

Systematische Quantifizierung des mitochondrialen Imports von Präproteinen unter proteotoxischen Bedingungen

Dissertation

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

vorgelegt von

Daniel Puchta-Schomberg

aus

Celle

Bonn (Februar, 2026)

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

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Voos

Gutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der Promotion: 07.07.2026

Erscheinungsjahr: 2026

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	7
1.1	Zusammenfassung	7
1.2	Abstract.....	8
2	EINLEITUNG	10
2.1	Mitochondrien	10
2.2	Mitochondriale Biogenese in die Matrix	10
2.2.1	Mitochondriale Präproteine der Matrix	10
2.2.2	Mitochondrialer Import in die Matrix	11
2.2.3	Membranpotential und Endoxidation	14
2.3	Detektionsmethoden des mitochondrialen Imports	16
2.3.1	Radioaktiver Import und Antikörperdetektion.....	16
2.3.2	Markierung von rekombinanten Präproteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	17
2.3.3	Thiol-Maleimid Reaktion	18
2.3.4	Mitochondriale Importkinetik	19
2.4	Beeinflussung des mitochondrialen Imports	20
2.4.1	Einfluss von ROS auf den mitochondrialen Import	21
2.4.2	Einfluss von Aggregaten auf den mitochondrialen Import.....	21
2.4.3	Einfluss der Temperatur auf den mitochondrialen Import	23
2.4.4	Einfluss von Zytosol und molekularen Chaperonen auf den mitochondrialen Import	24
3	ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN DIESER DOKTORARBEIT	25
4	MATERIAL UND METHODEN.....	26
4.1	Material.....	26
4.1.1	Laborgeräte	26
4.1.2	Chemikalien.....	27
4.1.3	Puffer und Lösungen	28
4.1.4	Zellkulturmedien, Reagenzien und Kits	30
4.1.5	Software	30
4.1.6	Primäre Antikörper (<i>Homo sapiens</i>)	31
4.1.7	Primäre Antikörper (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	32
4.1.8	Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper	32
4.1.9	Zelllinien.....	33
4.1.10	Hefezelllinien.....	33
4.1.11	Peptide	33
4.1.12	Plasmide / Primer	34
4.2	Methoden	34
4.2.1	Expression von SDCSH	34

4.2.2	Lyse und Aufreinigung vom Präprotein SDCSH.....	35
4.2.3	Dialyse/Rückfaltung des Präproteins SDCSH.....	35
4.2.4	Fluoreszenzmarkierung mit Fluorescein-5-Maleimid.....	36
4.2.5	Konzentrationsbestimmung des fluoreszenzmarkierten SDCSH	36
4.2.6	Mitochondrienpräparation von Säugetierzelllinien	36
4.2.7	Mitochondrienpräparation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
4.2.8	Proteinbestimmung nach Bradford	38
4.2.9	Spottest.....	39
4.2.10	Membranpotentialmessung via TMRE	40
4.2.11	Überhang-PCR	40
4.2.12	Radioaktive gekoppelte Translation	41
4.2.13	Durchflusszytometrie von Mitochondrien.....	42
4.2.14	Durchflusszytometrie von Zellen	42
4.2.15	Zelllyse.....	43
4.2.16	SDS-PAGE	43
4.2.17	Western Blot.....	44
4.2.18	Test der mitochondrialen Integrität	45
4.2.19	Lösen der Dimer A β und α -syn(61-95) Aggregaten	46
4.2.20	Lösen der A β 40 und A β 42-Peptide	46
4.2.21	Import in isolierten Mitochondrien aus Säugetierzelllinien	46
4.2.22	Import in isolierten Mitochondrien aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
4.2.23	Quantifizierung der m-Banden Intensität	47
4.2.24	Auswertung der Importgeschwindigkeit	48
4.2.25	Hitzestressexperimente	49
4.2.26	ROS-Behandlung von isolierten Mitochondrien (HeLa Mitochondrien).....	50
4.2.27	Zytosol-Isolierung.....	50
4.2.28	Ganzzellimport	51
4.2.29	Filterretardierungstest	51
5	ERGEBNISSE.....	52
5.1	Charakterisierung und Etablierung des fluoreszierenden rekombinanten Präproteins SDCSH für den <i>in organello</i> Import	52
5.1.1	Herstellung, Rückfaltung und Labelingoptimierung von SDCSH	52
5.1.2	Etablierung des <i>in organello</i> Imports mit fluoreszenzmarkiertem SDCSH in isolierten HeLa- und YPH499-Mitochondrien	59
5.1.3	Importkinetik Bestimmung von Hefe-Mitochondrien.....	63
5.2	Einfluss der Temperatur auf die mitochondrialen Importgeschwindigkeit.....	66
5.2.1	Einfluss der Temperatur auf den Import in isolierten HeLa-Mitochondrien.....	66
5.2.2	Bestimmung der maximalen Importgeschwindigkeit von isolierten HeLa-Mitochondrien in Abhängigkeit der Temperatur	70

5.2.3	Bestimmung der Importgeschwindigkeit von HEK293- und SH-SY5Y-Mitochondrien im Vergleich zu HeLa bei 37 °C	74
5.2.4	Einfluss der Temperatur auf den Import von isolierten Hefemitochondrien	78
5.2.5	Bestimmung der Importgeschwindigkeit von isolierten Hefemitochondrien in Abhängigkeit von der Temperatur	81
5.3	Einfluss von ROS-Stress auf die mitochondriale Importgeschwindigkeit	83
5.3.1	Einfluss von H ₂ O ₂ auf den Import in isolierten HeLa-Mitochondrien.....	83
5.3.2	Charakterisierung der isolierten Hefemitochondrien BY4741 und <i>sod2Δ</i>	86
5.3.3	Bestimmung der maximalen Importgeschwindigkeit der isolierten Hefemitochondrien BY4741 und <i>sod2Δ</i>	88
5.4	Einfluss vom isolierten Zytosol und molekularer Verdrängung auf den mitochondrialen Import	90
5.4.1	Einfluss von isoliertem Zytosol auf den mitochondrialen Import	90
5.5	Einfluss von Aggregaten auf den mitochondrialen Import.....	95
5.5.1	Einfluss von DiAβ auf den Import in isolierten HeLa-Mitochondrien.....	95
5.5.2	Charakterisierung des Einflusses von DiAβ auf HeLa-Zellen	98
5.5.3	Einfluss von Aβ ₄₀ /Aβ ₄₂ auf den mitochondrialen Import.....	101
5.5.4	Einfluss von Zytosol auf Aβ-Peptiden im Kontext von Importexperimenten.....	105
5.5.5	Einfluss von α-syn(61-95) auf den Import in isolierten HEK293-Mitochondrien	109
6	DISKUSSION	113
6.1	Detektion des Imports durch Fluoreszenzmarkierung.....	113
6.2	Bestimmung der mitochondrialen Importgeschwindigkeit	115
6.3	Einfluss von ROS und höheren Temperaturen führen zu verlangsamtem Import	122
6.3.1	ROS-Stress beeinflusst den mitochondrialen Import	123
6.4	Amyloide Aggregate führen zu Importhemmung und schädigen Mitochondrien nicht	125
6.4.1	Isoliertes Zytosol verlangsamt den Import und hebt Importhemmung durch amyloide Aggregate nicht auf.....	127
6.4.2	α-syn(61-95) inhibiert den mitochondrialen Import nicht.....	128
7	AUSBLICK	129
8	ABKÜRZUNGEN	130
9	ABBILDUNGSLISTE.....	131
10	TABELLENLISTE	135
11	DANKSAGUNG	136
12	ANHANG	137
13	LITERATURVERZEICHNIS.....	138

1 Zusammenfassung / Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die Analyse von Mitochondrien ist ein wichtiger Indikator für den Gesundheitszustand einer Zelle und es wurde in den letzten Jahren immer deutlicher, dass die Untersuchung der Mitochondrien in vielen Krankheiten immer mehr Relevanz erhält. Ein Indikator für funktionierende Mitochondrien ist der mitochondriale Import und die damit verbundene Importkinetik. Es war bisher nicht möglich, exakte Messungen der Importgeschwindigkeit mithilfe von Präproteinen durchzuführen, da die Methodiken wie radioaktiver Import oder Antikörperdetektion technisch viele Nachteile aufweisen. Fluoreszenzmarkierte Präproteine wie Su9-DHFR-Cys-Strep-His (SDCSH) hingegen können dabei helfen, die Importgeschwindigkeit *in vitro* zu messen. In dieser Doktorarbeit wurden der Import mit SDCSH, sowie die Expression, Rückfaltung, Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff und Auswertung der Importdaten etabliert und bei Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und verschiedenen Säugetierzelllinien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Import in Mitochondrien der Bäckerhefe viel schneller abläuft, als es bei den Mitochondrien aus den Säugetierzelllinien der Fall ist. Der Import bei Mitochondrien aus HeLa besitzt ein Temperaturoptimum bei 37 °C, während für Hefe 25 °C die optimale Temperatur waren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Import durch Erhöhung der Temperatur eine Temperaturabhängigkeit aufweist. Der Einfluss von oxidativem Stress (Reaktive Sauerstoffspezies) zeigte bei HeLa-Mitochondrien eine Reduzierung des Imports mit gleichzeitiger Depolarisation des Membranpotentials. Im Zuge von ROS-Experimenten mit der Hefe-Mutante *sod2Δ* im Vergleich zum Wildtyp wurde der Import mithilfe von SDCSH analysiert und es konnte kein Unterschied in der Importkinetik aufgezeigt werden. In weiteren Experimenten wurden amyloide Aggregate (DiAβ, Aβ40, Aβ42), sowie das hydrophobe Proteinsegment von α-Synucleins mit den Aminosäuren 61 bis 95 eingesetzt, um den Effekt der Aggregate, welche in dem Kontext der neurodegenerativen Krankheiten Alzheimer und Parkinson auftreten, auf den mitochondrialen Import zu analysieren. Das Beta-Amyloid DiAβ, welches aus zwei Aβ40 besteht, zeigte eindeutig eine Hemmung des Imports. Die amyloiden Monomere von Aβ40 und

A β 42 zeigten auch eine Hemmung des Imports, wobei diese aber schwächer ausfiel als bei DiA β . Die Experimente mit α -Synuclein (61-95) zeigten keinen Effekt auf den Import, sowie auf Membranpotential oder mitochondriale Integrität. Außerdem wurde der Effekt von isoliertem Zytosol und sich darin befindenden Chaperonen auf den mitochondrialen Import getestet, welcher zu einer ATP-abhängigen Hemmung des Imports und zur Reduzierung des Imports führte. Zytosol konnte bei Zugabe zu amyloiden Aggregaten den Import nicht wiederherstellen, was in einem noch langsameren Import resultierte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Messung der Importkinetik unter Verwendung eines rekombinanten fluoreszenzmarkierten Präproteins etabliert werden konnte und eine Analyse des Einflusses verschiedener Bedingungen auf den mitochondrialen Import *in vitro* überprüft wurde.

1.2 Abstract

The analysis of mitochondria is an essential indicator of cellular health. It has become increasingly clear in recent years that the examination of mitochondria is becoming more relevant in research of many diseases. An indicator of functioning mitochondria is mitochondrial import and the associated import kinetics. Until now, it has not been possible to perform accurate measurements of import rates with mitochondrial preproteins, as methods such as radioactive or antibody detection had many technical drawbacks. Fluorescence-labeled preproteins such as Su9-DHFR-Cys-Strep-His (SDCSH) can help to measure the import rate *in vitro*. In this PhD thesis, fluorescence import, expression, refolding, labeling, and analysis of import data were established and performed in mitochondria of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and different mammalian cell lines. The import into the mitochondria of baker's yeast takes place much faster than in the case with mitochondria from mammalian cell lines. The protein imports into mitochondria from HeLa best took place at 37 °C, while for yeast it was best at 25 °C. This thesis demonstrated that imports exhibit temperature dependency due to an increase in temperatures. Similarly, the use of ROS (reactive oxygen species) stress in HeLa mitochondria showed a reduction of the mitochondrial import with simultaneous depolarization of the membrane potential. ROS-experiments with the yeast mitochondria from the

sod2Δ mutant and wild type were analyzed using SDCSH and did not show any difference in the context of mitochondrial import rates. In further experiments, amyloid aggregates (DiA β , A β 40, A β 42) and the hydrophobic protein segment of α -synuclein with amino acids 61 to 95 were used to analyze the effect of the aggregates, which occur in the context of neurodegenerative diseases like Alzheimer's and Parkinson's, on mitochondrial import. The beta-amyloid DiA β , which consists of two A β 40, clearly showed an inhibition of import. The amyloid monomers of A β 40 and A β 42 also showed inhibition of import, although this was weaker than with DiA β . The experiments with α -synuclein(61-95) showed no effect on import, membrane potential, or mitochondrial integrity. Additionally, the effect of isolated cytosol and its chaperone on mitochondrial import was tested, which led to an ATP-dependent inhibition of import and a reduction in import. The addition of isolated cytosol to amyloid aggregates could not restore import efficiency and demonstrated an even weaker import than before.

In summary, the measurement of import kinetics using a recombinant fluorescently labeled preprotein could be established and an analysis of the influence of different conditions on mitochondrial import *in vitro* was verified.

2 Einleitung

2.1 Mitochondrien

Mitochondrien fungieren als Kraftwerke der Zelle, da sie zur Energiegewinnung beitragen und wichtiger Bestandteil vieler Stoffwechselwege, wie dem Citratzyklus, sind. Außerdem haben sie zusammen mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) die Aufgabe der Calciumspeicherung (Rizzuto et al. 1992). Nach der Endosymbiontentheorie sind Mitochondrien veränderte Einzeller, welche sich im Laufe der Evolution durch Integration in einer Zelle umgeformt haben, um der Zelle Energie, vorwiegend in Form von ATP, zur Verfügung zu stellen (Martin et al. 2015). Mitochondrien besitzen ihr eigenes Genom, welches hauptsächlich für die Expression der Atmungskettenkomplexe I-V codiert (Jokinen und Battersby 2013). Diese 13 Proteine stellen aber nur ca. 1 % des ganzen mitochondrialen Proteoms dar, welches mehr als 1000 Proteine aufweist (Morgenstern et al. 2021). Die Gene für alle anderen mitochondrialen Proteine, sogenannte Präproteine, befinden sich im regulären Genom und werden im Zellkern zu mRNA transkribiert und anschließend durch Ribosomen im Zytosol translatiert. Die Präproteine werden anschließend in die Mitochondrien importiert (Morgenstern et al. 2017; Morgenstern et al. 2021).

2.2 Mitochondriale Biogenese in die Matrix

2.2.1 Mitochondriale Präproteine der Matrix

Mitochondriale Präproteine besitzen eine Zielsequenz am N-terminalen Ende (**Abbildung 1**), was ihnen ermöglicht, an den Tom20-Rezeptor zu binden, um so in die mitochondriale Matrix aufgenommen werden zu können. Die Länge der Präsequenz, ihr amphipathischer Charakter (**Abbildung 1**) und der Faltungszustand des Präproteins bestimmen die Effizienz der Bindung, sowie des Imports in die Mitochondrien (Roise et al. 1988). Die Präsequenz besteht aus positiv geladenen Aminosäuren und hydrophoben Aminosäuren, sodass die Präsequenz eine positive Nettoladung besitzt. Bei zu kurzer Aminosäuresequenz eines Präproteins kann es zu verlangsamtem Import kommen, da keine vollständige Interaktion mit dem Importmotor HspA9 stattfinden kann (Lim et al. 2001). Die charakteristische Aminosäureabfolge der

mitochondrialen Präsequenz, welche reich an Arginin, Serin und Alanin ist, ermöglicht eine zielgenaue Detektion der Prozessierungsschnittstelle der Metalloendopeptidase Mitochondrial Processing Peptidase (MPP) durch Vorhersageprogramme wie Target P oder MitoFates (Emanuelsson und Heijne 2001; Koutnikova et al. 1998). Der amphipathische Charakter der Präsequenz kann elektrostatische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen auslösen und so zur Koaggregation führen (Liu et al. 2023). Die Aggregation von Präproteinen im Zytosol kann die Importgeschwindigkeit negativ beeinflussen (Boos et al. 2019). Eine Ansammlung von nicht importierten Präproteinen kann dafür sorgen, dass das Zellwachstum negativ beeinflusst wird (Nowicka et al. 2021). Nicht importierte Präproteine werden über das Proteasom abgebaut (Mohanraj et al. 2019).

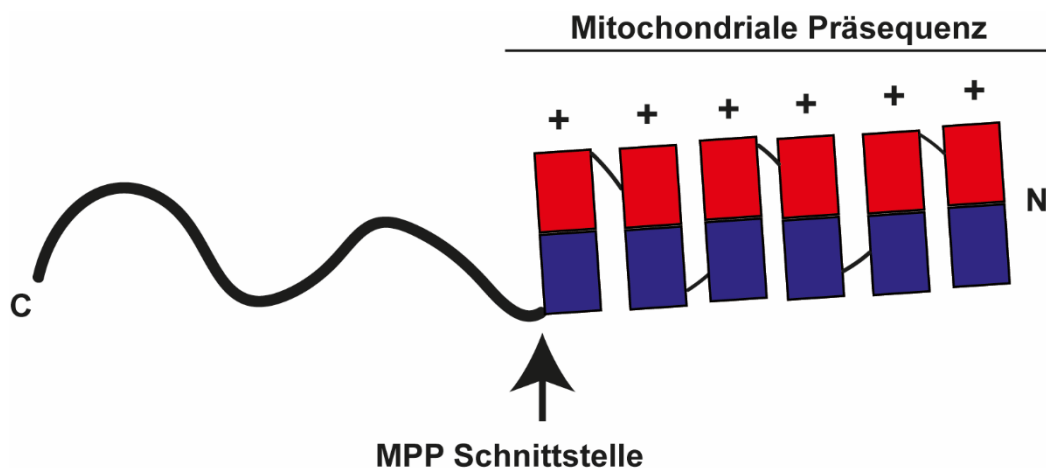


Abbildung 1: Vereinfachte allgemeine Struktur von mitochondrialen Präproteinen der mitochondrialen Matrix. Der Pfeil steht für die Prozessierungsschnittstelle der MPP am N-terminalen Ende des Präproteins. C steht für das C-terminale Ende des Präproteins. Rotmarkierte Balken stellen die positiv geladenen Aminosäuren und blaumarkierte Balken die hydrophoben Aminosäuren der Präsequenz dar.

2.2.2 Mitochondrialer Import in die Matrix

Mitochondrien bestehen aus einer Doppelmembran und der mitochondrialen Matrix. In der Außenmembran befindet sich der TOM-Komplex (Translocase of the Outer Membrane), welcher sich aus Präsequenzrezeptoren und dem Importkanal Tom40 zusammensetzt (**Abbildung 2**) (Ahting et al. 2001). Das Präprotein wird durch die Bindung der mitochondrialen Präsequenz an die Rezeptoren

Tom70, Tom20 und Tom22 an die Mitochondrien lokalisiert und weiter in den Tom40-Kanal geleitet (Backes et al. 2018). Die Präsequenz dient als Zielsequenz, welche die Lokalisation an die Mitochondrien ermöglicht (Saitoh et al. 2007). Präsequenzen zeichnen sich durch den amphipathischen Charakter aus (**Abbildung 1**), welcher die Bindung durch die positive Außenladung an den Tom20-Rezeptor ermöglicht (Roise et al. 1988). Nach dem Durchschreiten des Tom40-Kanals wird das Präprotein durch eine Überleitung über Tim50 (Translo-case of the Inner Membrane), welches als Rezeptor in dem Intermembranraum fungiert, zum Tim23-Komplex weitergeleitet (**Abbildung 2**) (Gomkale et al. 2021). Tim23 besitzt ein hydrophiles N-terminales Segment, welches die Bindung der Präsequenz ermöglicht (Im Sim et al. 2023). Die Insertion in den Tim23-Komplex findet nur bei funktionsfähigem Membranpotential statt (**Abbildung 2, Abbildung 3**) (Geissler et al. 2000). Bevor das Präprotein in die Matrix gelangen kann, wird es über die Weiterleitung von Tim44 und durch den Importmotor HspA9 (Mensch: mtHsp70, Mortalin, GRP-75; Hefe: Ssc1) unter ATP-Verbrauch in die Matrix gezogen (**Abbildung 2**) (Lim et al. 2001; Ungermann et al. 1994). Wenn das Präprotein im letzten Schritt in die mitochondriale Matrix gelangt, wird die Präsequenz durch die Metalloendopeptidase MPP prozessiert und durch mitochondriale Chaperonproteine wie Hsp60 zusammen mit Hsp10 zurückgefaltet (Joshi et al. 2016; Koutnikova et al. 1998; Witte et al. 1988; Haucke et al. 1995; Cheng et al. 1989; Höhfeld und Hartl 1994). In der mitochondrialen Innenmembran kann es ebenfalls zu einer Prozessierung durch die IMP (Inner Membrane Processing Peptidase) kommen (Ieva et al. 2013). Neben dem Import in die mitochondriale Matrix gibt es auch weitere Importwege in die Außenmembran, Innenmembran und den Intermembranraum der Mitochondrien (Meisinger et al. 2007). Für diese Doktorarbeit wird aber der Fokus rein auf den mitochondrialen Import in die Matrix gelegt.

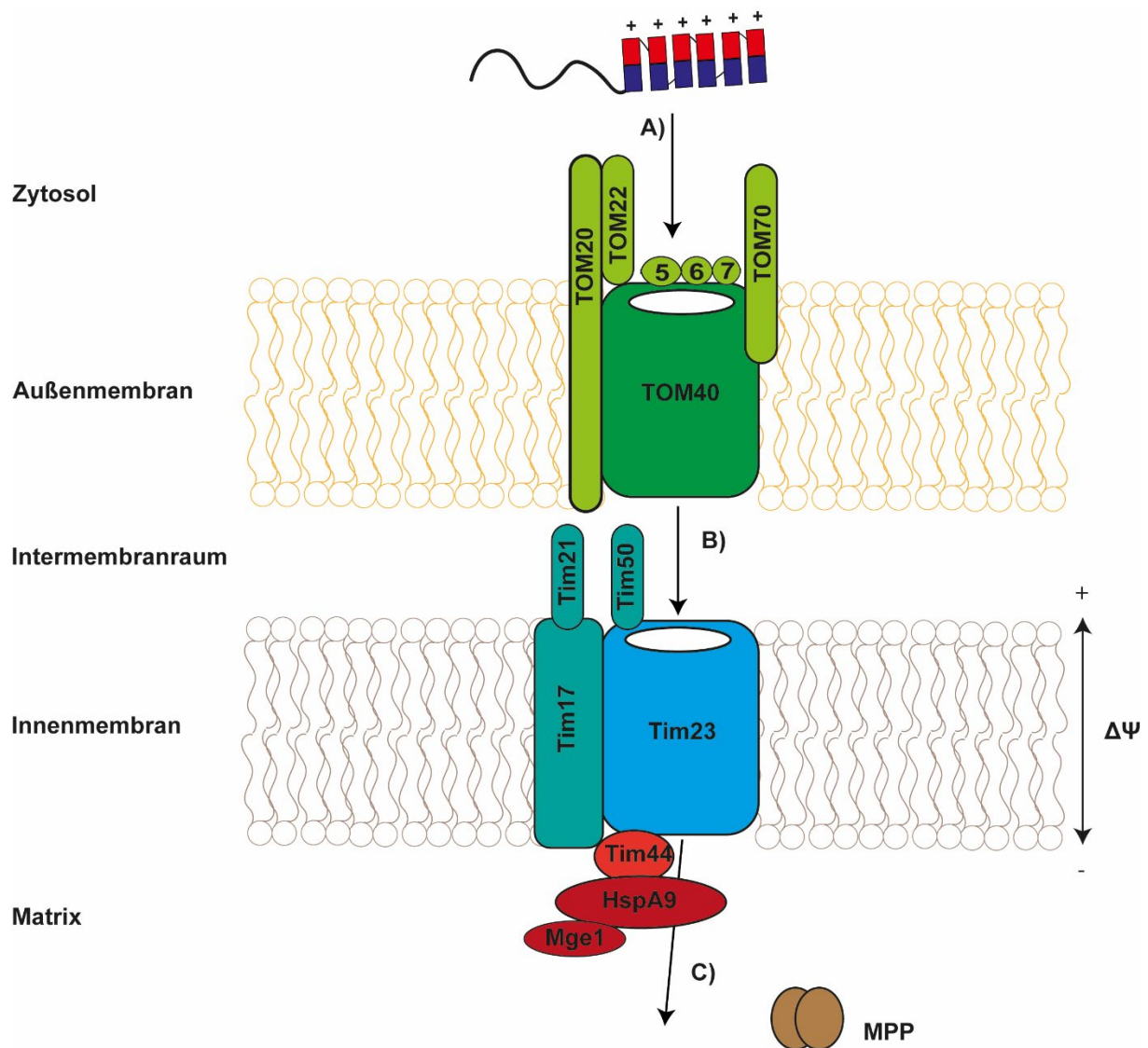


Abbildung 2: Mitochondrialer Import in die Matrix. A) Mitochondriale Präproteine werden durch die Bindung der mitochondrialen Präsequenz durch Rezeptoren (Tom20) erkannt und durch den Tom40-Kanal transportiert. B) Bei intaktem Membranpotential kann das Präprotein über Tim50 an den Tim23-Kanal binden und unter ATP-Verbrauch durch den Import Motor HspA9 in die mitochondriale Matrix gezogen werden. C) Dort wird die mitochondriale Präsequenz durch MPP prozessiert und das Matrixprotein kann nun durch mitochondriale Chaperone stabilisiert und gefaltet werden, um die Aufgabe innerhalb der Mitochondrien zu erfüllen.

2.2.3 Membranpotential und Endoxidation

Damit der Import in die Matrix stattfinden kann, muss an der mitochondrialen Innenmembran ein sogenanntes Membranpotential vorliegen. Das Membranpotential ($\Delta\Psi$) entsteht durch die Elektronentransportkette und die Protonenpumpen in den Atmungskettenkomplexen (I, III, IV, V) (**Abbildung 3**), welche sich in der mitochondrialen Innenmembran und im Intermembranraum befinden.

Elektronen werden über den Komplex I (NADH-Dehydrogenase) durch die Reaktion von NADH zu NAD^+ eingespeist, wodurch Elektronen auf Ubichinon übertragen werden (Weiss et al. 1991). Der Komplex II oxidiert (Succinat-Dehydrogenase) Succinat zu Fumarat, welches ebenfalls die Elektronen auf Ubichinon überträgt, wodurch Ubichinon zu Ubichinol (QH_2) reduziert wird (Grimm 2013). Ubichinol wird im nächsten Schritt durch Komplex III (Cytochrom c-Reduktase) oxidiert und die Elektronen werden auf Cytochrom c übertragen. Cytochrom c transportiert die Elektronen zu Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) und hier dient Sauerstoff als Endelektronenakzeptor und wird zu Wasser (H_2O) reduziert (Dennerlein et al. 2023). Durch die Redoxreaktionen und die Bildung von Wasser werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Der Elektronenfluss führt dazu, dass Protonen sich vermehrt in dem Intermembranraum sammeln, und der Komplex V (ATP-Synthase) begünstigt den Protonenfluss unter Bildung von ADP zu ATP zurück in die Matrix (Jia et al. 2007) (**Abbildung 3**). Diese Bewegung von Protonen von Matrix zum Intermembranraum erzeugt einen pH-Unterschied (pH). Durch die Konzentrationsunterschiede der Anionen und Kationen zwischen Matrix und Intermembranraum entsteht eine Spannung, welche als Membranpotential ($\Delta\Psi$) bezeichnet wird. Die Protonenkonzentration (pH) zusammen mit dem mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi$) bilden die protonenmotorische Kraft (Δp). Die Elektronentransportkette lässt sich durch verschiedene Hemmstoffe inhibieren (**Abbildung 3**), was zu einer Reduzierung des Membranpotentials führt (Rieske et al. 1967; Li et al. 2003).

Elektronen können vorzeitig von Elektronenträgern der Atmungskette an Sauerstoff abgegeben werden. Die Aufnahme eines Elektrons an Sauerstoff kann zu der Bildung des Superoxidradikal-Anions ($\text{O}_2^{\bullet-}$) führen. Dieses Sauerstoffradikal wird als reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen

species) bezeichnet (Vinogradov und Grivennikova 2005). Der Verlust zweier Elektronen an ein Sauerstoffmolekül führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid (Boveris und Chance 1973). Dieses ist membranpermeabel und reagiert mit Metallionen mittels einer Fenton-Reaktion, welche zu dem sogenannten Hydroxyl-Radikal führt. Hydroxyl-Radikale sind wie das Superoxidradikal-Anion sehr reaktiv und können zu Schäden bei Proteinen und DNA führen (Singh et al. 2019).

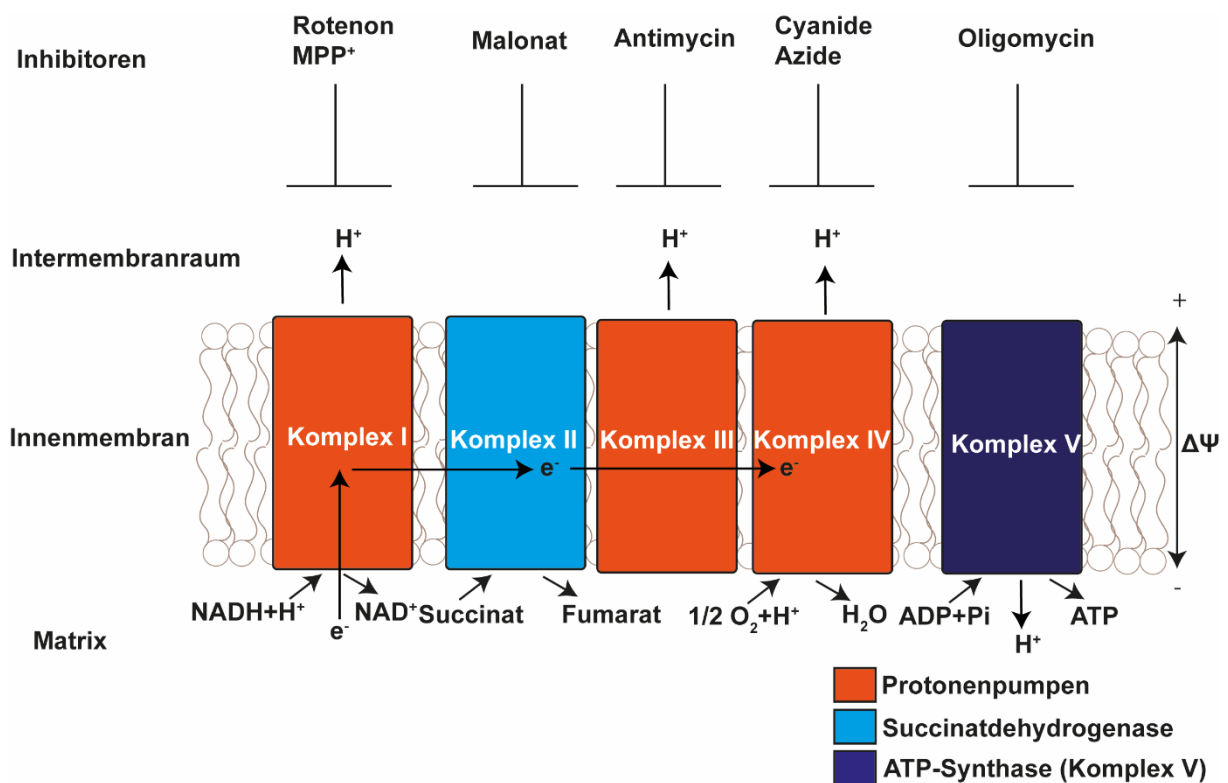


Abbildung 3: Membranpotential und Atmungskette der Mitochondrien. Elektronen werden über Komplex I (NADH-Dehydrogenase) in die Atmungskette eingespeist. Durch die weiteren Komplexe werden die Elektronen weiter transportiert und dadurch wird ihr Energieniveau bei jedem Schritt verringert. Die Energie wird für die Protonenpumpen verwendet, H^+ in den Intermembranraum zu transportieren. Bei Komplex IV dient Sauerstoff als Endelektronenakzeptor und wird mit 2 H^+ zu Wasser reduziert. Die ATP-Synthase nutzt die Anreicherung der Protonen im Intermembranraum und pumpt sie zurück in die Matrix und bringt dadurch die nötige Energie auf, um ADP + P_i zu ATP reagieren zu lassen. Durch die Protonenpumpen entsteht eine Umverteilung der Protonen und dadurch bildet sich das Membranpotential zwischen Intermembranraum und Matrix der Mitochondrien. Es gibt verschiedene Inhibitoren, welche die Atmungskettenkomplexe, sowie die ATP-Synthase hemmen und somit das Membranpotential beeinflussen können.

2.3 Detektionsmethoden des mitochondrialen Imports

Mitochondriale Proteinbiogenese wurde im Kontext von radioaktiv pulse-chase Experimenten in intakten Zellen von *Neurospora crassa* das erste Mal nachgewiesen (Hallermayer et al. 1977). In den darauffolgenden Jahren wurden neben der radioaktiven Detektion von Importexperimenten auch die Detektion durch Antikörper (Western Blot) sowie die Fluoreszenzmarkierung von Präproteinen etabliert.

2.3.1 Radioaktiver Import und Antikörperdetektion

Mit der Etablierung von Mitochondrienisolation aus Hefe oder *Neurospora crassa* und *in vitro*-Translation von radioaktiven Präproteinen konnten Importstudien durchgeführt werden. Mithilfe von radioaktivem Methionin, bei dem das Schwefelatom aus einem radioaktiven [³⁵S]-Isotop besteht, können Präproteine radioaktiv markiert werden. Radioaktive Importexperimente ermöglichten erste Einblicke in den mitochondrialen Import (Pfanner et al. 1987). Ein Vorteil dieser Technik ist die effektive Produktion von radioaktiven Präproteinen und die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Ahn et al. 2006; Ramezani et al. 2023). Ein Nachteil dieser Methode ist die benötigte Zeit der Experimente bis zum Ergebnis und, dass die Ergebnisse nur qualitative Einblicke in die Importkinetik geben können. Relative Quantifizierungen können mithilfe von radioaktiven Präproteinen durchgeführt werden, aber keine absolute Bestimmung der tatsächlich importierten Menge an prozessiertem Präprotein.

Importexperimente können außerdem mit rekombinanten Präproteinen durchgeführt werden und die Detektion kann über Antikörper via Western Blot erfolgen. Proteine wie, murine DHFR (Dihydrofolatreduktase) wurden in vielen synthetischen Präproteinen verwendet, um *in vitro* den mitochondrialen Import wie auch die Faltung zu analysieren (Gaume et al. 1998). Proteine wie DHFR kommen natürlich nicht in Mitochondrien vor, sodass sie sich eignen, in synthetischen Präproteinen mithilfe von Antikörpern für die Importdetektion verwendet zu werden. Da DHFR reversibel durch den Folsäureantagonisten Methotrexat gehemmt wird, welches nur an die gefaltete DHFR-Domäne binden und so den Import hemmen kann (Krayl et al. 2007), konnte die Anzahl an TOM40-Tim23-Importkomplexen in Hefe durch Blue-Native-PAGE mithilfe von

Antikörperdetektion festgestellt werden (Dekker et al. 1998). Antikörperdetektion kann exakte Mengen an Präprotein detektieren, wobei sich die Sensitivität der Bindung der Antikörper an das Protein über die Häufigkeit der Benutzung der Antikörperlösung verändern kann (Baker 2015).

2.3.2 Markierung von rekombinanten Präproteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Eine weitere Möglichkeit, Proteine quantitativ analysierbar zu machen, stellt die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen dar.

Eine Variante ist die SNAP-Domäne, welche ein Derivat der O⁶-alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT) aus Säugetierzellen (hAGT) ist. AGT repariert das O⁶-Alkylguanin durch Dealkylierung zu Guanin und sorgt so für die DNA-Stabilität in der Zelle (Fang et al. 2005). Bei dieser irreversiblen Reaktion wird das Cystein im aktiven Zentrum alkyliert, wodurch das Protein inaktiv wird (**Abbildung 4**) (Keppler et al. 2003). Die Substratspezifität der hAGT ist nicht sehr hoch, da es auch die O⁶-Nucleobase Benzylguanin (BG) enzymatisch dealkylieren kann. Die SNAP-Domäne kann dadurch mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten BG reagieren. Resultierende kovalente Bindung ermöglicht eine stabile Fluoreszenzmarkierung von Proteinen *in vitro* und *in vivo* (Keppler et al. 2004; Keppler et al. 2003).

Bei der Markierung der SNAP-Domäne mit einem Fluoreszenzfarbstoff sollte auf komplexbildende Chemikalien wie EDTA verzichtet werden, da das Zinkion (Zn²⁺) essenziell für das Labeln des hAGTs (SNAP) ist (Keppler et al. 2004). Anhand des Fusionsproteins β -Gal-SNAP konnte gezeigt werden, dass dieses Protein im Zytosol lokalisiert ist und die SNAP-Domäne nicht dafür sorgt, dass Fusionsproteine im Zellkern verweilen (Regoes und Hehl 2005). Somit sind Funktionsanalysen von Proteinen *in vivo* auch in anderen Zellkompartimenten möglich.

Das mitochondriale Präprotein b2(167)-DHFR-SNAP konnte *in vitro* für Importversuche in Hefe verwendet werden. Wodurch sich zeigte, dass fluoreszenzmarkierte Präproteine die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung von mitochondrialem Import ermöglichen und im Vergleich zu Antikörperdetektion ein genaueres Ergebnis liefern. Die Markierung des

Präproteins mit Fluoreszenzfarbstoff konnte auch nach dem Import durchgeführt werden und so nachträglich quantifiziert werden (Becker et al. 2008).

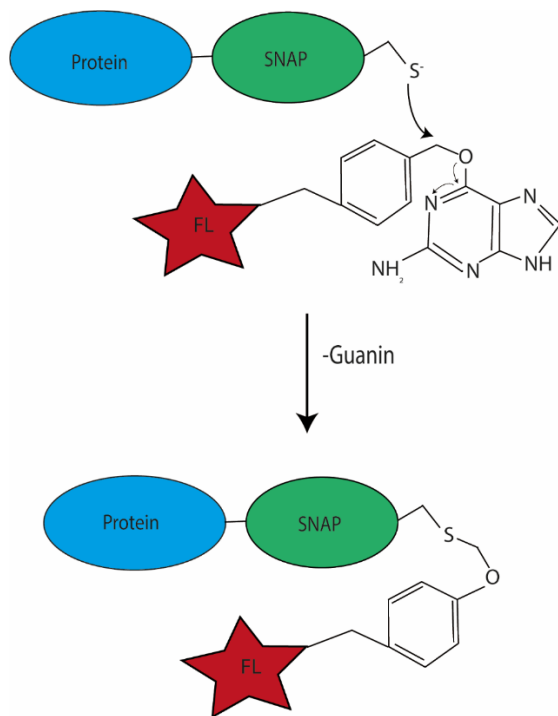


Abbildung 4: Mechanismus der SNAP-Markierungstechnik. Das Aktive Zentrum der SNAP-Domäne alkyliert das Benzylguanin-Fluorescein und führt zu einer kovalenten Bindung mit dem Fluorescein. Dadurch können Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

2.3.3 Thiol-Maleimid Reaktion

Eine weitere Möglichkeit, Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, stellt die Thiol-Maleimid-Reaktion dar (Anderton 1970). Die Sulfhydrylgruppe eines freien Cysteinrestes kann über die sogenannte Michael-Addition mit Maleimid reagieren und geht eine kovalente Bindung ein (Witter und Tuppy 1960; Pretzer und Wiktorowicz 2008). Der Anfang des katalytischen Zyklus stellt die initiale Bildung von nucleophilen Thiolat-Anionen (R_1-S^-) dar. Das Thiolat-Anion greift die π -Bindung des Maleimids an, was zu einem basischen Enolat-Zwischenprodukt führt. Dieses Zwischenprodukt deprotoniert neue Thiolgruppen, was den katalytischen Zyklus weiterlaufen lässt. Nach der Deprotonierung ist Maleimid mit der Thiolgruppe gekoppelt (**Abbildung 5**). Die Selektivität der Michael-Addition mit Sulfhydrylgruppen ist sehr hoch (Epps und Taylor 2001). Auf diese Weise lässt sich in Verbindung von Maleimid mit Fluorescein oder einem anderen Fluoreszenzfarbstoff ein Protein mit einem

Fluorophor markieren. Es konnte in Optimierungsexperimenten gezeigt werden, dass die optimale Kopplungszeit bei 30 Minuten liegt und Maleimid kaum unspezifische Bindungen eingeht (Tyagarajan et al. 2003). In dieser Arbeit wird diese Form der Markierung von Proteinen noch näher betrachtet.

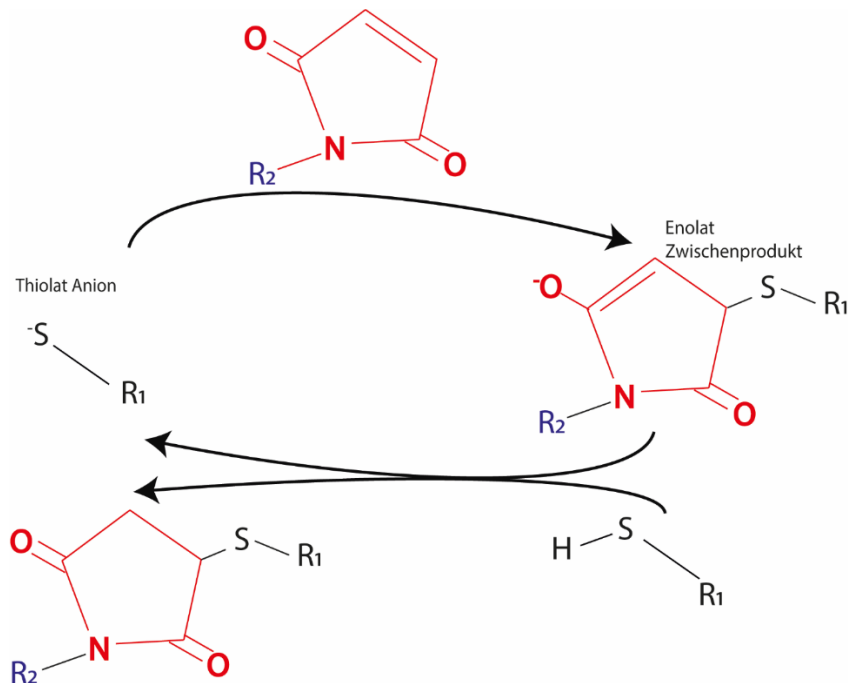


Abbildung 5: Mechanismus der Michael-Addition zwischen Maleimid und Thiolgruppen. Initiale Bildung des nucleophilen Thiolat-Anions führt zum Angriff der π -Bindung der Maleimidgruppe (rot), welches dadurch zum Enolat-Zwischenprodukt reagiert. Dieses Zwischenprodukt deprotoniert weitere Thiolgruppen, sodass der katalytische Mechanismus weiterlaufen kann. Nach dieser Deprotonierung ist die Maleimidgruppe mit der Thiolgruppe verbunden und die Michael-Addition beendet. An der Maleimidgruppe ist der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (blau). Das Protein ist nach der Michael-Addition über die Thiolgruppe des Cysteins (schwarz) über die Maleimidgruppe mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

2.3.4 Mitochondriale Importkinetik

Der Importprozess und die Prozessierung von Präproteinen durch Mitochondrien können als Kinetik erster Ordnung beschrieben werden (Lim et al. 2001). Mitochondrien fungieren in dieser Kalkulation als Enzymapparat (TOM/TIM/Proteasen) und die Präproteine als Substrat (**Abbildung 6**). Um die maximale Importgeschwindigkeit zu bestimmen, muss das Substratmaximum, also die Sättigung, im Experiment erreicht werden (**Abbildung 6**).

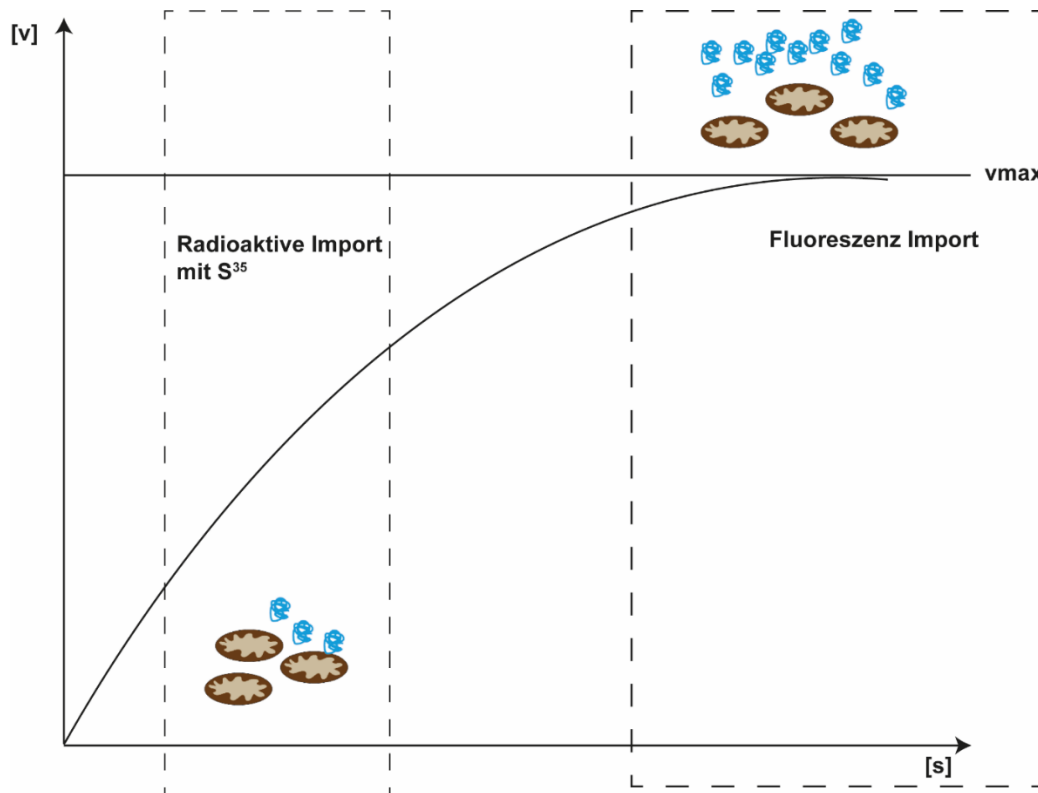


Abbildung 6: Mitochondriale Importkinetik. Mitochondrialer Import ist ein Prozess, welcher einer ähnlichen Kinetik unterliegt, wie die eines Enzyms. Mitochondriale Importkanäle stehen dabei für die Enzyme und das Präprotein für das Substrat. Bei radioaktiven Importexperimenten liegen Substratkonzentrationen vor, welche nicht dem maximalen Importumsatz entsprechen. Der Fluoreszenzimport ermöglicht die Zugabe des Präproteins in einem Konzentrationsbereich, in dem der maximale Import erzielt werden kann.

2.4 Beeinflussung des mitochondrialen Imports

Der mitochondriale Import kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Die Zugabe von Faktoren, welche den Import verbessern, kann zu einer schnelleren Importgeschwindigkeit führen. Ein negativer Einfluss kann dazu führen, dass das Organell seine zellulären Aufgaben nicht mehr erfüllen kann. Dies kann sich durch einen Verlust an Funktionalität der Atmungskette, des mitochondrialen Ribosoms oder durch Fehlfaltung mitochondrialer Proteine zeigen. Die Folge sind ein gestörtes Membranpotential, eine verringerte Stabilität der Mitochondrien und schlussendlich Defekte im mitochondrialen Import. Außerdem können die Interaktion mit zytosolischen Proteinen oder weiteren Zellorganellen den mitochondrialen Import beeinflussen. Welchen

Einfluss verschiedene Faktoren auf die mitochondrialen Importgeschwindigkeit haben, wird in dieser Doktorarbeit näher betrachtet.

2.4.1 Einfluss von ROS auf den mitochondrialen Import

ROS-Stress beschreibt eine Schädigung von Proteinen sowie DNA durch reaktive Sauerstoffspezies und führt zur Störung der mitochondrialen Biogenese. ROS-Stress greift hauptsächlich prosthetische Gruppen mit einem Eisenschwefel-Cluster an, welche in den Komplexen der Atmungskette vorkommen (Singh et al. 2019). H_2O_2 , welches durch den Elektronenverlust der Atmungskette in Mitochondrien entstehen kann, reagiert mit Metallionen mittels einer Fenton-Reaktion, welche zu der Bildung des sogenannten Hydroxyl-Radikals führt. Dieses Radikal kann DNA und andere Biopolymere angreifen und zu einer verringerten Aktivität führen (Ballinger et al. 1999). ROS-Stress führt zu einer Depolarisation der Mitochondrien, welche sich durch eine erniedrigte ATP-Produktion niederschlägt (Garg und Chang 2004). Dadurch kommt es zu einer ROS-induzierten Zelltoxizität, was durch erhöhte Apoptose gezeigt werden konnte (Singh et al. 2007; Pletjushkina et al. 2006). Durch ROS-Stress kann es auch innerhalb der Mitochondrien zu Aggregation von Aconitase und Acetolactatsynthase kommen (Bender et al. 2010; Gardner 2002, 2002). Der Abbau von durch ROS-Stress geschädigten mitochondrialen Proteinen findet über die Proteasen Pim1 in der Hefe und LonP1 im Menschen statt (Bender et al. 2011; Bota und Davies 2002). ROS-Stress wird als ein entscheidender Faktor für die vorschreitende Pathologie in verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson beschrieben (Gu et al. 2013; Keeney et al. 2024). Erhöhter ROS-Stress konnte beispielsweise in der mitochondrialen DNA, sowie in der gesteigerten Peroxidation von Lipiden in neuronalen Zellen von Alzheimer-Patienten festgestellt werden (Palmer und Burns 1994; Mecocci et al. 1994).

2.4.2 Einfluss von Aggregaten auf den mitochondrialen Import

Bei neurodegenerativen Krankheiten werden beispielsweise Ablagerungen von A β -Plaques bei Alzheimer oder α -Synuclein bei Parkinson beobachtet (Thal et al. 2015). Diese Proteinaggregationen wirken sich negativ auf Neuronen aus und führen zu deren Absterben (Shimohama et al. 1999; Chen und Feany 2005,

2005). Die Aggregate sind ein pathologischer Mechanismus neurodegenerativer Krankheiten und führen mit erhöhtem ROS-Level, Imbalance der Neurotransmitter, erhöhter Autophagie, mitochondrialer Dysfunktion, Übererregbarkeit der Neuronen zum Vorschreiten dieser Krankheiten (Pardillo-Díaz et al. 2022).

2.4.2.1 A β -Peptide

A β -Peptide werden durch die konsekutive Spaltung von Amyloid-Precursor-Protein (APP) durch β -Secretase und γ -Secretase gebildet. Bei der Pathologie von Alzheimer kommt es zu einer Amyloidose, wobei vermehrt schädliche A β -Plaques gebildet werden und die Anreicherung durch α -Secretase nicht gestoppt wird (Sun et al. 2017). A β ist ein amphipathisches Peptid, welches ein hydrophiles N-terminale Ende und ein hydrophobes C-terminales Ende besitzt. Diese Struktur führt zur spontanen Aggregation, angefangen von Monomeren über Oligomere bis hin zu unlöslichen Protofibrillen (Han und He 2018). Die Bildung von A β -Oligomeren führt zu höherer Neurotoxizität (Wilcox et al. 2011; Cizas et al. 2010). A β 42 neigt eher zur Oligomer-Bildung im Vergleich zu A β 40 (Rangachari et al. 2007). Die Dimervariante (DiA β), welche aus 2 Monomeren A β 40 besteht, liegt hauptsächlich als Oligomer vor (Schützmann et al. 2021). Welchen Effekt A β -Oligomere auf den mitochondrialen Import haben, soll in dieser Arbeit analysiert werden.

A β -Plaques können in Zellen zu einer gestörten Calcium-Homöostase, sowie einem Anstieg an Apoptose und erhöhten ROS-Leveln führen (Sultana et al. 2006; Fani et al. 2021; Cizas et al. 2010). Es konnten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen A β -Plaques in der mitochondrialen Matrix detektiert werden, was ein Anzeichen für eine Interaktion des Importkanals und der Rezeptoren von Mitochondrien sein könnte (Hansson Petersen et al. 2008). Eine weitere Studie konnte eine Ansammlung von A β -Peptiden am Tom22-Rezeptor von Hefe nachweisen (Hu et al. 2018). A β -Plaques könnten demnach bei Astrozyten zu einer Störung des Mitochondriennetzwerkes führen und die ATP-Produktion der Zelle negativ beeinflussen (Zyśk et al. 2023). Es konnte in *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass A β -Peptide zur Koaggregation mit Präproteinen wie Su9-DHFR neigen, was zur Importhemmung führt (Cenini et al. 2016). A β -Peptide zeigten dabei keinen

Effekt auf das Membranpotential von isolierten HeLa-Mitochondrien (Cenini et al. 2016).

2.4.2.2 α -Synuclein

Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit, welche durch eine Bildung von Lewy-Körpern in dopaminergen Neuronen charakterisiert ist. Abnormale Ansammlungen von α -Synuclein wurden in den Lewy-Körpern identifiziert und die Ansammlung dieses Proteins wird seitdem zur Parkinson-Pathogenese gezählt (Baba et al. 1998). α -Synuclein ist ein präsynaptisches neuronales Protein, welches eine Größe von 14 kDa hat und eine hohe Affinität zu Membranen (anionische Phospholipide) aufweist, da es hydrophobe Seitenketten besitzt (Ahn et al. 2006). In weiteren Studien zeigte sich, dass α -Synuclein an Tom20 binden und so den mitochondrialen Import hemmen kann (Di Maio et al. 2016). Eine weitere Studie zeigte eine einhergehende Hemmung von Komplex I der Atmungskette bei Ansammlung von α -Synuclein im Intermembranraum (Devi et al. 2008). Ramezani et al. (2023) zeigten, dass α -Synuclein die Ca^{2+} -Aufnahme der Mitochondrien erhöht und die mitochondriale Masse nach Expression des α -Synuclein reduziert, welche wiederum die ATP-Produktion reduziert und die Mitochondrien depolarisiert (Lurette et al. 2023).

2.4.3 Einfluss der Temperatur auf den mitochondrialen Import

Hitzestress kann Mitochondrien schädigen und sie in ihrer Funktion negativ beeinflussen. Es konnte neben der Proteinaggregation von Tufm, Aco2 oder Hsp60 in Säugetiermitochondrien, auch ein Abfall des Membranpotentials nach Hitzestress festgestellt werden (Wilkening et al. 2018). Dies führt ebenfalls zu einer verringerten ROS-Produktion, also einer eingeschränkten Atmungskettenaktivität. Die mitochondriale Translation kommt bei höheren Temperaturen zum Erliegen. (Wilkening et al. 2018; Bender et al. 2011). Die Komplexe der Atmungskette werden durch den Temperaturstress instabil, wodurch die mitochondriale Atmung gehemmt wird (Moreno-Loshuertos et al. 2023). Der mitochondriale Import wird durch den Abfall des Membranpotentials zwangsläufig reduziert (Wilkening et al. 2018; Dressler et al. 2006). Bei Myoblastzellen konnte eine Reduktion der Zellproliferation und Differenzierung nach Hitzestress nachgewiesen werden (Lu et al. 2023). Mitochondriale

Chaperone der Matrix wie Hsp78 konnten im Zuge von Temperaturstress als essenzieller Faktor für den Schutz der metabolischen Funktion und der Proteinbiosynthese ermittelt werden (Jaworek et al. 2022).

2.4.4 Einfluss von Zytosol und molekularen Chaperonen auf den mitochondrialen Import

Innerhalb der Zelle führt die Menge an Makromolekülen (Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren) zu einer molekularen Verdrängung, was zu einem reduzierten intrazellulären Raum führt (Bonucci et al. 2023). Diese Verdrängung hat einen großen Einfluss auf die biochemischen Reaktionen, die Proteinstruktur und die Interaktion (Celaya et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass diese Verdrängung zu einer veränderten Spezifität von biochemischen Reaktionen führt, indem die Bindung von Liganden verbessert wird (Minton 1993). Dadurch konnte auch eine veränderte Kinetik der Proteinaggregation beobachtet werden (van den Berg et al. 1999). Makromolekulare Verdrängung führt zu einer Stabilisierung von kompakten Proteinstrukturen und verlangsamt deren Auffaltung (Bonucci et al. 2023).

Neben der molekularen Verdrängung und deren Auswirkungen auf die Proteinfaltung befinden sich im Zytosol Proteine, sogenannte Chaperone, welche die Proteinfaltung ermöglichen. Die Chaperone Hsp70 und Hsp40 binden an neu synthetisierte Proteine und führen unter ATP-Verbrauch zur Faltung dieser Proteine (Hartl 1996). 15-20 % der Proteine müssen für weitere Faltung durch das Chaperon Hsp90 unterstützt werden (Johnson 2012).

Im Zytosol befindet sich ein Proteinringkomplex, bestehend aus Chaperoninen wie beispielsweise TriC. Diese Proteingruppe besteht aus 800-kDa-Doppelring Proteinkomplexen, welche einen Hohlraum besitzen, in welchem die Faltung großer Proteine unter ATP-Verbrauch stattfindet (Hu et al. 2023). Substrate dieses Faltungssystems sind hauptsächlich Aktin und Zytoskelettproteine (Siegers et al. 1999). In dieser Arbeit wird der Effekt von isoliertem Zytosol auf den Import mit fluoreszenzmarkierten Präproteinen analysiert.

3 Ziele und Fragestellungen dieser Doktorarbeit

Um die Analyse der mitochondrialen Biogenese in der mitochondrialen Matrix quantifizierbar zu machen, soll in dieser Arbeit ein rekombinantes, fluoreszenzmarkiertes Präprotein konstruiert werden, welches im Import *in Organello* verwendet werden kann. Neben der Etablierung dieser Methodik sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wie verhält sich die Importgeschwindigkeit in Hefemitochondrien im Vergleich zu Säugetiermitochondrien? Gibt es Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien?
2. Welchen Einfluss hat höhere Temperatur auf die Importgeschwindigkeit und bei welcher Temperatur importieren Säugetiermitochondrien am besten?
3. Welchen Einfluss hat ROS auf den mitochondrialen Import?
4. Wird der Import in Mitochondrien durch Zugabe von isoliertem Zytosol beeinflusst und kann so die Situation in der Zelle widerspiegelt werden?
5. Führen DiA β -Oligomere zu einer Importhemmung?
6. Wird der Import in die mitochondriale Matrix durch α -syn(61-95) gehemmt?
7. Kann die Importhemmung aufgrund von amyloiden Aggregaten in Mitochondrien durch isoliertes Zytosol und die sich darin befindenden Chaperonproteine wiederhergestellt werden?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Name	Hersteller
Durchflusszytometer	CyFlow space CYS3001	Sysmex- Partec, Deutschland
Einfrier-Container	Cryo1°C Freezing Contrainer	Nalgene®, USA
Mikroplattenleser	Infinite M200 pro Tecan	Tecan, Schweiz
Phosphoimager	FLA-5100	Fujifilm, Japan
Power Supply	Power Supply	PeqLab, Deutschland
Western Blot Kammer	Semi-Dry-Blotter	PeqLab, Deutschland
Zellinkubator	Function Line Cell Incubator	Heraeus Instruments
Zellinkubator	HERAcell VIOS 160i	Thermo scientific
Stickstoff-Generator	NGM	Cmc instruments

4.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Name	Hersteller
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, USA
AVO (Valinomycin, Antimycin A, Oligomycin)	Sigma-Aldrich, USA
Bacto Tryptone	Sigma-Aldrich, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
1,4- Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Fluorescein-Maleimid	ThermoFisher Scientific, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, USA
L-Arginin	Sigma-Aldrich, USA
Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE)	Sigma-Aldrich, USA
Turbofect	Sigma-Aldrich, USA
Valinomycin	Sigma-Aldrich, USA
Zymolyase-20T: 20000 U/g	Amsbio, UK

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

4.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Lösung	Konzentration/Zusammensetzung
Agarosegel	1 % [w/v] Agarose, 0,1 % [w/v] Ethidiumbro-mid in TAE
Arginin-Puffer	1 M Arginin, 10 mM MOPS pH 7,2
ATP	0,2 M
AVO (Valinomycin, Antimycin A , Oligomycin)	0.8 mM Antimycin, 50 µM Valinomycin, 2 mM Oligomycin in EtOH gelöst
Coomassie	50 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Essigsäure, 1 g/l Coomassie Brilliant Blue R250
Coomassie Entfärber	50 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Essigsäure
1xDekosalt	50 mM Tris, 150 mM NaCl
1xDekosalt-T	Dekosalt + 0,1 % Tween20
Dialysispuffer	30 mM Tris, 80 mM NaCl, 1 mM MgAc, 10 % Glycerin [v/v]
DTT-softening-Puffer	100 mM Tris (pH 9,4), 10 mM DTT
FACS-Puffer	1xPBS + 0,2 % [w/v] BSA
Homogenisierungspuffer	10 mM Tris, 0,6 M Sorbitol, 0,5 % [w/v] BSA ,1 mM PMSF
2xImportpuffer	500 mM Saccharose, 40 mM HEPES pH 7,6, 160 mM KAc, 10 mM MgAc
KPi-Buffer	1 M K ₂ HPO ₄ , 1 M KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)
1xLaemmli	2 % SDS [w/v], 10 % Glycerin [v/v], 60 mM Tris, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl

Lysis-Puffer	0,5 % [w/v] Triton, 20 mM Tris (pH 7,4), 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,5 mM PMSF, 1x Protease Inhibitor
LEW-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl (pH 8)
P80	3 % [w/v] BSA (Fettsäurefrei), 250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 5 mM MgCl ₂
10xPBS	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PMSF	100 mM
Potentialpuffer	0,8 M Sorbitol, 0,1 % [w/v] BSA, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM KPi pH 7,2
10xSDS-PAGE-Puffer	250 mM Tris, 1,9 M Glycin, 35 mM SDS
SEM-Puffer	250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS pH 7,2
Solubilisation-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl (pH 8), 6 M Harnstoff
Lösung A	Lösung B + 2 mg/ml BSA
Lösung B	20 mM HEPES pH 7,6, 220 mM Mannitol, 70 mM Saccharose, 1 mM EDTA
1xTAE	5 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM Natriumacetat (pH 8 mit Essigsäure)
1xTBS (pH 7.4)	20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl
1xTBS-T	TBS (pH 7.4) + 0,1 % Tween-20
Transfe-Puffer	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,2 % [w/v] SDS, 20 % [v/v] Ethanol
Waschpuffer Filterretardierungstest	10 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 0,1 % [w/v] SDS

YPD-Medium	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 2 % Glucose
YPD-Platten	YPD-Medium + 25 g/l Agar Agar
YPG-Medium	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 3 % Glycerol, (2 % Ethanol)
YPG Platten	YPG-Medium + 25 g/l Agar Agar
Zymolasepuffer	20 mM KPi (pH 7,4), 1,2 M Sorbitol

4.1.4 Zellkulturmedien, Reagenzien und Kits

- GFP-CERTIFIED Apoptose/Necrose Kit (Enzo Life Sciences)
- Miniprep Kit (Thermo Life Sciences)
- Mitosox (Thermo Life Sciences)
- RotiQuant (Carl Roth)
- RPMI ohne Glutamin (Invitrogen)
- SERVALight Eos CL HRP WB Substrate Kit (Serva)
- TMRE (Sigma Aldrich)
- TnT Couples Reticulocyte Lysate Systems for SP6 Promoter (Promega)

4.1.5 Software

Tabelle 4: Software und Programme

Name	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe, USA
Adobe Photoshop	Adobe, USA
Excel	Microsoft, USA
Graphpad Prism 7	Graphpad Software, USA
Multi Gauge	Fujifilm, Japan
SerialCloner 2.0	Serial Basic
SnapGene Viewer	Dotmatics, USA

Word	Microsoft, USA
------	----------------

4.1.6 Primäre Antikörper (*Homo sapiens*)

Tabelle 5: Primäre Antikörper (*Homo sapiens*)

Immunogen	Typ	Verdünnung	Spezifikation	Hersteller
A β	Maus	1:1000	B4 / sc-28365	Santa Cruz, USA
β -Actin	Maus	1:1000	3700S	NEB, Deutschland
FACL4	Rabbit	1:5000	NBP2-16401	Novus, Deutschland
GAPDH	Kaninchen	1:3000	2118S	NEB, Deutschland
Hsp9a	Maus	1:2000	67563-1	Proteintech, Deutschland
Mdh2	Kaninchen	1:5000	11908 S	NEB, Deutschland
MPP (Pmpca)	Maus	1:1000	HPA021648	Sigma-Aldrich, USA
MPP (Pmpca)	Maus	1:500	sc-390471	Santa Cruz, USA
PINK1	Kaninchen	1:1000	6946	Cell Signalling, USA
phos. Ubiquitin	Kaninchen	1:1000	62802	Cell Signalling, USA
SOD2	Kaninchen	1:2000	S5569	Sigma-Aldrich, USA
Strep	Kaninchen	1:1000	GR1552	AG Voos
Tim23	Maus	1:2000	611222	BD. Bioscience, USA

Tom40	Maus	1:1000	sc-265467	Santa Cruz, USA
Tom70	Kaninchen	1:5000	NB 110-583 47	Novus, Deutschland
TRAP1	Kaninchen	1:500	GR 2388-5b	Gramsch, Deutschland
VAPB	Kaninchen	1:2000	NBP1-89112	Novus, Deutschland
VAPB	Kaninchen	1:2000	Proteintech 14477-1 AP	Proteintech, Deutschland

4.1.7 Primäre Antikörper (*Saccharomyces cerevisiae*)

Tabelle 6: Primäre Antikörper (*Saccharomyces cerevisiae*)

Immunogen	Typ	Verdünnung	Spezifikation	Hersteller
Cox4	Kaninchen	1:2000	GR577-7	AG Voos
Mdh1	Kaninchen	1:5000	GR1088	AG Voos
Sod2	Kaninchen	1:5000	GR1051	AG Voos
Ssc1	Kaninchen	1:5000	GR41756	AG Voos
Tom70	Kaninchen	1:2000	GR657	AG Voos

4.1.8 Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper

Tabelle 7: Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper

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

4.1.9 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Hersteller
HeLa	Humanes Cervixkarzinom	DSMZ, ACC-57
SH-SY5Y	Human neuroblastoma	DSMZ, ACC-209
HEK293293	Human embryonic kidney	DSMZ, ACC-305

4.1.10 Hefezelllinien

Tabelle 9: Hefezelllinien

Strain	Genotype	Source
YPH499	Mat a, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1- Δ 63, his3- Δ 200, leu2- Δ 1	W. Voos
BY4741	Mat a, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0	Euroscarf
Yhr008c-ES	Mat a, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0, sod2 Δ ::KanMx	Euroscarf

4.1.11 Peptide

Tabelle 10: Peptide

Peptide	Sequenz	Source
Dimer A β 40 Trifluoracetatsalz	(DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVV) ₂ C	Bachem AG/ AG Hoyer
A β 40 (1-40) Trifluoracetatsalz	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVV	Bachem AG
A β 42 (1-42) Trifluoracetatsalz	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVVIA	Bachem AG
α -syn(61-95) Trifluoracetatsalz	EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSI AAATGFV	Bachem AG

4.1.12 Plasmide / Primer

Tabelle 11: Plasmide und Primer

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Hersteller
pWJ10	pET28b	Su9-DHFR-Cys-Strep-6His in DH α für Plasmidaufreinigung	Witold Jaworek
pWJ10	pET28b	Su9-DHFR-Cys-Strep-6His in BL21 codon+ für Expression	Witold Jaworek

Die Plasmidkarte befindet sich im Anhang **Abbildung 60**.

- Überhang PCR (T7 -> SP6 Promotor) – SDCSH

Forward-Primer:

GCGAATTCATTTAGGTGACACTATAGAATACTgagcggataacaattcccctctaga

Reverse-Primer:

GCGAATTCcaaggggtatgctagttattgctca

4.2 Methoden

4.2.1 Expression von SDCSH

Eine 5 ml-Vorkultur mit SDCSH in BL21 codon+ wurde über Nacht angesetzt. Nach der Inkubation über Nacht wurde die optische Dichte (OD600) per Photometer festgestellt und die Bakterien in LB-Medium + Kanamycin (f.c. 50 μ g/ml) mit einer OD600 von 0,1 inokuliert. Die Bakteriensuspension wurde weiter inkubiert, bis eine OD600 von 0,6-1,0 erreicht wurde. Im nächsten Schritt wurden 100 μ l 1 M IPTG (f.c. 1 mM) zugegeben und SDCSH für 4 Stunden exprimiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 4000 $\times$ g, 4 °C und 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.2 Lyse und Aufreinigung vom Präprotein SDCSH

Das Bakterienpellet wurde auf Eis aufgetaut und in LEW-Puffer (Lysis Equilibrium Wash Buffer) aufgenommen. Danach werden Lysozyme (1 mg/ml) und PMSF (f.c. 1 mM) zur Bakteriensuspension hinzugegeben und für 30 Minuten auf Eis rührend inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurde die Suspension im Bioruptor (15 Sekunden an, 15 Sekunden aus, hohe Einstellung, 10 Zyklen) lysiert. Das Lysat wurde dann bei 10000 ×g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in einem Waschpuffer (LEW-Buffer + 1 M Urea + 0,5 % Triton) resuspendiert, bei 10000 ×g, 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im nächsten Schritt wurde das Pellet erneut in Waschpuffer (LEW-Buffer + 1 M Urea) resuspendiert und bei 10000 ×g, 30 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird dann in 6 M-Urea-Solubilisation-Puffer resuspendiert (2 g/ml) und im Bioruptor (15 Sekunden an, 15 Sekunden aus, hohe Einstellung, 5 Zyklen) behandelt. Danach wird das Lysat bei 20.000 ×g, 15 Minuten, 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß übertragen und die Konzentration via SDS-PAGE und Western Blot im Vergleich zu BSA-Standards ermittelt.

4.2.3 Dialyse/Rückfaltung des Präproteins SDCSH

In 6 M Urea gelöstes SDCSH, wurde im Verhältnis 1:40 in 1 M Arginin 10 mM MOPS (pH 7,4) verdünnt und dann in eine Dialysekapsel überführt, die mit der aktivierten Dialysemembran verschlossen wurde. Die Dialysekapsel wurde in 500 ml Dialysepuffer gegeben. Die Verdünnung der SDCSH-Lösung in dem Dialysepuffer, welche durch die Membran getrennt wurde, beträgt am Ende 1:1000. Dialyse wurde über Nacht bei 4 °C rührend inkubiert. Nach der Dialyse wurde das Volumen der SDCSH-Lösung per Pipette ermittelt und das zurückgefaltete Protein bei 4 °C, 20.000 ×g und 15 Minuten zentrifugiert, um wirklich nur zurückgefaltetes Protein in das Labeln mit dem Farbstoff zu geben. Nach der Zentrifugation wurde das Protein mit Fluorescein-5-Maleimid versetzt (siehe Fluoreszenzmarkierung mit Fluorescein-5-Maleimid)

4.2.4 Fluoreszenzmarkierung mit Fluorescein-5-Maleimid

Um die Fluoreszenzmarkierung von SDCSH durchzuführen, ist der erste Schritt ein Zentrifugationsschritt des zurückgefalteten SDCSH, welcher bei 4 °C, 20 Minuten und bei 20.000 ×g durchgeführt wurde. Danach wurde der Überstand mit Fluorescein-5-Maleimid (f.c. 200 µM) versetzt und in einem dunklen 1,5 ml-Eppendorfgefäß auf Eis für 4 Stunden inkubiert. Nach etwa 3,5 Stunden wurde noch Cystein (f.c. 1 mM) zugesetzt, um nicht gebundenes Fluorescein-5-Maleimid zu inaktivieren und unspezifische Markierung des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern. Die Präproteine wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration (über BSA-Standard) und die Fluoreszenzmarkierung wurden im Gel oder auf PVDF-Membran überprüft.

4.2.5 Konzentrationsbestimmung des fluoreszenzmarkierten SDCSH

Fluoreszenzmarkiertes SDCSH wurde in verschiedenen Volumina und das Protein Rinderserumalbumin (BSA) in bekannten Mengen (1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg) in einem SDS-PAGE-Gel (12,5 %) aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde es über Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Um die Fluoreszenz zu überprüfen, wurden die Signale mithilfe des Fluoreszenz-Scanners (Anregungswellenlänge: 473 nm, Emissionsfilter: LPB) analysiert. Danach wurde die PVDF-Membran mit Coomassie gefärbt. Nach Entfärbung und Trocknung der PVDF-Membran wurden die Proteinsignale mithilfe des Programms Multigauge (Fujifilm) quantifiziert und der Hintergrund in der entsprechenden Lauffront subtrahiert. Die BSA-Proben dienten zur Quantifizierung einer Standardkurve, um die Proteinmenge des fluoreszenzmarkierten SDCSH zu ermitteln. Um die Konzentration des SDCSH in µg/µl zu ermitteln, wurde die jeweilige Proteinmenge durch das jeweilige Volumen dividiert.

4.2.6 Mitochondrienpräparation von Säugetierzelllinien

Die Zellen wurden auf 15 cm-Platten wachsen gelassen, bis eine mindestens 60 % Konfluenz des Zellwachstums erreicht war. Das Medium wurde entfernt und der Zellrasen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Im nachfolgenden Schritt

wurden die Zellen mithilfe eines Zellscharbers abgekratzt und in vorbereiteten 2-ml-Eppendorfgefäße gesammelt, welche sich im Eis befinden. Wenn sich die Zellen alle in 2-ml-Eppendorfgefäße befinden, wurden sie bei 800 ×g und 4 °C herunterzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4,5 ml Lösung A aufgenommen und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Dies dient dazu, die Zellen zum Anschwellen zu bringen. Nach der Stunde auf Eis wurden die Zellen (6 x 0,75 ml) in Falcons überführt und im Bioruptor bei 4 °C, 5 Sekunden an, 60 Sekunden aus in 5 Zyklen (geringe Einstellung) lysiert. Nach der schwachen Lyse wurde das Lysat bei 1500 ×g und 4 °C herunterzentrifugiert. Im Überstand (I) befinden sich nun Mitochondrien und im Pellet die noch nicht lysierten Zellen. Diese Überstände wurden jetzt in 1,5-ml-Eppendorfgefäße überführt und auf Eis gelagert. Die Zellpellets wurden im Folgenden nochmal in 4,5 ml Lösung A (siehe Tabelle Puffer und Lösungen) gelöst und der Schritt mit dem Bioruptor wurde nochmal wiederholt, um eine größere Mitochondrienausbeute aus den Zellen präparieren zu können. Wenn alle Überstände (I, II) sich auf Eis befinden, wurden die Eppendorfgefäße mit den Überständen bei 12.000 ×g, 10 Minuten und bei 4 °C zentrifugiert. Danach folgt das Entfernen des entstandenen Überstandes und die Mitochondrienpellets wurden in 1 ml Lösung B (f.c. 1 mM PMSF) gelöst und erneut bei 12.000 ×g, 5 Minuten und 4 °C herunterzentrifugiert. Im letzten Schritt konnte das Mitochondrienpellet in Lösung B aufgenommen werden und durch Verdünnungen in Lösung B (1:10, 1:20) mit der Bradford-Proteinbestimmung nach vermessen werden. Die restlichen Mitochondrien in Lösung B wurden bei 4 °C gelagert, bis das Experiment mit den Mitochondrien durchgeführt wurde.

4.2.7 Mitochondrienpräparation von *Saccharomyces cerevisiae*

Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden in YPD-Medium für ein bis zwei Tage wachsen gelassen und man setzt so das gewünschte Vorkulturvolumen an. Im nächsten Schritt wurde die Hefe in YPG (mit 2 % EtOH) wachsen gelassen, bis eine OD von 1,5-2,5 erreicht wurde. Wenn die gewünschte OD erreicht war, wurden die Hefezellen herunterzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Die Hefezellen wurden bei 1600 ×g herunterzentrifugiert und das Gewicht des Pellets bestimmt. Im Folgenden wurden die Zellen in einen DTT-softening-Puffer überführt und bei 30 °C und sanften Schütteln 20 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen bei 2800 ×g herunterzentrifugiert und das Pellet wurde

in Zymolasepuffer (100 ml) gelöst. Die Hefezellen wurden nun erneut bei 2800 ×g zentrifugiert und das Pellet wurde mit 7 ml/g pro Pelletgewicht in Zymolasepuffer gelöst. Zu dieser Suspension wurden 3 mg Zymolase pro g Pelletgewicht gegeben und die Zellen wurden bei 30 °C für 30 Minuten inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig, um die Zellwand der Hefezellen zu verdauen. Um diesen Arbeitsschritt zu überprüfen, wurden 50 µl der Suspension vor dem Zymolaseverdau und 50 µl nach dem Verdau in separate 2-ml-Eppendorfgefäße überführt. Zu diesen 50 µl wurde dann 2 ml destilliertes Wasser gegeben. Die Zellen vor dem Zymolaseverdau sollten in der Lösung bestehen bleiben (Trübung). Die Zellen nach dem Zymolaseverdau sollten in der Lösung aufgrund des osmotischen Drucks platzen und die Trübung verschwindet. Entstandene Spheroplastenlösung wurde herunterzentrifugiert und in Zymolasepuffer erneut gewaschen. Im Folgenden wurden die Zellen in Homogenisierungspuffer aufgenommen (6,5 ml/g) und im Bioruptor bei 30 Sekunden an und 30 Sekunden aus, geringe Einstellung, beschallt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt, welcher bei 2000 ×g und 5 Minuten durchgeführt wurde. Anschließend wurde der Überstand bei 3000 ×g und 5 Minuten zentrifugiert. Diese Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Im letzten Schritt wurde der Überstand 15 Minuten bei 12.000 ×g zentrifugiert und das entstandene Mitochondrienpellet in SEM-Puffer gelöst. Die Mitochondrienkonzentration wurde mittels Bradford bestimmt. Die Mitochondrien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

4.2.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Um vergleichbare Proteinmengen in SDS-PAGE und Western Blots einzusetzen, ist es notwendig, Proteinkonzentrationen genau zu bestimmen. Das Bradfordreagenz kann dazu verwendet werden. Dieser Assay basiert auf der Verschiebung vom Coomassie-Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm, wenn eine Proteinbindung des Farbstoffreagenz im sauren Milieu vorliegt. Diese Verschiebung lässt sich im Photometer oder Mikroplatten-Reader messen. Um genaue Proteinmengen zu bestimmen, ist es notwendig, einen Proteinstandard in diesem Assay zu verwenden. Verschiedene bekannte Konzentrationen von BSA wurden als Standard eingesetzt und mit den Proben analysiert. Um das

Bradfordreagenz zu verwenden, wurde der Farbstoff mit Wasser 1:5 verdünnt. Vor dem Vermessen der Proben und Standards, wurden 5 µl pro Probe in eine 96-Well-Mikroplatte gegeben und anschließend mit 200 µl vorher angesetztem Bradford (1:5) vermischt. Wenn sich alle Proben in der Mikroplatte befinden, wurde die Absorption bei 595 nm vermessen. Von dieser Absorption und anhand der Proteinstandards lässt sich eine Standardgerade ermitteln, welche die Proteinkonzentrationsbestimmung möglich macht.

4.2.9 Spotttest

Der Spotttest wurde im Kontext von ROS-Stress-Experimenten mit dem *Saccharomyces-cerevisiae*-Stamm BY4741 und der Deletionsmutante *sod2Δ* durchgeführt. Eine Vorkultur in YPD-Medium (3 ml) wurde am Vortag des Experimentes angesetzt. Die optische Dichte wurde am folgenden Tag mithilfe eines Photometers gemessen. Es wurden 0,16 OD600 (10^7 Zellen) entnommen und bei 2000 ×g zentrifugiert und der Überstand verworfen und in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen. 500 µl dieser Verdünnung wurden im folgenden Schritt mit dem Photometer bezüglich der OD überprüft. Diese Ausgangslösung wurde im nächsten Schritt 1:10 verdünnt. Aus dieser ersten Verdünnung wurden die anderen Lösungen durch Verdünnen um den Faktor 1:3 mit sterilem Wasser angesetzt. 7 µl der unverdünnten und verdünnten Zellsuspensionen wurden auf YPD/YPG-Platten gegeben und bei 30 °C/37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten gescannt und das Wachstum analysiert.

Tabelle 12: Verdünnungen Spotttest

Verdünnung	Zellzahl/ml	Zellen/ 7 µl
1:10	1000000	7000
1:30	333333	2333
1:90	111111	778
1:270	37037	259
1:610	12346	86

4.2.10 Membranpotentialmessung via TMRE

Das Membranpotential ist essenziell für die mitochondriale Biogenese und deshalb ein wichtiger Indikator für die Funktionalität von Mitochondrien. Es ist möglich, das Membranpotential über einen Fluoreszenzfarbstoff (TMRE, Tetramethylrhodamin, ethyl ester) zu vermessen. Diese Substanz kann die Zellmembran ganz einfach passieren und aufgrund ihrer positiven Ladung wird sie über das Membranpotential in die Mitochondrien transportiert. Am Anfang der Messung wurden 30 µg von Mitochondrien (Säugetier oder Hefe) per Zentrifugation (12.000 ×g, 5 Minuten, 4 °C) herunterzentrifugiert und danach in 95 µl Potenzialpuffer (+Malat/+Glutamat) aufgenommen. An diesem Punkt findet nun entweder die Behandlung mit verschiedenen Chemikalien oder die unbehandelten Mitochondrien dienen als Kontrolle. Als Positivkontrolle arbeitet man mit 5 µl 100 µM Valinomycin (f.c. 5 µM), welches als Entkoppler das Membranpotential zerstört (Su et al. 2019). Diese Behandlung findet bei 30 °C/37 °C statt. Nach diesem Schritt wurden zu jeder Probe 2 µl von 50 µM TMRE (f.c. 1 µM) gegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Mitochondrien wieder herunterzentrifugiert (12.000 ×g, 5 Minuten, Raumtemperatur) und der entstandene Überstand verworfen. Im nächsten Schritt wurde das Mitochondrienpellet mit 200 µl Potenzialpuffer (ohne Malat/Glutamat) gewaschen und bei 12.000 ×g, 5 Minuten, Raumtemperatur herunterzentrifugiert. Im abschließenden Schritt wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet in 200 µl Potenzialpuffer (ohne Malat/Glutamat) aufgenommen. Die Proben wurden nun in eine Schwarze 96-well-Platte pipettiert. Als Leerwert dienten dort 200 µl Potenzialpuffer und als Überprüfung des TMRE diente 200 µl Potenzialpuffer mit 2 µl TMRE (f.c. 0,5 µM). Bei der Messung wurde die Schwarze 96-well-Platte bei 540 nm die Fluoreszenz angeregt und die emittierten Signale wurden bei 585 nm detektiert.

4.2.11 Überhang-PCR

Um den T7-Promotor in einen SP6-Promotor zu tauschen, wurde eine Überhang-PCR mit den Primern (siehe Tabelle 11) durchgeführt. Neben der Template-DNA pWJ10 (f.c. 5 ng) wurden 1 x Phusion-GC-Puffer, 200 µM dNTPs, 3 % DMSO, 0,1 µM der Primer und 1 % Phusion-Polymerase gegeben und in folgendem

PCR-Programm (Tabelle 13) inkubiert und anschließend per Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tabelle 13: PCR-Programm

Zeit (Sekunden)	Temperatur (°C)	Schritt	Ablauf
60	98	Initiale Denaturierung	1.
10	98	Denaturierung	2.
30	65	Hybridisierung	3.
30	72	Elongation	4. (wieder zu Schritt 2)
600	72	Finale Elongation	5.

4.2.12 Radioaktive gekoppelte Translation

Die radioaktive Translation von Präproteinen kann in einem gekoppelten bzw. ungekoppelten Ansatz erfolgen. Bei der ungekoppelten Translation wird zuerst mRNA *in vitro* produziert und dann in einer nachfolgenden Translation verwendet. Bei der gekoppelten Translation wurde die DNA mit dem geeigneten Promotor (SP6/T7) eingesetzt und translatiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die radioaktiven Präproteine mittels der gekoppelten Translation (SP6-Promotor) hergestellt. Die Template-DNA wurde in dieser Translation in dem Reaktionsansatz in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde im Folgenden für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert. Daraufgehend wurde nicht radioaktives 5 mM Methionin zugegeben und die Inkubation für 10 Minuten fortgesetzt. Im nächsten Schritt wurde der Reaktionsansatz bei 125.000 ×g zentrifugiert, um die Ribosomen zu pelletieren. Der Überstand wurde mit 4,5 µl Sukrose versetzt (1,5 M, f.c. 250 mM), um das Protein schon auf die Osmolarität beim Import einzustellen. Im letzten Schritt wurde 1-2 µl von dem entstandenen Protein in einer kleinen SDS-PAGE mit anschließender Gel Trocknung und via Filmdetektion über Nacht analysiert.

4.2.13 Durchflusszytometrie von Mitochondrien

Durchflusszytometrie dient dazu, Populationen bei Zellen und auch Organellen, wie Mitochondrien zu analysieren. Um Mitochondrien zu analysieren, war es notwendig, im ersten Schritt die Mitochondrien (60 µg) herunterzuzentrifugieren bei 12000 ×g, 4 °C für 5 Minuten. Anschließend wurden die Mitochondrien in 100 µl Potenzialpuffer mit Glutamat und Malat resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde zu den Mitochondrien als Positivkontrolle 5 µM Valinomycin hinzugefügt. Die Proben wurden bei 30 °C/37 °C für 10 Minuten inkubiert. In diesem Schritt besteht auch die Möglichkeit, verschiedene Behandlungen mit verschiedenen Stressoren durchzuführen. Nach diesem Schritt wurden zu jeder Probe 2 µl von 50 µM TMRE (f.c. 1 µM) hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 12000 ×g zentrifugiert. Die mitochondrialen Pellets wurden anschließend in Potenzialpuffer + Malat/Glutamat auf eine Konzentration von 10 µg/µl gebracht und die Proben auf Eis gehalten, bis die Messung am Durchflusszytometer durchgeführt wurde. Kurz vor der eigentlichen Messung wurden die Proben auf eine Konzentration von 0,05 µg/µl verdünnt und im Durchflusszytometer vermessen.

4.2.14 Durchflusszytometrie von Zellen

Fluoreszenzfarbstoff (TMRE, Tetramethylrhodamin, ethyl ester) kann zur Färbung von intakten Zellen verwendet werden, um das mitochondriale Membranpotential zu analysieren (Crowley et al. 2016). Ein anderer Fluoreszenzfarbstoff ist MitoSOX, welcher mitochondriale ROS anfärben kann (Crowley et al. 2016; Shah und Dobrovolskaia 2024)

Die Zellen wurden ausgesät und über Nacht wachsen gelassen. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gewaschen und im neuen Medium mit den jeweiligen Inhibitoren/Substanzen behandelt. Valinomycin (f.c. 1 µM) wurde als Negativkontrolle bei TMRE-Messungen und Menadion (f.c. 100 µM) bei MitoSOX-Messungen als Positivkontrolle verwendet.

Nach der Behandlung wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit RPMI-Medium, das den jeweiligen Farbstoff (TMRE f.c. 0,5 µM; MitoSOX f.c. 5 µM) enthält, angefärbt. Die Färbung wurde im 37-°C-Inkubator

durchgeführt und dauerte 20 Minuten. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen, mit Trypsin von der Platte gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Im abschließenden Waschschrift wurden die Zellen nochmal bei 800 ×g und 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet mit 1 ml 1xPBS gewaschen und erneut bei 300 ×g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in FACS-Puffer (1xPBS, 0,2 % BSA) überführt und im Durchflusszytometer vermessen.

4.2.15 Zelllyse

Eine Lyse von menschlichen Zellen ist der erste Schritt, um die Proteine zu analysieren. Die Zellen auf einer 6-Well-Platte wurden nach der Inkubation aus dem Inkubator geholt und auf Eis gestellt. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen anschließend zweimal mit eiskaltem 1xPBS gewaschen. Auf die Zellen wurde nun direkt 50 µl - 200 µl Zelllysepuffer pipettiert. Die Zellen wurden durch das Kratzen mit einem Zellschaber von der 6-well-Zellkulturplatte abgelöst und in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt. Im nächsten Schritt wurden die Proben im Bioruptor beifolgender Einstellung durch Ultraschall lysiert: 5 Zyklen, hohe Einstellung, 30 Sekunden an, 30 Sekunden aus. Anschließend wurden die Proben noch 20 Minuten, 1400 rpm und 4 °C auf einem Heizblock inkubiert. Im abschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Zelllysate bei 1500 ×g, 10 Minuten, 4 °C von Zellmembranresten befreit, indem diese sich dann im Pellet befanden. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff weggefrostet und bei -80 °C gelagert.

4.2.16 SDS-PAGE

Die Auftrennung nach molekularem Gewicht ist essenziell um Veränderungen von Proteinmengen und Prozessierungen von Proteinen festzustellen. Um dies zu erreichen, verwendet man eine Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE). Der Probenpuffer (4 x Laemmli / 1 x Laemmli Buffer) enthält neben Mercaptoethanol und Bromphenolblau auch SDS, was dafür sorgt, dass Proteine denaturieren und außerdem eine negative Gesamtladung aufweisen. Dies ermöglicht ein Auftrennen nach molekularem Gewicht, da nun alle Proteine negativ geladen sind. Das Polyacrylamidgel dient als Auftrennungsmaterial, welches ein unterschiedliches Wandern der Proteine

nach Größe im elektrischen Fluss bewerkstelligt. SDS-PAGE-Gele wurden anfänglich mit dem Bodengel gegossen (siehe auch Tabelle 14) und nach Polymerisierung des Gels bei 4 °C gelagert. Nach Probenauftrag in die Taschen wurden die Gele in 1 x SDS-Puffer bei 25 mA für 3 Stunden laufen gelassen.

Tabelle 14: 12,5 % SDS-PAGE Gel

	Bodengel	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel
Acrylamid/bis (30/0.8)	6.7 ml	6.9 ml	0.83 ml
1.875 M Tris pH 8.8	2 ml	3.5 ml	-
0.8 M Tris pH 6.8	-	-	0.5 ml
10 % (w/v) SDS	0.1 ml	0.17 ml	50 µl
H ₂ O	1.13 ml	6.3 ml	3.55 ml
10 % (w/v) APS	50 µl	100 µl	50 µl
TEMED	25 µl	10 µl	10 µl
Endvolumen	10 ml	17 ml	5 ml

4.2.17 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine von einer SDS-PAGE können innerhalb der Acrylamidporen nicht mit Antikörpern detektiert werden. Die sogenannte Western-Blot Methode wurde etabliert, die Proteine auf eine Membran zu überführen. Das Gel aus der SDS-PAGE wird dabei mithilfe von elektrischer Ladung auf eine PVDF-Membran übertragen. In den sogenannten Blotting-Kammern wurde zuerst, in 1 x Blotting Puffer eingelegtes Whatman-Papier positioniert. Dieses Papier wurde vorher auf die passende Größe des Gels ausgeschnitten, ebenso wie die PVDF-Membran. Die geschnittene PVDF-Membran wurde in Ethanol aktiviert und dann ebenfalls auf den Whatman-Papierstapel platziert. Nun folgte das SDS-PAGE-Gel, welches auch in Blottingpuffer eingelegt wurde. Danach wurden wieder drei Whatman-Papiere auf den Stapel positioniert. Nun wurde die Blottingkammer verschlossen und an ein Elektrophoresegerät angeschlossen. Bei 220 mA und zwei Stunden wurden die Proteine von dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen. Nach dieser Zeit

wurde die PVDF-Membran mit Coomassie gefärbt, um die gleichmäßige Beladung und das bisherige Vorgehen zu überprüfen. Die Membran wurde nach der Färbung und Trocknung für die Dokumentation gescannt. Im nächsten Schritt folgte die Entfärbung mit Entfärberlösung und erneute Aktivierung der PVDF-Membran. Um eine spezifische Antikörperbindung an den gesuchten Proteinen zu bewerkstelligen, wurde die Membran in Blockinglösung eingelegt. Die Blockinglösung wurde aus 5 % Milchpulver, gelöst in TBS-T/Dekosalt-T, angesetzt. Der nächste Schritt beinhaltet die sogenannte Dekoration der Membran mit unterschiedlichen Primärantikörpern. Diese Inkubation wurde bei 4 °C und über Nacht durchgeführt. Im darauffolgenden Schritt wurden die Membranen mit den entsprechenden Puffern (TBS-T/Dekosalt-T) mindestens 3-mal gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen oder Maus) inkubiert. Die Sekundärantikörper binden an die Primärantikörper. Der Sekundärantikörper enthält ein HRP (Peroxidase des Meerrettichs), welches die Umsetzung von Luminol katalysiert. Diese Lumineszenzintensität wurde am Ende detektiert und repräsentiert die Proteinmenge.

4.2.18 Test der mitochondrialen Integrität

30 µg isolierte Mitochondrien wurden in 100 µl Lösung B-Puffer (Hefemitochondrien in SEM-Puffer) versetzt und die Stressbedingungen bzw. eine Probe mit Lysepuffer lysiert. Die Mitochondrien wurden anschließend mit Proteinase K (f.c. 73 µg/ml) versetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert, außer der -PK-Probe. Im nächsten Schritt wurde 1,5 µM PMSF zu jeder Probe hinzugegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Proben (außer lysierte Mitochondrien) bei 12.000 ×g, 5 Minuten, 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die entstandenen Pellets wurden in dem entsprechenden Puffer (Lösung B (Säugetiermitochondrien) / SEM (Hefemitochondrien)) resuspendiert. Im anschließenden Schritt wurden alle Proben mit 10 µl 50 % TCA versetzt und bei 60 °C für 5 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis erneut für 5 Minuten inkubiert. Im abschließenden Schritt wurden alle Proben bei 12.000 ×g, 5 Minuten, 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen und die entstandenen Pellets in 1 x Laemmli resuspendiert und die Gelbfärbung durch 2 µl von 1,875 M Tris pH 8,8 zu Blau verhindert.

4.2.19 Lösen der Dimer A β und α -syn(61-95) Aggregaten

Die lyophilisierten Peptide (Tabelle 10) wurden mit 40 μ l 50 mM NaOH gelöst und mit 1 M Tris Puffer (pH 7,4) so versetzt, dass nach Zugabe von 40 μ l 50 mM HCl eine 100 μ M Aggregatlösung entstand, welche dann bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert, danach bei 4 °C für die Experimente aufbewahrt oder per N₂ gefroren und bei -80 °C gelagert wurde.

4.2.20 Lösen der A β 40 und A β 42-Peptide

Die lyophilisierte Peptiden (Tabelle 10) wurden mit 40 μ l 50 mM NaOH gelöst und mit 1 M Tris Puffer (pH 7,4) so versetzt, dass nach Zugabe von 40 μ l v50 mM HCl eine 200 μ M Aggregatlösung entstand und per flüssigen N₂ gefroren und bei -80 °C gelagert wurde.

4.2.21 Import in isolierten Mitochondrien aus Säugetierzelllinien

Nach der Isolierung wurden 50 μ g Mitochondrien mit einem Mastermix (220 μ l) versetzt, welcher den Mitochondrien optimale Importbedingungen ermöglicht. In einem Importexperiment wurden neben der Mock (Probe ohne Mitochondrien) auch die AVO-Probe (Mitochondrien ohne Membranpotential) als Kontrollen eingebaut. Nach Inkubation von 3 Minuten bei 30 °C wurden die Mitochondrien mit Präprotein SDCSH versetzt, welches vorher je nach Konzentration in Dialysepuffer verdünnt und bei 5 Minuten, 4 °C und 20.000 $\times$ g abzentrifugiert wurde, um nur zurückgefaltetes Präprotein zu den Mitochondrien hinzuzuführen. Die Menge an Totalprobe (vor der Zentrifugation) und Loadproben wurde in der Auswertung berücksichtigt und berechnet, wie viel am Ende zu den Mitochondrien gelangt ist. Nach den für das Experiment entsprechenden Zeitpunkten wurde zu dem Import 2,2 μ l Valinomycin (f.c. 1 μ M) versetzt und die Proben auf Eis gestellt, bis alle Proben vom Experiment abgestoppt waren. Nun wurden die Proben (220 μ l) in 2 mal 100 μ l aufgeteilt, um einmal die Proben mit Proteinase K (2,5 mg/ml, f.c. 73 μ g/ml) zu versetzen und einmal nicht (-PK). Nach 30 Minuten auf Eis wurden alle Proben mit 1,2 μ l PMSF (100 mM, f.c. 1,2 mM) versetzt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 12.000 $\times$ g, 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 μ l Lösung B + 0,2 mM PMSF resuspendiert. Danach

wurden die Proben mit 10 µl 50 % TCA (f.c. 5 %) versetzt und 5 Minuten bei 60 °C inkubiert. Eine weitere 5 Minuten Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation (12.000 ×g, 4 °C, 5 Minuten) später wurden die Überstände verworfen und die Pellets in 20 µl 1xLaemmli resuspendiert.

4.2.22 Import in isolierten Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*

Isolierte Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* (50 µg) wurden pro Zeitpunkt in einem Mastermix von 220 µl versetzt, wobei wie in Importexperimenten mit Säugetiermitochondrien auch die Kontrolle ohne Membranpotential und Mock (ohne Mitochondrien) zu dem eigentlichen Importexperiment hinzugefügt wurden. Ebenfalls wurden Totalprobe (50 %) und Loadproben (50 %, 20 %, 10 %) vor dem Experiment vom SDCSH genommen, um bei der Detektion und Auswertung die Menge an importiertem Protein zu bestimmen. Der Import wurde bei 25 °C durchgeführt und mithilfe von Valinomycin (f.c. 1 µM) abgestoppt. Im darauffolgenden Schritt wurden die Proben wieder auf zwei Eppendorfgefäße je 100 µl aufgeteilt und die eine Menge mit Proteinase K behandelt (f.c. 73 µg/ml). Nach 30 Minuten auf Eis wurden alle Proben mit 1,2 µl PMSF (100 mM, f.c. 1,2 mM) behandelt und nochmal für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 12.000 ×g, 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden nun mit 300 µl SEM (PMSF f.c. 1 mM) gewaschen und erneut bei 12.000 ×g, 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden wieder verworfen und die Pellets in 20 µl 1xLaemmli (PMSF, f.c. 1 mM) aufgenommen und per SDS-PAGE analysiert.

4.2.23 Quantifizierung der m-Banden Intensität

Nach der Detektion des Imports via Fluoreszenzscanner (Anregungswellenlänge: 473 nm, Emissionsfilter: LPB) wurden mithilfe des Programms Multigauge (Fujifilm) die m-Banden (+Proteinase K) quantifiziert und der jeweilige Hintergrund substrahiert. Neben den Importproben wurden auch die Kontrollen (Totalprobe (50 %) / Loadproben (50 %, 20 %, 10 %) quantifiziert, um eine Standardkurve pro Experiment zu bestimmen. Anhand dieser

Standardkurve wurden die Intensitäten in pmol der quantifizierten m-Banden ermittelt.

4.2.24 Auswertung der Importgeschwindigkeit

Iterationsverfahren mit Solver (Excel) und Importgeschwindigkeitsbestimmung

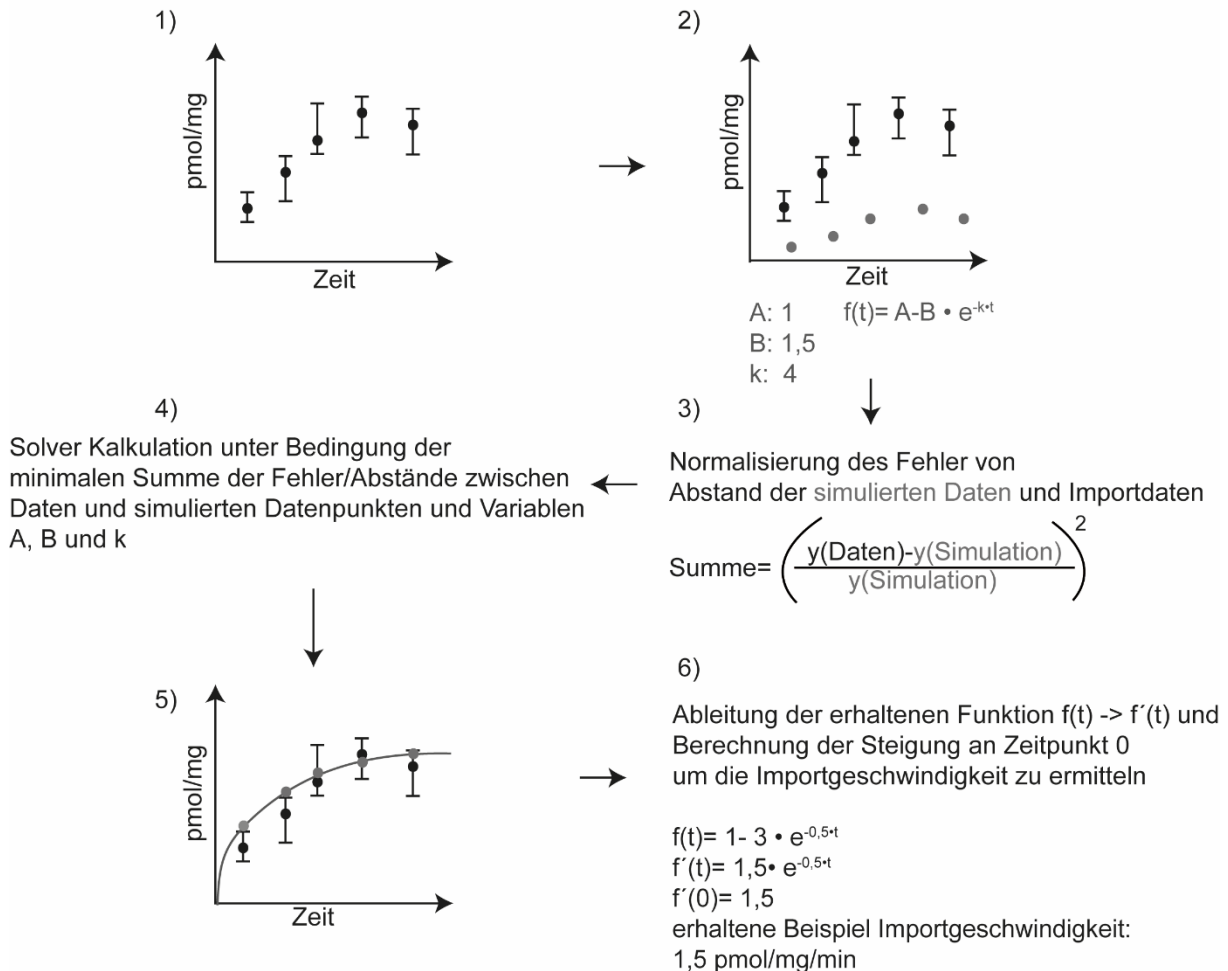


Abbildung 7: Auswertung der maximalen Importgeschwindigkeit. 1) Auftragung der ermittelten pmol/mg Werte aus den m-Bandenintensitäten (+PK) gegen die Zeit 2) Simulation von Daten mithilfe der Funktion $f(t) = A - B \cdot e^{-k \cdot t}$ durch freies Wählen der Variablen A, B und k 3) Normalisierung des Fehlers von dem Abstand der simulierten Daten und Importdaten 4) Solverkalkulation unter Bedingung der minimalen Fehlersumme des normalisierten Fehlers unter Anpassung der Variablen A, B und k 5) Bestimmung der e-Funktion $f(t)$ und Darstellung im Graphen mit den Importdaten 6) Ableitung der erhaltenen Funktion $f(t)$ zu $f'(t)$ und Berechnung der Steigung an Zeitpunkt 0 um die maximale Importgeschwindigkeit ermitteln

Die Intensitäten der m-Banden (+PK) wurden pro Zeitpunkt mit Multigauge quantifiziert. Die Kontrollen (Totalprobe (50 %) / Loadproben (50 %, 20 %, 10 %)

wurden ebenfalls quantifiziert, um eine Standardkurve pro Experiment zu bestimmen. Anhand dieser Standardkurve wurden die Intensitäten in pmol ermittelt und durch die eingesetzte Mitochondrienmenge (50 µg) geteilt. Die erhaltenen pmol/25µg konnten nun mit dem Faktor 40 multipliziert werden, um pmol/mg-Werte zu erhalten. Diese pmol/mg-Werte konnten pro Experiment ermittelt werden und aus den verschiedenen Wiederholungen des Experiments konnte ein Mittelwert für jeden Zeitpunkt bestimmt werden. Um die Importgeschwindigkeit bestimmen zu können, wurde mithilfe der Funktion „Solver“ bei Excel das Iterationsverfahren nach Marquardt-Levenberg (Docherty et al. 2012) durchgeführt. Dabei werden die erhaltenen Mittelwerte pro Zeitpunkt und ebenfalls simulierte Daten der Sättigungsfunktion $f(t)=A-B \cdot e^{-kt}$ grafisch aufgetragen. Durch die Chi-Summe der Normalisierung des Fehlers (Abstand Daten und simulierte Daten) ergibt sich die Möglichkeit, durch den Solver die kleinstmögliche Fehlersumme (Zielfenster), durch Anpassungen der Variablen A, B und k zu ermitteln (**Abbildung 7**). Die dadurch erhaltene Funktion, kann durch die 1. Ableitung zu $f'(t)=Bk \cdot e^{-kt}$ umgerechnet werden und die Steigung zu Zeitpunkt 0 ($f'(0)$) ergibt am Ende die Importgeschwindigkeit. Die erhaltenen maximalen Importgeschwindigkeiten wurden durch diese Rechnung per Solver bestimmt und wurden grafisch durch Graphpad aufbereitet.

4.2.25 Hitzestressexperimente

Die isolierten Säugetiermitochondrien wurden bei verschiedenen Temperaturen (37 °C, 42 °C, 45 °C) für 15 Minuten im Mastermix inkubiert und der Import wurde bei 30 °C durchgeführt. Die isolierten Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden bei verschiedenen Temperaturen (37 °C, 42 °C, 45 °C) für 10 Minuten inkubiert und der Import wurde bei 25 °C durchgeführt. Importexperimente mit den Säugetiermitochondrien bei 37 °C wurden durchgängig bei dieser Temperatur durchgeführt.

4.2.26 ROS-Behandlung von isolierten Mitochondrien (HeLa Mitochondrien)

Die isolierten Mitochondrien wurden mit H_2O_2 bei 30 °C mit verschiedenen Konzentrationen für 15 Minuten behandelt. Nach Zentrifugation der Mitochondrien bei 12.000 $\times g$ für 5 Minuten, 4 °C, wurden die Mitochondrienpellets wieder resuspendiert und in den entsprechenden Experimenten verwendet.

4.2.27 Zytosol-Isolierung

Um das Zytosol von HeLa-Zellen zu isolieren, wurden Zellen von 15-cm-Platten mit 1xPBS gewaschen und mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellen wurden bei 300 $\times g$, 5 Minuten, 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 4,5 ml Lösung B aufgenommen. Die Zellen wurden 45 Minuten in diesem Puffer schwellen gelassen. Nach dieser Zeit wurden die Zellen bei 5 Sekunden an, 60 Sekunden aus (geringe Einstellung, 5 Zyklen) im Bioruptor lysiert. Danach wurden die Proben bei 1500 $\times g$ für 5 Minuten, 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand in neues Eppendorfgefäß pipettiert und das Pellet erneut in 4,5 ml Lösung B resuspendiert. Die Bioruptorbehandlung wurde wie bei der Mitochondrienisolation nochmal wiederholt und die weiteren Zentrifugationsüberstände wurden gesammelt. Die Proben wurden im nachfolgenden Schritt bei 12000 $\times g$ für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der daraus resultierende Überstand weiter in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet stellt hier die Mitochondrienfraktion dar. Der Überstand wurde nun bei 125.000 $\times g$ für 40 Minuten, 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und ebenfalls der Überstand als Probe wieder gesammelt. Das Pellet dieser Zentrifugation stellt die ER-Fraktion dar. Um die Überstände (Zytosol-Fraktion) weiter aufzukonzentrieren, wurden sie mithilfe des Vivaspin 6 Ultrafiltrationskonzentrator (10000 Da) und mehrerer Zentrifugationsschritte bei 8000 $\times g$ und 30 Minuten (4 °C) konzentriert. Wenn ein Volumen des Zytosols von 500 μl erreicht wurde, konnte die Proteinkonzentration des Zytosols mithilfe der Bradfordmethode bestimmt werden.

4.2.28 Ganzzellimport

In einem weiteren Experiment wurde die Importeffizienz von SDCSH in Digitonin-behandelten HeLa-Zellen überprüft. Die Zellen wurden dafür gezählt (600.000 Zellen pro Importansatz) und diese Zellen einmal pelletiert bei 300 ×g und mit 1xPBS zweimal gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden dann mit Digitonin behandelt und in den Import eingesetzt. Nach 10 und 40 Minuten wurde der Import mit SDCSH mit Valinomycin abgestoppt. Als Kontrollen wurden hier wieder eine Mock-Probe (nur Präprotein, ohne Mitochondrien) und mit AVO behandelte Mitochondrien verwendet. In einem weiteren Ansatz wurde der gleiche Import für 40 Minuten mit dem radioaktiven Präprotein Su9(70)-DHFR durchgeführt.

4.2.29 Filterretardierungstest

Der Filterretardierungstest wurde mit 0,05 µM SDCSH und einer Titration von Aβ40 und Aβ42 durchgeführt. Am Anfang dieses Experiments wurde SDCSH mit Aβ40 oder Aβ42 im Importpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Acetatmembran und Nitrocellulosemembran wurden geschnitten und in Waschpuffer (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit einem Volumen von 50 µl in einen Dot-Blot-Apparat mithilfe eines Vakuums durchgesaugt und 5 mal mit 100 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem Durchsaugen der Proben wurden die Membranen mithilfe des Fluoreszenz-Scanners (Anregungswellenlänge: 473 nm, Emissionsfilter: LPB) detektiert und danach mithilfe eines Aβ-Antikörpers dekoriert.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung und Etablierung des fluoreszierenden rekombinanten Präproteins SDCSH für den *in organello* Import

Die Etablierung und Charakterisierung eines fluoreszierenden rekombinanten Präproteins wurden in mehreren Schritten durchgeführt. Die ersten Schritte betrafen die Herstellung, Rückfaltung und die Fluoreszenzmarkierung des SDCSH. In den weiteren Schritten wurden die Messung und die Sensitivität des SDCSH-Signals analysiert und die Importreaktion in isolierten Mitochondrien von YPH499/HeLa-Zellen durchgeführt. Im letzten Schritt in diesem Abschnitt wurde die Importkinetik von YPH499 bei verschiedenen SDCSH-Konzentrationen bestimmt.

5.1.1 Herstellung, Rückfaltung und Labelingoptimierung von SDCSH

Um die mitochondriale Importkinetik *in organello* zu analysieren, wurde das Präprotein SDCSH von (Bruderek et al., Michael 2016) kloniert. SDCSH setzt sich aus der mitochondrialen Präsequenz Su9 von *N. crassa*, DHFR (Dihydrofolatreduktase), welches ursprünglich aus der Maus stammt, und dem Strep-Tag aus *Streptomyces avidinii*, zusammen. Außerdem wurde zur Aufreinigung ein His-Tag an das C-terminale Ende angehängt. Die internen Cystein-Reste in der DHFR-Domäne wurden während der Klonierung entfernt. Am C-terminalen Ende des DHFRs wurde ein Cystein-Rest eingefügt (**Abbildung 8**). Dieser Cystein-Rest diente dazu, dass exprimierte Präprotein mithilfe der Maleimid-Thiol-Reaktion mit Fluorescein zu modifizieren. Das Präprotein konnte durch einen Fluoreszenz-Scanner (Anregungswellenlänge: 473 nm, Emissionsfilter: LPB-Filter) im Gel detektiert werden (**Abbildung 8**).

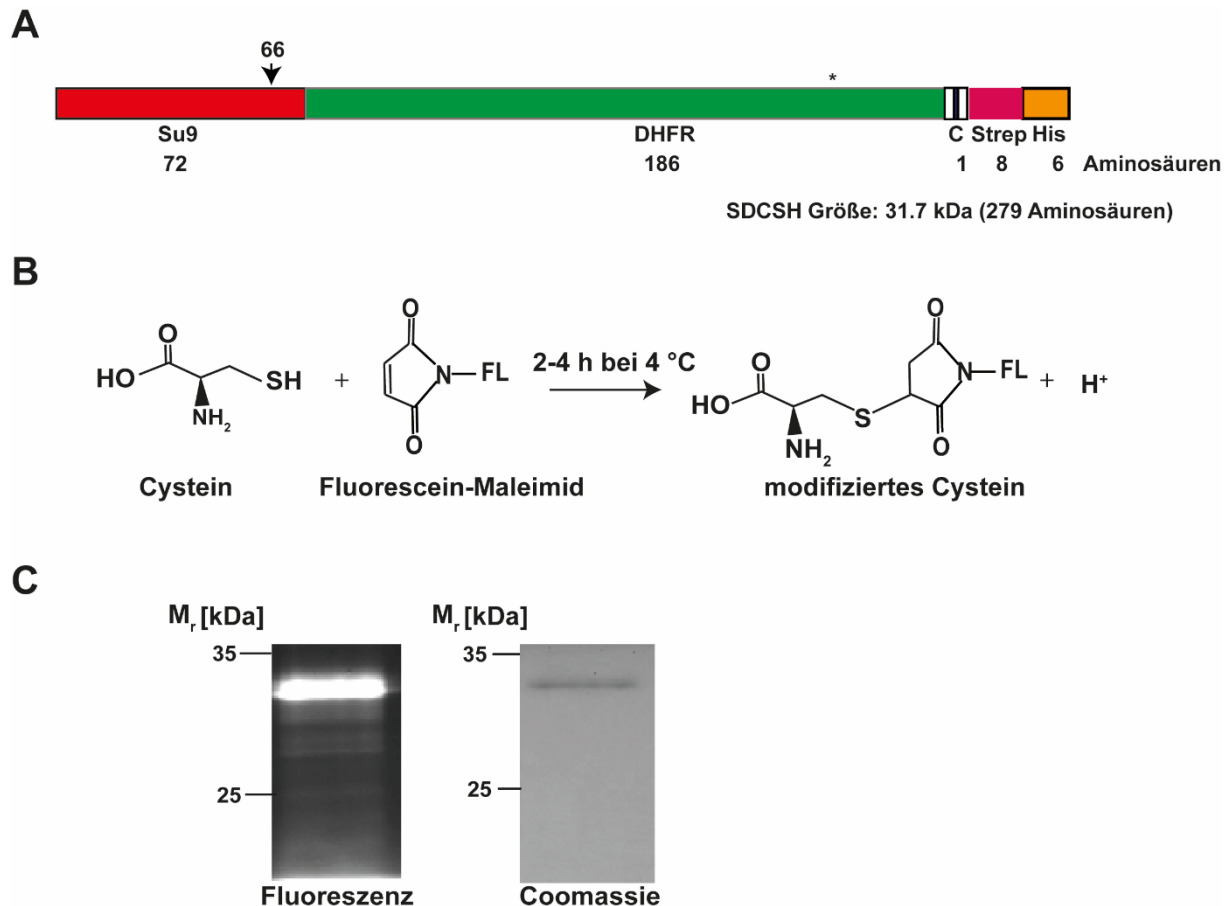


Abbildung 8: Struktur und Fluoreszenzmarkierung des Präproteins SDCSH A) Schematische Struktur des Präproteins SDCSH. Die MPP-Schnittstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet und der deletierte Cysteinrest ist mit einem Stern gekennzeichnet B) Maleimid-Thiol Reaktion vom Cysteinrest mit Fluorescein-Maleimid C) Detektion vom modifizierten SDCSH via Fluoreszenz-Scanner im Vergleich zum Coomassie gefärbten Protein

Die Expression von SDCSH zeigte, dass SDCSH in *E. coli* nur in Form von Einschlusskörpern vorliegt. Das exprimierte Präprotein wurde nach der Lyse in der Pelletfraktion aufgefunden. Die Lyse der Bakterien und die Aufreinigung des Präproteins wurden demnach so optimiert, dass die Pelletfraktion in 6 M Urea-Puffer aufgenommen wurde, und somit nicht zurückgefaltetes SDCSH in Lösung enthält (**Abbildung 9**). In weiteren Experimenten wurde ein Protokoll zur Rückfaltung entwickelt, das eine 1:40 Verdünnung in Argininpuffer und anschließende Dialyse beinhaltet. Durch das langsame Diffundieren des Harnstoffs durch die Dialysemembran, kommt es zu einem graduellen Abstieg der Harnstoffkonzentration in der Dialysekapsel, was die intramolekularen Wechselwirkungen der Proteinketten favorisiert und damit eine Rückfaltung des

Präproteins ermöglicht. Nach der Inkubation wurde das Präprotein fluoreszenzmarkiert und auf mögliche Aggregation überprüft. Die Tendenz des SDCSH zu aggregieren, zeigte sich auch noch nach der Dialyse und nach der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff (**Abbildung 9**). Um die Faltung des SDCSH zu kontrollieren, wurde ein Import mit Methotrexat (MTX) durchgeführt. Methotrexat kann nur an der gefalteten DHFR-Domäne binden und die Proteinstruktur so stabilisieren, dass der mitochondriale Import nicht mehr möglich ist. (**Abbildung 9**). Als zusätzliche Kontrolle wurde die Zugabe von MTX zu SDCSH, welches in 6 M Urea-Puffer gelöst wurde, analysiert und zeigte Prozessierung des ungefalteten SDCSHs.

In weiteren Optimierungsexperimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass die Rückfaltung durch reduzierendes DTT (f.c. 1 mM) nicht beeinträchtigt wurde und die Hintergrundfluoreszenz von nicht gelabeltem Farbstoff reduziert werden konnte (**Abbildung 9**).

Durch diese Experimente konnte die Rückfaltung von SDCSH experimentell etabliert werden.

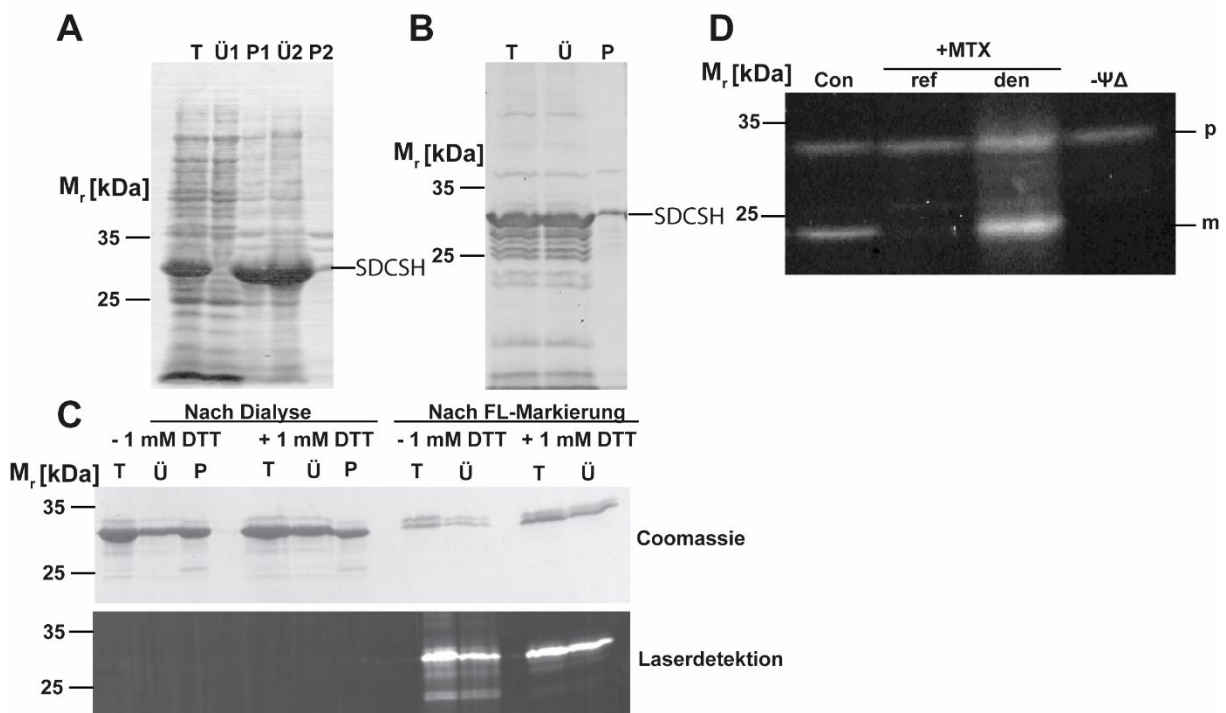
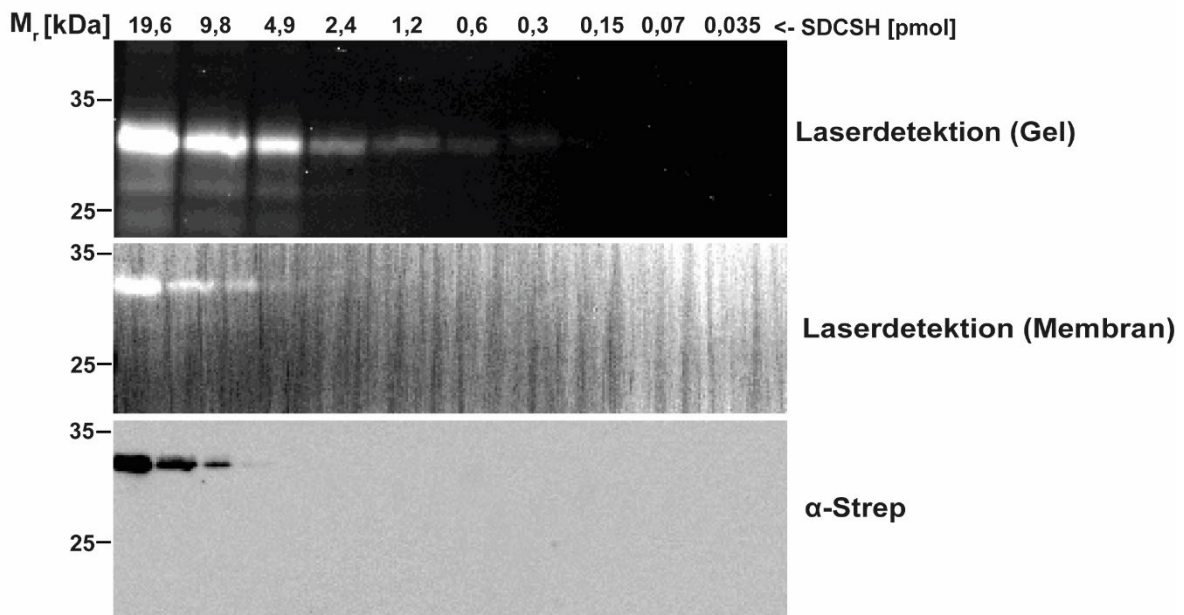


Abbildung 9: Expression, Rückfaltung (+/- 1 mM DTT) und Kontrollimport (+/- Methotrexat) von SDCSH. A) Expression von SDCSH führte zur Aggregation des exprimierten Präproteins. Das Lösen des Pellets P1 in 6 M Urea Puffer (Ü2, Überstand 2) führte zu einer Rückgewinnung des Präproteins in Lösung unter denaturierten Bedingungen. Das Pellet P2

zeigte nach Lösung des Präproteins immer noch Rückstände von nicht gelösten Präprotein B) Stabilisierung des Präproteins durch 1:40 in 1 M Argininpuffer (10 mM MOPS pH 7,4) und anschließendem Aggregationstest führte zu mehr SDCSH in Ü (Überstand) und kaum in der Pelletfraktion (P) C) Rückfaltung/Stabilisierung des Präproteins durch 1:40 Verdünnung in 1 M Argininpuffer (10 mM MOPS pH 7,4) und anschließender Dialyse (+/- 1 mM DTT) über Nacht bei 4 °C führte zur Rückfaltung des Präproteins mit anschließender Thiol-Maleimid Reaktion. Total (T), Überstand (Ü) und Pelletfraktion (P) wurden nach der Dialyse und nach Fluoreszenzmarkierung mithilfe Coomassiefärbung und Detektion via Fluoreszenz-Scanner analysiert D) Nachweis der Rückfaltung des Präproteins via Bindung des Methotrexat an die zurückgefaltete DHFR-Domäne. Diese Bindung verhindert den Import, welcher aber in denaturierenden (7 M Urea Puffer) wieder aufgehoben werden kann. Con: Kontrollimport ohne Methotrexat (MTX), $-\Psi\Delta$ steht für AVO-behandelte Mitochondrien ohne Membranpotential, ref: Import mit zurückgefalteten SDCSH, den: Import mit denaturierenden SDCSH, p: Präform des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs

Um die Sensitivität der SDCSH Detektion zu ermitteln, wurden verschiedene Mengen SDCSH in Probenpuffer (Laemmli) gegeben und via SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Signale durch den Fluoreszenz-Scanner detektiert und das Gel daraufhin noch auf eine PVDF-Membran transferiert und nochmals mit dem Fluoreszenz-Scanner detektiert. Außerdem wurde der StrepTag der Präproteine noch mit Anti-Strep Antikörpern detektiert. Die Ergebnisse der Titrations des SDCSH konnten zeigen, dass die Menge von SDCSH im linearen Verhältnis zur Fluoreszenzintensität steht, welches eine genaue Bestimmung der Proteinmenge ermöglicht (**Abbildung 10**). Die Nachweisgrenze wurde anhand der ermittelten Intensitäten der verschiedenen Titrations durch die Steigung (S) der Regressionsgeraden und der Standardabweichung der y-Achsenabschnitten (σ) mathematisch bestimmt. Eine Nachweisgrenze konnte durch die Formel $3,3 \cdot \sigma/S$ berechnet werden. Es konnte dadurch eine Nachweisgrenze für das SDCSH Fluoreszenzsignal von 0,3 pmol (9,5 ng) festgestellt werden (**Abbildung 10**).

A



B

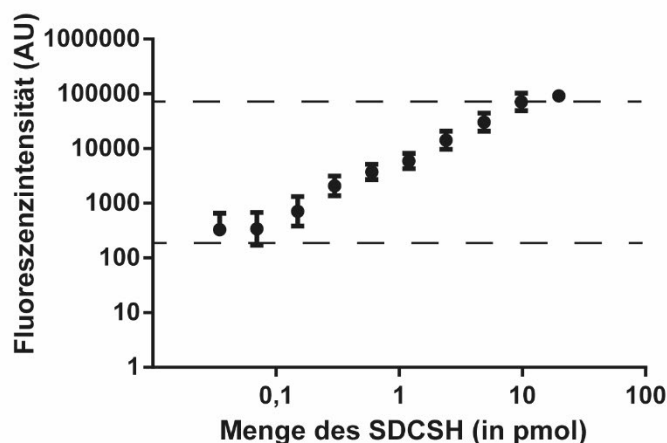


Abbildung 10: Titration und Sensitivität des Präproteins SDCSH A) Vergleich der Fluoreszenzsignale von verschiedenen Mengen in pmol von SDCSH im Gel, nach der Western-Blot-Detektion via Strep Antikörper B) Auswertung der Fluoreszenzintensität gegen Menge von Protein in pmol y-Achse: logarithmische Auftragung der Fluoreszenzintensität; x-Achse: eingesetzte Proteinmenge in pmol (n=3); gestrichelte Linien markieren den linearen Bereich

In weiteren Experimenten konnte die Fluoreszenzmarkierung des SDCSH bei 4 °C analysiert werden. Um die Michael-Addition besser verfolgen zu können, wurden vor und nach Zugabe des Fluorescein-Maleimids Proben genommen und das SDCSH-Signal via Fluoreszenz-Scanner nach einer SDS-PAGE detektiert. Das stärkste Signal konnte nach 2 Stunden beobachtet werden und somit die Dauer für die Markierung des SDCSH ermittelt werden (**Abbildung 11**).

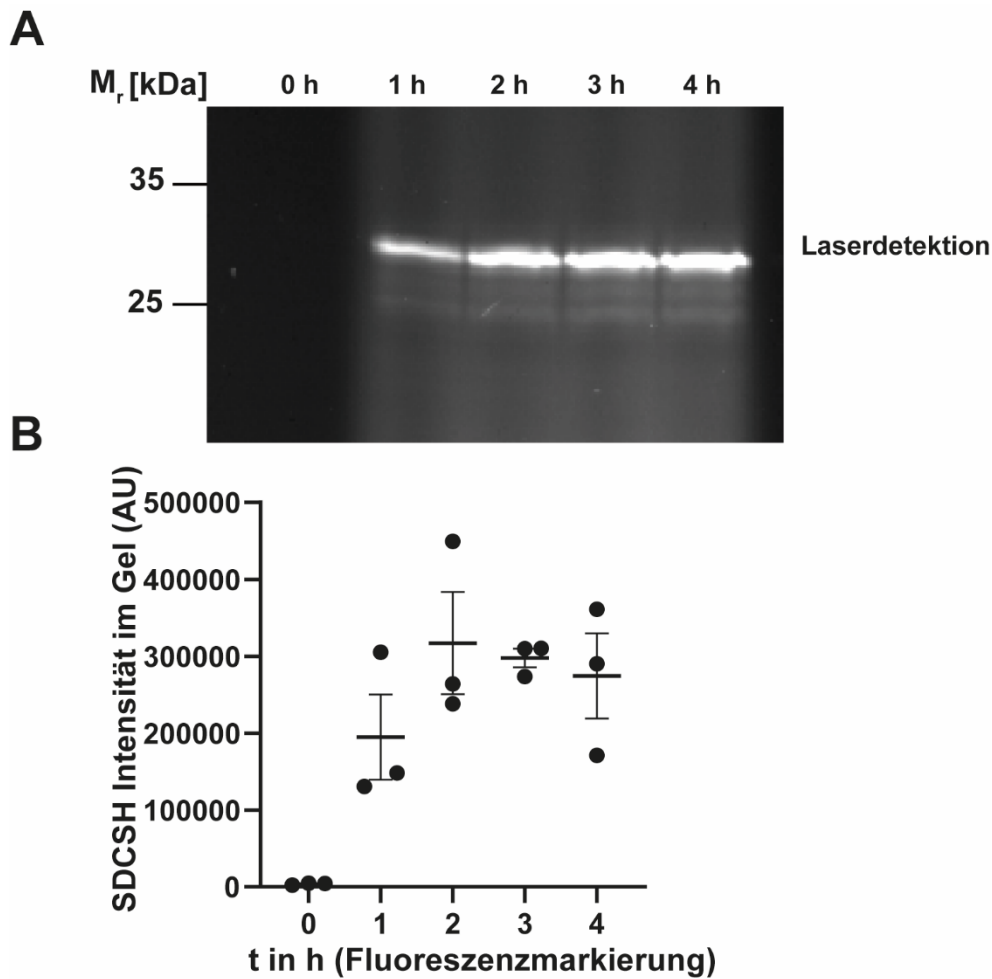


Abbildung 11: Optimierung der Reaktionszeit für die Fluoreszenzmarkierung. A) Fluoreszenzmarkierungsreaktion wurde bei Eis für 4 Stunden durchgeführt. Proben wurden nach mehreren Stunden entnommen und per Fluoreszenz-Scanner (Anregungswellenlänge: 473 nm; Emissionsfilter: LPB-Filter) analysiert. B) 3 verschiedene Ansätze wurden quantifiziert (x-Achse t in h und SDCSH-Intensität auf der y-Achse; Fehlerbalken: SEM)

Ein weiteres Ergebnis der Etablierung dieser Methode sollte die Frage beantworten, ob SDCSH mehrfach im Gel detektiert werden kann, ohne an Signalstärke zu verlieren. Dies wurde mithilfe von 10 pmol bis 1 pmol des verwendeten Präproteins überprüft. Leichte Schwankungen konnten bei den Messungen von 1 pmol festgestellt werden, welche sich aber nicht weit vom Anfangswert unterschieden. Anhand dieser Datenverläufe konnte kein Signalverlust nach mehrfacher Detektion via Fluoreszenz-Scanner nachgewiesen werden (**Abbildung 12**).

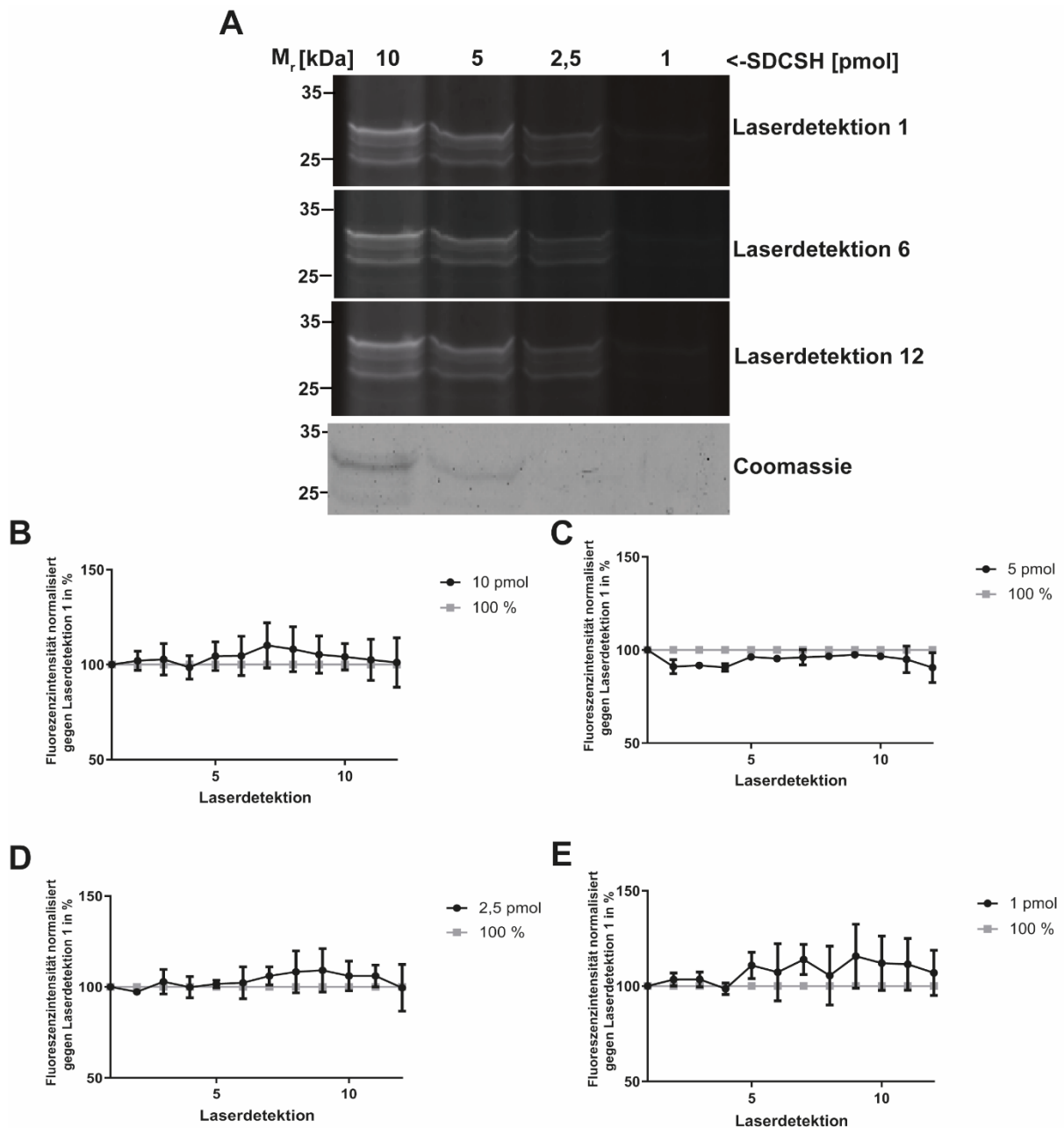


Abbildung 12: Fluoreszenzstabilität des SDCSHs nach mehrfacher Detektion. A) SDCSH-Titration von 10 pmol – 1 pmol wurden in einer SDS-PAGE und per Fluoreszenz-Scanner (Anregungswellenlänge: 473 nm, Emissionsfilter: LPB-Filter) mehrfach detektiert. Abschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Die Fluoreszenzintensität der ersten Detektion von B) 10 pmol, C) 5 pmol, D) 2,5 pmol, E) 1 pmol wurde auf 100 normalisiert und die Bandenintensität der nachfolgenden Detektionen besser in Relation zur ersten Detektion zu setzen. (n=2, Fehlerbalken: SEM)

5.1.2 Etablierung des *in organello* Imports mit fluoreszenzmarkiertem SDCSH in isolierten HeLa- und YPH499-Mitochondrien

Nach Charakterisierung des Präproteins sowie Optimierung der Rückfaltung und Fluoreszenzmarkierungsbedingungen wurden weitere Experimente zur Etablierung des Imports mit fluoreszenzmarkiertem SDCSH in isolierten Säugetiermitochondrien und Hefemitochondrien durchgeführt. Es zeigte sich bei *in organello* Experimenten, dass die Detektion des Imports durch unspezifische Banden gestört wird. Diese Banden werden durch ungebundenes Fluorescein-Maleimid hervorgerufen. Um eine Optimierung des Signals/Rauschverhältnisses im Import durchzuführen, wurde das Membranpotential der Hefemitochondrien durch AVO (Antimycin A, Valinomycin, Oligomycin) geblockt und nur die Hintergrundfluoreszenz analysiert. Es wurden verschiedene Konzentrationen von DTT eingesetzt, um die Wirkung des DTTs auf das nicht gebundene Fluorescein-Maleimid zu beobachten (**Abbildung 13**).

Es zeigte sich, dass schon f.c. 2,2 mM von DTT ausreichen, um unspezifische Fluoreszenzsignale zu inhibieren und so eine verbesserte Visualisierung der Importergebnisse zu ermöglichen (**Abbildung 13**).

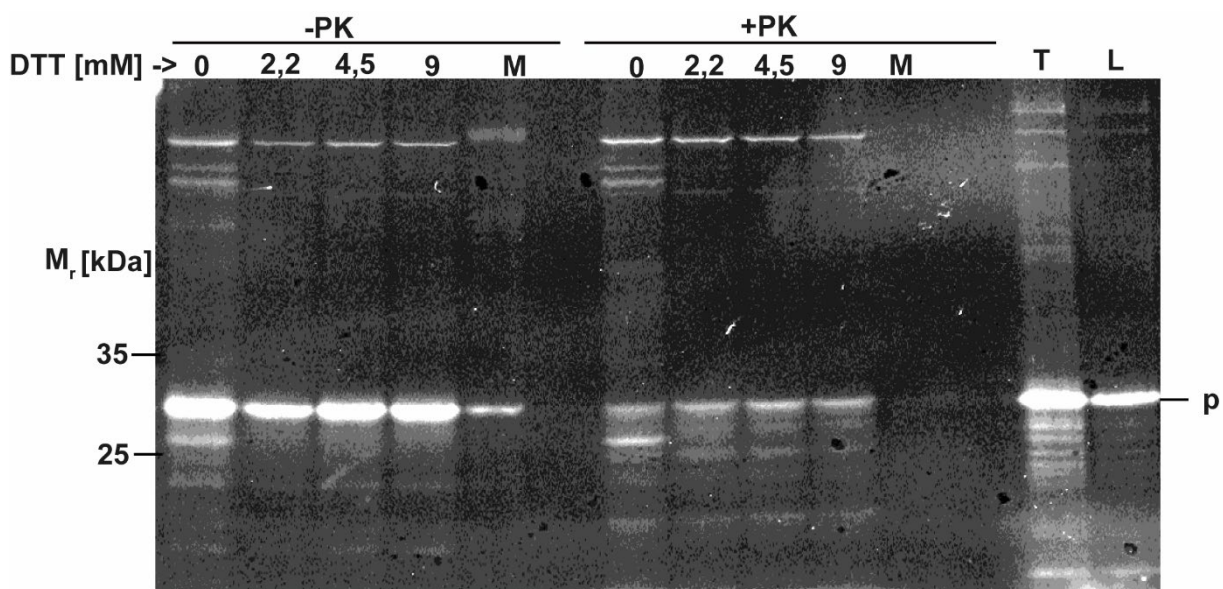


Abbildung 13: Hintergrundrauschen des SDCSHs und DTT-Titration. Isolierte Hefemitochondrien wurden mit AVO behandelt, um den Import zu blockieren. Neben AVO wurden verschiedene Mengen an DTT (2,2-9 mM) zu den Proben gegeben. Nach Inkubation mit SDCSH und PK-Verdau, wurden die Proben in einem SDS-PAGE laufen gelassen und die Hintergrundfluoreszenz via Fluoreszenz-Scanner (Anregungswellenlänge: 473 nm,

Emissionsfilter: LPB-Filter) analysiert. Mock (M): ohne Mitochondrien. PK: Proteinase K-Behandlung, T: 50 % Totalprobe, SDCSH-Lösung vor einem 20.000 ×g, 5 Minuten Zentrifugation. L: 50 % Probe der SDCSH-Lösung nach 5 Minuten Zentrifugation mit 20.000 ×g

Als Vergleich, um die Importeffizienz von SDCSH zu kontrollieren, wurde SDCSH radioaktiv mit [³⁵S]-Methionin gelabelt. Da das ursprüngliche Plasmid pWJ10 (**Abbildung 60**) einen T7-Promotor aufweist, wurde eine Überhang-PCR durchgeführt, um den T7-Promotor zu einem SP6-Promotor zu wechseln (**Abbildung 14**). Das Kit war für den SP6-Promotor ausgelegt, weswegen der Promotor gewechselt werden musste. Das PCR-Produkt konnte dann in einer gekoppelten Transkription/Translation mit [³⁵S]-Methionin zu SDCSH translatiert werden. Translationsprodukte wurden mithilfe einer SDS-PAGE und Filmdetektion kontrolliert und in Importexperimenten eingesetzt (**Abbildung 14**).

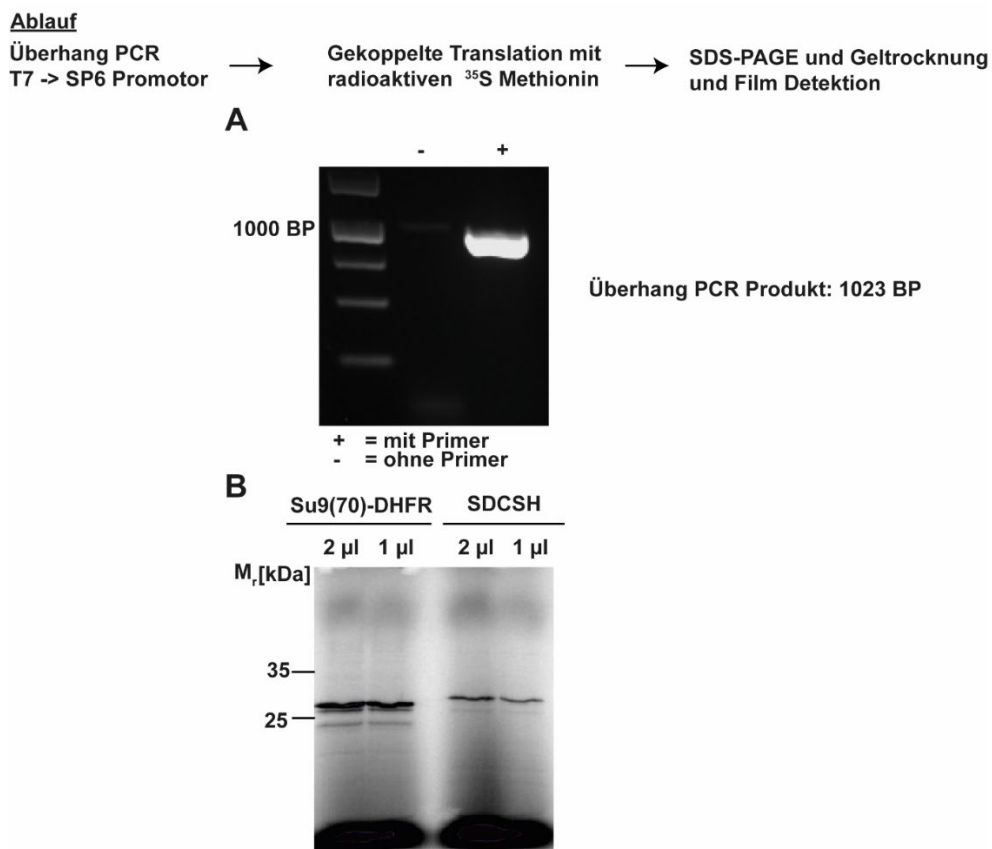
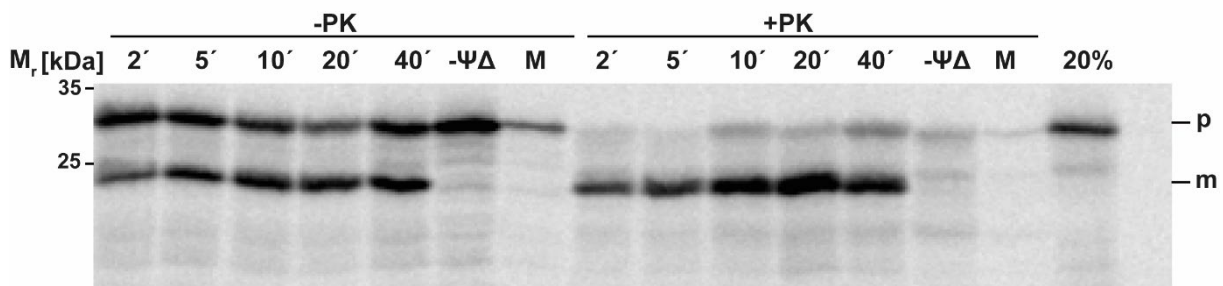


Abbildung 14: Überhang-PCR und gekoppelte Translation von SDCSH. A) Die Analyse des PCR-Produkts der Überhang PCR (T7 → SP6-Promotor) von SDCSH mithilfe eines 1% Agarosegels ergab die richtige Basenpaargröße (BP). B) Die gekoppelte Translation durch Zugabe der PCR ergab radioaktives SDCSH mit der richtigen Größe. Su9(70)-DHFR konnte ebenfalls translatiert werden. Die Detektion der Translationsprodukte (1 µl, 2 µl) erfolgte nach einer SDS-PAGE und anschließender Gel Trocknung.

Es zeigte sich in ersten Importexperimenten (**Abbildung 15, Abbildung 16**), dass SDCSH in isolierten Hefemitochondrien, sowie in isolierten HeLa-Mitochondrien importiert wird. Die Intensitäten der m-Bande zeigten einen Anstieg mit zunehmender Importzeit.

Es konnte in radioaktiven Experimenten ähnliche Verläufe für den Zeitraum von 2 Minuten bis 40 Minuten festgestellt werden (**Abbildung 15, Abbildung 16**). In den Importexperimenten mit isolierten HeLa-Mitochondrien zeigte sich bei der radioaktiven sowie Fluoreszenzdetektion des Imports die intermediäre Form (i-Bande) des Präproteins. Die intermediäre Form (i-Form) entsteht, weil die Präsequenz von Su9 zwei MPP-Schnittstellen aufweist (Bömer et al. 1998). Durch Prozessieren der MPP-Schnittstelle in der Mitte der Präsequenz kommt es zur Bildung dieser Zwischenstufe (Bömer et al. 1998). Erst wenn das N-terminale Ende des Präproteins die Matrix erreicht, kommt es zur erneuten Prozessierung und dadurch zur Bildung der m-Form (Bömer et al. 1998). Die Bildung dieser intermediären Form des Präproteins könnte auf einen verlangsamten Import hindeuten.

A



B

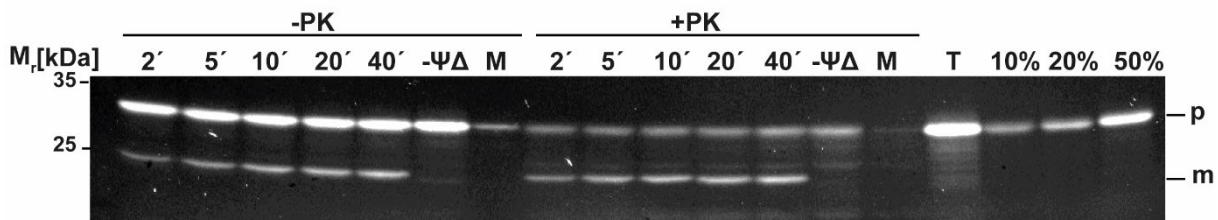


Abbildung 15: Import von radioaktiven SDCSH und fluoreszenzmarkierten SDCSH in isolierten YPH499-Mitochondrien. Import A) von radioaktiven SDCSH und B) fluoreszenzmarkierten SDCSH in YPH499-Mitochondrien über Zeit (50 µg per Laufbahn). -ΨΔ steht für Mitochondrien ohne Membranpotential. M steht für Mock Import ohne Mitochondrien. Es konnte ein zunehmender Import mit dem Maximum schon nach 10 Minuten festgestellt werden. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature

(Reife) Form des SDCSHs, T: 50 % Totalprobe, SDCSH-Lösung vor einem 20.000 ×g, 5 Minuten Zentrifugation. L: 50 % vom gefalteten SDCSH nach Zentrifugation

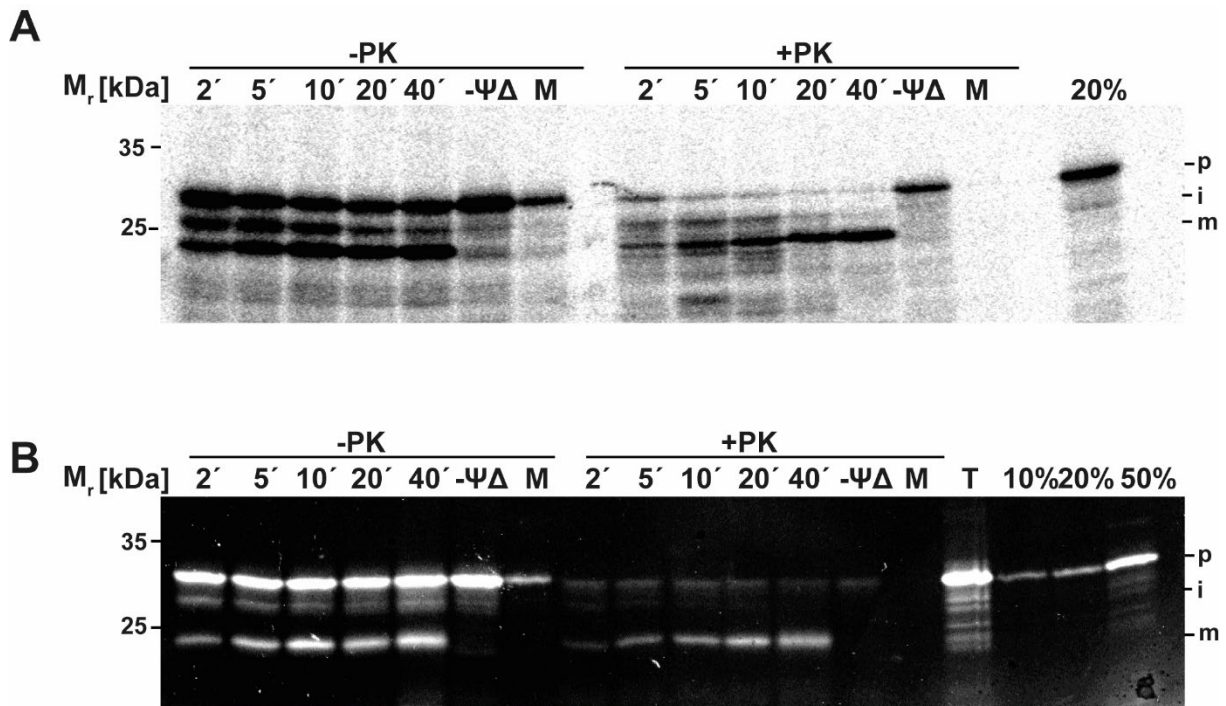


Abbildung 16: Import von radioaktiven SDCSH und fluoreszenzmarkierten SDCSH in isolierten HeLa-Mitochondrien. Import von A) radioaktiven und B) fluoreszenzmarkierten SDCSH in HeLa-Mitochondrien (50 μ g pro Laufbahn). - $\Psi\Delta$ steht für Mitochondrien ohne Membranpotential. M steht für Mock Import ohne Mitochondrien. Es konnte einen zunehmenden Import mit dem Maximum schon nach 40 Minuten festgestellt werden. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs, i: Intermediäre Form des SDCSHs

Neben den Experimenten mit isolierten Mitochondrien wurde SDCSH in einem Ganzzellimportexperiment, ohne vorherige Isolierung der Mitochondrien, getestet. Dabei wurde die Plasmamembran von HeLa-Zellen durch eine Digitonin-Behandlung permeabilisiert und anschließend der Import durchgeführt und überprüft, ob das Fluoreszenzpräprotein SDCSH für diese Art Importexperimente geeignet ist. (**Abbildung 17**). Der Import konnte sehr geringe prozessierte Banden (m-Banden) aufzeigen. Der Kontrollimport mit Su9(70)-DHFR zeigte dagegen, dass das Experiment technisch korrekt durchgeführt wurde.

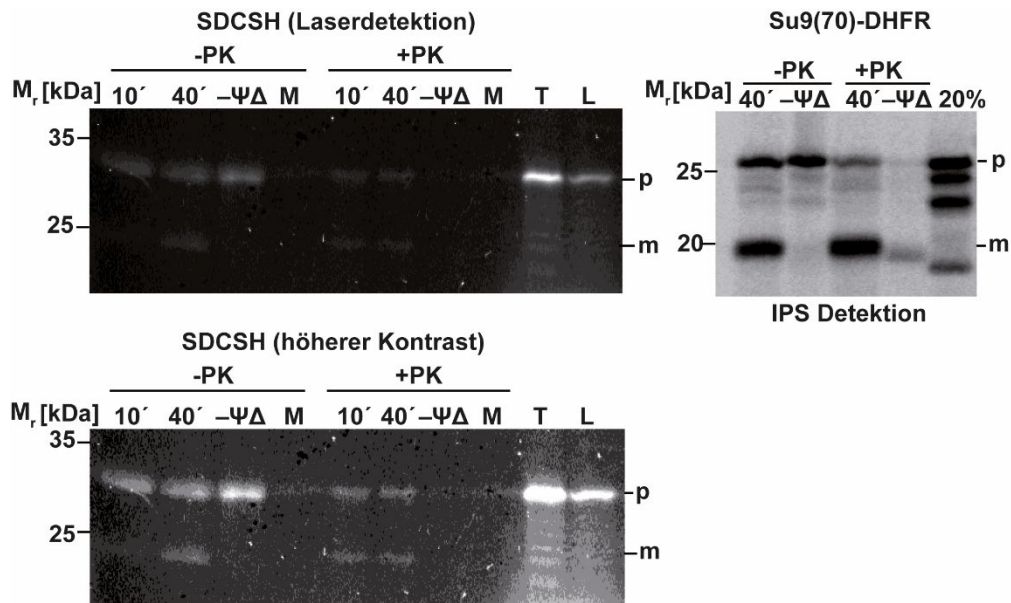


Abbildung 17: Import von radioaktiven SDCSH und fluoreszenzmarkierten SDCSH in Digitonin behandelten HeLa-Zellen. 600.000 HeLa-Zellen wurden pro Importzeitpunkt mit Digitonin behandelt und anschließend in einem Import mit fluoreszenzmarkierten SDCSH sowie radioaktiven Import eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Importtechnik mit ganzen Zellen kaum funktioniert, da nur schwache Prozessierung beobachtet werden konnte. Der Kontrollimport mit Su9(70)-DHFR konnte aber nachweisen, dass die behandelten Zellen für den Import zur Verfügung standen. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs

5.1.3 Importkinetik Bestimmung von Hefe-Mitochondrien

In weiteren Experimenten wurde die maximale Präproteinmenge bestimmt, welche benötigt wird, um die maximale Importgeschwindigkeit zu erreichen. Um dies zu analysieren, wurde ein Import in Anwesenheit von verschiedenen Mengen Präprotein und gleichbleibender Mitochondrienmenge durchgeführt und die Intensität der m-Bande quantifiziert (**Abbildung 18**). Die Ergebnisse zeigten, dass 5 pmol SDCSH in einem Mastermixansatz mit 25 µg HeLa-Mitochondrien die maximale Importgeschwindigkeit und damit die Sättigung mit SDCSH erreicht wird. Interessanterweise zeigten in einem ähnlichen Experiment, dass 25 µg YPH499-Mitochondrien doppelt so viel Präprotein benötigen, um die maximale Importkinetik zu zeigen (**Abbildung 18**). Mit diesen Angaben wurden auch die weiteren Experimente, welche sich mit Stressfaktoren des mitochondrialen Imports befassen, durchgeführt.

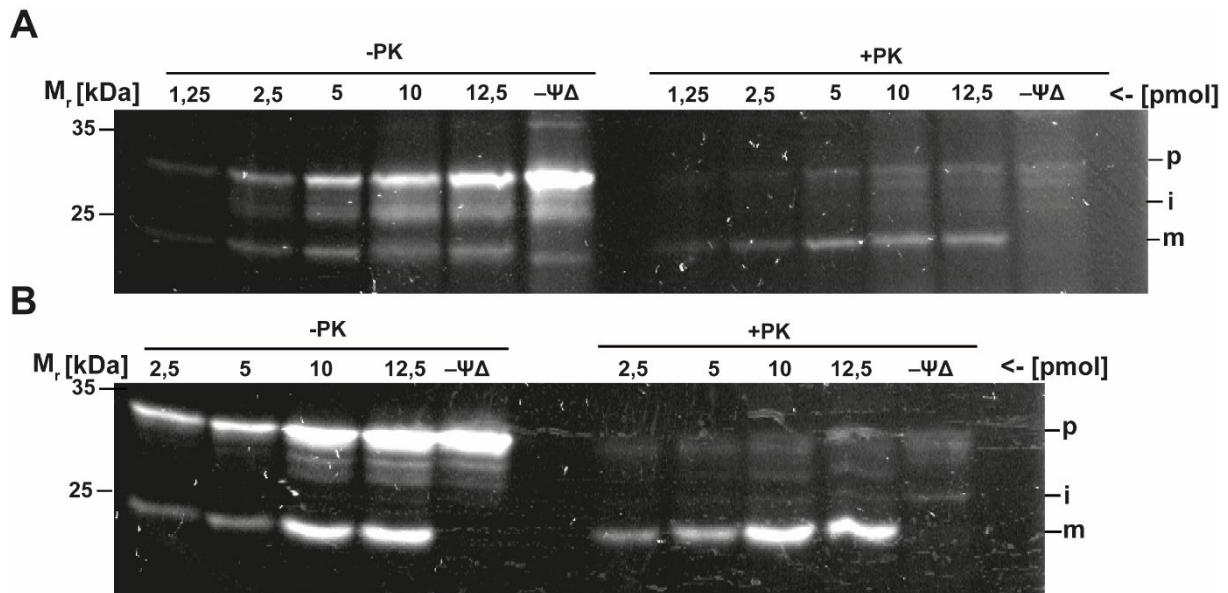


Abbildung 18: Import von verschiedenen Mengen SDCSH. A) 40 Minuten Import von verschiedenen Mengen SDCSH in HeLa-Mitochondrien (25 µg pro Laufbahn) bei 30 °C. B) 40 Minuten Import von verschiedenen Mengen SDCSH in YPH499-Mitochondrien (25 µg pro Laufbahn) bei 25 °C. -ΨΔ steht für Mitochondrien ohne Membranpotential. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs, i: Intermediäre Form des SDCSHs

Um die maximale Importgeschwindigkeit zu ermitteln, wurden in Folge der bereits erhaltenen Daten Experimentreihen mit verschiedenen Mengen (2,5 pmol, 5 pmol, 10 pmol, 12,5 pmol) an SDCSH pro 25 µg YPH499-Mitochondrien bei 25 °C importiert (**Abbildung 19**). Wie schon in **Abbildung 18** erkennbar, sollte die SDCSH-Menge um die 20 pmol im Mastermix betragen, um die maximale Substratsättigung zu erzielen (**Abbildung 18**). Die Ermittlung der Importgeschwindigkeit wurde mithilfe der Iterationsmethode von Marquardt-Levenberg (**Abbildung 7**) durchgeführt. Kleinere Mengen an SDCSH von 10 pmol konnten eine Importgeschwindigkeit von 2,9 pmol/mg/min erzielen. Mit zunehmender SDCSH-Menge konnte eine Importgeschwindigkeit von 12 pmol/mg/min ermittelt werden, welche auch bei höheren Mengen an SDCSH im Mastermix nicht weiter anstieg (**Abbildung 19**). Damit konnte die maximale Importgeschwindigkeit von SDCSH in YPH499-Mitochondrien bestimmt werden.

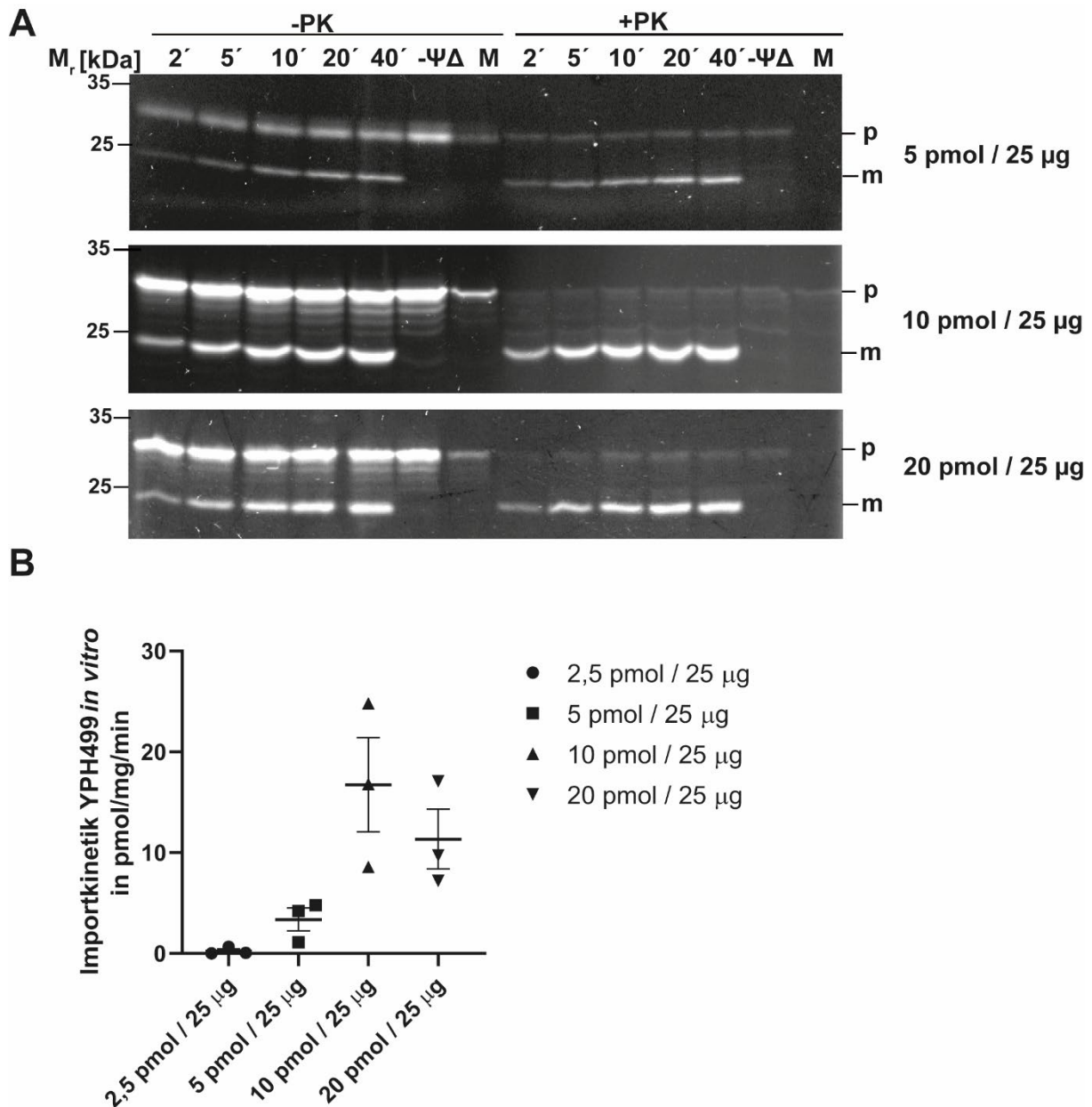


Abbildung 19: Importgeschwindigkeit von verschiedenen Mengen SDCSH in YPH499-Mitochondrien und anschließende Kinetik-Bestimmung. A) Import mit 5 pmol, 10 pmol, 20 pmol pro 25 μ g YPH499-Mitochondrien in Importexperimenten B) Importgeschwindigkeiten (y-Achse) der Importexperimente mit 2,5 pmol, 5 pmol, 10 pmol, 20 pmol pro 25 μ g in YPH499-Mitochondrien (x-Achse, pmol pro Laufbahn (+PK)). Importexperimente wurden pro SDCSH Konzentration dreimal durchgeführt. - $\Psi\Delta$ steht für AVO behandelte Mitochondrien ohne Membranpotential. M steht für Mock Import ohne Mitochondrien, PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs, Fehlerbalken SEM, n=3

Die Markierung mit Fluorophor von SDCSH konnte erfolgreich durch Fluorescein-Maleimid durchgeführt werden. Die Sensitivitätsgrenzen der Detektion des Fluoreszenzsignals wurden mit 0,3 pmol (9,5 ng) bestimmt. Diese Sensitivität reicht aus, um die Detektion von Importexperimente in Hefe- sowie Säugetiermitochondrien durchzuführen. Es konnte auch die maximale finale SDCSH-Konzentration für Importexperimenten ermittelt werden. Die Beeinflussung des mitochondrialen Imports durch verschiedene Faktoren konnte nun mithilfe dieser Methodik analysiert werden.

5.2 Einfluss der Temperatur auf die mitochondrialen Importgeschwindigkeit

In der Einleitung wurde erläutert, dass höhere Temperaturen die mitochondriale Biogenese negativ beeinflussen können (Wilkening et al. 2018; Jaworek et al. 2022). Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluss von Hitzestress auf den mitochondrialen Import und dessen Geschwindigkeit in Säugetier- und Hefemitochondrien analysiert.

5.2.1 Einfluss der Temperatur auf den Import in isolierten HeLa-Mitochondrien

Um den Einfluss der Temperatur auf den Import zu analysieren, wurden die isolierten HeLa-Mitochondrien für 15 Minuten bei verschiedenen Temperaturen vorbehandelt und anschließend ein 40 Minuten Import mit SDCSH bei 30 °C durchgeführt (**Abbildung 20**). In diesen Experimenten zeigte sich bei höheren Temperaturen (42 °C/45 °C) eine deutliche Reduktion des Importumsatzes im Vergleich zu 30 °C. Es konnte diese Reduktion nicht bei 37 °C beobachtet werden (**Abbildung 20**). Die Bindung an die Mitochondrien (p-Bande) blieb unverändert (**Abbildung 20**).

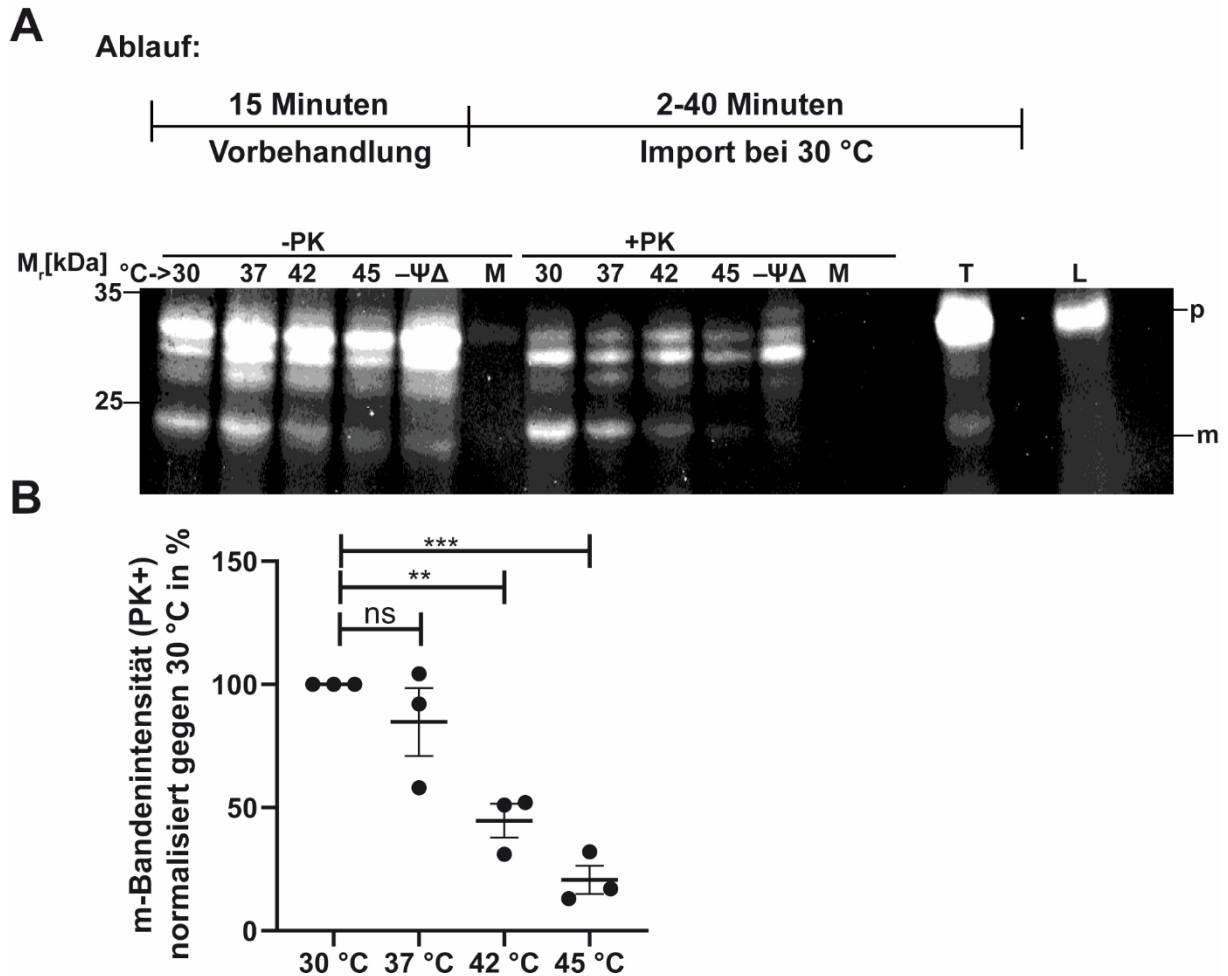


Abbildung 20: Einfluss der Temperatur auf den Import in isolierte HeLa-Mitochondrien.

A) Nach der Isolation von HeLa-Mitochondrien wurden diese bei verschiedenen Temperaturen für 15 Minuten inkubiert und anschließend wieder bei 30 °C ein Import mit SDCSH durchgeführt. B) Statistische Auswertung der m-Banden Intensitäten (+PK) normalisiert zu der m-Bande von 30 °C; n=3, ungepaarter t-Test **p=0,0013 ***p=0,0002, Fehlerbalken: SEM, PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs, T: 50 % Totalprobe, SDCSH-Lösung vor einem 20.000 ×g, 5 Minuten Zentrifugation. L: 50 % vom gefalteten SDCSH nach Zentrifugation, welches in dem Experiment eingesetzt wurde. -ΨΔ steht für Mitochondrien ohne Membranpotential. M steht für Mock Import ohne Mitochondrien.

Zur Analyse des Membranpotentials wurden die isolierten Mitochondrien nach der Isolation 15 Minuten bei den verschiedenen Temperaturen vorbehandelt und anschließend mit TMRE gefärbt und im Anschluss im Durchflusszytometer vermessen (**Abbildung 21**). Valinomycin diente hier als Negativkontrolle für ein gestörtes Membranpotential. Es zeigte sich, dass das Membranpotential nach erhöhter Temperatur, bei 45 °C und 42 °C reduziert war. Bei 30 °C und 37 °C konnten diese großen Unterschiede nicht gezeigt werden. Bei 37 °C konnte

sogar die stärkste TMRE-Färbung der HeLa-Mitochondrien in diesem Experiment gemessen werden (**Abbildung 21**).

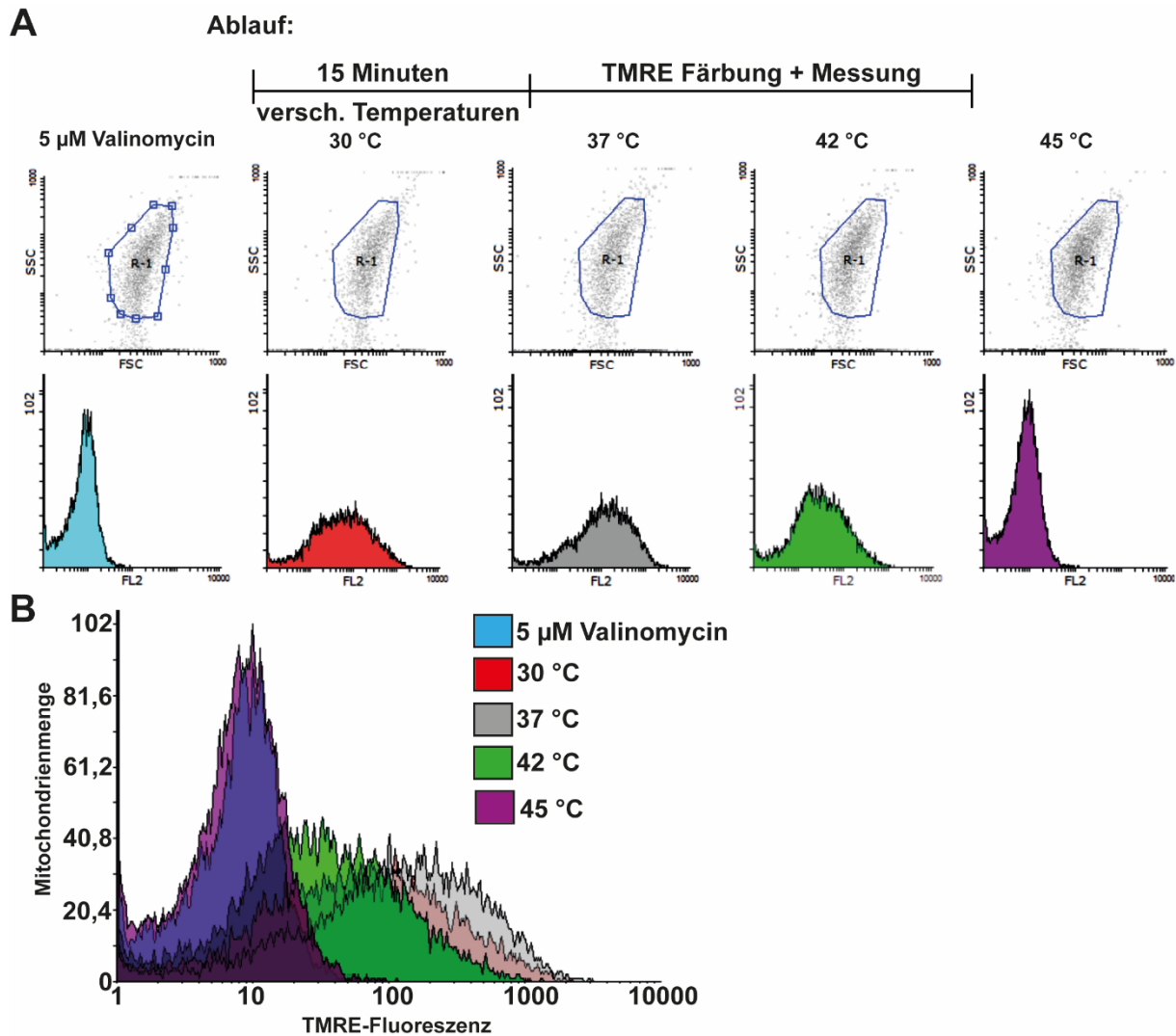


Abbildung 21: Einfluss der Temperatur auf das Membranpotential von isolierten HeLa-Mitochondrien. A) Effekt von höherer Temperatur auf das Membranpotential von isolierten HeLa-Mitochondrien gemessen durch TMRE-Färbung und anschließende Durchflusszytometrie. Entkoppler Valinomycin diente hier als Negativkontrolle für ein gestörtes Membranpotential. Gating der Mitochondrienpopulation wurde nach Größe und Granularität durchgeführt. B) Überlagerungshistogramm der TMRE-Messung der isolierten Mitochondrien nach Temperaturbehandlung

Um die Integrität der HeLa-Mitochondrien zu analysieren, wurden isolierte Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung mit Proteinase K versetzt (**Abbildung 22**). Die Proteinase K sollte bei intakten Mitochondrien nur die

Außenmembranproteine verdauen und die Innenmembranproteine und Matrixproteine sollten durch die Doppelmembran geschützt sein. Bei höheren Temperaturen wie 42 °C und 45 °C konnte die Proteinase K Teile von Tim23 und Tom40 verdauen, was darauf schließen lässt, dass die Außenmembran der Mitochondrien zum Teil ihre Integrität verloren hat. In diesem Experiment dienten Triton-lysierte Mitochondrien als Negativkontrolle, welche den kompletten Verdau der Proteinase K ermöglichen sollte. In dieser Kontrolle zeigte sich ein teilweise verdautes MPP-Signal (**Abbildung 22**). Tom70 wurde bei jeder Bedingung von der Proteinase K verdaut, da sich der Rezeptor in der Außenmembran befindet (**Abbildung 22**).

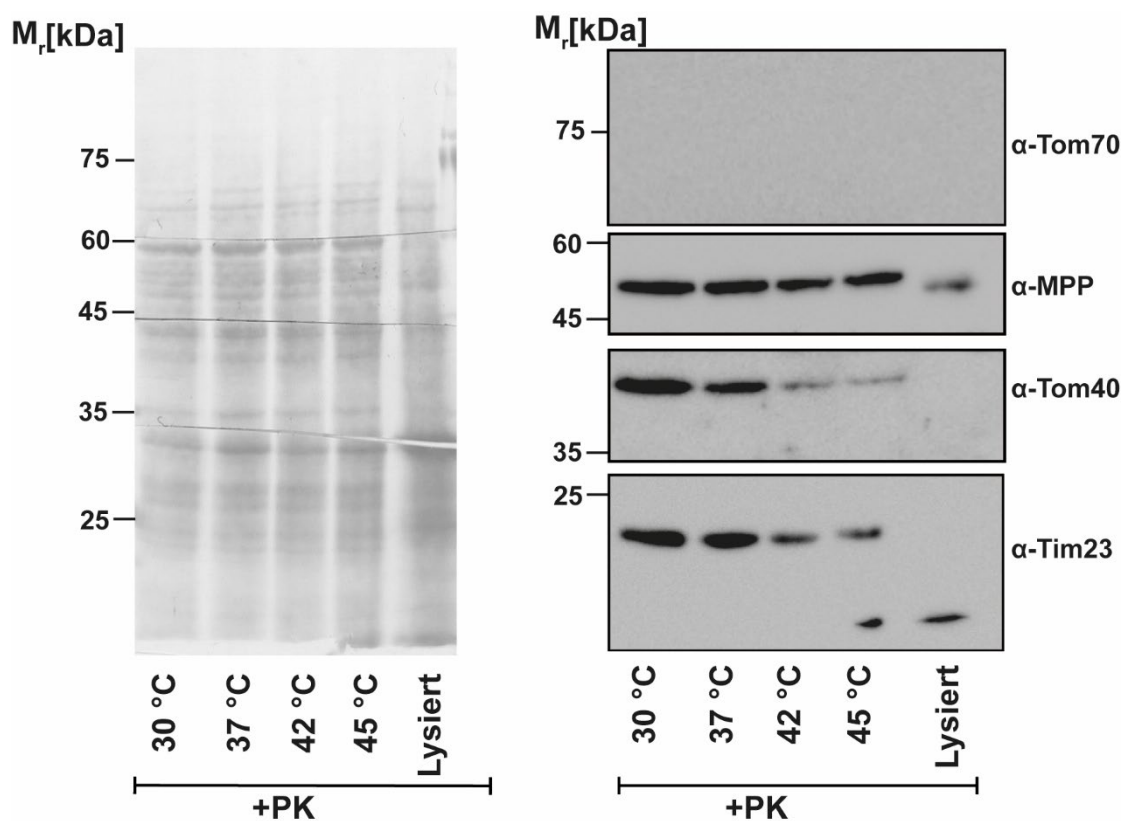


Abbildung 22: Einfluss der Temperatur auf die Stabilität von isolierten HeLa-Mitochondrien A) Effekt von höherer Temperatur auf die mitochondriale Integrität. Mitochondrien wurden in Lösung B für 15 Minuten bei verschiedenen Temperaturen behandelt und anschließend ein PK-Verdau (73 µg/ml) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben über einen Western Blot analysiert. Antikörper gegen Tom70 und Tom40 dienten als Nachweis von Außenmembranproteinen, MPP als Matrixprotein und Tim23 als Innenmembranprotein. Triton-lysierte Mitochondrien wurden als Kontrolle des PK-Verdaus ebenfalls aufgetragen.

5.2.2 Bestimmung der maximalen Importgeschwindigkeit von isolierten HeLa-Mitochondrien in Abhängigkeit der Temperatur

Nach diesen ersten Experimenten wurden die Importzeiten von 2-40 Minuten analysiert, um die maximale Importgeschwindigkeit von HeLa-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung bei 30 °C, 37 °C und 42 °C zu ermitteln (**Abbildung 23**). Es konnte gezeigt werden, dass der Import nach einer Vorbehandlung bei 37 °C den höchsten Wert für die Importgeschwindigkeit aufwies. Bei 42 °C war eine Importgeschwindigkeit zu beobachten, welche im Vergleich zu 37 °C kleiner war. Die Importgeschwindigkeit bei 37 °C Vorbehandlung stellte sich bei 1,3 pmol/mg/min ein. Im Vergleich dazu kamen die bei 42 °C vorbehandelten HeLa-Mitochondrien auf eine Importgeschwindigkeit von 0,47 pmol/mg/min (**Abbildung 24**). Ebenfalls konnte die Importgeschwindigkeit von 0,33 pmol/mg/min bei den mit 30 °C vorbehandelten Mitochondrien festgestellt werden. Die importierte SDCSH-Menge variierte auch sehr stark je nach Vorbehandlung. Bei 37 °C konnte eine importierte Menge von 25 pmol pro mg Mitochondrien beobachtet werden. Diese Menge ist signifikant höher im Vergleich zu 30 °C mit circa 10 pmol/mg und zu 42 °C mit 12 pmol/mg (**Abbildung 24**).

Interessanterweise konnte bei den Importexperimenten mit 37 °C und 42 °C Vorbehandlung eine stärkere i-Bande detektiert werden. Die Bildung der intermediären Form des Präproteins könnte auf einen verlangsamten Import hindeuten. Die p-Banden nach 37 °C Vorbehandlung zeigten außerdem die stärkste Intensität, was für eine effizientere Bindung von SDCSH an die Mitochondrien als bei den anderen Temperaturen spricht (**Abbildung 23**).

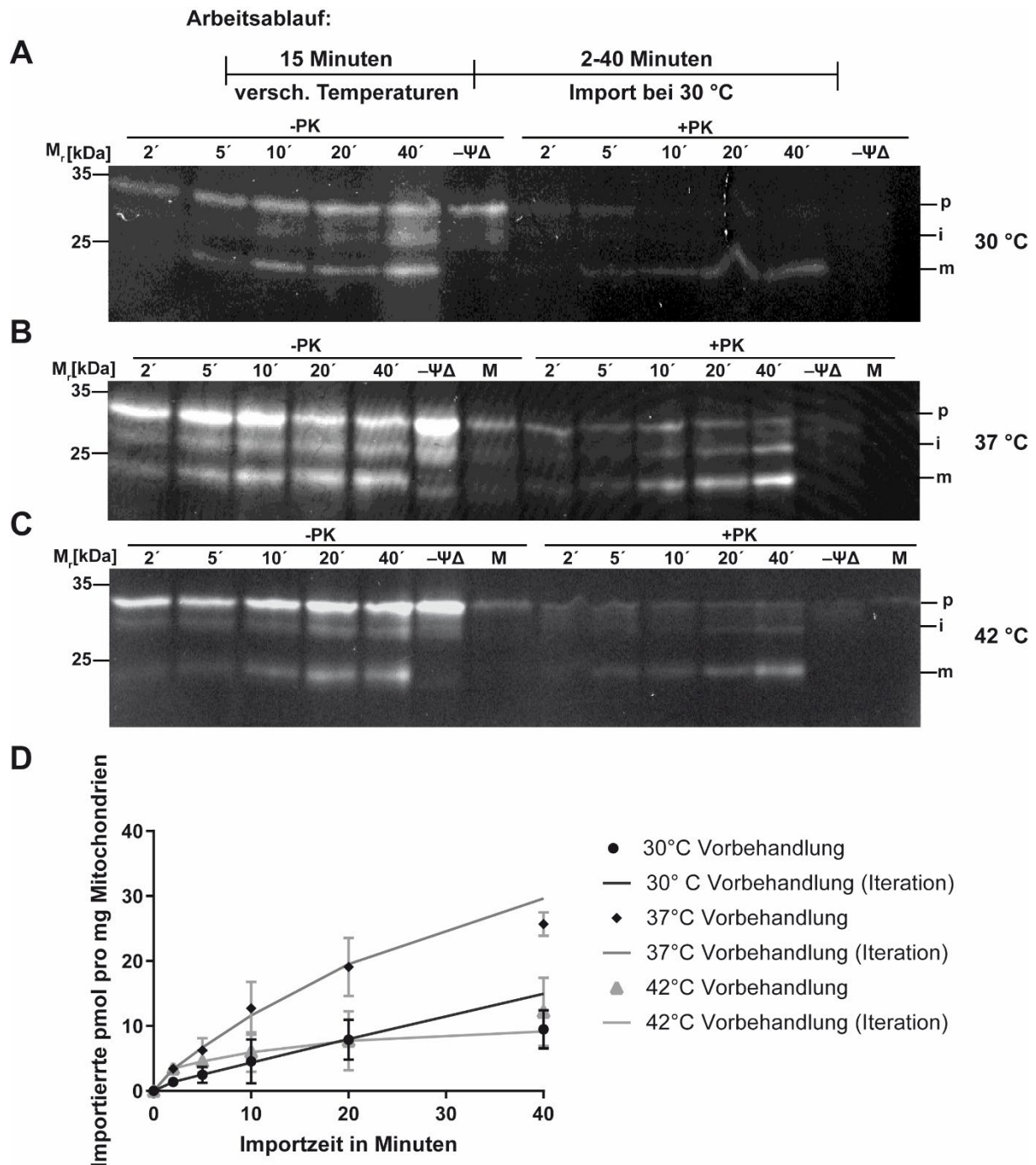


Abbildung 23: Import nach 15 Minuten Vorbehandlung bei 30 °C, 37 °C und 42 °C. A) SDCSH Import in HeLa-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung mit 30 °C B) SDCSH Import in HeLa-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung mit 37 °C C) SDCSH Import in HeLa-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung mit 42 °C D) Ermittelte Werte durch m-Bandenintensitäten in pmol/mg wurden gegen Zeit in Minuten aufgetragen. Iterationen stellen die durchgezogenen Linien dar. Fehlerbalken sind mit dem Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben (n=3). PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs, i: Intermediäre Form des SDCSHs, -ΨΔ steht für Mitochondrien ohne Membranpotential. M steht für Mock Import ohne Mitochondrien.

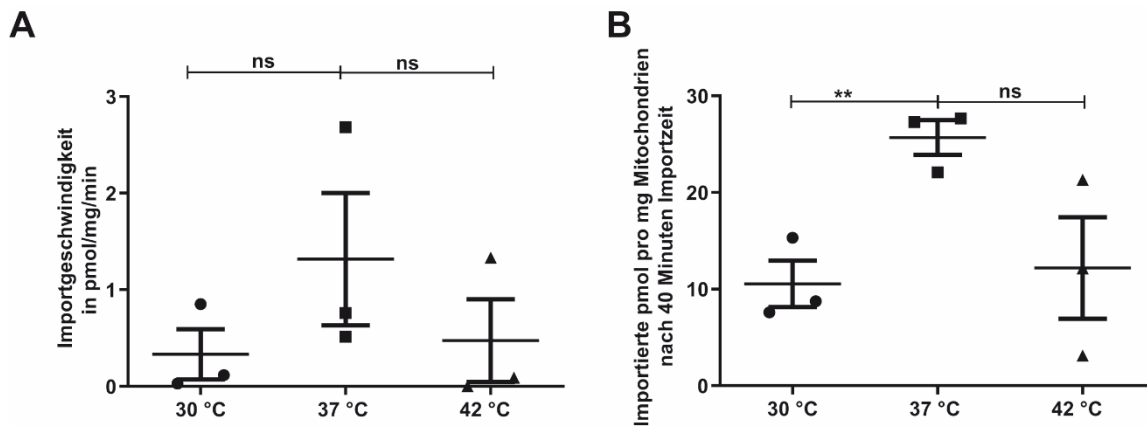


Abbildung 24: Importgeschwindigkeit nach 15 Minuten Vorbehandlung bei 30 °C, 37 °C und 42 °C. A) Vergleich der Importgeschwindigkeiten von HeLa-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung in pmol/mg/min (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test) B) Vergleich der prozessierten Menge an SDCSH (m-Bandenintensität) in pmol/mg von HeLa-Mitochondrien nach 40 Minuten (ungepaarter t-Test $p^{**}=0,0072$, n=3, Fehlerbalken: Fehler des Mittelwertes)

Dieses Ergebnis führte zur Analyse des Imports von SDCSH in HeLa-Mitochondrien bei konstanter Temperatur von 37 °C. Hier konnte gezeigt werden, dass die Importgeschwindigkeit im Vergleich zu 30 °C einen höheren Wert bei 37 °C aufwies (**Abbildung 25**). Die Importtemperatur von 30 °C führte zu einer Importgeschwindigkeit von 0,2 pmol/mg/min und bei 37 °C konnte eine Importgeschwindigkeit von 0,47 pmol/mg/min erreicht werden (**Abbildung 25**). Dieser Unterschied wurde schon nach 2 Minuten anhand der Intensität der m-Banden sichtbar. Bei 30 °C konnte dort keine Bande detektiert werden, wohingegen bei 37 °C schon eine schwache m-Bandenintensität gemessen werden konnte. Die importierte Menge von SDCSH variierte zwischen den unterschiedlichen Importtemperaturen nur marginal (**Abbildung 25**). Außerdem zeigte sich nach 2 Minuten eine unterschiedliche Stärke der p-Bande zwischen den beiden Temperaturen. Bei 37 °C ist nach 2 Minuten eine vergleichbare Intensität wie bei 40 Minuten zu beobachten, was für eine effiziente Bindung des Präproteins an die TOM-Rezeptoren spricht (**Abbildung 25**). Dieses Ergebnis aus diesen Experimenten konnte nun genutzt werden, um verschiedene Zelllinien bei dieser Bedingung zu vergleichen, um mögliche Unterschiede in der Importkinetik zu bestimmen.

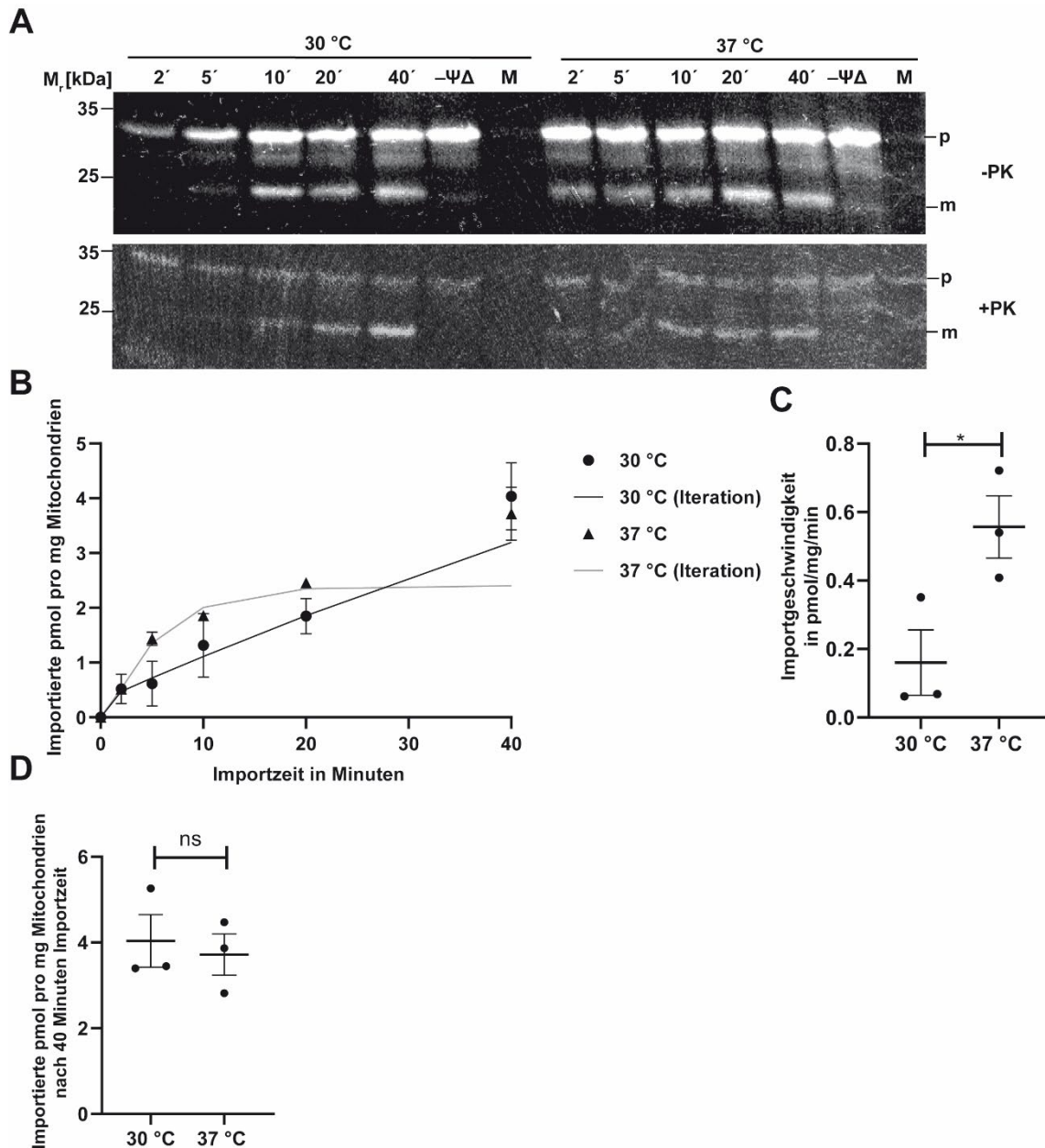


Abbildung 25: Maximale Importgeschwindigkeit bei 30 °C und 37 °C. A) SDCSH-Import in HeLa-Mitochondrien bei 30 °C und 37 °C. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs, $-\Psi\Delta$ steht für AVO-behandelte Mitochondrien ohne Membranpotential. M steht für Mock-Import ohne Mitochondrien. B) Ermittelte Daten durch die m-Bandenintensitäten in pmol/mg wurden gegen Zeit in Minuten aufgetragen. Iterationen stellen die durchgezogenen Linien dar. Fehlerbalken: SEM (n=3) C) Vergleich der maximalen Importgeschwindigkeit von HeLa-Mitochondrien bei 30 °C und 37 °C in pmol/mg/min (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test $p^* = 0,0396$) D) Vergleich der prozessierten Menge an SDCSH (m-Bandenintensität nach 40 Minuten) in pmol/mg von HeLa-Mitochondrien bei 30 °C und 37 °C (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test)

Die Behandlung mit höheren Temperaturen führte zu dem Verlust des Membranpotentials, sowie zu reduzierter Integrität von isolierten HeLa-Mitochondrien. Dadurch wurde auch die Importgeschwindigkeit negativ beeinflusst. Die optimale Importtemperatur und die daraus resultierende Importkinetik für Säugetiermitochondrien wurden auf 37 °C bestimmt.

5.2.3 Bestimmung der Importgeschwindigkeit von HEK293- und SH-SY5Y-Mitochondrien im Vergleich zu HeLa bei 37 °C

Aus den verschiedenen humanen Zelllinien (HeLa, HEK293 und SH-SY5Y) wurden die Mitochondrien isoliert und 50 µg pro Import eingesetzt (**Abbildung 26**). Die Importzeiten von 2-40 Minuten wurden analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass HEK293-Mitochondrien sich unter diesen Importbedingungen eine maximale Importgeschwindigkeit mit 1,8 pmol/mg/min aufwiesen. SH-SY5Y-Mitochondrien konnten in den Experimenten bei 37 °C eine Importgeschwindigkeit von 0,309 pmol/mg/min erreichen. Die HeLa-Mitochondrien zeigten im Zuge der Importexperimente einen ähnlichen Verlauf wie die SH-SY5Y-Mitochondrien und eine maximale Importgeschwindigkeit von 0,55 pmol/mg/min (**Abbildung 27**).

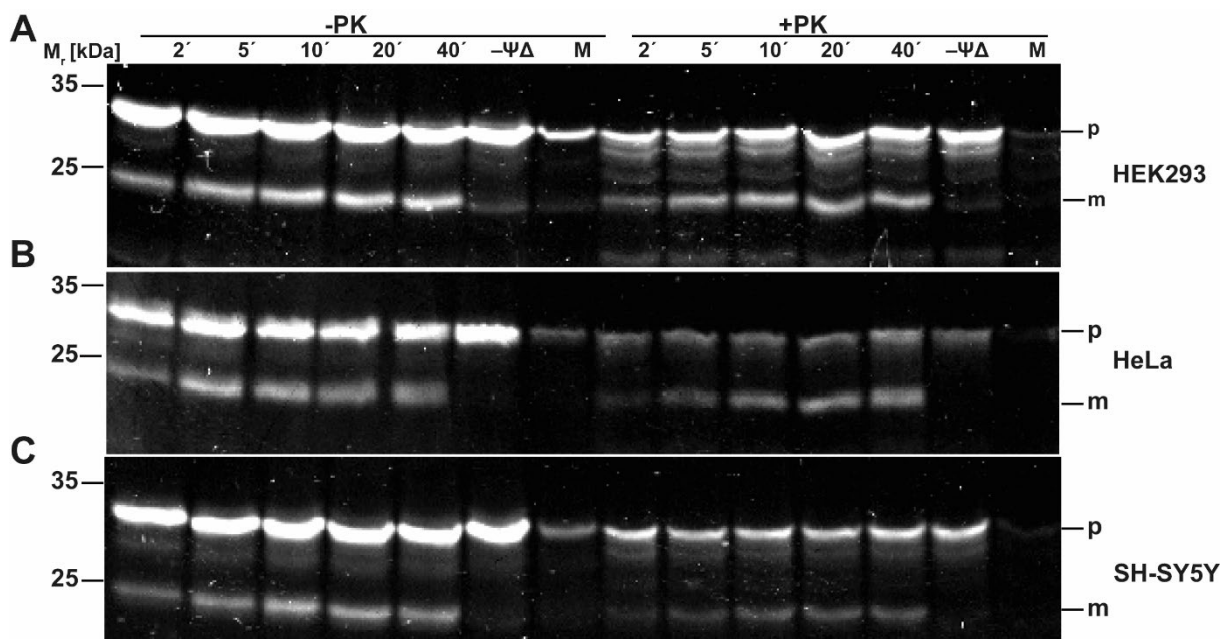


Abbildung 26: Importexperimente mit isolierten HEK293-, HeLa- und SH-SY5Y-Mitochondrien. SDCSH Import in A) HEK293- B) HeLa- C) SH-SY5Y-Mitochondrien bei 37°C PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife)

Form des SDCSHs, $-\Psi\Delta$ steht für Mitochondrien ohne Membranpotential. M steht für Mock Import ohne Mitochondrien.

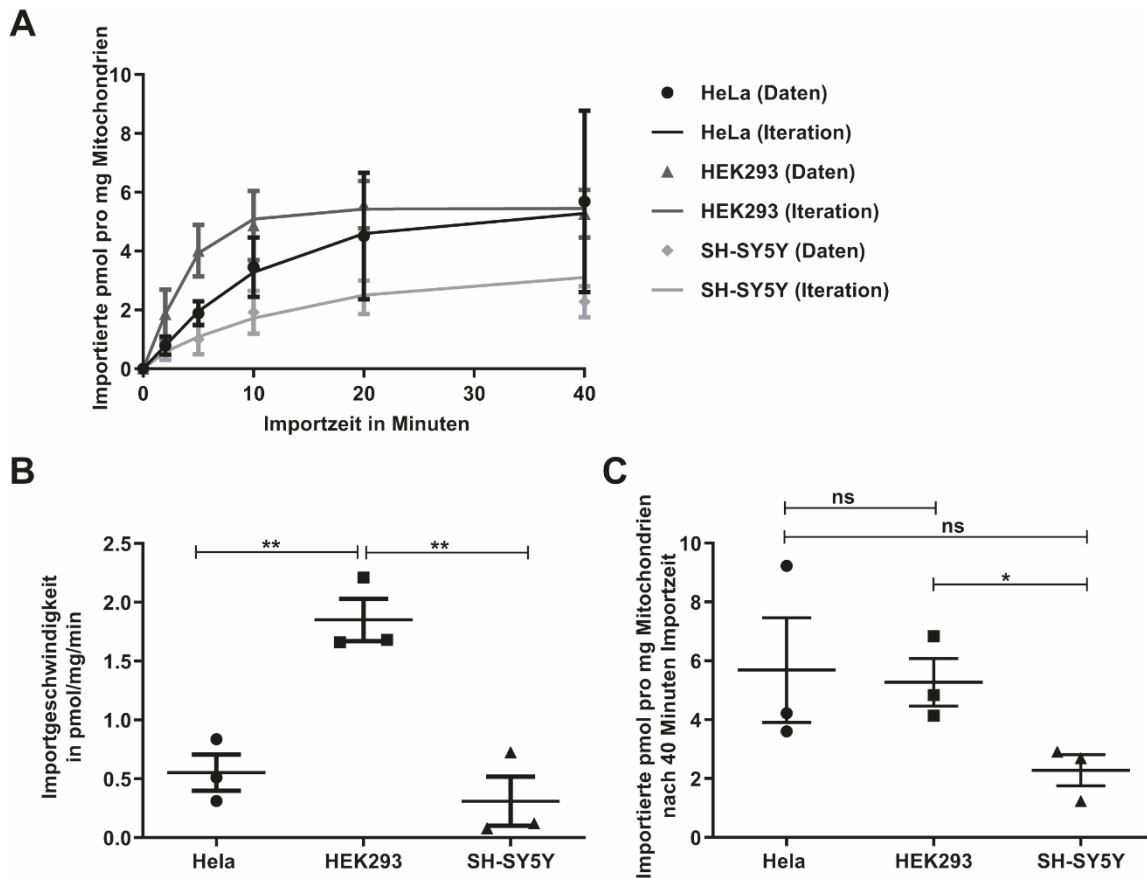


Abbildung 27: Maximale Importgeschwindigkeit und Importumsatz von isolierten Mitochondrien aus HeLa, HEK293 und SH-SY5Y bei 37 °C. A) Ermittelte Daten durch die m-Bandenintensitäten in pmol/mg wurden gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Iterationen stellen die durchgezogenen Linien dar. Fehlerbalken sind mit dem Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben (n=3). B) Vergleich der Importgeschwindigkeit von HeLa-, HEK293- und SH-SY5Y-Mitochondrien bei 37 °C in pmol/mg/min (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test $p^{**}=0,0054$ $^{**}p=0,005$ C) Vergleich der m-Bandenintensität nach 40 Minuten in pmol/mg von HeLa-, HEK293- und SH-SY5Y-Mitochondrien bei 37 °C (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test $p^{*}=0,0362$)

Um die Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurden Messungen des mitochondrialen Membranpotentials mit TMRE durchgeführt. Die Behandlung mit 1 μ M Valinomycin diente hier als Negativkontrolle für depolarisierte Mitochondrien in den Zellen. Um sicherzustellen, dass nur intakte Zellen für die Messungen analysiert wurden, wurden durch ein Gate diese Zellen ausgewählt und der Median dieser Population bestimmt (**Abbildung 28**). Außerdem wurde das Verhältnis der TMRE-positiven und TMRE-negativen Zellen jeder Probe

durch ein weiteres Gating analysiert (**Abbildung 28**). Der Median der unbehandelten Zellen wurde durch den Median der mit Valinomycin behandelten Zellen dividiert, um die Stärke des Membranpotentials darzustellen. Bei den Messungen zeigte sich, dass HeLa- und HEK293-Zellen über ein vergleichbares Membranpotential verfügen. SH-SY5Y-Zellen zeigten aber ein schwächeres Membranpotentialverhältnis (**Abbildung 28**).

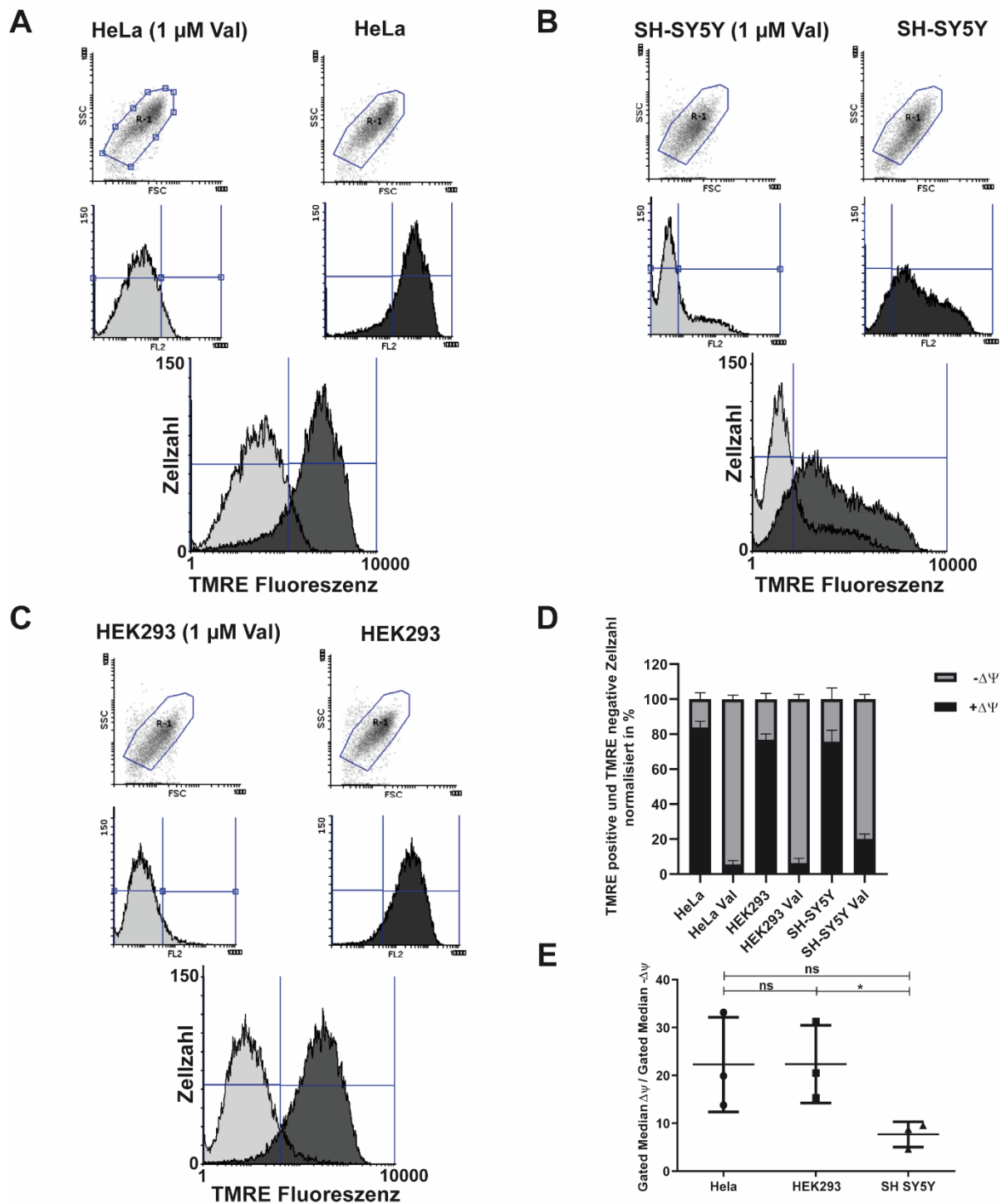


Abbildung 28: Membranpotential von HeLa-, HEK293- und SH-SY5Y-Zellen. A) HeLa-Zellen wurden für eine Stunde mit 1 μ M Valinomycin behandelt und anschließend mit TMRE gefärbt. Die Zellpopulation wurde nach der Zelldichte gegatet und in einem Überlagerungshistogramm aufgetragen. Anschließend wurde die Population TMRE-negativ und die Population gegatet und die Daten in D prozentual dargestellt. B) Siehe Punkt A. Es wurden hier nur SH-SY5Y-Zellen verwendet. C) Siehe Punkt A. Es wurden hier nur HEK293-Zellen verwendet. D) Prozentuale Verhältnisse der TMRE-positiv und TMRE-negativen Zellen nach Gating. E) Der gegated Median der Valinomycin-behandelten Zellpopulation wurde durch den gegated Median der unbehandelten Zellen geteilt und somit ein Faktor ermittelt, welcher die Stärke des Membranpotentials anzeigt. (n=3, Fehlerbalken SEM, ungepaarter t-Test $p^*=0,0412$)

In einem Western-Blot-Experiment wurden verschiedene Mengen an isolierten Mitochondrien der Zelllinien aufgetragen, um die Level verschiedener mitochondrialer Proteine zu vergleichen. Es stellte sich heraus, dass die Menge von MPP in allen Mitochondrien gleich verteilt war (**Abbildung 29**). Bei Tim23 zeigten nur die HEK293-Mitochondrien noch ein Signal bei 5 μ g Proteinmenge. HeLa und SH-SY5Y wiesen eine geringere Menge von Tim23 auf. Interessanterweise enthielten die SH-SY5Y-Zellen das meiste Tom70, wobei HeLa-Mitochondrien am wenigsten Tom70-Signal zeigten (**Abbildung 29**).

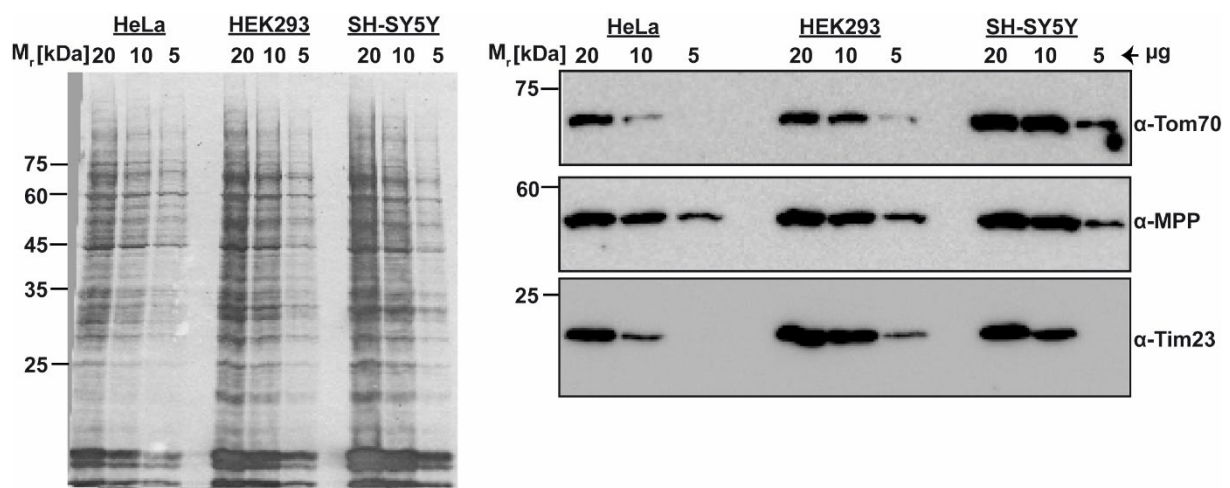


Abbildung 29: Proteinlevel von isolierten HeLa-, HEK293- und SH-SY5Y-Mitochondrien. 20, 10 und 5 μ g von isolierten HeLa-, HEK293- und SH-SY5Y-Mitochondrien wurden in einem Western Blot aufgetragen und mit Coomassie gefärbt, gefolgt von einer Dekoration mit Tim23, MPP- und Tom70-Antikörpern.

Es konnte die maximale Importgeschwindigkeit bei 37 °C von isolierten HeLa-, HEK293- und SH-SY5Y-Mitochondrien bestimmt werden. HEK293-Mitochondrien wiesen dabei im Vergleich zu den anderen Zelllinien den größten Wert für die Importgeschwindigkeit auf. Die Messung des Membranpotentials der verschiedenen Zelllinien ergab ein ähnliches Membranpotential bei HeLa und HEK293, aber ein geringeres Membranpotential bei SH-SY5Y-Zellen. Die mitochondrialen Proteinlevel der isolierten Mitochondrien der unterschiedlichen Zelllinien zeigten im Vergleich unterschiedliche Mengen an Tom70 und Tim23 im Western Blot.

5.2.4 Einfluss der Temperatur auf den Import von isolierten Hefemitochondrien

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Temperatur auf isolierte YPH499-Mitochondrien näher betrachtet. Dabei wurden Hefemitochondrien bei verschiedenen Temperaturen für 10 Minuten vorbehandelt und anschließend ein Import mit SDCSH für 40 Minuten durchgeführt (**Abbildung 30**). Es zeigte sich, dass der Import in YPH499-Mitochondrien bei höheren Temperaturen stark reduziert wurde. Bei Temperaturen von 42 °C und 45 °C konnte keine Prozessierung des Präproteins festgestellt werden (**Abbildung 30**). Die Bindung an die Mitochondrien (p-Bande) blieb unverändert.

In der Analyse der Integrität von Hefemitochondrien nach der Temperaturvorbehandlung konnte keine Veränderung festgestellt werden (**Abbildung 30**). Cox4, welches in der Innenmembran lokalisiert ist, zeigte keinen Abbau durch PK, genauso wie Mdh1, welches in der Matrix zu finden ist. Nur Tom70 wurde durch PK abgebaut, da es an der äußeren Seite der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert ist (**Abbildung 30**).

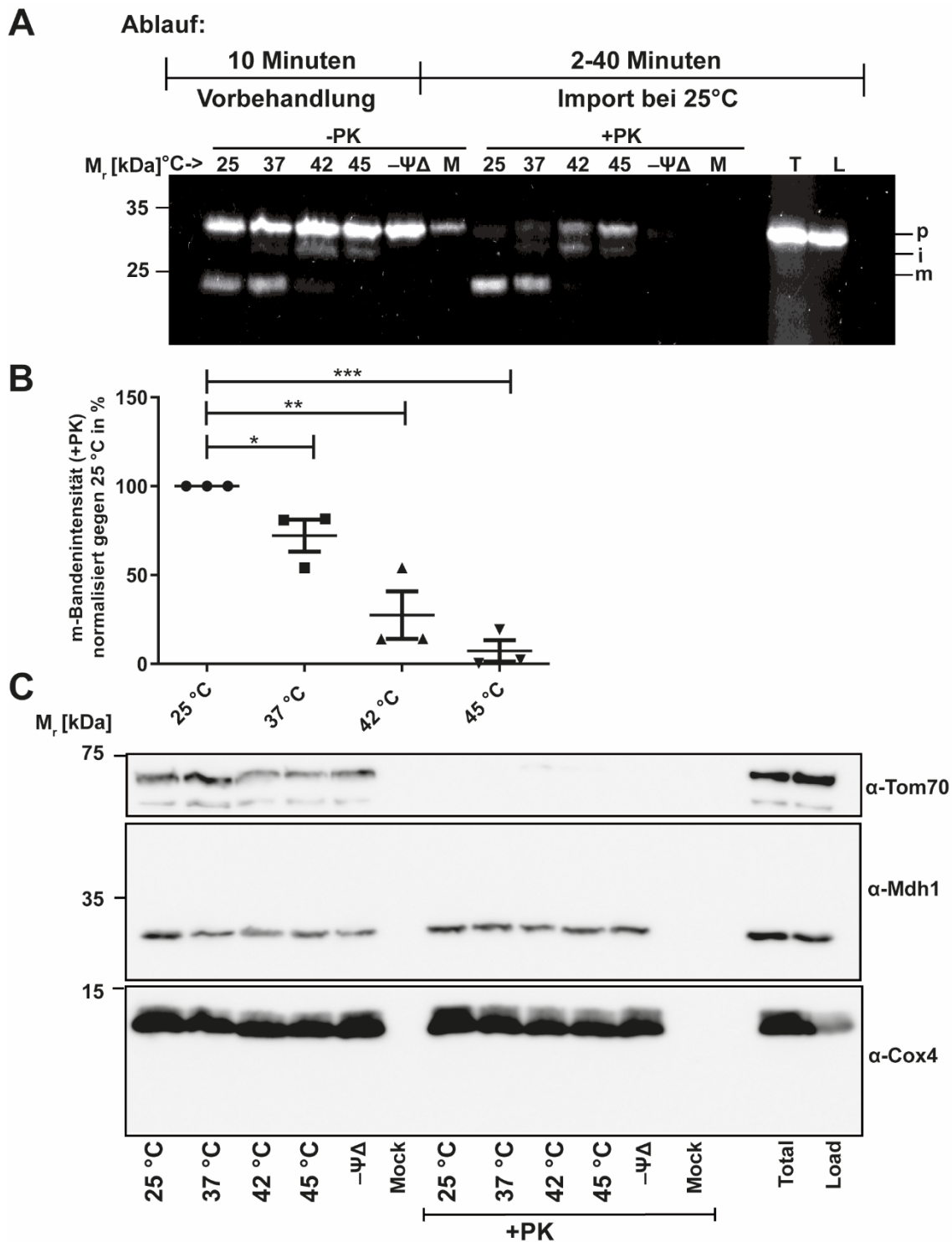


Abbildung 30: Einfluss der Temperatur auf den Import in isolierte *S. cerevisiae* YPH499-Mitochondrien. A) YPH499-Mitochondrien wurden bei verschiedenen Temperaturen für 10 Minuten inkubiert und anschließend bei 25 °C ein Import mit SDCSH durchgeführt. -ΔΨ: AVO-Probe ohne Membranpotential. M steht für Mock Import ohne Mitochondrien, PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs, i: Intermediäre Form des SDCSHs, T: 50 % Totalprobe, SDCSH-Lösung vor einer 20.000 ×g, 5 Minuten Zentrifugation. L: 50 % vom gefalteten SDCSH nach Zentrifugation, welches in dem Experiment eingesetzt wurde. B) Statistische Auswertung der m-Banden-Intensitäten (+PK)

normalisiert zu der m-Bande von 25 °C; n=3, ungepaarter t-Test *p=0,0369 **p=0,0056 ***p=0,0001, Fehlerbalken: SEM. C) Antikörperdekoration mit Tom70 (Außenmembran), Mdh1 (Matrix), Cox4 (Innenmembran) zeigten Banden in der PK unbehandelter Proben.

In weiteren Experimenten wurden Messungen des Membranpotentials mittels TMRE-Färbung in der Durchflusszytometrie nach der Temperaturvorbehandlung, durchgeführt (**Abbildung 31**). Diese Ergebnisse zeigten, dass das Membranpotential bei Hefemitochondrien durch höhere Temperatur reduziert wurde. Nach 10 Minuten Vorbehandlung mit 42 °C zeigte sich ein verringertes Membranpotential, welches sich aber nicht signifikant von 25 °C unterschied. Bei einer 37 °C-Vorbehandlung konnte auch eine geringe Reduzierung des Membranpotentials im Vergleich zu 25 °C festgestellt werden (**Abbildung 31**).

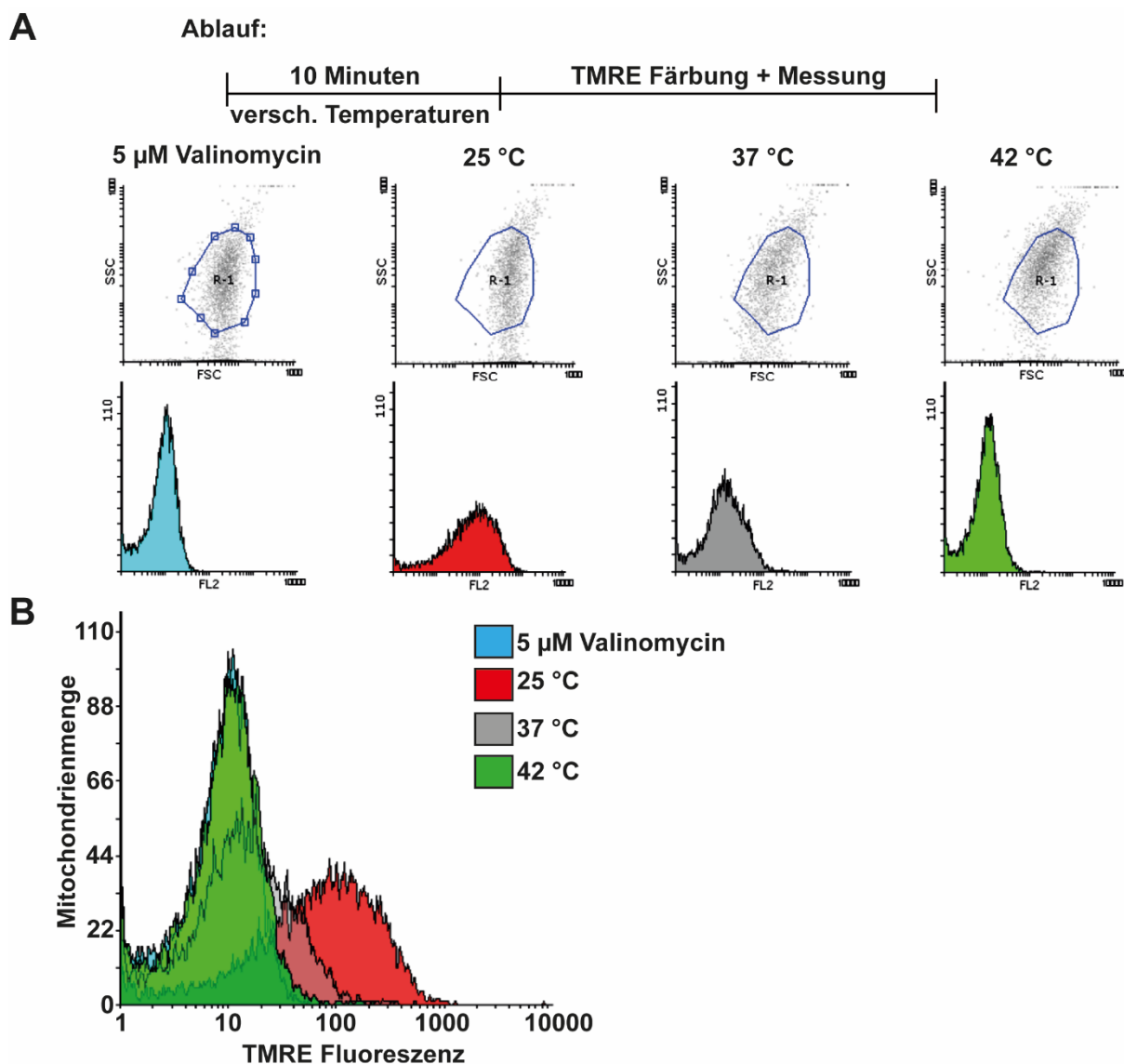


Abbildung 31: Einfluss der Temperatur auf das Membranpotential isolierter YPH499-Mitochondrien. A) Effekt von höherer Temperatur auf das Membranpotential von isolierten YPH499-Mitochondrien durch TMRE-Färbung und anschließende Messung per Durchflusszytometrie. Der Entkoppler Valinomycin diente hier als Negativkontrolle für ein gestörtes Membranpotential. Gating der Mitochondrienpopulation wurde nach Größe und Granularität durchgeführt. B) Überlagerungshistogramm der TMRE-Messung der isolierten Mitochondrien nach Temperaturbehandlung

5.2.5 Bestimmung der Importgeschwindigkeit von isolierten Hefemitochondrien in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Importkinetik wurde nach verschiedenen Temperaturbehandlungen (25 °C, 37 °C, 42 °C) für 10 Minuten bei 25 °C (2-40 Minuten) bestimmt (**Abbildung 32**). Diese Experimente wurden mit einer SDCSH-Menge von 10 pmol pro Mastermix durchgeführt, um die maximale Importgeschwindigkeit mit der von YPH499-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung zu vergleichen.

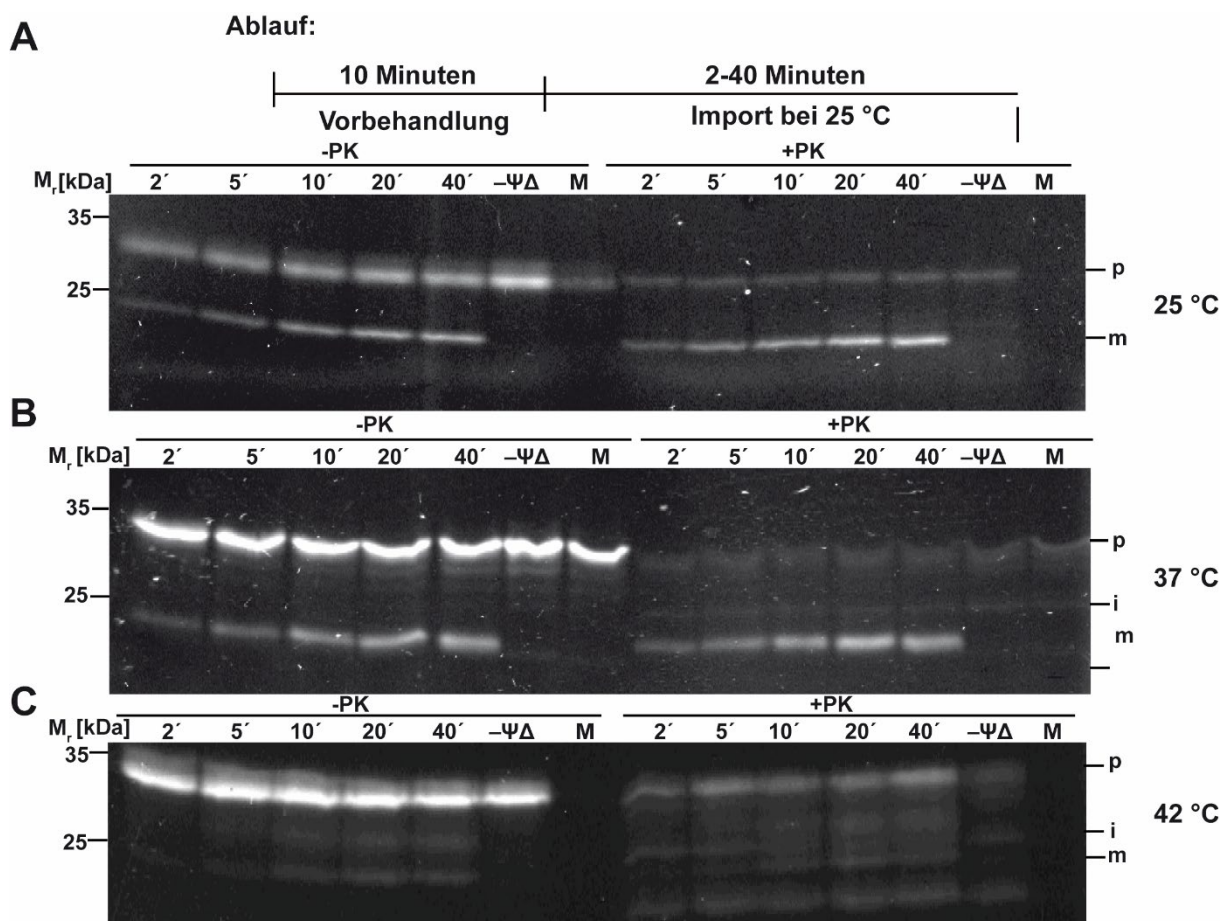


Abbildung 32: Import nach 10 Minuten Vorbehandlung bei 25 °C, 37 °C und 42 °C. A) SDCSH-Import in YPH499-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung mit 25 °C PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form

des SDCSHs, i: Intermediäre Form des SDCSHs, $-\Psi\Delta$ steht für AVO-behandelte Mitochondrien ohne Membranpotential. M steht für Mock-Import ohne Mitochondrien B) SDCSH-Import in YPH499-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung mit 37 °C C) SDCSH-Import in YPH499-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung mit 42 °C

Die Variation in der Temperatur zeigte einen Effekt auf die Importgeschwindigkeit von YPH499-Mitochondrien. Bei 25 °C konnte in diesen Experimenten eine Importgeschwindigkeit von 3 pmol/mg/min erreicht werden. Die Vorbehandlung mit 37 °C führte zu einer Importgeschwindigkeit von 1,7 pmol/mg/min und die Vorbehandlung mit 42 °C zeigte eine Importgeschwindigkeit von 0,45 pmol/mg/min (**Abbildung 33**). Somit konnte die Importgeschwindigkeit durch die 42 °C-Behandlung um den Faktor 6 kleiner werden, während 37 °C zu nahezu einem um die Hälfte verlangsamt Import in YPH499-Mitochondrien führten. Die importierte SDCSH-Menge nach 40 Minuten bestätigte ebenfalls diese Ergebnisse. Nach 40 Minuten und 25 °C konnten 1 mg YPH499-Mitochondrien 27 pmol SDCSH importieren. Im Gegensatz dazu konnten bei 37 °C vorbehandelte YPH499-Mitochondrien nur 7,5 pmol pro 1 mg YPH499-Mitochondrien importieren. Mit 42 °C vorbehandelte Mitochondrien zeigten hier nochmal eine Reduzierung auf nur 3,8 pmol importiertes SDCSH pro 1 mg YPH499-Mitochondrien (**Abbildung 33**).

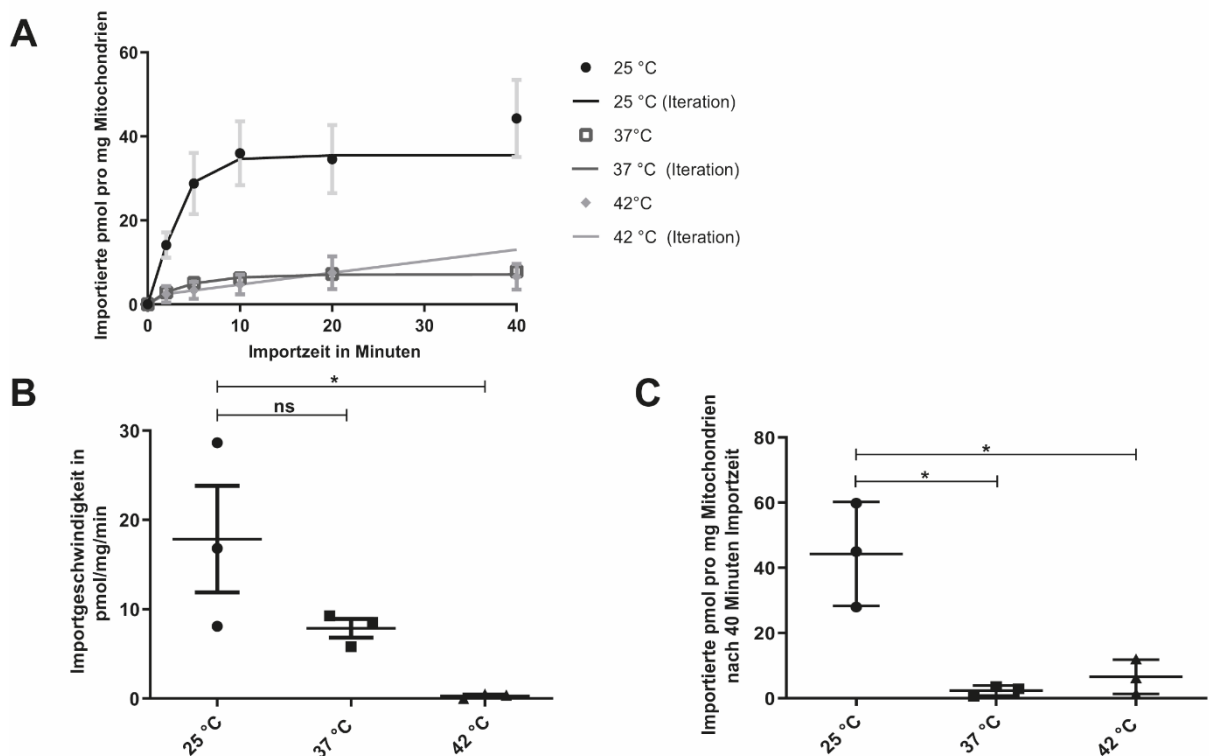


Abbildung 33: Einfluss der Temperatur auf den mitochondrialen Import in isolierte YPH499-Mitochondrien. A) Ermittelte m-Bandenintensitäten in pmol/mg gegen Zeit in Minuten aufgetragen. Iterationen stellen die durchgezogenen Linien dar. Fehlerbalken sind mit dem Fehler des Mittelwertes angegeben (n=3). B) Vergleich der maximalen Importgeschwindigkeiten von YPH499-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung in pmol/mg/min (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test $p^*=0,0421$). C) Vergleich der m-Bandenintensität nach 40 Minuten in pmol/mg von YPH499-Mitochondrien nach Temperaturvorbehandlung (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test $p^*=0,0106$ $p^*=0,0178$)

Der mitochondriale Import in isolierte Hefemitochondrien wurde durch die Vorbehandlung mit höheren Temperaturen verlangsamt. Die Integrität der Mitochondrien zeigte dabei keine Veränderung. Die Hefemitochondrien wurden durch die Vorbehandlung mit höheren Temperaturen depolarisiert. Bei 25 °C Vorbehandlung konnte im Vergleich zu den anderen Temperaturen der größte Wert für die maximale Importgeschwindigkeit ermittelt werden.

5.3 Einfluss von ROS-Stress auf die mitochondriale Importgeschwindigkeit

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können zu Schäden in der mitochondrialen DNA führen und den Präprotein-Import in die Mitochondrien negativ beeinflussen (Mecocci et al. 1994; Wright et al. 2001). Außerdem ist ROS-Stress ein Marker für neurodegenerative Krankheiten (Singh et al. 2019). Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluss von H_2O_2 auf den mitochondrialen Import mithilfe von SDCSH in isolierten HeLa-Mitochondrien analysiert.

5.3.1 Einfluss von H_2O_2 auf den Import in isolierten HeLa-Mitochondrien

In Importexperimenten mit einer 15-minütigen Vorbehandlung der Mitochondrien mit H_2O_2 zeigte sich eine Reduzierung der importierten SDCSH-Menge (mature-Bande) mit steigender Wasserstoffperoxidkonzentration (**Abbildung 34**). Die Intensität der m-Bande der unbehandelten Mitochondrien wurde mit 1 festgelegt und die entstandenen m-Banden gegen diese Probe normalisiert. Interessanterweise zeigte sich, dass 10 μM H_2O_2 nur zu 48 % Intensität im Vergleich mit der unbehandelten Probe führten (**Abbildung 34**). Diese

Reduzierung konnte auch bei den Proben ohne PK-Behandlung festgestellt werden. Bei der niedrigeren Konzentration an H_2O_2 wurde eine Reduzierung auf 80 % festgestellt.

Zusätzlich zum Import wurde das Membranpotential durch Messen der TMRE-Färbung ermittelt (**Abbildung 34**). Das Membranpotential sank ebenfalls nach der Vorbehandlung mit 10 μM H_2O_2 signifikant ab. Die TMRE-Messung zeigte hier einen ähnlichen Verlauf wie das Importexperiment (**Abbildung 34**).

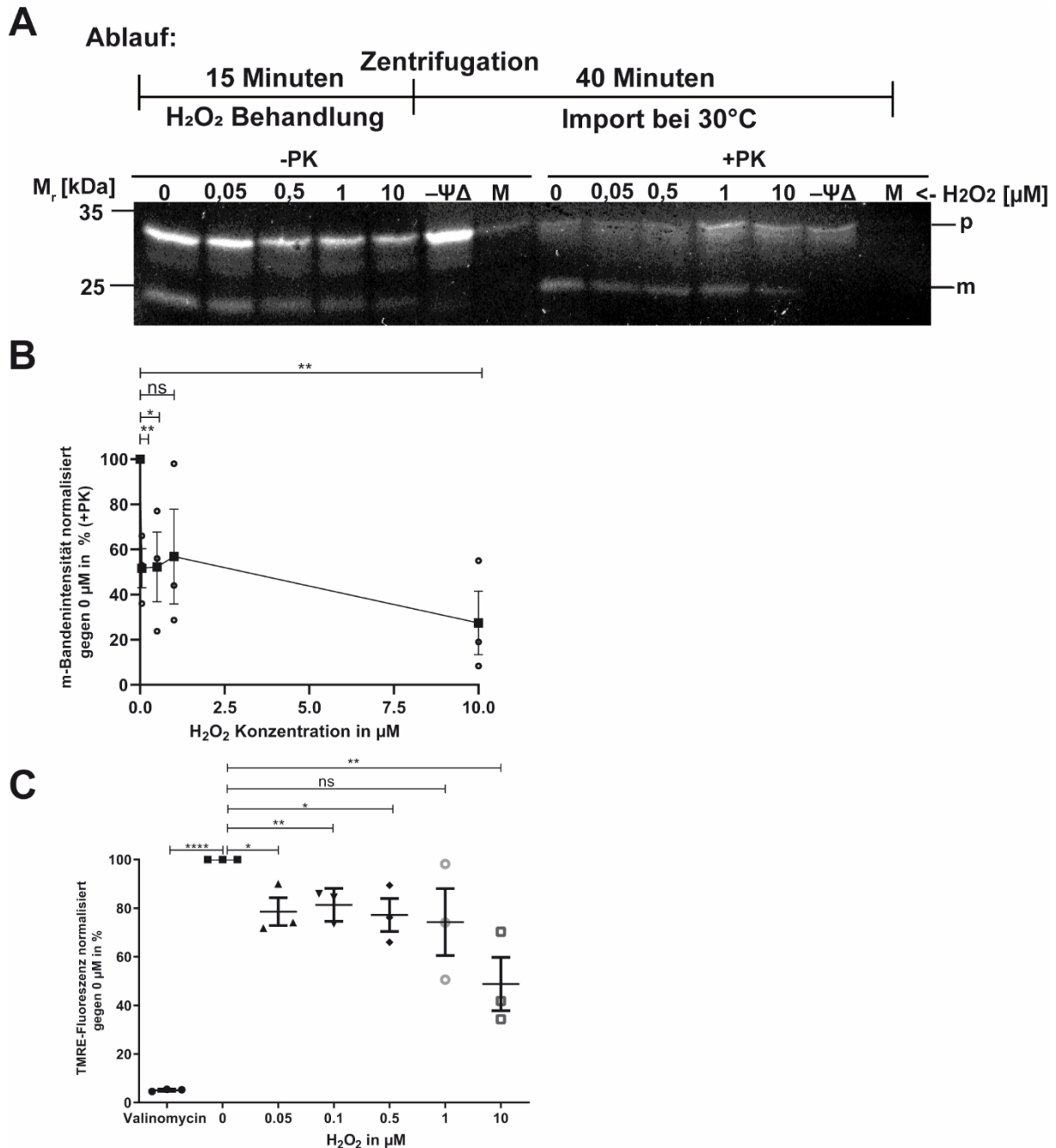


Abbildung 34: Einfluss von ROS-Stress auf den mitochondrialen Import in isolierte HeLa-Mitochondrien. A) HeLa-Mitochondrien wurden mit H_2O_2 Konzentrationen für 15 Minuten

inkubiert und anschließend wieder bei 30 °C ein Import mit SDCSH durchgeführt. Die Analyse der m-Bandenintensität wurde per Detektion via Fluoreszenz-Scanner vom SDS-PAGE-Gel durchgeführt. B) Statistische Auswertung der m-Banden Intensitäten (+PK) normalisiert zu der m-Bande von 0 μM H_2O_2 ; n=3, ungepaarter t-Test *p=0,0380, **p=0,0055, ***p=0,0069, Fehlerbalken SEM, PK: Proteinase K- Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs C) Messung der TMRE-Fluoreszenz der gefärbten HeLa-Mitochondrien nach H_2O_2 -Behandlung mithilfe eines Mikroplattenlesegerätes und anschließender Normalisierung auf H_2O Probe, um Unterschiede der TMRE-Fluoreszenz zu analysieren. Ungepaarter t-Test ****p=>0,0001, *p=0,0204, **p=0,0088, *p=0,0281, **p=0,0095, n=3, Fehlerbalken: SEM

Um zu überprüfen, ob sich die Integrität der HeLa-Mitochondrien nach der ROS-Behandlung verschlechtert hatte, wurde im Folgenden ein Integritätstest durchgeführt (**Abbildung 35**). Es zeigte sich aber keine Veränderung nach 15 Minuten Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid. Das Innenmembranprotein Tim23, welches bei Temperaturstress abgebaut wird, zeigte in diesem Experiment keine Änderung, was für eine intakte Integrität der HeLa-Mitochondrien spricht (**Abbildung 35**).

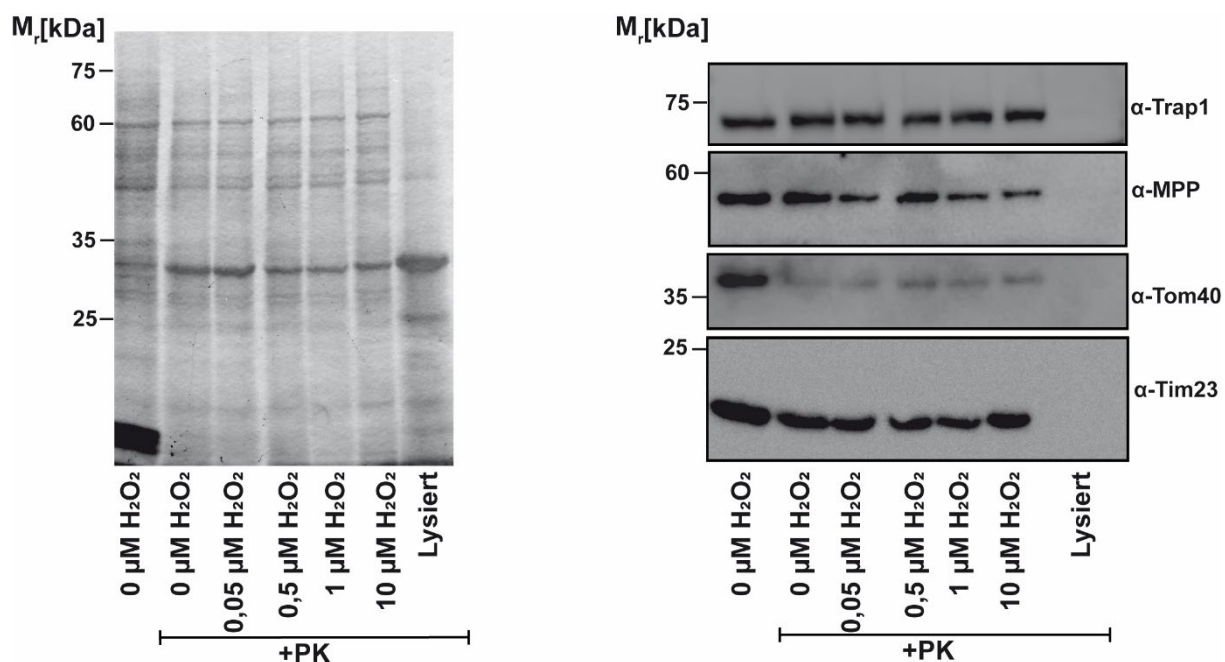


Abbildung 35: Einfluss von ROS-Stress auf die mitochondriale Stabilität. HeLa-Mitochondrien wurden in Lösung B für 15 Minuten bei 30 °C mit verschiedenen Mengen von H_2O_2 behandelt und anschließend ein PK-Verdau durchgeführt. Anschließend wurden die Proben über einen Western Blot analysiert. Antikörperdetektion gegen Tom40 diente als Nachweis von Außenmembranproteinen, MPP und Trap1 als Matrixproteine und Tim23 als

Innenmembranprotein. Triton X-100-lysierte Mitochondrien wurden als Kontrolle des PK-Verdaus ebenfalls aufgetragen.

H₂O₂ führte zu einem reduzierten Import mit gleichzeitigem Verlust des Membranpotentials. Eine Veränderung der Integrität der Mitochondrien nach H₂O₂-Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

5.3.2 Charakterisierung der isolierten Hefemitochondrien BY4741 und *sod2Δ*

Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) gehört zur antioxidativen Abwehr von Mitochondrien, welche in der Matrix reaktive Sauerstoffradikale über einen protonengekoppelten Elektronentransfer auf O₂ oder H₂O₂ übertragen (Muid et al. 2014). Bei Abwesenheit dieses Enzyms kann es zur vermehrten Bildung von ROS-Stress in den Mitochondrien kommen (Maslanka et al. 2020).

Um den Einfluss von ROS-Stress auf die mitochondriale Importkinetik in *S. cerevisiae* zu bestimmen, wurden Experimente mit *sod2Δ* (Deletionsmutante der Superoxid-Dismutase 2 der mitochondrialen Matrix) im Vergleich zur Wildtypvariante (BY4741) durchgeführt (**Abbildung 36**). Die Experimente konnten keinen Unterschied im Membranpotential zwischen BY4741 und *sod2Δ* feststellen. Es konnte gezeigt werden, dass die *sod2Δ*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp ein höheres ROS-Level besitzt (**Abbildung 36**). Dieses Ergebnis konnte durch Färbung der Mitochondrien mit dem MitoSOX-Farbstoff und Analyse per Durchflusszytometrie erzielt werden. Die Mutante zeigte auch im Western Blot keine Veränderungen der mitochondrialen Proteine Ssc1 und Mdh2 (**Abbildung 36**).

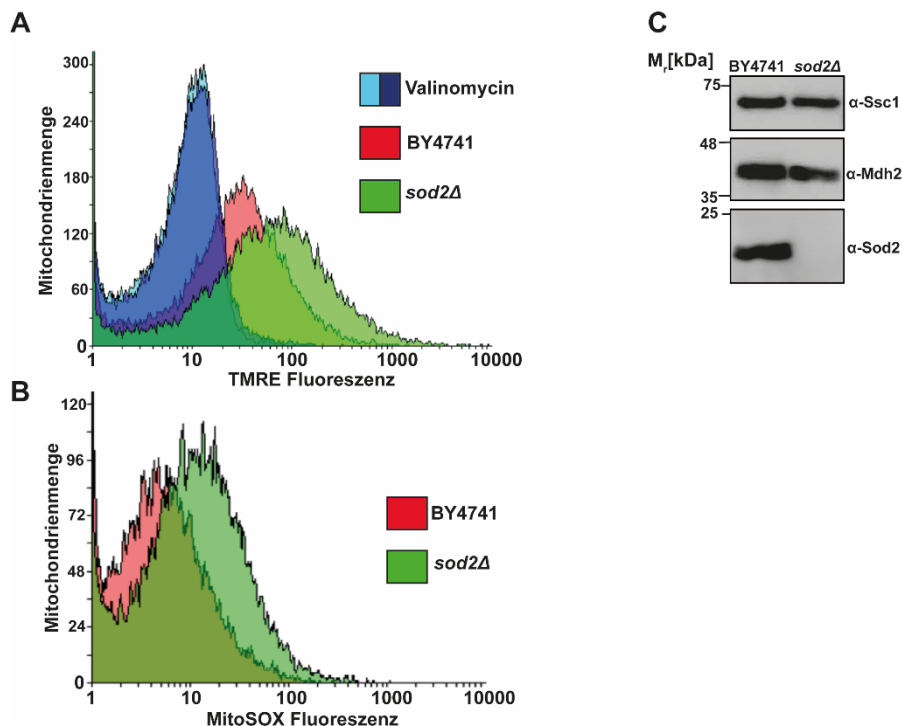


Abbildung 36: Charakterisierung der *sod2Δ*-Deletionsmutanten. A) Isolierte Mitochondrien BY4741 und *sod2Δ* wurden nach Behandlung bei 25 °C mit TMRE behandelt und anschließend im Durchflusszytometer vermessen. 5 μ M Valinomycin dienten als Negativkontrolle. Es konnte besseres Membranpotential in der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (y-Achse: Mitochondrienmenge; x-Achse: TMRE-Fluoreszenz). B) Isolierte Mitochondrien BY4741 und *sod2Δ* wurden nach Behandlung bei 25 °C mit MitoSOX behandelt und anschließend im Durchflusszytometer vermessen. Es konnte mehr ROS in der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden (y-Achse: Mitochondrienmenge; x-Achse: MitoSOX-Fluoreszenz). C) Isolierte Mitochondrien BY4741 und *sod2Δ* (50 μ g) wurden per Western Blot analysiert. Dekoration der Membran mit Antikörpern gegen Ssc1, Mdh1 und Sod2.

Um zu überprüfen, wie gut der Wildtyp und die *sod2Δ*-Mutante auf verschiedenen Nährböden wachsen, wurde ein Spotttest durchgeführt (**Abbildung 37**). Um auf Glucose zu wachsen, benötigen die Hefezellen keine mitochondriale Atmung, sodass hier nur das generelle Wachstum analysiert werden kann. Im Kontrast dazu benötigen Hefezellen, die auf Nährböden mit Glycerin wachsen können, die mitochondriale Atmung. Die YPD-Kultivierung zeigte keine Veränderung im Wachstum von BY4741 und *sod2Δ* (**Abbildung 37**). Auf Glycerin zeigte sich aber ein deutlicher Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp und ROS-Mutante. Der Wildtyp konnte bei verschiedenen Verdünnungen immer noch unter diesen Bedingungen wachsen. Die *sod2Δ* konnte dagegen nicht mehr auf dem YPG wachsen und zeigte hier einen Wachstumsdefekt (**Abbildung 37**). Ob ein

Unterschied in der mitochondrialen Importgeschwindigkeit vorliegt, wurde nun in Importexperimenten analysiert.

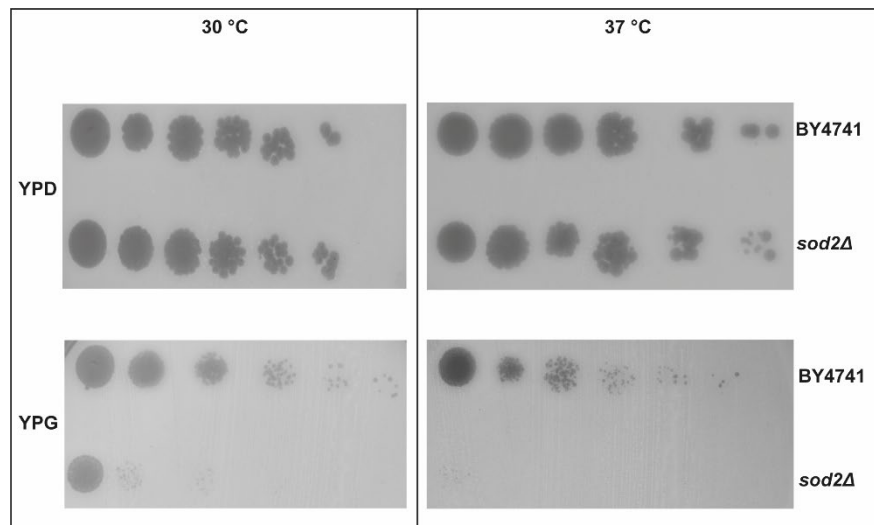


Abbildung 37: Spotttest mit BY4741 und *sod2Δ*. Verschiedene Verdünnungen von BY4741 und *sod2Δ* wurden auf YPD- und YPG-Platten aufgetragen und bei 30 °C und 37 °C inkubiert.

5.3.3 Bestimmung der maximalen Importgeschwindigkeit der isolierten Hefe-Mitochondrien BY4741 und *sod2Δ*

Die maximale Importgeschwindigkeit von BY4741 und *sod2Δ* wurde mithilfe von 40 pmol SDCSH bestimmt (**Abbildung 38**). Die Importergebnisse sowie die daraus ermittelten Intensitäten und Importraten zeigten, dass sich die beiden Hefestämme in Bezug auf die maximale Importgeschwindigkeit nicht unterscheiden (**Abbildung 38**). Es konnten Werte für die Importgeschwindigkeit von 12 pmol/mg/min festgestellt werden. Ebenfalls zeigte die Menge an importierten SDCSH nach 40 Minuten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *sod2Δ*. Mitochondrien vom Wildtyp (BY4741) importierten nach 40 Minuten 71 pmol SDCSH und die *sod2Δ* 69 pmol nach 40 Minuten (**Abbildung 39**).

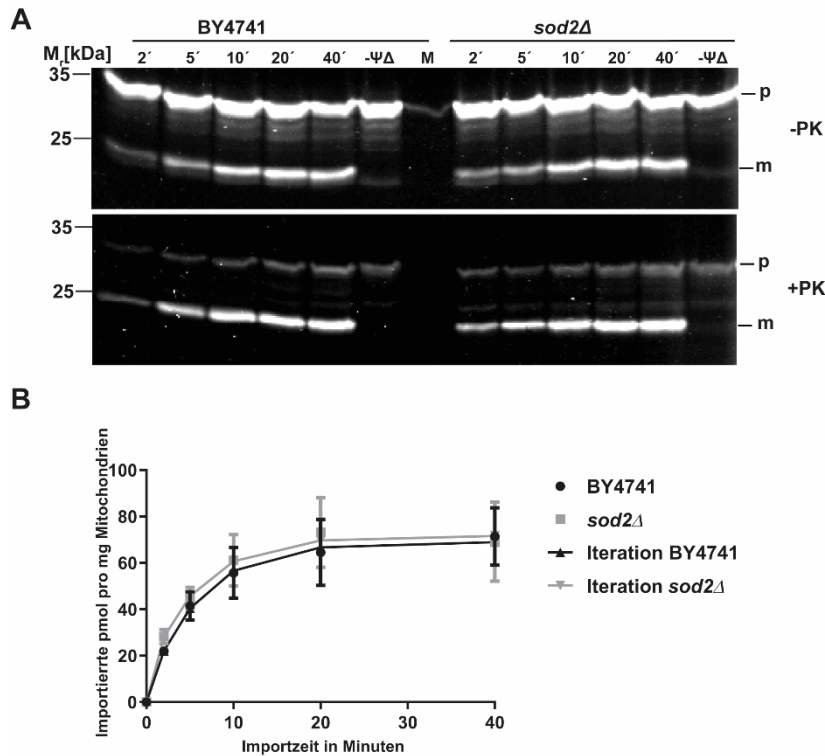


Abbildung 38: Importgeschwindigkeit von *sod2Δ* und BY4741 bei 25 °C. A) Import bei 25 °C von SDCSH in *sod2Δ* und BY4741 (n=2). B) Ermittelte m-Bandenintensitäten in pmol/mg wurden gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Iterationen stellen die durchgezogenen Linien dar. Fehler: SEM. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (Reife) Form des SDCSHs

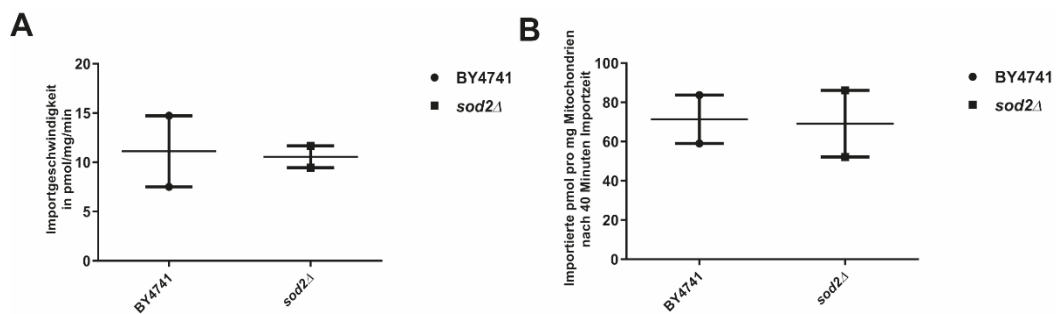


Abbildung 39: Maximale Importgeschwindigkeit und importierte Proteinmenge nach 40 Minuten von *S. cerevisiae* BY4741 und *sod2Δ*. A: Vergleich der maximalen Importgeschwindigkeit von BY4741 und *sod2Δ* in pmol/mg/min (n=2, Fehlerbalken: SEM). B: Vergleich der prozessierten Menge an SDCSH (m-Bande) in pmol/mg (n=2, Fehlerbalken: SEM)

Es konnte gezeigt werden, dass isolierte Mitochondrien aus der *sod2Δ*-Mutante ein höheres ROS-Level im Vergleich zum Wildtyp BY4741 aufweisen. Dieser ROS-Stress wirkte sich aber nicht auf das Membranpotential und die ermittelte Importgeschwindigkeit aus.

5.4 Einfluss vom isolierten Zytosol und molekularer Verdrängung auf den mitochondrialen Import

Zytosol enthält Chaperonproteine neben zahlreichen weiteren Proteinen (Young et al. 2004). Die Zugabe von Chaperonproteinen im isoliertem Zytosol könnte den Import von Präproteinen in Säugetiermitochondrien beeinflussen (Young et al. 2003). Es wurde im folgenden Abschnitt der Effekt von isoliertem Zytosol auf isolierte Säugetiermitochondrien und die Importreaktion mit SDCSH bei Zugabe von Zytosol analysiert.

5.4.1 Einfluss von isoliertem Zytosol auf den mitochondrialen Import

Das isolierte Zytosol wurde durch einen Western-Blot analysiert und es stellte sich heraus, dass die isolierte Fraktion nur zytosolische Proteine aufwies und Proteine von ER oder Mitochondrien nicht mithilfe von Antikörperdetektion nachweisbar waren (**Abbildung 40**). Proteine aus ER und Mitochondrien zeigten, dass die Organellen durch Zentrifugation nicht voneinander zu trennen sind und es noch Reste von Mitochondrienproteinen in der ER-Fraktion sowie ER-Proteine in der Mitochondrienfraktion detektiert werden konnten (**Abbildung 40**).

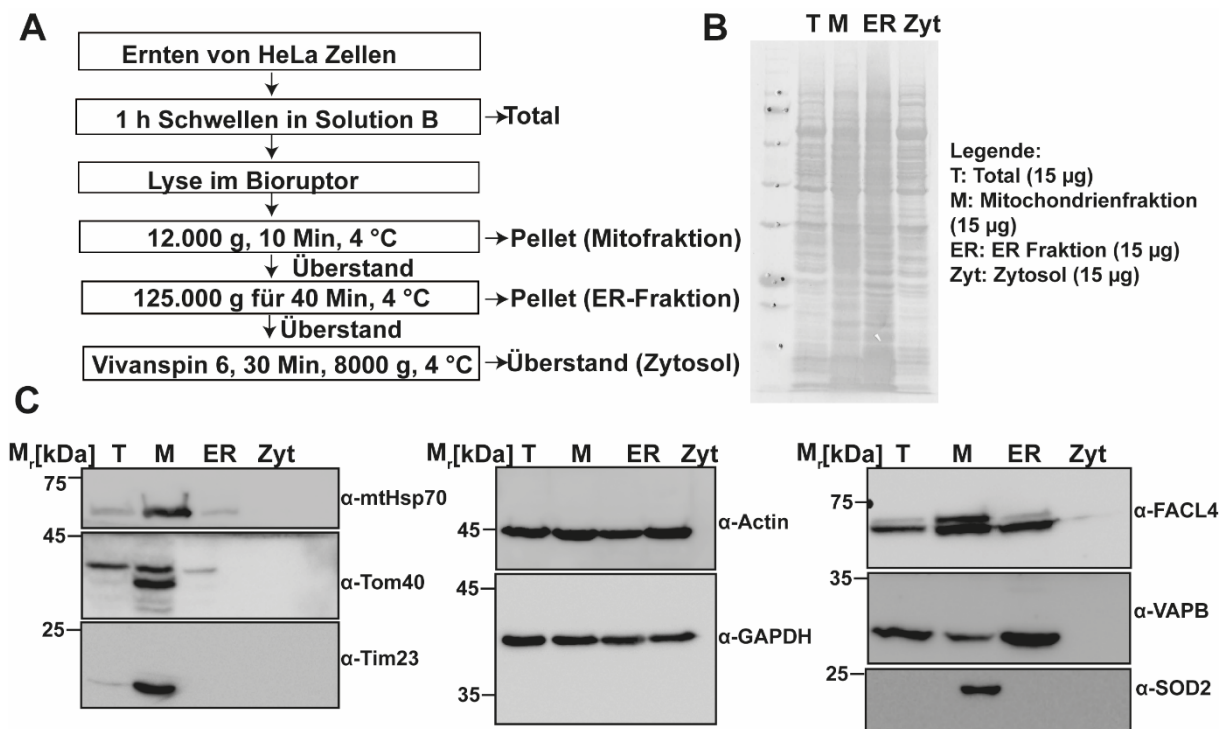


Abbildung 40: Zytosolisierung von HeLa-Zellen. Proben einer Zytosolisierung wurden mit einem Western Blot analysiert. A) Ablauf der Zytosolisierung B) Coomassie-gefärbte Membran C) Dekoration der Membran mit Antikörpern gegen mitochondriale, ER und zytosolische Proteine

Isoliertes Zytosol aus HeLa-Zellen wurde in Konzentrationen von 1 µg/µl und 4 µg/µl zu einem Import mit isolierten HEK293-Mitochondrien und SDCSH gegeben (**Abbildung 41**). In dem Import konnte festgestellt werden, dass die p-Bande mit steigender Zytosol-Konzentration abnimmt. Ebenfalls zeigte sich eine deutliche Reduzierung des Imports von SDCSH mit der Zugabe des Zytosols (**Abbildung 41**). Aus diesen Ergebnissen konnte der erste Rückschluss gezogen werden, dass die Bindung von SDCSH an die Mitochondrien reduziert wurde. Diese schwache Bindung an die Mitochondrien führte ebenfalls zu einem verlangsamten Import (**Abbildung 41**). Es konnte eine verstärkte Bildung der intermediären Form (i-bande) bei der Zugabe von 4 µg/µl Zytosol festgestellt werden. Die intermediäre Form (i-Form) wurde gebildet, da die Präsequenz von Su9 zwei MPP-Schnittstellen aufweist und durch das Prozessieren der MPP-Schnittstelle in der Mitte der Sequenz bildete sich diese Zwischenstufe (Bömer et al. 1998). Die Bildung der i-Form spricht für eine Verlangsamung des Imports. Diese Verlangsamung des Imports wurde durch die Zugabe von ATP (f.c. 1 mM) noch verstärkt (**Abbildung 41**).

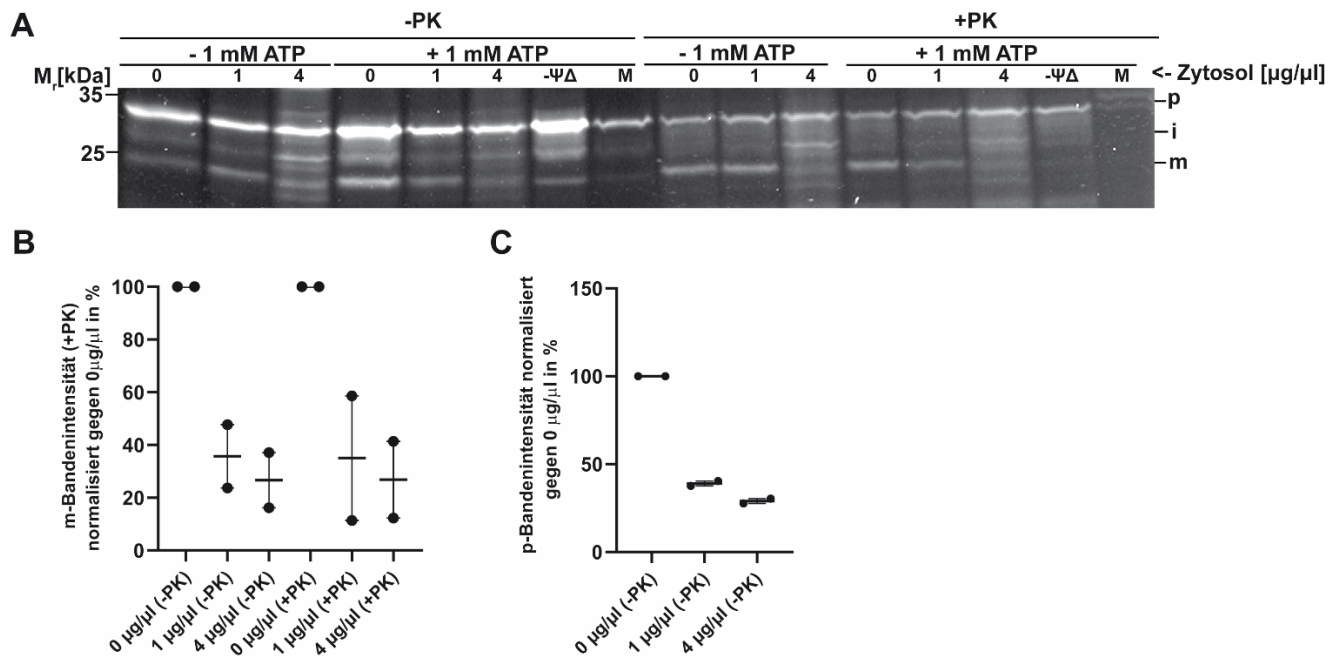


Abbildung 41: Import von SDCSH in isolierten HEK293-Mitochondrien +/- Zytosolzugabe.

A) HEK293-Mitochondrien wurden mit 1 µg/µl bzw. 4 µg/µl Zytosol versetzt (+/- 1 mM ATP) und anschließend bei 37 °C ein 40 Minuten Import mit SDCSH durchgeführt. Fehlerbalken: SEM, PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (reife) Form des SDCSHs, i: Intermediäre Form des SDCSHs B) Auswertung der m-Banden-Intensitäten (+PK) normalisiert zu der m-Bande von 37 °C ohne Zytosol (n=2, Fehler SEM) C) Auswertung der p-Banden-Intensitäten (-PK) normalisiert zu der p-Bande von 37 °C ohne Zytosol (n=2, Fehler: SEM)

Um zu überprüfen, ob Zytosol die Stabilität der Mitochondrien beeinträchtigt wurde, wurden HEK293-Mitochondrien mit Zytosol behandelt und anschließend ein PK-Verdau durchgeführt (**Abbildung 42**). Mit TritonX-100 lysierte Mitochondrien dienten als Negativkontrolle und zeigten keine Antikörpersignale der mitochondrialen Markerproteine (Trap1 (Matrix), MPP (Matrix), Tom40 (Außenmembran), Tim23 (Innenmembran)). Mit Zytosol behandelte Mitochondrien zeigten auch keinen Abbau der mitochondrialen Proteine ohne PK-Verdau, was ebenfalls als Kontrolle überprüft wurde. Die Stabilität der Mitochondrien konnte nach Zytosolzugabe weiter bestehen bleiben (**Abbildung 42**). Der PK-Verdau der Mitochondrien nach der Zytosol-Behandlung zeigte keine Veränderung der Stabilität. Der Abbau von Tom40 in der Außenmembran durch die PK wurde in den unbehandelten sowie Zytosol-behandelten Mitochondrien festgestellt. Die Innenmembran (Tim23) und auch die Matrix

(MPP, Trap1) zeigten auch keine Veränderung nach der PK-Behandlung und Zugabe von isoliertem Zytosol.

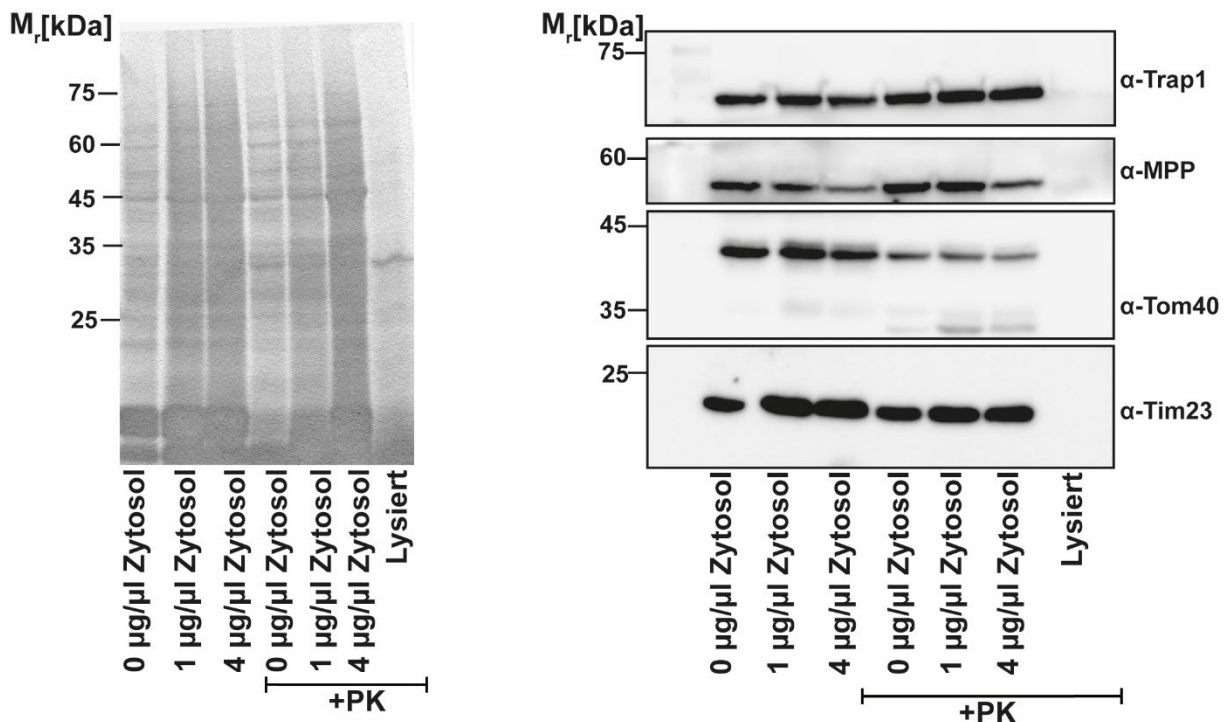


Abbildung 42: Stabilität von isolierten HEK293-Mitochondrien +/- Zytosolzugabe. HEK293-Mitochondrien wurden mit 1 μg/μl und 4 μg/μl Zytosol behandelt und anschließend ein PK-Verdau durchgeführt. Anschließend wurden die Proben über einen Western Blot analysiert. Antikörperdetektion gegen Tom40 diente als Nachweis von Außenmembranproteinen, MPP und Trap1 als Matrixproteine und Tim23 als Innenmembranprotein. Triton X-100-lysierte Mitochondrien wurden als Kontrolle des PK-Verdaus ebenfalls aufgetragen.

Ein weiteres Kontrollexperiment mit isolierten HEK293-Mitochondrien und isoliertem Zytosol wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob isoliertes Zytosol zu einer Depolarisierung der Mitochondrien führt. Die Mitochondrien nach Behandlung mit Zytosol zeigten ein vergleichbares Membranpotential, wie ohne Zytosolzugabe (**Abbildung 43**). Dieses Ergebnis konnte zeigen, dass eine Depolarisation kein Grund für den verlangsamten Import nach Zugabe von Zytosol sein kann.

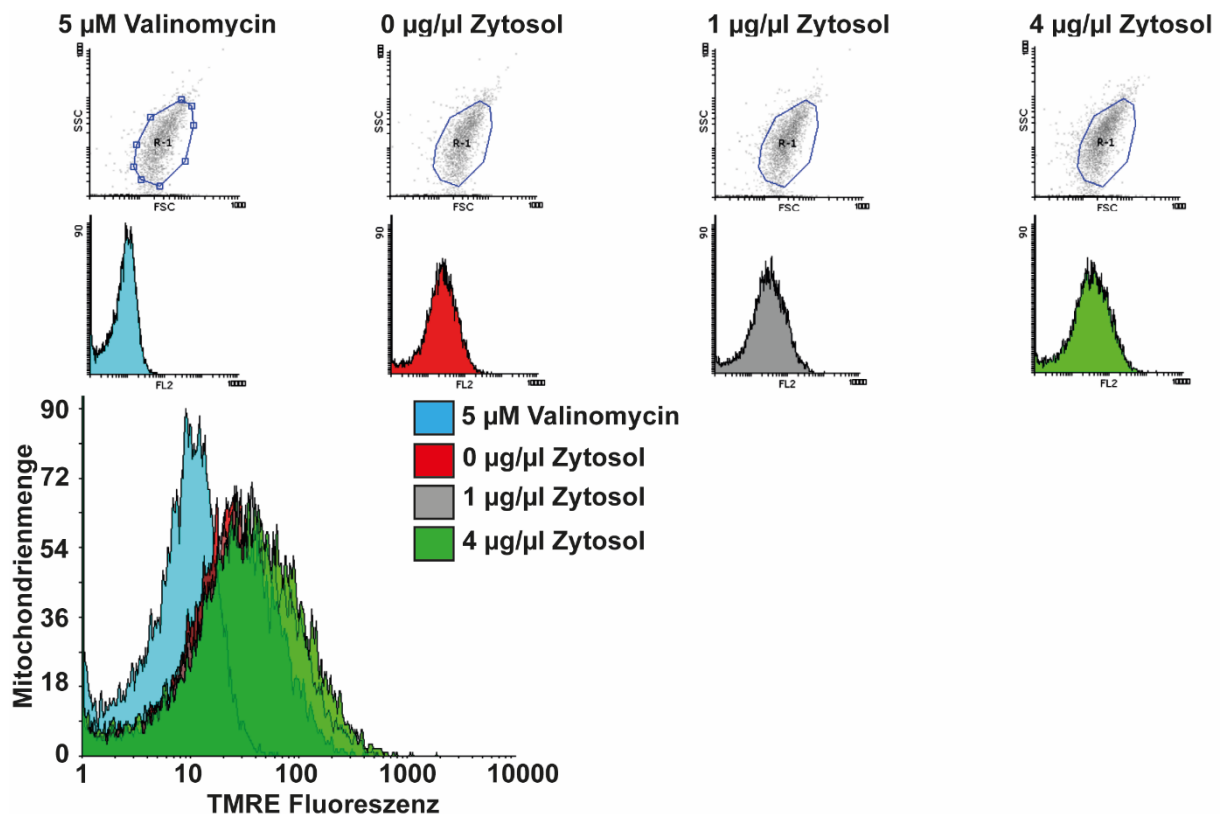


Abbildung 43: Membranpotential von isolierten HEK293-Mitochondrien +/- Zytosolzugabe. Effekt von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Zytosol auf das Membranpotential von isolierten HEK293-Mitochondrien, gemessen durch TMRE-Färbung mit anschließender Messung per Durchflusszytometrie. Der Entkoppler Valinomycin diente als Negativkontrolle für ein gestörtes Membranpotential. Gating der Mitochondrienpopulation wurde nach Größe und Granularität durchgeführt. Überlagerungshistogramm der TMRE-Messung der isolierten Mitochondrien nach Zytosol Behandlung.

Es konnte gezeigt werden, dass isoliertes Zytosol *in vitro* den Import ATP-abhängig hemmt. Die Bindung des SDCSHs an die Mitochondrien wurde durch das Zytosol reduziert. Außerdem wurde eine Verlangsamung des Imports bei 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ festgestellt, welche sich durch Bildung der intermediären Form (i-Bande) zeigte. Die Zugabe von Zytosol zeigte keine Depolarisation der Mitochondrien und keine Veränderung der mitochondrialen Integrität.

5.5 Einfluss von Aggregaten auf den mitochondrialen Import

Im Kontext von neurodegenerativen Krankheiten kommt es zur Bildung von A β -Plaques (Thal et al. 2015). Diese Aggregatansammlungen sind in der Lage, den Import in den Mitochondrien zu stören (Cenini et al. 2016). A β 40-Dimere bilden nur Oligomere und keine fibrillären Strukturen (Schützmann et al. 2021). Um zu überprüfen, ob amyloide Oligomere den Import hemmen können, wurden Importexperimente mit A β 40-Dimer (DiA β) durchgeführt.

5.5.1 Einfluss von DiA β auf den Import in isolierten HeLa-Mitochondrien

Es wurde ein Import mit HeLa-Mitochondrien und verschiedenen Konzentrationen des Dimers von A β 40 bei 30 °C durchgeführt (**Abbildung 44**). Ab einer Konzentration von 3,5 μ M DiA β konnte eine komplette Hemmung des Imports beobachtet werden (**Abbildung 44**).

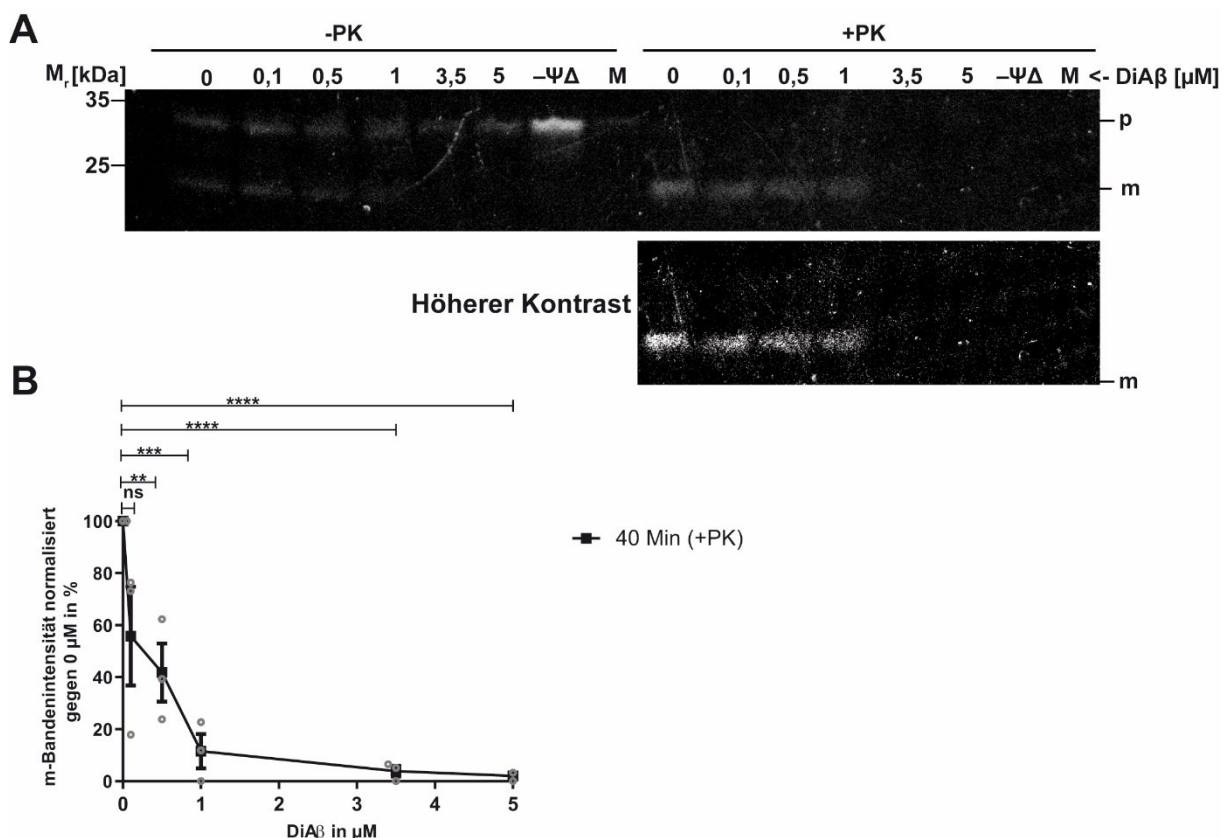


Abbildung 44: Effekt von DiA β -Peptiden auf den mitochondrialen Import. A) HeLa-Mitochondrien wurden mit verschiedenen DiA β -Konzentrationen versetzt und anschließend bei 30 °C ein 40-Minuten-Import mit SDCSH durchgeführt. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (reife) Form des SDCSHs B) Statistische Auswertung der m-Banden Intensitäten (+PK) normalisiert zu der m-Bande von 30 °C ohne

Behandlung. (n=3, Fehlerbalken SEM, ungepaarter t-Test $p^{**}=0,0065$ $p^{***}=0,0002$ $p^{****}<0,0001$)

Ebenfalls wurden Messungen des Membranpotentials mit isolierten Mitochondrien in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von DiA β durchgeführt (**Abbildung 45**). Die Ergebnisse zeigten keinen Effekt der DiA β auf das Membranpotential. Als Negativkontrolle diente hier 5 μ M Valinomycin, welches das Membranpotential als Entkoppler stört (**Abbildung 45**).

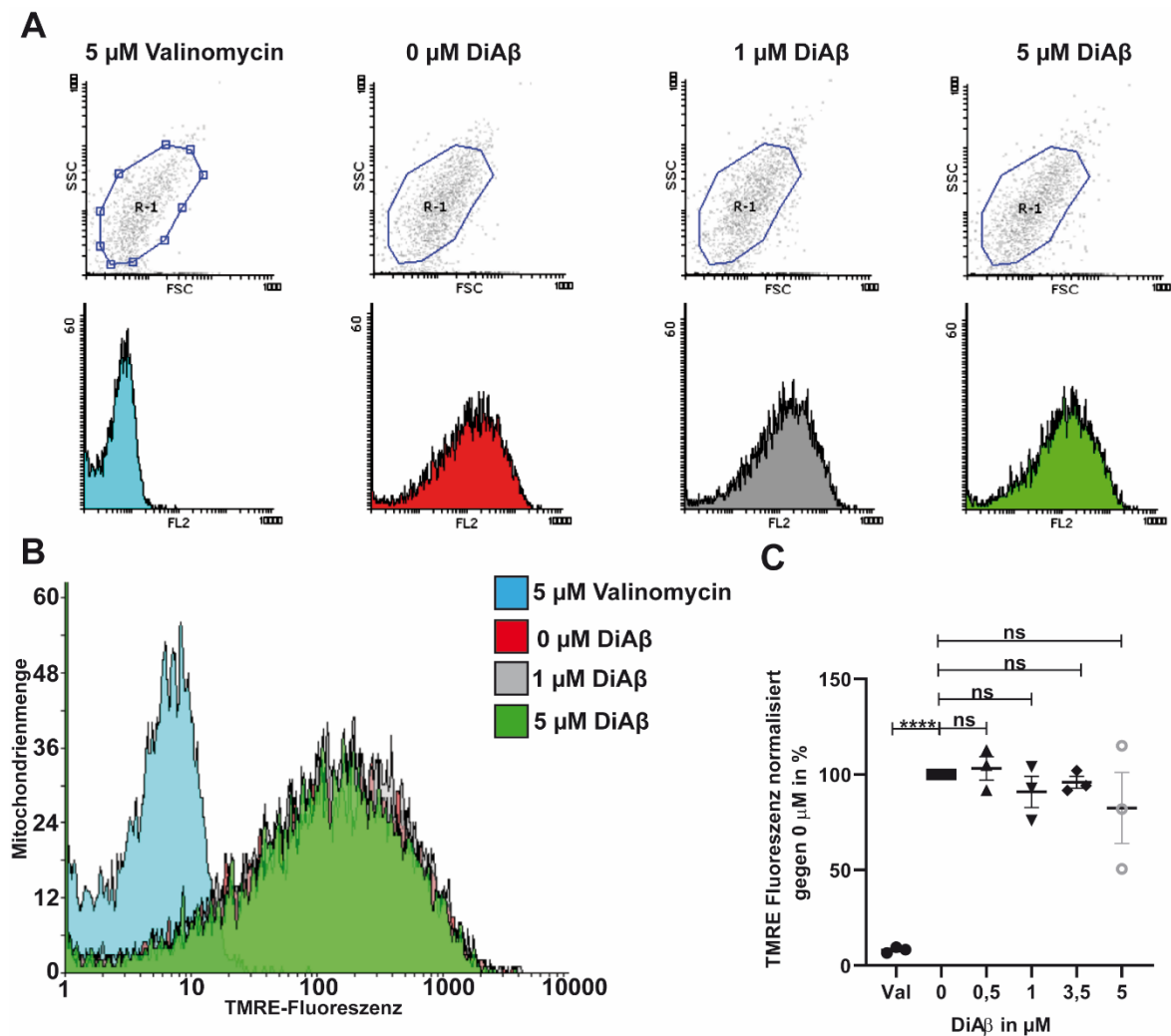


Abbildung 45: Effekt von DiA β -Peptiden auf das Membranpotential von isolierten HeLa-Mitochondrien A) Effekt von 1 μ M und 5 μ M DiA β auf das Membranpotential von isolierten HeLa-Mitochondrien, gemessen durch TMRE-Färbung und anschließende Messung per Durchflusszytometrie. Gating der Mitochondrienpopulation wurde nach Größe und Granularität durchgeführt. Entkoppler Valinomycin diente als Negativkontrolle für ein gestörtes Membranpotential B) Überlagerungshistogramm der TMRE-Messung der isolierten Mitochondrien nach DiA β C) Messung der TMRE-Fluoreszenz nach DiA β mithilfe eines Mikroplattenlesegerätes und anschließender Normalisierung von 0 μ M DiA β , um Unterschiede

der TMRE-Fluoreszenz zu analysieren. (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test $p^{****} < 0,0001$)

Um festzustellen, ob DiA β sich negativ auf die mitochondriale Stabilität auswirkt, wurden HeLa-Mitochondrien mit DiA β inkubiert und anschließend ein PK-Verdau durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass die Stabilität sich nicht veränderte (**Abbildung 46**). Eine Detektion des DiA β wurde durch A β -Antikörper durchgeführt und zeigte Signale in Spuren, wo kein DiA β vorlag (**Abbildung 46**). Durch diese nicht verlässliche Antikörperdetektion gegen DiA β konnte keine Aussage bezüglich der A β -Detektion zu diesem Ergebnis getroffen werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Import nicht durch eine Störung des Membranpotentials oder durch eine veränderte mitochondriale Integrität gehemmt wurde.

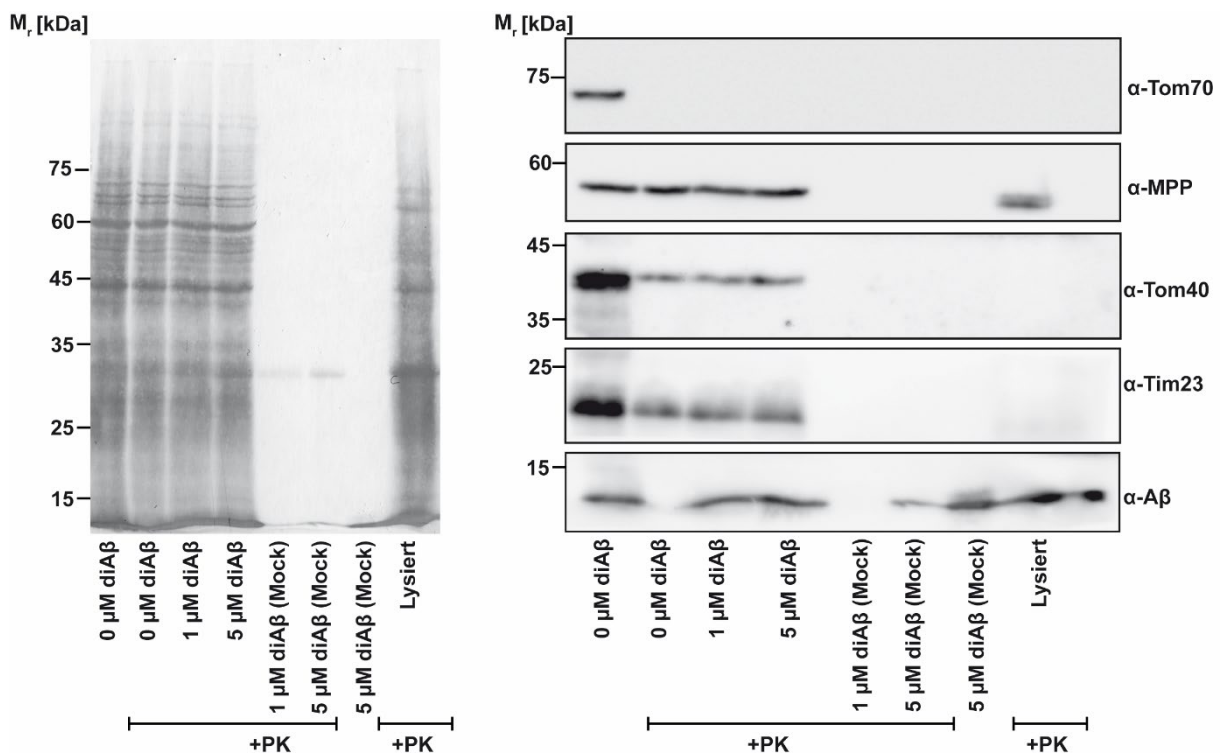


Abbildung 46: Effekt von DiA β -Peptiden auf die mitochondriale Integrität. A) HeLa-Mitochondrien wurden mit DiA β behandelt und anschließend ein PK-Verdau durchgeführt. Anschließend wurden die Proben über einen Western Blot analysiert. Die Antikörperdetektion von Tom40 und Tom70 diente als Nachweis von Außenmembranproteinen, MPP als Matrixprotein und Tim23 als Innenmembranprotein. Triton X-100-lysierte Mitochondrien wurden als Kontrolle des PK-Verdaus ebenfalls aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, dass amyloide Oligomere wie DiA β den Import ab einer Konzentration von 3,5 μ M komplett hemmen. Diese Hemmung lie β sich nicht durch Depolarisation der Mitochondrien, sowie eine unveränderte Integrität erklären, da DiA β darauf keinen Effekt zeigen konnte. Daraus könnte man folgende Schlussfolgerung ziehen: Eine Interaktion von DiA β mit dem Präprotein SDCSH muss stattfinden und so wurde der Import gehemmt.

5.5.2 Charakterisierung des Einflusses von DiA β auf HeLa-Zellen

In vitro konnte eine Hemmung des mitochondrialen Imports festgestellt werden. Im Folgenden wurde überprüft, ob DiA β sich negativ auf intakte HeLa-Zellen und sich darin befindende Mitochondrien auswirken kann. Um dies zu überprüfen, wurden zu HeLa-Zellen DiA β dazugegeben und für 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden HeLa-Zellen mit TMRE angefärbt, um das Membranpotential mithilfe des Durchflusszytometers zu analysieren (**Abbildung 47**). Neben der Membranpotential-Messung wurden die HeLa-Zellen auch in anderen Experimenten nach der DiA β -Inkubation mit MitoSOX angefärbt und im Durchflusszytometer vermessen, um das ROS-Level zu überprüfen (**Abbildung 48**). Die Ergebnisse zeigten ein gleichbleibendes Membranpotential, sowie keine Erhöhung des ROS-Levels nach 24 Stunden Behandlung mit 0,1 μ M oder 1 μ M DiA β (**Abbildung 47,Abbildung 48**).

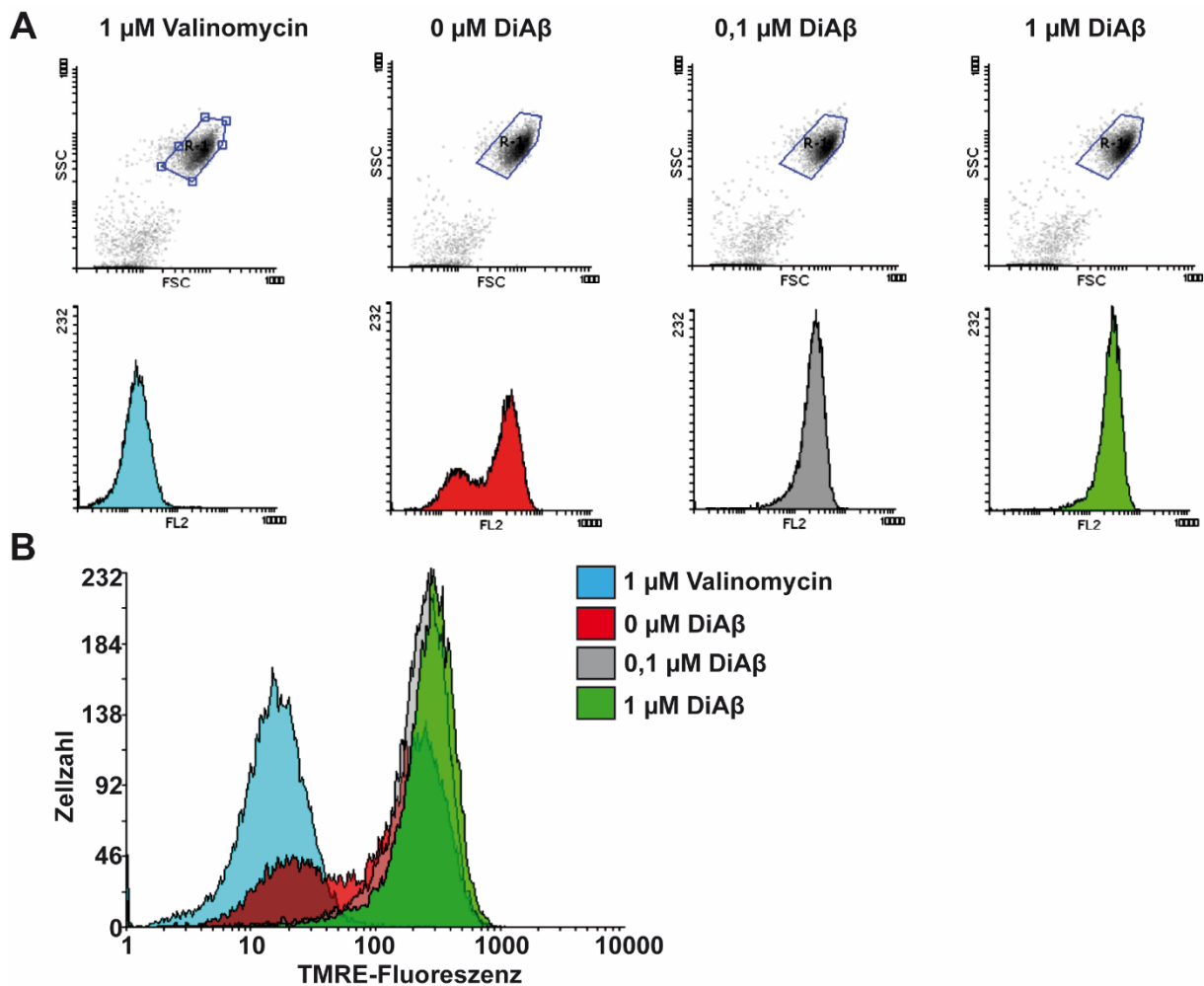


Abbildung 47: Effekt von DiA β -Peptiden auf das Membranpotential von HeLa-Zellen. A) HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,1 μ M DiA β und 1 μ M DiA β behandelt. Als Negativkontrolle wurden außerdem HeLa-Zellen 4 Stunden mit 1 μ M Valinomycin behandelt und anschließend wurden alle Proben mit TMRE gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Die Zellpopulation wurde nach der Zelldichte gegatet (R-1) und in einem Überlagerungshistogramm (B) aufgetragen.

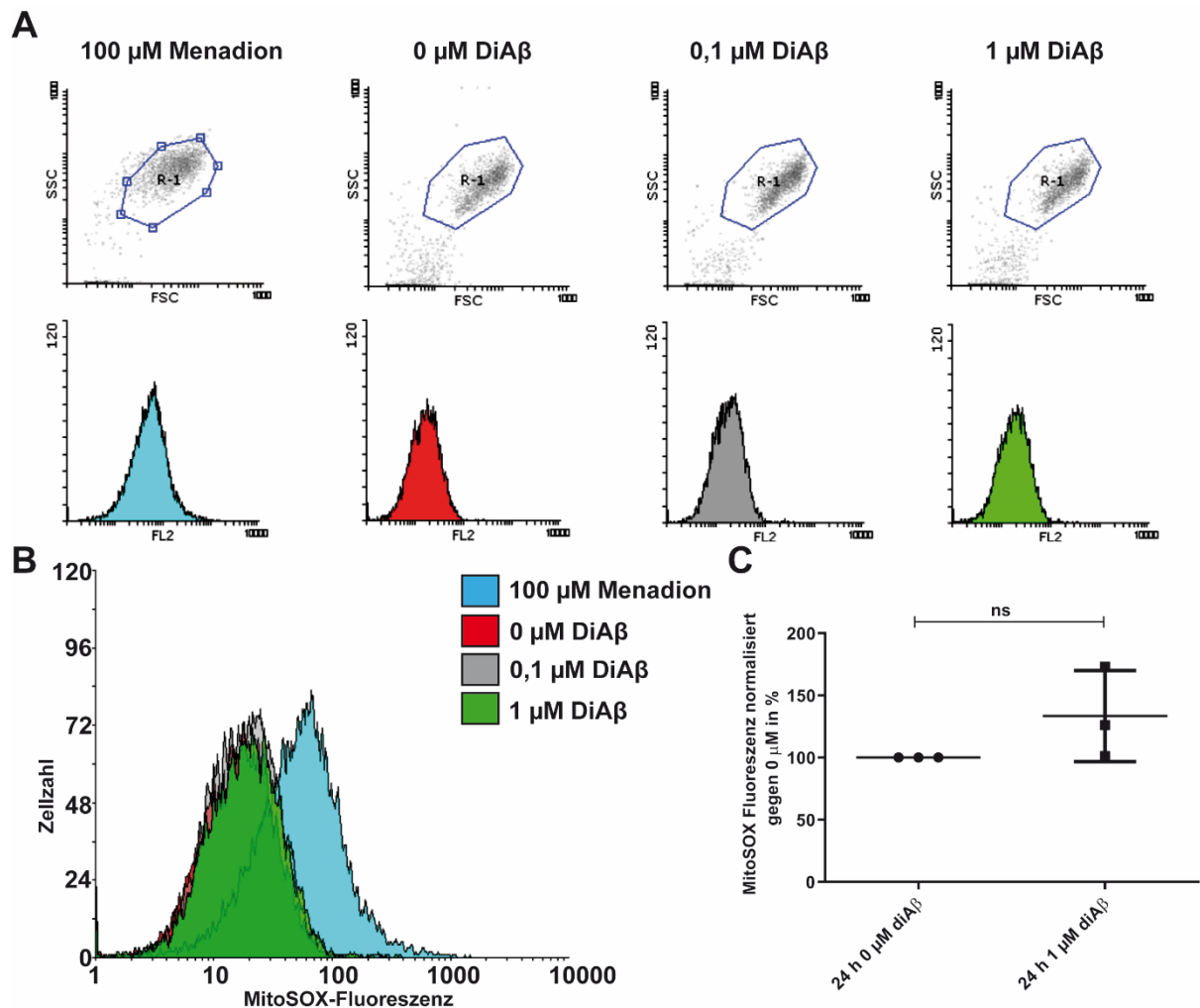


Abbildung 48: Effekt von DiA β -Peptiden auf die ROS-Produktion von HeLa-Zellen. A) HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,1 μM DiA β und 1 μM DiA β behandelt. Als Negativkontrolle für ROS-Stress wurden außerdem HeLa-Zellen 2 Stunden mit 100 μM Menadione behandelt und anschließend alle Proben mit dem Farbstoff MitoSOX gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. B) Die Zellpopulation wurde nach der Zelldichte gegatet und in einem Überlagerungshistogramm aufgetragen. C) Der gegatete Median wurde gegen die Zellen, welche mit Tris-Puffer behandelt wurden, normalisiert. Der ungepaarte t-Test ergab keine signifikante Veränderung (ns) im ROS-Level nach DiA β -Behandlung. (n=3, SEM)

Mithilfe von Zelllyse und Western Blot konnten auch die Mengen verschiedener mitochondrialer Proteine nach Behandlung analysiert werden. Die Mengen mitochondrialer Markerproteine wie Tim23, Tom70 und SOD2 wurden nicht verändert, mit und ohne DiA β -Behandlung (**Abbildung 49**). Die Signale des α -phospho Ubiquitin und Pink1, welche Marker für Pink1 (PTEN-induzierte Kinase 1) Aktivität und Mitophagie sind, wurden auch nicht induziert durch DiA β -Behandlung der Zellen (**Abbildung 49**). Allgemein bezeichnet Mitophagie den

Abbau von Mitochondrien durch lysosomalen Abbau in der Zelle (Sato und Furuya 2018).

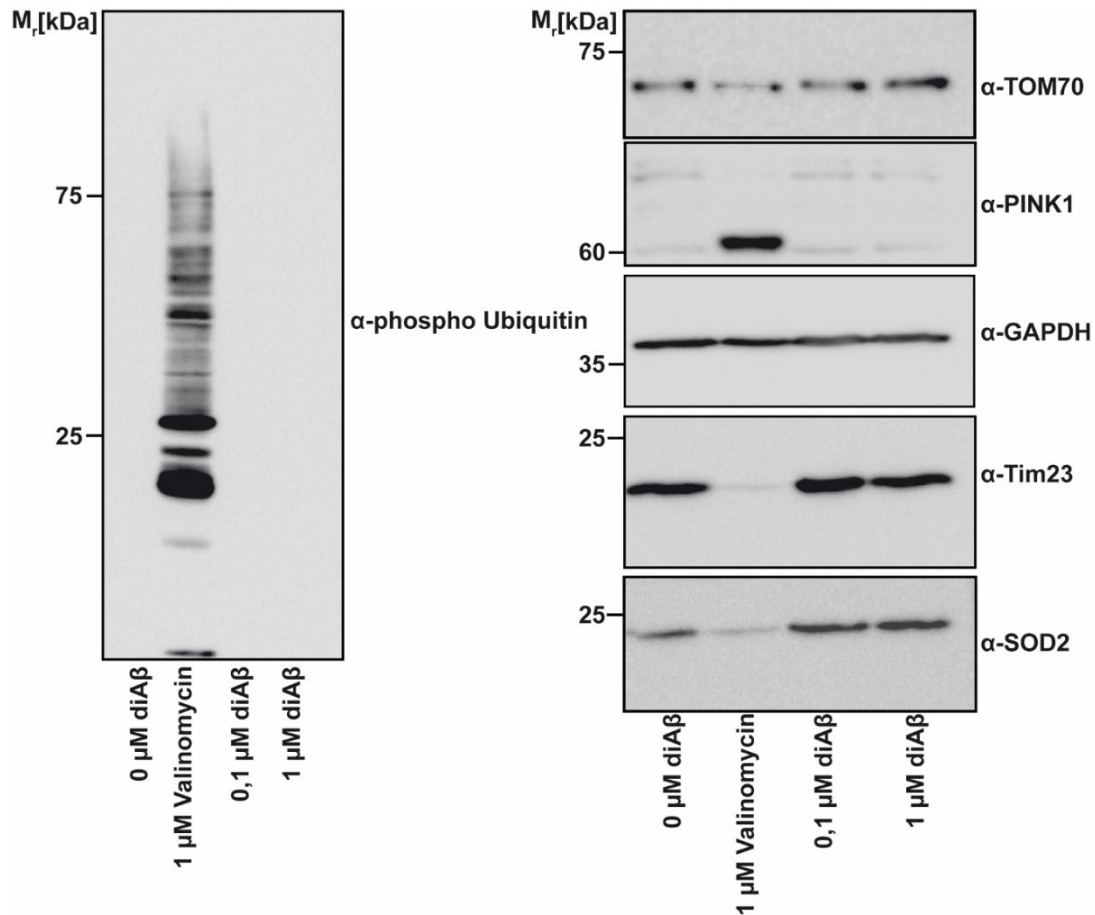


Abbildung 49: Effekt von DiAβ-Peptiden auf die Proteinlevel und Mitophagy-Marker von HeLa-Zellen. 500.000 HeLa-Zellen wurden mit DiAβ-Peptiden (0,1 μM und 1 μM) für 24 Stunden behandelt.

Die Behandlung mit DiAβ von HeLa-Zellen führte zu keiner Depolarisation der Mitochondrien, sowie zu keiner vermehrten ROS-Leveln. Außerdem wurden die mitochondrialen Proteinlevel durch die Behandlung mit DiAβ nicht beeinflusst und keine Mitophagy-Marker detektiert. Daraus lässt sich schließen, dass die DiAβ-Behandlung keinen Einfluss auf die Mitochondrien in intakten Zellen zeigt.

5.5.3 Einfluss von Aβ40/Aβ42 auf den mitochondrialen Import

Die Experimente mit DiAβ zeigten eine Hemmung des Imports mit SDCSH. In weiteren Experimenten wurde überprüft, ob die Monomere Aβ40 und Aβ42 einen negativen Effekt auf den Import haben könnten. Der SDCSH-Import in HEK293-Mitochondrien mit Konzentrationen von Aβ40 und Aβ42 zeigte eine hemmende Wirkung des Imports mit einer Konzentration von 3,5 μM Aβ-Peptiden

(Abbildung 50). Es zeigte sich, dass die Hemmung durch A β 42-Peptide einen stärkeren Abstieg des m-Bandensignals bei höheren Konzentrationen zur Folge hat. Dieser Abstieg des Signals der m-Bande lag bei ähnlichen A β 40-Konzentrationen schwächer vor (Abbildung 50).

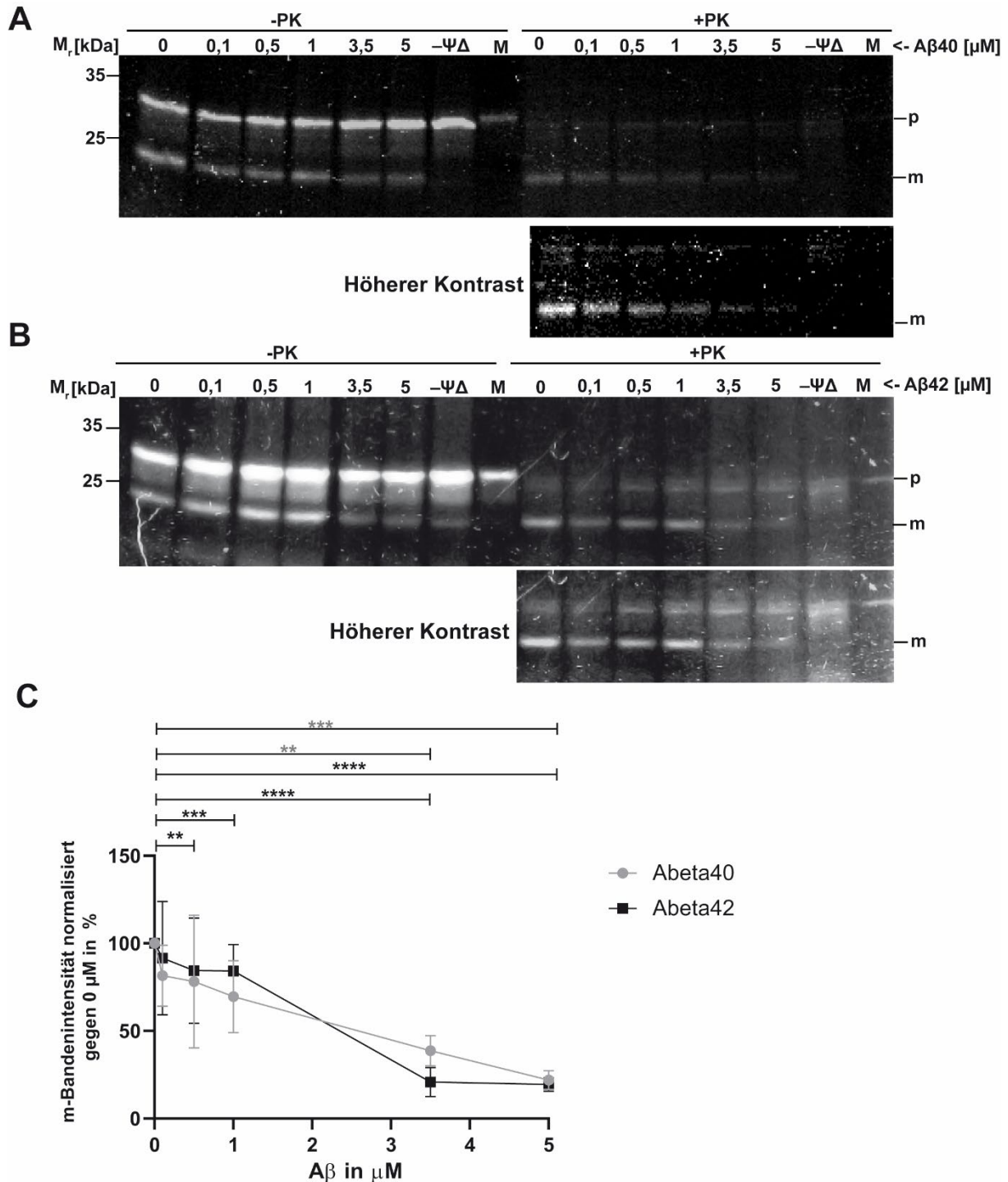


Abbildung 50: Effekt von A β 40-Peptiden und A β 42-Peptiden auf den mitochondrialen Import. A) HEK293-Mitochondrien wurden mit verschiedenen A β 40-Konzentrationen versetzt und anschließend bei 37 °C ein 40 Minuten Import mit SDCSH durchgeführt. B) HEK293-Mitochondrien wurden mit verschiedenen A β 42-Konzentrationen versetzt und anschließend bei

37 °C ein 40 Minuten Import mit SDCSH durchgeführt. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (reife) Form des SDCSHs C) Statistische Auswertung der m-Banden Intensitäten (+PK) normalisiert zu der m-Bande von 37 °C ohne Behandlung. A β 40 in grau und A β 42 in schwarz (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test p**=0,0021 p*=0,0065 p***=0,0001 p****=0,0002 p*****=<0,0001)

Um dieses Experiment zu verifizieren, wurden isolierte HEK293-Mitochondrien nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C mit A β -Peptiden TMRE gefärbt und anschließend im Plattenlesegerät die Fluoreszenz der TMRE-gefärbten Mitochondrien gemessen (**Abbildung 51**). Dabei konnte keine Veränderung des Membranpotentials festgestellt werden (**Abbildung 51**). 3,5 μ M A β 40 zeigten eine geringe Verringerung des Membranpotentials, was aber durch die steigenden Werte nach 5 μ M Behandlung relativiert wurde (**Abbildung 51**). Als Negativkontrolle wurden auch mit 5 μ M Valinomycin behandelte isolierte HEK293-Mitochondrien analysiert.

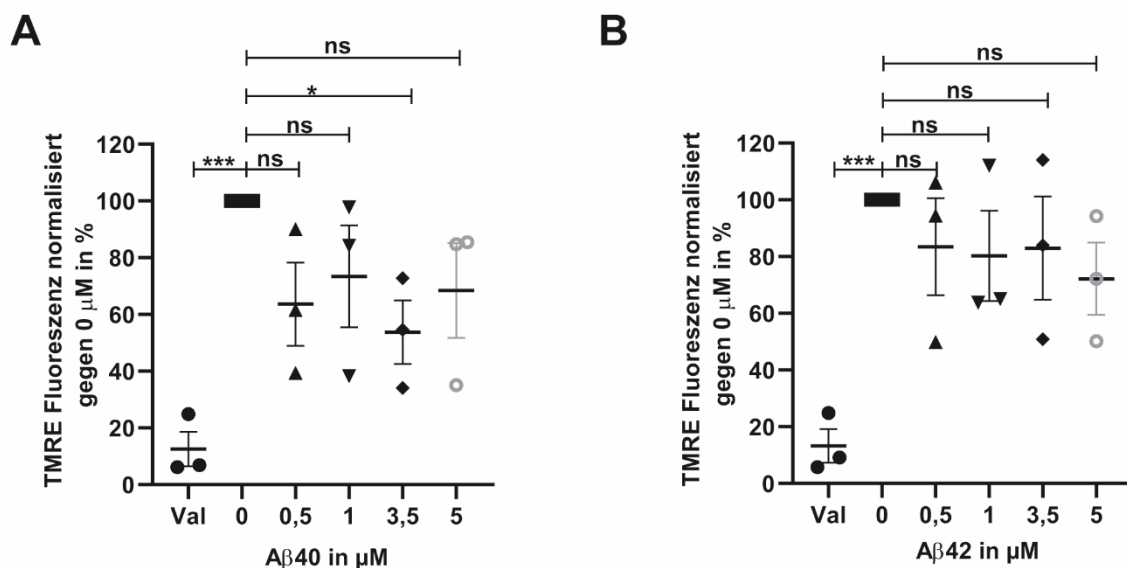
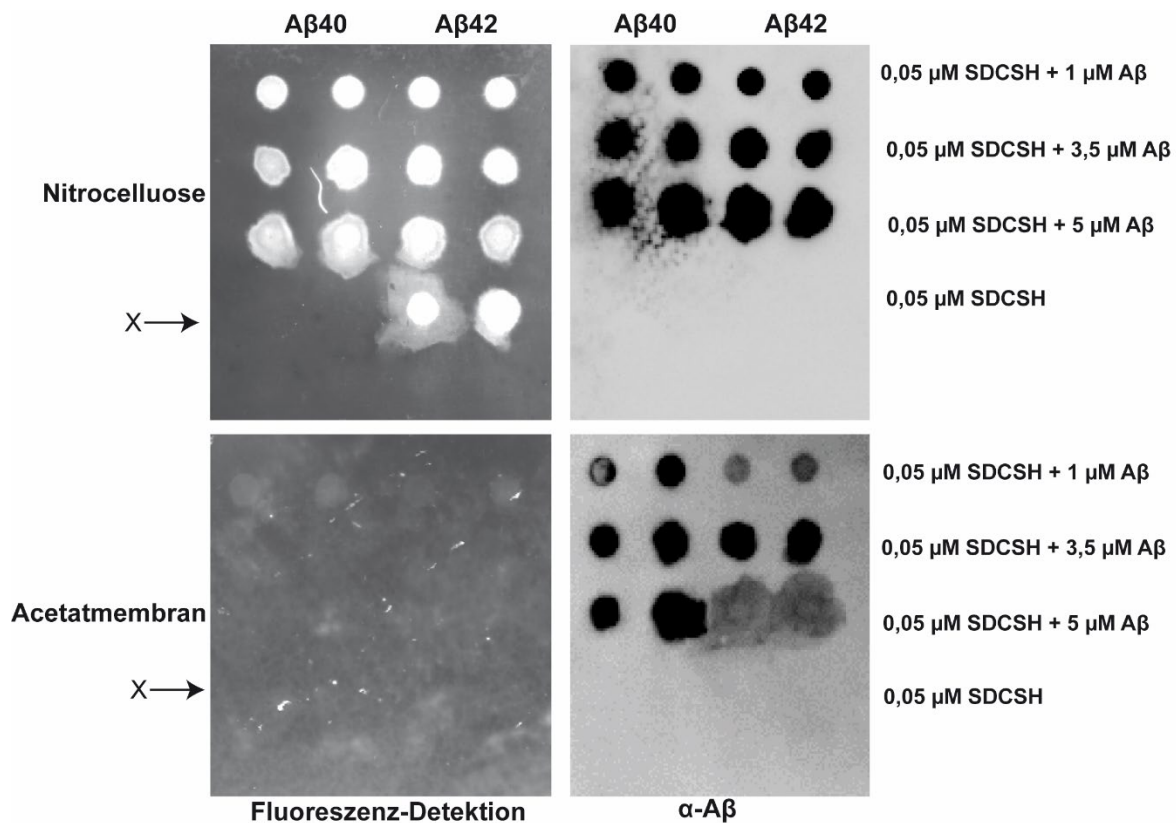


Abbildung 51: Effekt von A β 40- und A β 42-Peptiden auf das Membranpotential A) Messung der TMRE-Fluoreszenz nach A β 40 mithilfe eines Mikroplattenlesegerätes und anschließender Normalisierung von 0 μ M A β 40, um Unterschiede der TMRE-Fluoreszenz zu analysieren. (n=3, Fehlerbalken: SEM, t-Test p*= 0,0145 p***=0,0001) B) Messung der TMRE-Fluoreszenz nach A β 42 mithilfe eines Mikroplattenlesegerätes und anschließender Normalisierung von 0 μ M A β 42, um Unterschiede der TMRE-Fluoreszenz zu analysieren. (n=3, Fehlerbalken: SEM, t-Test p***=0,0001)

Um festzustellen, ob eine Koaggregation mit SDCSH und den Peptiden A β 40 und A β 42 vorliegt, wurde ein sogenannter Filterretardierungstest durchgeführt (**Abbildung 52**). Dabei wurden Proben auf eine Nitrocellulose und eine Acetatmembran aufgetragen und anschließend mithilfe von Vakuum durchgesaugt. Auf der Nitrocellulose, welche als Kontrolle dient, sollte jede Art von Protein durch elektrostatische Anziehung gebunden bleiben. Bei der Acetatmembran können nur amyloide Proteinstrukturen gebunden bleiben, weil durch das Waschen mit SDS nur SDS-lösliche Proteine durchgesaugt werden. Amyloide Aggregate sind nicht SDS-löslich und bleiben deshalb auf der Acetatmembran zurück. Das Experiment wurde mit einer Konzentration von 0,05 μ M SDCSH durchgeführt, um eine mögliche Koaggregation mit den A β -Peptiden (1 μ M, 3,5 μ M und 5 μ M) zu überprüfen (**Abbildung 52**). SDCSH und A β -Peptid wurden zusammen in einem Reaktionsgefäß inkubiert und anschließend auf die Membranen aufgetragen. Dabei stellte sich heraus, dass SDCSH keine Koaggregation auf der Acetatmembran zeigt. A β 40 und A β 42 konnten auf der Acetatmembran mithilfe eines A β -Antikörpers detektiert werden. Auf der Nitrocellulose konnte das Fluoreszenzsignal von SDCSH mithilfe des Fluoreszenz-Scanners gemessen und die A β -Peptide konnten durch einen A β -Antikörper detektiert werden (**Abbildung 52**).



X: In dieser Reihe wurde 2 mal 0,05 μM SDCSH aufgetragen. Um den Hintergrund von diesem Experiment abzubilden, wurde in dieser Reihe ebenfalls zweimal 1x Importpuffer aufgetragen.

Abbildung 52: Filterretardierungstest mit SDCSH und A β 40/42. 0,05 μM SDCSH wurden mit verschiedenen Mengen von A β 40/42 bei 37 °C inkubiert und anschließend durch eine Nitrocellulosemembran und Acetatmembran von Vakuum gezogen. Die Fluoreszenz auf den Membranen wurde per Fluoreszenz-Scanner detektiert und die gebundenen A β -Peptide auf den Membranen wurden mithilfe eines A β -Antikörpers dekoriert.

Die Importhemmung durch A β 40 und A β 42 konnte ab einer Konzentration von 3,5 μM festgestellt werden. Grund dafür könnte eine mögliche Koaggregation mit dem Präprotein sein. Eine Depolarisation der Mitochondrien lag nachweislich nicht vor.

5.5.4 Einfluss von Zytosol auf A β -Peptiden im Kontext von Importexperimenten

Es konnte in dem Experiment (**Abbildung 41**) gezeigt werden, dass isoliertes Zytosol unter ATP-Verbrauch durch reduzierte Bindung an die Mitochondrien den Import hemmen kann. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt den Importdefekt durch die A β -Peptide beeinflussen könnte, wurde der Import mit 3,5 μM A β -Peptiden

durchgeführt und 1 µg/µl Zytosol hinzugegeben (**Abbildung 53**, **Abbildung 54**). Als Kontrollbedingung wurde BSA in der gleichen Konzentration in diesen Importexperimenten verwendet. Die Importhemmung durch die verschiedenen Aβ-Peptide konnte beobachtet werden, mit dem Unterschied, dass die Hemmung in der Anwesenheit von 1 µg/µl BSA nicht so stark ausfällt wie ohne BSA-Zugabe (**Abbildung 54**). Der Import mit Zugabe von Zytosol und Aβ zeigte vergleichbare oder sogar schwächere m-Banden-Intensitäten im Vergleich zu der Probe mit 3,5 µM Aβ-Peptiden (**Abbildung 53**). Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei den Experimenten mit 3,5 µM DiAβ und 1 µg/µl Zytosol (**Abbildung 54**).

Es konnte erneut gezeigt werden, dass durch die Zugabe des Zytosols ebenfalls die Intensität der p-Bande stark reduziert war. Die Bindung an die Mitochondrien, dargestellt durch die p-Banden-Intensität zeigte nur marginale Verbesserungen zwischen der Probe mit Zytosol im Vergleich mit der Probe mit Zytosol und Aβ-Peptid, sodass die Bindung des Präproteins an die Mitochondrien kaum beeinflusst wurde (**Abbildung 53**). Dieses Ergebnis konnte auch bei den Proben mit Zytosol im Vergleich mit der Probe Zytosol mit DiAβ beobachtet werden (**Abbildung 54**).

Interessanterweise zeigte sich auch, dass in der Anwesenheit von 3,5 µM DiAβ und 1 µg/µl Zytosol die Menge des SDCSH in der Mockprobe (ohne Mitochondrien) im Vergleich zur Probe mit BSA um das Fünffache zunahm (**Abbildung 54**). Möglicherweise bilden sich mehr Aggregate in dieser Probe, welche am Ende des Experiments im Pellet zu detektieren sind.

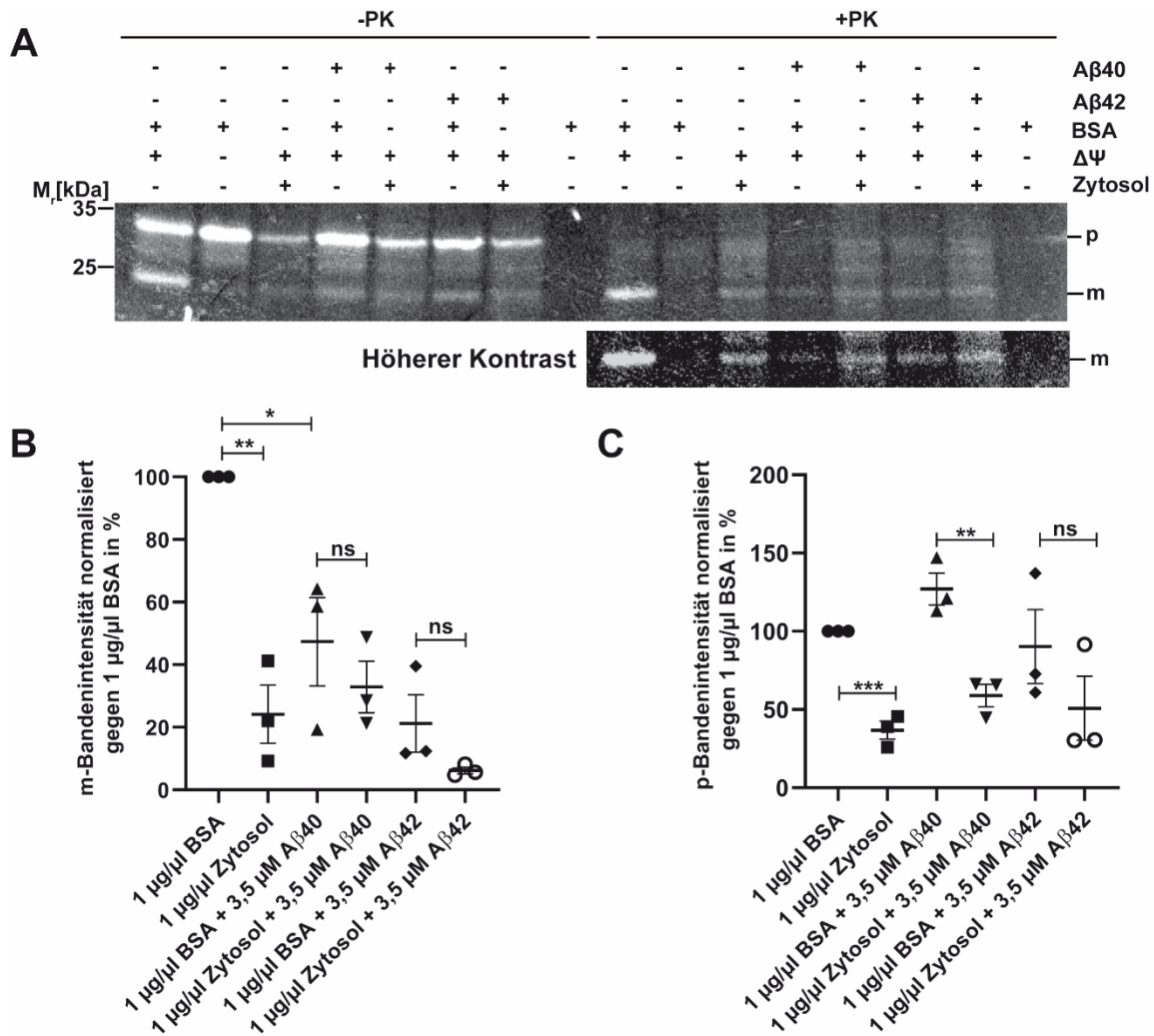


Abbildung 53: Einfluss von isoliertem Zytosol auf den Import Effekt von Aβ40 und Aβ42.

A) HEK293-Mitochondrien wurden mit 3,5 µM Aβ40/42 und 1 µg/µl Zytosol versetzt und anschließend bei 37 °C ein 40 Minuten Import mit SDCSH durchgeführt. Der SDCSH-Import wurde auch mit 1 µg/µl BSA durchgeführt, um in jeder Probe die gleiche Zugabe an Proteinmenge zu bewerkstelligen. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (reife) Form des SDCSHs B) Statistische Auswertung der m-Banden Intensitäten (+PK) normalisiert zu der m-Bande von 37 °C mit 1 µg/µl BSA-Zugabe (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test $p^*=0,0204$ $p^{**}=0,0012$ C) Statistische Auswertung der p-Banden Intensitäten (-PK) normalisiert zu der p-Bande von 37 °C mit 1 µg/µl BSA Zugabe (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test $p^{***}=0,0004$ $p^{**}=0,0055$

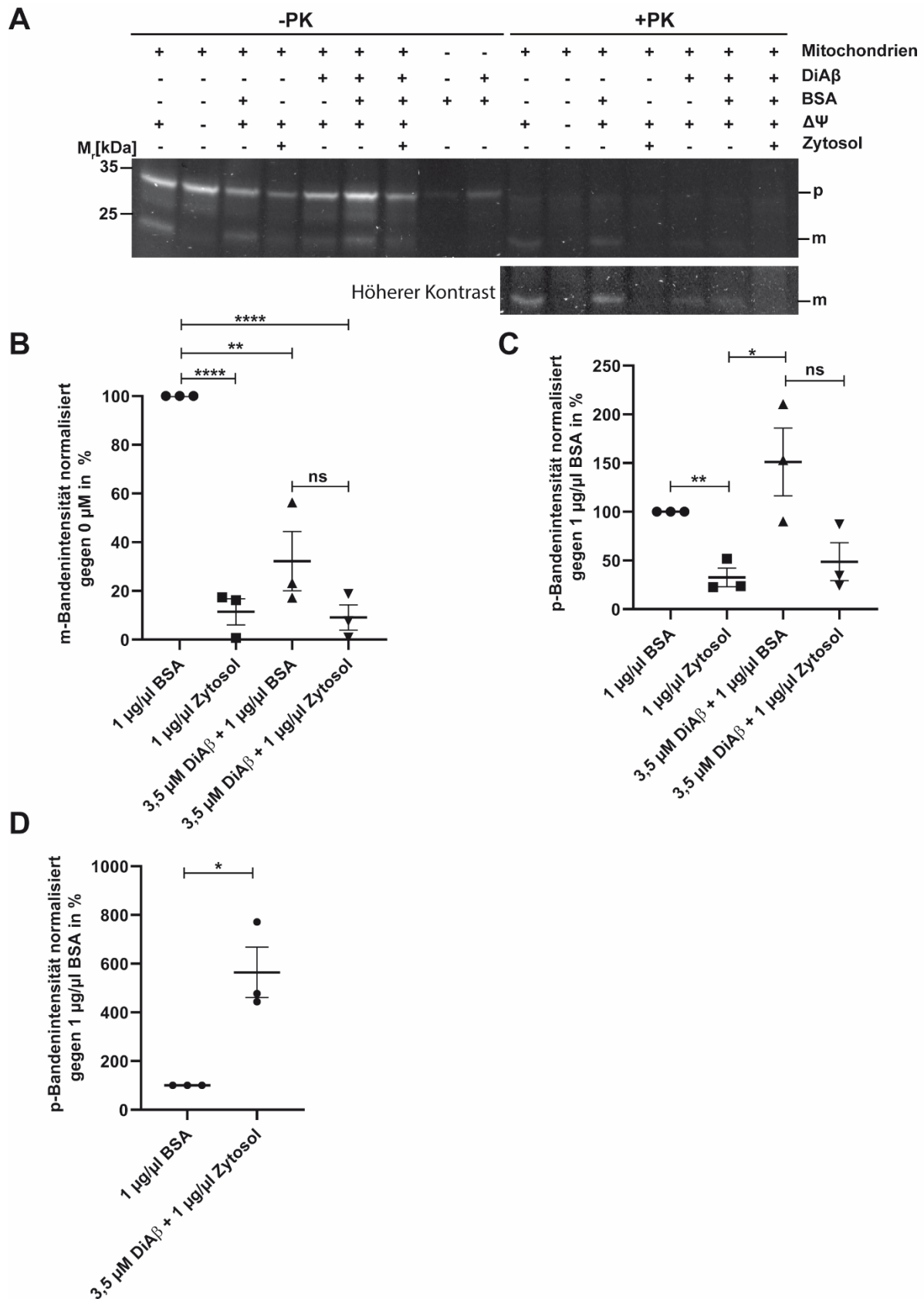


Abbildung 54: Einfluss von isoliertem Zytosol auf den Import Effekt von DiA β . A) HeLa-Mitochondrien wurden mit 3,5 μ M DiA β und 1 μ g/ μ l Zytosol versetzt und anschließend bei 30 °C ein 40 Minuten Import mit SDCSH durchgeführt. Der SDCSH-Import wurde auch mit 1 μ g/ μ l

BSA durchgeführt, um in jeder Probe die gleiche Zugabe an Proteinmenge zu bewerkstelligen. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (reife) Form des SDCSHs B) Statistische Auswertung der m-Banden Intensitäten (+PK) normalisiert zu der m-Bande von 30 °C mit 1 µg/µl BSA-Zugabe (n=3, Fehlerbalken SEM, ungepaarter t-Test $p^{**}= 0,0051$ $p^{****}= <0,0001$ C) Statistische Auswertung der p-Banden Intensitäten (-PK) normalisiert zu der p-Bande von 30 °C mit 1 µg/µl BSA Zugabe (n=3, Fehlerbalken SEM, ungepaarter t-Test $p^{*}=0,0303$ $p^{**}=0,0022$ D) Statistische Auswertung der p-Banden von den Mockproben Intensitäten (-PK) normalisiert zu der p-Bande von 30 °C mit 1 µg/µl BSA Zugabe im Vergleich zu SDCSH mit 3,5 µM DiAß und 1 µg/µl Zytosol (n=3, Fehlerbalken: SEM, ungepaarter t-Test $p^{*}= 0,0111$)

Die Zugabe von Zytosol im Kontext der Importhemmung von DiAß, Aß40 und Aß42 zeigte keine Wiederherstellung des Imports.

5.5.5 Einfluss von α -syn(61-95) auf den Import in isolierten HEK293-Mitochondrien

α -Synuclein befindet sich in den Lewy-Körperchen in der Pathologie der neurodegenerativen Krankheit Parkinson (Baba et al. 1998). Die Primärstruktur des Proteins besteht aus 3 verschiedenen Domänen. Die Aminosäuren 1-60 bilden den N-terminalen amphipathischen Teil des Proteins, welches eine α -Helix Struktur aufweist (Kumari et al. 2021). Aminosäuren 61-95 bilden die hydrophobe Domäne des Proteins, welche zur Proteinaggregation neigt (Wang et al. 2022, 2022)). Die Proteindomäne von 96-140 ist reich an Prolin und es liegt keine Sekundärstruktur vor (Guerrero-Ferreira et al. 2018). Die hydrophobe Domäne des α -Synuclein mit den Aminosäuren 61-95 wurde in Importexperimenten analysiert, um zu überprüfen, ob sie einen negativen Einfluss auf den Import von SDCSH ausüben könnte.

Um den Einfluss von α -syn(61-95) auf den mitochondrialen Import festzustellen, wurden isolierte HEK293-Mitochondrien in einem Importexperiment mit verschiedenen Mengen von α -syn(61-95) versetzt (**Abbildung 55**). Die importierte Menge an SDCSH (+PK) wurde nach 40 Minuten analysiert. Die Inhibition des Imports von SDCSH durch α -syn(61-95) zeigte einen graduellen Effekt, welcher mit steigender α -syn(61-95)-Konzentration (5 µM) zunahm (**Abbildung 55**). Durch α -syn(61-95) wurde aber keine vollständige Hemmung des Imports erzielt. Im Importergebnis ließ sich auch beobachten, dass die p-

Banden (-PK) unverändert blieben, was für eine unveränderte Bindung an den TOM-Komplex sprechen könnte (**Abbildung 56**). Ebenfalls wurde das Membranpotential mittels TMRE-Färbung gemessen und eine Reduzierung mit steigender α -syn(61-95)-Konzentration festgestellt. Diese Reduzierung war aber nicht signifikant (**Abbildung 56**).

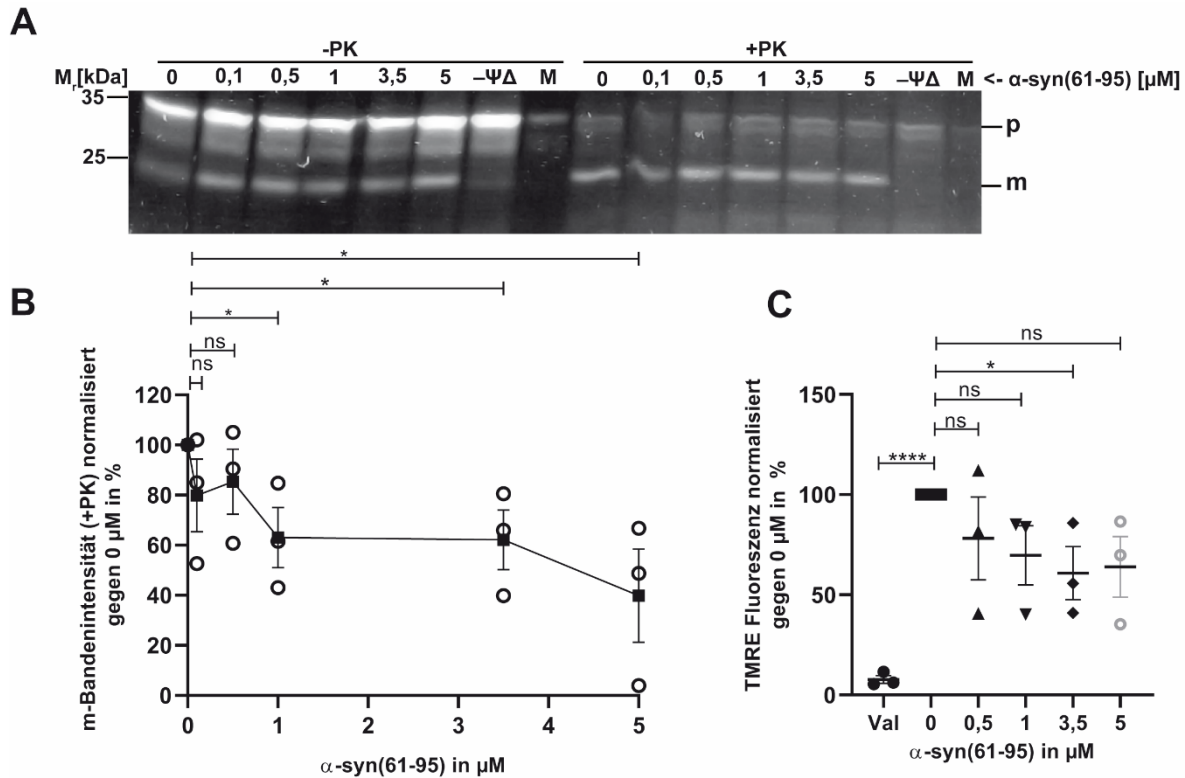


Abbildung 55: Effekt von α -syn(61-95) auf den mitochondrialen Import. A) HEK293-Mitochondrien wurden mit verschiedenen α -syn(61-95) Konzentrationen versetzt und anschließend bei 37 °C ein 40 Minuten Import mit SDCSH durchgeführt. PK: Proteinase K-Behandlung, p: Prä (unprozessierte) Form des SDCSHs, m: Mature (reife) Form des SDCSHs B) Statistische Auswertung der m-Banden-Intensitäten (+PK) normalisiert zu der m-Bande von 37 °C ohne Behandlung. (n=3, Fehlerbalken: SEM, t-Test $p^*=0,0376$ $p^*=0,0335$ $p^*=0,0322$) C) Messung der TMRE-Fluoreszenz nach α -syn(61-95) mithilfe eines Mikroplattenlesegerätes und anschließender Normalisierung von 0 μ M α -syn(61-95), um Unterschiede der TMRE-Fluoreszenz zu analysieren. (n=3, Fehlerbalken: SEM, t-Test $p^*=0,0412$ $p^{****}<0,0001$)

Die Membranpotentialanalyse wurde im Rahmen einer durchflusszytometrischen Analyse nach TMRE-Färbung und Behandlung von HEK293-Mitochondrien mit α -syn(61-95) wiederholt (**Abbildung 56**). Es konnte hier ebenfalls keine Reduzierung des Membranpotentials der Mitochondrien festgestellt werden.

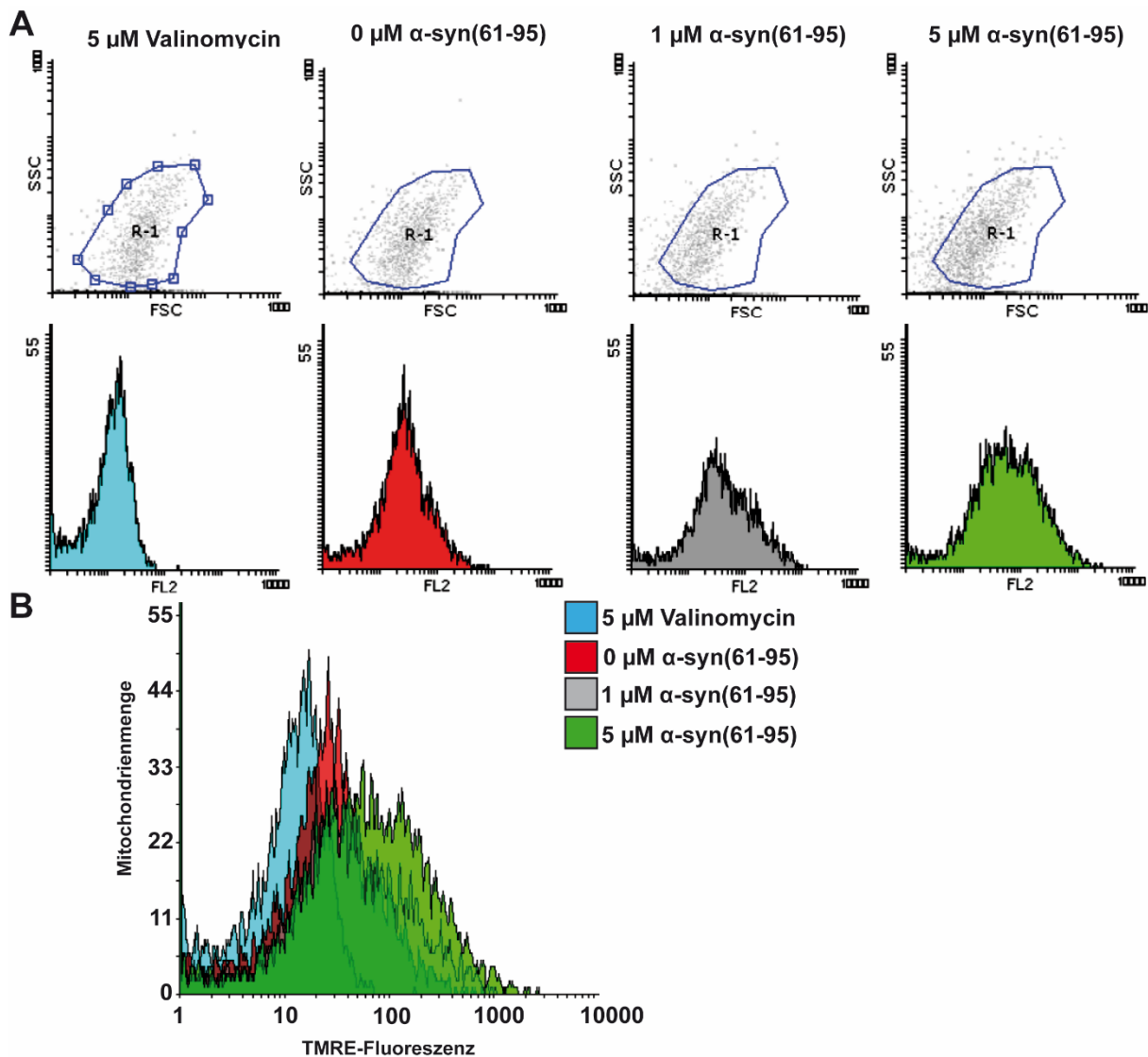


Abbildung 56: Effekt von α -syn(61-95) auf das Membranpotential. Effekt von 1 μ M und 5 μ M α -syn(61-95) auf das Membranpotential von isolierten HEK293-Mitochondrien, gemessen durch TMRE-Färbung mit anschließender Messung per Durchflusszytometrie. Der Entkoppler Valinomycin diente als Negativkontrolle für ein gestörtes Membranpotential. Gating der Mitochondrienpopulation wurde nach Größe und Granularität durchgeführt. Überlagerungshistogramm der TMRE-Messung der isolierten Mitochondrien nach α -syn(61-95) Behandlung.

Um festzustellen, ob α -syn(61-95) sich negativ auf die mitochondriale Stabilität auswirkt, wurden HEK293-Mitochondrien mit α -syn(61-95) inkubiert und anschließend ein PK-Verdau durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass sich die Stabilität der Mitochondrien nach Inkubation mit α -syn(61-95) nicht verändert (**Abbildung 57**).

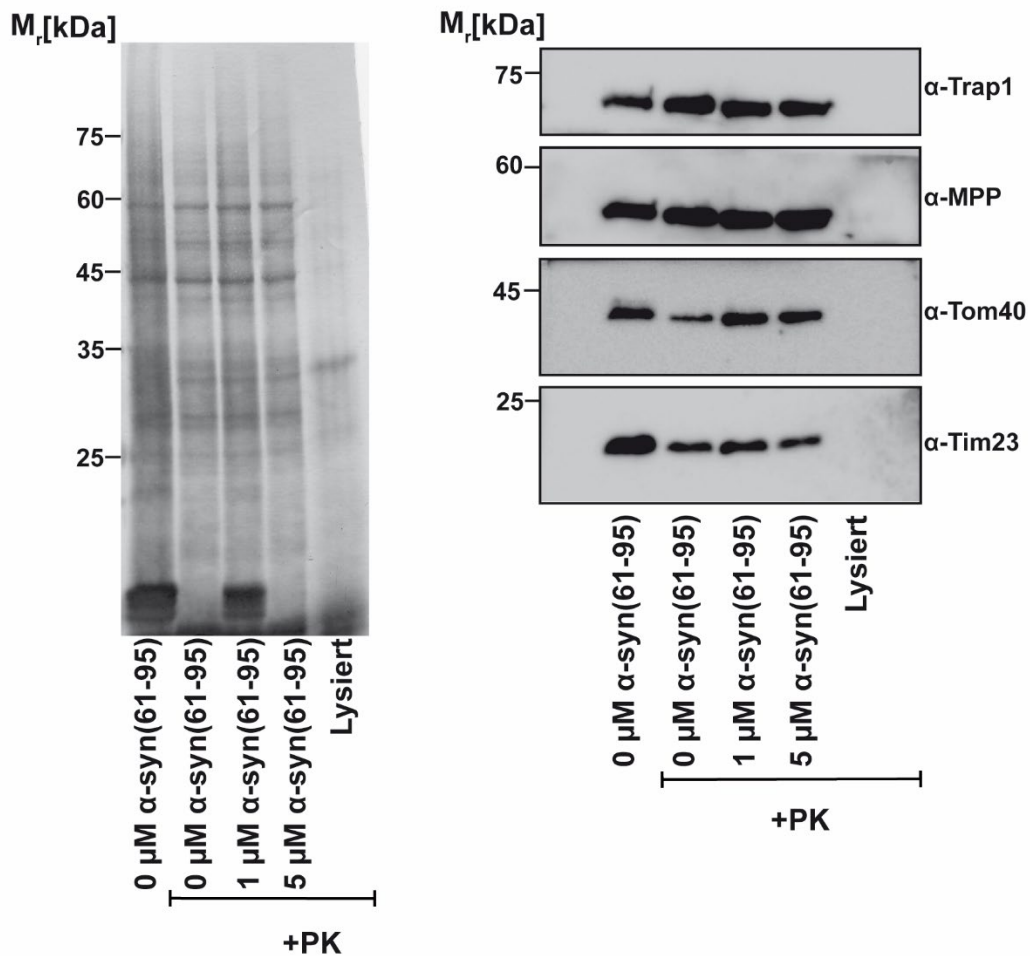


Abbildung 57: Einfluss von α -syn(61-95) auf die Stabilität von isolierten HEK293-Mitochondrien A) Mitochondrien wurden in Lösung B für 15 Minuten bei 37 °C mit α -syn(61-95) behandelt und anschließend ein PK-Verdau durchgeführt. Anschließend wurden die Proben über einen Western Blot analysiert. Antikörperdetektion gegen Tom40 diente als Nachweis von Außenmembranproteinen, MPP und Trap1 als Matrixproteine und Tim23 als Innenmembranprotein. Triton X-100-lysierte Mitochondrien wurden als Kontrolle des PK-Verdaus ebenfalls aufgetragen.

Die verschiedenen Konzentrationen von α -syn(61-95) in Importexperimenten zeigten keine Hemmung des Imports. Außerdem konnte α -syn(61-95) keine Depolarisierung der Mitochondrien und keine Veränderung der mitochondrialen Integrität hervorrufen.

6 Diskussion

6.1 Detektion des Imports durch Fluoreszenzmarkierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Etablierung des Präproteins SDCSH im Kontext von Fluoreszenzimports durchgeführt. Die Markierung des Präproteins mit Fluoreszenzfarbstoffen konnte in einem Zeitverlauf verfolgt werden. Diese zeitlich effektive Markierung von Cystein konnte schon in anderen Kontexten beobachtet werden (Niño-Ramírez et al. 2022).

Die Löslichkeit von SDCSH wurde vor und nach der Dialyse/Fluoreszenzmarkierung analysiert und es konnte keine Veränderung der Stabilität des Fluoreszenzproteins festgestellt werden. Die Löslichkeit des Präproteins stellt einen kritischen Faktor für den Import dar, da aggregierte Präproteine nicht mehr importiert werden können (Cenini et al. 2016; Schlagowski et al. 2021). Eine Aggregation der Präproteine führt dazu, dass die Präproteine nicht mehr in die Mitochondrien aufgenommen werden können und sich im Zytosol ansammeln (Krämer et al. 2023; Nowicka et al. 2021). Dort begünstigen nicht importierte Präproteine auch die Aggregation von anderen Proteinen (Endo et al. 1995; Cenini et al. 2016).

Des Weiteren konnte die Konzentration des Präproteins SDCSH für den Import in Hefe- und Säugetiermitochondrien ermittelt werden, welche die Analyse der Importgeschwindigkeit unter gesättigter Präproteinmenge erlaubt.

Die Experimente mit SDCSH ermöglichen das Arbeiten mit Importexperimenten ohne Radioaktivität, was für mehr Sicherheit sorgt. Die Sensitivität des Fluoreszenzsignals, mithilfe dessen die Importgeschwindigkeit bestimmt werden kann, wurde mit verschiedenen Mengen an SDCSHs ermittelt. Detektion des Präproteins SDCSH zeigte eine Nachweisgrenze von 0,3 pmol (9,5 ng). Diese Nachweisgrenze reichte aus um die Importgeschwindigkeit von Hefemitochondrien, sowie Säugetiermitochondrien zu bestimmen. 2008 wurde in einer Veröffentlichung eine Nachweisgrenze von 0,1 pmol bei der Detektion des Präproteins $b_2(167)_\Delta$ -DHFR-SNAP erzielt (Becker et al. 2008). Bei den Experimenten mit diesem Präprotein wurden weitere Reinigungsschritte vor der Fluoreszenzmarkierung durchgeführt, wodurch es zu einer Verbesserung der Sensitivität kommen könnte. Durch die Reinigung über Säulenchromatografie wurden bakterielle Proteine entfernt und mögliches Hintergrundrauschen

beseitigt (Becker et al. 2008). Daher wäre es möglich, mit His-Tag-Aufreinigung oder Säulenchromatografie die Sensitivität des SDCSHs zu verbessern und das Hintergrundrauschen zu minimieren.

Das verwendete Präprotein in Becker et al. (2008) unterscheidet sich außerdem in der Fluoreszenzmarkierungsmethodik im Vergleich zu SDCSH. Dort wurde das Präprotein über die SNAP-Domäne mit Fluorophor markiert, was eine Faltung dieser Domäne voraussetzt (Becker et al. 2008). Im Gegensatz dazu wurde SDCSH über die Michael-Addition-Reaktion der Thiol-Gruppe des Cysteins mit Maleimid fluoreszenzmarkiert (Anderton 1970). Diese Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff benötigt keine Faltung des Proteins.

Die Fluoreszenzmarkierung von SDCSH ermöglicht die direkte Quantifizierung der maximalen Importgeschwindigkeit in Mitochondrien. Das Präprotein SDCSH konnte neben Experimenten mit Hefemitochondrien auch in isolierten Säugetiermitochondrien etabliert werden, was einen Vorteil gegenüber früheren Datenerhebungen darstellt.

Jain et al. (2023) bestimmten mithilfe von Maleimid-Markierung von Präproteinen wie Jac1 ebenfalls die Importgeschwindigkeit in Hefemitochondrien. Hier wurde ein Plattenlesegerät zur Quantifizierung von Importexperimenten genutzt, welches eine vereinfachte Handhabung und schnellere Analyse ermöglicht, da keine Gelelektrophorese notwendig ist. Um diese Möglichkeit auf SDCSH anzuwenden, bedarf es weiterer Optimierung und des 100 %igen Abbaus des nicht importierten SDCSH durch die Proteinase K, da Reste der Prä-Form die Messung stören würden (Jain et al. 2023).

In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich das Importergebnis bei unterschiedlichen gekoppelten Farbstoffen nicht verändert (Jain et al. 2023). In Zukunft wäre es demzufolge möglich, weitere Farbstoffe zu verwenden, um diese Daten zu überprüfen.

Die Anreicherung nur eines Präproteins findet innerhalb der Zelle nicht statt, da verschiedene Präproteine *in vivo* gleichzeitig in die Mitochondrien importiert werden (Morgenstern et al. 2021). Insgesamt stellt die *in vitro*-Analyse der Importkinetik von Mitochondrien mithilfe eines Fluoreszenzpräproteins also eine Situation dar, welche in der Zelle so nicht vorzufinden ist.

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wird in vielen rekombinanten Proteinen als Lokalisationstag verwendet und könnte eine Möglichkeit darstellen, auch den Import *in vitro* zu analysieren (Chudakov und Lukyanov 2003; Hemmerle et al. 2022). Allerdings konnte bei *in vitro* Import Experimenten gezeigt werden, dass MTS-Dendra2 radioaktiv nicht in Mitochondrien importieren kann, da das gefaltete GFP den Import verhindert (Bogorodskiy et al. 2021).

6.2 Bestimmung der mitochondrialen Importgeschwindigkeit

In dieser Doktorarbeit konnte die maximale Importgeschwindigkeit von YPH499 Mitochondrien mit 12 pmol/mg/min bestimmt werden. Im Vergleich mit früheren Messungen wurde die Importgeschwindigkeit für ein mitochondriales Matrix Präprotein der Größe 35 kDa in *Saccharomyces cerevisiae in vitro* mit 25 pmol/mg/min bestimmt (Lim et al. 2001). Jain et al. (2023) konnten mithilfe eines Mikroplattenlesegeräts eine Importgeschwindigkeit von 14 pmol/mg/min für Hefemitochondrien bestimmen.

Jain et al. (2023) konnten außerdem einen Wert von 72 pmol/mg/min für die Importgeschwindigkeit in Hefemitochondrien ermitteln. Dieser Unterschied in der Importgeschwindigkeit zu dieser Doktorarbeit lässt sich durch die Wahl der Präproteine erklären. Unterschiedliche Präproteine haben auch unterschiedliche Importgeschwindigkeiten, was auch Schäfer et al. (2022) zeigen konnten.

Ein weiteres Argument für die variierenden Werte der Importgeschwindigkeit könnte die Instabilität des Präproteins sein. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SDCSH nach Rückfaltung ein starkes Aggregationsverhalten zeigt. Die Aggregation ist nach der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff erkennbar und es könnte sein, dass das Präprotein vor dem Import aggregiert und somit nicht die Gesamtmenge für den Import zur Verfügung stehen könnte. Die Aggregation von Präproteinen führt dazu, dass diese nicht mehr an TOM-Kanäle binden können und der Import in die Mitochondrien nicht mehr stattfinden kann (Nowicka et al. 2021).

Ein anderer Aspekt, welcher die Importgeschwindigkeit beeinflussen könnte, sind sogenannte zusätzliche interne MTS-Signale von mitochondrialen Präproteinen. Diese Aminosäuresequenzen besitzen ähnliche chemische Eigenschaften wie Präsequenzen und führen zu einer effizienteren Bindung des

Präproteins an den Tom70-Rezeptor (Backes et al. 2018). Diese effizientere Bindung würde auch zu einer veränderten Importgeschwindigkeit führen.

Malhotra et al. (2013) konnten durch Titration des Entkopplers Carbonylcyanid-3-chlorophenylhydrazon (CCCP) im Importansatz eine deutliche Reduzierung des Imports detektieren. Das bedeutet, dass sich bei reduziertem Membranpotential auch der Import in die Mitochondrien verlangsamt.

Im Zuge der Messung der Importgeschwindigkeit unter unterschiedlichen Bedingungen stellt sich die Frage, welches Protein in der mitochondrialen Importmaschinerie das „Schrittmacher“-Protein für die Geschwindigkeit des Imports darstellt. In der Literatur und in den bisherigen Veröffentlichungen stellt HspA9 (Mensch: Mortalin oder mtHsp70; Hefe: Ssc1) ein solches dar. Der Importmotor entfaltet Präproteine unter ATP-Verbrauch, durch Bindung an das N-terminale Segment der Präproteine. Bei der Mutante Ssc1-2, welche durch die Mutation einer einzigen Aminosäure in der Peptid-Bindungsdomäne von Ssc1 entsteht, zeigte sich eine starke Reduktion der Bindung des Präproteins am Importmotor und der Import war nachhaltig reduziert (Lim et al. 2001). Diese Ergebnisse konnten durch die reduzierte Bindung von Ssc1 zu Tim44 in der Mutante erklärt werden. Dies führte dazu, dass es in der Mutante zu einem Wechsel kommt, von aktivem Entfalten des Präproteins zu einem passiven Vorgang. Dies zeigt, dass der Importmotor ein „Schrittmacher-Enzym“ des mitochondrialen Imports ist, welches das Entfalten des Präproteins und das Weiterleiten in die Matrix ermöglicht.

So lässt sich aus diesen Anhaltspunkten schließen, dass die Importgeschwindigkeit von dem Aggregationsverhalten der Präproteine, von internen MTS-Signalen in der Aminosäuresequenz des Präproteins, dem Membranpotential und ebenfalls der effizienten Bindung zwischen dem Importmotor HspA9 und Tim44 abhängig ist.

Es konnte auch die maximale Importgeschwindigkeit von Säugetiermitochondrien bestimmt werden. Der höchste Wert für die Importgeschwindigkeit stellte sich hier bei 2 pmol/mg/min ein, was eine 6-mal langsamere Geschwindigkeit als bei YPH499-Mitochondrien (12 pmol/mg/min) ist. Isolierte Mitochondrien aus HeLa-Zellen zeigten eine Importgeschwindigkeit von 0,55 pmol/mg/min. Mitochondrien aus HEK293-Zellen kamen auf eine

Importkinetik von 1,8 pmol/mg/min. SH-SY5Y-Zellen besitzen die langsamste Wachstumsrate, und eine ermittelte Importgeschwindigkeit der isolierten Mitochondrien von 0,309 pmol/mg/min, welche im Vergleich zu den anderen Zelllinien der geringste Wert ist. Außerdem würde die längste Verdopplungszeit das niedrige Membranpotential der SH-SY5Y-Zellen erklären.

Um einen Vergleich mit der Importgeschwindigkeit *in vivo* anzustellen, wurde die Importgeschwindigkeit eines mitochondrialen Präproteins mit der Größe 40 kDa berechnet. Dafür wurden Kennzahlen für die Ribosomenanzahl, die mitochondriale Masse, die Translationsrate und den prozentualen Anteil der Präproteine mit Präsequenz in der Zelle recherchiert (siehe dazu Tabelle 15), welche diese Rechnung ermöglichen. Zudem wurden die Verdopplungsraten der verschiedenen Zelllinien für die Rechnung benötigt. HeLa-Zellen haben eine Verdopplungsrate von 17,5 - 32,3 Stunden (Tang 2019). Im Vergleich dazu besitzt *S. cerevisiae*, eine Verdopplungsrate von 2,5 Stunden (Papagiannakis et al. 2017). Die Verdopplungszeit beträgt bei den HEK293-Zellen 23 +/- 2,7 Stunden (Tsao et al. 2001) und bei den SH-SY5Y-Zellen 67,3 Stunden +/- 5,8 (Feles et al. 2022).

Nun folgt die Beispielrechnung für die *in vivo* Importgeschwindigkeit in Säugetiermitochondrien: Zunächst wurde von einer Proteingröße von 40 kDa ausgegangen. 40 kDa entsprechen 40.000 Dalton, was wiederum 363 Aminosäuren entspricht. Die Translationsrate von 11 Aminosäuren pro Sekunde konnte aufzeigen, dass alle 33 Sekunden ein 40 kDa Protein von einem Ribosom translatiert wird. Die Verdopplungszeit von 25 Stunden wurde halbiert, da die meiste Translation von Proteinen in der G1- und S-Phase des Zellzyklus stattfindet (Bertoli et al. 2013). Die Verdopplungszeit wurde nun in Sekunden mit der Translationsrate von 33 Sekunden multipliziert und lieferte den Wert von circa 1,4 Millionen Proteinen pro Verdopplungszeit durch ein Ribosom. Da sich in einer HeLa-Zelle circa 9500000 Ribosomen befinden, wurde der Wert von 1,4 Millionen mit der Ribosomenanzahl pro Zelle multipliziert und zeigte die Anzahl an Proteine der Translation aller Ribosomen an. Diese Anzahl an Proteinen wurde mit den prozentualen Anteilen von 11 % der mitochondrialen Masse einer Zelle multipliziert und zeigte einen Wert von 1,2 Billionen Proteinen an. Da nur die Hälfte der Proteine mitochondrialen Präsequenzen aufweisen, wurde diese Anzahl nochmal halbiert und mit der Avogadro-Konstante in pmol umgerechnet.

Dadurch konnte eine Stoffmenge an Protein von 0,0012 pmol berechnet werden. Diese Stoffmenge wurde durch die Verdopplungszeit in Minuten dividiert. Abschließend wurde dieser Wert noch mit 60 pg Mitochondrien (pro Zelle) dividiert, um die Importgeschwindigkeit in die Mitochondrien zu berechnen. 60 pg wurden noch in mg umgerechnet und ergaben die Importgeschwindigkeit *in vivo* von Säugetiermitochondrien.

Tabelle 15: Kennzahlen *in vivo* Importgeschwindigkeit Berechnung

	<i>S. cerevisiae</i>	HeLa-Zellen	HEK293-Zellen	SH-SY5Y-Zellen
Ribosomenanzahl	200000 (Warner 1999)	9500000 (Wolf und Schlessinger 1977)		
Translationsrate	8 AA/sec (Arava et al. 2003)	11 AA/sec (Siwiak und Zielenkiewicz 2013)		
Mitochondriale Masse in %	14 % (Grimes et al. 1974)	11 % (Posakony et al. 1977)		
Präproteine mit Präsequenz in %	50 % (Lim et al. 2001)			

Bei HeLa-Zellen und HEK293-Zellen erhält man so eine Importgeschwindigkeit von 0,05 pmol/mg/min (**Abbildung 58**). Die Rechnung ergab bei HEK293-Zellen die gleiche *in vivo*-Importgeschwindigkeit, da die Verdopplungszeit zwischen HeLa- und HEK293-Zellen sich nicht sehr unterscheidet. Bei SH-SY5Y-Zellen wurde trotz längerer Verdopplungszeit im Vergleich zu HeLa/HEK293-Zellen ebenfalls eine *in vivo* Importgeschwindigkeit von 0,05 pmol/mg/min berechnet (**Abbildung 58**). Für die Hefe konnte eine *in vivo* Importgeschwindigkeit bei 0,151 pmol/mg/min errechnet werden (**Abbildung 58**). Nach dieser Rechnung würden Hefemitochondrien 3-mal schneller importieren als Säugetiermitochondrien. Dieser Unterschied konnte auch *in vitro* festgestellt werden. Im Vergleich zu der Importgeschwindigkeit *in vitro*, welche bei 12 pmol/mg/min lag, war diese *in vivo* in der Hefezelle viel langsamer (**Abbildung 58**).

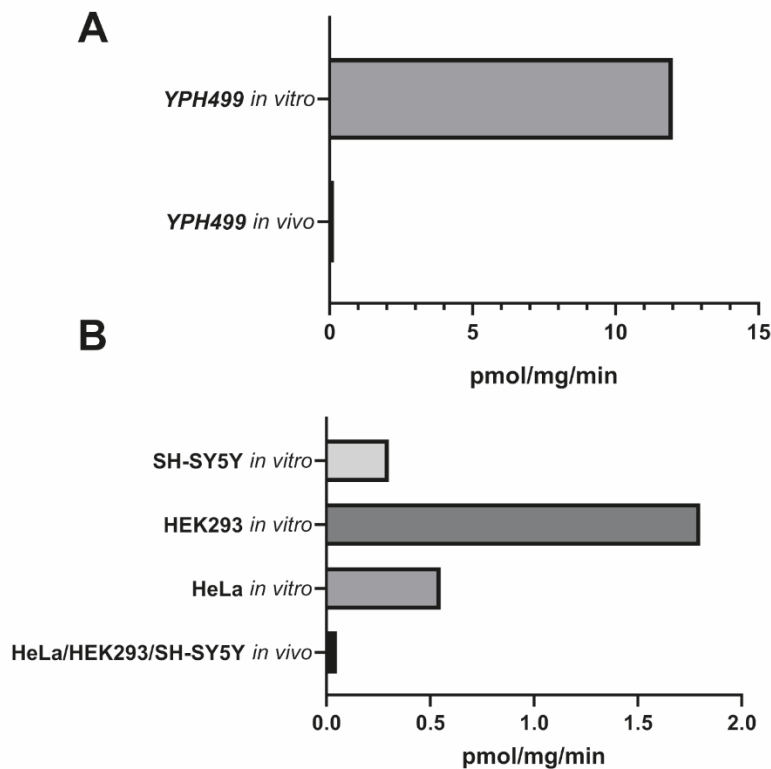


Abbildung 58: Vergleich Importgeschwindigkeit *in vitro* und *in vivo*. A) YPH499 Importgeschwindigkeit: Vergleich zwischen *in vivo* und *in vitro* B) HeLa/HEK293/SH-SY5Y Importgeschwindigkeit: Vergleich zwischen errechneter Importgeschwindigkeit *in vivo* und experimentell bestimmter Importgeschwindigkeit *in vitro*. X-Achse: pmol/mg/min, y-Achse: Legende

Die errechneten Importgeschwindigkeiten der Säugetierzelllinien *in vivo* liegen alle unter den ermittelten *in-vitro*-Importgeschwindigkeitdaten. Dies lässt sich mit den Daten von 2021 in Einklang bringen, wo über Mikroinjektion das Präprotein COX8A-SNAP in HEK293 injiziert worden ist (Bogorodskiy et al. 2021). In diesem zeigte der beobachtbare Import mithilfe des Mikroskops erst nach 20-50 Minuten eine signifikante Kolokalisation zwischen Präprotein und Mitochondrien. Dieser längere Zeitraum des Imports konnte durch Puromycin wieder verkürzt werden, da die sich an den Mitochondrien befindlichen Ribosomen, den Import *in vivo* verlangsamt hatten (Bogorodskiy et al. 2021). Diese Beobachtung von Bogorodskiy et al. (2021) bestärkt die Theorie des kotranslationalen Imports, wobei die Translation und der mitochondriale Import gleichzeitig an den Mitochondrien ablaufen. Diese Beobachtung zeigte außerdem, dass die Importgeschwindigkeit *in vivo* im Vergleich zu *in vitro* unterschiedlich ist, was die Daten dieser Doktorarbeit ebenfalls bestätigen können. Es gibt nach jetzigem

Forschungsstand bisher keine Referenzwerte für die errechneten Werte der Importgeschwindigkeit *in vivo*, weshalb ein Vergleich mit anderen Daten nicht möglich ist.

SH-SY5Y-Zellen zeigten *in vitro* eine Importgeschwindigkeit von 0,309 pmol/mg/min der isolierten Mitochondrien (Feles et al. 2022). Die errechnete *in vivo* Importgeschwindigkeit ergab einen Wert von 0,06 pmol/mg/min. SH-SY5Y ist eine neuronale Zelllinie, welche durch Zusätze in der Zellkultur zu Neuronen ausdifferenziert werden kann (Shipley et al. 2016). Das menschliche Gehirn und die sich darin befindenden Neuronen benötigen eine hohe metabolische Aktivität, was darauf schließen lässt, dass dort eine Menge an Energie in Form von ATP benötigt wird (Rolfe und Brown 1997). Es konnte gezeigt werden, dass ausdifferenzierte SH-SY5Y-Zellen ein höheres Membranpotential besitzen, sowie eine höhere Proteinmenge von den Atmungskettenkomplexen im Vergleich zu undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen aufwiesen (Schneider et al. 2011). Ein Grund für die ermittelte geringe Importgeschwindigkeit der Mitochondrien in SH-SY5Y-Zellen könnte die fehlende Ausdifferenzierung sein, welche die Importrate ansteigen lassen würde.

Die Mitochondrien aus HEK293 zeigten *in vitro* eine Importgeschwindigkeit von 1,8 pmol/mg/min und die errechnete *in vivo* Importgeschwindigkeit lag bei 0,06 pmol/mg/min. HEK293 ist eine embryonale Nierenzelllinie (Tsao et al. 2001). Nieren besitzen eine große Anzahl an Mitochondrien, welche die Energie für wichtige Prozesse wie beispielsweise die Elektrolytbalance und die Filterung von Schadstoffen aus dem Blut liefern (Bhargava und Schnellmann 2017). Die Importgeschwindigkeit von Mitochondrien aus Nieren sollte demnach hoch sein. Die *in-vitro*-Daten ergaben auch den höchsten Wert für die Importgeschwindigkeit im Vergleich mit den anderen Zelllinien. Forbes (2016) konnten auch eine hohe mitochondriale Aktivität in Nierenzellen feststellen.

Der ermittelte Wert für die Importgeschwindigkeit von den isolierten HeLa-Mitochondrien war im Vergleich zu der Importgeschwindigkeit von HEK293 etwas kleiner, aber größer als bei SH-SY5Y-Mitochondrien. HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen eines Gebärmutterhalskarzinoms (Tang 2019). Schäfer et al. (2022) konnten die mitochondriale Proteinaufnahme in HeLa-Zellen mithilfe eines SILAC-Experiments über Massenspektrometrie analysieren. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die Menge der importierten

Proteine über die Zeit *in vivo* zunimmt (Schäfer et al. 2022). Die ermittelten Steigungen der mitochondrialen Proteinaufnahme in dieser Veröffentlichung zeigen auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Präproteinen, wodurch die Rolle der Länge der Präsequenz verdeutlicht wird (Schäfer et al. 2022; Lim et al. 2001). Anhand der Daten von Schäfer et al. (2022) und dem jetzigen allgemeinen Forschungsstand gibt es keine vergleichbaren Daten, um einen Vergleich mit der ermittelten maximalen Importgeschwindigkeit für HeLa-Mitochondrien vorzunehmen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass HeLa-Mitochondrien bei 37 °C eine Importgeschwindigkeit aufweisen, welche im Vergleich zu 30 °C größer ist. Dies könnte damit zusammenhängen, dass HeLa-Zellen standardmäßig bei 37 °C kultiviert werden. Underhill und Smales (2007) konnten zeigen, dass bei einer Kultivierung von HeLa-Zellen bei 32 °C eine Reduzierung des Wachstums und des Proteingehaltes der Zellen eintritt. Diese Beobachtung und die Daten dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass der mitochondriale Import in Säugetiermitochondrien ein Temperaturoptimum bei 37 °C besitzt.

In vitro ermittelte Importgeschwindigkeiten stellen, wie schon in vorherigen Abschnitten erwähnt, ein künstliches Szenario dar. *In vivo* kann es nicht zu einem Import von nur einem Präprotein unter Sättigungsbedingungen kommen (Peleh et al. 2015).

Bei der Einordnung der ermittelten Importgeschwindigkeiten *in vivo* stellt der Unterschied zwischen den gesunden Zellen im Körper und der untersuchten Krebszelllinien noch eine Schwierigkeit dar. Krebszellen haben allgemein eine hohe metabolische Aktivität, wobei sie dabei nicht auf die Mitochondrien angewiesen sind (Finley 2023). Ein erhöhter Bedarf an Nährstoffen und schnelles Wachstum der Krebszellen führen zu dem sogenannten „Warburg-Effekt“ (Warburg et al. 1927). Dieser zeigt, dass Krebszellen die aufgenommene Glucose im Zytosol hauptsächlich durch aerobe Glykolyse verarbeiten und das Lactat als Abfallprodukt ausgeschieden wird (Warburg et al. 1927). In diesem Fall werden die Mitochondrien nicht aktiv benötigt, was zu einer geringen mitochondrialen Aktivität und schlussendlich zu geringeren Importgeschwindigkeiten führt.

Die ermittelten Werte für die Importgeschwindigkeit von isolierten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* waren deutlich größer als die Werte der Säugetiermitochondrien. Dies kann an der kürzeren Verdopplungszeit der Hefe von 2,5 Stunden liegen (Papagiannakis et al. 2017). Ein anderer Aspekt könnte in der Kultivierung von Hefezellen liegen. In dieser Arbeit wurden die Hefezellen mit 2 % Ethanol und 10 % Glycerin kultiviert, bevor die Mitochondrien isoliert wurden. Diese Wachstumsbedingung benötigt einen hohen Bedarf an Mitochondrien, welche zur mitochondrialen Atmung in der Hefezelle gebraucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass es beim Wachstum der Hefe bei diesen Bedingungen zu einem Wechsel von Gärung zu Atmung kommt, wodurch Proteine der mitochondrialen Biogenese hochreguliert exprimiert werden im Vergleich zu der Kultivierung unter Medium mit Glucose (Di Bartolomeo et al. 2020). Daraus lässt sich schließen, dass die Importgeschwindigkeit von 12 pmol/mg/min mit der kürzeren Verdopplungszeit und der Art der Kultivierung zu erklären sein könnte (Di Bartolomeo et al. 2020; Olivares-Marin et al. 2018).

6.3 Einfluss von ROS und höheren Temperaturen führen zu verlangsamttem Import

Höhere Temperaturen führen zur Aktivierung einer Hitzestressantwort in Hefe und Säugetierzellen (Sorger et al. 1987; Ruan et al. 2017). Bei Hefezellen wirken sich höhere Temperaturen zudem negativ auf das Wachstum aus, was durch Verlangsamung der mitochondrialen Translation und Aggregation von Atmungskettenkomplexen erklärbar ist (Munna et al. 2015; Bender et al. 2011; Sakaki et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach Vorbehandlung mit höheren Temperaturen zu einer Verlangsamung der Importkinetik von Mitochondrien aus Hefe und HeLa-Zellen kommt. Als Ursache dafür zeigte sich eine Störung des Membranpotentials, welches für einen erfolgreichen Import erforderlich ist. Bei höherer Temperatur neigen die Komplexe der Atmungskette zur Aggregation und die mitochondriale Translation kommt zum Erliegen, da wie der mitochondriale Elongationsfaktor Tufm zur Aggregation neigt (Wilkening et al. 2018; Moreno-Loshuertos et al. 2023). Diese Auswirkungen könnten zum Erliegen des Membranpotentials und somit auch zur Verminderung der Importrate nach Hitzestress der Mitochondrien führen. Die in

dieser Arbeit gemessene Störung des Membranpotentials nach Hitzestress stimmt mit den Daten in anderen Veröffentlichungen überein (Wilkening et al. 2018; Dressler et al. 2006). Interessanterweise zeigten die Ergebnisse dieser Doktorarbeit keine Veränderung der mitochondrialen Stabilität nach Hitzestress bei Hefemitochondrien, sodass der negative Effekt auf die Importgeschwindigkeit nur auf das gestörte Membranpotential zurückgeführt werden kann. Min Zhang et al. (2015) konnten ebenfalls nach Hitzestress eine Depolarisation der Mitochondrien in Hefezellen feststellen.

Die Integrität der HeLa-Mitochondrien zeigte eine Verschlechterung durch höhere Temperaturen. Dies führt zu der Annahme, dass Säugetiermitochondrien durch höhere Temperaturen zumindest *in vitro* stark geschädigt werden. Die Daten dieser Arbeit und anderer Publikationen zeigten, dass *in vitro* der Import in Mitochondrien bereits ab 42 °C reduziert ist, was den Daten von Chrétien et al. (2018) widerspricht, wo mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes MitoThermo Yellow die Temperatur innerhalb der Zellen gemessen wurde und aktive Mitochondrien mit einer Temperatur von 50 °C beschrieben worden sind (Wilkening et al. 2018; Dressler et al. 2006). Es zeigt sich aus diesen unterschiedlichen Ergebnissen, dass weitere Datenerhebungen in diesem Kontext nötig sind.

Ruland et al. (2025) zeigten, dass aggregierende Proteine in der Matrix an Ssc1 gebunden werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass bei Proteinaggregation wie bei Hitzestress in der Matrix die Chaperonfunktion vom Ssc1 hauptsächlich aktiv ist und dadurch der mitochondriale Import negativ beeinflusst werden könnte.

6.3.1 ROS-Stress beeinflusst den mitochondrialen Import

ROS-Stress wurde in vielen Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson als Marker für geschädigte Mitochondrien nachgewiesen (Mecocci et al. 1994; Keeney et al. 2024). Deshalb wurde der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies in dieser Doktorarbeit in Bezug auf den mitochondrialen Import analysiert. Die Ergebnisse zeigten bei isolierten HeLa-Mitochondrien einen Depolarisationseffekt des Membranpotentials, welcher zu einem verlangsamten mitochondrialen Import führt. Dies bestätigt frühere Beobachtungen, dass H₂O₂ zu einer Reduktion des Membranpotentials führt (Garg und Chang 2004).

Chernyak et al. (2006) konnten eine Reduktion des Membranpotentials in HeLa-Zellen nach H_2O_2 detektieren. H_2O_2 zeigte in eigenen Experimenten keinen Einfluss auf die mitochondriale Integrität. In einer anderen Veröffentlichung zeigten Fan et al. (2010) mikroskopisch, dass die Morphologie von Mitochondrien in Zellen nach H_2O_2 verändert vorlag, was für eine geschädigte mitochondriale Integrität sprechen könnte. Die Experimente wurden *in vivo* durchgeführt, was einen Vergleich mit den Daten dieser Arbeit schwer zulässt.

Erhöhte Level an reaktiven Sauerstoffspezies wurden in der Superoxidase-Dismutase 2-Deletionsmutante festgestellt. Um den Effekt dieser hohen ROS-Level auf die Importgeschwindigkeit zu analysieren, wurden Importexperimente durchgeführt. Superoxidase Dismutase 2 ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und fungiert als Teil der Abwehr gegen ROS-Stress (Pereira et al. 2003). Es konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und der entsprechenden *sod2Δ*-Mitochondrien in Bezug auf die Importgeschwindigkeit beobachtet werden. In früheren Beobachtungen konnte festgestellt werden, dass es zu mehr DNA-Schäden und erhöhten ROS-Levels kommt, je älter die *sod2Δ*-Hefezellen werden (Muid et al. 2014). Da in dieser Arbeit mit einer Mischung von alten und jungen *sod2Δ* Hefezellen gearbeitet wurde, wiesen diese Zellen weniger geschädigte Mitochondrien auf und es konnte zwischen *sod2Δ* und BY4741 kein großer Unterschied in Bezug auf die Importgeschwindigkeit nachgewiesen werden. Die Vermehrung von Hefezellen findet über asexuelle Reproduktion (Knospung) statt, wobei es zu einer Ausstülpung an der Mutterzelle kommt. Aus dieser Ausstülpung entwickelt sich eine Tochterzelle, die nicht das Alter der Mutterzelle übernimmt und somit als jung bezeichnet werden kann (Denoth Lippuner et al. 2014). Die Tochterzelle bekommt bei dieser Vermehrung neugebildete Mitochondrien von der Mutterzelle übertragen (Denoth Lippuner et al. 2014). Ältere Hefezellen sind außerdem größer im Vergleich zu jüngeren Zellen, weshalb die Methodik der Größenfiltration vor einer Mitochondrien-Isolation durchgeführt werden müsste, um den Effekt von erhöhten ROS-Levels auf jüngere, sowie ältere Hefezellen zu analysieren (Laun et al. 2001; Nestelbacher et al. 1999).

6.4 Amyloide Aggregate führen zu Importhemmung und schädigen Mitochondrien nicht

Amyloide Aggregate von A β -Peptiden zählen zur Pathologie der neurodegenerativen Krankheit Alzheimer (Thal et al. 2015). Diese Aggregate verursachen Schäden an Mitochondrien in neuronalen Zellen und bei der Biogenese von mitochondrialen Präproteinen, weswegen in dieser Arbeit Importexperimente in isolierten Mitochondrien in der Anwesenheit von verschiedenen Varianten von A β -Peptiden durchgeführt wurden.

Die verwendeten A β -Peptide zeigten ab einer Konzentration von 3,5 μ M Importinhibition. Die Titration mit A β 42-Peptiden zeigte einen stärkeren Verlauf der Importhemmung bei einer finalen Konzentration von 3,5 μ M im Vergleich zu A β 40.

Cenini et al. (2016) konnten die Importhemmung von A β -Peptiden mithilfe von radioaktiven Präproteinen zeigen. A β 42 zeigte in dieser Veröffentlichung die stärkere Inhibition im Vergleich zu A β 40. In Filterretardierungsexperimenten, sowie Blue-Native Gelelektrophorese konnte die Koaggregation von A β 42/40 mit radioaktiv gelabelten Su9(70)-DHFR gezeigt werden (Cenini et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass A β 42-Peptide mehr β -Faltblattstrukturen bilden, was zu einer höheren Tendenz der Aggregation im Vergleich zu A β 40 führt (Lin et al. 2019).

In dieser Doktorarbeit konnten die Filterretardierungsexperimente keine Koaggregation von SDCSH mit den A β -Peptiden aufzeigen. Ein wesentlicher Unterschied zu Cenini et al. (2016) ist das Lösen der A β -Peptide, was ein Grund für dieses Ergebnis sein könnte. Die A β 42/40 wurden durch 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol gelöst, über Nacht verdampft und bei -80 °C weggefroren (Shigemitsu et al. 2016). Die entstandenen Monomere von A β 42/40 wurden in die Experimente eingesetzt (Cenini et al. 2016). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit A β 42/40 mit 40 μ l von 50 mM NaOH gelöst und mit 1 M Tris Puffer (pH 7,4) so versetzt, dass nach Zugabe von 40 μ l von 50 mM HCl eine neutrale Lösung mit amyloiden Peptiden entstehen konnte. Diese Lösung wurde anschließend bei -80 °C weggefroren. Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede von Lösungsmitteln von A β -Peptiden zu unterschiedlichen Aggregationsverhalten führen (Shen und Murphy 1995; Castelletto et al. 2009).

Der Unterschied im Protokoll in der Lösungsnahme könnte dazu führen, dass mehr A β -Oligomere entstanden sind, welche sich unterschiedlich zu den Monomeren in dem Filterretardierungsexperiment verhalten könnten. Dies könnte schlussendlich zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Die Dimervariante von A β 40, welche aus zwei gekoppelten A β 40 besteht, zeigte in Importexperimenten mit isolierten Mitochondrien die stärkste Importinhibition. Die Besonderheit dieser DiA β -Peptide ist, dass sie hauptsächlich Oligomere bilden und keine fibrillären Strukturen (Schützmann et al. 2021). Das Importergebnis lässt sich durch die erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Koaggregation durch das doppelte A β 40 erklären. Außerdem weist dieses Ergebnis darauf hin, dass Oligomere einen stärkeren negativen Einfluss auf den Import ausüben im Vergleich zu amyloiden Monomeren. Diese Daten würden mit der höheren Toxizität von amyloiden Oligomeren übereinstimmen (Tipping et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass A β 42-Oligomere *in vitro* die Aktivität von isoliertem Komplex IV inhibieren können, wobei A β 42-Monomere diese Hemmung nicht verursachen konnten (Crouch et al. 2005). Diese Datenlage und die Experimente dieser Arbeit lassen daraus schließen, dass A β -Oligomere wie DiA β einen stärkeren Defekt auf den Import von mitochondrialen Präproteinen verursachen könnten als andere A β -Monomere.

Das Membranpotential von isolierten Mitochondrien nach DiA β -Behandlung zeigte keine Veränderung und auch die mitochondriale Integrität zeigte keine Veränderung. Auch wenn Cenini et al. (2016) nicht mit A β 40-Dimeren gearbeitet hat, lässt sich dieses Ergebnis dadurch bestätigen und es demonstriert, dass A β -Peptide das Membranpotential und die mitochondriale Integrität *in vitro* nicht schädigen können.

In weiteren Experimenten wurde der Effekt von DiA β extern auf intakte Zellen analysiert, bei denen keine Veränderung der mitochondrialen Proteinlevel, des Membranpotentials oder der ROS-Produktion festgestellt werden konnte. Es konnte auch gezeigt werden, dass DiA β nicht zu einer Pink1-induzierten Mitophagie führt. Auch dieses Ergebnis konnte die Messung des Membranpotentials nach Behandlung mit DiA β bestätigen. Pink1-Induktion findet normalerweise durch Depolarisation von Mitochondrien statt (Sato und Furuya 2018).

Aufgrund dieser Datenlage lässt sich ein Modell der A β -Hemmwirkung auf Mitochondrien entwickeln: Die Hemmung des mitochondrialen Imports durch amyloide Peptide im Zytosol könnte einen indirekten Effekt auf die Mitochondrien ausüben. Die Koaggregation mit mitochondrialen Präproteinen könnte zum Fehlen von entscheidenden Proteinen wie LonP1, Hsp60, MPP oder mtHsp70 führen, was indirekt wieder Auswirkungen auf die Atmungskettenkomplexe und deren Stabilität haben könnte (Cenini et al. 2016; Bayot et al. 2014; Cömert et al. 2024; Witte et al. 1988; Strub et al. 2002). Dies könnte wiederum zum Erliegen des Membranpotentials führen, was dann zur Mitophagie führen würde (Eldeeb et al. 2024). Diese Annahme würde aber nur so in dieser Tragweite stattfinden, wenn kein kotranslatonaler Import in der Zelle abläuft und die amyloiden Aggregate mit Präproteinen im Zytosol in Interaktion treten können.

6.4.1 Isoliertes Zytosol verlangsamt den Import und hebt Importhemmung durch amyloide Aggregate nicht auf

In der Zelle sind Organellen wie Mitochondrien vom Zytosol umgeben. Wenn man von diesem Zustand *in vivo* ausgeht, wäre es hypothetisch möglich, dass der Import *in vitro* durch Zugabe von Zytosol effizienter ablaufen sollte. Es konnte gezeigt werden, dass der Import durch Hinzugabe von isoliertem Zytosol gehemmt wird. Die Hemmung geschieht durch Verringerung der Bindung des Präproteins an die Mitochondrien mit zunehmender Zytosolmenge. Die Zugabe von ATP verstärkt diesen Effekt. Diese Reduzierung der Bindung an die Mitochondrien könnte durch die Bindung des Präproteins an Chaperonproteine erklärt werden, da diese Bindung von ATP abhängig ist (Hartl 1996). Es konnte gezeigt werden, dass zytosolische Chaperone wie Hsp70/Hsp90 einen Komplex mit Tom34/Tom70 bilden, dadurch Präproteine wie pOTC (Ornithin-Transcarbamylase) im Zytosol stabilisieren und zum Mitochondrium führen können (Faou und Hoogenraad 2012).

Daher könnte es sein, dass die Bindung von SDCSH an die Mitochondrien und an die Chaperone in Konkurrenz zueinandersteht. In Anwesenheit von ATP könnten die Chaperone SDCSH nicht mehr freigeben und es stünde weniger SDCSH für den Import zur Verfügung. Chaperone verbrauchen ATP, um die Rückfaltung von Proteinen zu ermöglichen und um Aggregation zu verhindern

(Lee und Vierling 2000). Dieses Ergebnis würde ebenfalls die Theorie stützen, dass Präproteine direkt durch die Ribosomen an den Mitochondrien translatiert werden (Fujiki und Verner 1993). Infolgedessen würde der mitochondriale Import hauptsächlich kotranslational ablaufen. Der potenzielle Weg des posttranslationalen Imports, bei dem das Präprotein von Ribosomen im Zytosol translatiert wird, hätte den Nachteil einer möglichen Koaggregation (Reid und Schatz 1982; Liu et al. 2023).

In *E. coli* wurde eine Koaggregation gezeigt, beidem der amphipathische Charakter der Präsequenz von Präproteinen wie COXIV zur Aggregation mit Proteinen wie reduziertem α -Lactalbumin führte (Endo et al. 1995). Diese Beobachtung zusammen mit den Daten dieser Arbeit legt die Annahme nahe, dass Proteine im isolierten Zytosol mit Präproteinen wie SDCSH koaggregieren könnten. Dies könnte einen hemmenden Einfluss auf den Import haben.

Um die Wirkung von isoliertem Zytosol auf die Importhemmung von amyloiden Aggregaten zu testen, wurde Zytosol zu Importexperimenten mit verschiedenen amyloiden Aggregaten eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Interaktion der Chaperone des zugegebenen Zytosols mit den amyloiden Aggregaten nicht ausreicht, um die Importhemmung durch A β zu verhindern. Dieses Ergebnis könnte ebenfalls für eine Koaggregation von SDCSH mit den zytosolischen Proteinen, sowie den amyloiden Peptiden sprechen (Endo et al. 1995; Cenini et al. 2016). Der amphipathische Charakter der Präsequenz sorgt für eine erhöhte Koaggregation mit ungefalteten Proteinen und damit für einen verminderten Import in die mitochondriale Matrix (Liu et al. 2023).

6.4.2 α -syn(61-95) inhibiert den mitochondrialen Import nicht

Das Protein α -Synuclein befindet sich in den sogenannten Lewy-Körpern, welche sich in verschiedenen Regionen des Gehirns sammeln und Parkinson auslösen können. α -Synuclein steht im Verdacht, den mitochondrialen Import negativ zu beeinflussen (Baba et al. 1998; Di Maio et al. 2016). Die Aminosäuren 61-95 des α -Synuclein bilden die hydrophobe Domäne des Proteins. Um zu überprüfen, ob dieser Teil des α -Synuclein den Import mit SDCSH stört, wurden Importexperimente mit isolierten Mitochondrien aus HEK293 durchgeführt. Es konnte keine Veränderung des Imports, keine Depolarisation durch α -syn(61-95)

und keine Veränderung der mitochondrialen Integrität durch die Behandlung mit α -syn(61-95) festgestellt werden. Di Maio et al. (2016) stellten eine Importreduzierung durch α -Synuclein-Oligomere in SH-SY5Y Zellen fest. Dieses Ergebnis konnte diese Arbeit trotz Einsatz von Oligomeren des α -syn(61-95) in den Importexperimenten nicht bestätigen. Das lässt vermuten, dass Oligomere des α -Synucleins zwar einen Einfluss auf den Import in die Mitochondrien haben, der hydrophobe Teil (61-95) des α -Synucleins allerdings nicht ausreicht, um eine Importhemmung auszulösen. Die N-terminalen Aminosäuren (1-60) des α -Synucleins besitzen einen amphipathischen Charakter, welcher dazu führen könnte, mit mitochondrialen Präproteinen zu koaggregieren (Kumari et al. 2021; Endo et al. 1995).

7 Ausblick

Die ermittelten Werte der maximalen Importgeschwindigkeit dieser Arbeit sind ein Versuch, die mitochondriale Importkinetik quantitativ zu analysieren. Die Methodik des Imports mit fluoreszenzmarkierten Präproteinen benötigt aber noch weitere Optimierungen in Bezug auf höhere Löslichkeit des Präproteins. Andere Fluoreszenzfarbstoffe zu testen, wäre ein Weg, die Methodik weiter zu optimieren (Jain et al. 2023). Ein weiterer Aspekt, welcher in dieser Doktorarbeit nicht bearbeitet werden konnte, stellt die Importkinetik *in vivo* dar. *In-vivo*-Import-Experimente könnten die Fragestellungen in Bezug auf die Pathologie einiger Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson näher beleuchten sowie die tatsächliche Importkinetik in einer Zelle analysierbar machen (Althoff et al. 2024; Bogorodskiy et al. 2021). *In vitro* Experimente mit chemisch modifizierten A β -Peptiden wie Phosphorylierung oder Acetylierung könnten weitere Aspekte des negativen Effektes von Aggregaten auf den mitochondrialen Import näher beleuchten (Kapadia et al. 2024; Pilkington, 4th. et al. 2020). Außerdem könnte der Effekt von Varianten von Tau-Proteinen und dem ganzen α -Synuclein auf mitochondriale Präproteine und deren Import analysiert werden (Bhandare et al. 2019; Di Maio et al. 2016).

Isoliertes Zytosol und deren Chaperone konnten die Importhemmung von A β -Peptiden nicht aufheben. Im Rahmen der Erforschung von Alzheimer-Behandlungsmethoden konnte von Bocharov et al. (2021) gezeigt werden, dass

D3-Peptide eine Behandlungsmöglichkeit darstellen könnten. Enantiomere D3-Peptide bestehen aus einer D-Aminosäuresequenz, welche reich an Arginin ist und die Aggregation von A β -Monomeren hemmen kann, um so die Bildung von toxischen Oligomeren zu verlangsamen (Bocharov et al. 2021). Diese Beobachtung könnte sich auf die Importhemmung von A β in Importexperimenten in Mitochondrien auswirken und durch die in dieser Arbeit beschriebene Technik mit SDCSH analysiert werden.

8 Abkürzungen

Tabelle 16: Abkürzungen

APP	Amyloid Beta Precursor Protein
ATP	Adenosintriphosphat
AVO	Antimycin A Valinomycin Oligomycin
A β	Beta-Amyloid
BSA	Bovine serum albumin
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting
HEK293	Human Embryonic Kidney
HeLa	Humane Cervixkarzinom Zelllinie
LPB	Long Pass Blue
m-Bande	Mature Form
MPP	Mitochondrial Processing Peptidase
nm	Nanometer
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

p-Bande	Präform
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDCSH	Su9-DHFR-Cys-Strep-6His
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
SH-SY5Y	Neuroblastoma Zelllinie
TMRE	Tetramethylrhodamin-Ethylester
YPD	Hefextract Pepton Glukose
YPG	Hefeextrakt Pepton Glycerin

9 Abbildungsliste

Abbildung 1: Vereinfachte allgemeine Struktur von Mitochondrialen Präproteine der mitochondrialen Matrix.	11
Abbildung 2: Mitochondrialer Import in die Matrix.	13
Abbildung 3: Membranpotential und Atmungskette der Mitochondrien.	15
Abbildung 4: Mechanismus der SNAP-Markierungstechnik.	18
Abbildung 5: Mechanismus der Michael-Addition zwischen Maleimid und Thiolgruppen.	19
Abbildung 6: Mitochondriale Importkinetik.	20
Abbildung 7: Auswertung der Importgeschwindigkeit.	48
Abbildung 8: Struktur und Fluoreszenzmarkierung des Präproteins SDCSH	53

Abbildung 9: Expression, Rückfaltung (+/- 1 mM DTT) und Kontrollimport (+/- Methotrexat) von SDCSH.....	54
Abbildung 10: Titration und Sensitivität des Präproteins SDCSH	56
Abbildung 11: Optimierung der Reaktionszeit für die Fluoreszenzmarkierung.	57
Abbildung 12: Fluoreszenzstabilität des SDCSHs nach mehrfacher Detektion.....	58
Abbildung 13: Hintergrundrauschen des SDCSHs und DTT-Titration.	59
Abbildung 14: Überhang-PCR und gekoppelte Translation von SDCSH....	60
Abbildung 15: Import von radioaktiven SDCSH und fluoreszenzmarkierten SDCSH in isolierten YPH499-Mitochondrien.....	61
Abbildung 16: Import von radioaktiven SDCSH und fluoreszenzmarkierten SDCSH in isolierten HeLa-Mitochondrien.	62
Abbildung 17: Import von radioaktiven SDCSH und fluoreszenzmarkierten SDCSH in Digitonin behandelten HeLa-Zellen.	63
Abbildung 18: Import von verschiedenen Mengen SDCSH.	64
Abbildung 19: Importgeschwindigkeit von verschiedenen Mengen SDCSH in YPH499-Mitochondrien und anschließende Kinetik-Bestimmung.	65
Abbildung 20: Einfluss der Temperatur auf den Import in isolierte HeLa-Mitochondrien.....	67
Abbildung 21: Einfluss der Temperatur auf das Membranpotential von isolierten HeLa-Mitochondrien.....	68
Abbildung 22: Einfluss der Temperatur auf die Stabilität von isolierten HeLa-Mitochondrien	69
Abbildung 23: Import nach 15 Minuten Vorbehandlung bei 30 °C, 37 °C und 42 °C.....	71
Abbildung 24: Importgeschwindigkeit nach 15 Minuten Vorbehandlung bei 30 °C, 37 °C und 42 °C.	72
Abbildung 25: Maximale Importgeschwindigkeit bei 30 °C und 37 °C.	73
Abbildung 26: Importexperimente mit isolierten HEK293-, HeLa- und SH-SY5Y-Mitochondrien.....	74

Abbildung 27: Maximale Importgeschwindigkeit und Importumsatz von isolierten Mitochondrien aus HeLa, HEK293 und SH-SY5Y bei 37 °C.	75
Abbildung 28: Membranpotential von HeLa-, HEK293- und SH-SY5Y-Zellen.	77
Abbildung 29: Proteinlevel von isolierten HeLa-, HEK293- und SH-SY5Y-Mitochondrien.....	77
Abbildung 30: Einfluss der Temperatur auf den Import in isolierte <i>S. cerevisiae</i> YPH499-Mitochondrien..	79
Abbildung 31: Einfluss der Temperatur auf das Membranpotential isolierter YPH499-Mitochondrien.	81
Abbildung 32: Import nach 10 Minuten Vorbehandlung bei 25 °C, 37 °C und 42 °C.....	81
Abbildung 33: Einfluss der Temperatur auf den mitochondrialen Import in isolierte YPH499-Mitochondrien.....	83
Abbildung 34: Einfluss von ROS-Stress auf den mitochondrialen Import in isolierte HeLa-Mitochondrien.	84
Abbildung 35: Einfluss von ROS-Stress auf die mitochondriale Stabilität.	85
Abbildung 36: Charakterisierung der <i>sod2Δ</i> -Deletionsmutanten.	87
Abbildung 37: Spotttest mit BY4741 und <i>sod2Δ</i>	88
Abbildung 38: Importgeschwindigkeit von <i>sod2Δ</i> und BY4741 bei 25 °C..	89
Abbildung 39: Maximale Importgeschwindigkeit und importierte Proteinmenge nach 40 Minuten von <i>S. cerevisiae</i> BY4741 und <i>sod2Δ</i>	89
Abbildung 40: Zytosolisolierung von HeLa-Zellen.	91
Abbildung 41: Import von SDCSH in isolierten HEK293-Mitochondrien +/- Zytosolzugabe.	92
Abbildung 42: Stabilität von isolierten HEK293-Mitochondrien +/- Zytosolzugabe..	93
Abbildung 43: Membranpotential von isolierten HEK293-Mitochondrien +/- Zytosolzugabe.	94
Abbildung 44: Effekt von DiAβ-Peptiden auf den mitochondrialen Import.	95

Abbildung 45: Effekt von DiA β -Peptiden auf das Membranpotential von isolierten HeLa-Mitochondrien	96
Abbildung 46: Effekt von DiA β -Peptiden auf die mitochondriale Integrität.	97
Abbildung 47: Effekt von DiA β -Peptiden auf das Membranpotential von HeLa-Zellen.	99
Abbildung 48: Effekt von DiA β -Peptiden auf die ROS-Produktion von HeLa-Zellen.....	100
Abbildung 49: Effekt von DiA β -Peptiden auf die Proteinlevel und Mitophagie-Marker von HeLa-Zellen.	101
Abbildung 50: Effekt von A β 40-Peptiden und A β 42-Peptiden auf den mitochondrialen Import.	102
Abbildung 51: Effekt von A β 40- und A β 42-Peptiden auf das Membranpotential	103
Abbildung 52: Filterretardierungstest mit SDCSH und A β 40/42.	105
Abbildung 53: Einfluss von isoliertem Zytosol auf den Import Effekt von A β 40 und A β 42.....	107
Abbildung 54: Einfluss von isoliertem Zytosol auf den Import Effekt von DiA β	108
Abbildung 55: Effekt von α -syn(61-95) auf den mitochondrialen Import.	110
Abbildung 56: Effekt von α -syn(61-95) auf das Membranpotential..	111
Abbildung 57: Einfluss von α -syn(61-95) auf die Stabilität von isolierten HEK293-Mitochondrien	112
Abbildung 58: Vergleich Importgeschwindigkeit <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	119
Abbildung 59: Struktur Plasmid pWJ10.	137

10 Tabellenliste

Tabelle 1: Laborgeräte	26
Tabelle 2: Chemikalien	27
Tabelle 3: Puffer und Lösungen	28
Tabelle 4: Software und Programme	30
Tabelle 5: Primäre Antikörper (<i>Homo sapiens</i>)	31
Tabelle 6: Primäre Antikörper (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	32
Tabelle 7: Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper	32
Tabelle 8: Zelllinien	33
Tabelle 9: Hefezelllinien.....	33
Tabelle 10: Peptide.....	33
Tabelle 11: Plasmide und Primer	34
Tabelle 12: Verdünnungen Spotttest	39
Tabelle 13: PCR-Programm	41
Tabelle 14: 12,5 % SDS-PAGE Gel.....	44
Tabelle 15: Kennzahlen <i>in vivo</i> Importgeschwindigkeit Berechnung.....	118
Tabelle 16: Abkürzungen	130

11 Danksagung

Ich danke Gott, dass er mich Tag für Tag seine Schöpfung bewundern lässt, dass er mich mit der Kraft und der Ausdauer ausgerüstet hat, diese Doktorarbeit zu schreiben und mich in dieser Zeit vieles gelehrt hat.

Danke an meine Frau Evelyn und meinen Sohn Nathanael für alle ihre Aufmunterung, ihr Humor, für Ablenkungen ebenso wie Ermutigungen dranzubleiben und ihr Verständnis in all der Zeit.

Bei meinen Eltern, Schwiegereltern und guten Freunden bedanke ich mich für das Interesse, das Staunen, die Ermutigung und gemeinsame Auszeiten.

Ich bedanke mich außerdem bei Tarek, der mich an seinem Imbiss stets mit leckerem Essen und guten Kaffee versorgt hat.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Wolfgang Voos für die Unterstützung und die Möglichkeit die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu schreiben, sowie bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Voos und bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für den Austausch und die kollegiale Zusammenarbeit.

Danke auch an die Mitglieder der Promotionskommission für Ihre Bereitschaft mich zu prüfen und mich durch die Prüfung zu begleiten.

12 Anhang

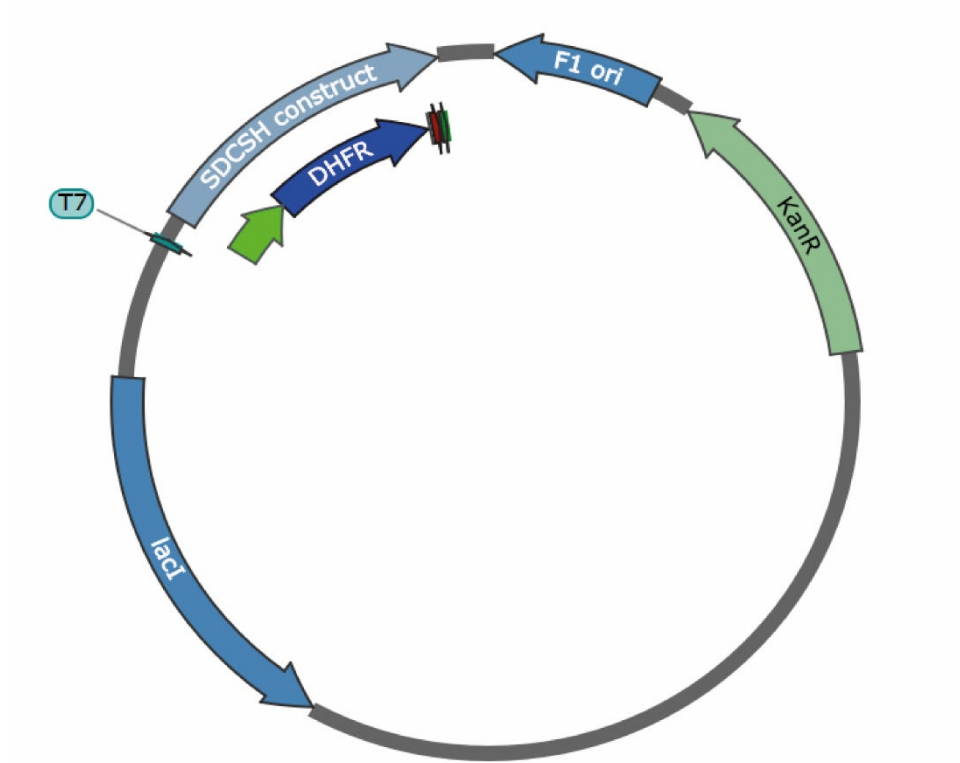


Abbildung 59: Struktur Plasmid pWJ10. T7-Promotor vor dem SDCSH Konstrukt für Expression. KanR: Kanamycin Resistenz, F1 ori: Reproduktion des Plasmids in *E.coli*. lacI: Lac Repressor für rekombinante Expression des SDCSHs in *E.coli*

13 Literaturverzeichnis

- Ahn, Keun Jae; Paik, Seung R.; Chung, Kwang Chul; Kim, Jongsun (2006): Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein. In: *Journal of neurochemistry* 97 (1), S. 265–279. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03731.x.
- Althoff, Lukas F. J.; Kramer, Markus M.; Bühner, Benjamin; Gaspar, Denise; Radziwill, Gerald (2024): Optogenetic Control of the Mitochondrial Protein Import in Mammalian Cells. In: *Cells* 13 (19). DOI: 10.3390/cells13191671.
- Anderton, B. H. (1970): The reaction of N-ethyl maleimide with malate dehydrogenase. In: *FEBS letters* 12 (1), S. 65–68. DOI: 10.1016/0014-5793(70)80597-x.
- Arava, Yoav; Wang, Yulei; Storey, John D.; Liu, Chih Long; Brown, Patrick O.; Herschlag, Daniel (2003): Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7), S. 3889–3894. DOI: 10.1073/pnas.0635171100.
- Baba, M.; Nakajo, S.; Tu, P. H.; Tomita, T.; Nakaya, K.; Lee, V. M. et al. (1998): Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. In: *The American journal of pathology* 152 (4), S. 879–884.
- Backes, Sandra; Hess, Steffen; Boos, Felix; Woellhaf, Michael W.; Gödel, Sabrina; Jung, Martin et al. (2018): Tom70 enhances mitochondrial preprotein import efficiency by binding to internal targeting sequences. In: *The Journal of cell biology* 217 (4), S. 1369–1382. DOI: 10.1083/jcb.201708044.
- Baker, Monya (2015): Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. In: *Nature* 521 (7552), S. 274–276. DOI: 10.1038/521274a.
- Ballinger, S. W.; van Houten, B.; Jin, G. F.; Conklin, C. A.; Godley, B. F. (1999): Hydrogen peroxide causes significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells. In: *Experimental eye research* 68 (6), S. 765–772. DOI: 10.1006/exer.1998.0661.
- Bayot, Aurélien; Gareil, Monique; Chavatte, Laurent; Hamon, Marie-Paule; L'Hermitte-Stead, Caroline; Beaumatin, Florian et al. (2014): Effect of Lon

protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells. In: *Biochimie* 100, S. 38–47. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.12.005.

Becker, Dorothea; Krayl, Martin; Voos, Wolfgang (2008): In vitro analysis of the mitochondrial preprotein import machinery using recombinant precursor polypeptides. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 457, S. 59–83. DOI: 10.1007/978-1-59745-261-8_5.

Bender, Tom; Leidhold, Claudia; Ruppert, Thomas; Franken, Sebastian; Voos, Wolfgang (2010): The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. In: *Proteomics* 10 (7), S. 1426–1443. DOI: 10.1002/pmic.200800619.

Bender, Tom; Lewrenz, Ilka; Franken, Sebastian; Baitzel, Catherina; Voos, Wolfgang (2011): Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. In: *Molecular biology of the cell* 22 (5), S. 541–554. DOI: 10.1091/mbc.E10-08-0718.

Bertoli, Cosetta; Skotheim, Jan M.; de Bruin, Robertus A M (2013): Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (8), S. 518–528. DOI: 10.1038/nrm3629.

Bhandare, Vishwambhar Vishnu; Kumbhar, Bajarang Vasant; Kunwar, Ambarish (2019): Differential binding affinity of tau repeat region R2 with neuronal-specific β -tubulin isoforms. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 10795. DOI: 10.1038/s41598-019-47249-7.

Bhargava, Pallavi; Schnellmann, Rick G. (2017): Mitochondrial energetics in the kidney. In: *Nature reviews. Nephrology* 13 (10), S. 629–646. DOI: 10.1038/nrneph.2017.107.

Bocharov, Eduard V.; Gremer, Lothar; Urban, Anatoly S.; Okhrimenko, Ivan S.; Volynsky, Pavel E.; Nadezhdin, Kirill D. et al. (2021): All-d-Enantiomeric Peptide D3 Designed for Alzheimer's Disease Treatment Dynamically Interacts with Membrane-Bound Amyloid- β Precursors. In: *Journal of medicinal chemistry* 64 (22), S. 16464–16479. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00632.

Bogorodskiy, Andrey; Okhrimenko, Ivan; Maslov, Ivan; Maliar, Nina; Burkatovskii, Dmitrii; Ameln, Florian von et al. (2021): Accessing Mitochondrial

Protein Import in Living Cells by Protein Microinjection. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 698658. DOI: 10.3389/fcell.2021.698658.

Bömer, U.; Maarse, A. C.; Martin, F.; Geissler, A.; Merlin, A.; Schönfisch, B. et al. (1998): Separation of structural and dynamic functions of the mitochondrial translocase: Tim44 is crucial for the inner membrane import sites in translocation of tightly folded domains, but not of loosely folded preproteins. In: *The EMBO journal* 17 (15), S. 4226–4237. DOI: 10.1093/emboj/17.15.4226.

Bonucci, Martina; Shu, Tong; Holt, Liam J. (2023): How it feels in a cell. In: *Trends in cell biology* 33 (11), S. 924–938. DOI: 10.1016/j.tcb.2023.05.002.

Boos, Felix; Krämer, Lena; Groh, Carina; Jung, Ferris; Haberkant, Per; Stein, Frank et al. (2019): Mitochondrial protein-induced stress triggers a global adaptive transcriptional programme. In: *Nature cell biology* 21 (4), S. 442–451. DOI: 10.1038/s41556-019-0294-5.

Bota, Daniela A.; Davies, Kelvin J. A. (2002): Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. In: *Nature cell biology* 4 (9), S. 674–680. DOI: 10.1038/ncb836.

Boveris, A.; Chance, B. (1973): The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. In: *The Biochemical journal* 134 (3), S. 707–716. DOI: 10.1042/bj1340707.

Bruderek et al., Michael (2016): Intra-mitochondriale Proteinaggregatablagerung als Schutzmechanismus der mitochondrialen Qualität. Doktorarbeit. Universität Bonn, Universität Bonn. Institut für Biochemie und Molekularbiologie.

Castelletto, V.; Hamley, I. W.; Harris, P. J. F.; Olsson, U.; Spencer, N. (2009): Influence of the solvent on the self-assembly of a modified amyloid beta peptide fragment. I. Morphological investigation. In: *The journal of physical chemistry. B* 113 (29), S. 9978–9987. DOI: 10.1021/jp902860a.

Celaya, Garbiñe; Fernández-Higuero, José Angel; Martin, Ianire; Rivas, Germán; Moro, Fernando; Muga, Arturo (2016): Crowding Modulates the Conformation, Affinity, and Activity of the Components of the Bacterial Disaggregase Machinery. In: *Journal of molecular biology* 428 (11), S. 2474–2487. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.04.027.

Cenini, Giovanna; Rüb, Cornelia; Bruderek, Michael; Voos, Wolfgang (2016): Amyloid β -peptides interfere with mitochondrial preprotein import competence by a coaggregation process. In: *Molecular biology of the cell* 27 (21), S. 3257–3272. DOI: 10.1091/mbc.E16-05-0313.

Chen, Li; Feany, Mel B. (2005): Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. In: *Nature neuroscience* 8 (5), S. 657–663. DOI: 10.1038/nn1443.

Cheng, M. Y.; Hartl, F. U.; Martin, J.; Pollock, R. A.; Kalousek, F.; Neupert, W. et al. (1989): Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. In: *Nature* 337 (6208), S. 620–625. DOI: 10.1038/337620a0.

Chernyak, Boris V.; Izyumov, Denis S.; Lyamzaev, Konstantin G.; Pashkovskaya, Alina A.; Pletjushkina, Olga Y.; Antonenko, Yuri N. et al. (2006): Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. In: *Biochimica et biophysica acta* 1757 (5-6), S. 525–534. DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.02.019.

Chrétien, Dominique; Bénit, Paule; Ha, Hyung-Ho; Keipert, Susanne; El-Khoury, Riyad; Chang, Young-Tae et al. (2018): Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C. In: *PLoS biology* 16 (1), e2003992. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003992.

Chudakov, D. M.; Lukyanov, K. A. (2003): Use of green fluorescent protein (GFP) and its homologs for in vivo protein motility studies. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 68 (9), S. 952–957. DOI: 10.1023/a:1026048109654.

Cizas, Paulius; Budvytyte, Rima; Morkuniene, Ramune; Moldovan, Radu; Broccio, Matteo; Lösche, Mathias et al. (2010): Size-dependent neurotoxicity of beta-amyloid oligomers. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 496 (2), S. 84–92. DOI: 10.1016/j.abb.2010.02.001.

Cömert, Cagla; Kjær-Sørensen, Kasper; Hansen, Jakob; Carlsen, Jasper; Just, Jesper; Meaney, Brandon F. et al. (2024): HSP60 chaperone deficiency disrupts the mitochondrial matrix proteome and dysregulates cholesterol synthesis. In: *Molecular metabolism* 88, S. 102009. DOI: 10.1016/j.molmet.2024.102009.

- Crouch, Peter J.; Blake, Rachel; Duce, James A.; Ciccotosto, Giuseppe D.; Li, Qiao-Xin; Barnham, Kevin J. et al. (2005): Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (3), S. 672–679. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4276-04.2005.
- Crowley, Lisa C.; Christensen, Melinda E.; Waterhouse, Nigel J. (2016): Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2016 (12). DOI: 10.1101/pdb.prot087361.
- Dekker, P. J.; Ryan, M. T.; Brix, J.; Müller, H.; Hönliger, A.; Pfanner, N. (1998): Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. In: *Molecular and cellular biology* 18 (11), S. 6515–6524. DOI: 10.1128/MCB.18.11.6515.
- Dennerlein, Sven; Rehling, Peter; Richter-Dennerlein, Ricarda (2023): Cytochrome c oxidase biogenesis - from translation to early assembly of the core subunit COX1. In: *FEBS letters* 597 (12), S. 1569–1578. DOI: 10.1002/1873-3468.14671.
- Denoth Lippuner, Annina; Julou, Thomas; Barral, Yves (2014): Budding yeast as a model organism to study the effects of age. In: *FEMS microbiology reviews* 38 (2), S. 300–325. DOI: 10.1111/1574-6976.12060.
- Devi, Latha; Raghavendran, Vijayendran; Prabhu, Badanavalu M.; Avadhani, Narayan G.; Anandatheerthavarada, Hindupur K. (2008): Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (14), S. 9089–9100. DOI: 10.1074/jbc.M710012200.
- Di Bartolomeo, Francesca; Malina, Carl; Campbell, Kate; Mormino, Maurizio; Fuchs, Johannes; Vorontsov, Egor et al. (2020): Absolute yeast mitochondrial proteome quantification reveals trade-off between biosynthesis and energy generation during diauxic shift. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (13), S. 7524–7535. DOI: 10.1073/pnas.1918216117.
- Di Maio, Roberto; Barrett, Paul J.; Hoffman, Eric K.; Barrett, Caitlyn W.; Zharikov, Alevtina; Borah, Anupom et al. (2016): α -Synuclein binds to TOM20

and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. In: *Science translational medicine* 8 (342), 342ra78. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf3634.

Docherty, Paul D.; Chase, J. Geoffrey; David, Timothy (2012): Characterisation of the iterative integral parameter identification method. In: *Medical & biological engineering & computing* 50 (2), S. 127–134. DOI: 10.1007/s11517-011-0851-y.

Dressler, Cathrin; Beuthan, Juergen; Mueller, Gerhard; Zabarylo, Urszula; Minet, Olaf (2006): Fluorescence imaging of heat-stress induced mitochondrial long-term depolarization in breast cancer cells. In: *Journal of fluorescence* 16 (5), S. 689–695. DOI: 10.1007/s10895-006-0110-z.

Eldeeb, Mohamed A.; Fallahi, Armaan; Soumbasis, Andrea; Bayne, Andrew N.; Trempe, Jean-François; Fon, Edward A. (2024): Mitochondrial import stress and PINK1-mediated mitophagy: the role of the PINK1-TOMM-TIMM23 supercomplex. In: *Autophagy* 20 (8), S. 1903–1905. DOI: 10.1080/15548627.2024.2340399.

Emanuelsson, O.; Heijne, G. von (2001): Prediction of organellar targeting signals. In: *Biochimica et biophysica acta* 1541 (1-2), S. 114–119. DOI: 10.1016/s0167-4889(01)00145-8.

Endo, T.; Mitsui, S.; Roise, D. (1995): Mitochondrial presequences can induce aggregation of unfolded proteins. In: *FEBS letters* 359 (1), S. 93–96. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00015-2.

Epps, D. E.; Taylor, B. M. (2001): A competitive fluorescence assay to measure the reactivity of compounds. In: *Analytical biochemistry* 295 (1), S. 101–106. DOI: 10.1006/abio.2001.5173.

Fan, Xiying; Hussien, Rajaa; Brooks, George A. (2010): H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. In: *Free radical biology & medicine* 49 (11), S. 1646–1654. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.024.

Fang, Qingming; Kanugula, Sreenivas; Pegg, Anthony E. (2005): Function of domains of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. In: *Biochemistry* 44 (46), S. 15396–15405. DOI: 10.1021/bi051460d.

Fani, Giulia; Mannini, Benedetta; Vecchi, Giulia; Cascella, Roberta; Cecchi, Cristina; Dobson, Christopher M. et al. (2021): A β Oligomers Dysregulate Calcium Homeostasis by Mechanosensitive Activation of AMPA and NMDA Receptors. In: *ACS chemical neuroscience* 12 (4), S. 766–781. DOI: 10.1021/acscchemneuro.0c00811.

Faou, Pierre; Hoogenraad, Nicholas J. (2012): Tom34: a cytosolic cochaperone of the Hsp90/Hsp70 protein complex involved in mitochondrial protein import. In: *Biochimica et biophysica acta* 1823 (2), S. 348–357. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.12.001.

Feles, Sebastian; Overath, Christian; Reichardt, Sina; Diegeler, Sebastian; Schmitz, Claudia; Kronenberg, Jessica et al. (2022): Streamlining Culture Conditions for the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: A Prerequisite for Functional Studies. In: *Methods and protocols* 5 (4). DOI: 10.3390/mps5040058.

Finley, Lydia W. S. (2023): What is cancer metabolism? In: *Cell* 186 (8), S. 1670–1688. DOI: 10.1016/j.cell.2023.01.038.

Forbes, Josephine M. (2016): Mitochondria-Power Players in Kidney Function? In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 27 (7), S. 441–442. DOI: 10.1016/j.tem.2016.05.002.

Fujiki, M.; Verner, K. (1993): Coupling of cytosolic protein synthesis and mitochondrial protein import in yeast. Evidence for cotranslational import in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (3), S. 1914–1920.

Gardner, Paul R. (2002): Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. In: *Methods in enzymology* 349, S. 9–23. DOI: 10.1016/s0076-6879(02)49317-2.

Garg, Tarun K.; Chang, Jason Y. (2004): 15-deoxy-delta 12, 14-Prostaglandin J2 prevents reactive oxygen species generation and mitochondrial membrane depolarization induced by oxidative stress. In: *BMC pharmacology* 4, S. 6. DOI: 10.1186/1471-2210-4-6.

Gaume, B.; Klaus, C.; Ungermann, C.; Guiard, B.; Neupert, W.; Brunner, M. (1998): Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. In: *The EMBO journal* 17 (22), S. 6497–6507. DOI: 10.1093/emboj/17.22.6497.

- Geissler, A.; Krimmer, T.; Bömer, U.; Guiard, B.; Rassow, J.; Pfanner, N. (2000): Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the $\Delta\psi$ -dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. In: *Molecular biology of the cell* 11 (11), S. 3977–3991. DOI: 10.1091/mbc.11.11.3977.
- Gomkale, Ridhima; Linden, Andreas; Neumann, Piotr; Schendzielorz, Alexander Benjamin; Stoldt, Stefan; Dybkov, Olexandr et al. (2021): Mapping protein interactions in the active TOM-TIM23 supercomplex. In: *Nature communications* 12 (1), S. 5715. DOI: 10.1038/s41467-021-26016-1.
- Grimes, G. W.; Mahler, H. R.; Perlman, R. S. (1974): Nuclear gene dosage effects on mitochondrial mass and DNA. In: *The Journal of cell biology* 61 (3), S. 565–574. DOI: 10.1083/jcb.61.3.565.
- Grimm, Stefan (2013): Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1827 (5), S. 565–572. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2012.09.009.
- Gu, Xinling; Sun, Jing; Li, Shen; Wu, Xiangmei; Li, Liang (2013): Oxidative stress induces DNA demethylation and histone acetylation in SH-SY5Y cells: potential epigenetic mechanisms in gene transcription in A β production. In: *Neurobiology of aging* 34 (4), S. 1069–1079. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.013.
- Guerrero-Ferreira, Ricardo; Taylor, Nicholas Mi; Moná, Daniel; Ringler, Philippe; Lauer, Matthias E.; Riek, Roland et al. (2018): Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. In: *eLife* 7. DOI: 10.7554/eLife.36402.
- Hallermayer, G.; Zimmermann, R.; Neupert, W. (1977): Kinetic studies on the transport of cytoplasmically synthesized proteins into the mitochondria in intact cells of *Neurospora crassa*. In: *European journal of biochemistry* 81 (3), S. 523–532. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11978.x.
- Han, Xu; He, Gefei (2018): Toward a Rational Design to Regulate β -Amyloid Fibrillation for Alzheimer's Disease Treatment. In: *ACS chemical neuroscience* 9 (2), S. 198–210. DOI: 10.1021/acscchemneuro.7b00477.
- Hansson Petersen, Camilla A.; Alikhani, Nyosha; Behbahani, Homira; Wiehager, Birgitta; Pavlov, Pavel F.; Alafuzoff, Irina et al. (2008): The amyloid

beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (35), S. 13145–13150. DOI: 10.1073/pnas.0806192105.

Hartl, F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. In: *Nature* 381 (6583), S. 571–579. DOI: 10.1038/381571a0.

Haucke, V.; Lithgow, T.; Rospert, S.; Hahne, K.; Schatz, G. (1995): The yeast mitochondrial protein import receptor Mas20p binds precursor proteins through electrostatic interaction with the positively charged presequence. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (10), S. 5565–5570. DOI: 10.1074/jbc.270.10.5565.

Hemmerle, Marine; Senger, Bruno; Di Rago, Jean-Paul; Kucharczyk, Roza; Becker, Hubert D. (2022): Visualizing Mitochondrial Importability of a Protein Using the Yeast Bi-Genomic Mitochondrial-Split-GFP Strain and an Ordinary Fluorescence Microscope. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2497, S. 255–267. DOI: 10.1007/978-1-0716-2309-1_16.

Höhfeld, J.; Hartl, F. U. (1994): Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. In: *The Journal of cell biology* 126 (2), S. 305–315. DOI: 10.1083/jcb.126.2.305.

Hu, Jianshu; Venturi, Elisa; Sigalas, Charalampos; Murayama, Takashi; Nishi, Miyuki; Takeshima, Hiroshi; Sitsapesan, Rebecca (2023): The biophysical properties of TRIC-A and TRIC-B and their interactions with RyR2. In: *The Journal of general physiology* 155 (11). DOI: 10.1085/jgp.202113070.

Hu, Wenxin; Wang, Zhiming; Zheng, Hongjin (2018): Mitochondrial accumulation of amyloid β (A β) peptides requires TOMM22 as a main A β receptor in yeast. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (33), S. 12681–12689. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002713.

Ieva, Raffaele; Heißwolf, Anna K.; Gebert, Michael; Vögtle, F-Nora; Wollweber, Florian; Mehnert, Carola S. et al. (2013): Mitochondrial inner membrane protease promotes assembly of presequence translocase by removing a carboxy-terminal targeting sequence. In: *Nature communications* 4, S. 2853. DOI: 10.1038/ncomms3853.

Im Sim, Sue; Chen, Yuanyuan; Lynch, Diane L.; Gumbart, James C.; Park, Eunyong (2023): Structural basis of mitochondrial protein import by the TIM23 complex. In: *Nature* 621 (7979), S. 620–626. DOI: 10.1038/s41586-023-06239-6.

Jain, Naintara; Gomkale, Ridhima; Bernhard, Olaf; Rehling, Peter; Cruz-Zaragoza, Luis Daniel (2023): A quantitative fluorescence-based approach to study mitochondrial protein import. In: *EMBO reports* 24 (5), e55760. DOI: 10.15252/embr.202255760.

Jaworek, Witold; Sylvester, Marc; Cenini, Giovanna; Voos, Wolfgang (2022): Elucidation of the interaction proteome of mitochondrial chaperone Hsp78 highlights its role in protein aggregation during heat stress. In: *The Journal of biological chemistry* 298 (10), S. 102494. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102494.

Jia, Lixia; Dienhart, Mary K.; Stuart, Rosemary A. (2007): Oxa1 directly interacts with Atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F1Fo-ATP synthase complex. In: *Molecular biology of the cell* 18 (5), S. 1897–1908. DOI: 10.1091/mbc.e06-10-0925.

Johnson, Jill L. (2012): Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1823 (3), S. 607–613. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.020.

Jokinen, Riikka; Battersby, Brendan J. (2013): Insight into mammalian mitochondrial DNA segregation. In: *Annals of medicine* 45 (2), S. 149–155. DOI: 10.3109/07853890.2012.693190.

Joshi, Mugdha; Anselm, Irina; Shi, Jiahai; Bale, Tejus A.; Towne, Meghan; Schmitz-Abe, Klaus et al. (2016): Mutations in the substrate binding glycine-rich loop of the mitochondrial processing peptidase- α protein (PMPCA) cause a severe mitochondrial disease. In: *Cold Spring Harbor molecular case studies* 2 (3), a000786. DOI: 10.1101/mcs.a000786.

Kapadia, Akshay; Theil, Sandra; Opitz, Sabine; Villacampa, Nàdia; Beckert, Hannes; Schoch, Susanne et al. (2024): Phosphorylation-state dependent intraneuronal sorting of A β differentially impairs autophagy and the endo-lysosomal system. In: *Autophagy* 20 (1), S. 166–187. DOI: 10.1080/15548627.2023.2252300.

Keeney, Matthew T.; Rocha, Emily M.; Hoffman, Eric K.; Farmer, Kyle; Di Maio, Roberto; Weir, Julie et al. (2024): LRRK2 regulates production of reactive oxygen species in cell and animal models of Parkinson's disease. In: *Science translational medicine* 16 (767), eadl3438. DOI: 10.1126/scitranslmed.adl3438.

Keppler, Antje; Gendreizig, Susanne; Gronemeyer, Thomas; Pick, Horst; Vogel, Horst; Johnsson, Kai (2003): A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. In: *Nature biotechnology* 21 (1), S. 86–89. DOI: 10.1038/nbt765.

Keppler, Antje; Pick, Horst; Arrivoli, Claudio; Vogel, Horst; Johnsson, Kai (2004): Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (27), S. 9955–9959. DOI: 10.1073/pnas.0401923101.

Koutnikova, H.; Campuzano, V.; Koenig, M. (1998): Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. In: *Human molecular genetics* 7 (9), S. 1485–1489. DOI: 10.1093/hmg/7.9.1485.

Krämer, Lena; Dalheimer, Niko; Räsche, Markus; Storchová, Zuzana; Pielage, Jan; Boos, Felix; Herrmann, Johannes M. (2023): MitoStores: chaperone-controlled protein granules store mitochondrial precursors in the cytosol. In: *The EMBO journal* 42 (7), e112309. DOI: 10.15252/embj.2022112309.

Krayl, Martin; Lim, Joo Hyun; Martin, Falk; Guiard, Bernard; Voos, Wolfgang (2007): A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. In: *Molecular and cellular biology* 27 (2), S. 411–425. DOI: 10.1128/MCB.01391-06.

Kumari, Pratibha; Ghosh, Dhiman; Vanas, Agathe; Fleischmann, Yanick; Wiegand, Thomas; Jeschke, Gunnar et al. (2021): Structural insights into α -synuclein monomer-fibril interactions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (10). DOI: 10.1073/pnas.2012171118.

Laun, P.; Pichova, A.; Madeo, F.; Fuchs, J.; Ellinger, A.; Kohlwein, S. et al. (2001): Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of

oxidative stress and apoptosis. In: *Molecular microbiology* 39 (5), S. 1166–1173.

Lee, G. J.; Vierling, E. (2000): A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. In: *Plant physiology* 122 (1), S. 189–198. DOI: 10.1104/pp.122.1.189.

Li, Nianyu; Ragheb, Kathy; Lawler, Gretchen; Sturgis, Jennie; Rajwa, Bartek; Melendez, J. Andres; Robinson, J. Paul (2003): Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (10), S. 8516–8525. DOI: 10.1074/jbc.M210432200.

Lim, J. H.; Martin, F.; Guiard, B.; Pfanner, N.; Voos, W. (2001): The mitochondrial Hsp70-dependent import system actively unfolds preproteins and shortens the lag phase of translocation. In: *The EMBO journal* 20 (5), S. 941–950. DOI: 10.1093/emboj/20.5.941.

Lin, Yuxi; Im, Haeri; Le Diem, Thi; Ham, Sihyun (2019): Characterizing the structural and thermodynamic properties of A β 42 and A β 40. In: *Biochemical and biophysical research communications* 510 (3), S. 442–448. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.01.124.

Liu, Qingqing; Fong, Benjamin; Yoo, Seungmin; Unruh, Jay R.; Guo, Fengli; Yu, Zulin et al. (2023): Nascent mitochondrial proteins initiate the localized condensation of cytosolic protein aggregates on the mitochondrial surface. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120 (31), e2300475120. DOI: 10.1073/pnas.2300475120.

Lu, Jiawei; Li, Huixia; Yu, Debing; Zhao, Peng; Liu, Yuan (2023): Heat stress inhibits the proliferation and differentiation of myoblasts and is associated with damage to mitochondria. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 11, S. 1171506. DOI: 10.3389/fcell.2023.1171506.

Lurette, Olivier; Martín-Jiménez, Rebeca; Khan, Mehtab; Sheta, Razan; Jean, Stéphanie; Schofield, Mia et al. (2023): Aggregation of alpha-synuclein disrupts mitochondrial metabolism and induce mitophagy via cardiolipin externalization. In: *Cell death & disease* 14 (11), S. 729. DOI: 10.1038/s41419-023-06251-8.

Malhotra, Ketan; Sathappa, Murugappan; Landin, Judith S.; Johnson, Arthur E.; Alder, Nathan N. (2013): Structural changes in the mitochondrial Tim23 channel are coupled to the proton-motive force. In: *Nature structural & molecular biology* 20 (8), S. 965–972. DOI: 10.1038/nsmb.2613.

Martin, William F.; Garg, Sriram; Zimorski, Verena (2015): Endosymbiotic theories for eukaryote origin. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370 (1678), S. 20140330. DOI: 10.1098/rstb.2014.0330.

Maslanka, Roman; Zadrag-Tecza, Renata; Kwolek-Mirek, Magdalena (2020): Linkage between Carbon Metabolism, Redox Status and Cellular Physiology in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Devoid of SOD1 or SOD2 Gene. In: *Genes* 11 (7). DOI: 10.3390/genes11070780.

Mecocci, P.; MacGarvey, U.; Beal, M. F. (1994): Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. In: *Annals of neurology* 36 (5), S. 747–751. DOI: 10.1002/ana.410360510.

Meisinger, Chris; Pfannschmidt, Sylvia; Rissler, Michael; Milenkovic, Dusanka; Becker, Thomas; Stojanovski, Diana et al. (2007): The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major beta-barrel assembly pathway of mitochondria. In: *The EMBO journal* 26 (9), S. 2229–2239. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601673.

Min Zhang; Jun Shi; Li Jiang (2015): Modulation of mitochondrial membrane integrity and ROS formation by high temperature in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Electronic Journal of Biotechnology* 18 (3), S. 202–209. DOI: 10.1016/j.ejbt.2015.03.008.

Minton, A. P. (1993): Macromolecular crowding and molecular recognition. In: *Journal of molecular recognition : JMR* 6 (4), S. 211–214. DOI: 10.1002/jmr.300060410.

Mohanraj, Karthik; Wasilewski, Michal; Benincá, Cristiane; Cysewski, Dominik; Poznanski, Jaroslaw; Sakowska, Paulina et al. (2019): Inhibition of proteasome rescues a pathogenic variant of respiratory chain assembly factor COA7. In: *EMBO molecular medicine* 11 (5). DOI: 10.15252/emmm.201809561.

Moreno-Loshuertos, Raquel; Marco-Brualla, Joaquín; Meade, Patricia; Soler-Agesta, Ruth; Enriquez, José A.; Fernández-Silva, Patricio (2023): How hot can mitochondria be? Incubation at temperatures above 43 °C induces the degradation of respiratory complexes and supercomplexes in intact cells and isolated mitochondria. In: *Mitochondrion* 69, S. 83–94. DOI: 10.1016/j.mito.2023.02.002.

Morgenstern, Marcel; Peikert, Christian D.; Lübbert, Philipp; Suppanz, Ida; Klemm, Cinzia; Alka, Oliver et al. (2021): Quantitative high-confidence human mitochondrial proteome and its dynamics in cellular context. In: *Cell metabolism* 33 (12), 2464-2483.e18. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.11.001.

Morgenstern, Marcel; Stiller, Sebastian B.; Lübbert, Philipp; Peikert, Christian D.; Dannenmaier, Stefan; Drepper, Friedel et al. (2017): Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. In: *Cell reports* 19 (13), S. 2836–2852. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.06.014.

Muid, Khandaker Ashfaque; Karakaya, Hüseyin Çağlar; Koc, Ahmet (2014): Absence of superoxide dismutase activity causes nuclear DNA fragmentation during the aging process. In: *Biochemical and biophysical research communications* 444 (2), S. 260–263. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.056.

Munna, Md Sakil; Humayun, Sanjida; Noor, Rashed (2015): Influence of heat shock and osmotic stresses on the growth and viability of *Saccharomyces cerevisiae* SUBSC01. In: *BMC research notes* 8, S. 369. DOI: 10.1186/s13104-015-1355-x.

Nestelbacher, R.; Laun, P.; Breitenbach, M. (1999): Images in experimental gerontology. A senescent yeast mother cell. In: *Experimental gerontology* 34 (7), S. 895–896. DOI: 10.1016/s0531-5565(99)00053-4.

Niño-Ramírez, Víctor Alfonso; Insuasty-Cepeda, Diego Sebastián; Rivera-Monroy, Zuly Jenny; Maldonado, Mauricio (2022): Evidence of Isomerization in the Michael-Type Thiol-Maleimide Addition: Click Reaction between L-Cysteine and 6-Maleimidehexanoic Acid. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (16). DOI: 10.3390/molecules27165064.

Nowicka, Urszula; Chroscicki, Piotr; Stroobants, Karen; Sladowska, Maria; Turek, Michał; Uszczynska-Ratajczak, Barbara et al. (2021): Cytosolic

aggregation of mitochondrial proteins disrupts cellular homeostasis by stimulating the aggregation of other proteins. In: *eLife* 10. DOI: 10.7554/eLife.65484.

Olivares-Marin, Ivanna Karina; González-Hernández, Juan Carlos; Regalado-Gonzalez, Carlos; Madrigal-Perez, Luis Alberto (2018): *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (139). DOI: 10.3791/58192.

Palmer, A. M.; Burns, M. A. (1994): Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. In: *Brain research* 645 (1-2), S. 338–342. DOI: 10.1016/0006-8993(94)91670-5.

Papagiannakis, Alexandros; Niebel, Bastian; Wit, Ernst C.; Heinemann, Matthias (2017): Autonomous Metabolic Oscillations Robustly Gate the Early and Late Cell Cycle. In: *Molecular cell* 65 (2), S. 285–295. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.11.018.

Pardillo-Díaz, Ricardo; Pérez-García, Patricia; Castro, Carmen; Nunez-Abades, Pedro; Carrascal, Livia (2022): Oxidative Stress as a Potential Mechanism Underlying Membrane Hyperexcitability in Neurodegenerative Diseases. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (8). DOI: 10.3390/antiox11081511.

Peleh, Valentina; Ramesh, Ajay; Herrmann, Johannes M. (2015): Import of proteins into isolated yeast mitochondria. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1270, S. 37–50. DOI: 10.1007/978-1-4939-2309-0_3.

Pereira, M. D.; Herdeiro, R. S.; Fernandes, P. N.; Eleutherio, E. C. A.; Panek, A. D. (2003): Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. In: *Biochimica et biophysica acta* 1620 (1-3), S. 245–251. DOI: 10.1016/s0304-4165(03)00003-5.

Pfanner, N.; Müller, H. K.; Harmey, M. A.; Neupert, W. (1987): Mitochondrial protein import: involvement of the mature part of a cleavable precursor protein in the binding to receptor sites. In: *The EMBO journal* 6 (11), S. 3449–3454. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02668.x.

Pilkington, Albert W., 4th.; Schupp, Jane; Nyman, Morgan; Valentine, Stephen J.; Smith, David M.; Legleiter, Justin (2020): Acetylation of A β (40) Alters Aggregation in the Presence and Absence of Lipid Membranes. In: *ACS*

chemical neuroscience 11 (2), S. 146–161. DOI:
10.1021/acscchemneuro.9b00483.

Pletjushkina, O. Yu; Fetisova, E. K.; Lyamzaev, K. G.; Ivanova, O. Yu;
Domnina, L. V.; Vyssokikh, M. Yu et al. (2006): Hydrogen peroxide produced
inside mitochondria takes part in cell-to-cell transmission of apoptotic signal.
In: *Biochemistry. Biokhimiia* 71 (1), S. 60–67. DOI:
10.1134/s0006297906010093.

Posakony, J. W.; England, J. M.; Attardi, G. (1977): Mitochondrial growth and
division during the cell cycle in HeLa cells. In: *The Journal of cell biology* 74
(2), S. 468–491. DOI: 10.1083/jcb.74.2.468.

Pretzer, Elizabeth; Wiktorowicz, John E. (2008): Saturation fluorescence
labeling of proteins for proteomic analyses. In: *Analytical biochemistry* 374 (2),
S. 250–262. DOI: 10.1016/j.ab.2007.12.014.

Ramezani, Meraj; Wagenknecht-Wiesner, Alice; Wang, Tong; Holowka, David
A.; Eliezer, David; Baird, Barbara A. (2023): Alpha synuclein modulates
mitochondrial Ca(2+) uptake from ER during cell stimulation and under stress
conditions. In: *NPJ Parkinson's disease* 9 (1), S. 137. DOI: 10.1038/s41531-
023-00578-x.

Rangachari, Vijayaraghavan; Moore, Brenda D.; Reed, Dana Kim; Sonoda,
Leilani K.; Bridges, Alexander W.; Conboy, Erin et al. (2007): Amyloid-beta(1-
42) rapidly forms protofibrils and oligomers by distinct pathways in low
concentrations of sodium dodecylsulfate. In: *Biochemistry* 46 (43), S. 12451–
12462. DOI: 10.1021/bi701213s.

Regoes, Attila; Hehl, Adrian B. (2005): SNAP-tag mediated live cell labeling as
an alternative to GFP in anaerobic organisms. In: *BioTechniques* 39 (6), 809-
10, 812. DOI: 10.2144/000112054.

Reid, G. A.; Schatz, G. (1982): Import of proteins into mitochondria.
Extramitochondrial pools and post-translational import of mitochondrial protein
precursors in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 257 (21), S. 13062–
13067.

- Rieske, J. S.; Baum, H.; Stoner, C. D.; Lipton, S. H. (1967): On the antimycin-sensitive cleavage of complex 3 of the mitochondrial respiratory chain. In: *The Journal of biological chemistry* 242 (21), S. 4854–4866.
- Rizzuto, R.; Simpson, A. W.; Brini, M.; Pozzan, T. (1992): Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. In: *Nature* 358 (6384), S. 325–327. DOI: 10.1038/358325a0.
- Roise, D.; Theiler, F.; Horvath, S. J.; Tomich, J. M.; Richards, J. H.; Allison, D. S.; Schatz, G. (1988): Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. In: *The EMBO journal* 7 (3), S. 649–653. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb02859.x.
- Rolfe, D. F.; Brown, G. C. (1997): Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. In: *Physiological reviews* 77 (3), S. 731–758. DOI: 10.1152/physrev.1997.77.3.731.
- Ruan, Linhao; Zhou, Chuankai; Jin, Erli; Kucharavy, Andrei; Zhang, Ying; Wen, Zhihui et al. (2017): Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. In: *Nature* 543 (7645), S. 443–446. DOI: 10.1038/nature21695.
- Ruland, Laura; Sylvester, Marc; Maus, Lydia; Beckert, Hannes; Voos, Wolfgang (2025): Mitochondrial protein aggregates recruit key chaperones and are sequestered in a fission- and fusion-dependent process. In: *Journal of cell science* 138 (16). DOI: 10.1242/jcs.263680.
- Saitoh, Takashi; Igura, Mayumi; Obita, Takayuki; Ose, Toyoyuki; Kojima, Rieko; Maenaka, Katsumi et al. (2007): Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. In: *The EMBO journal* 26 (22), S. 4777–4787. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601888.
- Sakaki, Kenjiro; Tashiro, Kosuke; Kuhara, Satoru; Mihara, Katsuyoshi (2003): Response of genes associated with mitochondrial function to mild heat stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of biochemistry* 134 (3), S. 373–384. DOI: 10.1093/jb/mvg155.
- Sato, Shigeto; Furuya, Norihiko (2018): Induction of PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1759, S. 9–17. DOI: 10.1007/7651_2017_7.

Schäfer, Jasmin Adriana; Bozkurt, Süleyman; Michaelis, Jonas Benjamin; Klann, Kevin; Münch, Christian (2022): Global mitochondrial protein import proteomics reveal distinct regulation by translation and translocation machinery. In: *Molecular cell* 82 (2), 435-446.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.11.004.

Schlagowski, Anna M.; Knöringer, Katharina; Morlot, Sandrine; Sánchez Vicente, Ana; Flohr, Tamara; Krämer, Lena et al. (2021): Increased levels of mitochondrial import factor Mia40 prevent the aggregation of polyQ proteins in the cytosol. In: *The EMBO journal* 40 (16), e107913. DOI: 10.15252/embj.2021107913.

Schneider, Lonnie; Giordano, Samantha; Zelickson, Blake R.; S Johnson, Michelle; A Benavides, Gloria; Ouyang, Xiaosen et al. (2011): Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. In: *Free radical biology & medicine* 51 (11), S. 2007–2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.030.

Schützmann, Marie P.; Hasecke, Filip; Bachmann, Sarah; Zielinski, Mara; Hänsch, Sebastian; Schröder, Gunnar F. et al. (2021): Endo-lysosomal A β concentration and pH trigger formation of A β oligomers that potently induce Tau missorting. In: *Nature communications* 12 (1), S. 4634. DOI: 10.1038/s41467-021-24900-4.

Shah, Ankit; Dobrovolskaia, Marina A. (2024): Detection of Induction of Mitochondrial Oxidative Stress by Nanoparticles in T Cells Using MitoSOX Red Dye. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2789, S. 145–151. DOI: 10.1007/978-1-0716-3786-9_15.

Shen, C. L.; Murphy, R. M. (1995): Solvent effects on self-assembly of beta-amyloid peptide. In: *Biophysical journal* 69 (2), S. 640–651. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)79940-4.

Shigemitsu, Yoshiki; Iwaya, Naoko; Goda, Natsuko; Matsuzaki, Mizuki; Tenno, Takeshi; Narita, Akihiro et al. (2016): Nuclear magnetic resonance evidence for the dimer formation of beta amyloid peptide 1-42 in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. In: *Analytical biochemistry* 498, S. 59–67. DOI: 10.1016/j.ab.2015.12.021.

- Shimohama, S.; Tanino, H.; Fujimoto, S. (1999): Changes in caspase expression in Alzheimer's disease: comparison with development and aging. In: *Biochemical and biophysical research communications* 256 (2), S. 381–384. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0344.
- Shipley, Mackenzie M.; Mangold, Colleen A.; Szpara, Moriah L. (2016): Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (108), S. 53193. DOI: 10.3791/53193.
- Siegers, K.; Waldmann, T.; Leroux, M. R.; Grein, K.; Shevchenko, A.; Schiebel, E.; Hartl, F. U. (1999): Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. In: *The EMBO journal* 18 (1), S. 75–84. DOI: 10.1093/emboj/18.1.75.
- Singh, Anju; Kukreti, Ritushree; Saso, Luciano; Kukreti, Shrikant (2019): Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (8). DOI: 10.3390/molecules24081583.
- Singh, Mayank; Sharma, Himani; Singh, Neeta (2007): Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. In: *Mitochondrion* 7 (6), S. 367–373. DOI: 10.1016/j.mito.2007.07.003.
- Siwiak, Marlena; Zielenkiewicz, Piotr (2013): Transimulation - protein biosynthesis web service. In: *PloS one* 8 (9), e73943. DOI: 10.1371/journal.pone.0073943.
- Sorger, P. K.; Lewis, M. J.; Pelham, H. R. (1987): Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. In: *Nature* 329 (6134), S. 81–84. DOI: 10.1038/329081a0.
- Strub, Andreas; Röttgers, Karin; Voos, Wolfgang (2002): The Hsp70 peptide-binding domain determines the interaction of the ATPase domain with Tim44 in mitochondria. In: *The EMBO journal* 21 (11), S. 2626–2635. DOI: 10.1093/emboj/21.11.2626.
- Su, ZhangFei; Ran, XueQin; Leitch, J. Jay; Schwan, Adrian L.; Faragher, Robert; Lipkowski, Jacek (2019): How Valinomycin Ionophores Enter and Transport K(+) across Model Lipid Bilayer Membranes. In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 35 (51), S. 16935–16943. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b03064.

Sultana, Rukhsana; Boyd-Kimball, Debra; Poon, H. Fai; Cai, Jian; Pierce, William M.; Klein, Jon B. et al. (2006): Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. In: *Neurobiology of aging* 27 (11), S. 1564–1576. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.021.

Sun, Linfeng; Zhou, Rui; Yang, Guanghui; Shi, Yigong (2017): Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (4), E476-E485. DOI: 10.1073/pnas.1618657114.

Tang, Lei (2019): Investigating heterogeneity in HeLa cells. In: *Nature methods* 16 (4), S. 281. DOI: 10.1038/s41592-019-0375-1.

Thal, Dietmar Rudolf; Walter, Jochen; Saido, Takaomi C.; Fändrich, Marcus (2015): Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. In: *Acta neuropathologica* 129 (2), S. 167–182. DOI: 10.1007/s00401-014-1375-y.

Tipping, Kevin W.; Karamanos, Theodoros K.; Jakhria, Toral; Iadanza, Matthew G.; Goodchild, Sophia C.; Tuma, Roman et al. (2015): pH-induced molecular shedding drives the formation of amyloid fibril-derived oligomers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (18), S. 5691–5696. DOI: 10.1073/pnas.1423174112.

Tsao, Y. S.; Condon, R.; Schaefer, E.; Lio, P.; Liu, Z. (2001): Development and improvement of a serum-free suspension process for the production of recombinant adenoviral vectors using HEK293 cells. In: *Cytotechnology* 37 (3), S. 189–198. DOI: 10.1023/A:1020555310558.

Tyagarajan, Kamala; Pretzer, Elizabeth; Wiktorowicz, John E. (2003): Thiol-reactive dyes for fluorescence labeling of proteomic samples. In: *Electrophoresis* 24 (14), S. 2348–2358. DOI: 10.1002/elps.200305478.

Underhill, Michèle F.; Smales, C. Mark (2007): The cold-shock response in mammalian cells: investigating the HeLa cell cold-shock proteome. In: *Cytotechnology* 53 (1-3), S. 47–53. DOI: 10.1007/s10616-007-9048-5.

- Ungermann, C.; Neupert, W.; Cyr, D. M. (1994): The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. In: *Science (New York, N.Y.)* 266 (5188), S. 1250–1253. DOI: 10.1126/science.7973708.
- van den Berg, B.; Ellis, R. J.; Dobson, C. M. (1999): Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. In: *The EMBO journal* 18 (24), S. 6927–6933. DOI: 10.1093/emboj/18.24.6927.
- Vinogradov, A. D.; Grivennikova, V. G. (2005): Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 70 (2), S. 120–127. DOI: 10.1007/s10541-005-0090-7.
- Wang, Chengshan; Zhou, Yiqun; Ewuola, Christopher; Akinleye, Toyin; Hasegawa, Takeshi; Leblanc, Roger M. (2022): Determine both the conformation and orientation of a specific residue in α -synuclein(61-95) even in monolayer by (13)C isotopic label and p-polarized multiple-angle incidence resolution spectrometry (pMAIRS). In: *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 38 (7), S. 935–940. DOI: 10.1007/s44211-022-00128-0.
- Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. (1927): THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. In: *The Journal of general physiology* 8 (6), S. 519–530. DOI: 10.1085/jgp.8.6.519.
- Warner, J. R. (1999): The economics of ribosome biosynthesis in yeast. In: *Trends in biochemical sciences* 24 (11), S. 437–440. DOI: 10.1016/s0968-0004(99)01460-7.
- Weiss, H.; Friedrich, T.; Hofhaus, G.; Preis, D. (1991): The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. In: *European journal of biochemistry* 197 (3), S. 563–576. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb15945.x.
- Wilcox, Kyle C.; Lacor, Pascale N.; Pitt, Jason; Klein, William L. (2011): A β oligomer-induced synapse degeneration in Alzheimer's disease. In: *Cellular and molecular neurobiology* 31 (6), S. 939–948. DOI: 10.1007/s10571-011-9691-4.
- Wilkening, Anne; Rüb, Cornelia; Sylvester, Marc; Voos, Wolfgang (2018): Analysis of heat-induced protein aggregation in human mitochondria. In: *The*

Journal of biological chemistry 293 (29), S. 11537–11552. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002122.

Witte, C.; Jensen, R. E.; Yaffe, M. P.; Schatz, G. (1988): MAS1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease. In: *The EMBO journal* 7 (5), S. 1439–1447. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb02961.x.

Witter, A.; Tuppy, H. (1960): N-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)maleimide: a coloured sulfhydryl reagent. Isolation and investigation of cysteine-containing peptides from human and bovine serum albumin. In: *Biochimica et biophysica acta* 45, S. 429–442. DOI: 10.1016/0006-3002(60)91480-3.

Wolf, S. F.; Schlessinger, D. (1977): Nuclear metabolism of ribosomal RNA in growing, methionine-limited, and ethionine-treated HeLa cells. In: *Biochemistry* 16 (12), S. 2783–2791. DOI: 10.1021/bi00631a031.

Wright, G.; Terada, K.; Yano, M.; Sergeev, I.; Mori, M. (2001): Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. In: *Experimental cell research* 263 (1), S. 107–117. DOI: 10.1006/excr.2000.5096.

Young, Jason C.; Agashe, Vishwas R.; Siegers, Katja; Hartl, F. Ulrich (2004): Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (10), S. 781–791. DOI: 10.1038/nrm1492.

Young, Jason C.; Hoogenraad, Nicholas J.; Hartl, F. Ulrich (2003): Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. In: *Cell* 112 (1), S. 41–50. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)01250-3.

Zyśk, Marlena; Beretta, Chiara; Naia, Luana; Dakhel, Abdulkhalek; Påvénius, Linnea; Brismar, Hjalmar et al. (2023): Amyloid- β accumulation in human astrocytes induces mitochondrial disruption and changed energy metabolism. In: *Journal of neuroinflammation* 20 (1), S. 43. DOI: 10.1186/s12974-023-02722-z.