondrialen Dynamik abhängig ist. Zellen, welche eine beeinträchtigte mitochondriale Spaltung aufweisen, zeigen nur ein einzelnes großes zusammenhängendes Mitochondrion, in dem die Separation der IMiQC-Inklusion nicht mehr möglich ist. Daraus resultieren schließlich Aggregate im gesamten mitochondrialen Netzwerk, welche toxische Effekte hervorrufen. Hingegen führt die beeinträchtigte Fusion von Mitochondrien zu vielen, kleinen Mitochondrien. Dies resultiert in einer herabgesetzten IMiQC-Formierung sowie in einer erniedrigten Effizienz der Kernablagerung.

Zusätzlich weisen die reduzierte Thermotoleranz sowie die erhöhte Aggregatanzahl auf eine wichtige Rolle der mitochondrialen Disaggregase Hsp78 in der IMiQC-Bildung hin, obwohl keine Ko-Sedimentation von Hsp78 mit IMiQC gefunden werden konnte (Abb. 16).

4.1.8 Amyloide Proteine werden nicht im IMiQC-Kompartiment abgelagert

Wir konnten zeigen, dass das destabilisierte Reporterprotein *mtGFP-DHFR_{ds}* in einem Proteinaggregatkompartiment zum Schutz der mitochondrialen Qualität abgelagert wird. Aufgrund der SDS-Löslichkeit und durch die Sensitivität gegenüber des proteolytischen Abbaus durch Proteinase K konnten wir demonstrieren, dass das destabilisierte Protein amorphe und ungeordnete Aggregate bildet (Abb. 5B und 6).

Aus diesem Grund untersuchten wir inwiefern Proteine die zur Bildung von amyloiden und hoch strukturierten Aggregaten führen ebenso im IMiQC- Proteinqualitätskontrollkompartiment abgelagert werden. Zur Analyse des Aggregationsverhaltens solcher Proteine konzipierten wir erneut GFP-Fusionsproteine die entweder eine Domäne eines Hefepriions oder eines glutaminreichen Proteins enthielten. Prione sowie glutaminreiche Proteine können amyloide Proteinaggregate formen (Nakayashiki et al., 2001, Dehay & Bertolotti, 2006). Zur Erstellung des Prionenreporterproteins verwendeten wir die erste Domäne (Aminosäuren 2 bis 235) des Hefepriions Sup35. Hingegen wurde für das glutaminreiche Fusionsprotein die erste Domäne des Proteins Huntingtin verwendet, welches als glutaminreiche Variante mit 115 Glutaminen vorlag. Beide Reporterproteine enthielten zur Lokalisation in Mitochondrien des Weiteren die MTS des mitochondrialen Proteins Cytochrom *b*₂. Wir bezeichneten die Proteine *mtGFP-Sup35(2-235)* und *mtGFP-Q115*.

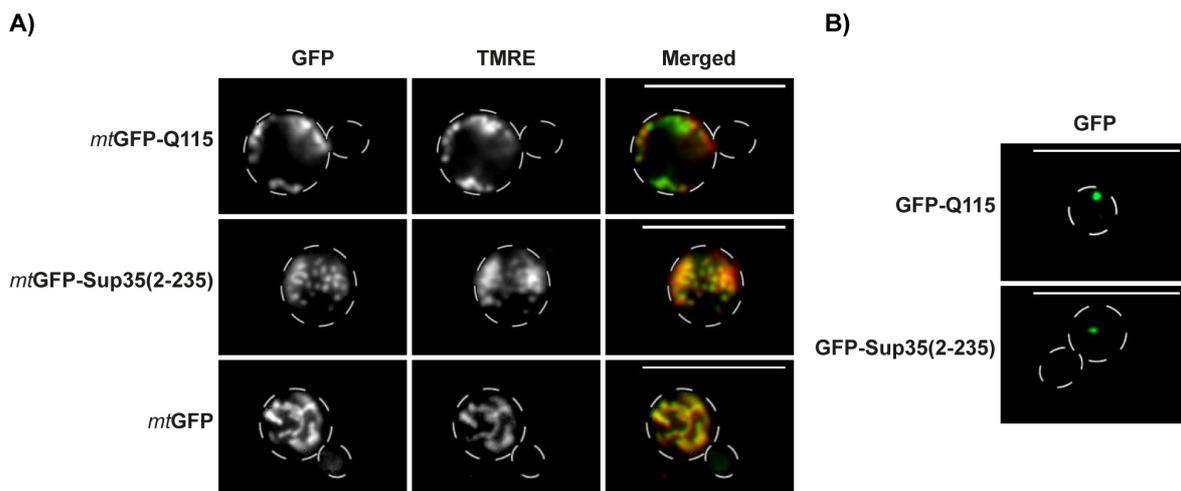


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Analyse amyloider Reporterproteine. A) Zellen, welche das destabilisierte *mtGFP-Sup35(2-235)*, *mtGFP-Q115* oder das Kontrollprotein *mtGFP* (alle grün) für 10 Stunden exprimierten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Das mitochondriale Innenmembranpotential wurde durch TMRE-Färbung (rot) visualisiert. Maßstabbalken: 10 μ m. B) Wildtypische Hefezellen, welche die Reporterproteine GFP-Q115 oder GFP-Sup35(2-235) für 10 Stunden exprimierten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Maßstabbalken: 10 μ m.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Expressionsstämme, welche die Reporterproteine *mtGFP-Sup35(2-235)* und *mtGFP-Q115* für 10 Stunden exprimierten, zeigte keine großen Agglomerate wie in *mtGFP-DHFR_{ds}*-exprimierenden Zellen (Abb. 33A). Hingegen wiesen beide Expressionsstämme Veränderungen der mitochondrialen Morphologie auf. Während *mtGFP* erneut das mitochondriale Netzwerk repräsentierte was auf eine normale mitochondriale Morphologie schließen ließ, führte die

Expression der beiden Aggregationsreporterproteine zu kleinen, punktuellen Gebilden, welche nicht mit der Proteinablagerung in IMiQC erklärt werden konnten. Die Färbung der Mitochondrien mit TMRE zeigten zum einen, dass beide Reporterproteine in Mitochondrien lokalisiert waren und zum anderen, dass die punktuellen Formen Mitochondrien darstellten.

Wir kontrollierten, inwiefern die Reporterproteine eine intrinsische Aggregationstendenz besaßen, indem wir zytosolische Varianten der Reporterproteine ohne MTS exprimierten (Abb. 33B). Beide Proteine, GFP-Sup35(2-235) sowie GFP-Q115, formten zytoplasmatische Proteinaggregate nach einer Expressionszeit von 10 Stunden.

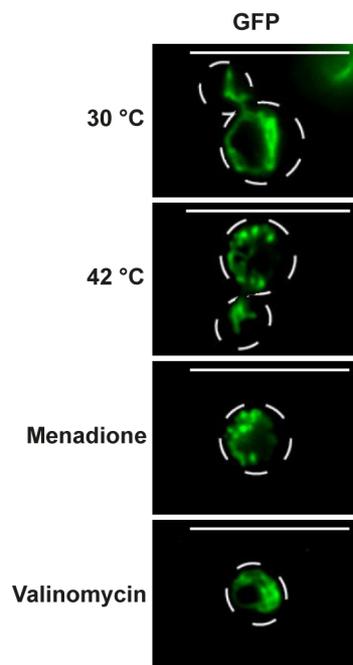


Abbildung 34: Mitochondriale Morphologie unter verschiedenen Stresskonditionen. Analyse der mitochondrialen Morphologie unter verschiedenen Stresssituationen. Wildtypische Hefezellen, welche das Reporterprotein *mtGFP* für 5 Stunden exprimierten wurden entweder bei 30 °C, 42 °C oder in Anwesenheit von 1 mM Menadion oder 2 μ M Valinomycin für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Maßstabballen: 10 μ m.

Wir testeten daraufhin, inwiefern die mitochondriale Morphologie tatsächlich verändert war, indem wir *mtGFP*-exprimierende Zellen in Anwesenheit verschiedener Stressoren inkubierten (Abb. 34). Während die Inkubation der exprimierenden Zellen bei 30 °C erneut eine normale mitochondriale Morphologie aufwies, führte die Inkubation bei einer erhöhten Temperatur von 42 °C oder die Behandlung der Zellen mit der ROS-induzierenden Chemikalie Menadion zu kleinen mitochondrialen Gebilde, vergleichbar mit den Beobachtungen in *mtGFP*-Sup35(2-235) und *mtGFP*-Q115 exprimierenden Zellen. Aus früheren Studien über Hitze- sowie über oxidativen Stress ist bekannt, dass diese Stressoren zu einer Fragmentierung der Mitochondrien führen (Braun & Westermann,

2011). Aus diesem Grund konnten wir darauf schließen, dass die Expression der beiden Reporterproteine ebenfalls die Fragmentierung der Mitochondrien hervorrief. Interessanterweise bewirkte die Behandlung der *mtGFP*-exprimierenden Zellen mit Valinomycin, welches zur Zerstörung des Membranpotentials führte, zu einem großen zusammenhängenden Netzwerk eines einzigen Mitochondriums (Abb. 34).

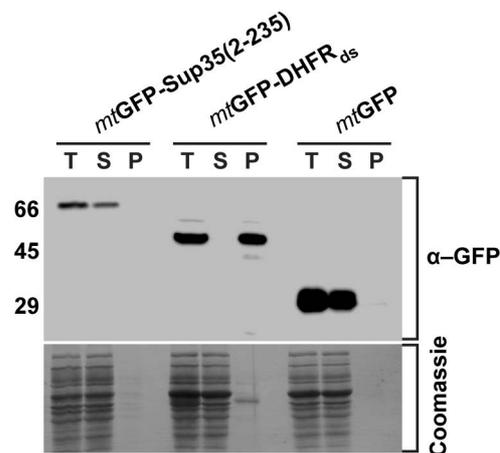


Abbildung 35: Sedimentation des mitochondrialen, amyloiden Reporterproteins. Aggregationsverhalten der Reporterproteine *mtGFP*-Sup35(2-235), *mtGFP*-DHFR_{ds} sowie des Kontrollproteins *mtGFP*. Wildtypische Hefezellen, welche die Reporterproteine für 10 Stunden exprimierten, wurden lysiert und anschließend bei 20.000 xg zentrifugiert. Die Totalfraktion (T), die Überstands- (S) sowie die Pelletfraktion (P) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert und die Reporterproteine durch Antikörper gegen GFP detektiert. Die unspezifische Coomassie Färbung diente als Ladekontrolle

Wir überprüften daraufhin, inwiefern die Fragmentierung der Mitochondrien durch Aggregationsprozesse der Reporterproteine ausgelöst wurde. Wir führten einen Sedimentationsansatz mit Hefezellen durch, welche entweder *mtGFP*-DHFR_{ds}, *mtGFP*-Sup35(2-235) oder das Kontrollprotein *mtGFP* für 10 Stunden exprimierten (Abb. 35). Während *mtGFP*-DHFR_{ds} erwartungsgemäß in der Pelletfraktion gefunden wurde, konnte *mtGFP*-Sup35(2-235) nur in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet auf zwei wesentliche Eigenschaften hin. Zum einen scheint die Expression von *mtGFP*-Sup35(2-235) zu einem SDS-löslichen Protein zu führen und zum anderen aggregierte das Reporterprotein nicht. Es ist hierbei anzumerken, dass das zweite Reporterprotein *mtGFP*-Q115 nicht mittels der SDS-PAGE detektiert werden konnte was wahrscheinlich auf seine SDS-Resistenz zurückgeführt werden kann. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Proteine, welche normalerweise amyloide Proteinaggregate bilden, zur Fragmentierung der Mitochondrien führen. Diese Fragmentierung ist vergleichbar mit anderen proteotoxischen Stresssituationen wie Hitzestress oder oxidativen Stress.

4.2. Herstellung eines fluoreszierenden rekombinanten Importproteins für den *in organello* Import in Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1 GFP-ähnliche Fluoreszenzproteine können durch die ko-translationale Importreaktionen *in organello* in Mitochondrien transportiert werden

Die *in organello* Importreaktion ist ein gängiges Werkzeug zur Beschreibung der mitochondrialen Importmechanismen und dient auch zur Analyse der mitochondrialen Funktionalität. Der mitochondriale Import von zytosolischen Preproteinen stellt einen äußerst komplexen Prozess dar, welcher neben einer funktionellen Importmaschinerie, ebenso ein funktionierendes Proteinqualitätskontrollsystem sowie eine effiziente Atmungskette voraussetzt. Daher ist die Beeinflussung der *in organello* Importreaktion bei Veränderungen der mitochondrialen Proteinhomöostase sowie bei wechselnden extra-mitochondrialen Bedingungen, einer der ersten Fragestellungen bei der Untersuchung dieser zellulären Kompartimente.

Gegenwärtig werden die Importreaktionen in isolierte Mitochondrien häufig mit radioaktiv markierten Preproteinen durchgeführt, welche durch *in vitro* Transkription und Translation in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin hergestellt werden. Dies ermöglicht zwar eine hohe Detektionssensitivität, erlaubt jedoch keine quantitative Bestimmung der Importeffizienz, da die Menge des *in vitro*-translatierten Proteins nicht bestimmt werden kann.

Daher wurde in einem kleineren Abschnitt dieser Promotionsarbeit ein rekombinantes fluoreszierendes Protein konstruiert, welches zum einen die Herstellung einer großen Menge Preproteins ohne Einsatz von [³⁵S]-Methionin erleichtern, und zum anderen die quantitative Bestimmung der Importeffizienz ermöglichen sollte. Darüber hinaus war das Ziel ein fluoreszierendes Protein zu erhalten, welches in isolierte Mitochondrien aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sowie aus Säugetierzelllinien importiert werden kann.

Wir analysierten zunächst die Importfähigkeit des Fluoreszenzproteins Dentra, ein verwandtes Protein des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) (Abb. 36A). Theoretisch benötigt dieses Protein keine Markierung mittels eines Fluorophors und kann direkt nach der SDS-PAGE mit den entsprechenden Filtern detektiert werden. Das Protein war mit einer mitochondrialen Zielsequenz versehen, zur erfolgreichen Lokalisation in die Mitochondrien. Wir analysierten den Import in isolierte Mitochondrien nach der *in vitro* Transkription und Translation von *mtDentra* in der Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin im Vergleich zum radioaktiv markierten

Preprotein Su9(70)-DHFR. Letzteres wurde bereits häufig erfolgreich als Imports substrat verwendet (Gambill et al., 1993).

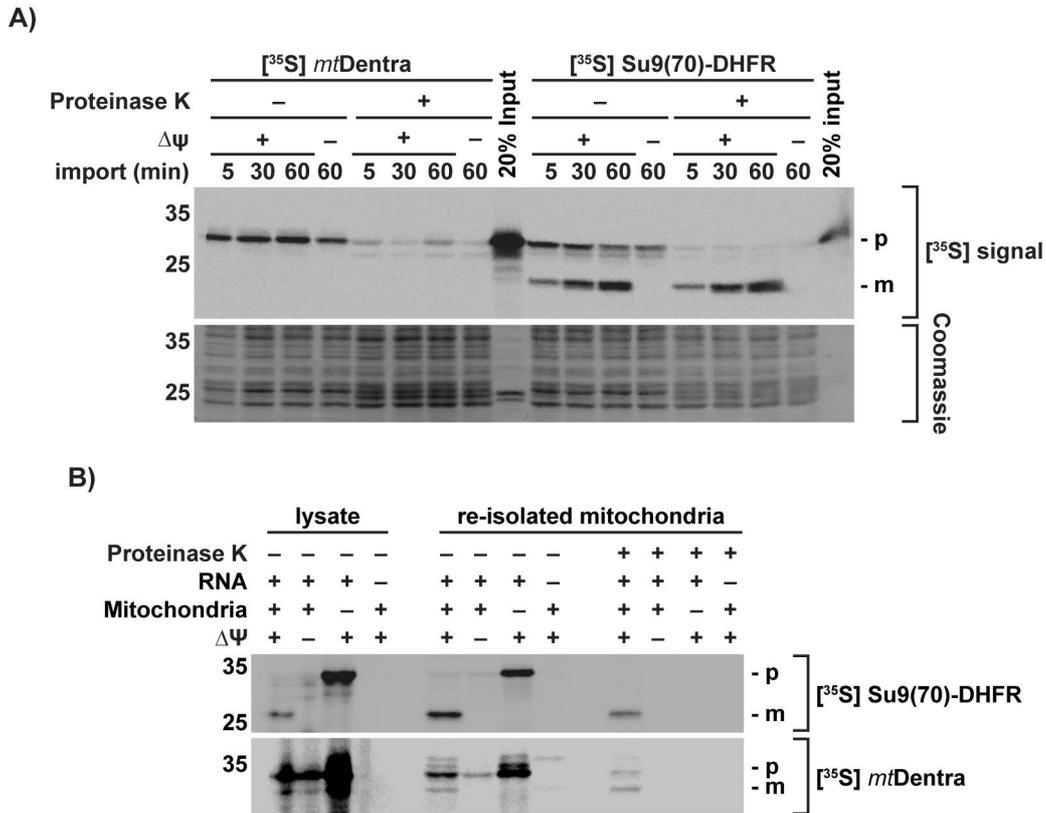


Abbildung 36: Ko-translationale *in organello* Importreaktion in isolierte Mitochondrien. A) Eine *in organello* Importreaktion von ^[35S]-Su9(70)-DHFR und ^[35S]- mtDentra wurde für die angegebene Dauer in isolierte energiereiche Mitochondrien durchgeführt. In (-Δψ), wurde das mitochondriale Membranpotential durch die Behandlung mittels 8 μM Antimycin A, 0,5 μM Valinomycin und 2 μM Oligomycin aufgehoben. Die Importreaktionen wurden mittels SDS-PAGE und digitaler Autoradiografie analysiert. Das Preprotein (p) und das importierte maturierte Protein (m) sind gekennzeichnet B) Ko-translationale *in organello* Importreaktion von ^[35S]-Su9(70)-DHFR und ^[35S]-mtDentra in isolierten energiereichen Mitochondrien für 60 Minuten. Die Importreaktion war gekoppelt mit der *in vitro* Translation der Konstrukte in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ^[35S]-Methionin / Cystein. Die Translation und der mitochondriale Import wurden in vier verschiedene Ansätze verfolgt (i) mRNA und Mitochondrien (Δψ), (ii) mRNA und Mitochondrien (-Δψ) durch die Hinzugabe von 8 μM Antimycin A, 0,5 μM Valinomycin und 2 μM Oligomycin (iii) mRNA ohne Mitochondrien (iv) ohne RNA. Ein proteolytischer Verdau mittels 2,5 μM Proteinase K wurde zur Kontrolle der Importeffizienz durchgeführt. Das Preprotein (p) und das importierte maturierte Protein (m) sind gekennzeichnet.

Wir fanden heraus, dass der mitochondriale Import von ^[35S]-Su9(70)-DHFR erfolgreich durchgeführt werden konnte. Ein über die Zeit ansteigendes Signal des prozessierten Proteins konnte beobachtet werden, während der Import nach Verlust des Membranpotentials komplett blockiert war. Darüber hinaus zeigte die Behandlung der Mitochondrien mit Proteinase K anschließend an den Import, dass das prozessierte Protein in die mitochondriale Matrix transportiert wurde und so vor Verdau geschützt war. Hingegen wurde kein Import von

[³⁵S]-*mtDentra* über die Zeit festgestellt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das GFP-ähnliche Fluoreszenzprotein *Dentra* nicht in isolierte Mitochondrien importiert werden kann.

Im zellulären System sind jedoch Translation und der mitochondriale Import weder räumlich noch zeitlich getrennt. Daher testeten wir, inwiefern das Fluoreszenzprotein *Dentra* in einer ko-translationalen Importreaktion in isolierte Mitochondrien transportiert werden kann (Abb. 36B). Wir kombinierten die *in vitro* Translation mit der Importreaktion um einen ko-translationalen Proteinimport zu stimulieren. Erneut verwendeten wir als Kontrollprotein [³⁵S]-Su9(70)-DHFR. Wir beobachteten, dass [³⁵S]-Su9(70)-DHFR sowie [³⁵S]-*mtDentra* während der 90-minütigen Translation und Importreaktion in die Mitochondrien transportiert wurde, während der Proteinimport in isolierten Mitochondrien ohne Membranpotential nicht stattfand. Die Behandlung mit Proteinase K zeigte darüber hinaus, dass beide Proteine in der mitochondrialen Matrix lokalisiert waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass GFP-ähnliche Proteine, wie das Fluoreszenzprotein *Dentra*, nicht für eine klassische Importreaktion in isolierte Mitochondrien verwendet werden können. Jedoch ermöglicht ein gekoppelter Ansatz der Translation und Importreaktion in Mitochondrien den effizienten mitochondrialen Transport der Proteine.

4.2.2. Herstellung eines rekombinanten fluoreszierenden Proteins, welches in isolierten Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* importiert wird

Intrinsisch fluoreszierende Proteine können für eine *in organello* Importreaktion nicht verwendet werden. Aus diesem Grund konstruierten wir ein rekombinantes Fusionsprotein für den Import in isolierten Mitochondrien, welches spezifisch mit einem kleinen Fluorophor markiert werden kann (Abb. 37A). Das Fusionsprotein bestand aus der Dehydrofolatreduktase (DHFR) und der mitochondrialen Zielsequenz der Untereinheit 9 der mitochondrialen ATPase. Während das proteininterne Cystein entfernt wurde (siehe * in Abb. 37A), ergänzten wir den C-Terminus der DHFR mit einem Cysteinrest. Dieses Cystein erlaubte schließlich die Markierung des Proteins mit kleinen Fluorophoren. Die Markierung mit Fluorophoren erlaubt eine Detektion des Fusionsproteins direkt anschließend an eine SDS-PAGE ohne dass eine Übertragung des Proteins mittels Western Blot und dessen Detektion mittels Antikörper notwendig ist. Zur zusätzlich Detektion sowie zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurden zudem ein Strep-Tag sowie ein sechsfacher Histidin-Tag an den C-Terminus angefügt. Der Strep-Tag stellt dabei eine Aminosäuresequenz dar, welche eine hohe Affinität

zu Streptactin aufweist, einem spezifisch konstruierten Streptavidin. Wir benannten dieses Fusionsprotein Su9(70)-DHFR-Cys-Strep-6His (SDCSH). Die Aufreinigung von SDCSH erfolgte anschließend an die Expression in *Escherichia coli* BL21+ Zellen über eine Ni-NTA Säule. Die Markierung des Fusionsproteins wurde mit der doppelten Molarität des kleinen Fluorophors Maleimid-5-Fluorescein für 2 Stunden bei Raumtemperatur erfolgreich durchgeführt und zeigte nach der SDS-PAGE eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zur Coomassie Färbung (Abb. 37B). Dies erlaubt eine mögliche Verwendung des Proteins für die *in organello* Importreaktion. Jedoch lag das Protein nach der Lyse nicht in löslicher Form vor, sondern als Proteinaggregat (Abb. 37C).

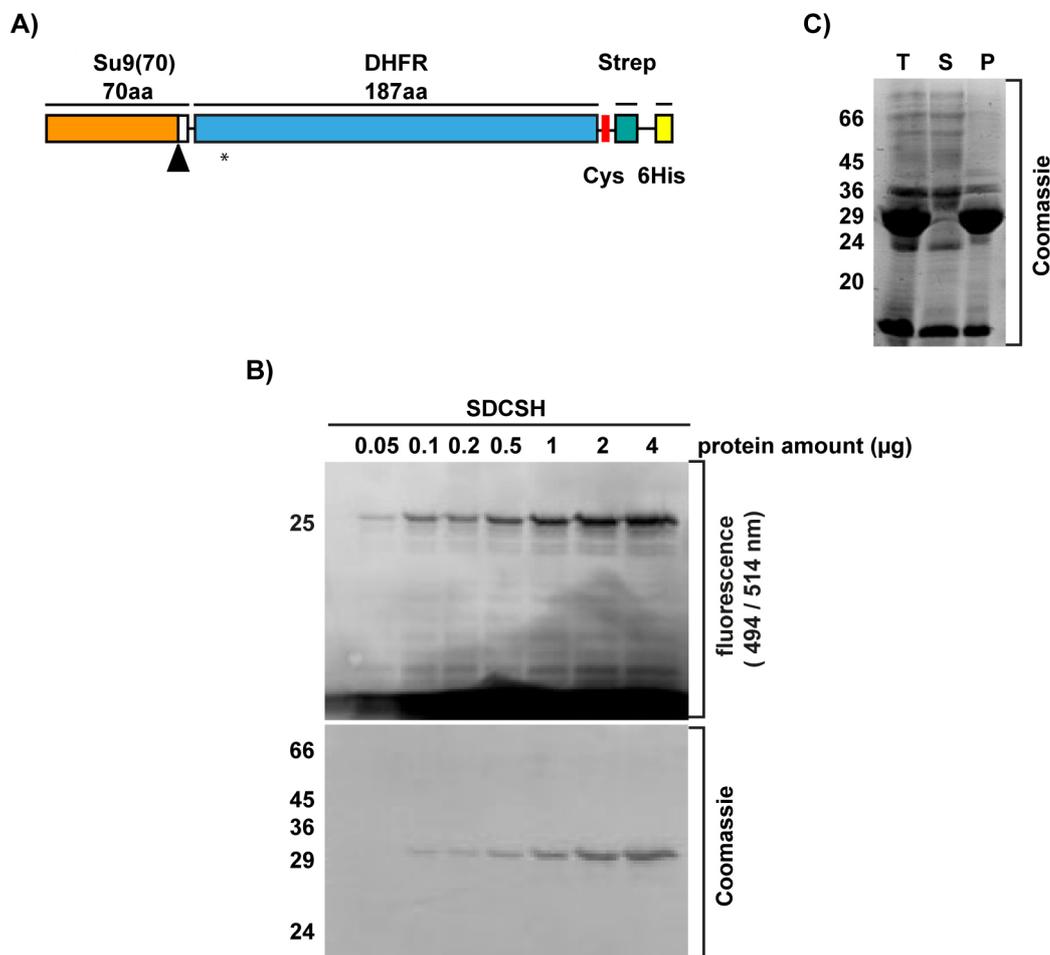


Abbildung 37: Konstruktion eines rekombinanten fluoreszierendes Proteins für den *in organello* Import in isolierte Mitochondrien. A) Schematische Abbildung des Fluoreszenzreporterkonstrukts Su9(70)-DHFR-Cys-Strep-6His (SDCSH). Der deletierte Cysteinrest ist durch den Stern gekennzeichnet. Der Pfeil zeigt die MPP-Schnittstelle an. B) Markierung des Reporterproteins mittels Maleimid-5-Fluoresceins für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Serielle Verdünnungen wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen und bei 494/518 nm (Laser: 472 nm; Filter: LPB) ausgelesen. Die Gesamtproteinmenge wurde mittels Coomassie-Färbung analysiert. C) Analyse zur Löslichkeit des Reporterproteins. *E.coli* BL21+ Zellen exprimierten das SDCSH Konstrukt für 4 Stunden. Die Zellen wurden lysiert und bei 20.000 xg für 20 Minuten abzentrifugiert. Die Totalfraktion (T), die Überstands- (S) sowie die Pelletfraktion (P) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung analysiert.

Aus diesem Grund lösten wir das fluoreszierende Protein zunächst in 7 M Urea und führten die Importreaktion in isolierten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* in Anwesenheit von 250 mM Urea durch.

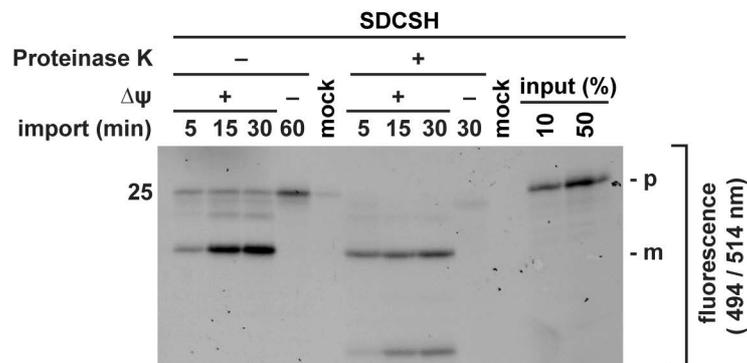


Abbildung 38: In organello Import von Urea-gelöstem SDCSH in isolierte Mitochondrien. Eine *in organello* Importreaktion von SDCSH wurde für die angegebene Dauer in isolierte energiereiche Mitochondrien durchgeführt. In (-Δψ), wurde das mitochondriale Membranpotential durch die Behandlung mittels 8 μM Antimycin A, 0.5 μM Valinomycin und 2 μM Oligomycin aufgehoben. Der mitochondriale Import wurde mittels SDS-PAGE analysiert und bei 494/518 nm (Laser: 472 nm; Filter: LPB) ausgelesen. Das Preprotein (p) und das importierte maturierte Protein (m) sind gekennzeichnet.

Wir fanden heraus, dass der Import des fluoreszierenden Proteins erfolgreich durchgeführt werden konnte, da die Proteinmenge des prozessierten Proteins, also nach Abspaltung der mitochondrialen Zielsequenz durch die Matrixpeptidase MPP, über die Länge der Importzeit zunahm (Abb. 38). Hingegen war der Proteinimport in Mitochondrien ohne Membranpotential komplett abwesend. Darüber hinaus deutete die Behandlung der isolierten Mitochondrien mit Proteinase K darauf hin, dass der Import des fluoreszierenden Proteins vollständig ablief und das Protein in der Matrix lokalisiert war. Interessanterweise konnte durch die Menge des importierten Proteins im Vergleich zur eingesetzten Proteinmenge, welche als 10 % bzw. 50 % des eingesetzten Proteins angezeigt ist, darauf geschlossen werden, dass die Importeffizienz in Anwesenheit von Urea sehr hoch war. Dieser Eindruck wurde zusätzlich durch die Beobachtung gestärkt, dass kaum Preprotein an den Mitochondrien nachgewiesen werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass das gesamte Protein zügig importiert wird.

Wir analysierten anschließend, inwiefern das rekombinante Protein unabhängig von Urea gelöst werden kann. Dazu resuspendierten wir sedimentiertes Protein in Puffern, welche jeweils Kombinationen aus der Natriumchlorid, Magnesiumchlorid, Glycerol oder L-Arginin enthielten. Es wurde bereit beschrieben, dass diese Bestandteile die Löslichkeit eines rekombinanten Proteins erhöhen (Kelly & Winkler, 1990). Zur Analyse der Löslichkeit führten wir einen Sedimentationsansatz durch, in welchem das resuspendierte Protein zuerst

bei 20.000 xg und anschließend bei 125.000 xg zentrifugiert wurde. Wir beobachteten, dass SDCSH in Puffern löslich blieb, in denen L-Arginin enthalten war (Abb. 39A).

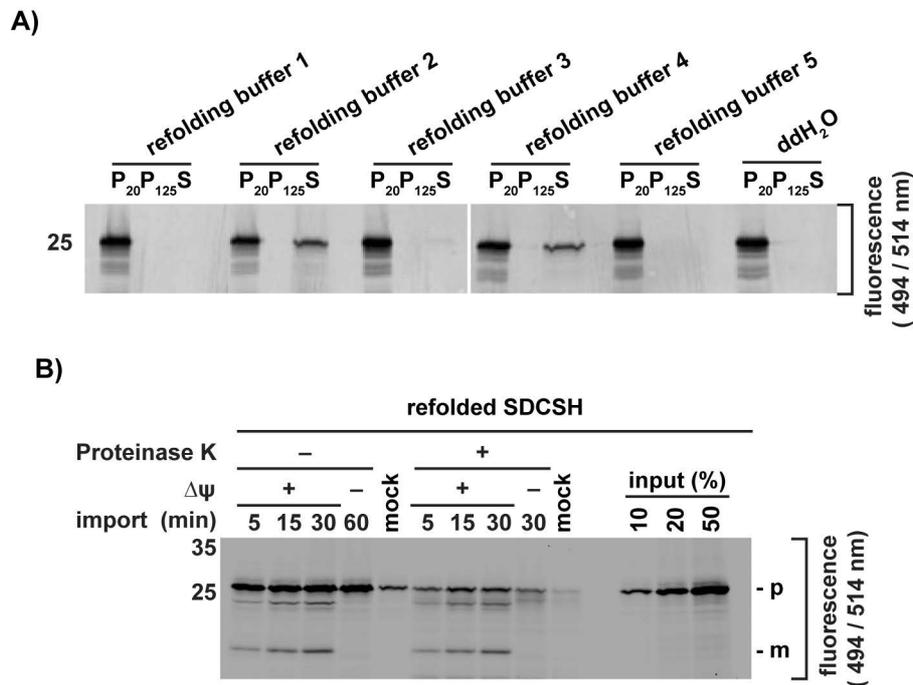


Abbildung 39: *In organello* Importreaktion von rückgefaltetem SDCSH in Mitochondrien von Hefen. A) Rückfaltung von SDCSH nach Proteinaufreinigung in Puffer 1-5 (1: 20 % Glycerol; 2: 0.5 M L-Arginin; 3: 1 mM MgCl₂; 4: 10.5 M L-Arginin, 1 mM MgCl₂; 5: 20 % Glycerol, 1 mM MgCl₂) für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Proteinlösungen wurden bei 20.000 xg und 125.000 xg sedimentiert. Überstandsfraktion (S), Pelletfraktion nach 20.000 xg (P₂₀) und Pelletfraktion nach 125.000 xg (P₁₂₅) wurden mittels SDS-PAGE analysiert und bei 494/518 nm (Laser: 472 nm; Filter: LPB) ausgelesen. B) Eine *in organello* Importreaktion vom rückgefaltetem SDCSH wurde für die angegebenen Zeiten in isolierte energiereiche Mitochondrien durchgeführt. In (- $\Delta\psi$) wurde das mitochondriale Membranpotenzial durch die Behandlung mittels 8 μ M Antimycin A, 0.5 μ M Valinomycin und 2 μ M Oligomycin aufgehoben. Der mitochondriale Import wurde mittels SDS-PAGE analysiert und bei 494/518 nm (Laser: 472 nm; Filter: LPB) ausgelesen. Das Preprotein (p) und das importierte maturierte Protein (m) sind gekennzeichnet.

Wir testeten demnach, inwiefern das gelöste SDCSH für die Importreaktion verwendet werden konnte. Die Zunahme des prozessierten Proteins über die Zeit zeigte, dass der Import des gelösten Proteins erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abb. 39B). Jedoch ist die prozessierte Proteinmenge im Vergleich zum eingesetzten Protein sehr gering und nicht-prozessiertes Preprotein konnte in großen Mengen an den Mitochondrien gefunden werden. Die geringe Effizienz des mitochondrialen Imports kann teilweise durch die Menge Protein erklärt werden, welche während der Reaktionszeit erneut aggregierte was in einem Importansatz ohne Mitochondrien festgestellt werden konnte. Das Ergebnis zeigt, dass die Importeffizienz von SDCSH nach der Resolubilisierung mittels L-Arginin im Vergleich zum Protein welches durch Urea gelöst wurde, deutlich geringer ist.

Wir untersuchten darüber hinaus die Fähigkeit von SDCSH in Mitochondrien aus Säugetierzellen importiert zu werden (Abb. 40). Wir verwendeten lysierte Zellen, welche durch Digitonin aufgeschlossen wurden und inkubierten diese mit dem rekombinanten fluoreszierenden Protein. Zur Kontrolle führten wir den Import in digitonisierten Zellen mit radioaktiv markiertem Su9(86)-DHFR durch. Während wir den Import von [³⁵S]-Su9(86)-DHFR nach 30 Minuten beobachten konnten, wurde das fluoreszierende SDCSH nicht in Mitochondrien der Säugetierzellen importiert.

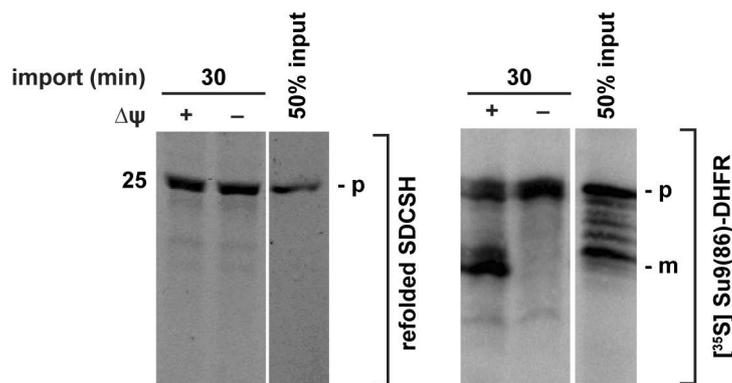


Abbildung 40: *In organello* Importreaktion von rückgefaltetem SDCSH in isolierten Mitochondrien von Säugetierzellen. Eine *in organello* Importreaktion von rückgefaltetem, fluoreszenzmarkiertem SDCSH sowie radioaktiv markiertem [³⁵S] Su9(86)-DHFR wurde in digitonisierten HeLa-Zellen (0.005 % Digitonin) für 30 Minuten durchgeführt. In (- $\Delta\psi$) wurde das mitochondriale Membranpotenzial durch die Behandlung mittels 8 μ M Antimycin A, 0.5 μ M Valinomycin und 2 μ M Oligomycin aufgehoben. Der mitochondriale Import wurde mittels SDS-PAGE analysiert und bei 494/518 nm (Laser: 472 nm; Filter: LPB) und mittels digitaler Autoradiographie detektiert. Das Preprotein (p) und das importierte maturierte Protein (m) sind gekennzeichnet.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das fluoreszierende Protein SDCSH für die *in organello* Importreaktion in isolierten Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet werden kann. Jedoch ist es aufgrund seiner geringen Löslichkeit kein optimales Imports substrat unter nativen Bedingungen. Zudem konnte ein Import in Mitochondrien von Säugetierzellen nicht gezeigt werden.

5. Diskussion und Ausblick

5.1. Intra-mitochondriale Proteinaggregatablagerung als Schutzmechanismus der mitochondrialen Qualität

5.1.1. IMiQC ist ein neues Proteinqualitätskontrollkompartiment in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae*

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Auswirkungen großer Mengen ungefalteter und fehlgefalteter Proteine in der mitochondrialen Matrix untersucht. Es wurde beschrieben, dass die Überexpression des destabilisierten Reporterproteins *mtGFP-DHFR_{ds}* nicht zu einer gleichmäßigen Verteilung des Proteins innerhalb des gesamten mitochondrialen Netzwerks führte. Vielmehr konnte die Anwesenheit von ein bis zwei Agglomeraten beobachtet werden als Folge des Aggregationsprozesses des Reporterproteins innerhalb der Mitochondrien. Dieses Ergebnis zeigt erstmalig die Ablagerung geschädigter und ungefalteter Protein in ein oder zwei großen Proteinaggregatkompartimenten in Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses mitochondriale Kompartiment wurde als intra-mitochondriales Proteinqualitätskontrollkompartiment (engl.: Intra-Mitochondrial Protein Quality Control Compartiment; IMiQC) bezeichnet.

Unter physiologischen sowie proteotoxischen Stresssituationen dient das zelluläre Proteinqualitätskontrollsystem, welches die Aktivität von molekularen Chaperonen und Proteasen umfasst, als primäre Reaktion zum Erhalt der Proteinhomöostase und der zellulären Qualität. In den letzten Jahren wurde jedoch in mehreren Studien beschrieben, dass das zelluläre System in Anwesenheit schwerer Stresssituationen mit der gezielten Formierung großer Proteinaggregate reagiert, um die proteotoxischen Effekten der Proteinaggregatzwischenstufen, wie kleinere Oligomere, entgegenzuwirken (Miller et al., 2015b). Sie werden in Stresssituation gebildet in denen das primäre Proteinqualitätskontrollsystem durch die Anwesenheit einer großen Menge ungefalteter Proteine überfordert ist. Inzwischen sind in der Bäckerhefe verschieden Proteinaggregatablagerungsstellen bekannt und charakterisiert. Zytoplasmische geschädigte Proteine werden in drei unterschiedlichen Aggregatkompartimenten abgelagert. Amorphe Proteinaggregate werden entweder in den Kern transportiert um dort das intra-nukleäre Qualitätskontrollkompartiment (INQ) zu bilden oder verbleiben im Zytoplasma und formen

das zytoplasmatische Aggregatkompartiment CytoQ (Miller et al., 2015a). Hingegen werden Proteine, welche dazu neigen amyloide Proteinaggregate zu formen, in IPOD abgelagert, ein finales nicht entfaltbares Proteinaggregatkompartiment an der Vakuole (Kaganovich et al., 2008). Die Ablagerung geschädigter Polypeptide findet nicht nur bei bereits gefalteten und funktionellen Proteinen statt, sondern wurde auch bei naszierenden und neu synthetisierten Polypeptiden beobachtet (Choe et al., 2016, Yang et al., 2016, Yonashiro et al., 2016). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aggregation der neu synthetisierten Proteine durch die Markierung der naszierenden Kette mittels eines CAT-Restes eingeleitet wird, einer Abfolge von Alaninen und Threoninen am C-terminus des Proteins. Die Markierung der Polypeptidkette und der daraus resultierende Aggregationsprozess wurde durch die Deletion der Ribosomen-assoziierten E3-Ligase Ltn1 ausgelöst (Choe et al., 2016). Diese Beobachtungen sind aus zwei Gründen besonders interessant, zum einen zeigen die Ergebnisse tatsächlich eine direkte Reihenfolge der Aktion des Proteinqualitätskontrollsystems welche von der Induktion der Proteinaggregation gefolgt wird. Darüber hinaus bestätigt die Markierung der Polypeptidkette den Aggregationsprozess als einen aktiven Schutzmechanismus gegen proteotoxische Effekte misgefalteter Proteine.

Aktive Aggregationsprozesse geschädigter Polypeptide wurden zudem auch in Zellorganellen beobachtet. Zum einen werden auch nukleäre geschädigte Protein in INQ abgelagert und zum anderen wurden Proteinaggregate in Peroxisomen beschrieben (Manivannan et al., 2013, Miller et al., 2015a).

IMiQC stellt somit das fünfte Proteinaggregatkompartiment in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass das IMiQC-Kompartiment einen wesentlichen Faktor zum Erhalt der mitochondrialen Proteinhomöostase sowie der mitochondrialen Qualität und Funktionalität darstellt.

Es muss hierbei herausgehoben werden, dass ein ähnlicher Aggregationsprozess auch mit endogenen mitochondrialen Proteinen beobachten werden konnten, wenn wildtypische Hefezellen über einen langen Zeitraum bei 42°C inkubiert wurden. Innerhalb dieser Arbeit wurde somit erstmalig nachgewiesen, dass endogene Proteine tatsächlich in Proteinaggregatkompartimente abgelagert werden.

5.1.2. Dynamik und Lokalisation des IMiQC-Kompartiments

Während der Expression des destabilisierten Reporterproteins *mtGFP-DHFR_{ds}* konnte die Formierung von Proteinaggregaten innerhalb der Mitochondrien beobachtet werden. Bei konstitutiver Expression stieg die Aggregatanzahl an, wohingegen sich ein oder zwei Proteinaggregate nach dem Abstoppen der Proteinexpression formten. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Dynamik der Aggregatformierung hin, welche ungefaltete Proteine in kleineren Proteinaggregaten sammelt und anschließend in ein großes Aggregatkompartiment ablagert. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest eines der Aggregate am Zellkern lokalisiert ist und nicht mehr im mitochondrialen Netzwerk. Daraus kann geschlossen werden, dass geschädigte und ungefaltete Polypeptidketten durch die Formierung des IMiQC-Kompartiments vom mitochondrialen Netzwerk separiert werden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass das abgelagerte Proteinaggregat zwar mit weiteren mitochondrialen Proteinen ko-lokalisiert, jedoch kein mitochondriales Membranpotential aufweist. Aufgrund der Abwesenheit des mitochondrialen Membranpotentials könnte die Aggregatablagerung auf verschiedenen Wegen stattfinden. Zum einen könnte IMiQC in einem nicht-funktionalen Mitochondrium am Kern lokalisiert sein, welches zwar noch eine Doppelmembran aufweist, jedoch weder eine aktive Atmungskette noch einen funktionalen mitochondrialen Proteinimport besitzt. Somit wäre das Mitochondrium allein für die Ablagerung der Proteinaggregate zuständig. Eine weitere Möglichkeit wäre die Bildung von mitochondrialen Vesikeln, welche sich von der mitochondrialen Innenmembran abschnüren (Sugiura et al., 2014). Diese Beobachtung wurde erst vor kurzem beschrieben und stellt einen weiteren Mechanismus zum Erhalt der mitochondrialen Qualität dar. Eine dritte Möglichkeit wäre die Ausschleusung der Aggregate aus dem mitochondrialen Netzwerk in das Zytoplasma. Dies würde zu einer Ablagerung des IMiQC-Kompartiments führen, welche komplett unabhängig von mitochondrialen Bestandteilen stattfinden würde. Dabei ist jedoch darauf hinzuweisen, dass noch kein Mechanismus des Proteinexports aus Mitochondrien in das Zytoplasma bekannt ist.

Wie bereits erwähnt, ist IMiQC am Zellkern lokalisiert. Die Ablagerung von geschädigten Proteinen in *S. cerevisiae* an spezifischen Stellen innerhalb des zellulären Systems wurde ebenfalls für andere Aggregatkompartimente beschrieben. Die Aggregatablagerung INQ ist im Zellkern lokalisiert, während IPOD an der Vakuole abgelagert ist. Obwohl die genaue Funktion der spezifischen Ablagerung noch nicht vollständig verstanden ist, könnte der daraus resultierende Schutz zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle spielen (Spokoini et al., 2012).

5.1.3. Funktion des IMiQC-Kompartiments in Mitochondrien

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuteten darauf hin, dass die Proteinaggregatablagerung in Mitochondrien im Wesentlichen drei wichtige Funktionen erfüllt. Zum einen führt die IMiQC-Formierung zur Detoxifizierung ungefalteter oder fehlgefalteter Polypeptidketten, welche proteotoxische und zytotoxische Effekte hervorrufen können (Tyedmers et al., 2010). Dabei wird davon ausgegangen, dass fehlgefaltete Dimere und Oligomere weitere Proteine in die Aggregation verleiten und mit zellulären Bestandteilen, wie Membranen, interagieren und dadurch ihre Funktion behindern. Hingegen scheinen insbesondere die großen Proteinaggregate inert zu sein und keine zytotoxischen Effekte ausüben zu können.

Die vorliegenden Analysen bestätigten, dass die Formierung des IMiQC-Kompartiments zum Erhalt der Proteinhomöostase beitragen. In der Anwesenheit des destabilisierten Reporterproteins *mtGFP-DHFR_{ds}* ist die Stabilität von drei mitochondrialen Proteinen nicht beeinflusst, welche bereits als strukturell labil unter proteotoxischen Stresssituationen beschrieben wurden (Bender et al., 2011). Darüber hinaus weist die Analyse der Aggregate mittels 2D-PAGE darauf hin, dass nur wenige mitochondriale Proteine in geringen Mengen in die Ko-Aggregation verleitet werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass aufgrund der Formierung des IMiQC-Kompartiments ungefaltete und fehlgefaltete Proteine nicht zu einer proteotoxischen Stresssituation innerhalb der Mitochondrien führen und die mitochondriale Proteinhomöostase erhalten bleibt.

Die gezeigten Analysen bestätigten darüber hinaus, dass weder das zelluläre Wachstum noch mitochondriale Prozesse durch die Anwesenheit des destabilisierten Reporterproteins beeinflusst werden. Des Weiteren wurden das mitochondriale Membranpotential, der mitochondriale Proteinimport sowie der proteolytische Proteinabbau der Matrixprotease Pim1 untersucht. Diese Prozesse sind insbesondere zum Erhalt der mitochondrialen Funktionen notwendig. Keiner der getesteten mitochondrialen Prozesse war durch die große Menge ungefalteter und fehlgefalteter Polypeptidketten beeinträchtigt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Formierung von IMiQC die mitochondriale Qualität aufrechterhält und proteotoxische Effekte geschädigter Proteine verhindert.

Die mitochondriale Stressantwort (engl.: mitochondrial unfolded protein response; UPR^{mt}) ist ein deutlicher Hinweis auf Stresssituationen innerhalb der mitochondrialen Matrix. Sie wurde insbesondere im Wurm *Caenorhabditis elegans* und in Säugetierzellen beschrieben (Quiros et al., 2016). In diesen Organismen führt die Anwesenheit ungefalteter Proteine zum vermehrten proteolytischen Abbau in der mitochondrialen Matrix und den damit verbundenen Abfall des

Membranpotentials, welche durch den Export kleiner Peptide aus der Matrix in den Intermembranraum verursacht wird. Dies wiederum führt zu einer Signalweiterleitung in den Kern, in welchem schließlich die Transkription mitochondrialer Hitzeschockproteine aktiviert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Inkubation von *S. cerevisiae* bei einer erhöhten Temperatur von 42°C zu einer verstärkten Expression des mitochondrialen Hsp100-Homologs Hsp78 führt, was die Existenz eines retrograden Signalwegs von Mitochondrien zum Zellkern in der Bäckerhefe bestätigt.

Im Gegensatz dazu konnte zu allen getesteten Zeitpunkten keine Aktivierung der mitochondrialen Stressantwort in Anwesenheit des destabilisierten Reportproteins *mtGFP-DHFR_{ds}* beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass fehlgefaltete Proteine in der mitochondrialen Matrix keine Stresssituation herbeiführen. Die fehlende Stressantwort weist auf eine Detoxifizierung geschädigter Proteine durch die Ablagerung in das Proteinaggregatkompartiment IMiQC hin.

Bei der Funktion der Detoxifizierung geschädigter Proteine ist jedoch anzumerken, dass die Formierung von Proteinaggregaten erst stattfindet, wenn das primäre mitochondriale Proteinqualitätskontrollsystem überlastet ist. In einer früheren Studie in unserem Labor wurde gezeigt, dass eine verringerte oder fehlende Aktivität des mitochondrialen Hsp70-Chaperones Ssc1 nur bei physiologischer Wachstumstemperatur sowie bei einer leicht erhöhten Temperatur zu einer Akkumulation von Aggregaten führt, während der Aggregationsprozess bei deutlich erhöhten Temperaturen nicht durch die eingeschränkte Ssc1-Aktivität beeinflusst wird (Bender et al., 2011). Dieses Ergebnis weist bereits darauf hin, dass das Proteinqualitätskontrollsystem die Aggregation ungefalteter Proteine unter leichten Stresssituationen verhindert. Bei erhöhtem Stress werden jedoch geschädigte Polypeptide aufgrund ihrer immensen Menge nicht länger entfaltet und abgebaut, sondern in ein Proteinaggregatkompartiment abgelagert. Die in dieser Arbeit vorgelegte Immunofluoreszenzanalyse der Lokalisation eines endogenen mitochondrialen Proteins bei 42°C bestätigt diese Beobachtung. Während Hitzestress bei 42 °C zu einer Fragmentierung der Mitochondrien innerhalb der ersten zwei Stunden führt, eine bereits gut beschriebene Reaktion auf Hitzestress, wird das IMiQC-Kompartiment erst nach vier Stunden gebildet. Dies deutet darauf hin, dass bei langen und schweren Stresssituationen, bei denen die primären Schutzmechanismen überfordert sind, die Formierung von IMiQC induziert wird.

Eine weitere Funktion der IMiQC-Ablagerung ist die Entlastung des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems. Chaperone, wie das Hsp70-Chaperon oder Hsp60-Chaperon, binden mit hoher Affinität an hydrophobe Bereiche ungefalteter Proteine, welche

normalerweise im Inneren der Struktur geschützt vorliegen (James et al., 1997). Die Anwesenheit großer Mengen ungefalteter Polypeptidketten in der mitochondrialen Matrix würde zur Auslastung des Proteinqualitätskontrollsystems führen, welches die Funktionen der mitochondrialen Chaperone unter physiologischen Bedingungen einschränken würde. Zum anderen wäre die Effizienz des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems zusätzlichen Stresssituationen entgegenzuwirken durch die bereits bestehende Belastung deutlich herabgesetzt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass durch die Formierung des IMiQC-Kompartiments das mitochondriale Proteinqualitätskontrollsystem zu allen Zeitpunkten der *mtGFP-DHFR_{ds}*-Expression von fehlgefalteten Proteinen befreit vorliegt. Darüber hinaus führt die Zufuhr einer zusätzlichen Stresssituation zu keiner erhöhten Sensitivität der mitochondrialen Proteinhomöostase. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinaggregatablagerung in Mitochondrien die Fitness des Organells und des zellulären Systems erhöht. Diese Eigenschaft der Proteinablagerungen ist auch eine wesentliche Funktion anderer Ablagerungsstellen, wie den zytosolischen CytoQ-Kompartimenten (Escusa-Toret et al., 2013).

Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Proteinaggregatablagerung ist die asymmetrische Verteilung geschädigter Polypeptide bei der Zellteilung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass mitochondriale Proteinaggregate beim Sprossungsprozess in der Mutterzelle verbleiben, während geschädigte Proteine nicht in die Tochterzelle weitergegeben werden. Diese Beobachtung ist ein weiteres wichtiges Merkmal von Proteinaggregatkompartimenten und wurde bereits für Aggregatkompartimente in allen Reichen des Lebens beschrieben (Aguilaniu et al., 2003, Erjavec et al., 2007, Lindner et al., 2008, Rujano et al., 2006). Der Mechanismus stellt einen effizienten Weg zur Beseitigung geschädigter Proteine innerhalb eines Zellverbandes oder einer Zellkultur dar. Interessanterweise scheint die asymmetrische Aufteilung mit der Assoziation der Aggregate an zellulären Organellen zu korrelieren (Spokoini et al., 2012), da diese in einer geringen Anzahl von relativ immobilen Aggregaten resultiert und die Wahrscheinlichkeit der Vererbung in die Tochterzelle verringert (Coelho et al., 2014).

In einer Studie wurde ebenfalls eine prominente Rolle von Mitochondrien in der Zurückhaltung von zytosolischen Proteinaggregaten beschrieben. Die Bindung an Mitochondrien verringert ihre Mobilität und koppelt die Aggregatvererbung mit der asymmetrischen Verteilung geschädigter Mitochondrien (Zhou et al., 2014).

5.1.4. Beeinträchtigung der Pim1-Funktionalität durch IMiQC

Innerhalb dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der proteolytische Abbau durch die einzelne Matrixprotease Pim1 in Mitochondrien, welche das Reporterprotein *mtGFP-DHFR_{ds}* enthielten, nicht beeinflusst wurde. Dennoch konnten Auswirkungen destabilisierter Proteine beobachtet werden, welche mit der Funktion von Pim1 korrelieren. Zum einen zeigen Zellen, welche das Reporterproteine exprimierten, eine erhöhte Sensitivität gegenüber reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und zum anderen sind in diesen Zellen die mitochondriale Proteinexpression des Proteins Cytochrom *b* herabgesetzt. Beide Beobachtungen wurden bereits mit einer eingeschränkten Funktion von Pim1 beschrieben (Bender et al., 2010, van Dyck et al., 1998). Darüber hinaus konnte die erhöhte ROS-Sensitivität in *mtGFP-DHFR_{ds}* exprimierenden Zellen durch die Überexpression von Pim1 aufgehoben werden, wodurch unsere Annahme bestätigt wird, dass destabilisierte Polypeptide trotz IMiQC-Formierung nicht komplett inert vorliegen. Es konnte somit Effekte auf die Pim1-Funktionen in Mitochondrien beobachtet werden, welche unabhängig von proteolytischem Abbau bestehen. In der Studie von van Dyk et al. wurde die Korrelation der Pim1-Funktion mit mRNA-Splicing und der damit verbundenen mRNA-Stabilität gezeigt. Daraus folgend wurde diskutiert, dass neben der indirekten Rolle durch proteolytischen Abbau von mitochondrialen Maturasen, ebenfalls eine direkte Rolle von Pim1 in der mRNA-Stabilität besteht. Da innerhalb der vorliegenden Studie keine Beeinflussung des proteolytischen Abbaus in Anwesenheit der mitochondrialen Aggregate beobachtet werden konnte, ist eine direkte Rolle von Pim1 in der mRNA-Stabilität unabhängig der proteolytischen Aktivität wahrscheinlich, welche durch ungefaltete Proteine gestört wird. Eine mögliche Erklärung wäre eine Chaperon-ähnliche Funktion von Pim1, welche zur Organisation mitochondrialer mRNA benötigt wird.

5.1.5. Stabilität der Aggregatablagerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf eine hohe Stabilität der IMiQC-Aggregate innerhalb von 24 Stunden hin. Sie wurden weder resolubilisiert noch proteolytisch abgebaut und waren somit kein Substrat des Proteinqualitätskontrollsystems. Diese Beobachtung weist eher auf eine Homologie zu bakteriellen Proteinaggregaten hin, als auf Korrelationen zu anderen Aggregatkompartimenten in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Während INQ- sowie Cyto-Q Inklusionen durch Komponenten des Proteinqualitätskontrollsystems entfaltet und abgebaut werden können, sind Inklusionskörper in Bakterien stabil (Miller et al.,

2015b, Winkler et al., 2010). Darüber hinaus kann aufgrund der Stabilität der Kompartimente über 24 Stunden die Säuberung der Aggregate durch Mitophagie ausgeschlossen werden. Dies kann durch die Beobachtung der Stabilität weiterer mitochondrialer Proteine über 48 Stunden bestätigt werden. Mitophagie ist eine spezifische Form der Autophagie. Autophagie stellt einen weiteren Mechanismus zur Säuberung von geschädigten Proteinen dar und wurde bereits bei der Entfernung des IPOD-Kompartiments in *S. cerevisiae* und des Aggresoms in Säugetierzellen beobachtet (Gamerding et al., 2011, Lu et al., 2014).

In dieser Studie konnte jedoch festgestellt werden, dass das IMiQC-Kompartiment in einer Wachstumsphase abgebaut wird, in welcher den Zellen keine Kohlenstoffquelle mehr zur Verfügung steht. Diese Phase, in der es zu keinem Wachstum der Zellen mehr kommt, wird als stationäre Phase bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der IMiQC-Aggregate erst in der stationären Phase mittels Mitophagie erfolgt, in der existierende Quellen genutzt werden müssen.

5.1.6. Beteiligung der Komponenten des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems in der IMiQC-Formierung

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde überprüft, inwiefern Komponenten des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems für die Formierung des IMiQC-Kompartiments innerhalb der mitochondrialen Matrix benötigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Komponenten wie das Hsp70-Chaperon Ssc1 oder das Hsp40-Chaperon Mdj1 keinen Einfluss auf die Aggregatformierung besitzen. Lediglich das mitochondriale Hsp100-Homolog Hsp78 wird zur korrekten Formierung von IMiQC benötigt. Die fehlerhafte IMiQC-Formierung zeigt sich in einer erhöhten Aggregatanzahl, einer verringerten Kernlokalisierung sowie in einer herabgesetzten Thermotoleranz. Aufgrund der fehlenden Interaktion von Hsp78 mit IMiQC, kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um einen indirekten Einfluss handelt und Hsp78 nicht direkt an der IMiQC-Formierung beteiligt ist.

Die fehlende Beteiligung der Komponenten des Proteinqualitätskontrollsystems ist aus verschiedenen Gründen erklärbar. Zum einen ist eine Funktion der Aggregatablagerung die Befreiung des primären Proteinqualitätskontrollsystems von geschädigten und ungefalteten Proteinen und eine Funktion der PQC-Komponenten an der IMiQC-Formierung würde dies erschweren. Darüber hinaus wurde bereits bei anderen Aggregatkompartimenten, wie CytQ und INQ, eine fehlende Funktion der klassischen Chaperone Hsp70 und Hsp60 während der Aggregatablagerung beschrieben (Miller et al., 2015a). Es gibt jedoch bisher keine Hinweise darauf durch welchen Mechanismus geschädigte Polypeptide in IMiQC abgelagert werden

(Miller et al., 2015a, Specht et al., 2011). Auf der einen Seite ist die Beteiligung kleiner Hitzeschockproteine beschrieben, welche in *S. cerevisiae* zur Bildung von INQ und CytQ benötigt werden. Jedoch sind bisher keine kleinen Hitzeschockproteine in der mitochondrialen Matrix bekannt. Andererseits wurde im bakteriellen System beobachtet, dass die Formierung der Inklusionskörper durch Nukleoid-Ausschluss stattfindet (Winkler et al., 2010). Da Mitochondrien aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs ebenfalls DNA-Cluster in der Matrix aufweisen, ist ein solcher Mechanismus ebenfalls vorstellbar.

5.1.7. Funktionelle Verbindung der mitochondrialen Dynamik mit der IMiQC-Formierung

Die Analysen dieser Arbeit zeigen, dass ein Proteinaggregat vom mitochondrialen Netzwerk separiert vorliegt. Obwohl der Mechanismus der Aggregatablagerung am Kern noch nicht bekannt ist, konnte nachgewiesen werden, dass die funktionelle mitochondriale Dynamik für eine erfolgreiche Detoxifizierung essentiell ist. Während die verhinderte mitochondriale Spaltung einen letalen Effekt hervorruft, wird eine erhöhte Anzahl Proteinaggregate bei verhinderter mitochondrialer Fusion festgestellt. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen, dass die erfolgreiche IMiQC-Formierung zur Detoxifizierung geschädigter Proteine führt, welche ansonsten zytotoxische Effekte hervorrufen. Zum anderen kann belegt werden, dass das IMiQC-Kompartiment vom mitochondrialen Netzwerk separiert vorliegt. Die IMiQC-Formierung benötigt beide Prozesse der mitochondrialen Dynamik, die mitochondriale Fusion, welche zur Vereinigung der geschädigten Polypeptide in IMiQC führt und die mitochondriale Spaltung zur effizienten Separierung des mitochondrialen Netzwerks. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei dem Prozess der IMiQC-Ablagerung um einen ständigen Wechsel von Fusion und Spaltung der Mitochondrien handelt.

Die Lokalisation mitochondrialer geschädigter Proteine am Zellkern weist Ähnlichkeiten zur Proteinaggregatablagerung in Säugetierzellen auf. Ähnlich wie beim Aggresom könnte IMiQC am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (engl.: Microtubule-organizing centre, MTOC) lokalisiert sein (Johnston et al., 1998). Dies würde auch nahelegen, dass der Transport der Proteinablagerung wie beim Aggresom über Interaktionen mit den Mikrotubuli stattfindet (Garcia-Mata et al., 1999). Es sei des Weiteren angemerkt, dass der Transport von Mitochondrien innerhalb des zellulären System ebenfalls durch das Mikrotubulinetzwerk durchgeführt wird (Kanfer et al., 2015).

Interessanterweise scheinen die zelluläre Maschinerie, welche die mitochondriale Dynamik reguliert, und die Mitochondrien-spezifische Autophagie funktionell gekoppelt zu sein. Diese Verknüpfung erlaubt eine spezifische Beseitigung geschädigter Mitochondrien, während die intakten Organellen vor mitochondrialem Abbau geschützt wären (Youle & van der Bliek, 2012). Dieser Zusammenhang wäre vor allem in Organismen interessant, in denen Mitophagie als Mechanismus der mitochondrialen Qualitätskontrolle bevorzugt verwendet wird, wie zum Beispiel in Säugetierzellen. In Säugetierzellen könnte eine Ablagerung mitochondrialer Proteinaggregate nicht nur zur Separierung geschädigter Proteine führen, sondern darüber hinaus als Ausgangspunkt zur Eliminierung nicht-funktionelle Mitochondrien dienen.

5.1.8. Amyloide werden nicht in IMiQC abgelagert

Neben dem Reporterprotein *mtGFP-DHFR_{ds}* wurden ebenfalls die Effekte auf die mitochondriale Qualität während der Expression zweier Fusionsproteine analysiert, welche entweder das erste Exon des Hefeprions Sup35 (*mtGFP-Sup35(2-235)*) oder das des glutaminreichen Proteins Huntingtin (*mtGFP-Q115*) enthielten. Beide Fusionsproteine führen zur Ausbildung amyloider Proteinaggregate mit einem hohen β -Faltblattanteil (Barton et al., 2007, Serio & Lindquist, 2001). Interessanterweise deuteten mikroskopische Analysen beider mitochondrialer Fusionsproteine darauf hin, dass es zu keiner eindeutigen Formierung des IMiQC-Kompartiments kommt. Während die biochemische Analyse des Reporterproteins *mtGFP-Q115* mittels Western Blot nicht möglich war, konnte für *mtGFP-Sup35(2-235)* eindeutig gezeigt werden, dass das Reporterprotein nicht in Mitochondrien aggregiert, sondern als lösliches Protein vorliegt. Vor allem während der Expression des Reporterproteins *mtGFP-Sup35(2-235)* konnten eine veränderte mitochondriale Morphologie festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Proteine, welche dazu neigen amyloide Proteinaggregate zu bilden, keine Substrate der IMiQC-Ablagerung darstellen. Vielmehr führt die fehlende Ablagerung der Reporterproteine zu schädigenden Effekten, welche die mitochondriale Morphologie beeinflussen. Aus diesem Grund zeigen diese Reporterkonstrukte, welche Auswirkungen schädliche Proteine auf die mitochondriale Qualität haben können, wenn die IMiQC-Ablagerung nicht funktioniert.

5.1.9. Modell

Die mitochondriale Qualität sowie Proteinhomöostase wird unter physiologischen oder in leichten Stresssituationen durch die Aktivität des primären Proteinqualitätskontrollsystems erhalten. In Stresssituationen in denen die Entfaltung von Proteinen zu einer großen Menge ungefalteter Polypeptidketten führt, welche das Proteinqualitätskontrollsystem überfordern, wird die Ablagerung solcher Polypeptide in das IMiQC-Kompartiment gefördert (Abb. 41). Während der anhaltenden Stresssituationen mildert die Ablagerung in IMiQC zytotoxische Effekte geschädigter Proteine und ermöglicht die Befreiung der Komponenten des Proteinqualitätskontrollsystems von der Bindung an ungefaltete Polypeptide. Nach Abklingen der Stresssituation ist die mitochondriale Matrix weitestgehend von geschädigten Proteinen befreit und eine schnelle Erholung in Form der Wiederaufnahme der mitochondrialen Translation, des Proteinimports sowie der Proteinfaltung, wird effizient und zeitnah ermöglicht. Zudem können frisch auftretende Proteinaggregate mittels Disaggregation und proteolytischem Abbau beseitigt werden.

Das IMiQC-Kompartiment wird nicht im mitochondrialen Netzwerk abgelagert, sondern ist in separierten Mitochondrien oder mitochondrialen Vesikeln, welche durch wechselnde Abfolge von mitochondrialer Fusion und Spaltung entstehen, am Kern lokalisiert. Zum einen schützt die separierte Ablagerung das verbleibende intakte mitochondriale Netzwerk und ermöglicht zum anderen die asymmetrische Verteilung geschädigter Polypeptide während der Zellteilung. Die Zurückhaltung der Proteinaggregate in der Mutterzelle erlaubt zudem die Eliminierung von ungefalteten Proteinen in einem Zellverband oder in einer Zellkultur.

Zusammenfassend stellt IMiQC einen wesentlichen Mechanismus zum Erhalt der mitochondrialen Qualität und Funktionalität dar und trägt wesentlich zur intakten Funktion des gesamten zellulären Systems bei.

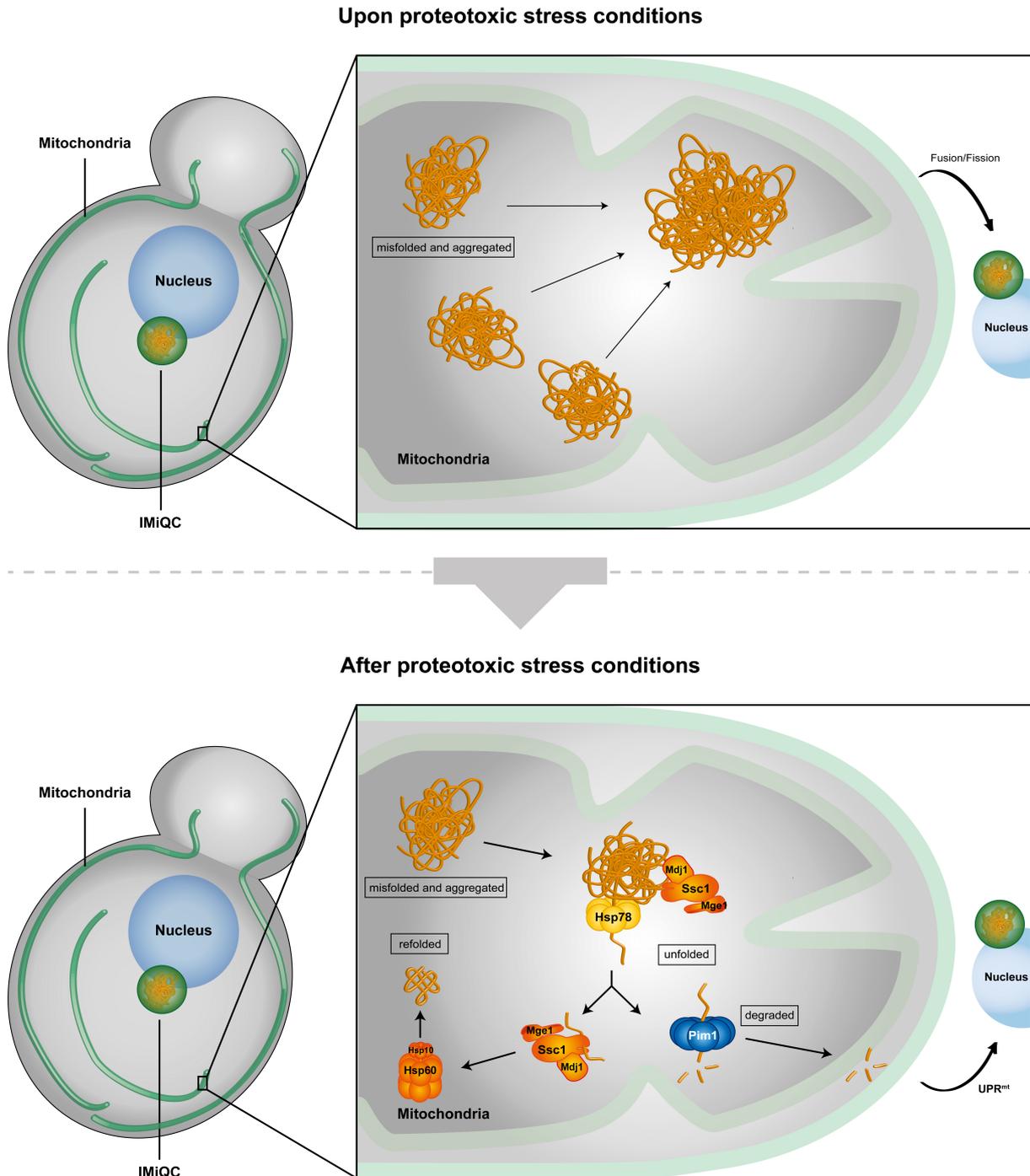


Abbildung 41: Modell der IMiQC-Ablagerung in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Während schweren proteotoxischen Stresssituationen, in denen das primäre Proteinqualitätskontrollsystem überfordert ist, entstehen kleinere oligomere Proteinaggregate, welche toxische Auswirkungen herbeiführen können. In solchen Situationen reagieren Mitochondrien mit der gezielten Zusammenlagerung oligomerer Aggregate in ein großes Proteinaggregatkompartiment, welches in Mitochondrien als IMiQC (engl.: Intra-Mitochondrial Protein Quality Control Compartiment) bezeichnet wird. IMiQC wird am Zellkern abgelagert und führt über Fusions- und Spaltungsprozessen zur Separierung schädlicher Proteinsubtypen vom mitochondrialen Netzwerk. Dieser Prozess garantiert den Erhalt der mitochondrialen Qualität und Funktionalität. Aufgrund der Befreiung des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems von ungefalteten Proteinen, ermöglicht die Ablagerung der schädlichen Polypeptide in IMiQC nach der proteotoxischen Stresssituation die schnelle Regeneration mitochondrialer Prozesse. Zudem wird die mitochondriale Fitness durch die IMiQC-Formierung erhöht, da zusätzliche Stresssituationen durch das primäre Proteinqualitätskontrollsystem entgegengewirkt werden kann.

5.1.10 Ausblick

Basierend auf den Daten aus diesem Abschnitt der Arbeit entstehen offene Fragestellungen, welche in zukünftigen Studien erarbeitet werden sollten.

(i) Die Formierung von IMiQC innerhalb der mitochondrialen Matrix konnte in der vorliegenden Studie beobachtet werden, jedoch kein intra-mitochondrialer Faktor identifiziert werden, welcher zur Formierung von IMiQC notwendig ist. Aus diesem Grund ist eine weitere wesentliche Fragestellung, welche Proteine der mitochondrialen Matrix die IMiQC-Formierung begünstigen. Das mitochondriale Hsp100-Homolog Hsp78 trägt zur Formierung bei, jedoch ist seine Funktion innerhalb der Aggregatkompartimentformierung weiterhin unbekannt.

Interessanterweise konnte durch die Analyse ko-sedimentierender Proteine mittels 2D-PAGE das kleine Hitzeschockprotein Hsp26 identifiziert werden. Obwohl es sich dabei offensichtlich um ein zytoplasmatisches Protein handelt, wurden kleine Hitzeschockproteine in der Formierung zytoplasmatischer Ablagerungsstellen beschrieben. Daher besteht die theoretische Möglichkeit, dass Hsp26 ebenfalls eine Funktion in der IMiQC-Formierung besitzt.

(ii) Die IMiQC-Ablagerung am Zellkern ist abhängig von der mitochondrialen Dynamik welche die Spaltung und Fusion von Mitochondrien umfasst. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann spekuliert werden, dass die Ablagerung durch den Transport geschädigter und funktionsloser Mitochondrien am Mikrotubulienetzwerk stattfindet und schließlich am Mikrotubulie-organisierenden Zentrum endet. Diese Hypothese muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden. Zum einen kann die Behandlung von Hefezellen, welche das destabilisierte, mitochondriale Reporterprotein exprimieren, mit Mikrotubuli-inhibierenden Substanzen, wie Nocodazol und Benomyl, mehr Aufschluss über den Transport geben. Zum anderen würden elektronmikroskopische Aufnahmen weitere Eindrücke über die Lokalisation der Ablagerung liefern.

(iii) Diese Studie beschreibt die Formierung von IMiQC in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Für zukünftige Studien wäre die Frage, inwiefern eine solche Proteinaggregatablagerung von geschädigten Proteinen ebenfalls in der mitochondrialen Matrix von höheren Eukaryoten existiert, wie zum Beispiel in Säugetierzellen, von äußerstem

Interesse. Zur Analyse der Proteinaggregatablagerung würde sich die transienten sowie stabile Transfektion in Säugetierzellen anbieten. Die Analyse kann mittels mikroskopischer sowie biochemischer Analysen durchgeführt werden. Darüber hinaus würden sich krankheitsrelevante Fragen anschließen, welche sich mit der Rolle von Proteinaggregatablagerung in Krankheiten beschäftigen.

5.2. *In organello* Proteinimport eines fluoreszierenden Reporterproteins

In einem zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde eine Möglichkeit gesucht ein rekombinantes fluoreszierendes Protein *in organello* in isolierte Mitochondrien zu importieren. Dabei war eine wesentliche Zielsetzung ein Substratprotein zu konstruieren, welches in Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sowie in Mitochondrien aus Säugetierzellen importiert werden kann.

Die *in organello* Importreaktion des radioaktiv markierten Proteins Dentra, ein Homolog des GFP-Proteins in isolierten Mitochondrien von *S. cerevisiae* konnte nicht beobachtet werden. Für den Proteinimport in isolierte Mitochondrien wird das Substratprotein mittels einer *in vitro* Transkription und *in vitro* Translation radioaktiv markiert. Synthese und die Importreaktion des Substratproteins sind räumlich sowie zeitlich getrennt und erlauben daher das vollständige Maturieren der Tripeptidsequenz des GFP-ähnlichen Proteins Dentra, welche zur Fluoreszenz des Proteins benötigt wird. Jedoch verhindert das Maturieren des Proteins die Entfaltung während der Importreaktion, welche zur Translokation durch den TOM- und TIM-Komplex notwendig ist. Daher wurde eine Importreaktion durchgeführt, welche mit der *in organello* Translation gekoppelt war. Es konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen ein Proteinimport in isolierte Mitochondrien möglich ist. Dies könnte zum einen durch eine zeitliche Nähe zwischen Translation und Proteinimport erklärt werden. Der mitochondriale Import würde demnach schneller ablaufen als die Maturierung des Proteins Dentra. Andererseits könnte dieses Ergebnis auch auf einen ko-translationalen Import hindeuten. Das Substratprotein würde demnach nicht aus dem Ribosom entlassen werden, sondern während der Translation in Mitochondrien importiert werden.

Ein rekombinantes fluoreszierendes Fusionsprotein wurde konstruiert mit welchem nachgewiesen wurde, dass der mitochondriale *in organello* Import unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von Urea möglich ist. Zudem konnte der mitochondriale Import nach der Proteinauftrennung bei den Wellenlängen 494/518 nm direkt auszulesen werden. Diese Methode erspart die Markierung des Substratproteins mit radioaktivem [³⁵S]-Methionin. Während die Effizienz der Proteinimportreaktion in Anwesenheit von Urea hoch

ist, ist sie nach der Rückfaltung des rekombinanten Proteins in einem Alanin-haltigen Puffer deutlich geringer. Dieses Ergebnis kann auf die erneute Aggregation des Reporterproteins zurückgeführt werden.

Der Proteinimport des fluoreszierenden Reporterproteins konnte jedoch nicht in Säugetierzellen beobachtet werden.

Somit konnte zwar ein fluoreszierendes rekombinantes Protein für den *in organello* Import in isolierten Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* konstruiert werden, jedoch fehlt weiterhin ein Substratprotein für eine fluoreszierende Importreaktion in Mitochondrien der Säugetierzellen.

Zur Konstruktion eines funktionierenden Reporterproteins für den *in organello* Proteinimport in isolierten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* sowie aus Säugetierzellen müssen des Weiteren andere Substrate neben der DHFR getestet werden.

6. Materialien und Methoden

6.1. Materialien

6.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, welche in dieser Studie verwendet wurden, besaßen Analysequalität und wurden erstanden von Sigma-Aldrich, Merk, Carl-Roth oder MP Biomedicals, sofern nicht anders angemerkt. Enzyme wurden erstanden von New England Biolabs oder Thermo-Scientific, sofern nicht anders angemerkt.

6.1.2 Wachstumsmedien und generelle Puffer

Hefe-Medien: Hefe wurden entweder in YPD - Medium (1 % (w/v) Bakto Hefeextrakt, 2 % (w/v) Bakto Pepton, 2 % (w/v) Glukose oder 3 % (v/v) Glycerin) oder in synthetischem Komplettmedium (0.67 % (w/v) Bakto Hefe-Stickstoffbasismedium ohne Aminosäuren, 0.077 % Aminosäuremix ohne einzelne Aminosäuren oder Nukleotide, 2 % (w/v) Glukose oder 3 % (v/v) Glycerin) angezogen. Für Platten wurden 2 % Agarose hinzugefügt.

Bakterielle Medien: Bakterien wurden in LB-Medium (1 % (w/v) Bakto Trypton, 0.5 % (w/v) Bakto Hefeextrakt, 0.5 % (w/v) NaCl) angezogen

Generelle Puffer

Tabelle II: Generelle Puffer

Puffer	Bestandteile
6x DNA-Puffer	60% Glycerol, 60 mM Tris/HCl pH 8.0, 12 mM EDTA, 60 mg Bromphenol Blau
50x TAE Puffer	2 M Tris, 5.7 % (v/v) Essigsäure, 50mM EDTA pH 8.0
4x Lämmli-Puffer	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
4x Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl pH 6.8, 0.4 % (w/v) SDS
4x Trenngelpuffer	1.5 M Tris pH 8.8, 0.4 % (w/v) SDS
Acrylamid (Blue-Native PAGE)	49 % Arylamid, 3 % Bisacrylamid
3x Gel-Puffer (Blue-Native-PAGE)	200 mM E-amino-n-Caprinsäure, 150 mM Bis-Tris pH 7.0
Ladepuffer (Blue-Native-PAGE)	5 % Coomassie Brilliant Blau G250m 500 mM E-amino-n-Caprinsäure. 10 mM Bis-Tris pH 7.0
10x Kathodenpuffer (Blue-Native-PAGE)	500 mM Tricin; 150 mM Bis-Tris pH 7.0
10x Anodenpuffer (Blue-Native-PAGE)	500 mM Bis-Tris
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
10x Westernblot-Transferpuffer	200 mM Tris, 1.5 M Glycin, 2 % (w/v) SDS
1x Westernblot Transferpuffer	10 % (v/v) 10x Westernblot Transferpuffer, 20 % (v/v) Methanol
Deko-Salt Puffer	500 mM Tris, 1.5 M NaCl
10x TBS	200 mM Tris/HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl
Coomassie-Blau Färbelösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Coomassie Brilliant Blau G250
Entfärberlösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

6.1.3 Antibiotika, Induktoren, Inhibitoren und Stressoren

Antibiotika:

- Ampicillin: 50 mg/ml Stocklösung in d_dH_2O ; finale Konzentration: 100 μ g/ml (AppliChem, DE)
- Kanamycin: 100 mg/ml Stocklösung in d_dH_2O ; finale Konzentration: 100 μ g/ml (Carl Roth, DE)

Induktoren:

- IPTG (Isopropyl-D-thiogalactopyranoside): 1 M Stocklösung in d_dH_2O ; finale Konzentration: 1 mM (Carl Roth, DE)

Inhibitoren

- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid): 100 mM Stocklösung in $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$; finale Konzentration: 1 mM (Carl Roth, DE)
- Proteaseninhibitor: 100x Stocklösung, 1x finale Konzentration (Carl Roth, DE)
- Valinomycin: 1 mM Stocklösung in 100% Ethanol; finale Konzentration: 1 μM (Sigma Aldrich, DE)

AVO (Valinomycin, Antimycin A, Oligomycin): finale Konzentration 0.8 mM antimycin, 50 μM Valinomycin and 2 mM oligomycin in EtOH (Sigma Aldrich, DE)

Generelle Substanzen:

- Menadion: 50 mM Stocklösung in 100 % Ethanol (Sigma Aldrich, DE)
- Kreatinphosphat: 1 M Stocklösung $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mM finale Konzentration (Sigma Aldrich, DE)
- ATP: 200 mM Stocklösung in $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ pH 7.4, 2 mM finale Konzentration (Carl Roth, DE)
- NADH: 200 mM Stocklösung in $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$, 2 mM finale Konzentration (Carl Roth, DE)
- L-Arginin (Sigma Aldrich, DE)
- Imidazol (Carl Roth, DE)

6.1.4 Enzyme und Antikörper

Enzyme:

- Alkalische Phosphatase (Thermo Scientific, DE)
- T4 DNA-Ligase: 1U/ml (Thermo Scientific, DE)
- Phusion DNA-Polymerase (Thermo Scientific, DE)
- Zymolyase-20T: 20000 U/g (Amsbio, UK)
- Restriktionsenzyme und Klenow-Enzym (Thermo Scientific, DE; New England Biolabs, US)
- Kreatinkinase (Sigma Aldrich, DE)
- Proteinase K (Carl Roth, DE)

Antikörper:

Primäre und sekundäre Antikörper wurden in Deko-Salt oder TBS mit 0.1 % Tween eingesetzt.

Tabelle III: Antikörperliste

Name	Verdünnung	Organismus	Herkunft
α -GFP	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Mdh1	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Aco1	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Ilv2	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Atp2	1:1000	Hase	AG Pfanner
α -Ssc1	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Mdj1	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Hsp60	1:2500	Hase	AG Pfanner
α -Hsp78	1:1000	Maus	Kommerziell erstanden
α -Pim1	1:1000	Hase	AG Pfanner
α -Tim23	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Tom40	1:5000	Hase	AG Pfanden
α -Tom70	1:5000	Hase	AG Pfanner
α -Sec61	1:500	Hase	AG Pfanner
α -Cox4	1:1000	Hase	AG Pfanner
α -Kgd2	1:1000	Hase	AG Pfanner
α -Pgk1	1:5000	Hase	AG Pfanner

6.1.5 Farbstoffe, Kits und Marker

Farbstoffe:

- TMRE (Tetramethylrhodamin): 1 mM Stocklösung in DMSO, 0.5 μ M finale Konzentration (Sigma Aldrich, DE)
- DiSC₃ (3,3'-Dipropoylthiadicarbocyaniniodid): 2 mM Stocklösung in 100 % Ethanol, 20 μ M finale Konzentration (Sigma Aldrich, DE)
- Hoechst 33342 (Life Technoligues,DE)
- DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol): 1 mg/ml Stocklösung, finale Konzentration 5 μ g/ml (Sigma Aldrich)

Kits:

- GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, DE)
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, DE)
- mMMESSAGE mMACHINE transcription kit (Life Technologies, DE)

- reticulocyte lysate translation system (Promega, DE)

Marker:

- GeneRuler 1kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, DE)
- PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, DE)
- SigmaMarker™ Low Range (Sigma Aldrich, DE)

6.2. Methoden

6.2.1 Plasmide und Klonierungen

Im Allgemeinen wurden alle Klonierungsschritte sowie Transformationen in *E.coli* DH5 α nach herkömmlichen und konventionellen Prozeduren durchgeführt.

Zuerst wurde das Stoppcodon des GFP-Genes entfernt, um die Aggregatreporterproteine an das bereits bestehende Konstrukt *cyb*₂(84)_A-GFP (pBG8099) zu fusionieren. Dazu wurde *cyb*₂(84)_A-GFP mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Zur Durchführung der PCR wurden Primer (#1 & #3) eingesetzt, die entweder eine BamHI- oder eine EcoRI-Schnittstelle in der nicht anlagernden Sequenz besaßen. Des Weiteren wurde durch den reversen Primer das Stoppcodon des GFP-Genes eliminiert. Schließlich wurde *cyb*₂(84)_A-GFP w/o Stoppcodon in den Vektor pBG8099 mittels BamHI und EcoRI Restriktionsschnittstellen kloniert. Anschließend wurden sämtliche Reportergene (Q115, Sup35, DHFR_{ds}, sowie DHFR) mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden Primer (#4 & #5; #6 & #7; #8 & #9) eingesetzt die jeweils eine EcoRI Restriktionsschnittstelle enthielten. Die amplifizierten Fragmente wurde daraufhin in den pBG8099 Vektor mit *cyb*₂(84)_A-GFP w/o Stoppcodon durch den Verdau der EcoRI Restriktionsschnittstellen kloniert (pMB024, pMB026, pMB028, pMB032). Um die Reportergene ebenfalls ohne mitochondriale Targeting-Sequenz (MTS) zu klonieren, wurde GFP durch PCR amplifiziert mittels Primer (#2 & #3), die erneut BamHI und EcoRI Restriktionsschnittstellen aufwiesen. Dabei wurde das Stoppcodon von GFP erneut durch den reversen Primer eliminiert. Das amplifizierte GFP-Fragment wurde ebenfalls in pBG8099 kloniert und anschließend alle bereits zuvor amplifizierten Reportergene über EcoRI Restriktionsschnittstellen an das neu hergestellte GFP fusioniert (pMB025; pMB027, pMB029).

Zur Herstellung des Kontrollvektors ohne zu exprimierendes Gen (empty vector; pM031) wurde das Gen *cyb₂(84)_s*-GFP aus den Vektor pBG8099 durch den Verdau von BamHI und EcoRI entfernt. Anschließend wurden die entstehenden klebrigen Enden des Vektors durch Klenow-Fragment zu stumpfen Enden modifiziert.

Zur Herstellung des mitochondrialen Markers *cyb₂(167)_s*-mCherry wurde der Vektor pBG8118-1 (pUG35 + *cyb₂(167)_s*-GFP modifiziert. Dafür wurde mCherry mittels PCR amplifiziert. Zur Durchführung der PCR wurden Primer (#10 & #11) verwendet, die in den nicht anlagernden Sequenzen entweder eine ClaI- oder XhoI Restriktionsschnittstelle besaßen. Anschließend wurde GFP aus dem Vektor pBG8118-1 gegen das mCherry-Fragment durch die Restriktion mittels ClaI und XhoI ersetzt.

Zur Herstellung des mitochondrialen Importkonstrukts wurde eine Fusions-PCR durchgeführt um die mitochondriale Importsequenz der Untereinheit 9 (Su9) mit dem Gen der Dihydrofolatreduktase zu verbinden. Beide Gensequenzen wurden mittels Primer (Su9: #15 & #16; DHFR: #12 & #13) amplifiziert. Die Primer #16 und #12 wurden so designt, dass diese überlappenden, komplementären Bereiche von etwa 20 Basenpaaren besaßen. Anschließend wurden die PCR-Fragmente mittels einer kurzen PCR (8 Zyklen) ohne Primer aneinandergelagert. Schließlich wurde erneut ein PCR-Ansatz durchgeführt mit Primern #15 und #14 durchgeführt. Primer #14 enthielt dabei das Codon für das C-terminale Cystein, die Basenpaarabfolge für den Strep-Tag sowie für den 6His-Tag. Nach erfolgreicher Amplifizierung wurde das PCR-Fragment über NcoI und XhoI Schnittstellen in den Vektor pET28b eingefügt.

Tabelle IV: Primer, die in dieser Studie verwendet wurden

Nummer	Primername	Sequenz
1	Fw_cyb2_BamHI	gaccgGATCCatgctaaa
2	Fw_GFP_BamHI	ccgcgGGATCCatgtctaaaggtgaa
3	Rev_GFPw/ostop_EcoRI	ccgcgGAATTCttgtacaattcatc
4	Fw_Q115_EcoRI	catgaGAATTCatggcgaccctggaaaagctgatga
5	Rev_Q115_EcoRI	catgaGAATTCttatacacggctcttctgttagctgaa
6	Fw_NM_EcoRI	agtacGAATTCatgtcggattcaaacca
7	Rev_NM_EcoRI	agtacGAATTCttaatcgtaaacactctgctc
8	Fw_DHFRds_EcoRI	agtacGAATTCatggttcgaccattgaac
9	Rev_DHFRds_EcoRI	agtacGAATTCttagctttctctctcgta
10	For_mcherry_claI	agtcgatcgtatgagcaaggcgagga
11	Rev_mcherry_xhoI	Agtcgtcgcgactactgtacagctcgt
12	DHFR_for_w-oStart	gttcgaccattgaacagatcgtcgcctgtccccaaaatag
13	Rev_DHFR	gtctttctctcgtagacttc
14	DHFR_rev_Cys_Strep	aggagtctcgagttttcgaactgcgggtgctccaagcgtcgaagccttctcttctcgtagacttcaaa
15	For_Su9_NcoI	gataaccatggcctccactcgtgctc
16	Rev_Su9_DHFRov	gatgctgtcaatggtcgaacgatgccgtcggagagtaggc

Tabelle V: Plasmide die in dieser Studie verwendet wurden

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBG8099	pYEDP1/8-2 mit cytb ₂ (84) _s -GFP unter Gal- Promotor	Bernard Guiard
pMB024	pYEDP1/8-2 mit cytb ₂ (84) _s -GFP-Q115 unter Gal- Promotor	This study
pMB2025	pYEDP1/8-2 mit GFP-Q115 unter Gal-Promotor	This study
pMB2026	pYEDP1/8-2 mit cytb ₂ (84) _s -GFP-Sup35 unter Gal promotor	This study
pMB2027	pYEDP1/8-2 mit GFP-Sup35 unter Gal-Promotor	This study
pMB028	pYEDP1/8-2 mit cytb ₂ (84) _s -GFP-DHFR _{ds} unter Gal- Promotor	This study
pMB029	pYEDP1/8-2 mit GFP-DHFR _{ds} unter Gal-Promotor	This study
pMB031	pYEDP1/8-2 (empty vector)	This study
pMB032	pYEDP1/8-2 mit cytb ₂ (84) _s -GFP-DHFR unter Gal-Promotor	This study
pMB034	pUG35 mit cytb ₂ (167) _s -mCherry unter Met ₂₅ -Promotor	This study
pMB035	Su9(70)-DHFR-Cys-Strep-6His in pET28b	This study
MTS-Dentra	Dentra with mitochondrial Importsequenz	Gift from Thomas Gensch
NUP120-mCherry	pRS314 mit Nup120-mCherry	Skruzny et al., 2009

6.2.2 Transformation in bakterielle Zellen

Bakterienzellen der Gattung *Escherichia Coli* (DH5 α oder BL21+) wurden mit 1 μ g DNA auf Eis für 20 Minuten inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 42 °C für 45 Sekunden inkubiert und zurück auf Eis gestellt. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zur Suspension gegeben und bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Die Bakterien wurden bei 12.000 xg (Eppendorf Centrifuge 5418) sedimentiert. Schließlich wurden die Bakterien in 100 μ l ddH₂O resuspendiert und auf selektiven LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

6.2.3 Proteinreinigung durch Sedimentation

Das Protein wurde in *Escherichia Coli* BL21+ durch die Hinzugabe von 1 mM IPTG für 4 Stunden in LB-Medium bei 37 °C exprimiert. Nach der Expression wurden die Zellen bei 12.000 xg für 5 Minuten geerntet. Zum Zellaufschluss wurden die Zellen in Lysispuffer (30 mM Tris/HCl pH 7.2, 5 % Glycerol, 40 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 100 mM Imidazol, 1 mM PMSF, 1 mg/ml Lysozym, Spatelspitze DNase) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Sonifizieren (15 x 10 Sekunden, duty cycle 40 %, output control 5) aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 4.500 xg (Eppendorf Centrifuge 58054 R) für 60 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Triton X-100-Puffer (50mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 2 % Triton X-100) resuspendiert und anschließend erneut bei 4.500 xg (Eppendorf Centrifuge 58054 R) für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in TEN-Puffer

(50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) resuspendiert und bei 4 °C für 30 Minuten rollend inkubiert. Erneut wurde das Protein bei 4.500 xg (Eppendorf Centrifuge 58054 R) für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und in Aufbewahrungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl) resuspendiert

6.2.4 Proteinrückfaltung nach Proteinreinigung

Das Protein SDCSH musste aufgrund seiner Unlöslichkeit nach der Isolierung aus *E.coli* BL21+ in die native Faltung zurückgefaltet werden. Aus diesem Grund wurde das bereits markierte Protein in verschiedenen Puffern getestet. Die Puffer waren dabei: (i) Puffer 1 (50 mM Tris/ HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 % Glycerol), (ii) Puffer 2 (50 mM Tris/ HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 M L-Arginin), (iii) Puffer 3 (50 mM Tris/ HCl pH 7.4, 250 mM NaCl, 1 mM MgCl₂), (iv) Puffer 4 (50 mM Tris/ HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 M L-Arginin, 1mM MgCl₂), (v) Puffer 5 (50 mM Tris/ HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 % Glycerol, 1 mM MgCl₂). Zur Kontrolle der Rückfaltung wurde eine Sedimentation bei 20.000 xg (Eppendorf Centrifuge 5424 R) und anschließend bei 125.000 xg (Optima™ MAX XP) durchgeführt.

6.2.5 Hefestämme

Alle verwendeten Hefestämme wurden wie folgt wachsen gelassen, soweit nicht anders darauf hingewiesen wird:

Hefezellen wurden in einem kleinen Volumen mit selektivem Medium, welches 2% Raffinose enthielt, inokuliert und anschließend schüttelnd bei 30°C über Nacht wachsen gelassen. Aus der Übernachtskultur wurde schließlich eine Kultur mit selektivem Medium, welches 3 % Glycerol enthielt, auf OD₆₀₀ 0.2 inokuliert und wachsen gelassen bis zur OD₆₀₀ 1. Bei OD₆₀₀ 1 wurden die Zellen bei 2.000 xg (Eppendorf Centrifuge 58054 R) für 2 Minuten geerntet und in selektivem Medium, welches 2% Galaktose enthielt, resuspendiert. Die Zellen exprimierten durch die Hinzugabe von Galaktose für die angegebenen Zeitpunkte. Zellen wurden abschließend bei 2.000 xg für 2 Minuten geerntet, einmal mit sterilem, kaltem Wasser gewaschen und nach Einfrieren im flüssigen Stickstoff bei -80°C gelagert.

Alle Transformationen in Hefestämme wurden nach konventionellen Prozeduren durchgeführt.

Tabelle VI: Hefestämme die in dieser Studie verwendet wurden

Strain	Genotype	Source
WVY49 (WT)	MAT α his4-713 lys2 ura3-52 leu2-3 112 trp1	Wolfgang Voos
BY4741	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0, met15 Δ 0 ura3 Δ 0	Euroscarf
BY4741 rho-	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0, met15 Δ 0 ura3 Δ 0	Euroscarf
Ssc1-3	MAT α ade2-101 lys2 ura3-52 leu2-3 112 trp1 ssc1-3 (LEU2)	(Gambill et al., 1993)
<i>mdj1Δ</i>	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0, met15 Δ 0 ura3 Δ 0 <i>mdj1Δ::KanMX</i>	Euroscarf
<i>hsp78Δ</i>	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0, met15 Δ 0 ura3 Δ 0 <i>hsp78Δ::KanMX</i>	Euroscarf
<i>fzo1Δ</i>	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0, met15 Δ 0 ura3 Δ 0 <i>fzo1Δ::KanMX</i>	Euroscarf
<i>fis1Δ</i>	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0, met15 Δ 0 ura3 Δ 0 <i>fis1Δ::KanMX</i>	Euroscarf

6.2.6 Transformation in Hefe-Zellen

Wildtypische Hefezellen oder Hefemutanten, welche auf YPD-Platten angewachsen sind, wurden in eine Transformationslösung (80 % (v/v) PEG 4000, 0.4 M LiAc, 150 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert, welche einzelsträngige Herings-DNA und 1 μ g Ziel-DNA enthielt. Die Zellsuspension wurde gut gemischt und bei 37 °C für 30 Minuten rollen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2.000 xg (Eppendorf Centrifuge 5418) abzentrifugiert und in 100 μ l sterilem d_d H₂O resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen auf selektiven CSM-Platten ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

6.2.7 Sedimentation von Aggregaten

Für die Sedimentation von Aggregaten wurde in dieser Studie das Protokoll (Koplin et al, 2010) in abgewandelter Form durchgeführt.

Im Detail die gefrorenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und resuspendiert in SPM-Puffer (1.2 M sorbitol, 50 mM KP_i pH 7.2, 200 mM KCl₂, 10 mM MgCl₂, 1 mM PMSF), welcher 3mg/ml Zymolyase 20T (Amsbio, UK) enthielt. Die Zellsuspension wurde 30 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend 2 Minuten bei 2.000 xg (Eppendorf Centrifuge 5418) gerntet. Die Zellen wurden mit SPM-Puffer ohne Zymolyase gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Zur Lyse der Zellen wurden diese in Lyse-Puffer (0.5% Triton X-100, 50 mM KP_i pH 7.2, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 1x Protease inhibitor, 1 mM PMSF) aufgenommen und durch Pipettieren (20x) und anschließenden Schütteln bei voller Geschwindigkeit und 4°C für 20 Minuten lysiert. Um unaufgeschlossene Zellen zu entfernen, wurden lysierte Zellen bei kleiner Geschwindigkeit (1600 xg, Eppendorf Centrifuge 5424 R) für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration wurde bestimmt durch die Vermessung mittels Bradfordreagenz. Die

Proteinkonzentration wurde auf die Probe mit der geringsten Proteinkonzentration eingestellt. Anschließend wurde eine Probe abgenommen, die den kompletten Proteingehalt widerspiegelt (T). Die verbleibende Probe wurde bei hoher Geschwindigkeit (20.000 xg; Eppendorf Centrifuge 5424 R) für 20 Minuten und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als Überstandsprobe aufbewahrt (Ü). Das Pellet wurde resuspendiert in Waschpuffer + Triton X-100 (0.5% Triton X-100, 20 mM KP_i pH 7.2, 1 mM PMSF) durch Sonifizieren (6x, output control 4, 50% duty cycle). Erneut wurde die Probe bei hoher Geschwindigkeit (20.000 xg; Eppendorf Centrifuge 5424 R) für 20 Minuten und 4°C zentrifugiert und resuspendiert in Waschpuffer (20 mM KP_i pH 7.2, 1 mM PMSF) durch Sonifizieren (6x, output control 4, 50 % duty cycle). Nach wiederholter Zentrifugation bei 20.000 xg (Eppendorf centrifuge 5424 R) wurde das Pellet im gleichen Volumen wie der Überstand in Waschpuffer aufgenommen und durch schütteln bei 4 °C für 20 Minuten resuspendiert.

Für die Sedimentation von Aggregaten aus isolierten Mitochondrien wurde ein ähnliches Protokoll durchgeführt. Allein die Lyse der Mitochondrien fand direkt statt. Mitochondrien wurden lysiert in Lysepuffer (0.5% Triton X-100, 50 mM KP_i pH 7.2, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 1x Protease inhibitor, 1 mM PMSF) durch Pipettieren (20x) und anschließendem Schütteln bei voller Geschwindigkeit für 10 Minuten bei 4°C. Für eine Behandlung der Mitochondrien bei erhöhter Temperatur wurden die Mitochondrien vor der Lyse in Resuspensionspuffer A (1.2 M sorbitol, 50 mM KP_i pH 7.2, 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 2 mM NADH, 1 mM PMSF) aufgenommen.

Die Sedimentation von Aggregaten wurde mittels SDS-PAGE und anschließenden Western Blot detektiert. Während von der Gesamtprobe sowie von dem Überstand die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, wurde von der Pelletfraktion die dreifache Menge aufgetragen.

6.2.8 Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Hefezellen

Nach der Expression der mitochondrialen Reportproteine wurden die Zellen geerntet bei 2.000 xg (Eppendorf Centrifuge 5424 R) für 2 Minuten. Zellen wurden resuspendiert in selektivem Medium pH 7.4, welches 3% Glycerol enthielt. Bei Bedarf wurden die Zellen mit 0.5 μ M Tetramethylrhodaminethyl (TMRE) für 15 Minuten bei 30°C gefärbt. Anschließend

wurden die Zellen ebenfalls mit Dapi für 5 Minuten bei 30°C gefärbt. Schließlich wurden die Zellen auf dünnen Agarosepads (1% w/v Agarose in selektivem Medium pH 7.4) immobilisiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden entweder mit dem EVOS_{FI} Cell Imaging System (AMG, DE) mit einer 100x Objektivlinse (Ölimmersion) oder dem TCS Konfokalmikroskop mit einer 63x Objektivlinse (Ölimmersion, NA 1.4, Leica, DE) gemacht. Die Auswertung und Bearbeitung erfolgte mit Fiji64 (ImageJ64).

6.2.9 Hefe-Wachstumstest mittels Spotttest

Die Hefezellen wurden wachsen gelassen wie bereits beschrieben. Die Expression fand statt für die angegebenen Zeitpunkte. 1×10^7 Zellen wurden anschließend für eine Verdünnungsreihe genutzt. Dabei wurde zuerst eine 1:10 Verdünnung vorgelegt und anschließend 4x 1:3 verdünnt. Letztendlich wurde die Verdünnungsreihe auf selektiven Mediumplatten gespottet, welche entweder 2% Glukose oder 3% Glycerol enthielt. Die Platten wurden bei der angegebenen Temperatur inkubiert.

6.2.10 Wachstumsinhibitionstest

Die Hefezellen wurden wachsen gelassen wie bereits beschrieben. Die Expression fand statt für die angegebenen Zeitpunkte. 1×10^7 wurden in 200 μ l sterilem Wasser resuspendiert und auf selektiven Mediumplatten ausplattiert, welche entweder 2% Glukose oder 3% Glycerol enthielten. Anschließend wurden kleine runde Stücke Filterpapier, die mit 2 μ l 20 mM Menadion behandelt worden sind, auf den Agar gelegt. Dadurch wurde eine zirkuläre Zone verursacht, in der das Wachstum vermindert war. Die Platten wurden bei 30°C oder 37°C inkubiert.

6.2.11 Membranpotenzialmessungen in Spheroblasten

Die Hefezellen wurden wachsen gelassen wie bereits beschrieben. Expression fand für 10 Stunden statt. Anschließend wurden 20 OD₆₀₀ Units geerntet bei 2000 g für 2 Minuten (Eppendorf Centrifuge 5424 R) und in Te β -Puffer (200 mM Tris/HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend bei 2.000 xg (Eppendorf Centrifuge 5418) geerntet. Das Zellpellet wurde in Spheroblastenpuffer (1.2 M sorbitol, 50 mM KP_i pH 7.2, 1 mM MgCl₂) + 3 mg/ml

Zymolyase T20 (Amsbio, UK) resuspendiert und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach der Zymolyasebehandlung wurden die Spheroblasten zweimal mit 1.2 M Sorbitol gewaschen und anschließend in Storage-Puffer (250 mM sucrose, 10 mM MOPS/KOH pH 7.2, 80 mM KCl, 5mM MgCl₂, 3% w/v BSA, 2 mM ATP, 2 mM NADH) resuspendiert. Für die Messung wurden 3 ml Potenzialpuffer (0.6 M sorbitol, 20 mM KP_i pH 7.2, 0.1% w/v BSA, 0.5 mM EDTA pH 8) mit 5 mM L-Malate und 5 mM L-Glutamat in eine Quarz-Küvette (Hellma, DE) gegeben. Durch die Hinzugabe von 0.25 µM 3,3'-Dipropylthiadicarbocyaniniodid (DiSC₃) wurde die Fluoreszenzmessung gestartet und gemessen bis die Fluoreszenz von DiSC₃ konstant war. Durch die Hinzugabe von 20 OD₆₀₀ Einheiten Spheroblasten wurden die DiSC₃ Fluoreszenz inhibiert und ebenfalls gewartet bis die Fluoreszenz erneut stabil war. Danach wurde das Membranpotenzial der Mitochondrien zerstört durch die Zugabe von 20 mM Natriumazid, welches zur Regenerierung der DiSC₃ Fluoreszenz führte. Die Regenerierung der Fluoreszenz spiegelt direkt das zuvor existierende Membranpotenzial der Spheroblasten wieder und wurde daher für den Vergleich der Membranpotenziale genutzt.

6.2.12 Isolation von Mitochondrien aus *Saccharomyces Cerevisiae*

Mitochondrien aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden nach einer konventionellen Standardprozedur isoliert wie sie bereits beschrieben ist (Diekert et al., 2001).

Im Detail, Zellen wurden wachsen gelassen wie beschrieben, die Expression wurde bei OD₆₀₀ 1 induziert und fand für die angegebenen Zeitpunkte statt. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 rpm (Beckman Coulter, Avanti J-A Centrifuge) geerntet und in einfach destilliertem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in vorgewärmten DTT-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM DTT) resuspendiert und für 20 Minuten inkubiert bei 30°C und 60 rpm (New Brunswick Scientific, Innova 42, Incubator shaker series). Die Zellen wurden einmal gewaschen in Zymolyasepuffer (20 mM KP_i pH 7.2, 1.2M Sorbitol) und anschließend resuspendiert in Zymolyasepuffer (20 mM KP_i pH 7.2, 1.2M Sorbitol) mit 3 mg/g Pellet Zymolyase 20T. Die Zellen wurden erneut für 35 Minuten inkubiert bei 30°C und 60 rpm (New Brunswick Scientific, Innova 42, Incubator shaker series). Nach dem Verdau der Zellwand wurden die Spheroblasten noch einmal mit Zymolyasepuffer gewaschen. Anschließend wurde die Zellen in kaltem Homogenisationspuffer aufgenommen (1 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.6 Sorbitol, 0.5% w/v BSA, 1 mM PMSF) und durch Pottern (20x) lysiert. Zelllysat wurde daraufhin bei 1500 rpm

(Beckman Coulter, Avanti J-A Centrifuge) bei 4°C für 2 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufgefangen und direkt erneut bei 3.000 rpm (Beckman Coulter, Avanti J-A Centrifuge) bei 4°C für 4 Minuten abzentrifugiert. Abermals wurde der Überstand aufgefangen und bei 4.000 rpm (Beckman Coulter, Avanti J-A Centrifuge) bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Schließlich wurden die Mitochondrien bei 12.000 rpm (Beckman Coulter, Avanti J-A Centrifuge) für 15 Minuten bei 4°C sedimentiert. Die Mitochondrien wurden in SEM Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH pH 7.2, 1 mM EDTA) gewaschen und zuerst bei 4.000 rpm (Beckman Coulter, Avanti J-A Centrifuge) und anschließend der Überstand erneut bei 12.000 rpm (Beckman Coulter, Avanti J-A Centrifuge) abzentrifugiert. Mitochondrien wurden nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

6.2.13 *In organello* Import von radioaktiv-markierten und fluoreszenz-markierten Proteinen in isolierten Mitochondrien

In organello Importreaktion in isolierten Mitochondrien wurde durchgeführt nach konventionellen Importprozeduren (Ryan et al., 2001).

Im Detail, radioaktiv markiertes Substratprotein Su9(70)-DHFR wurde durch *in vitro* Transkription und *in vitro* Translation hergestellt mittels mMMESSAGE mMACHINE transcription kit und Retikulozytenlysat aus Hasen in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin/Cystein (PerkonElmer, DE). Für jede Importreaktion wurden 25 µg isolierte Mitochondrien genutzt und in 110 µl Importpuffer (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH pH 7.2, 80 mM KCl, 5mM MgCl₂, 3% w/v BSA, 2 mM ATP, 2 mM NADH, 50 µM MnCl, 10 µM ZnCl) resuspendiert. In den vermerkten Proben wurden zur Zerstörung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_{mit}$) eine Mischung aus 8 µM Antimycin A, 0.5 µM Valinomycin and 2 µM Oligomycin hinzugegeben. Nach einer Preinkubation der Mitochondrien bei 30 °C für 2 Minuten, wurde der Import gestartet durch die Hinzugabe von 5 µl Preprotein und die Reaktion wurde für die angegebenen Zeitpunkte bei 30°C inkubiert. Die Importreaktion wurde gestoppt durch das direkte Platzieren der Proben auf Eis und zusätzlich durch die Hinzugabe von 50 µM Valinomycin. Nach der vollständigen Importreaktion wurden die Mitochondrien anschließend mit Proteinase K verdaut, da nicht-importierte Substratproteine verdaulich sind, während vollständig importierte Substratprotein durch die mitochondriale Membranen geschützt sind. Daher wurden Mitochondrien mit SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH pH 7.2, 1 mM EDTA) auf das doppelte Volumen aufgefüllt

und in zwei Proben aufgeteilt. Während die eine Hälfte unbehandelt blieb, wurde die andere Hälfte mit 75 µg/µg Proteinase K behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis wurde die Proteinase K durch die Hinzugabe von 1.5 mM PMSF inhibiert. Die Mitochondrien wurden anschließend erneut isoliert durch Zentrifugation bei 12.000 xg (Eppendorf Centrifuge 5424 R) und gewaschen mit SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH pH 7.2, 1 mM EDTA) mit 1.5 mM PMSF. Die Importreaktion wurde analysiert durch SDS-PAGE und digitale Autoradiographie.

Für den rekombinanten fluoreszierenden Proteinimport von Su9(70)-DHFR-Cys-Strep-His (SDCSH) wurde das Protein zuvor mit Fluoreszein-5-Maleimid markiert. Zur Markierung wurde das Protein der pH-Wert auf 7.4 mit Tris pH 7.4 eingestellt und zusätzlich EDTA (f.c. 5 mM) hinzugegeben. Anschließend wurde Fluoreszein-5-Maleimid in zweifach molarem Überschuss zum Protein gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der mitochondriale Import wurde durchgeführt wie bereits beschrieben, jedoch mit einer Proteinmenge von 22.5 nM. Die Detektion des fluoreszierenden Proteins erfolgte mittels des Fluoreszenz-Scanner bei 494/518 nm (Laser: 472 nm; Filter: LPB).

Unlösliches Protein wurde entweder in Urea-Puffer (7 M Urea, 30 mM MOPS-KOH pH 7.2, 50 mM DTT) oder im Rückfaltungspuffer in den löslichen Zustand gebracht

6.2.14 *In organello* Degradation von radioaktiv-markierten Protein in isolierten Mitochondrien

Für die *in organello* Degradation in isolierten Mitochondrien wurde die *in vitro* Transkription, *in vitro* Translation und der radioaktiv-markierte Import von cytb₂(167)_s-DHFR genauso durchgeführt wie bei der *in vitro* Importreaktion bereits beschrieben.

Für jeden Degradationsansatz wurden 150 µg Mitochondrien genutzt. Nach dem Proteinimport wurden 15 µg Mitochondrien mit Proteinase K behandelt um den erfolgreichen Import zu bestätigen, während die restlichen Mitochondrien unbehandelt blieben. Die restlichen Mitochondrien wurden anschließend bei 14.000 xg (Eppendorf Centrifuge 5424 R) bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und in Resuspensionspuffer B (250 mM sucrose, 10 mM MOPS/KOH pH 7.2, 80 mM KCl, 5mM MgCl₂, 3% w/v BSA, 10 mM KP_i pH 7.2, 3 mM ATP, 4 mM NADH, 10 mM Kreatinphosphat, 50 µg/ml Kreatinkinase) resuspendiert. Weitere 15 µg Mitochondrien wurden entnommen und als Startpunktprobe verwendet. Die restlichen Mitochondrien wurden inkubiert bei 25 °C für die angegebenen Zeitpunkte.

Die Proben aller Zeitpunkte wurden einmal gewaschen in SEM-Puffer (250 mM sucrose, 10 mM MOPS/KOH pH 7.2, 1 mM EDTA) + 1 mM PMSF.

Die Degradationsreaktion wurde schließlich durch SDS-PAG und digitaler Autoradiographie nachgewiesen. Die zunehmenden Degradationsbanden wurde zur Quantifizierung der Degradationseffizienz mittels ImageJ64 genutzt.

6.2.15 *In organello* Translation

30 g isolierte Mitochondrien wurden pro Reaktion in Translationspuffer (643 mM Sorbitol, 160 mM KCl, 16 mM KP_i , 21.5 mM Tris/HCl pH 7.4, 13.5 mM $MgSO_4$, 3.21 mg/ml BSA, 21.5 mM ATP, 0.13 μ M Aminosäuremix (-Met), 0.53 mM GTP, 1.42 mM Kreatinphosphat, 36 μ g/ml Kreatinkinase, 1.21 mg/ml α -Ketoglutarat) resuspendiert und für 3 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Translationsreaktion wurde durch die Zugabe von 4.4 μ Ci/Reaktion [35 S]-Methionin/Cystein (PerkinElmer, DE) gestartet und für 45 Minuten bei 30 °C inkubiert. Durch die Hinzugabe von MOPS/Methionin (50 mM MOPS/KOH pH 7.2 and 10 mM Methionin) wurde die Translationsreaktion gestoppt und für weitere 20 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Mitochondrien wurden anschließend zweimal mit Waschpuffer (0.6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 5 mM MOPS/KOH pH 7.2, 1 mM Methionin) gewaschen und auf ein 15 %iges SDS-Gel mit 1.1 M Urea aufgetragen. Die Detektion fand durch digitale Autoradiographie statt. Die Translationsprodukte wurden mittels ImageJ64 quantifiziert.

6.2.16 2D-PAGE

Für die 2D-PAGE-Analyse wurde eine Ko-Sedimentation nach 10 stündiger mtGFP-DHFR_{ds} Expression durchgeführt. 1 mg isolierter Mitochondrien wurden in Lysispuffer (0.5% Triton X-100, 50 mM KP_i pH 7.2, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 1x Proteaseninhibitor (Roth, DE), 1 mM PMSF) resuspendiert und durch Pipettieren (20x) lysiert. Anschließend wurden die Mitochondrien 10 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Die lysierten Mitochondrien wurden bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet mit Waschpuffer + Triton X-100 (0.5% Triton X-100, 20 mM KP_i pH 7.2, 1 mM PMSF) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet erneut gewaschen mit Waschpuffer (20 mM KP_i pH 7.2, 1 mM PMSF). Nach der erneuten Sedimentation wurden die Pellet in Rehydrierungspuffer (7 M Urea, 2 M Thio-Urea, 2% w/v CHAPS, 20 mM DTT, 0.8% v/v Pharmalyt (Biolytes) 3-10 NL, kleine Menge Bromophenolblau) aufgenommen und für 20 Minuten bei 20 °C für 10 Minuten geschüttelt.

Für die ersten Dimension IEF wurde die Probe auf einen trockenen 18 cm langen nichtlinearen Immobilinstreifen (GE Healthcare, UK) aufgetragen für die über Nacht-Rehydrierung bei 20 °C in einem IPGphor isoelektrischen Fokussierungssystem (GE Healthcare, UK). Anschließend wurde die Proteinfokussierung durchgeführt in einem schrittweisen Anstieg der Spannung (1 Stunde 200 V, 1 Stunde 500 V und 1 Stunde 1000 V). Die Spannung wurde schließlich auf 8000 V (langsame Erhöhung über 2 Stunden und 30 Minuten) für 3 Stunden eingestellt und anschließend für 2 Stunden und 30 Minuten auf 500 V herabgesetzt. Der fokussierte Streifen wurde in Equilibrierungspuffer (6 M Urea, 1.5 mM Tris/HCl pH 8.8, 50 % v/v Glycerol, 1 % w/v SDS) mit entweder 1 % w/v DTT or 2.5 % w/v Iodoacetamid im Dunkeln schrittweise für jeweils 10 Minuten equilibriert und reduziert.

Die Proteine wurden aufgetrennt durch ein 11 % iges Polyakrylamid SDS-Gel bei 0.5 W für 1 Stunde und anschließend bei 1.5 W über Nacht bei 20 °C im Ettan™ DALTsix-System (GE Healthcare, UK). Proteindetektion wurde durchgeführt durch die Gelfixierung mittels Fixierungslösung (40 % v/v Methanol, 10 % v/v Essigsäure) für 2 Stunden und die anschließende Coomassiefärbung durch Coomassie-Blue G250 (40 % v/v Methanol, 10 % v/v Essigsäure, 0.5 % w/v Coomassie Blue G250).

6.2.17 Peptidvorbereitung und LC-MS

Gelstücke, welche aus dem 2-D-Gel extrahiert wurden, wurden nacheinander mit Wasser, 50 % Acetonitril (CAN) und 100 % ACN gewaschen. Die Proteine wurden mittels 20 mM DTT in 50 mM Ammoniumdikarbonat reduziert und alkyliert durch 40 mM Iodoacetamid in 50 mM Bikarbonat. Die Gelstücke wurden erneut gewaschen und dehydriert mit ACN. Getrocknete Gelstücke wurden mit 400 ng Trypsin über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Peptidextrakt wurde separiert und die verbliebenen Peptide durch 50 % ACN extrahiert. Die Peptide wurden in einem Vakuumkonzentrierer getrocknet und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Peptide wurden in 8 µl 0.1 % Trifluoressigsäure gelöst. 1 bis 2 µl wurden in eine C18 Trap-Säule (20 mm Länge, 100 µm innerer Diameter) gekoppelt an einer C18 analytischen Säule (200 mm Länge, 75 µm innerer Diameter), welche selbst gepackt wurden mit 3 µm ReproSil-Pur 120 C18-AQ Partikeln (Dr. Maisch, DE).

Lösungsmittel A war 0.1 % Ameisensäure. Die Peptide wurden durch einen linearen Gradienten von 0 % bis 35 % Lösungsmittel B (90 % CAN und 0.1 % Ameisensäure) mit 30 oder 45 Minuten bei einer Flussrate von 350 nl/min getrennt. Die nanoHPLC war direkt

gekoppelt mit einem LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, DE) oder einem HCT Ultra Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonik, DE). Für die Orbitrap-Analyse wurden Peptidionen zwischen 330 und 1700 m/z im Orbitrap-Detektor gescannt mit einer Auflösung von 30,000 (Maximale Füllzeit 400 ms, AGC target 10^6). Die 25 intensivsten vorläufigen Ionen (Schwellenintensität 5000) wurden der Kollisionsinduzierten Dissoziation zugeführt und die Fragmente wurden analysiert in der linearen Ionenfalle. Fragmentierte Peptidionen wurden für die Wiederholungsanalysen für 15 Sekunden ausgeschlossen. Rohdaten wurden mittels Proteome Discoverer Software 1.4.1.12 (Thermo Fisher Scientific) prozessiert und analysiert. Peptididentifizierung wurde durch die hauseigene Mascot Server Version 2.4.1 (Matrix Science Ltd, UK) durchgeführt. MS2-Daten wurden gegen *S.cerevisiae* und menschliche Sequenzen von SwissProt (release 2013_03) gesucht. Vorläuferionentoleranz (m/z) betrug 10 ppm, Fragmentionentoleranz bei 0.6 Da. Tryptische Peptide wurden gesucht mit bis zu zwei fehlenden Spaltungen. Niedrig bewertete Übereinstimmungen wurden erneut halbtryptischer Spezifität mit bis zu einer fehlenden Spaltung gesucht. Karbamidomethylierung wurden als statische Modifikation (Cys) gesetzt. Oxidation (Met) und Acetylierung (N-terminus des Proteins) wurden als dynamische Modifikationen gesetzt. Mascot-Resultate aus der Suche gegen SwissProt wurden zum Percolator-Algorithmus Version 2.04 gesendet, welche im Proteom Discoverer enthalten war. Nur Proteine mit zwei Peptiden (Maximale Fehlerwahrscheinlichkeit 1 %) wurden berücksichtigt und identifiziert. Daten der HCT Ultra Ionenfalle_ERNEF_4 wurden bearbeitet in ESI Compass 1.3 DataAnalysis Version 4.0 (Bruker). Mascot-Serversuche wurde gestartet mit ProteinScape 3.0 gegen *S.cerevisiae* und menschliche Sequenzen von SwissProt mit einer Vorläufer- und Fragmentionentoleranz von 0.6 Da und Modifizierungen wurden wie oben beschrieben gesetzt.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung	
μ	Micro (10^6)	
$\Delta\psi_{mit}$	Mitochondriales Membranpotenzial	
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	
[^{35}S]	Schwefelisotop	
AAA	Engl. ATPase associated activity	
Abb.	Abbildung	
Aco1	Aconitase 1	
ADP	Adenosindiphosphat	
ALS	Amylotrophe Lateralsklerose	
AMP	Adenosinmonophosphat	
ATFS 1	Engl.: Activating transcription factor associated with stress 1	
ATG	Eng.: Autophagy related proteins	
ATP	Adenosintriphosphat	
ATPase	Adenosintriphosphatase	
AVO	Antimycin A Valinomycin Oligomycin	
BSA	Bovine Serum Albumin	
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	
Clp	Caseinolytische Peptidase	
CPY*	Mutierte Carboxypeptidase Y	
<i>cyb</i> ₂	Cytochrom <i>b</i> ₂	
Da	Dalton	
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylidol	
$d_0\text{H}_2\text{O}$	Doppelt destilliertes Wasser	
DHFR	Dihydrofolatreduktase	
DiSC ₃	3,3'-Dipropylthiadicarbocyaniniodid	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxiribonukleinsäure	
DNase	Desoxiribonuklease	
dNTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat	
DRP	Engl.: Dynamin related GTPase	
DTT	Dithiotreitol	
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
ER	Endoplasmatisches Retikulum	
<i>et al.</i>	Lat. Et alii	
Fis1	Engl.: Mitochondrial fission 1	
for	Engl.: Forwards	
Fzo1	Engl.: Fuzzy onion homolog 1	
g	Zentrifugalkraft	
Gln	Glutamin	
Glu	Glutaminsäure	
GFP	Grünfluoreszierendes Protein	
GTP	Guanosintriphosphat	
GTPase	Guanosintriphosphatase	
HCl	Salzsäure	
HDAC	Histondeacetylase	
His	Histidin	
Hsp	Hitzeschockprotein	
Hsf1	Hitzeschockfaktor 1	
Ilv2	Engl.: Isoleucine plus Valin requiring	
IMiQC	Eng.: Intra-mitochondrial protein quality compartment	
INQ	Engl.: Intranuclear quality compartment	
IPOD	Engl.: Insoluble protein deposit	
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	
k	Kilo (10^3)	
kb	Kilobasen	
KOH	Kaliumhydroxid	
KP _i	Kaliumphosphat	
LB	Luria Bertani	
LC-MS	Engl.: Liquid Chromatography mass spectrometry	
Lys	Lysin	
m	Milli (10^{-3})	
M	molar	
mA	Milliamper	
Mdh1	Malatdehydrogenase 1	
Mdj1	Mitochondriales DnaJ 1	
MELAS	Mitochondriale Encephalomyopathie, Lactatacidose und Schlaganfall-ähnliche Episoden	
Met	Mehionin	
MgCl	Magnesiumchlorid	
Mge1	Mitochondriales GrpE 1	
Min	Minuten	
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure	
MPP	Engl. Mitochondrial processing peptidase	
mRNA	Engl.: Messenger ribonucleic acid	
MS	Massenspektrometrie	
MTOC	Mirkotubuli-organisierendes Zentrum	
MTS	Mitochondriale Zielsequenz	
n	Nano (10^{-9})	
NaCl	Natriumchlorid	
NADH	Nicotinamadenindinukleotid	
NBD	Nukleotidbindedomäne	
NEF	Nukleotidaustauschfaktor	
Ni-NTA	Nickel-Nitrolotriessigsäure	
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm	
Oxa1	Engl.: Protein oxidase assembly1	
PCR	Polymeraseketenreaktion	
PEG	Polyethylenglykol	
Pgk1	Phosphoglyceratkinase 1	
pH	Lat. Pondus Hydrogenii	
Phe	Phenylalanin	
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	
PolyQ	Polyglutamine	
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies	

PQC	Proteinqualitätskontrollsystem
Pro	Prolin
rev	Engl. Reverse
SAM	Engl. Sorting and assembly machinery
SBD	Substratbindedomäne
SC	Engl.: Synthetic complete
SDCSH	Su9(70)-DHFR-Cys-Strep-6His
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese
SEM	Saccharose EDTA MOPS
Ser	Serin
SGD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Datenbank
Strep-Tag	Aminosäureabfolge Trp-Ser-His-Pro-Gln-Ph-Glu-Lys
Su9	Engl.: Subunit 9 of mitochondrial ATP synthase
sHSP	Kleine Hitzeschockproteine
Ssa	Engl.: Stress seventy family A
Ssb	Engl.: Stress seventy family B
Ssc	Engl.: Stress seventy family C
TAE	Tris-Acetat mit EDTA
TBS	Engl.: Tris buffered saline
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
TIM	Engl.: Translocase of inner membrane
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TOM	Engl.: Translocase of outer membrane
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Trp	Tryptophan
U	Engl.: Unit
UPR	Antwort auf ungefaltete Proteine
UPR ^{mt}	Mitochondriale UPR
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	Engl.: Weight per volume
w/o	Engl.: Without out
v/v	Engl.: Volume per volume
YPD	Hefeextrakt Pepton Glukose

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Schicksals eines Proteins innerhalb seines Lebenszyklus.	7
Abbildung 2: Proteinaggregatkompartimente existieren in allen Reichen des Lebens.	17
Abbildung 3: Schematische Abbildung der zweifachen Funktion des mitochondrialen Hsp70 Chaperons Ssc1 in der mitochondrialen Matrix.	27
Abbildung 4: Proteinqualitätskontrollsystem in der mitochondrialen Matrix von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	31
Abbildung 5: Expression aggregationsanfälliger Reporterproteine.	42
Abbildung 6: Lokalisation der aggregationsanfälligen mitochondrialen Reporterproteine.	43
Abbildung 7: Lokalisation der aggregationsanfälligen mitochondrialen Proteine mittels Dichtegradienten.	44
Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Reporterproteine.	45
Abbildung 9: Membranpotential-Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie.	46
Abbildung 10: Immunofluoreszenz von wildtypischen Hefezellen unter Stresssituationen.	47
Abbildung 11: Sedimentationseigenschaften von <i>mtGFP-DHFR_{ds}</i> Aggregaten.	48
Abbildung 12: Proteinhomöostase in Anwesenheit von IMiQC.	49
Abbildung 13: 2D-Analyse der ko-sedimentierenden mitochondrialen Proteine.	50
Abbildung 14: Stabilität mitochondrialer Proteine in Anwesenheit von <i>mtGFP-DHFR_{ds}</i> Aggregaten.	52
Abbildung 15: Ko-Sedimentation mitochondrialer Proteine in Anwesenheit von <i>mtGFP-DHFR_{ds}</i> unter Hitzestresskonditionen.	53
Abbildung 16: Komponenten des PQC in Anwesenheit ungefalteter Proteine.	55
Abbildung 17: Langzeitstabilität des IMiQC-Kompartiments.	56
Abbildung 18: UPR ^{mt} -Aktivierung in Anwesenheit von <i>mtGFP-DHFR_{ds}</i> Aggregaten.	57
Abbildung 19: Das zelluläre Wachstum wird nicht beeinträchtigt durch die Formierung von IMiQC.	58
Abbildung 20: Das mitochondriale Membranpotential bleibt in Anwesenheit von <i>mtGFP-DHFR_{ds}</i> Aggregaten erhalten.	59
Abbildung 21: <i>In organello</i> Import von zytosolischen Vorläuferproteinen in Anwesenheit von <i>mtGFP-DHFR_{ds}</i> Aggregaten.	60
Abbildung 22: Degradationseffizienz isolierter Mitochondrien in Anwesenheit der Proteinaggregate.	61
Abbildung 23: Integrität mitochondrialer Proteinkomplexe in Anwesenheit von <i>mtGFP-DHFR_{ds}</i> Aggregaten.	62
Abbildung 24: Mitochondriale Proteinlevel in der stationären Phase.	63
Abbildung 25: ROS-Resistenz IMiQC enthaltender Zellen.	65
Abbildung 26: <i>In Organello</i> Translationsrate in Anwesenheit von <i>mtGFP-DHFR_{ds}</i> Aggregaten.	66

Abbildung 27: Formierung des IMiQC-Kompartiments.	67
Abbildung 28: Perinukleäre Lokalisation von IMiQC.	68
Abbildung 29: IMiQC-Formierung befreit Tochterzellen von ungefalteten Proteinen.	70
Abbildung 30: Zelluläre Faktoren sind an der IMiQC-Formierung beteiligt.	72
Abbildung 31: Thermotoleranz in <i>mtGFP-DHFR_{ds}</i> exprimierenden Hsp78-Deletionszellen.	73
Abbildung 32: Anzahl der Aggregate und perinukleäre Lokalisation in Mutantenstämmen.	74
Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Analyse amyloider Reporterproteine.	75
Abbildung 34: Mitochondriale Morphologie unter verschiedenen Stresskonditionen.	76
Abbildung 35: Sedimentation des mitochondrialen, amyloiden Reporterproteins.	77
Abbildung 36: Ko-translationale <i>in organello</i> Importreaktion in isolierte Mitochondrien.	79
Abbildung 37: Konstruktion eines rekombinanten fluoreszierendes Proteins für den <i>in organello</i> Import in isolierte Mitochondrien.	81
Abbildung 38: <i>In organello</i> Import von Urea-gelöstem SDCSH in isolierte Mitochondrien.	82
Abbildung 39: <i>In organello</i> Importreaktion von rückgefaltetem SDCSH in Mitochondrien von Hefen.	83
Abbildung 40: <i>In organello</i> Importreaktion von rückgefaltetem SDCSH in isolierte Mitochondrien von Säugetierzellen.	84
Abbildung 41: Modell der IMiQC-Ablagerung in der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	96

9. Literaturverzeichnis

- Aguilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M, Nystrom T (2003) Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299: 1751-3
- Ahting U, Waizenegger T, Neupert W, Rapaport D (2005) Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 280: 48-53
- Alexopoulos JA, Guarne A, Ortega J (2012) ClpP: a structurally dynamic protease regulated by AAA+ proteins. *Journal of structural biology* 179: 202-10
- Ambro L, Pevala V, Bauer J, Kutejova E (2012) The influence of ATP-dependent proteases on a variety of nucleoid-associated processes. *Journal of structural biology* 179: 181-92
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-65
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-30
- Arnould T, Michel S, Renard P (2015) Mitochondria Retrograde Signaling and the UPR mt: Where Are We in Mammals? *International journal of molecular sciences* 16: 18224-51
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319: 916-9
- Barton S, Jacak R, Khare SD, Ding F, Dokholyan NV (2007) The length dependence of the polyQ-mediated protein aggregation. *J Biol Chem* 282: 25487-92
- Bateman JM, Iacovino M, Perlman PS, Butow RA (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: 47946-53
- Becker T, Bottinger L, Pfanner N (2012) Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends in biochemical sciences* 37: 85-91
- Ben-Zvi A, De Los Rios P, Dietler G, Goloubinoff P (2004) Active solubilization and refolding of stable protein aggregates by cooperative unfolding action of individual hsp70 chaperones. *J Biol Chem* 279: 37298-303
- Bender T, Leidhold C, Ruppert T, Franken S, Voos W (2010) The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics* 10: 1426-43
- Bender T, Lewrenz I, Franken S, Baitzel C, 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: 541-54
- Benyair R, Ron E, Lederkremer GZ (2011) Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum. *Int Rev Cell Mol Biol* 292: 197-280
- Betting J, Seufert W (1996) A yeast Ubc9 mutant protein with temperature-sensitive in vivo function is subject to conditional proteolysis by a ubiquitin- and proteasome-dependent pathway. *J Biol Chem* 271: 25790-6
- Bolliger L, Deloche O, Glick BS, Georgopoulos C, Jenö P, Kronidou N, Horst M, Morishima N, Schatz G (1994) A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability. *The EMBO journal* 13: 1998-2006
- Bota DA, Davies KJ (2002) Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nature cell biology* 4: 674-80
- Bottinger L, Becker T (2012) Protein quality control in the intermembrane space of mitochondria. *Journal of molecular biology* 424: 225-6
- Braun RJ, Westermann B (2011) Mitochondrial dynamics in yeast cell death and aging. *Biochemical Society transactions* 39: 1520-6
- Bukau B, Weissman J, Horwich A (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125: 443-51

- Carrio M, Gonzalez-Montalban N, Vera A, Villaverde A, Ventura S (2005) Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *Journal of molecular biology* 347: 1025-37
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-44
- Chen Y, Zhang H, Zhou HJ, Ji W, Min W (2016) Mitochondrial Redox Signaling and Tumor Progression. *Cancers (Basel)* 8
- Choe YJ, Park SH, Hassemer T, Korner R, Vincenz-Donnelly L, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2016) Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress. *Nature* 531: 191-5
- Clague MJ, Urbe S (2010) Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* 143: 682-5
- Coelho M, Lade SJ, Alberti S, Gross T, Tolic IM (2014) Fusion of protein aggregates facilitates asymmetric damage segregation. *PLoS biology* 12: e1001886
- Corydon TJ, Bross P, Holst HU, Neve S, Kristiansen K, Gregersen N, Bolund L (1998) A human homologue of *Escherichia coli* ClpP caseinolytic protease: recombinant expression, intracellular processing and subcellular localization. *The Biochemical journal* 331 (Pt 1): 309-16
- Corydon TJ, Wilsbech M, Jespersgaard C, Andersen BS, Borlum AD, Pedersen S, Bolund L, Gregersen N, Bross P (2000) Human and mouse mitochondrial orthologs of bacterial ClpX. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 11: 899-905
- Craig EA, Kramer J, Kosc-Smithers J (1987) SSC1, a member of the 70-kDa heat shock protein multigene family of *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 4156-60
- Craig EA, Kramer J, Shilling J, Werner-Washburne M, Holmes S, Kosc-Smithers J, Nicolet CM (1989) SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Molecular and cellular biology* 9: 3000-8
- de Groot NS, Sabate R, Ventura S (2009) Amyloids in bacterial inclusion bodies. *Trends in biochemical sciences* 34: 408-16
- Dehay B, Bertolotti A (2006) Critical role of the proline-rich region in Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. *J Biol Chem* 281: 35608-15
- DeSantis ME, Leung EH, Sweeny EA, Jackrel ME, Cushman-Nick M, Neuhaus-Follini A, Vashist S, Sochor MA, Knight MN, Shorter J (2012) Operational plasticity enables hsp104 to disaggregate diverse amyloid and nonamyloid clients. *Cell* 151: 778-93
- Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313: 314-8
- Doyle SM, Wickner S (2009) Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends in biochemical sciences* 34: 40-8
- Duennwald ML (2011) Polyglutamine misfolding in yeast: toxic and protective aggregation. *Prion* 5: 285-90
- Durcan TM, Tang MY, Perusse JR, Dashti EA, Aguilera MA, McLelland GL, Gros P, Shaler TA, Faubert D, Coulombe B, Fon EA (2014) USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *The EMBO journal* 33: 2473-91
- Eichmann C, Preissler S, Riek R, Deuerling E (2010) Cotranslational structure acquisition of nascent polypeptides monitored by NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 9111-6
- Ellis RJ (2006) Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends in biochemical sciences* 31: 395-401
- Erjavec N, Larsson L, Grantham J, Nystrom T (2007) Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes & development* 21: 2410-21
- Escusa-Toret S, Vonk WI, Frydman J (2013) Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nature cell biology* 15: 1231-43
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et biophysica acta* 1592: 63-77

- Gambill BD, Voos W, Kang PJ, Miao B, Langer T, Craig EA, Pfanner N (1993) A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *The Journal of cell biology* 123: 109-17
- Gamerdinger M, Kaya AM, Wolfrum U, Clement AM, Behl C (2011) BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO reports* 12: 149-56
- Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES (1999) Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *The Journal of cell biology* 146: 1239-54
- Germaniuk A, Liberek K, Marszalek J (2002) A bichaperone (Hsp70-Hsp78) system restores mitochondrial DNA synthesis following thermal inactivation of Mip1p polymerase. *J Biol Chem* 277: 27801-8
- Glabe CG (2006) Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol Aging* 27: 570-5
- Gloge F, Becker AH, Kramer G, Bukau B (2014) Co-translational mechanisms of protein maturation. *Current opinion in structural biology* 24: 24-33
- Goloubinoff P, De Los Rios P (2007) The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends in biochemical sciences* 32: 372-80
- Grice GL, Nathan JA (2016) The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS
- Gruebele M (2005) Downhill protein folding: evolution meets physics. *C R Biol* 328: 701-12
- Guardia-Laguarta C, Area-Gomez E, Rub C, Liu Y, Magrane J, Becker D, Voos W, Schon EA, Przedborski S (2014) alpha-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *J Neurosci* 34: 249-59
- Halfmann R, Alberti S, Lindquist S (2010) Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity. *Trends in cell biology* 20: 125-33
- Hallberg EM, Shu Y, Hallberg RL (1993) Loss of mitochondrial hsp60 function: nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins. *Molecular and cellular biology* 13: 3050-7
- Hardie DG (2005) New roles for the LKB1-->AMPK pathway. *Current opinion in cell biology* 17: 167-73
- Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324-32
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-8
- Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J (2005) Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature structural & molecular biology* 12: 842-6
- Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP (2009) MAM: more than just a housekeeper. *Trends in cell biology* 19: 81-8
- Haynes CM, Petrova K, Benedetti C, Yang Y, Ron D (2007) ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell* 13: 467-80
- Haynes CM, Yang Y, Blais SP, Neubert TA, Ron D (2010) The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Molecular cell* 37: 529-40
- He S, Fox TD (1997) Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Molecular biology of the cell* 8: 1449-60
- Hell K, Herrmann J, Pratje E, Neupert W, Stuart RA (1997) Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett* 418: 367-70
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-6
- Herrmann JM, Stuart RA, Craig EA, Neupert W (1994) Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. *The Journal of cell biology* 127: 893-902
- Hoppins S, Lackner L, Nunnari J (2007) The machines that divide and fuse mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76: 751-80
- Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW (2007) Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annual review of cell and developmental biology* 23: 115-45
- Horwitz J (2003) Alpha-crystallin. *Exp Eye Res* 76: 145-53

- Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J (2005) Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *The Journal of cell biology* 170: 1021-7
- Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K (2006) Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO journal* 25: 2966-77
- James P, Pfund C, Craig EA (1997) Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. *Science* 275: 387-9
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *The Journal of cell biology* 143: 1883-98
- Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB (2005) AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell* 18: 283-93
- Kaganovich D, Kopito R, Frydman J (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454: 1088-95
- Kanfer G, Courtheoux T, Peterka M, Meier S, Soste M, Melnik A, Reis K, Aspenstrom P, Peter M, Picotti P, Kornmann B (2015) Mitotic redistribution of the mitochondrial network by Miro and Cenp-F. *Nature communications* 6: 8015
- Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA, Pfanner N (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348: 137-43
- Kanki T (2010) Nix, a receptor protein for mitophagy in mammals. *Autophagy* 6: 433-5
- Kanki T, Klionsky DJ (2010) The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Molecular microbiology* 75: 795-800
- Kelly, R.F. and Winkler, M.E. (1990). Folding of eukaryotic proteins produced in *Escherichia coli*. *Genetic Engineering*. 12:1-19.
- Kirstein J, Strahl H, Moliere N, Hamoen LW, Turgay K (2008) Localization of general and regulatory proteolysis in *Bacillus subtilis* cells. *Molecular microbiology* 70: 682-94
- Kityk R, Kopp J, Sinning I, Mayer MP (2012) Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Molecular cell* 48: 863-74
- Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in cell biology* 10: 524-30
- Kornmann B (2013) The molecular hug between the ER and the mitochondria. *Current opinion in cell biology* 25: 443-8
- Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, Bepperling A, Haslbeck M, Buchner J (2010) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J* 24: 3633-42
- Krobitsch S, Lindquist S (2000) Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 1589-94
- Krzewska J, Konopa G, Liberek K (2001) Importance of two ATP-binding sites for oligomerization, ATPase activity and chaperone function of mitochondrial Hsp78 protein. *Journal of molecular biology* 314: 901-10
- Krzewska J, Langer T, Liberek K (2001) Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in *Saccharomyces cerevisiae*, cooperates with Hsp70 in protein refolding. *FEBS Lett* 489: 92-6
- Kubelka J, Hofrichter J, Eaton WA (2004) The protein folding 'speed limit'. *Current opinion in structural biology* 14: 76-88
- Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D (2012) Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem* 287: 3265-72
- Laloraya S, Gambill BD, Craig EA (1994) A role for a eukaryotic GrpE-related protein, Mge1p, in protein translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 6481-5
- Laskowska E, Bohdanowicz J, Kuczynska-Wisnik D, Matuszewska E, Kedzierska S, Taylor A (2004) Aggregation of heat-shock-denatured, endogenous proteins and distribution of the IbpA/B and Fda marker-proteins in *Escherichia coli* WT and grpE280 cells. *Microbiology* 150: 247-59

- Leidhold C, von Janowsky B, Becker D, Bender T, Voos W (2006) Structure and function of Hsp78, the mitochondrial ClpB homolog. *Journal of structural biology* 156: 149-64
- Leonhardt SA, Fearson K, Danese PN, Mason TL (1993) HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Molecular and cellular biology* 13: 6304-13
- Lewandowska A, Gierszewska M, Marszalek J, Liberek K (2006) Hsp78 chaperone functions in restoration of mitochondrial network following heat stress. *Biochimica et biophysica acta* 1763: 141-51
- Lewrenz I, Rietzschel N, Guiard B, Lill R, van der Laan M, 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: 30931-43
- Lindner AB, Madden R, Demarez A, Stewart EJ, Taddei F (2008) Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 3076-81
- Liu Q, D'Silva P, Walter W, Marszalek J, Craig EA (2003) Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science* 300: 139-41
- Lopez T, Dalton K, Frydman J (2015) The Mechanism and Function of Group II Chaperonins. *Journal of molecular biology* 427: 2919-30
- Lu K, Psakhye I, Jentsch S (2014) A new class of ubiquitin-Atg8 receptors involved in selective autophagy and polyQ protein clearance. *Autophagy* 10: 2381-2
- Manivannan S, de Boer R, Veenhuis M, van der Klei IJ (2013) Luminal peroxisomal protein aggregates are removed by concerted fission and autophagy events. *Autophagy* 9: 1044-56
- Marchante R, Rowe M, Zenthon J, Howard MJ, Tuite MF (2013) Structural definition is important for the propagation of the yeast [PSI⁺] prion. *Molecular cell* 50: 675-85
- Martinus RD, Garth GP, Webster TL, Cartwright P, Naylor DJ, Hoj PB, Hoogenraad NJ (1996) Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *Eur J Biochem* 240: 98-103
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62: 670-84
- McDonough H, Patterson C (2003) CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* 8: 303-8
- McHaourab HS, Godar JA, Stewart PL (2009) Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry* 48: 3828-37
- Miller SB, Ho CT, Winkler J, Khokhrina M, Neuner A, Mohamed MY, Guilbride DL, Richter K, Lisby M, Schiebel E, Mogk A, Bukau B (2015a) Compartment-specific aggregases direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. *The EMBO journal* 34: 778-97
- Miller SB, Mogk A, Bukau B (2015b) Spatially organized aggregation of misfolded proteins as cellular stress defense strategy. *Journal of molecular biology* 427: 1564-74
- Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728-41
- Mogk A, Tomoyasu T, Goloubinoff P, Rudiger S, Roder D, Langen H, Bukau B (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *The EMBO journal* 18: 6934-49
- Moreno-Gonzalez I, Soto C (2011) Misfolded protein aggregates: mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Seminars in cell & developmental biology* 22: 482-7
- Morimoto RI (2011) The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76: 91-9
- Muller M, Lu K, Reichert AS (2015) Mitophagy and mitochondrial dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1853: 2766-74
- Nakayashiki T, Ebihara K, Bannai H, Nakamura Y (2001) Yeast [PSI⁺] "prions" that are cross-transmissible and susceptible beyond a species barrier through a quasi-prion state. *Molecular cell* 7: 1121-30
- Narendra DP, Youle RJ (2011) Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control. *Antioxid Redox Signal* 14: 1929-38

- Nargund AM, Fiorese CJ, Pellegrino MW, Deng P, Haynes CM (2015) Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Molecular cell* 58: 123-33
- Naujokat C, Hoffmann S (2002) Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 82: 965-80
- Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AO, Riekel C, Grothe R, Eisenberg D (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435: 773-8
- Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76: 723-49
- Opazo F, Krenz A, Heermann S, Schulz JB, Falkenburger BH (2008) Accumulation and clearance of alpha-synuclein aggregates demonstrated by time-lapse imaging. *J Neurochem* 106: 529-40
- Orr HT, Zoghbi HY (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annual review of neuroscience* 30: 575-621
- Osman C, Noriega TR, Okreglak V, Fung JC, Walter P (2015) Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: E947-56
- Otera H, Ishihara N, Mihara K (2013) New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochimica et biophysica acta* 1833: 1256-68
- Ott M, Amunts A, Brown A (2016) Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual review of biochemistry*
- Ouyang H, Ali YO, Ravichandran M, Dong A, Qiu W, MacKenzie F, Dhe-Paganon S, Arrowsmith CH, Zhai RG (2012) Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini. *J Biol Chem* 287: 2317-27
- Papsdorf K, Richter K (2014) Protein folding, misfolding and quality control: the role of molecular chaperones. *Essays Biochem* 56: 53-68
- Preissler S, Deuerling E (2012) Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. *Trends in biochemical sciences* 37: 274-83
- Quiros PM, Mottis A, Auwerx J (2016) Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 213-26
- Rampelt H, Kirstein-Miles J, Nillegoda NB, Chi K, Scholz SR, Morimoto RI, Bukau B (2012) Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation. *The EMBO journal* 31: 4221-35
- Raviol H, Sadlish H, Rodriguez F, Mayer MP, Bukau B (2006) Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *The EMBO journal* 25: 2510-8
- Richmond CS, Glasner JD, Mau R, Jin H, Blattner FR (1999) Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 27: 3821-35
- Richter K, Haslbeck M, Buchner J (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell* 40: 253-66
- Rokney A, Shagan M, Kessel M, Smith Y, Rosenshine I, Oppenheim AB (2009) *E. coli* transports aggregated proteins to the poles by a specific and energy-dependent process. *Journal of molecular biology* 392: 589-601
- Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-29
- Rottgers K, Zufall N, Guiard B, Voos W (2002) The ClpB homolog Hsp78 is required for the efficient degradation of proteins in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* 277: 45829-37
- Rudiger S, Buchberger A, Bukau B (1997) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* 4: 342-9
- Rujano MA, Bosveld F, Salomons FA, Dijk F, van Waarde MA, van der Want JJ, de Vos RA, Brunt ER, Sibon OC, Kampinga HH (2006) Polarised asymmetric inheritance of accumulated protein damage in higher eukaryotes. *PLoS biology* 4: e417
- Sabate R, de Groot NS, Ventura S (2010) Protein folding and aggregation in bacteria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67: 2695-715
- Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, Lindquist S (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in biochemical sciences* 21: 289-96
- Schulz AM, Haynes CM (2015) UPR(mt)-mediated cytoprotection and organismal aging. *Biochimica et biophysica acta* 1847: 1448-56

- Serio TR, Lindquist SL (2001) [PSI⁺], SUP35, and chaperones. *Advances in protein chemistry* 57: 335-66
- Seyffer F, Kummer E, Oguchi Y, Winkler J, Kumar M, Zahn R, Sourjik V, Bukau B, Mogk A (2012) Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA⁺ disaggregase at aggregate surfaces. *Nature structural & molecular biology* 19: 1347-55
- Soto C (2001) Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett* 498: 204-7
- Specht S, Miller SB, Mogk A, Bukau B (2011) Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 195: 617-29
- Spokoini R, Moldavski O, Nahmias Y, England JL, Schuldiner M, Kaganovich D (2012) Confinement to organelle-associated inclusion structures mediates asymmetric inheritance of aggregated protein in budding yeast. *Cell reports* 2: 738-47
- Sugiura A, McLelland GL, Fon EA, McBride HM (2014) A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *The EMBO journal* 33: 2142-56
- Tanaka M, Kim YM, Lee G, Junn E, Iwatsubo T, Mouradian MM (2004) Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem* 279: 4625-31
- Thibault G, Yudin J, Wong P, Tsitrin V, Sprangers R, Zhao R, Houry WA (2006) Specificity in substrate and cofactor recognition by the N-terminal domain of the chaperone ClpX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 17724-9
- Truscott KN, Voos W, Frazier AE, Lind M, Li Y, Geissler A, Dudek J, Muller H, Sickmann A, Meyer HE, Meisinger C, Guiard B, Rehling P, Pfanner N (2003) A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *The Journal of cell biology* 163: 707-13
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* 27: 433-46
- Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 777-88
- Vafai SB, Mootha VK (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491: 374-83
- van Dyck L, Neupert W, Langer T (1998) The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes & development* 12: 1515-24
- Ventura S, Villaverde A (2006) Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in biotechnology* 24: 179-85
- Vera A, Aris A, Carrio M, Gonzalez-Montalban N, Villaverde A (2005) Lon and ClpP proteases participate in the physiological disintegration of bacterial inclusion bodies. *Journal of biotechnology* 119: 163-71
- von Ahsen O, Voos W, Henninger H, Pfanner N (1995) The mitochondrial protein import machinery. Role of ATP in dissociation of the Hsp70.Mim44 complex. *J Biol Chem* 270: 29848-53
- von Heijne G (1986) Why mitochondria need a genome. *FEBS Lett* 198: 1-4
- von Janowsky B, Knapp K, Major T, Krayl M, Guiard B, Voos W (2005) Structural properties of substrate proteins determine their proteolysis by the mitochondrial AAA⁺ protease Pim1. *Biological Chemistry* 386: 1307-1317
- von Janowsky B, Major T, Knapp K, 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
- Voos W, Gambill BD, Laloraya S, Ang D, Craig EA, Pfanner N (1994) Mitochondrial GrpE is present in a complex with hsp70 and preproteins in transit across membranes. *Molecular and cellular biology* 14: 6627-34
- Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder , Lehrach H, Wanker EE (2001) Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Molecular biology of the cell* 12: 1393-407
- Wagner I, Arlt H, van Dyck L, Langer T, Neupert W (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *The EMBO journal* 13: 5135-45

- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274: 25945-52
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101: 1172-84
- Wang K, Klionsky DJ (2011) Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* 7: 297-300
- Wegrzyn RD, Deuerling E (2005) Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62: 2727-38
- Weibezahn J, Schlieker C, Tessarz P, Mogk A, Bukau B (2005) Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation. *Biological chemistry* 386: 739-44
- Weibezahn J, Tessarz P, Schlieker C, Zahn R, Maglica Z, Lee S, Zentgraf H, Weber-Ban EU, Dougan DA, Tsai FT, Mogk A, Bukau B (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* 119: 653-65
- Weisberg SJ, Lyakhovetsky R, Werdiger AC, Gitler AD, Soen Y, Kaganovich D (2012) Compartmentalization of superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) aggregates determines their toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 15811-6
- Westermann B (2011) Organelle dynamics: ER embraces mitochondria for fission. *Current biology : CB* 21: R922-4
- Westermann B, Prip-Buus C, Neupert W, Schwarz E (1995) The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *The EMBO journal* 14: 3452-60
- Wickner RB, Edskes HK, Kryndushkin D, McGlinchey R, Bateman D, Kelly A (2011) Prion diseases of yeast: amyloid structure and biology. *Seminars in cell & developmental biology* 22: 469-75
- Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schonfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* 424: 565-71
- Winkler J, Seybert A, Konig L, Pruggnaller S, Haselmann U, Sourjik V, Weiss M, Frangakis AS, Mogk A, Bukau B (2010) Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *The EMBO journal* 29: 910-23
- Winkler J, Tyedmers J, Bukau B, Mogk A (2012a) Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation. *Journal of structural biology* 179: 152-60
- Winkler J, Tyedmers J, Bukau B, Mogk A (2012b) Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation. *The Journal of cell biology* 198: 387-404
- Woerner AC, Frottin F, Hornburg D, Feng LR, Meissner F, Patra M, Tatzelt J, Mann M, Winklhofer KF, Hartl FU, Hipp MS (2016) Cytoplasmic protein aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA. *Science* 351: 173-6
- Wolf DH, Schafer A (2005) CPY* and the power of yeast genetics in the elucidation of quality control and associated protein degradation of the endoplasmic reticulum. *Curr Top Microbiol Immunol* 300: 41-56
- Xu Z, Horwich AL, Sigler PB (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* 388: 741-50
- Yang J, Hao X, Cao X, Liu B, Nystrom T (2016) Spatial sequestration and detoxification of Huntingtin by the ribosome quality control complex. *eLife* 5
- Yerbury JJ, Ooi L, Dillin A, Saunders DN, Hatters DM, Beart PM, Cashman NR, Wilson MR, Ecroyd H (2016) Walking the tightrope: proteostasis and neurodegenerative disease. *J Neurochem* 137: 489-505
- Yonashiro R, Tahara EB, Bengtson MH, Khokhrina M, Lorenz H, Chen KC, Kigoshi-Tansho Y, Savas JN, Yates JR, Kay SA, Craig EA, Mogk A, Bukau B, Joazeiro CA (2016) The Rqc2/Tae2 subunit of the ribosome-associated quality control (RQC) complex marks ribosome-stalled nascent polypeptide chains for aggregation. *eLife* 5
- Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 9-14
- Youle RJ, van der Bliek AM (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337: 1062-5

Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT, Hoogenraad NJ (2002) A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *The EMBO journal* 21: 4411-9

Zhou C, Slaughter BD, Unruh JR, Guo F, Yu Z, Mickey K, Narkar A, Ross RT, McClain M, Li R (2014) Organelle-based aggregation and retention of damaged proteins in asymmetrically dividing cells. *Cell* 159: 530-42

10. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang Voos für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die gute Betreuung meiner Doktorarbeit sowie die stete Diskussionsbereitschaft. Besonders möchte ich mich für sein tiefes Vertrauen und die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung meines Forschungsthemas bedanken. Stets hat er mich bei meinen Ideen unterstützt und mit Ratschlägen und konstruktiver Kritik gefördert. Die Zeit im Labor waren für mich lehrreiche und voranbringende Jahre.

Ein ganz herzlicher Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe und meinen Laborkollegen. Vorallem möchte ich dabei Dr. Giovanna Cenini danken für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen. Es war mir immer ein Vergnügen mit dir ins Detail zu gehen, laut zu denken und Experimente zu planen. Ausserdem warst du immer das Licht am Ende des Gangs (oder sollte ich Tunnel sagen), wenn die Abende mal wieder lang waren.

Witold Jaworek, Anne Wilkening und Cornelia Rüb möchte ich für eine tolle Zeit im Labor danken. Ohne euch wäre diese Zeit eine andere gewesen. Es war immer eine harmonische und freundschaftliche und dennoch sehr konstruktive Zeit. Oft vertieften wir uns in Diskussionen über wissenschaftliche sowie außerwissenschaftliche Themen. Zudem verbinde ich mehr mit euch als nur die Zeit im Labor. Unvergessen bleiben mir unsere gemeinsamen Doppelkopfabende im Quiet Man.

Ich danke ebenso unserer ehemaligen technischen Assistenten Ursula Gerken, die mir bei der Eingewöhnung und beim Zurechtfinden im Labor sehr geholfen hat und für Fragen immer ein offenes Ohr hatte. Zudem danke ich unserer technischen Assistentin Magarita Fuhrmann. Obwohl die gemeinsame Zeit sehr kurz war, war sie doch bereichernd.

Des weiteren danke ich meinen Studenten Patrick Günther, Nima Ahmadi, Christoph Brandscheid und Sabrina Yamoune für die tolle Unterstützung in den verschiedenen Projekten.

Prof. Dr. Elke Deuerling möchte ich für die Möglichkeit danken die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in ihrem Labor durchführen zu können. Sandra Fries möchte ich dabei für die freundliche Unterstützung und Hilfestellung danken.

Zudem danke ich den Gutachtern dieser Arbeit Prof. Dr. Wolfgang Voos, Prof. Dr. Waldemar Kolanus, Prof. Dr. Jörg Höfeld und Prof. Dr. Ulrich Schweizer.

Meinen lieben Eltern sowie meinem Bruder danke ich für die stete Unterstützung und den Glauben an mich. Der Weg bis hier her war lang und ihr ward immer an meiner Seite.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Anne Hanebuth bedanken. Deine Liebe und Unterstützung war für mich in vielen Situation von äußerster Wichtigkeit. Deine beruhigenden Worte haben mich immer wieder aufgebaut und mich erneut angetrieben.