

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT
KAISERSLAUTERN**

Ema19- ein ER-Protein mit Relevanz für mitochondriale Proteine

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation,

vorgelegt von

M.Sc. Janina Laborenz

Prüfungskommission

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Johannes M. Herrmann
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Martin van der Laan
- Vorsitzender: Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus

Inhalt

Zusammenfassung.....	i
Summary	ii
1. Einleitung	1
1.1 Mitochondrien	1
1.2 Endoplasmatisches Retikulum.....	3
1.3 Proteintransport in verschiedene Organellen.....	4
1.3.1 Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum.....	4
1.3.2 Proteintransport in Mitochondrien	6
1.3.3 Der Transport mitochondrialer Proteine im Zytosol	10
1.3.4 Ema19.....	13
1.4 Zielsetzung	15
2. Ergebnisteil.....	17
2.1 Ema19 ist ein konserviertes Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums	17
2.2 Die Deletion von <i>EMA19</i> führt nicht zu Veränderung in der Lipidzusammensetzung	20
2.3 Die richtige Lokalisation des Fusionsproteins Oxa1-Ura3 ist abhängig von Ema19	22
2.4 Ema19 zeigt keinen Einfluss auf das Wachstum mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen	25
2.5 Oxa1 ist mislokalisiert in Δ ema19.....	27
2.5.1 Die unprozessierte Form von Oxa1 zeigt die gleichen Proteinlevel	27
2.5.2 In Δ ema19 befindet sich mehr Oxa1 am ER.....	28
2.6 Identifizierung neuer Interaktionspartner durch Massenspektrometrie	32
2.7 Der Import mitochondrialer Proteine wird von Ema19 nicht beeinflusst.....	34
2.7.1 Ein <i>in vitro</i> Import in isolierte Mitochondrien zeigt keinen Unterschied in Δ ema19....	34
2.7.2 Die Deletion von <i>EMA19</i> zeigt beim Import in semi-intakte Zellen keinen direkten Einfluss	35
2.8 Erv1 wird langsamer abgebaut in Δ ema19.....	41
2.8.1 Die Proteinmenge von Erv1 ist Δ ema19 höher als in WT-Zellen.....	41
2.8.2 Ema19 ist beim Abbau von Erv1 beteiligt	42
2.9 Δ N-Oxa1 ist stabiler in Δ ema19.....	43
3. Diskussion	45
3.1 Proteintransport in der Zelle.....	45
3.1.1 „Not all those who wander are lost“ - J.R.R. Tolkien.....	45
3.1.2 Das Ende einer Reise oder irgendwas mit Abbau	48
3.1.3 Die Proteinfaltung - Es ist nicht immer der direkte Weg	49
3.2 Ema19- ein ER-Protein mit Relevanz für mitochondriale Protein	51

4.	Ausblick.....	53
5.	Material und Methoden	55
5.1	Medien.....	55
5.1.1	<i>YP-Medium</i>	55
5.1.2	<i>YP-Platten</i>	55
5.1.3	<i>5-fach S-Medium</i>	55
5.1.4	<i>S-Medium</i>	55
5.1.5	<i>5-fach SLac-Medium</i>	55
5.1.6	<i>SLac-Medium</i>	55
5.1.7	<i>Dropout-Mix</i>	56
5.1.8	<i>S-Platten</i>	56
5.1.9	<i>ClonNAT-Platten</i>	56
5.1.10	<i>Geneticin (G418)-Platten</i>	56
5.1.11	<i>LB-Medium</i>	57
5.1.12	<i>LBamp-Medium</i>	57
5.1.13	<i>LBamp-Platten</i>	57
5.2	Molekularbiologische Methoden.....	57
5.2.1	<i>Polymerase Kettenreaktion (PCR Polymerase chain reaction)</i>	57
5.2.2	<i>Präparative Gelelektrophorese</i>	58
5.2.3	<i>Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel</i>	59
5.2.4	<i>Transformation von Saccharomyces cerevisiae</i>	59
5.2.5	<i>Transformation von Escherichia coli</i>	60
5.3	Zellbiologische Methoden.....	60
5.3.1	<i>Verwendete Saccharomyces cerevisiae- Stämme</i>	60
5.3.2	<i>Anzucht von Saccharomyces cerevisiae-Stämmen</i>	62
5.3.3	<i>Wachstumskurven</i>	62
5.3.4	<i>Tüpfeltest</i>	62
5.3.5	<i>Split-GFP Versuch</i>	63
5.3.6	<i>Mitochondrienisolation aus S. cerevisiae</i>	63
5.3.7	<i>Präparation von Semi-intakten Zellen aus S. cerevisiae</i>	64
5.4	Proteinbiochemische Methoden	64
5.4.1	<i>SDS-Gelelektrophorese</i>	64
5.4.2	<i>Zellausschluss</i>	65
5.4.3	<i>Westernblot</i>	65
5.4.4	<i>Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembran</i>	66

5.4.5	<i>Verwendete Antikörper</i>	66
5.4.6	<i>Pulse Chase</i>	66
5.4.7	<i>TCA-Fällung</i>	67
5.4.8	<i>Immunopräzipitation mit anschließender Massenspektrometrie</i>	68
5.4.9	<i>Synthese ³⁵S-markierter Proteine in vitro</i>	69
5.4.10	<i>In vitro Import radioaktiv markierter Lysate in isolierte Mitochondrien von S. cerevisiae</i>	69
5.4.11	<i>In vitro Import radioaktiv markierter Lysate in semi-intakte Zellen von S. cerevisiae</i> ..	69
5.4.12	<i>Autoradiographie</i>	70
	Referenzen	71
	Abkürzungen	79
	Danksagung	83
	Curriculum vitae	87
	Publikationen	88
	Eidesstattliche Erklärung	89

Zusammenfassung

Das Zytosol ist der Hauptort der Proteinbiosynthese. Während viele Proteine im Zytosol bleiben, muss ein Großteil zu unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle transportiert werden. Die korrekte Lokalisation der Polypeptide ist essentiell für die Homöostase der Zelle. Werden Proteine fehlgeleitet oder gar nicht transportiert, können diese in der Zelle aggregieren, was zu Stress bis hin zum Zelltod führen kann. Obwohl der Import mitochondrialer Proteine über die verschiedenen Membranen der Mitochondrien sehr gut erforscht ist, war lange unklar, wie diese Proteine zu ihrem Zielorganell transportiert werden. In den letzten Jahren wurde diese Wissenslücke teilweise gefüllt, neue zytosolische Faktoren wurden identifiziert und alternative Transportwege aufgedeckt.

Eine solche Entdeckung war der Transportweg namens ER-SURF. Hier werden mitochondriale Proteine an die Membran des endoplasmatischen Retikulums transportiert, wo sie vom Co-Chaperon Djp1 gebunden und zu den Mitochondrien gebracht werden. Im Zuge der Studie zu ER-SURF wurde ein Protein identifiziert, das bisher noch uncharakterisiert war. Dieses Protein nannten wir Ema19 („*Efficient Mitochondria Targeting-Associated Protein 19*“). Es ist ein Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums, das vier Transmembrandomänen besitzt.

Ziel dieses Projekts war es, die Funktion von Ema19 für die Zelle zu analysieren. Durch ein Alignment konnte ich feststellen, dass das Protein bis in den Menschen hoch konserviert ist, was auf eine wichtige Rolle für die Zelle schließen ließ. Da Ema19 im Zusammenhang mit dem ER-SURF Transportweg identifiziert wurde, habe ich zunächst eine mögliche Rolle für den Transport und Import mitochondrialer Proteine in unterschiedlichen Experimenten getestet. Im Laufe der Arbeit wurde jedoch deutlich, dass Ema19 keine direkte Rolle beim Import von mitochondrialen Proteinen spielt. Allerdings konnte ich durch mehrere unabhängige Versuche einen Zusammenhang mit der Lokalisation und dem Abbau mitochondrialer Proteine feststellen. Fehlt Ema19 in der Zelle, ist vor allem das mitochondriale Protein Oxa1 mehr am endoplasmatischen Retikulum vorzufinden. Ebenso konnte ich feststellen, dass Oxa1, sowie das Intermembranraumprotein Erv1, langsamer abgebaut werden als in Wildtypzellen. Diese Experimente geben erste Hinweise auf eine mögliche Rolle von Ema19 für den Abbau mitochondrialer Proteine an der ER-Membran. Nichtsdestotrotz bleiben noch viele Fragen offen und weitere Versuche sind nötig, um diese Hypothese weiter zu unterstützen.

Summary

The cytosol is the main compartment of protein synthesis. While many proteins stay in the cytosol, the vast majority have to be transported to different organelles. The correct localization of all these proteins is important for the homeostasis of the cell. When proteins get mistargeted to other organelles or stay in the cytosol, it is likely for them to build aggregates, which can lead to stress or eventually to cell death.

Import of mitochondrial proteins into mitochondria is well studied, while we just know little about the transport of these proteins to their organelle. In recent years the black box of the mitochondrial protein transport to the destined membrane has been studied in more detail, where new factors involved in the targeting have been identified and novel alternative targeting pathways have been found.

One surprising alternative pathway is called ER-SURF, in which mitochondrial proteins are first transported to the surface of the endoplasmic reticulum. Here, they can be bound by the co-chaperone Djp1 which targets them to mitochondria. The study which characterized ER-SURF, also identified one protein completely uncharacterized, which we named Ema19 („*Efficient Mitochondria Targeting–Associated Protein 19*”). Ema19 is an ER protein with four predicted transmembrane domains.

The aim of this project was to characterize the function of Ema19. A first alignment showed that this protein is highly conserved from fungi to mammals, hinting to an important role for the cell. Since Ema19 was identified as part of ER-SURF, we supposed that there is a connection between Ema19 and the transport of mitochondrial proteins. Therefore I first tested a role for Ema19 in the targeting and import of mitochondrial precursor proteins. However, I could show that there is not a direct role of this protein in the import into mitochondria. Surprisingly, we could see that Ema19 plays a role in localization and degradation of precursor proteins at the endoplasmic reticulum. In an *EMA19* deletion strain, the mitochondrial insertase Oxa1 shows an enriched localization at the ER membrane. In addition Oxa1 and Erv1, a protein of the mitochondrial intermembrane space, show a slower degradation rate in the mutant compared to a wild type. These experiments are first hints to a possible role of Ema19 in the degradation of mitochondrial precursor proteins at the ER membrane. However, there are still many open questions which need further experiments to confirm this hypothesis.

1. Einleitung

Zellen sind die kleinsten lebenden Bausteine eines jeden Organismus. Eukaryotische Zellen besitzen verschiedene Organellen, wie zum Beispiel den Nukleus, das endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat und die Mitochondrien. Der Vorteil einer Einteilung in verschiedene Organellen ist, dass in diesen Kompartimenten gleichzeitig unterschiedliche Prozesse ablaufen können, wie zum Beispiel die Zellatmung in den Mitochondrien.

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien werden auch „Kraftwerke der Zelle“ genannt. Die Hauptaufgabe dieser Organellen ist die Energiegewinnung mittels Zellatmung und des dadurch entstehenden Energiebaustoffes Adenosintriphosphat (ATP). Mitochondrien übernehmen außerdem eine Vielzahl anderer wichtiger Funktionen, wie zum Beispiel die Regulation des Calciumhaushaltes der Zelle, Apoptose oder die Aminosäuresynthese¹⁻⁵.

Laut Endosymbiontentheorie entstanden Mitochondrien durch Fusion eines Archaeobakteriums mit einem Eubakterium⁶. Dies ist auch heute noch an der Struktur der Mitochondrien erkennbar, aber auch daran, dass sie ein eigenes Genom mit Transkriptions- und Translationsmaschinerie besitzen. Die äußere Membran grenzt die Mitochondrien vom Zytosol ab. Große Proteinkomplexe in dieser Membran ermöglichen den Import von im Zytosol gebildeten Proteinen, sowie den Austausch von Ionen und Metaboliten. Des Weiteren bilden Proteinkomplexe hier Kontaktstellen zu anderen Organellen, wie dem ER und den Peroxisomen. Zwischen der äußeren und der inneren Membran liegt der Intermembranraum. Hier finden wichtige Redoxprozesse zur Stabilisierung der kleinen Proteine im Intermembranraum und der Regulierung der Atmungskette statt. Die Innenmembran formt Invaginationen, die Cristae genannt werden. Hier befindet sich die Atmungskette, die den Elektronentransfer zur Zellatmung und Energiegewinnung gewährleistet. Im Inneren befindet sich die Matrix, der Ort, an dem der Großteil aller Prozesse stattfindet. Hier arbeiten Enzyme des Krebszyklus, Aminosäuren werden hergestellt und Lipide abgebaut. In der Matrix werden außerdem mitochondrial kodierte Proteine synthetisiert. Die hier zu findende mitochondriale DNA kodiert für 13 Proteine in Menschen und 8 Proteine in Hefe. In Menschen werden ausschließlich Untereinheiten der Atmungskette hergestellt, in Hefe wird zusätzlich ein ribosomales Protein kodiert⁷⁻⁹.

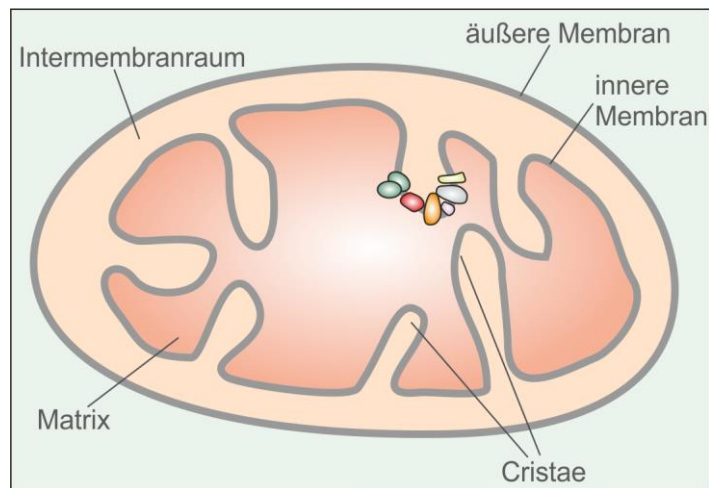


Abb. 1: Schematische Zeichnung eines Mitochondriums. Gekennzeichnet sind die äußere und innere Membran und ihre Cristae, der Intermembranraum, sowie die Matrix. In den unterschiedlichen Kompartimenten der Mitochondrien können gleichzeitig mehrere Prozesse ablaufen, die Atmungskette befindet sich in den Cristae der inneren Membran^{8,10}.

All diese Funktionen benötigen allerdings eine enge Kommunikation mit den Kompartimenten außerhalb der Mitochondrien¹¹. Ein Beispiel dafür sind die sogenannten „contact sites“ zwischen Mitochondrien und ER. Diese Kontaktstellen sorgen dafür, dass ein ständiger Austausch von Calcium zwischen den Organellen stattfinden kann¹². Auch Lipide können so von einem Organell an das nächste abgegeben werden¹³.

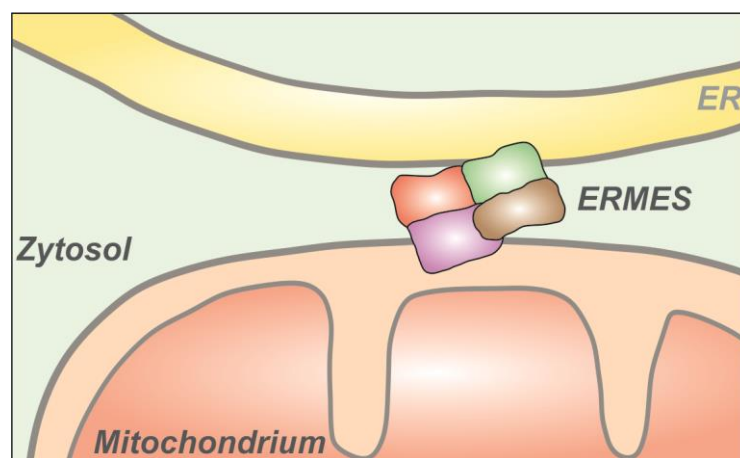


Abb. 2: Schematische Darstellung der Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum. Alle Organellen stehen immer in Kontakt zueinander, um so einen ständigen Austausch von chemischen Stoffen, Proteinen oder Lipiden gewährleisten zu können¹⁴.

1.2 Endoplasmatisches Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum ist eines der größten Organellen in der Zelle. Es erfüllt eine Vielzahl an Funktionen wie die Proteinsynthese, -faltung und -sortierung, sowie Lipidmetabolismus. Diese unterschiedlichen Aufgaben finden in verschiedenen Bereichen des ERs statt. Seine röhrenähnliche Form besteht aus der ER-Membran und dem ER-Lumen und erstreckt sich durch die ganze Zelle. Diese Verzweigung wird auch als peripheres ER bezeichnet. Ein anderer Teil ummantelt den Zellkern, der somit vom Zytosol getrennt wird. Dieser Bereich des endoplasmatischen Retikulums wird Kernhülle genannt^{15,16}.

Die Hauptaufgabe des ER ist die Synthese, Faltung und posttranslationale Modifikationen von Proteinen und deren Weitertransport an ihren Zielort. Das ER bildet zusammen mit dem Golgi-Apparat den sekretorischen Weg, auf dem viele Proteine ihr Ziel erreichen, wie etwa die Plasmamembran. Aufgrund der vielen Ribosomen, die die Proteine synthetisieren und auf der ER-Membran sitzen, wird dieser Teil auch als rauhes ER bezeichnet. Das glatte ER wiederum braucht die Ribosomen nicht. Das glatte ER fungiert als Kalziumspeicher, außerdem findet die Lipidsynthese hier statt¹⁷.

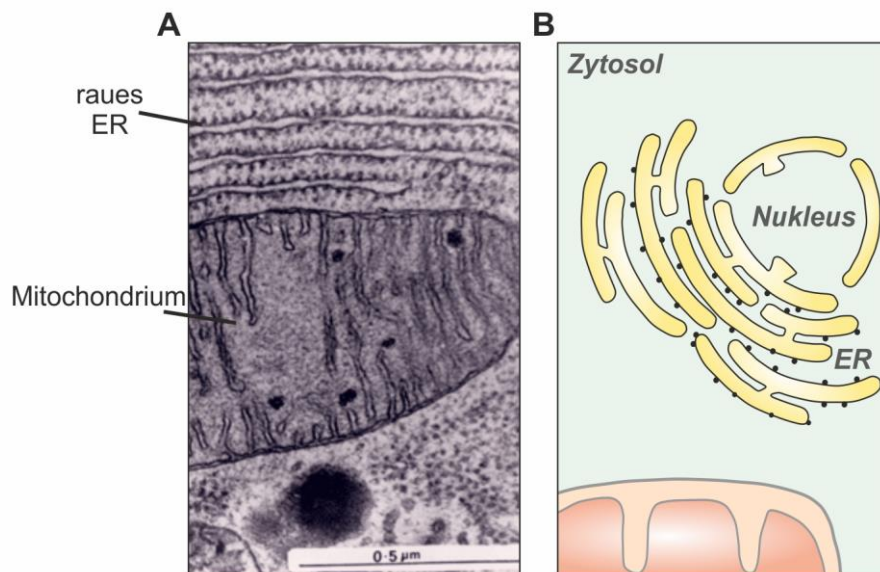


Abb. 3: Das endoplasmatische Retikulum. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondriums, umschlossen von rauem endoplasmatischem Retikulum. (B) Schematische Darstellung eines endoplasmatischen Retikulums. Es umgibt den Nucleus, der somit vom Zytosol getrennt wird und verzweigt sich dann durch die ganze Zelle. Sitzen Ribosomen am direkt am ER, wird dieses als rauhes ER bezeichnet. Ein endoplasmatisches Retikulum ohne Ribosomen nennt man glattes ER¹⁷. https://www.histology.leeds.ac.uk/cell/cell_organelles.php, Stand: 02.04.2020

Da im ER viele Proteine gefaltet und modifiziert werden, ist die Erkennung von fehlgefalteten Proteinen wichtig für die Erhaltung der Homöostase. Dies wird durch die Stressantwort des ER, der sogenannten UPR („*Unfolded Protein Response*“) gewährleistet. Wenn viele Proteine falsch gefaltet werden oder aggregieren, kommt es zur UPR. Dabei wird in Hefe das Protein Ire1 aktiviert. Ire1 spleißt ein Intron in der mRNA von Hac1. Dadurch kann die mRNA

translatiert werden und das Produkt Hac1, ein Transkriptionsfaktor, in den Nukleus entlassen werden, wo Gene wie beispielsweise ER-Chaperone, Komponenten der Proteinbiosynthese und Faktoren des Qualitätskontrollsystems der Zelle transkribiert werden. Diese Proteine helfen dann, die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER aufzulösen¹⁶⁻¹⁸.

1.3 Proteintransport in verschiedene Organellen

Das Zytosol ist der Hauptort der Proteinbiosynthese. Während viele Proteine im Zytosol bleiben, muss ein Großteil zu unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle transportiert werden. Die korrekte Lokalisation der Polypeptide ist essentiell für die Homöostase der Zelle. Werden Proteine fehlgeleitet oder gar nicht transportiert, können diese in der Zelle aggregieren, was zu Stress bis hin zum Tod führen kann. Um die korrekte Sortierung der Proteine zu gewährleisten, besitzen diese sogenannte Zielsequenzen, welche spezifisch für den Zielort sind^{19,20}.

1.3.1 Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum

Eine der Hauptfunktionen des ERs ist die Faltung und Sortierung von Proteinen. Über ein Drittel aller Proteine werden über das ER transportiert. Genauso wie Mitochondrien, besitzen sie eine Signalsequenz, die ausschlaggebend für ihre Translokation ist²¹.

Proteine können in das ER über zwei Wege transportiert werden: co- oder post-translational.

Bei der co-translationalen Translokation wird das Protein noch während der Synthese importiert. Das so genannte SRP („*Signal Recognition Particle*“) bindet an die Ribosomen und an hydrophobe Aminosäuren und die Signalsequenz des Proteins, das gerade synthetisiert wird. Das SRP bringt Ribosom und Polypeptid zum ER, wo es vom SRP-Rezeptor gebunden wird. Unter Energieverbrauch durch die Spaltung von GTP zu GDP kommt es zu einer Konformationsänderung des SRP-Rezeptors und damit zur Freisetzung des SRPs. SRP kann nun ein neues Ribosom binden²¹⁻²³.

Hat das Protein die ER-Membran erreicht, muss es im nächsten Schritt in das ER-Lumen importiert oder in die Membran integriert werden. Am bekanntesten ist dabei der Sec61-Komplex. Je nachdem, welches Protein importiert werden soll, binden unterschiedliche Proteine an Sec61. Dabei bildet Sec61 jedoch immer die Pore, durch die das Protein importiert werden kann²⁴. Durch die Porenbildung entsteht in der ER-Membran eine wässrige Phase, wodurch die Proteine leichter in das ER-Lumen gelangen können. Wird ein Membranprotein mithilfe des SRP an das Sec61-Translocon gebracht, öffnet sich die Pore zu einer Seite der Lipiddoppelschicht und das Protein kann in die Membran integriert werden^{23,25,26}.

Während Membran- oder eher hydrophobe Proteine meist co-translational importiert werden, werden viele lösliche Proteine dagegen post-translational transportiert. Hierbei wird das Protein zuerst vollständig synthetisiert, bevor es dann zum ER transportiert und importiert wird. Dieser Weg ist SRP-unabhängig. Das Polypeptid im Zytosol bindet an den Sec61-Kanal, der hier an den Sec62/63-Komplex gebunden ist²⁷. Die zytosolischen Chaperone lösen sich dann vom Polypeptid und es kann ins ER-Lumen importiert werden. Dieser Prozess ist ähnlich dem des Imports in die mitochondriale Matrix. Nach dem Prinzip der Brown'schen Ratsche wird das ungefaltete Protein durch das Binden des Hsp70-Chaperons BiP („*Binding Protein*“), Kar2 in *S. cerevisiae*, in das Lumen gezogen und ein Rückgleiten in das Zytosol verhindert. Bindet BiP an Sec63, findet die Hydrolyse von ATP statt, wodurch BiP seine Konformation ändert und sich die Peptidbindedomäne um das zu importierende Polypeptid schließt. So wird das Protein immer weiter in das ER-Lumen gezogen, wo weitere BiP daran binden und es letztendlich komplett importiert wird. Durch den Austausch von ADP zu ATP wird die Peptidbindedomäne von BiP wieder geöffnet und das Polypeptid liegt frei im Lumen vor^{9,21,22,26,28}.

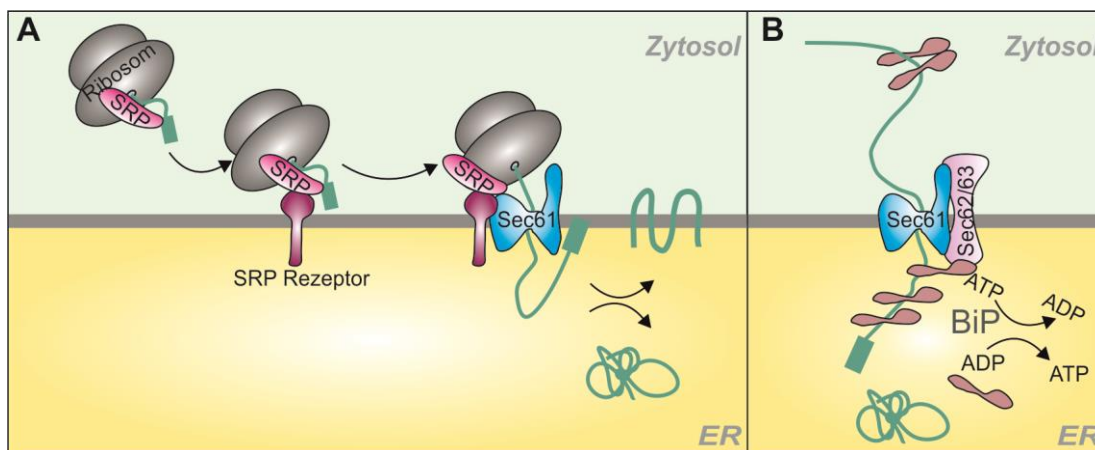


Abb. 4: Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum. (A) Der co-translationalen Import. Das SRP bindet während der Proteinsynthese an das Ribosom und bringt es zur ER-Membran. Dort wird das SRP von seinem Rezeptor gebunden. Das Protein, das gerade synthetisiert wird, wird über das Sec61-Translocon entweder in das ER-Lumen geschleust oder in die ER-Membran integriert. (B) Beim post-translationalen Import wird das Protein zuerst im Zytosol synthetisiert. Der an den Sec62/63 gebundene Sec61 dient als Importkanal, wo das Protein nach dem Modell der Brown'schen Ratsche ins ER-Lumen gezogen wird. Das Chaperon BiP ist dabei ein entscheidender Faktor. Durch ATP-Hydrolyse bindet es das Polypeptid und zieht es in das Lumen. Der Austausch von ADP zu ATP gibt das Protein letztendlich frei²². Bearbeitet aus Rapoport (2007).

Neben dem co- und post-translationalen Import in das ER, finden noch weitere Translokationen statt. Einer davon ist der GET- („*Guided-Entry Of Tail-Anchored Protein Insertion*“)-Transportweg. Hier werden tail-anchored Proteine, also Proteine, die über eine Transmembrandomäne in der Membran verankert sind, vom zytosolischen Protein des GET-Systems, Get3, an das ER gebracht^{29,30}. Der Get3-Polypeptidkomplex wird dann vom Membranprotein Get2 gebunden, sodass er zu Get1 gelangt. Get1 entlässt das tail-anchored Protein dann ATP-abhängig in die Membran³¹.

1.3.2 Proteintransport in Mitochondrien

Mehr als 1000 mitochondriale Proteine sind nuklear kodiert und werden im Zytosol als Vorstufenproteine translatiert. Daher müssen sie zuerst in die Mitochondrien transportiert werden, um ihre eigentliche Aufgabe erfüllen zu können. Abhängig von ihrem Zielort in den Mitochondrien besitzen diese Proteine bestimmte Sequenzen, die entscheidend für den Import sind. Die sogenannte Mitochondriale Targeting Sequenz (MTS) ist die häufigste Form. Sie bildet eine amphipatische Helix und ist bei den meisten Matrix- und Innenmembranproteinen am N-Terminus zu finden. Diese Proteine werden durch die Außenmembran über den TOM (*Translocase of the Outer Membrane*)-Komplex und durch die Innenmembran über den TIM23 (*Translocase of the Inner Membrane*)-Komplex importiert^{32,33}.

Sogenannte Carrier-Proteine besitzen keine klassische MTS. Stattdessen befinden sich entlang des Polypeptids mehrere interne Sequenzen, über die sie an den TOM-Komplex binden können. Nach dem Transport durch die Außenmembran, werden sie in der Innenmembran vom TIM22-Komplex erkannt und weitergeleitet^{32,34}.

Proteine des Intermembranraumes sind meist relativ klein und besitzen spezielle Cysteinmotive. Sie gelangen über den TOM-Komplex in den Intermembranraum, wo sie von der Oxireduktase Mia40 gebunden und gefaltet werden^{4,32}.

1.3.2.1 Proteinimport über die äußere Membran

Fast alle mitochondrialen Proteine werden über den TOM-Komplex in die Mitochondrien importiert. Dabei werden sie von den Rezeptoren des Komplexes, Tom20 und Tom70, aufgenommen und dann zur Pore, Tom40 gebracht. Tom20 und Tom22 binden Proteine mit einer klassischen N-terminalen MTS, sowie β -barrel Proteine. Tom70 dagegen bindet zusätzlich an Signalsequenzen von Carrier- und anderen Innenmembranproteinen, sowie an interne MTS-ähnliche Sequenzen von Matrixproteinen. Zudem können verschiedene Chaperone an Tom70 binden, um so das zu importierende Protein an seiner verfrühten Faltung zu hindern, die den Import durch die enge TOM-Pore verhindern würde^{35,36}.

Nach der Bindung an die Rezeptoren werden die Proteine an Tom22 weitergegeben, das an die positiven Reste bindet. Mithilfe der kleinen Tom-Proteine, Tom5, Tom6 und Tom7, gelangen die Vorstufenproteine schließlich zu Tom40. Durch binden an die IMS-Domäne von Tom22 werden die Proteine letztendlich in die Mitochondrien gebracht^{1,32,33}.

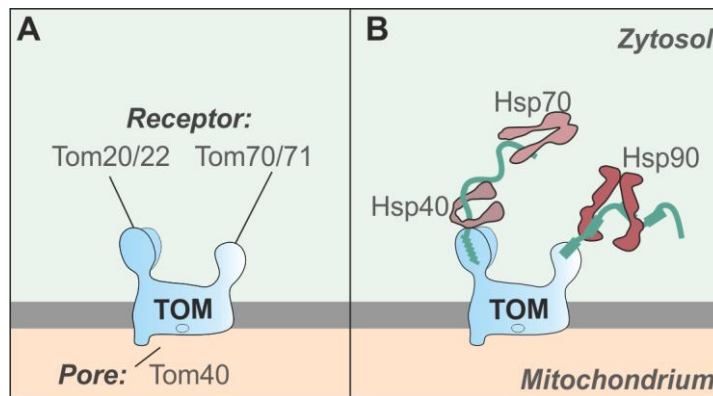


Abb. 5: Der Import von mitochondrialen Proteinen erfolgt über den TOM-Komplex. Dabei fungiert Tom20/22 als Rezeptor für Matrixproteine mit N-Terminaler MTS, während Tom70 jene Proteine bindet, die interne Signalsequenzen besitzen. Durch die Pore des Komplexes, Tom40, gelangen die Proteine schließlich in die Mitochondrien³⁶. Abbildung überarbeitet aus Hansen *et al.* (2019).

1.3.2.2 Proteinimport über die Innenmembran in die Matrix

Proteine, deren Zielort die Matrix ist, binden an den TIM23-Komplex. Die Hauptkomponenten dieses Komplexes sind Tim50, Tim23 und Tim17. Tim50 fungiert dabei als Rezeptor und bindet an die MTS des zu importierenden Proteins. Tim50, zusammen mit dem N-Terminus von Tim23, übergibt das Protein dann an die Pore des TIM23-Komplexes. Diese Pore wird durch die zwei Membranproteine Tim23 und Tim17 gebildet und erlaubt den Einlass des Proteins in die Matrix^{32,33,37-39}.

In der Innenmembran ist auch die Atmungskette zu finden. Diese pumpt Protonen von der Matrix in den Intermembranraum. Somit wird der Intermembranraum positiv geladen, während die Matrix negativ geladen wird. Aufgrund der positiv geladenen MTS des Matrixproteins wandert das Protein über die TIM23-Pore getrieben von diesem elektrochemischen Gradienten in die Matrix³⁶.

Der PAM („Presequence Translocase-Associated Motor“)-Motor, der den Import aktiv vorantreibt, befindet sich an der Matrixseite der Innenmembran direkt am TIM23-Komplex. Hier wird das mitochondriale Chaperon Hsp70 von Tim44 gebunden, sodass Hsp70 an ungefaltete Proteine binden und so ein Zurückgleiten in den Tom40-Kanal verhindern kann. Um das Protein immer weiter in die Matrix zu ziehen, rekrutiert Tim44 immer mehr Hsp70 Chaperone, die dann nacheinander an das Polypeptid binden können. So gelangt es stückchenweise immer weiter in die Matrix. Dieses Modell wird auch Brown'sche Ratsche genannt^{35,36,40,41}.

Die MTS wird letztendlich von der Peptidase MPP („Matrix Processing Peptidase“) abgeschnitten und das Protein kann mithilfe von Chaperonen und Co-Chaperonen in seine native Form gefaltet werden.

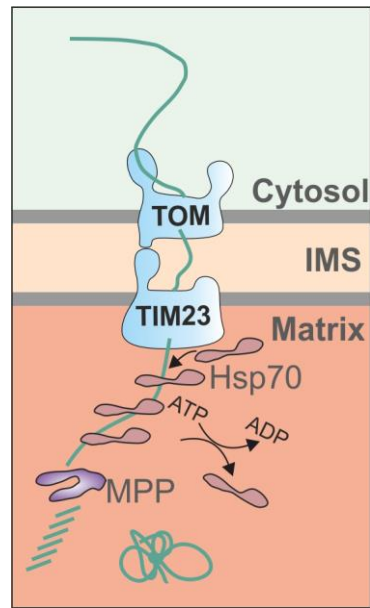


Abb. 6: Das Modell der Brown'schen Ratsche. Mithilfe des TIM23-Komplexes und der PAM-Maschinerie wird das Vorstufenprotein in die Matrix importiert. Dort binden mehrere mitochondriale Hsp70-Chaperone an das Protein. So wird ein Zurückgleiten des Polypeptids in den TOM-Kanal verhindert und wird immer weiter in die Matrix gezogen. Durch die Hydrolyse von ATP zu ADP an Hsp70, wird das Vorstufenprotein vom Chaperon gelöst und in die Matrix entlassen. Ist es vollständig importiert, wird die Präsequenz von MPP abgeschnitten und das Protein kann gefaltet werden. Abbildung überarbeitet aus Backes *et al.* (2017).

1.3.2.3 Proteineinbau in die Innenmembran

Wie bereits erwähnt, gibt es auch Proteine, die keine klassische MTS besitzen, sondern beispielsweise interne Signalsequenzen. Dazu gehören sogenannte Carrier-Proteine, die mittels Tom70 importiert werden. Im Intermembranraum angelangt, werden diese vom Tim9-Tim10 Komplex abgefangen und gebunden. Diese kleinen IMS-Proteine erfüllen als Komplex eine Chaperonfunktion. Da Membranproteine durch ihre Transmembrandomänen (TMD) sehr hydrophob sind, tendieren sie dazu, im hydrophilen Intermembranraum zu aggregieren, was mit Hilfe der kleinen Tim-Proteine verhindert wird³⁴.

Zusammen mit Tim54 und Tim18 bildet Tim22 den Kern des TIM22-Komplexes. Anders als im TIM23-Komplex werden Carrier-Proteine durch TIM22 nicht in die Matrix importiert. Sie werden in die Innenmembran entlassen, wo sie durch mehrere Transmembrandomänen verankert werden^{36,42}.

Die Atmungskette befindet sich ebenfalls in der Innenmembran. Einige Proteine der Atmungskette sind mitochondrial kodiert und werden daher in der Matrix synthetisiert. Mithilfe des OXA („Oxidase Assembly“-)Systems werden diese Proteine in die innere Membran eingebaut. Oxa1 ist die Hauptkomponente dieses Systems. Das Protein ist hoch konserviert und ein Homolog des Proteins YidC in Bakterien. Beispielsweise bindet Oxa1 co-translational an den N-Terminus von Cox2, einem mitochondrial kodierten Protein. Oxa1

dirigiert Cox2 dann an die Innenmembran, wo der N-Terminus als Transmembrandomäne verankert wird. Es wird außerdem angenommen, dass das OXA-System nicht nur eine Rolle für die Membraninsertion mitochondrial-synthetisierter Proteine spielt, sondern auch bei der Bildung des TIM22-Komplexes in der Innenmembran^{33,42-45}.

1.3.2.4 Das MIA-System

Die meisten Proteine des Intermembranraumes sind sehr klein und besitzen keine Präsequenz. Stattdessen verfügen sie über bestimmte Cysteinemotive in ihrer Sequenz, die als mitochondriale Signalsequenzen fungieren. Meistens besitzen diese IMS-Proteine vier Cysteine, bei denen jeweils zwei Cysteine entweder einen Abstand von 9 oder von 3 Aminosäureresten haben, weswegen man sie auch „TwinCx₉C“ oder „TwinCx₃C“ nennt. Der Import dieser Proteine ist abhängig vom MIA („*Mitochondrial Intermembrane Space Assembly Machinery*“)-System. Dabei spielen die Proteine Mia40 und Erv1 eine wichtige Rolle. Mia40, eine Oxidoreduktase, bildet mit den importierten IMS-Proteinen Disulfidbrücken und ist so in der Lage, diese Proteine zu oxidieren. So können die Proteine ihre korrekte Faltung einnehmen, werden im IMS gehalten und können somit ihre Funktion ausführen. Mia40 selbst bleibt im reduzierten Zustand zurück. Erv1, eine Oxidase, ist in der Lage, Mia40 zu oxidieren und so wieder in seine aktive Form zu bringen. Die dadurch freigegebenen Elektronen werden von Erv1 entweder an Cytochrom c abgegeben und somit an die Atmungskette, oder Erv1 reduziert direkt Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid^{2,46,47}.

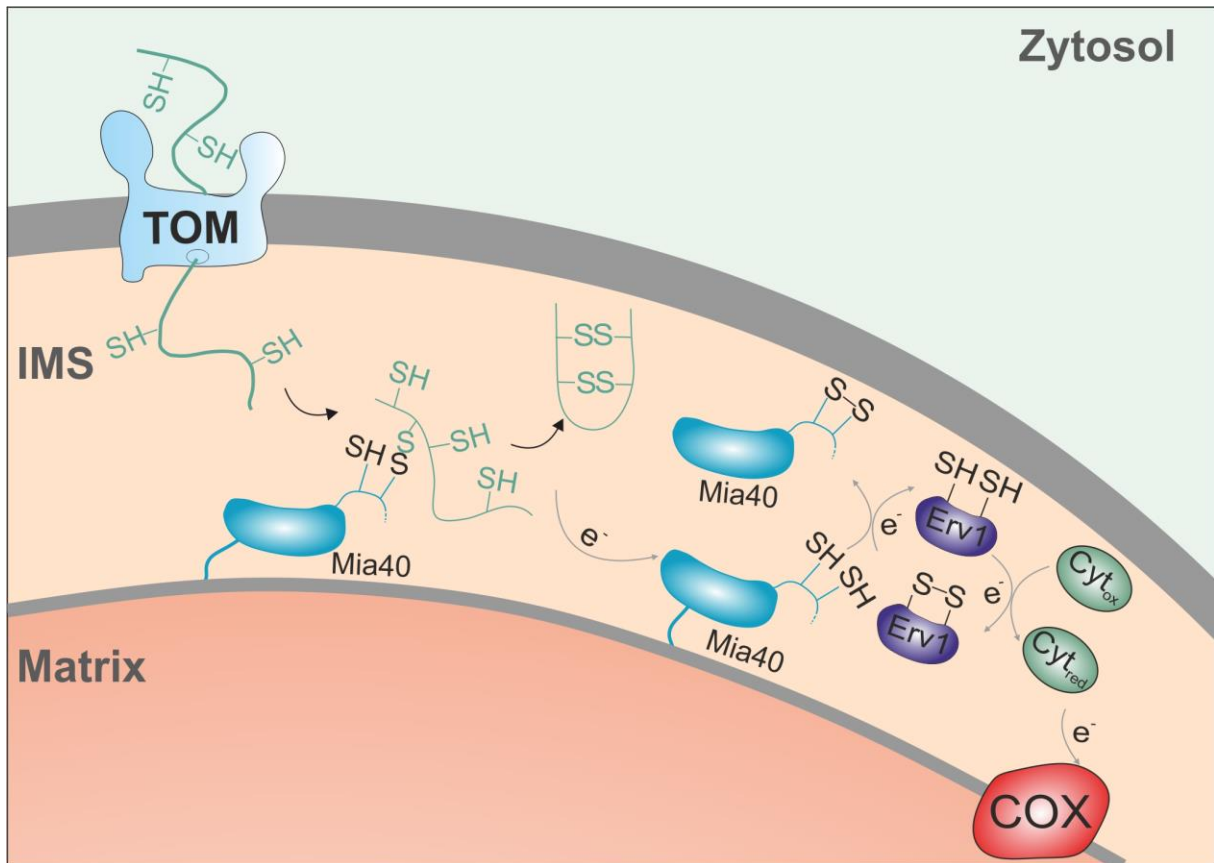


Abb. 7: Der Import von kleinen IMS-Proteinen findet über deren Cysteinmotife statt. Die Oxidoreduktase Mia40 bildet Disulfidbrücken mit den Proteinen und oxidiert sie dabei. Das nun reduzierte Protein Mia40 wird von der Oxidase Erv1 oxidiert und wieder in seinen funktionalen Zustand gebracht. Die frei gewordenen Elektronen werden über die Cytochromoxidase an die Atmungskette abgegeben². Abbildung überarbeitet aus Backes *et al.* (2017).

1.3.3 Der Transport mitochondrialer Proteine im Zytosol

Der Transport von mitochondrialen Proteinen über die verschiedenen Membranen der Mitochondrien ist mittlerweile sehr gut studiert. Wie die unprozessierten Proteine jedoch genau zu ihren Zielorganellen gelangen, ist nur sehr wenig erforscht.

Während ER-Proteine meist über das SRP erkannt und mit dem Ribosom an die ER-Membran gebracht werden, ist ein solcher Vorgang für mitochondriale Proteine noch nicht bekannt. Allerdings können mitochondriale Proteine über mehrere Wege zu den Mitochondrien gelangen.

Vor der Translation der mRNA zu seinem Polypeptid, kann diese zu den Mitochondrien gebracht werden. Diese mRNAs besitzen ein bestimmtes Motiv in ihrer 3'UTR („*Untranslated Region*“). Dieses Motiv wird vom Protein Puf3 erkannt, sodass die mRNA zu den Mitochondrien rekrutiert werden kann. Dies hat den Vorteil, dass die mRNA erst in geringer Nähe zu den Mitochondrien translatiert wird. So kann das Polypeptid schneller importiert werden und somit auch die Aggregation im Zytosol verhindert werden⁴⁸.

Die meisten Proteine des endoplasmatischen Retikulums werden schon während der Translation vom SRP erkannt und zusammen mit dem Ribosom zum ER gebracht. Ebenso können mitochondriale Proteine nach dem Mechanismus der co-translationalen Translokation an die Mitochondrien transportiert werden. Dabei ist auffällig, dass co-translational importierte Proteine meistens Proteine mit einer Präsequenz sind, die homolog zu bakteriellen Proteinen und außerdem Teil der Atmungskette sind⁴⁹. Das Ribosom wird zusammen mit der naszierenden Kette als Komplex (RNC „*Ribosome-Nascent Chain Complex*“) vermutlich wegen der bereits translatierten MTS an den TOM-Rezeptor Tom20 gebunden. Bei diesem Transport des RNC sind Proteine beteiligt, die NAC („*Nascent Chain Associated Complex*“) genannt werden und direkt an die Ribosomen binden. Dabei spielt vor allem das Protein Btt1 für Mitochondrien in Hefe eine wichtige Rolle. Wahrscheinlich bindet dieses Protein an Ribosomen, die mitochondriale Proteine translatieren, um das Binden von SRP an dieses Ribosom zu verhindern. Dadurch wird verhindert, dass das Ribosom zusammen mit dem mitochondrialen Protein fälschlicherweise an das ER gebracht wird. Stattdessen kann der RNC zu den Mitochondrien gebracht werden. Hier konnte zudem eine Interaktion von Btt2 mit dem Außenmembranprotein Om14 gezeigt werden, sodass die Bindung des RNC an den Tom20-Rezeptor ermöglicht wird⁴⁸⁻⁵¹.

Die meisten mitochondrialen Proteine werden post-translational transloziert. Dabei spielen die Chaperone der Hsp40-, Hsp70- und Hsp90-Familie eine wichtige Rolle.

Hsp70 bindet an die Polypeptidkette und hält sie im ungefalteten Zustand, sodass diese nicht aggregieren⁵². Hsp70 oder Hsp90 können mit ihrem C-Terminus an die TPR-Domäne des Tom70-Rezeptors des TOM-Komplexes binden⁵³. Durch ATP-Hydrolyse wird das Protein wieder vom Chaperon gelöst und kann durch den Tom40-Kanal in die Mitochondrien importiert werden. Dies trifft vor allem für hydrophobe Proteine wie beispielsweise die Carrier-Proteine der Innenmembran zu^{53,54}.

Während Hsp70- und Hsp90-Chaperone an fast alle neu synthetisierten Proteine binden, sorgen die Hsp40-Co-Chaperone für die Spezifität im Zytosol. Vor allem Ydj1, Sis1, Xdj1 und Djp1 in Hefe binden an mitochondriale Proteine und bringen sie entweder zu den Chaperonen oder direkt zu den TOM-Rezeptoren für direkten Import. Dabei bindet Ydj1 und Sis1 primär an Tom20, Xdj1 an Tom22 und Djp1 an Tom70^{48,49,55}.

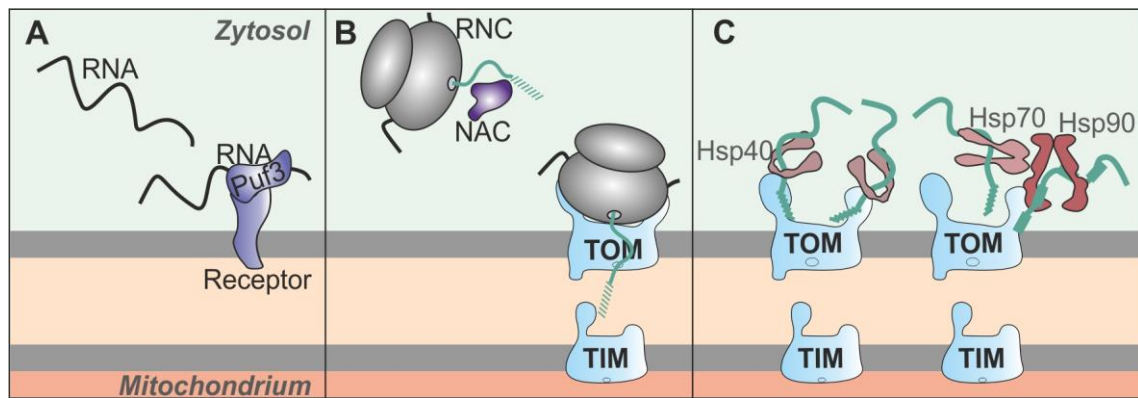


Abb. 8: Der Transport mitochondrialer Proteine im Zytosol. (A) Vor der Translation kann die mRNA bereits an die Außenmembran der Mitochondrien gebracht werden. Dabei bindet Puf3 an die mRNA und bringt sie an einen Rezeptor in der Außenmembran. **(B)** Mitochondriale Proteine können co-translationale importiert werden. Der Ribosom-Polypeptid-Komplex (RNC) wird von NAC gebunden und an den TOM-Komplex gebracht, sodass die Translation direkt in die Mitochondrien stattfindet. **(C)** Mitochondriale Proteine werden post-translationale importiert, nachdem die Chaperone Hsp70 oder Hsp90 oder die Co-Chaperone Hsp40 sie an den TOM-Komplex rekrutiert haben. Dabei können die Co-Chaperone an Tom20 oder Tom70 binden, während die Hsp70/90 die Polypeptide nur an Tom70 abgibt^{36,48,49}.

1.3.3.1 Der „ER-SURF“ Transportweg

Zum post-translationale Import gehört auch ein neu entdeckter Transportweg, der ER-SURF („ER surface-mediated protein targeting“) genannt wird. Da der Transport von mitochondrialen Proteinen im Zytosol immer noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kann mit ER-SURF ein Alternativweg für diese Vorstufenproteine gezeigt werden. Hierbei wird das mitochondriale Protein Oxal von zytosolischen Ribosomen synthetisiert, danach gelangt es jedoch nicht zu den Mitochondrien, sondern zum endoplasmatischen Retikulum. Grund dafür könnte die Hydrophobizität des Proteins sein. Vom endoplasmatischen Retikulum aus wird Oxal dann allerdings nicht abgebaut, sondern wird zu den Mitochondrien transportiert, wo es dann importiert werden kann^{36,48,49,56}.

Eine wichtige Rolle dabei spielt das Co-Chaperon Djp1. Dieses Protein hat eine Vielzahl an Funktionen. Über Djp1 war zunächst nur bekannt, dass es als zytosolisches Protein beim Import von peroxisomalen Proteinen beteiligt ist. Sobald das Hsp40-Protein in der Zelle fehlt, werden Peroxisomen fehlgebildet und peroxisomale Proteine fehlgeleitet⁵⁷. Djp1 spielt zudem eine Rolle beim Transport von Mim1, einem Protein des MIM („Mitochondrial Import“-)Komplexes⁵⁸. In ER-SURF werden mitochondriale Proteine, welche an der ER-Membran lokalisiert sind, von Djp1 in einem Import-kompetenten Zustand gehalten. Dies verhindert die Aggregation der Proteine und deren Abbau, stattdessen gelangen die Proteine in die Mitochondrien. Dies hat gezeigt, dass eine Lokalisation ans ER nicht zwangsweise zum Abbau führt, sondern dass die ER-Membran als ein Zwischenlager für mitochondriale Membranproteine dienen kann und deren korrekte Lokalisation absichert⁵⁶.

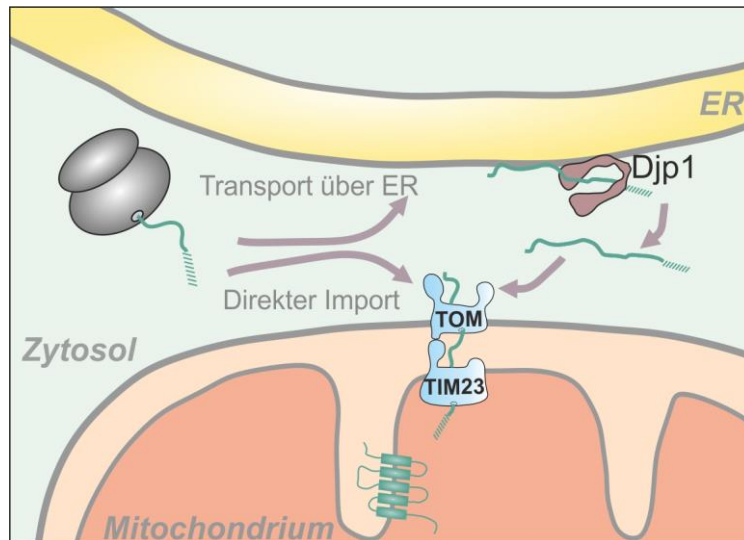


Abb. 9: Der ER-SURF Transportweg. Nach der Synthese im Zytosol können mitochondriale Proteine direkt importiert werden. Allerdings kann beispielsweise das Innenmembranprotein Oxa1 auch an die ER-Oberfläche gebracht werden. Das Co-Chaperon Djp1 hält das Protein dann in einem Importkompetenten Zustand, sodass Oxa1 an die Mitochondrien weiter geleitet werden kann, wo es importiert wird ⁵⁶.

Einige Co-Chaperone sind dafür bekannt, mitochondriale Proteine zu den Rezeptoren Tom22 und Tom70 an der mitochondrialen Außenmembran zu dirigieren. Dazu gehört auch Djp1. Ungefaltete Proteine werden von dem Hsp40-Protein zu Tom70 gebracht, wodurch sie importiert werden können ⁵⁵.

1.3.4 Ema19

Zu Beginn der Studie des ER-SURF Transports wurde einen Screen durchgeführt, bei dem nach Proteinen gesucht wurde, die den Transport von mitochondrialen Proteinen beeinflussen könnten. Als möglicher Kandidat erwies sich auch das Protein Ema19 („Efficient Mitochondria Targeting-Associated protein“). Es ist ein kleines Membranprotein, das in der Membran des endoplasmatischen Retikulums liegt. Über die Funktion von Ema19 ist wenig bekannt, jedoch ist dieses Protein hochkonserviert und auch im Menschen zu finden ⁵⁶.

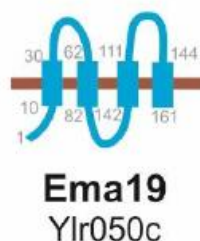


Abb. 10: Ema19, ein bisher unerforschtes Protein. Es besitzt 4 Transmembrandomänen und ist fest in der ER-Membran verankert.

Die Funktion dieses Homologs, Tmem97, auch als Sigma2 bekannt, ist nur teilweise erforscht. Beispielsweise ist das Membranprotein bei der Cholesterinhomöostase beteiligt. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Beteiligung bei der Niemann Pick Krankheit Typ 2

gefunden^{59,60}. Tmem97 scheint auch eine Rolle bei unterschiedlichen Krebstypen zu spielen, jedoch ist die Funktion sehr unterschiedlich. Bei einigen Arten, wie zum Beispiel Pankreaskrebs oder Prostatakrebs wurde eine deutlich niedrigere Expression von Tmem97 festgestellt. Dies führte zu der Annahme, dass Tmem97 als Tumorsuppressor dienen könnte. Bei anderen Krebsarten, wie Brustkrebs oder Leberkrebs wurde dagegen eine höhere Expression festgestellt, worauf auf eine Tumorprogression geschlossen wurde⁶⁰⁻⁶³.

1.4 Zielsetzung

Mittlerweile ist sehr viel bekannt über den Import von mitochondrialen Proteinen über die verschiedenen Membranen der Mitochondrien. Über den Transport dieser Proteine im Zytosol wurde bisher wenig geforscht. Neben dem klassischen Transport der Vorstufenproteine direkt zu den Mitochondrien, können diese auch an andere Organellen gebracht werden. Hierzu wurde ein neuer Transportweg gezeigt, der ER-SURF genannt wird. Über ER-SURF gelangen Proteine über das ER zu den Mitochondrien⁵⁶.

Im Zuge der Untersuchungen zum ER-SURF wurde ein Protein entdeckt, das bislang unerforscht blieb, Ema19. In dieser Studie soll nun untersucht werden, welche Funktion Ema19 in der Zelle hat und ob ein Zusammenhang mit dem ER-SURF Weg besteht. Dazu wurde zuerst der Reporter Oxa1-Ura3 benutzt der schon in Hansen *et al.*, 2019 beschrieben wurde. Wird dieses Fusionsprotein exprimiert, wird es durch die Präsenz von Oxa1 in die Mitochondrien gebracht, wodurch Ura3 ebenfalls in die Mitochondrien gelangt. Fehlt Ura3 im Zytosol, kann kein Uracil synthetisiert werden und die Hefezellen können ohne Uracil im Medium nicht wachsen. Wird der Import dieses Reporters allerdings gestört, weil beispielsweise Proteine in der Zelle fehlen, so verbleibt er im Zytosol und die Zelle kann Uracil selbst herstellen. Wird *EMA19* in der Zelle deletiert, so können die Zellen ebenfalls ohne Uracil wachsen. Das Ziel dieses Projekts war es, zu untersuchen, wieso dieser Reporter im Zytosol verbleibt. Dafür wurden Experimente durchgeführt, die aufzeigen könnten, was mit Vorstufenproteinen im Zytosol geschieht, bevor sie sich in den Mitochondrien befinden. Da Ema19 jedoch ein gänzlich uncharakterisiertes Protein ist, mussten Versuche unternommen werden, mit denen man sich verschiedene Systeme in der Zelle betrachten konnte. Hierzu mussten unter anderem neue Methoden etabliert werden. Dazu habe ich den Import in Semi-intakte Zellen untersucht und angepasst, sodass eine Situation ähnlich der *in vivo* geschaffen werden konnte. Um nicht nur den Import zu untersuchen, wurden auch Versuche entwickelt, die den Transport von Proteinen in den Zellen zeigen können, wie beispielsweise einen Split-GFP Versuch. Hier sollte untersucht werden, ob Oxa1 vermehrt am ER vorliegt, sollte *EMA19* deletiert sein. Ebenso wurden sich unterschiedliche Proteinmengen in der Zelle betrachtet und welche Auswirkungen Ema19 darauf hat. Durch unterschiedliche Versuchsansätze sollte ebenso festgestellt werden, ob das Protein Einfluss auf den Abbau mancher Proteine hat.

2. Ergebnisteil

Der neu beschriebene ER-SURF Transportweg erklärt, wie neu synthetisierte mitochondriale Proteine vom Zytosol zum Mitochondrium gelangen können. Im Zuge dieses Projekts wurden einige Proteine aufgezeigt, die eine Funktion in diesem System übernehmen könnten. Ein noch gänzlich uncharakterisiertes Protein, Ema19, wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht. Da bisher keine Funktionen von Ema19 bekannt waren, wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Versuche unternommen. Die Resultate werden hier präsentiert.

2.1 Ema19 ist ein konserviertes Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums

Wie bereits in 1.3.4 gezeigt, werden für Ema19 vier Transmembrandomänen und zusätzlich eine Signalsequenz vorhergesagt⁵⁶. Dies deutet auf eine Lokalisation des Proteins in der ER-Membran hin. Wird am open reading frame (ORF) von Ema19 mittels homologer Rekombination eine GFP-Kassette genomisch integriert, kann durch Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation am ER nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise kann diese Kassette dabei C- oder N-Terminal integriert sein, die Lokalisation am ER bleibt immer gleich (Abb. 11). Dies spricht dafür, dass Ema19 durch die Transmembrandomänen fest in der ER-Membran verankert ist.

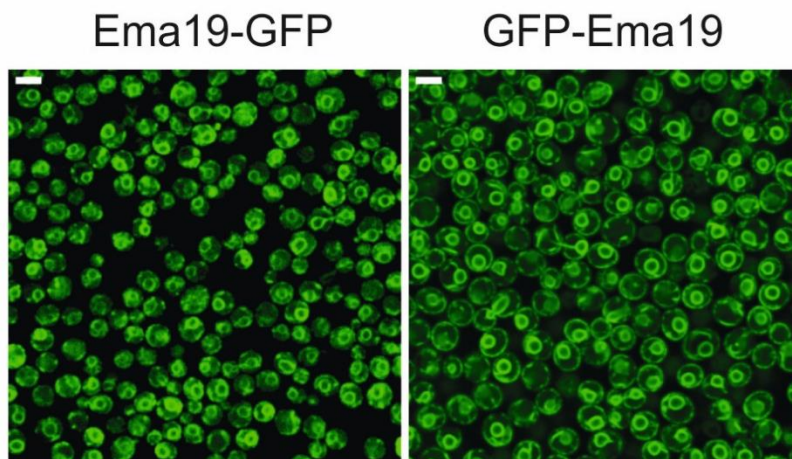


Abb.11: Ema19 ist in der ER-Membran lokalisiert. Durch einen N-Terminal (links) oder C-Terminal (rechts) genomisch integrierten GFP-Tag, kann man mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops die Lokalisation von Ema19 sehen. Beide Mikroskopiebilder zeigen eine typische Färbung des endoplasmatischen Retikulums in *S. cerevisiae*⁵⁶. Die genomische Integration, sowie die Fluoreszenzmikroskopie wurden von Dr. Naama Aviram am Weizmann Institute of Science, Rehovot, durchgeführt.

Viele Proteine, die in bestimmten Systemen der Zelle eine wichtige Rolle spielen, sind oftmals konserviert in unterschiedlichen Organismen. Außerdem kann mithilfe von Homologie auf eine Funktion im zu untersuchenden Organismus geschlossen werden. Aus diesem Grund wurde für Ema19 ein Alignment gemacht. Benutzt man hierzu die Proteinsequenz von Ema19, werden nicht nur für Pilze, sondern auch für Säugerzellen homologe Proteine gefunden. Dies spricht für eine wichtige Aufgabe des Proteins in der Zelle.

Bei einem genaueren Vergleich der Sequenzen ist vor allem die Konserviertheit der vier Transmembrandomänen (in blau hervorgehoben) erkennbar. Dies unterstreicht nochmals die Vorhersage von vier Transmembrandomänen.

A

```

Sc -----
Cg -----
Ca -----
Zb -----
Kl -----
Dh -----
Hs -----
Mm -----
Dr MVVLRRLPHEPMSWESAHSRNQPSRLTNWKTRIKKIRAKGRIRNRGLTRYSTLPTDANPP 60

Sc -----M-KLGHREQQFYLVWYFIVHIPITIFIDSSVVI PAKWQL 37
Cg -----M-ISSLVFEEKFYYYYCLVHIPITVLDSSVAVPDKWVL 39
Ca -----M-KLIDKVYLWYFIIHIPITIFIDSSIVIPKQYQL 34
Zb -----MAGLSRLEISFFYFYFLHSHIPITILIDSAVVI PPKFRI 38
Kl -----MSKEQRD-SRKTQLWKNLWKI WYAVNIPIITFLDSNAVL PPYLQY 45
Dh -----MPGANK-STKTMCGIDKFYVAYFLMHIPITLIIDSCII IPEEQRF 44
Hs -----MGAPATRRCV EWLLGLYFLSHIPITL FMDLQAVLPRELYP 40
Mm -----MGALAARRCV EWLLGLYFVSHIPITL FIDLQAVLPPELYP 40
Dr LLNHPDGGTTCRKHLTRHLNQTIKMF LRVLEIIYFIYFASHIPITLLVDLQALLPEHVYP 120
      .      :      :***      ::*      :*

Sc GIAQKVSDHIAKQHD FLLSEKPEWLYW FVLELVLQ LPLFVYFVNKFWNSSE----- 90
Cg L--PGLVQWHIRQNND FLLYEKPMWLQ L FVWVWELV FQLPLFFYFAHQFKKI WALRSKDTK 97
Ca PITKSILEFHISTNND ILLAYPQTWFK IFGFIELIFQL PLFFYFIYKLLSSNR----- 87
Zb A--GWLLERHIAQNND FLLCDRPMWLQ V FVALELTVQL PLFFQFAKQLRRNSV----- 89
Kl T--KGLLDGYIDNFND FLTANPPNWLK YMTIIEILFQL PVAIYCLYQLLNLSKSKTIK-- 101
Dh QFQKQFLEFHISSNK D FLLVSLPLWLK V FGLFELFVQL PFFAIGAYMLVKQMK----- 97
Hs VEFRNLLKWAYAKEFK D PLLQEP PAWFKSFL FCELVFQL PFFPIATYAFLKGC----- 93
Mm QEFSNLLRWYSKEFK D PLMQEPPVWFKS FLLCELVFQL PFFPIAAYAFFKGC----- 93
Dr PELIKLLHWYAGEFK D PMMDPPAWFKS FV FCEALVQL PFFPVAAAYAFKGGC----- 173
      .:      :      :*      :      *:      :      * .***.      :

Sc ----LQVNTNSRLKK WLR----IYGWNASL T T LICIVVIF KRGYIPYDVLKT----SLS 137
Cg NAKAERASTKKS LYLWLR----VYGLNAAL T TWICIVVIL YRGYYPFTLDASRIAGTKLE 153
Ca -----RVLDVNYLWSI----IYGFNAGF TTFVCLIWLI IE-YKNF-----QLS 126
Zb -----PRRSLK----LYGLLAST T T LVCIGAI LE GHYPGTAIP-----MT 125
Kl -----RTLFTVDRLSK----CYAFNVIT T T SFCI WYVWAYGYYPATMNTDH---VSL 147
Dh -----QVYPYML----IYGFNASF T T L VCLVHIFCD-YERF-----GLT 131
Hs -----KWIRTPAI IYSVHTMT T LIPILSTFL FEDFS---KASGFKGQRPET 136
Mm -----RWIRIPAI IYAAHTIT T LIPILYTL L FEDFS---KAVAFKGQRPES 136
Dr -----KWIRTPAI IYSVHVAT T LVPILSHILFHKFP---LSP---HPGPQT 213
      * .      .      *      :      .      :

Sc MTQKCQLASVYLPTFL I PLRLCFV*----- 162
Cg VRDTLALMGLYLPTFL L PLRLCMLQQ----- 179
Ca DLQLINLLAIYIPYLL L PLILLIHSFKQIQ-QYN-N--NNHNK LKQQ- 169
Zb SLDKGKLV CVYLP TFL L P FRLVLL----- 149
Kl NPDKLALTMVYVPYVL I PALFFV----- 170
Dh TGESYKLAALYIPYL V I PLVMLVDYSIRIN-KSI-K--AHIPPTK KNI 175
Hs LHERLTLVSVYAPYLL I PFILLIFMLRSPYYKYEEKRKKK----- 176
Mm FRERLTLVGVIAPYLI I PLILLFMLRNPYYKYEEKRKKK----- 176
Dr LNERLTLVSIYAPYLI I PIMILLTMLF SATYNSPSLKG NAPS KAKKQR 261
      :      *      :*      *      .:*      :      .

```

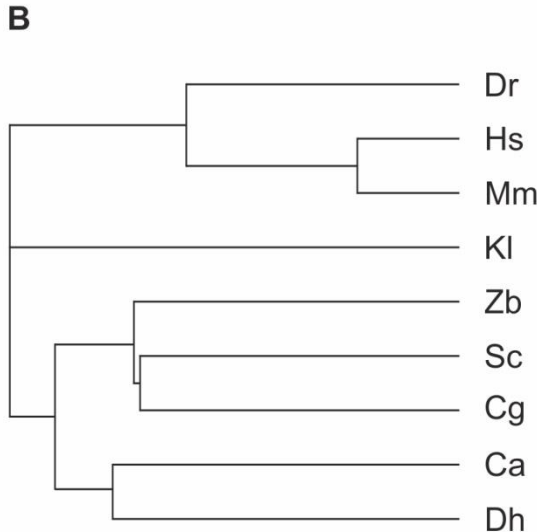


Abb.12: Die Homologe von Ema19 besitzen alle vier Transmembrandomänen. (A) Die Sequenzen der verschiedenen Organismen wurden mittels Uniprot Alignment verglichen. Die Sequenzen folgender Organismen wurden benutzt: ScEMA19 (*S. cerevisiae* Q12155), Cg uncharacterized protein (*Candida glabrata* Q6FUN5), Ca uncharacterized protein (*Candida albicans* A0A1D8PQN5), Zb uncharacterized protein (*Zygosaccharomyces bailii*), Kl uncharacterized protein (*Kluyvermyces lactis* Q6CRN2), Dh uncharacterized protein (*Debaryomyces hansenii* Q6BKE5), Hs Sigma intracellular receptor 2 (*Homo sapiens* Q5BJF2), Mm Sigma intracellular receptor 2 (*Mus musculus* Q8VD00), Dr Tmem97 (*Danio rerio* F1QDW6). Die vier Transmembrandomänen sind blau unterlegt. **(B)** zeigt den Stammbaum der verglichenen Organismen.

2.2 Die Deletion von *EMA19* führt nicht zu Veränderung in der Lipidzusammensetzung

Da über die Aufgabe von Ema19 bisher nichts bekannt ist, wurden Untersuchungen in verschiedene Richtungen vorgenommen. Um den Einfluss auf die Zelle als Ganzes zu betrachten, wurden zunächst elektronenmikroskopische Bilder aufgenommen. Dies sollte eine mögliche Rolle von Ema19 für die Zellmorphologie aufzeigen. Dafür wurden Zellen von Wildtyp und Δ ema19 in respiratorischem (YPG) und fermentativem (YPD) Medium angezogen und für die Aufnahme der Mikroskopiebilder vorbereitet.

Wurden die Stämme in Glukosemedium inkubiert, sehen die Zellen gleich aus. Es sind mehrere Organellen zu erkennen, deren Morphologie sich in der Mutante nicht verändert hat. Betrachtet man allerdings die Zellen, die in Glycerinmedium angezogen wurden, ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Während die Wildtypzelle sich nicht von der Zelle in YPD unterscheidet, weißt die Zelle von Δ ema19 weiße Einschlüsse auf. Solche runde, weiße Gebilde sind normalerweise zu sehen, wenn sich sogenannte „Lipid droplets“ oder „Lipid bodies“ bilden. Solche Lipidtröpfchen sind Organellen, die zur Lipidlagerung dienen. Bisher ist wenig über diese Lipidspeicher bekannt, es wird jedoch angenommen, dass sie in Kontakt mit anderen Organellen, wie zum Beispiel Mitochondrien stehen⁶⁴⁻⁶⁶.

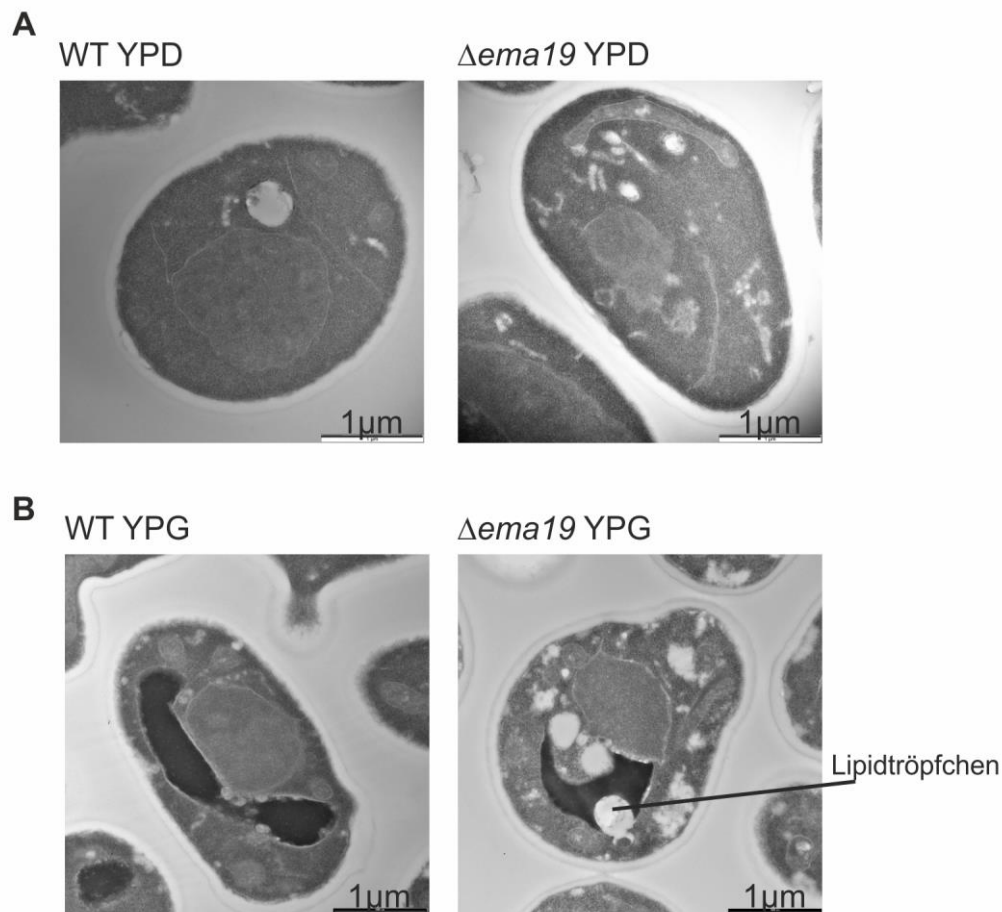


Abb. 13: $\Delta ema19$ zeigt vermehrt Lipidtröpfchen in respiratorischem Medium. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp und $\Delta ema19$ Zellen in (A) fermentativem und (B) respiratorischem Medium. Die Zellen in Glukosemedium zeigen keine Unterschiede. Im Glycerolmedium sind weiße Einschlüsse, die wie Lipidtröpfchen aussehen, in der Mutante nachzuweisen. Im Wildtyp sind diese nicht zu sehen. Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden von der AG Anne Spang vom Biozentrum der Universität Basel zur Verfügung gestellt.

Aufgrund dieser Bildungen sollte genauer untersucht werden, ob die Lipidzusammensetzung in der $\Delta ema19$ Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Dazu wurde eine Lipidanalyse von ganzen Zellen und von isolierten Mitochondrien durchgeführt. Die Zellen wurden in Galaktosemedium inkubiert. Danach wurden für Proben aus ganzen Zellen eine bestimmte OD_{600} pelletiert und mit Flüssigstickstoff bis zur weiteren Verwendung schockgefroren. Für die Proben aus Mitochondrien wurde eine Mitochondrienisolation vorgenommen und die Organellen dann mittels Sukrosegradienten aufgereinigt. Danach wurden alle Proben gleich behandelt, es wurde die Zusammensetzung verschiedener Lipidspezies untersucht. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden.

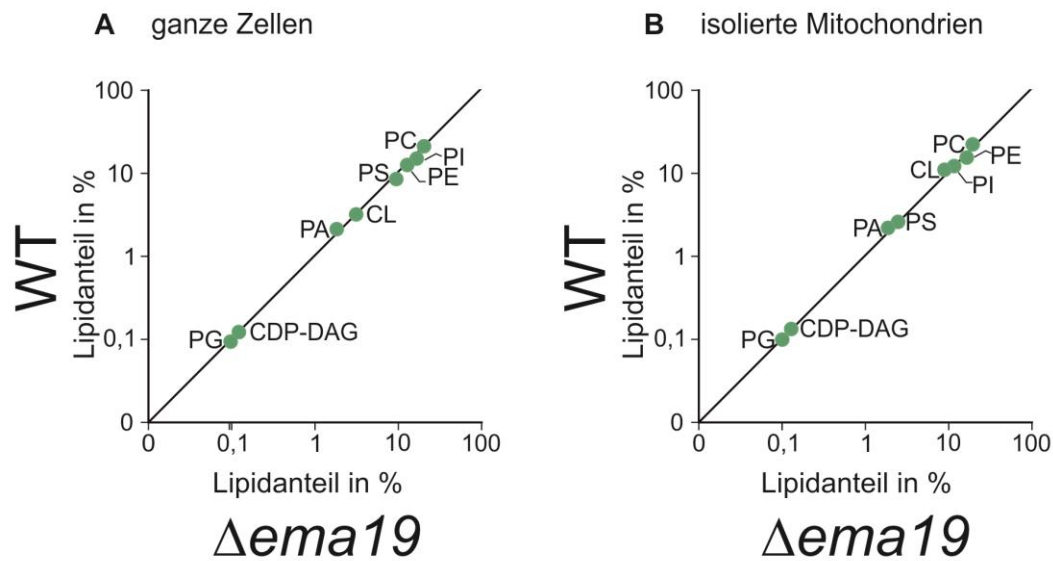


Abb. 14: Eine Lipidanalyse zeigt keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Lipide. Dargestellt sind die Lipide in (A) ganzen Zellen und (B) isolierten Mitochondrien. Auf der y-Achse sind die Lipide im Wildtyp und auf der x-Achse die Lipide in $\Delta ema19$ in logarithmischer Darstellung zu sehen. Der Median verdeutlicht die Ähnlichkeit der beiden Stämme. Folgende Lipide wurden gemessen: PG (Phosphatidylglycerol), CDP-DAG (Cytidine diphosphate diacylglycerol), PA (Phosphatidsäure), PS (Phosphatidylserin), PI (Phosphatidylinositol), CL (Cardiolipin), PE (Phosphatidylethanolamin), PC (Phosphatidylcholin). Durchgeführt wurde die Lipidanalyse von Dr. Takashi Tatsuta an der Universität Köln.

2.3 Die richtige Lokalisation des Fusionsproteins Oxa1-Ura3 ist abhängig von Ema19

Da eine Deletion von EMA19 keinen Effekt auf zellulärer Ebene zeigt, wurden sich im nächsten Schritt Organellen, besonders Mitochondrien, und ihre Mechanismen genauer betrachtet. Ema19 wurde als möglicher Faktor für mitochondrialen Import identifiziert. Dieser Versuch mittels des Reporters Oxa1-Ura3 sollte zuerst noch einmal bestätigt werden.

Mit Hilfe des Fusionsproteins Oxa1-Ura3 sollten Akkumulationen von mitochondrialen Proteinen im Zytosol in unterschiedlichen Mutanten nachgewiesen werden⁵⁶. Dafür wurde in die Sequenz des mitochondrialen Proteins Oxa1 die Sequenz des zytosolischen Proteins Ura3 integriert. Ura3 wird zur Synthese von Uracil benötigt. Wird dieses Fusionsprotein also korrekt in die Mitochondrien importiert, können Hefezellen mit Medium ohne Uracil (-Ura) nicht wachsen. Fehlt ein Protein in der Zelle, das beim Trans- oder Import von Oxa1 beteiligt ist, verbleibt das Fusionsprotein jedoch im Zytosol und Ura3 kann im Uracilsyntheseweg arbeiten^{9,56}.

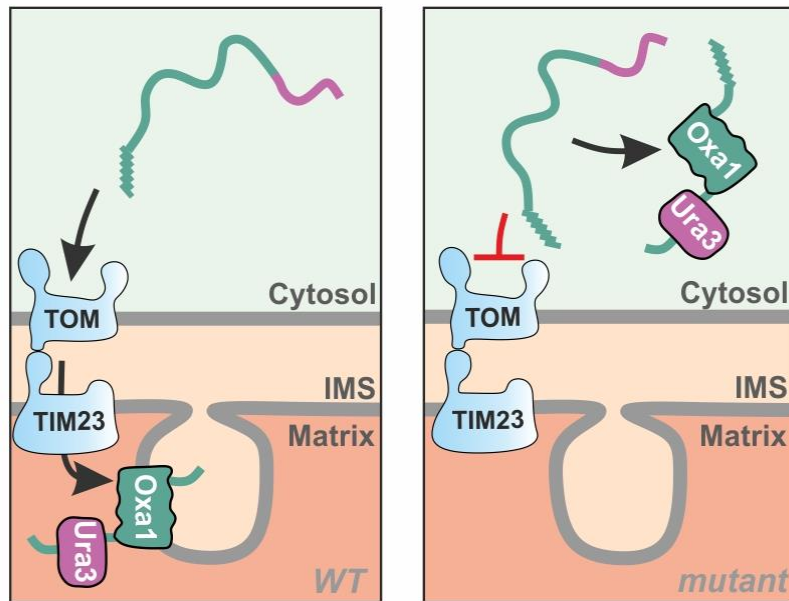


Abb. 15: Schematische Darstellung des Imports des Fusionsproteins Oxa1-Ura3. Oxa1-Ura3 wird im Zytosol synthetisiert und muss danach zu den Mitochondrien transportiert und importiert werden. Findet dies im Wildtyp statt (links), wird das komplette Protein importiert, Oxa1 wird in die Innenmembran inseriert und Ura3 befindet sich in der Matrix. Wird der Import jedoch verhindert, weil beispielsweise ein Protein im Transport- oder Importweg fehlt, gelangt das Fusionsprotein nicht mehr in die Mitochondrien und verbleibt im Zytosol. Dadurch kann Ura3 in der Uracilsynthese verwendet werden und die Zellen können mit Medium ohne Uracil wachsen⁹.

In der Studie zum ER-SURF Transportweg von Hansen *et al.* wurde dieser Reporter verwendet, um Mutanten zu finden, die möglicherweise wichtig für den Import von mitochondrialen Proteinen sein könnten. Hierbei wurde unter anderem gesehen, dass $\Delta ema19$ Zellen auf Selektionsplatten ohne Uracil wachsen, wenn Oxa1-Ura3 exprimiert wird.

Daraufhin wurde *EMA19* in unterschiedlichen Wildtypstämmen deletiert. Danach wurde Oxa-Ura3 als Plasmid in die Zellen transformiert und abermals das Wachstum ohne Uracil mittels Tüpfeltest beobachtet. Auf beiden Plasmiden befindet sich ein His-Marker. Die Stämme wurden in SD-His Medium inkubiert und danach eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt. Von dieser Verdünnungsreihe wurde dann die gleiche Menge auf eine Platte ohne Histidin (Abb.16 rechts, -His) oder ohne Uracil (Abb. 16 links, -Ura) pipettiert.

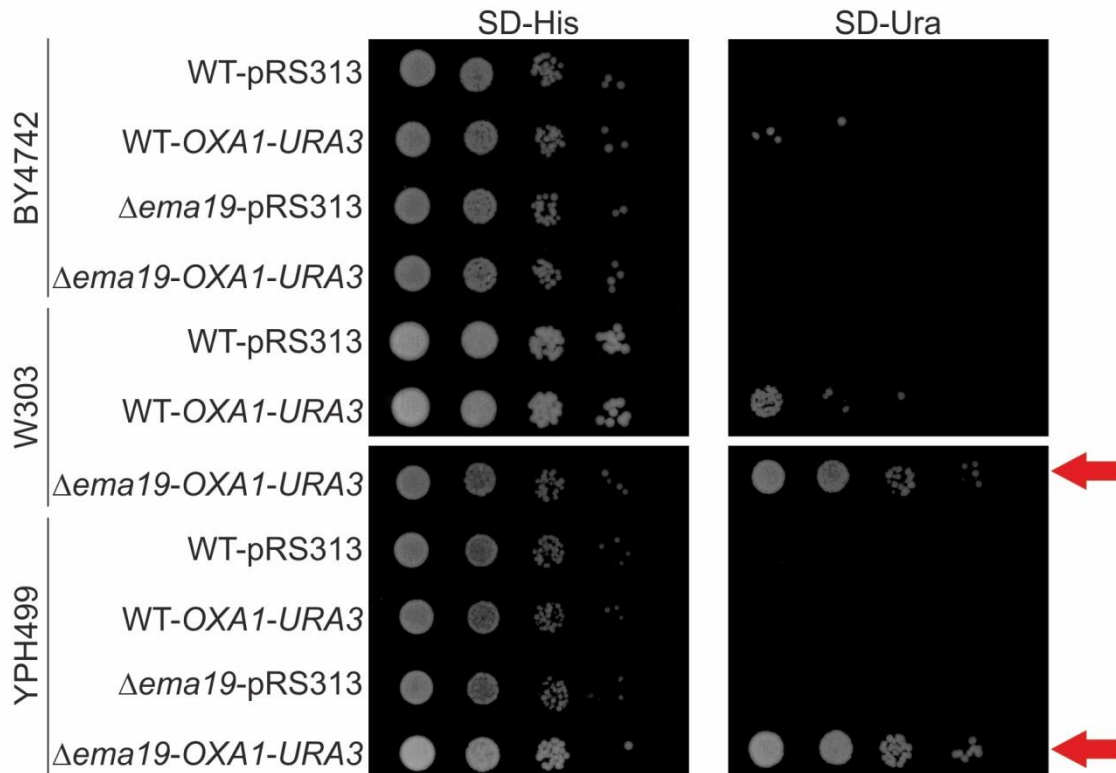


Abb. 16: Wird *EMA19* deletiert, kann das Fusionsprotein *Oxa1-Ura3* nicht mehr importiert werden. Gezeigt sind die drei Wildtypstämme BY4742, W303 und YPH499. In allen Stämmen wurde *EMA19* deletiert. Das Fusionsprotein wurde mittels Plasmid mit His-Marker in den Wildtyp und die dazugehörige Mutante transformiert. Als Kontrolle dient das Leerplasmid mit His-Marker. Alle Stämme können auf Medium ohne His wachsen. Δ ema19 kann in W303 und YPH499 auch ohne Uracil wachsen.

Hier wurde nun deutlich, dass das Wachstum wildtypabhängig ist. Betrachtet man sich die Platte mit Uracil und ohne Histidin (Abb. 16 rechts, -His), so ist zu erkennen, dass alle Stämme bis zur gleichen Verdünnung wachsen können. Es kann also ein Pipettierfehler ausgeschlossen werden. Während sowohl der Wildtyp BY4742 als auch die Deletion im selben Hintergrund ohne Uracil nicht wachsen können, ist ein deutliches Wachstum von Δ ema19 im Wildtyp W303 α und YPH499 zu sehen. Der Wildtyp YPH499 kann auf der -Ura Platte gar nicht wachsen, für den Wildtyp W303 ist bei der ersten Verdünnung noch Wachstum zu sehen.

Für die nachfolgenden Experimente wurde deshalb ausschließlich die Deletionsmutante im YPH499 Wildtyp benutzt, da hier der beste Phänotyp nachgewiesen werden konnte.

2.4 Ema19 zeigt keinen Einfluss auf das Wachstum mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Der Einfluss von Ema19 auf Oxa1-Ura3 konnte somit nochmals bestätigt werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Ema19 im ER-SURF Weg wirkt. Für Djp1 konnte Hansen *et al.* nachweisen, dass das Co-Chaperon am ER gehalten wird, wo es Oxa1 abfangen und zurück zu den Mitochondrien schicken kann ⁵⁶. Um zu sehen, ob Ema19 und Djp1 auf ähnliche Weise fungieren, wurde zunächst eine Doppelmutante generiert, bei der sowohl *EMA19* als auch *DJP1* deletiert wurden. Daraufhin sollte das Wachstum der Einzel- und Doppelmutanten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen betrachtet werden. Dieser Wachstumstest sollte aufzeigen, ob es eine genetische Interaktion zwischen Djp1 und Ema19 gibt. Dies würde durch ein verschlechtertes oder besseres Wachstum im Vergleich zu den Einzeldelationen sichtbar werden. Des Weiteren sollte durch das Wachstum auf Glycerolplatten (YPG) betrachtet werden, ob die Mutanten auf respiratorischem Medium wachsen können und dementsprechend Defekte in den Mitochondrien und der Atmungskette haben. Die Stämme und der dazugehörige Wildtyp wurden in YPGal angezogen. Anschließend sollte das Wachstum mittels Tüpfeltest betrachtet werden, dafür wurden die Zellen pelletiert und eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt. Die jeweiligen Verdünnungsreihen wurden dann auf Platten mit Glukose, Galaktose oder Glycerol getüpfelt, also fermentativen oder respiratorischen Kohlenstoffquellen.

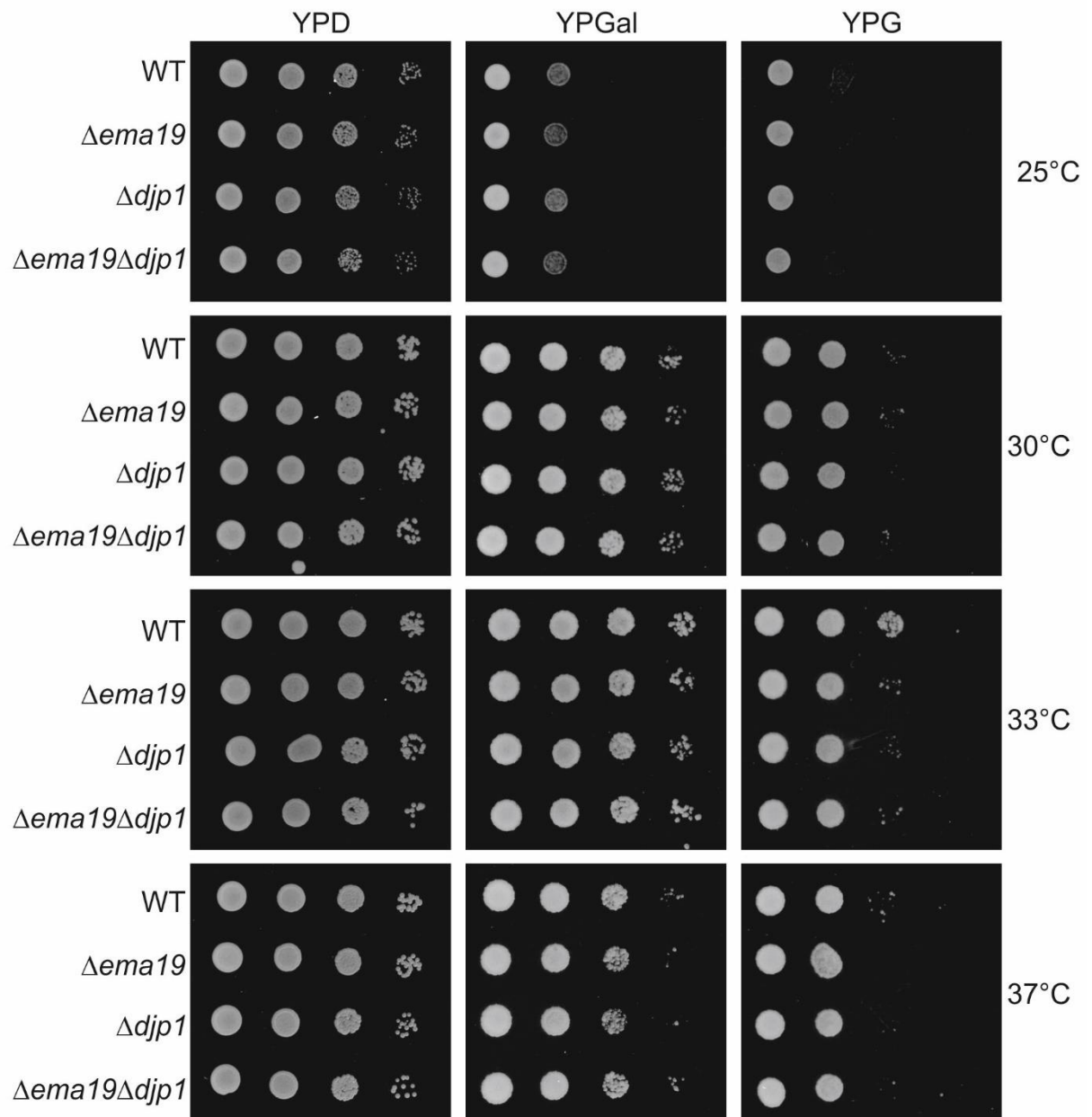


Abb. 17: $\Delta ema19$, $\Delta djp1$ und die Doppelmutanten zeigen keinen Wachstumseffekt. Der Wildtyp und die Mutanten wurden in Galaktosemedium angezogen. Danach wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt und auf Glukose-, Galaktose- und Glycerolplatten getüpfelt. Die Platten wurden bei unterschiedlichen Temperaturen drei Tage inkubiert. Alle Stämme zeigen gleiches Wachstum bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen und Temperaturen.

Die Verdünnungsreihen wurden auf drei Platten der jeweiligen Kohlenstoffquellen pipettiert und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Das Temperaturoptimum von Hefe liegt bei 30°C. Höhere Temperaturen lösen Stress in der Zelle aus, was zu Proteinakkumulationen führt und das Wachstum beeinträchtigen kann. Nach drei Tagen Inkubationszeit zeigten die Stämme überall das gleiche Wachstum. Selbst bei einer hohen Temperatur wie 37°C können sie auf fermentativem Medium (YPD) noch bis zur höchsten Verdünnung wachsen. Ebenso

können die Mutanten bis zur zweiten Verdünnung alle auf respiratorischem Medium (YPG) wachsen, was darauf hinweist, dass kein Defizit in der Atmung vorliegt. Auch die Doppelmutante zeigt keinen Defekt im Wachstum. Somit konnte kein Rückschluss über die Funktion von Ema19 im ER-SURF geschlossen werden.

2.5 Oxa1 ist mislokalisiert in Δ ema19

2.5.1 Die unprozessierte Form von Oxa1 zeigt die gleichen Proteinlevel

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Ema19 auf Oxa1 genauer untersucht. Oxa1 ist ein mitochondriales Protein, das in der Innenmembran sitzt (siehe 1.3.1.3. „Proteineinbau in die Innenmembran“). In der Studie von Hansen *et al.* wurde außerdem untersucht, ob in den Zellen von *DJP1*-Deletionsmutanten mehr unprozessiertes Oxa1 vorliegt als im Wildtyp. Die unprozessierte Form von Oxa1 ist das neu synthetisierte Protein im Zytosol. Es wurde noch nicht in die Matrix importiert, wo MPP die Präsenz vom reifen Protein trennt. Dies konnte mit einer Überexpression von *OXA1* bestätigt werden⁵⁶. Dieser Versuch sollte nun auch mit der *EMA19* Deletionsmutante durchgeführt werden. Da die unprozessierte Form von Oxa1 nur durch Überexpression zu sehen ist, wurde sowohl in den Wildtyp als auch in Δ ema19 das Plasmid pYX223-Oxa1 transformiert. Hierbei wird die Expression von *OXA1* durch einen *GAL*-Promotor kontrolliert, sodass *OXA1* nur überexprimiert wird, wenn Galaktose im Medium verwendet wird. Das Protein wurde zudem mit einem HA-Tag versehen, sodass die Proteinlevel im Western Blot mittels HA-Antikörper detektiert werden können.

Die beiden Stämme wurden in Laktatmedium angezogen und morgens verdünnt. Dabei wurde 0,5% Galaktose dazugegeben, sodass die Expression von Oxa1-HA induziert wurde. Nach etwa 4h Induktionszeit wurde eine OD₆₀₀ von 2 geerntet, lysiert und ein Western Blot durchgeführt.

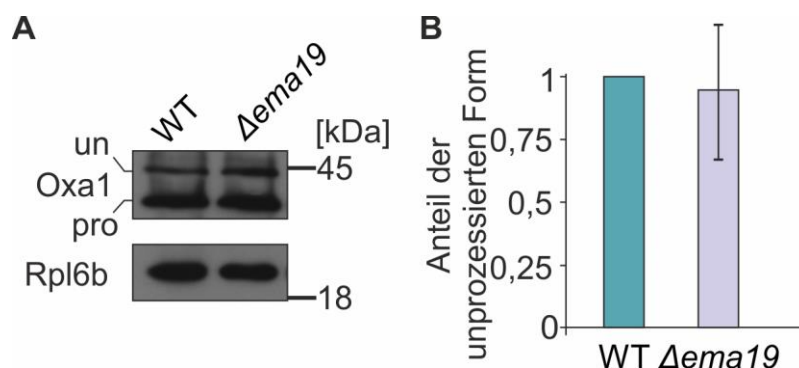


Abb. 18: Δ ema19 zeigt die gleiche Menge an unprozessiertem Oxa1 wie der Wildtyp. Beide Stämme wurden in Laktatmedium inkubiert und die Überexpression von Oxa1 mittels Galaktosezugabe induziert. **(A)** Ein HA-Antikörper detektiert die Expression von Oxa1 vom Plasmid. Gezeigt sind die unprozessierte Form (un) und die prozessierte (pro) von Oxa1. Es ist kein Unterschied zwischen den Stämmen zu erkennen. Rpl6b dient als Ladekontrolle. **(B)** Quantifizierung von Triplikaten der Banden für die unprozessierte Form.

Durch den HA-Tag am C-Terminus von Oxa1, kann mit einem HA-Antikörper spezifisch nur die Überexpression detektiert werden. Rpl6b dient hier als Ladekontrolle. Für dieses Protein sehen beide Banden gleich aus, es wurde also die gleiche Menge Zelllysate auf das SDS-Gel geladen. Betrachtet man sich die Banden für Oxa1, ist auch hier kein Unterschied zwischen den Stämmen zu sehen. Die Bande für die prozessierte Form ist stärker als die der unprozessierten. Oxa1 kann somit in beide Stämme importiert und in die mitochondriale Innenmembran integriert werden. Die Quantifizierung (Abb. 18B) bestätigt, dass es keinen Unterschied zwischen den Stämmen gibt.

2.5.2 In $\Delta ema19$ befindet sich mehr Oxa1 am ER

Die vorherigen Ergebnisse zeigen keine Akkumulation des Vorstufenproteins Oxa1 im Zytosol von $\Delta ema19$ Zellen. Mit einem Western Blot kann somit keine Aussage getroffen werden, ob die Lokalisation von Oxa1 in der Mutante gleich der des Wildtyps ist. Dazu wurde nun ein so genannter „Split-sfGFP“ Versuch durchgeführt. Dadurch kann festgestellt werden, ob Oxa1 am ER oder in den Mitochondrien sitzt. Dazu wird das Fluoreszenzprotein sfGFP („*superfolder Green Fluorescent Protein*“) als zwei Teile in der Zelle exprimiert^{67,68}. Auf einem Plasmid befindet sich der C-Terminus als kleiner Teil des sfGFP (sfGFP 11) am C-Terminus von Oxa1. Wird Oxa1 also synthetisiert, wird dieser Teil des sfGFP ebenfalls exprimiert. Auf einem weiteren Plasmid sitzt der N-Terminus des sfGFP (sfGFP 1-10) entweder am C-Terminus von Oxa1 oder am C-Terminus von Sec63. Der N-Terminus von sfGFP befindet sich daher entweder an den Mitochondrien oder am endoplasmatischen Retikulum. Wird Oxa1 mit dem sfGFP-11 synthetisiert, finden sich beide Stücke sfGFP dann an den Mitochondrien oder am ER. Dabei muss keine Interaktion der beiden Proteine stattfinden. Es genügt schon die geringe Nähe, sodass beide sfGFP-Teile miteinander interagieren können. Die entstandene Fluoreszenz kann mit einem Fluoreszenz Plate Reader gemessen werden und es können Rückschlüsse über die Lokalisation von Oxa1 geschlossen werden. Diese Methode wurde von Katharina Knöringer in der Abteilung Zellbiologie entwickelt.

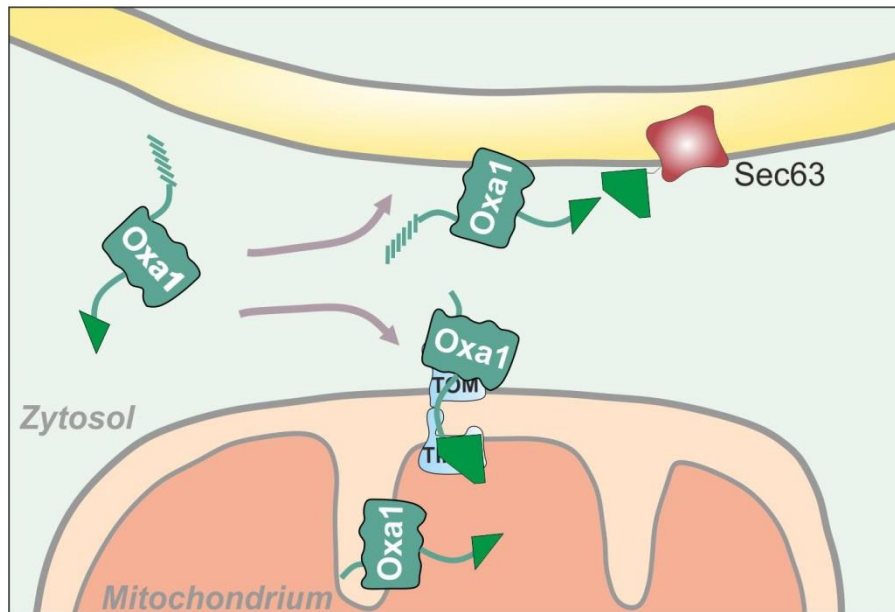


Abb. 19: Schematische Darstellung des Split-sfGFP Versuchs. sfGFP wird in zwei Teilen exprimiert. sfGFP 11 wird mit dem Protein synthetisiert, dessen Lokalisation untersucht werden soll. sfGFP 1-10 wird mit dem Protein synthetisiert, das entweder am ER oder an den Mitochondrien sitzt. Sobald beide Teile des GFP sich in sehr geringen Abstand befinden, kann Fluoreszenz gemessen werden und somit Aussagen über die Lokalisation getroffen werden.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, wo Oxa1 lokalisiert ist, wenn es vollständig synthetisiert wird oder als Variante, der die Präsequenz fehlt (ΔN -Oxa1). *OXA1-GFP11* oder *ΔN -OXA1-GFP11* wurden zusammen mit *SEC63-GFP1-10* im Wildtyp oder *$\Delta ema19$* exprimiert und die Fluoreszenz gemessen. Sowohl das Vollängenprotein als auch die verkürzte Version zeigen eine höhere Fluoreszenz in der Mutante. Dadurch kann auf eine vermehrte Lokalisation von Oxa1 am ER geschlossen werden.

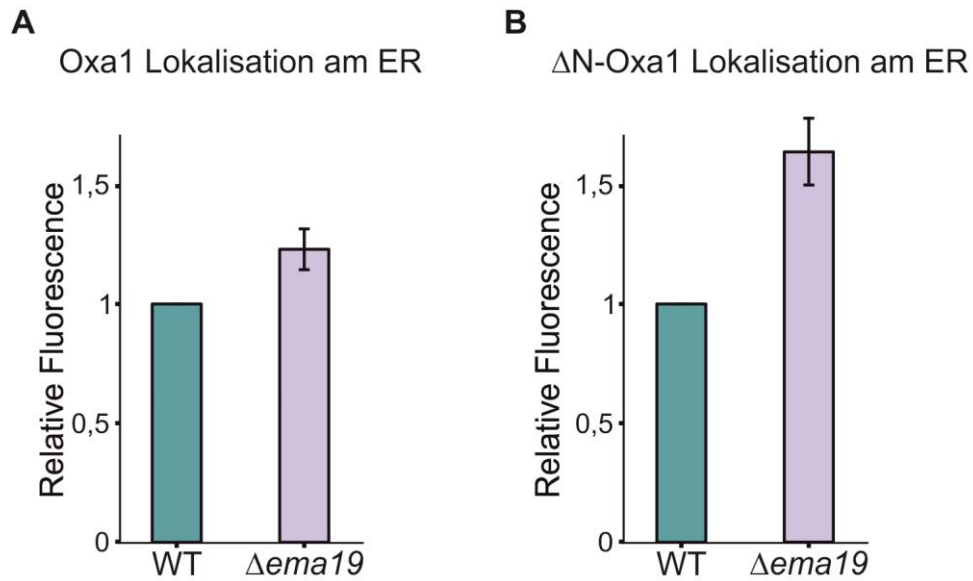


Abb. 20: Oxa1 ist mehr am ER lokalisiert in $\Delta ema19$. Gezeigt ist die Fluoreszenzmessung des Split-GFP Versuchs mit *SEC63-GFP1-10* als ER-Protein und *OXA1-GFP11* (**A**) oder *ΔN -OXA1-GFP11* (**B**). Interagieren beide Teile GFP durch sehr geringen Abstand der Fusionsproteine, fluoresziert GFP. Diese Fluoreszenz gibt Auskunft über die Lokalisation des Proteins. Gemessen wurden drei technische Replikate. Sowohl Oxa1 als auch ΔN -Oxa1 befinden sich in der *EMA19*-Deletionsmutante vermehrt am ER verglichen zum Wildtyp.

Dieses Ergebnis sollte nun durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Da der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante bei der Lokalisation von ΔN -Oxa1 größer ist, sollte dieser Stamm mikroskopiert werden. $\Delta ema19$ mit der Oxa1 Lokalisation wurde ebenfalls mikroskopiert. Die Mikroskopiebilder dienen nur zur Kontrolle des splitGFPs.

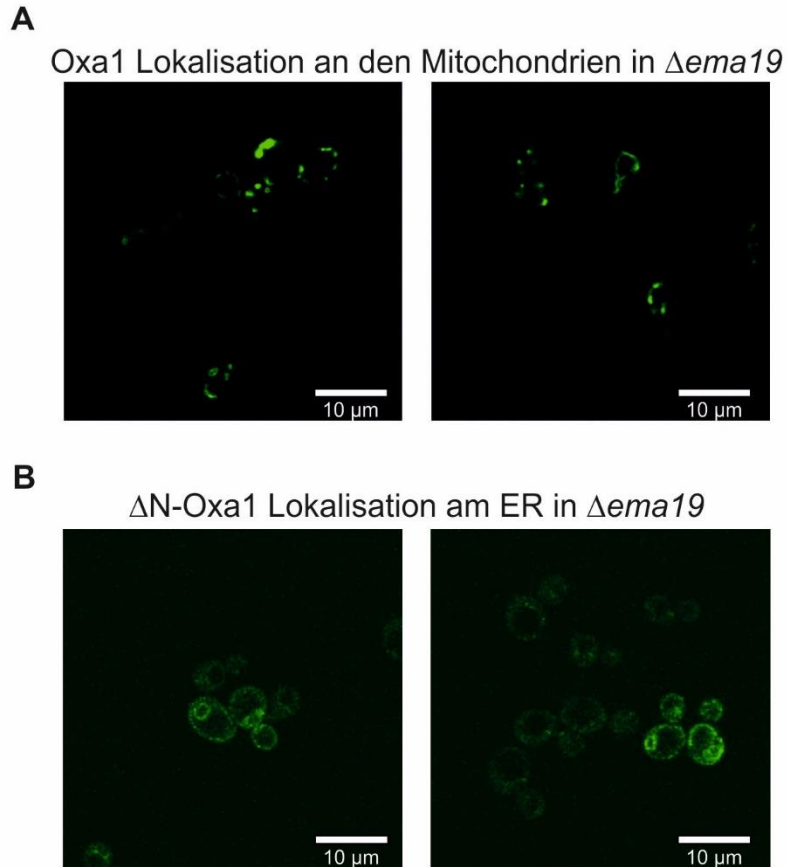


Abb. 21: Oxa1 wird ohne Präsequenz am ER mislokalisiert. Zur Untersuchung der Lokalisation wurde ein Split-GFP Versuch mikroskopisch durchgeführt. Es wurde als Kontrolle in $\Delta ema19$ **(A)** *OXA1-GFP1-10* und *OXA1-GFP11* exprimiert, sodass eine mitochondriale Lokalisation zu sehen ist. Wird *OXA1* ohne Präsequenz zusammen mit *SEC63-GFP1-10* exprimiert **(B)**, so ist eine ER-Struktur zu erkennen.

Auch mikroskopisch ist eine ER-Lokalisation von ΔN -Oxa1 zu erkennen. Betrachtet man sich die Bilder in Abb. 21B, so sieht man eine typische Struktur des endoplasmatischen Retikulums. Zum Vergleich sieht man in Abb. 21A eine mitochondriale Lokalisation, wenn beide Teile GFP an Oxa1 fusioniert sind und beides an die Mitochondrien transportiert wird. Es ist außerdem zu erkennen, dass die Auflösung der Bilder unterschiedlich ist. Diese ist schlechter für die Bilder der ER-Lokalisation. Der Grund hierfür liegt in der deutlich schwächeren Fluoreszenz für die ER-Lokalisation. Nichtsdestotrotz bestätigen die Bilder die Auswertung der Split-GFP Messungen.

2.6 Identifizierung neuer Interaktionspartner durch Massenspektrometrie

Durch die Ermittlung der Lokalisation von Oxa1 in $\Delta ema19$ konnten nun erste Hinweise erbracht werden, dass Ema19 tatsächlich Oxa1 beeinflusst. Ob dieser Einfluss allerdings direkt oder indirekt ist, ist nicht bekannt. Im Folgenden sollte noch weitere Interaktionspartner identifiziert werden. Dabei wäre vor allem interessant, ob Ema19 mit weiteren mitochondrialen Proteinen interagiert. Diese Interaktionspartner sollten mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

Dafür wurde zunächst der endogene Promotor von *EMA19* durch den *NOPI* Promotor ersetzt, wodurch eine Überexpression von Ema19 stattfindet. Überexpressionen haben in der Zelle Vor- und Nachteile. Einerseits kann es dadurch leicht zu Artefakten und falsch positiven Ergebnissen kommen, da mehr Ema19 vorliegt und so auch mehr Proteine dran binden können. Genau das hat aber auch den Vorteil, dass Interaktionen besser gemessen werden können. Ema19 ist ein kleines Protein, das nur in sehr geringer Zahl in der Zelle vorliegt⁶⁹, weshalb die Überexpression eine Bindung der Interaktionspartner steigert. Dadurch können bessere Ergebnisse in der Massenspektrometrie erzielt werden.

Am C-Terminus von wurde Ema19 GFP genomisch integriert. Dadurch konnte eine Immunopräzipitation wie in 5.4.9 beschrieben, durchgeführt werden. Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm verwendet. Dadurch konnten bei der späteren Analyse unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden. Außerdem wurde als weitere Kontrolle GFP im Wildtyp exprimiert, sodass auch spezifische Bindungen an das grün fluoreszierende Protein kontrolliert werden konnten. Zusätzlich wurde der Ema19-GFP Stamm mit und ohne Cycloheximidzugabe betrachtet. Cycloheximid stoppt die zytosolische Translation. Dadurch können transiente Interaktionspartner an Ema19 länger verweilen, da sie nicht dem nächsten neu synthetisierten Protein weichen müssen. Durch Proben mit und ohne Cycloheximidbehandlung können also transiente und permanente Bindungspartner aufgewiesen werden.

Die Ema19-GFP Proben mit und ohne Cycloheximid wurden jeweils mit den beiden Kontrollen verglichen. So wurde ermittelt, wie häufig die Proteine angereichert waren. Überraschenderweise wurden einige mitochondriale Proteine als Interaktionspartner mit Ema19 gefunden.

Tab. 1: Ema19 interagiert mit mitochondrialen Proteinen. Auswertung der Massenspektrometrie nach Immunopräzipitation. Gesucht wurden Interaktionspartner von Ema19. Dargestellt sind alle Proteine, die Interaktionen mit Ema19 zeigen. Auffällig sind die vielen mitochondrialen Proteine. Die angereicherten Proteine sind in abnehmender Reihenfolge dargestellt. Die Massenspektrometrie und die Auswertung dazu wurden von Dr. Markus Räsche aus der AG Storchova an der TU Kaiserslautern übernommen.

Ema19	Gna1	Aim3	Sec12	Vps21	Ham1	Vba4
Ste2	Lsm6	Pdr15	Urb2	Bud21	Msc7	Cue4
Did2	Cwh43	Rpl31B	Inh2	Tfa2	Rpl31A	Irc22
Vtc1	Sod2	Atp17	Rpl26A	YLR363W-A	Pcc1	Dpl1
Bar1	YKL077W	Sbh1	Ayr3	Yip1	Hbt1	Hsp31
Lys2	Put2	Rpl39	Htl1	Rsm25	Atp16	Rrp43
Coq5	Yet1	Yet3	Mic19	Vhs2	Erp3	Cox20
Mam33	Hef3	Glo2	Mic20	Bug1	Nma2	Sdh2
Slm1	Atp15	Tan1	Mic21	Gcd10	Pcc1	Nsr1
Ntf2	Prc1	Pan6	Mic22	Vac14	Emi2	Scs7
Pma2	Rpl36A	Cox5B	Mic23	Fum1	Mrs4	Sam50
Ndi1	Rga2	Rpc37	Rps31	Rie1	Neo1	Hxt6
Erp4	Get1	Rpb11	Fcf2	Ssp120	Tma17	Gpp2
Vti1	Erp2	Tpd3	Rpl29	Srp101	Sit4	Sec61
Rbk1	Tom20	Mrpl40	Avt1	YCR075W-A	Erp1	Lac1
Cha1	Hxt2	Ptc1	Lam6	SMT3	Zrg17	Pma1
Rio2	Caf130	Rpo31	Vps5	Flc3	Ado1	Stt3
Hir3	Fmp42	Rep2	Ras2	Emp70	Hif1	Gsh1

↓

mitochondriale Proteine

Sehr auffällig dabei ist, dass viele Komponenten des MICOS- („*Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System*“) identifiziert wurden. Der MICOS-Komplex sitzt an den Cristae der mitochondrialen Innenmembran und verbindet diese miteinander. Außerdem bildet er die Kontaktstelle zwischen innerer und äußerer Membran^{10,70}. Weitere Proteinen aus den Cristae wurden ebenfalls aufgezeigt, wie beispielsweise Ndi1, Atp15 oder Atp17. Diese Proteine sind Teil der Atmungskette.

Interessanterweise sind die meisten Kandidaten Membranproteine. Dies könnte auf die mögliche Interaktion mit Ema19 hindeuten. Allerdings sollten hierzu weitere Experimente unternommen werden, um eine tatsächliche Interaktion zu bestätigen. Die Verbindung von Ema19 zu mitochondrialen Proteinen wird hier jedoch abermals deutlich.

2.7 Der Import mitochondrialer Proteine wird von Ema19 nicht beeinflusst

2.7.1 Ein *in vitro* Import in isolierte Mitochondrien zeigt keinen Unterschied in $\Delta ema19$

Da es nun mehrere Hinweise auf die Rolle von Ema19 beim Trans- und Import gibt, sollte daher *in vitro* der Import mitochondrialer Proteine untersucht werden. Dazu wurden Mitochondrien von Wildtyp und $\Delta ema19$ isoliert und anschließend wurden verschiedene Proteine radioaktiv markiert und *in vitro* in die Mitochondrien importiert. So konnte deren Importkinetik analysiert werden konnte. Es wurden unterschiedliche Proteine verwendet, die verschiedene Sublokalisationen in den Mitochondrien vorweisen. Es konnte allerdings kein Unterschied in der Importkinetik in der *EMA19* Deletionsmutante festgestellt werden. Dies zeigt wiederum, dass Ema19 keine Rolle direkt an den Mitochondrien spielt.

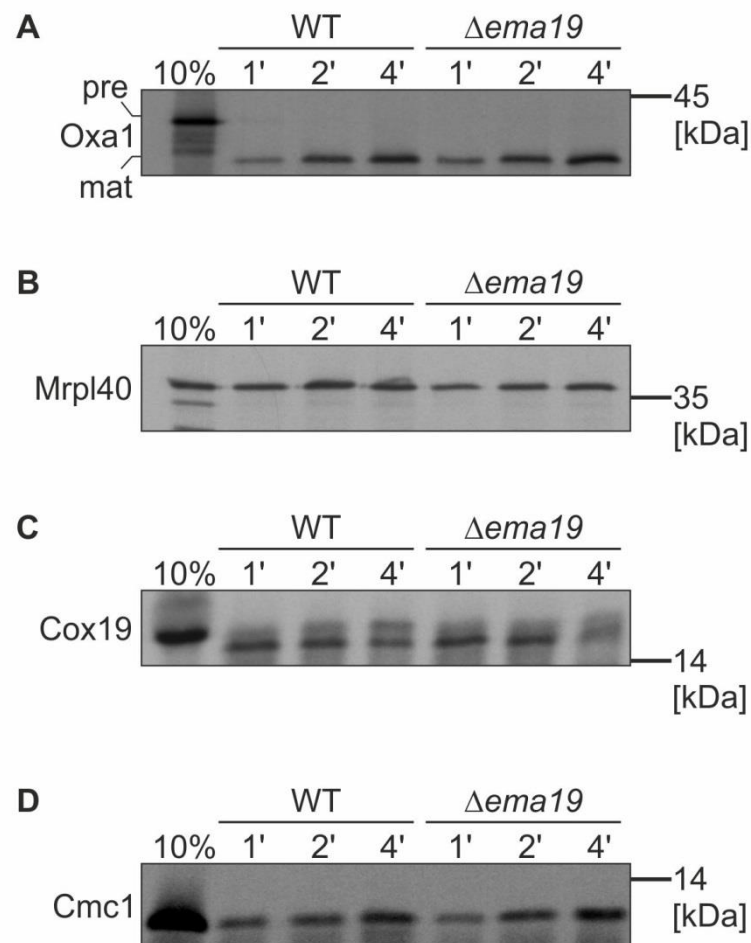


Abb. 22: Mitochondriale Proteine zeigen in $\Delta ema19$ *in vitro* die gleiche Importkinetik wie im Wildtyp. Für den Import wurden isolierte Mitochondrien aus Wildtyp und $\Delta ema19$ Zellen benutzt. Die Proteine **(A)** Oxa1, **(B)** Mrpl40, **(C)** Cox19 und **(D)** Cmc1 wurden radioaktiv markiert und anschließend in die Mitochondrien importiert. Danach wurden alle Proben auf Eis mit Proteinase K behandelt,

sodass nicht importierte Proteine abgebaut wurden. Somit sind nur importierte Proteine sichtbar. Alle Proben wurden mittels SDS-Gel aufgetrennt und anschließend über Autoradiographie detektiert. 10% der radioaktiv markierten Proteine pro Reaktion wurden als Kontrolle geladen. Alle Proteine werden gleich importiert, die Deletion von *EMA19* zeigt keinen negativen Effekt.

Oxa1 wurde für den Import benutzt, da dieses Protein ausschlaggebend für die Untersuchung von Ema19 und dessen Einfluss auf mitochondriale Proteine war. Mrpl40 war außerdem eines der Proteine, die mittels Massenspektrometrie als Interaktionspartner mit Ema19 entdeckt wurden. Es ist ein Protein der großen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen und liegt somit in der Matrix der Mitochondrien vor⁷¹. Cox19 und Cmc1 sind kleine Proteine aus dem Intermembranraum, die über das MIA-Importsystem (siehe 1.3.1.4 „das MIA-System“) in die Mitochondrien gelangen. Beide gehören zur Gruppe der Twin-Cx₉C-Proteine des Intermembranraumes. Cmc1 und Cox19 sind außerdem bei der Assemblierung der Cytochrom c Oxidase beteiligt⁷²⁻⁷⁴. Der Import zeigt bei keinem Protein einen Unterschied zwischen den Stämmen. Ema19 spielt also keine direkte Rolle beim Import mitochondrialer Proteine.

2.7.2 Die Deletion von *EMA19* zeigt beim Import in semi-intakte Zellen keinen direkten Einfluss

Im *in vitro* Import in isolierte Mitochondrien zeigte die Deletion von *EMA19* keinen Effekt. Dies könnte daran liegen, dass bei der Isolation von Mitochondrien nur wenig ER vorliegt. Somit können auch keine anderen als mitochondriale Proteine den Import beeinflussen. Als ER-Protein ist Ema19 in diesen Mitochondrien nicht mehr vorhanden und kann deshalb den Transport der Proteine über die Membranen nicht mehr direkt beeinflussen. Aus diesem Grund wurde eine neue Methode entwickelt, um sich den mitochondrialen Import in einem Versuch anzuschauen, der der *in vivo* Situation ähnlicher ist.

2.7.2.1 Semi-intakte Hefezellen können für einen *in vitro* Proteinimport in Mitochondrien genutzt werden

Mit semi-intakten Zellen kann man den Import in unterschiedliche Organellen untersuchen, da alle Organellen weiterhin in der Zelle vorliegen. Dafür werden zuerst Spheroblasten hergestellt, indem die Zellwand der Hefezellen enzymatisch abgebaut wird. Durch sehr langsames Einfrieren der Zellen über flüssigem Stickstoff entstehen Poren in der Plasmamembran, durch die die semi-intakten Zellen Proteine und andere große Moleküle von außen aufnehmen können (Abb. 23A). Dabei ist besonders die Dauer des Einfrierens, die Größe des Eimers, in dem sich der Stickstoff befindet und der Abstand zwischen den Zellen und des Stickstoffes wichtig (Abb. 23 B; C). Direkt nach der Porenbildung können die nun entstandenen semi-intakten Zellen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Es kann aber auch direkt ein *in vitro* Import durchgeführt werden, wie er auch schon für isolierte Mitochondrien bekannt ist. Die Zellen sollten in jedem Fall schnell verbraucht

werden, da die Aufnahmekompetenz mit der Zeit stark sinkt und sie dann nicht mehr für einen Importversuch benutzt werden können.

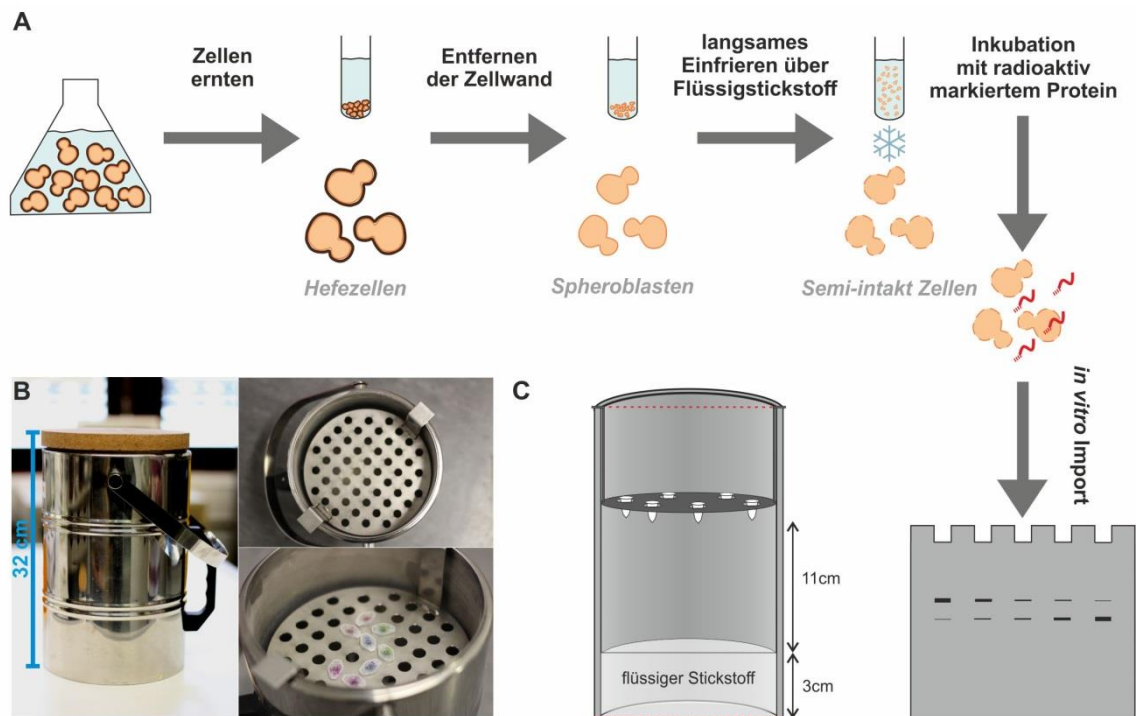


Abb. 23: Semi-intakte Zellen können für einen *in vitro* Import genutzt werden. (A) Schematische Darstellung der Bearbeitung von Hefezellen, um semi-intakte Zellen zu gewinnen. Nach der Porenbildung über flüssigem Stickstoff können die Zellen direkt im Importversuch benutzt werden. (B;C) Bei der Porenbildung sind mehrere Faktoren entscheidend. Der Eimer, in dem die Proben über dem Stickstoff eingefroren werden, muss die richtige Größe haben und der Abstand zwischen Proben und Stickstoff muss bei jeder neuen Präparation gleich sein ⁹. Abbildung bearbeitet aus Laborenz, Hansen *et al.* (2019).

Zum Vergleich wurden drei unabhängige Replikate von Wildtypzellen aus Glukose- oder Galaktosemedium geerntet und zu semi-intakten Zellen verarbeitet. Danach wurde ein *in vitro* Import mit radioaktiv markiertem Oxa1 durchgeführt. Beide Medien scheinen geeignet zu sein, da in allen Replikaten auf Glukose oder Galaktose Import von Oxa1 stattfinden kann.

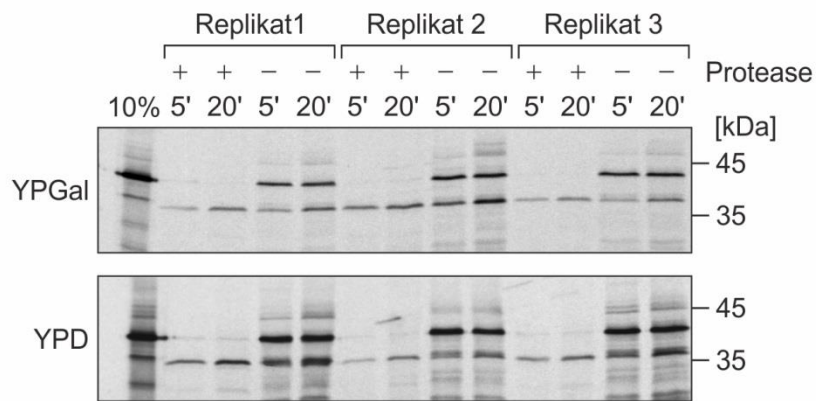


Abb. 24: Semi-intakte Zellen können zum *in vitro* Import benutzt werden. Semi-intakte Zellen wurden aus Wildtypzellen hergestellt, die entweder in Glukose- oder Galaktosemedium zur exponentiellen Phase gewachsen sind. Nach der Inkubation bei 30°C wurden nach 5 min und 20 min Proben entnommen, sodass eine Importkinetik zu erkennen ist. Durch eine Proteasebehandlung wird die unprozessierte Form von Oxa1 im Zytosol abgebaut, sodass nur noch die importierte Form sichtbar ist. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel geladen und die radioaktiven Proben mittels Autoradiographie detektiert. 10% des radioaktiv markierten Oxa1 pro Reaktion wurde als Kontrolle geladen. In allen drei Replikaten kann Oxa1 importiert werden, unabhängig von der Kohlenstoffquelle.

Nach dem erfolgten Import wurde die Hälfte der Proben mit Protease behandelt, sodass nicht importiertes Oxa1 abgebaut wurde. Dadurch ist nur noch die prozessierte Form sichtbar, die sich in den Mitochondrien befindet. Obwohl Oxa1 in allen Replikaten nachgewiesen werden kann, gibt es dennoch leichte Schwankungen in der Effizienz des Imports. Vergleicht man beispielsweise Replik 1 und 2 der semi-intakten Zellen aus Galaktose, scheint die Bande nach 5 min bei Replik 2 stärker als bei Replik 1 (Abb. 24). Deshalb sollten die Stämme, die man direkt miteinander vergleichen will, immer zusammen bearbeitet werden. Somit sind die Konditionen für alle gleich.

2.7.2.2 Semi-intakte Zellen besitzen weiterhin eine zelluläre Struktur

Durch den Abbau der Zellwand und das Permeabilisieren der Plasmamembran, kann das Zytosol und die darin enthaltenen Proteine teilweise verloren gehen^{75,76}. Um sich die allgemeine Morphologie näher betrachten zu können, wurden elektronenmikroskopische Bilder aufgenommen. Dünne Schnitte von semi-intakten Zellen wurden gefärbt, sodass die Membranen der verschiedenen Organellen unter dem Elektronenmikroskop sichtbar waren.

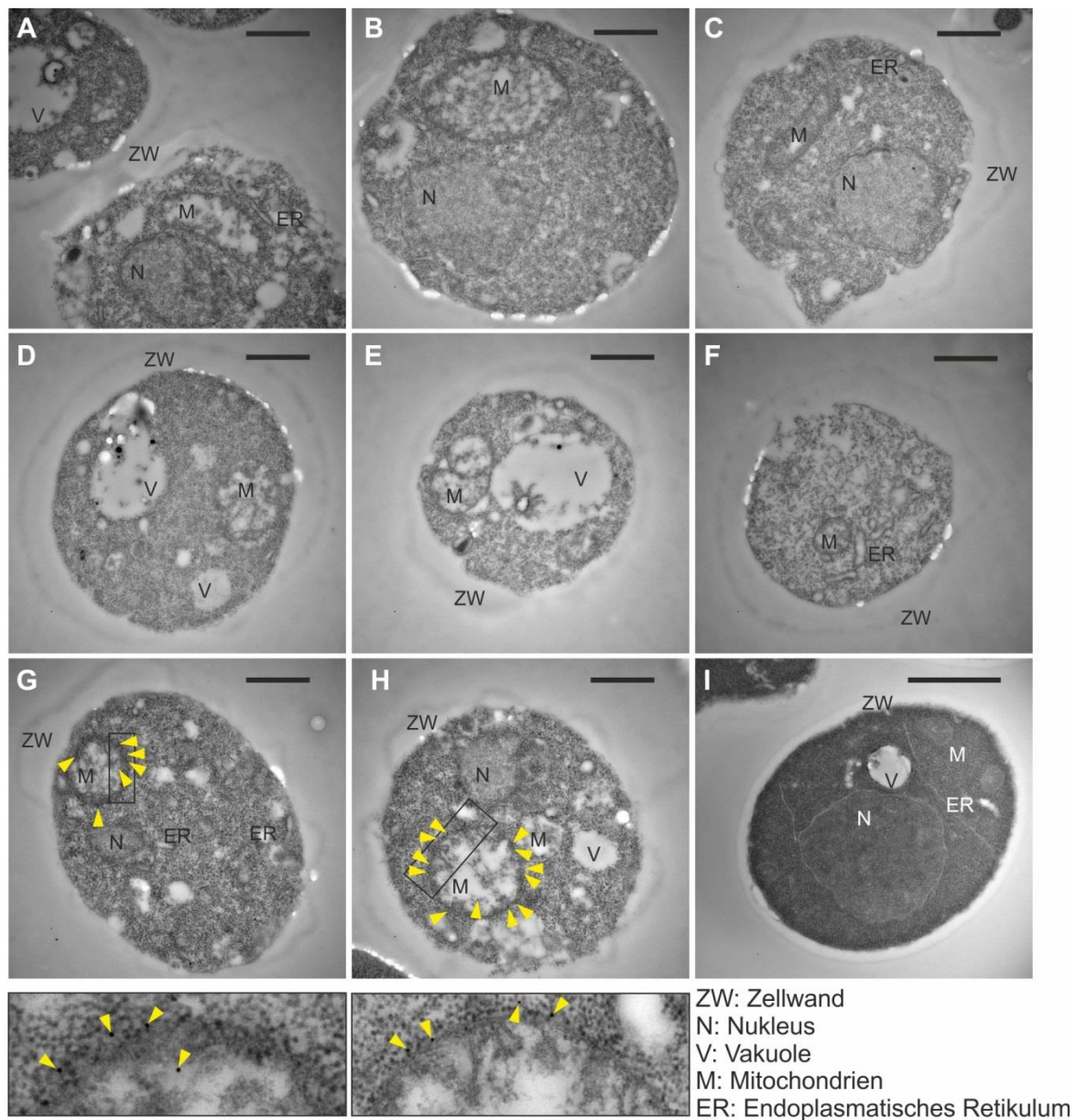


Abb. 25: Semi-intakte Zellen behalten ihre zelluläre Struktur. (A-H) Semi-intakte Zellen oder (I) ganze Zellen wurden aus Wildtypzellen in Galaktosemedium isoliert und zur elektronenmikroskopischen Aufnahme vorbereitet. (G-H) Durch Immunogoldfärbung des Proteins Porin, wird die Außenmembran der Mitochondrien gefärbt. Die Bilder unter G und H zeigen Nahaufnahmen der beiden Bilder. Die gelben Pfeile zeigen die Goldpartikel, die sich durch Porin an den Mitochondrien befinden. Die Mikroskopiebilder wurden von Cristina Prescianotto-Baschong am Biozentrum der Universität Basel aufgenommen. Die Abbildung wurde bearbeitet aus Labrenz, Hansen *et al.* (2019).

Durch den Verlust des Zytosols und zytosolischer Proteine zeigen die Bilder eine geringere Elektronendichte verglichen mit einer intakten Zelle (Abb. 25I). Durch Immunogoldfärbung wurde das mitochondriale Protein Porin angefärbt (Abb. 25 G, H). Porin ist ein Protein in der Außenmembran der Mitochondrien, das beim Transport von Proteinen und Metaboliten in die Mitochondrien hilft ^{77,78}. Die Goldpartikel, mit denen Porin angefärbt wurde, sind an der Außenmembran der Mitochondrien zu erkennen. Somit kann diese Struktur in den Mikroskopiebildern eindeutig als Mitochondrium identifiziert werden ⁹. In Abb. 25 A und B sind die Mitochondrien etwas angeschwollen, was zur Vergrößerung der Matrix und einer Verringerung des Intermembranraumes führt. Die innere und äußere Membran liegen dann sehr nah beieinander.

In anderen Zellen besitzen die Mitochondrien dagegen eine normale Morphologie, während die Vakuole (Abb. 25 D, E) oder das Endoplasmatische Retikulum (Abb. 25 F) angeschwollen sind. Obwohl also die Morphologie der einzelnen Organellen etwas verändert sein kann, zeigen semi-intakte Zellen generell die gleiche Struktur und Größenverhältnisse der unterschiedlichen Membranen wie intakte Zellen und können somit für *in situ* Studien verwendet werden ⁹.

2.7.2.3 Ema19 beeinflusst den Import mitochondrialer Proteine nicht

Nach der Etablierung der Semi-intakten Zellen sollte sich der *in vitro* Import mitochondrialer Proteine in Wildtyp und $\Delta ema19$ betrachtet werden. Dazu wurden beide Stämme in Galaktosemedium bis zur exponentiellen Phase angezogen und im Anschluss semi-intakte Zellen präpariert. Es wurden danach mehrere radioaktiv markierte Proteine importiert.

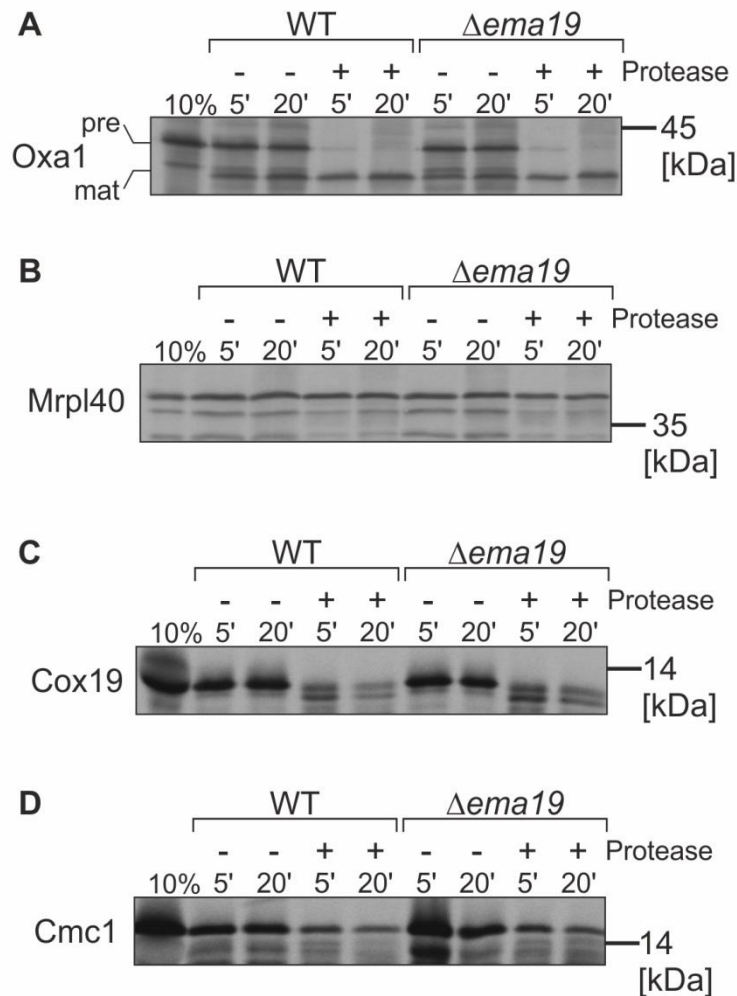


Abb. 26: In vitro Import in semi-intakten Zellen zeigt keinen Unterschied in $\Delta ema19$. Semi-intakte Zellen wurden aus dem Wildtyp und $\Delta ema19$ isoliert. Die Proteine **(A)** Oxa1, **(B)** Mrpl40, **(C)** Cox19 und **(D)** Cmc1 wurden radioaktiv markiert. Anschließend wurde ein *in vitro* Import durchgeführt. Durch die Inkubation mit Proteinase K auf Eis werden nicht importierte Proteine abgebaut, sodass nur noch importierte Proteine vorhanden sind. Die Proben wurden mittels SDS-Gel aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie detektiert. 10% der radioaktiv markierten Proteine pro Reaktion wurden als Kontrolle geladen. Alle Proteine werden gleich importiert, die Deletion von *EMA19* zeigt keinen negativen Effekt.

Um den Import in isolierte Mitochondrien und semi-intakte Zellen vergleichen zu können, wurden die gleichen radioaktiv markierten Proteine verwendet. In semi-intakten Zellen sind noch alle Organellen und deren Proteine vorhanden, sodass diese Einfluss auf den Import

mitochondrialen Proteine haben können. Allerdings wurde auch hier kein Unterschied zwischen den Stämmen gesehen. Die Proteine können in $\Delta ema19$ genauso gut importiert werden wie im Wildtyp. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Ema19 keine direkte Rolle beim Import spielt.

2.8 Erv1 wird langsamer abgebaut in $\Delta ema19$

2.8.1 Die Proteinmenge von Erv1 ist $\Delta ema19$ höher als in WT-Zellen

Bisher konnte gezeigt werden, dass Ema19 die Lokalisation von Oxa1 beeinflusst. Einen direkten Einfluss auf den Import mitochondrialer Proteine konnte nicht nachgewiesen werden. Um einen Überblick über die Gesamtmenge einzelner Proteine in der Zelle zu erlangen, wurde im nächsten Schritt ein Western Blot durchgeführt. Die Menge des IMS-Proteins Erv1 ist deutlich höher, wenn *EMA19* deletiert ist.

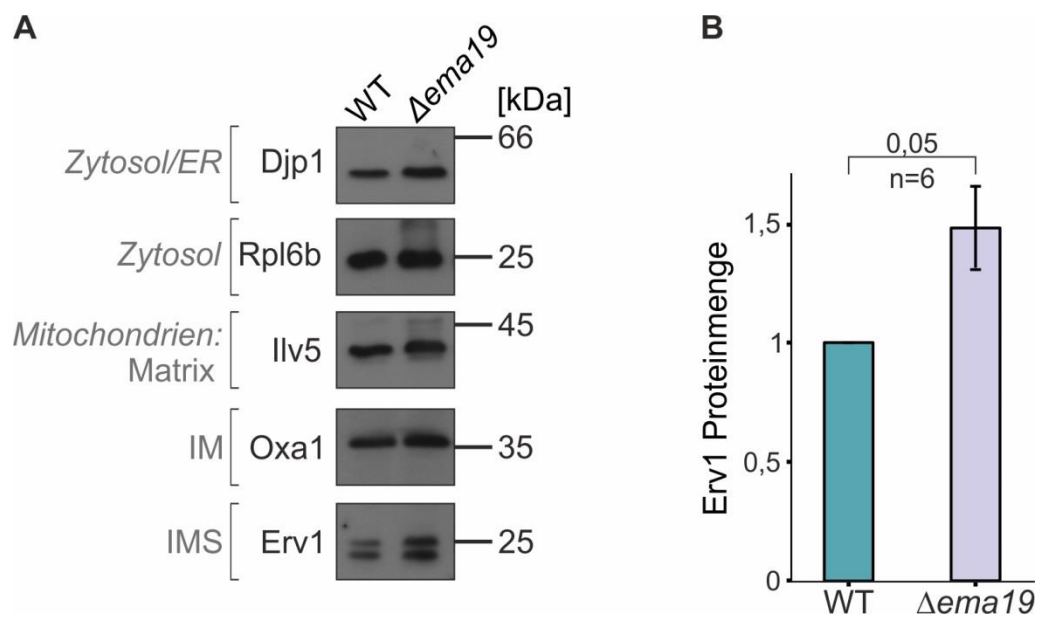


Abb. 27: Die Proteinmenge von Erv1 ist in $\Delta ema19$ höher. (A) WT und $\Delta ema19$ wurden in Glukosemedium bis zur exponentiellen Phase wachsen gelassen. Danach wurde eine OD_{600} von 2 geerntet und die Zellen mit einer Glassbeadlyse aufgebrochen. Das Zellysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, danach wurde ein Western Blot durchgeführt. Folgende Antikörper wurden benutzt: α -Djp1, α -Rpl6B, α -Ilv5, α -Oxa1, α -Erv1. Die Banden für Erv1 sind in $\Delta ema19$ deutlich stärker als im Wildtyp. **(B)** Quantifizierung der Proteinmenge von Erv1 relativ zum Wildtyp.

Als Ladekontrolle wurde das zytosolische Protein Rpl6b verwendet. Rpl6b ist ein Teil des 60S Ribosoms. Verschiedene kleine Komplexe des 60S Ribosoms setzen sich im Zytosol zusammen, bevor sie unter anderem mithilfe von Rpl6b zu einem Ribosom zusammenfinden⁷⁹. Die Banden von Rpl6b sehen im Western Blot für beide Stämme gleich aus, was zeigt, dass die gleiche Menge an Zellysate geladen wurde.

Für Djpl sehen beide Banden ebenfalls gleich aus. Da schon in 3.4 eine Verbindung zu Djpl gesucht wurde, sollte hier noch die Proteinmenge in der Mutante analysiert werden. Abermals lässt sich kein Zusammenhang finden zwischen Djpl und Ema19.

Im nächsten Schritt sollten mitochondriale Proteine aus unterschiedlichen Subkompartimenten untersucht werden. Dazu wurde als Matrixprotein ein Ilv5-Antikörper gewählt. Ilv5 ist wichtig für die Aminosäuresynthese in den Mitochondrien und bindet mitochondriale DNA und hilft somit bei der Bildung sogenannter Nukleoide^{80,81}. Auch für dieses Protein ist kein Unterschied in der Bandenstärke der zwei Stämme zu verzeichnen.

Das Gleiche ist auch für Oxal1 zu sehen. Da Ema19 zumindest die Lokalisation beeinflusst, war es interessant zu sehen, ob sich die Proteinmenge in der Deletionsmutante ändert. Dies kann jedoch nicht nachgewiesen werden, da hier die Banden im Western Blot für beide Stämme gleich sind. Die Proteinmenge von Oxal1 ist also unabhängig von der Lokalisation.

Als letztes Protein wurde Erv1 als Teil des Intermembranraumes betrachtet. Erv1 ist ein Teil des MIA-Systems (siehe 1.3.1.4). Das Flavoprotein ist die Sulphydryloxidase des Intermembranraumes. Es erfüllt verschiedene Aufgaben. Beispielsweise oxidiert es Mia40, sodass die Oxidorektuase weiter kleine IMS-Proteine oxidieren kann. Desweiteren gibt Erv1 die entstandenen freien Elektronen an FAD ab, das dann wiederum durch die Abgabe der Elektronen an Cytochrom c oder H₂O₂ oxidiert wird⁸²⁻⁸⁴. Erv1 ist essenziell für die Zelle, wodurch die Wichtigkeit dieses Proteins noch einmal hervorgehoben wird. Betrachtet man sich nun die Banden von Erv1 im Western Blot, ist diese in der Mutante deutlich stärker als im Wildtyp (Abb 27 A). Folglich ist die Proteinmenge von Erv1 erhöht, wenn Ema19 in der Zelle fehlt. Auch durch Quantifizieren mehrerer Replikate ist zu sehen, dass der Proteinlevel etwa 1,5-fach höher ist verglichen mit dem Wildtyp (Abb 27B). Ema19 scheint also in Verbindung mit Erv1 zu stehen. Im Folgenden soll der Einfluss von Ema19 auf Erv1 näher untersucht werden.

2.8.2 *Ema19 ist beim Abbau von Erv1 beteiligt*

Ema19 zeigte bisher keinen Einfluss auf den Import von mitochondrialen Proteinen. Auch mit Erv1 wurde ein *in vitro* Import in isolierte Mitochondrien und semi-intakte Zellen getestet und kein Unterschied festgestellt. Wieso nun aber die Proteinmenge von Erv1 höher ist, sollte anhand eines Pulse-Chase-Versuchs getestet werden. Dabei wird während der Proteintranslation radioaktives Methionin eingebaut. Die Zugabe des Methionins ist in diesem Fall der Pulse. Gibt man nach einer bestimmten Zeit nicht-radioaktiv markiertes Methionin dazu, wird nur noch dieses eingebaut. Danach werden mehrere Proben abgenommen und nach der Lyse eine Immunopräzipitation durchgeführt, sodass der Abbau des radioaktiven Proteins, in diesem Fall Erv1, sichtbar wird.

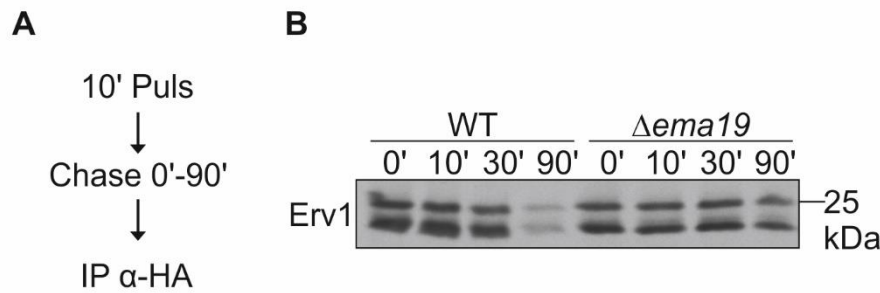


Abb. 28: Erv1 wird im Wildtyp schneller abgebaut als in $\Delta ema19$. Erv1 wird mit einem Plasmid in beiden Stämmen überexprimiert. Am C-Terminus von Erv1 liegt ein HA-Tag. Um den Abbau von Erv1 sichtbar zu machen, wurde zuerst ein 10-minütiger Puls mit radioaktiv markiertem Methionin durchgeführt. Danach erfolgte der Chase mit kaltem Methionin für 0 bis 90 Minuten. Mithilfe des HA-Tags erfolgte eine Immunopräzipitation (**A**). Die Proben wurden dann auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Autoradiographie detektiert. Nach 90' zeigen die Banden deutliche Unterschiede, im Wildtyp ist Erv1 fast vollständig abgebaut, während in der Mutante immer noch starke Banden zu sehen sind (**B**).

Zwischen 0 und 10 Minuten ist in beiden Stämmen kein Unterschied zu sehen. Allerdings scheint die Bande im Wildtyp nach 30 Minuten etwas schwächer als in $\Delta ema19$. Dieser Kontrast wird nach 90 Minuten noch viel deutlicher. Während die Bande für den Wildtyp schon fast nicht mehr zu erkennen ist, zeigt die Mutante erstaunlicherweise immer noch starke Banden für Erv1. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Proteinmenge von Erv1 in einer *EMA19* Deletionsmutante nicht so schnell abgebaut wird wie im Wildtyp.

2.9 ΔN -Oxa1 ist stabiler in $\Delta ema19$

Durch den verzögerten Abbau von Erv1 in $\Delta ema19$, sollte im nächsten Versuch die Stabilität in der Deletionsmutante genauer untersucht werden. Wie schon in 2.6.2 zu sehen, wird vor allem Oxa1 ohne Präsequenz vermehrt am ER lokalisiert. Es wäre interessant zu sehen, ob diese Akkumulation deshalb zu detektieren war, weil der Abbau des nicht-importierten Proteins gestört war. Deshalb sollte die Stabilität von ΔN -Oxa1 untersucht werden. Hierzu wurde das Plasmid pYX223- ΔN -Oxa1-HA in den Wildtyp sowie $\Delta ema19$ transformiert. Die Expression von ΔN -OXA1 wird durch einen GAL-Promotor kontrolliert. Hinter dem Gen liegt ein HA-Tag, sodass im Western Blot ein HA-Antikörper benutzt werden kann. Die Stämme wurden über Nacht in Lactatmedium angezogen und morgens mit Galaktose induziert, sodass ΔN -Oxa1-HA exprimiert wurde. Nach vier Stunden Induktion wurden die Zelle pelletiert und in Glukosemedium aufgenommen. Nach 0 min, 30 min und 60 min wurden Proben mit einer OD_{600} 2 abgenommen und lysiert und ein Western Blot durchgeführt.

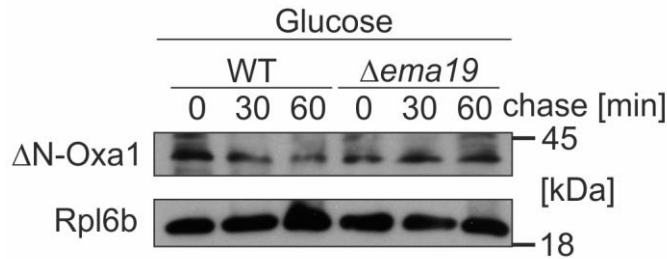


Abb. 29: Δ N-Oxa1 wird im Wildtyp schneller abgebaut als in Δ ema19. Die Stämme wurden in Lactatmedium inkubiert und die Expression von Oxa1 ohne Präsequenz mittels Galaktosezugabe induziert. Der HA-Antikörper detektiert Δ N-Oxa1, Rpl6b dient dabei als Ladekontrolle. Über die Zeit wird das Proteinlevel von Δ N-Oxa1 im Wildtyp geringer, während die Mengen in Δ ema19 gleich bleiben.

Durch den HA-Tag am C-Terminus von Δ N-Oxa1 kann im Western Blot spezifisch die Oxa1-Version ohne Präsequenz detektiert werden. Rpl6b ist auch in diesem Blot die Ladekontrolle. Außer beim Zeitpunkt 60 min des Wildtyps sehen die Banden gleich aus. Hier wurde etwas mehr als von den anderen Proben geladen. Nichtsdestotrotz zeigen die Banden für Δ N-Oxa1 im Wildtyp eine Abnahme der Proteinmenge über die Zeit. Währenddessen bleiben die Proteinlevel in Δ ema19 gleich. Da Δ N-Oxa1 durch die fehlende Präsequenz nicht importiert werden kann, wird es vermutlich direkt abgebaut. Der Unterschied zwischen den Stämmen verdeutlicht abermals, dass der Abbau von mitochondrialen Proteinen in der Mutante gestört sein könnte.

Diese Arbeit konnte deutlich zeigen, dass Ema19 keinen direkten Einfluss auf den Import von mitochondrialen Proteinen hat. Mittels Massenspektrometrie konnten jedoch viele mitochondriale Proteine identifiziert werden. Des Weiteren zeigte sich mehr Oxa1 am ER. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Erv1 in der Deletionsmutante stabiler ist, ebenso wie eine Form von Oxa1 ohne Präsequenz. Dies deutet auf eine Rolle für den Abbau von mitochondrialen Vorstufenproteinen hin. Diese Arbeit hat den ersten Schritt bei der Aufklärung der Funktion von Ema19 in Hefezellen aufgezeigt, weitere Experimente sind nötig, um die volle komplexe Funktion von Ema19 aufzudecken.

3. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, in welchem Zusammenhang Ema19 mit mitochondrialen Proteinen steht. Im Laufe des Projektes wurde immer deutlicher, dass eine direkte Rolle beim Import der Mitochondrien nicht nachgewiesen werden kann, sondern dass die Interaktion schon vorher stattfinden muss. Im Folgenden wird die Komplexität des Proteintransports in der Zelle genauer erläutert.

3.1 Proteintransport in der Zelle

3.1.1 „Not all those who wander are lost“ - J.R.R. Tolkien

Werden Proteine im Zytosol synthetisiert, können sie unterschiedliche Wege einschlagen, um zu ihrem Zielorganell zu gelangen. Dabei kann entweder die mRNA allein oder als Komplex mit dem Ribosom zu den Mitochondrien gebracht werden^{48,49,85}. Werden Proteine allerdings im Zytosol zuerst vollständig synthetisiert, können sie entweder über einen direkten Weg in die Mitochondrien importiert werden oder werden an anderen Organellen zwischengelagert. Der direkte Import erfolgt meistens dann, wenn Chaperone an die Vorstufenproteine binden, damit diese im Zytosol nicht aggregieren und um sie an die Rezeptoren des TOM-Komplexes zu weiterzuleiten^{49,55}.

Neben diesem direkten Weg von der Synthese zum Zielorganell ist mittlerweile auch vieles über alternative Transportwege bekannt. Hierbei werden mitochondriale Proteine nicht unmittelbar nach oder während der Translation zu den Mitochondrien gebracht, sondern können zu anderen Organellen als eine Art „Zwischenlager“ gebracht werden. Ein Beispiel hierfür ist der neu entdeckte ER-SURF-Transportweg, bei dem vor allem Oxa1 untersucht wurde. Oxa1 wird teilweise an das endoplasmatische Retikulum transportiert, von wo es dann über Djpl an den TOM-Komplex gebracht wird und importiert werden kann^{36,56,86}. Neue Studien haben auch einen Einfluss des GET-Transportweges auf den Import mitochondrialer Proteine gezeigt. Der GET-Transportweg besteht aus dem GET-Komplex am ER und Get3 im Zytosol, die zusammen für die Verankerung von tail-anchored Proteinen, also von Proteinen, die über eine Transmembrandomäne in der Membran verankert sind, in der ER-Membran verantwortlich sind⁸⁷. Vor allem für das Carrierprotein Oac1 konnte eine duale Lokalisation an Mitochondrien und ER gezeigt werden. Wird mitochondrialer Import blockiert und fehlen gleichzeitig Teile des GET-Komplexes, so fehllokalisiert Oac1 im Zytosol und kann weder am ER gehalten noch in die Mitochondrien gebracht werden⁸⁶.

Neben der Lagerung mitochondrialer Proteine am ER wurde auch eine Lokalisation von mitochondrialen Proteinen im Nukleus festgestellt. Hier wurde vor allem das Matrixprotein Ilv2 untersucht. Dabei fand man heraus, dass in alternden Hefezellen Ilv2 nicht nur in Mitochondrien zu finden ist, sondern auch im Nukleus. Hier können mitochondriale Proteine als so genannte Nukleus-assoziierte Proteinaggregate gelagert werden, bis diese abgebaut werden können⁸⁸.

Eine Studie von Stehlik *et al.* 2020 zeigte auch eine duale Lokalisation eines peroxisomalen Proteins in Peroxisomen und Mitochondrien. Dafür besitzt das Protein Ptc5 am C-Terminus die peroxisomale Signalsequenz PTS1 und am N-Terminus eine MTS, sodass das Protein in die Mitochondrien gebracht wird. Dort wird die Präsequenz und die dahinter liegende Transmembrandomäne von Ptc5 im Intermembranraum vom IMP (für „Inner Mitochondrial Membrane Peptidase“-Komplex abgeschnitten. Gleichzeitig bindet Pex5, das an den Peroxisomen sitzt, an das PTS1 von Ptc5. So findet eine Art Tauziehen um das Protein statt, wodurch der vollständige Import in die Mitochondrien verhindert wird. Durch diese duale Lokalisation werden Peroxisomen und Mitochondrien sehr nahe zueinander gebracht und stehen enger im Austausch miteinander⁸⁹.

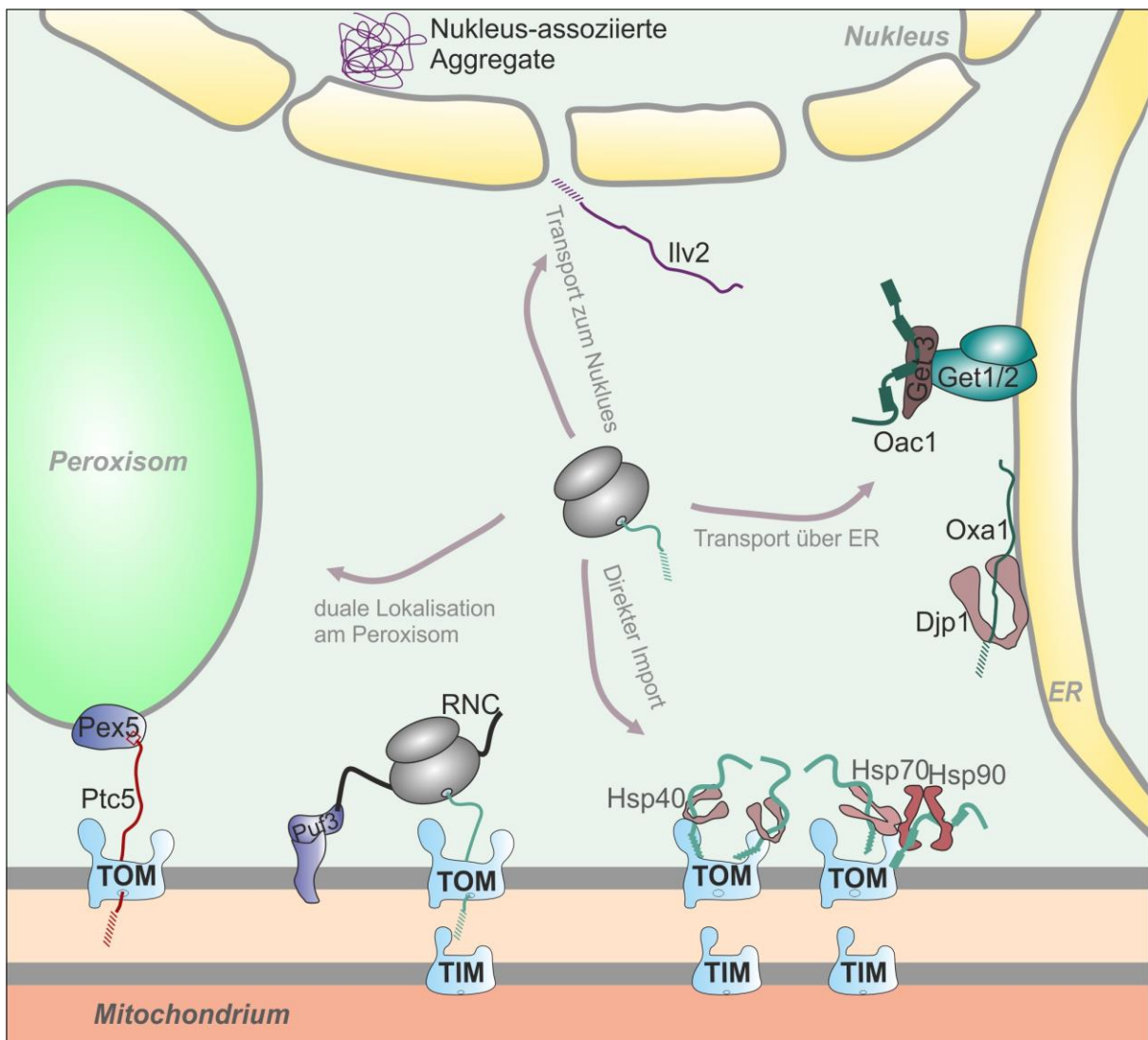


Abb. 30: Mitochondriale Proteine werden über verschiedene Wege im Zytosol transportiert. Meistens werden sie direkt in die Mitochondrien importiert. Co-translational bindet der Ribosom-Polypeptidkomplex über Puf3 an die Mitochondrien, wo das Polypeptid dann direkt in den TOM-Kanal translatiert wird. Post-translational bringen Chaperone die Vorstufenproteine an den TOM-Komplex^{49,85}. Jedoch können sie auch zuerst an das ER transportiert werden, von wo sie dann an die Mitochondrien gebracht werden können^{56,86}. Am Nucleus werden mitochondriale Proteine gelagert, damit diese nicht im Zytosol akkumulieren und somit Stress in der Zelle auslösen könnten. Diese Proteine werden dann abgebaut⁸⁸. Proteine können auch in zwei Organellen lokalisiert sein, wie dem Peroxisom und dem Mitochondrium, wodurch die Kompartimente enger in Kontakt stehen⁸⁹.

Mitochondriale Proteine können also entweder einen eher geordneten Weg im Zytosol gehen und direkt importiert werden oder über Um- oder Zwischenwege zu den Mitochondrien gelangen. Beide Arten des Imports haben Vor- und Nachteile, die im Folgenden genauer betrachtet werden.

Vor allem co-translationaler Import hat den Vorteil, dass die Proteine sehr schnell importiert werden, da die Synthese am TOM-Komplex stattfindet und somit der Transport im Zytosol entfällt. Dadurch können die Polypeptide direkt importiert werden. Dafür spricht auch, dass der Transport neu synthetisierter Proteine nicht fehlgeleitet werden kann, was zu Aggregaten und Stress in der Zelle führen kann. Für hydrophobe Proteine mit Transmembrandomänen zeigt sich hier außerdem der Bonus, dass diese sich nicht im hydrophilen Zytosol befinden, wo es schwerer ist, hydrophobe Proteine zum Zielorganell zu transportieren⁹⁰. Allerdings birgt co-translationaler Translokation auch Nachteile. Durch Synthese in den TOM-Kanal blockiert der Ribosom-Polypeptid-Komplex die Importpore so lang, bis das Protein vollständig synthetisiert ist. Da die Translation langsamer abläuft als der Import, wären mehr Importkomplexe nötig, um gleichzeitig mehr Proteine co-translational importieren zu können. Dadurch können andere Polypeptide, die post-translational transloziert werden, nicht gleichzeitig an die TOM-Rezeptoren binden und konkurrieren so stark miteinander⁴⁸.

Auch post-translationaler Import hat Vor- und Nachteile. Werden Proteine zuerst vollständig im Zytosol synthetisiert, können sie über mehrere Routen in die Mitochondrien gelangen. Zum sichersten und schnellsten Weg gehört die Interaktion der Vorstufenproteine mit Chaperonen und Co-Chaperonen. Diese verhindern die Faltung und auch die Aggregation der Polypeptide und halten sie in einem Import-kompetenten Zustand. Durch die Bindung von Hsp40, Hsp70 oder Hsp90 an die Rezeptoren des TOM-Komplexes, können die Proteine effizient importiert werden. Diese Art der Translokation hat den Vorteil, dass verschiedene Proteine gleichzeitig an Tom20 und Tom70/71 binden und somit auch wichtige Proteine vorrangig importiert werden können⁹¹. Dies konnte kürzlich für Peroxisomen gezeigt werden. Müssen viele Proteine gleichzeitig importiert werden, entsteht eine Art Konkurrenz zwischen den Proteinen, wobei diejenigen mit der höchsten Priorität als erstes importiert werden⁹². Ein weiterer Vorteil des Transports ist auch die duale Lokalisation mancher Proteine.

Mitochondriale Proteine wurden inzwischen an vielen anderen Organellen gefunden. Der Anteil hierbei ist zwar sehr niedrig, zeigt aber, dass es in der Zelle anscheinend eine Art Auffangsystem gibt. So werden mitochondriale Proteine zum Teil zu anderen Kompartimenten geleitet, um dann später importiert oder abgebaut zu werden. Dadurch liegen nicht alle Vorstufenproteine im Zytosol vor, wo sie dazu tendieren zu aggregieren. Nicht immer allerdings dient diese duale Lokalisation dem Schutz der Zelle.

3.1.2 Das Ende einer Reise oder irgendwas mit Abbau

Der Transport von Proteinen in der Zelle ist ein sehr komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren. Ein Beispiel hierfür ist die Rolle vom NAC-Komplex als Antagonist zu SRP. Bindet NAC an das Ribosom während der Translation, wird die Interaktion von SRP mit dem Ribosom gestört. Gamerdinger *et al.* konnten in *C. elegans* zeigen, dass SRP vermehrt an die Ribosomen bindet, wenn NAC in der Zelle fehlt. Dies führt allerdings zu vielen Problemen in der Zelle. Denn kann NAC keine Bildung des SRP-Ribosom-Komplexes verhindern, werden viel mehr Ribosomen an das ER gebracht. Dadurch werden die Proteine nicht mehr im Zytosol synthetisiert, sondern am ER. Vor allem mitochondriale Proteine mit vielen hydrophoben Aminosäuren können so auch in das ER eingebaut und dadurch nicht mehr an die Mitochondrien gebracht werden^{93,94}. Die Konkurrenz zweier Transportwege und die dadurch entstehende Fehllokalisierung vieler Proteine verdeutlicht hier die Vielschichtigkeit des Transports in der Zelle.

Können Proteine nicht direkt oder indirekt an ihr eigentliches Zielorganell transportiert werden, so können diese aggregieren und/oder abgebaut werden. Ein Beispiel dazu ist die nukleare Lokalisation von nicht-importierten mitochondrialen Proteinen, wie sie schon in 3.1.1 beschrieben ist. Dort werden die daraus entstehenden Proteinaggregate so lange am Nukleus gehalten, bis sie entfernt werden können⁸⁸.

Das Proteasom ist ein Komplex im Zytosol, der dem Abbau von Proteinen dient. Können mitochondriale Vorstufenproteine nicht importiert werden, weil beispielsweise der Importkanal blockiert ist, werden auch diese vom Proteasom abgebaut. Je mehr nicht-importierte Proteine sich im Zytosol finden, desto mehr Chaperone und Proteasomkomponenten werden exprimiert, um die Polypeptide abzubauen^{19,95}. Es gibt einige Systeme in der Zelle, die den Abbau mislokalisierter Proteine ermöglichen. Werden mitochondriale Proteine mit Transmembrandomäne nicht richtig importiert, werden sie im Zytosol von sogenannten Ubiquilinen abgefangen. Ubiquiline sind Chaperone, die speziell Proteine mit Transmembrandomänen binden. Durch die Interaktion zwischen Ubiquilin und Protein können diese dann vom Proteasom besser abgebaut werden, da die Ubiquiline die Aggregation der nicht importierten Polypeptide verhindern⁹⁰. Ein sehr spezialisiertes Modell zum Abbau von mitochondrialen Vorstufenproteinen ist das mitoTAD („*Mitochondrial Protein Translocation-Associated Degradation*“)-System. Hier wird verhindert, dass nicht importierte Proteine den TOM-Komplex blockieren und so andere Proteine beim Eintreten in die Mitochondrien hindern. Dabei bindet das Protein Ubx2 an den Tom70-Rezeptor. Ubx2 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, das ursprünglich beim Abbau von Proteinen am ER gefunden wurde, dem ERAD („*ER-Associated Protein Degradation*“)-System^{96,97}. Genau wie am ER bringt die Lokalisation von Ubx2 an den Mitochondrien die AAA-ATPase Cdc48 zum abzubauenen Protein. Der Cdc48-Komplex bindet dann an das Polypeptid im Importkanal und zieht es zum Proteasom, wo es schließlich abgebaut wird⁹⁸. Eine weitere AAA-ATPase, Msp1, sitzt in der Außenmembran von Mitochondrien und hilft ebenfalls beim Abbau. Werden tail-anchored Proteine, beispielsweise vom Peroxisom, an den Mitochondrien

mislokalisiert, werden sie von Msp1 gebunden und zum ER gebracht. Dort können sie wieder in die Membran eingebaut werden und dann über ERAD abgebaut werden⁹⁹.

Im Zytosol gibt es viele solcher Kontrollsysteme. Sie machen deutlich, dass es für Proteine nicht immer nur einen richtigen Weg gibt, sondern viele Alternativen. Dadurch wird eine Akkumulation von beispielsweise Vorstufenproteinen im Zytosol verhindert, die sonst zur Stressbelastung der Zelle führen würde.

3.1.3 Die Proteinfaltung - Es ist nicht immer der direkte Weg

Genau wie beim Proteintransport gibt es nicht nur einen Weg, wie ein Protein sich letzten Endes faltet. Früher wurde angenommen, dass Proteine nur einen festen Weg kennen, zu falten. Durch die Hilfe von Chaperonen sollten die Polypeptide direkt in ihren nativen Zustand gelangen, sodass sie dann ihre Funktion erfüllen können.

Christian Anfinsen hat 1973 jedoch die Theorie aufgestellt, dass Proteine eher zufällig gefaltet werden und somit mehrere Faltungswege nehmen können. Jede Faltung führe letztendlich aber zum selben Ergebnis, nämlich zur nativen Faltung des Proteins. Diese Theorie ist als „Thermodynamische Hypothese“ oder auch als „Anfinsen's Dogma“ bekannt^{100,101}. So können Proteine zwar auch entweder direkt ohne Hilfe falten, aber auch von Chaperonen gebunden werden. Durch die Chaperone und Co-Chaperone bleiben die Proteine entweder vorerst im ungefalteten Zustand, können so aber nicht mehr aggregieren oder werden dann gefaltet, sodass sie ihre Funktion in der Zelle erfüllen können. Die Faltung der Proteine allerdings ist von mehreren Umständen abhängig, wie beispielsweise seiner Aminosäuresequenz.

Chaperone können auch helfen, fehlgefaltete Proteine wieder zu entfalten und sie dann in ihre richtig gefaltete Form zu bringen. Binden keine Chaperone an diese Fehlfaltung, können sie aggregieren und müssen abgebaut werden. Es können also mehrere Formen eines Proteins in der Zelle vorliegen, bis es dann schließlich in seiner endgültigen, funktionsfähigen Form vorliegt¹⁰².

Die Wege der Proteinfaltung sind schlussendlich genauso vielfältig wie die unterschiedlichen Transportwege in der Zelle. Durch unzählige Alternativen kann die Zelle eine vermehrte toxische Proteinaggregation verhindern. Diesem Gedanken folgend, hat die Zelle dementsprechend auch viele Transportwege entwickelt, um Proteine nicht nur auf direktem Weg zum Zielorganell zu bringen, sondern auch über Umwege, sodass eine Akkumulation zu vieler ungefalteter Proteine im Zytosol verhindert werden kann.

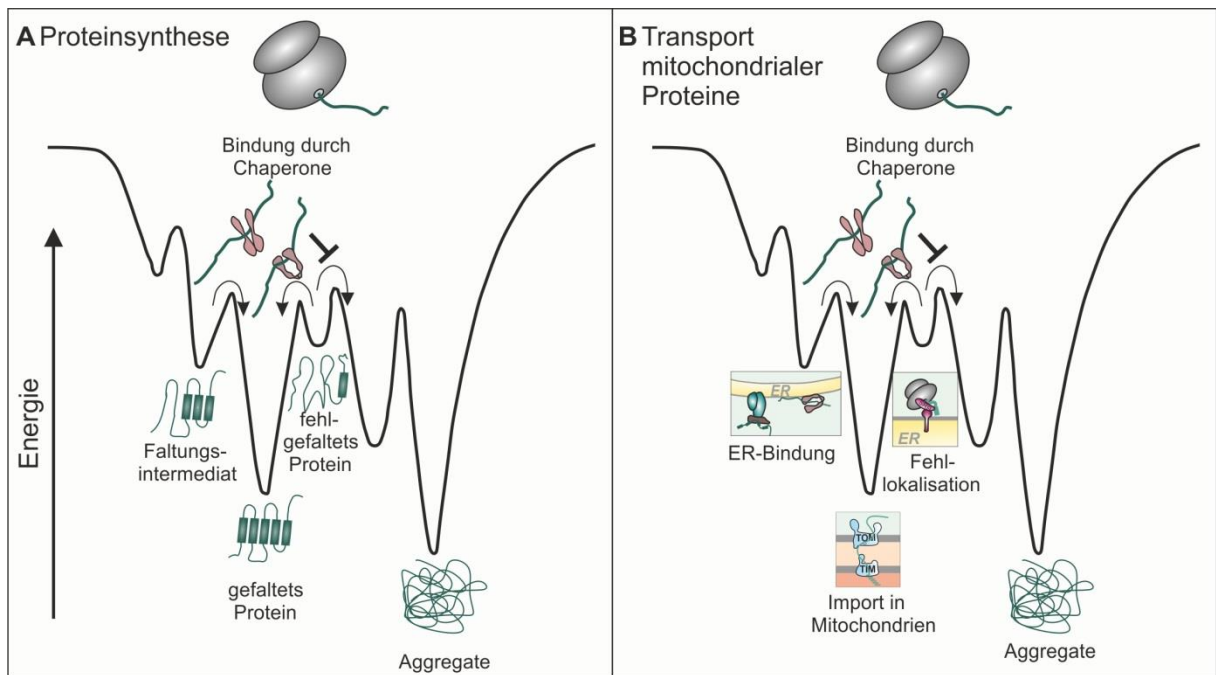


Abb. 31: Proteine können auf ebenso vielen unterschiedlichen Wegen gefaltet wie transportiert werden. (A) Nach der thermodynamischen Theorie werden Proteine nicht nur in einem Weg gefaltet, sondern können unterschiedliche Zustände annehmen, bis sie letztendlich in ihrer gefalteten Form vorliegen. Dabei können Chaperone helfen, Faltungsintermediate, ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine in ihren nativen Zustand zu falten. Bindet kein Chaperon an ein fehlgefaltetes Protein, aggregiert es meistens und muss abgebaut werden. Dabei ist die freie Energie in der Zelle, sowie die Aminosäuresequenz des Proteins entscheidend ¹⁰². **(B)** Nach dem gleichen Schema kann der Proteintransport betrachtet werden. Werden die Proteine im Zytosol synthetisiert, könnten sie entweder direkt an die Mitochondrien gebracht werden oder vorerst an andere Organellen. Dabei können sie beispielsweise an das ER gebunden werden. Ebenso ist eine Fehllokalisation möglich. In jedem Fall helfen Chaperone, die Proteine an ihren Zielort zu bringen. Geschieht dies nicht, aggregieren diese und müssen abgebaut werden. Abbildung bearbeitet aus Dahiya, Buchner *et al.*, 2019.

Im Laufe dieses Projekts wurde immer deutlicher, wie wichtig die Proteinhomeostase in der Zelle ist. Ist die Transportstruktur der Zelle nicht im Gleichgewicht, werden Proteine wie etwa Oxa1, sehr leicht vermehrt am ER lokalisiert. Auch wurde klar, dass fehllokalisierte Proteine nicht immer an ihr Zielorganell zurückgebracht werden können. Der Abbau dieser Proteine ist sehr wichtig und auch genau ausbalanciert, sodass auch hier Probleme entstehen können, sollte diese Balance nicht mehr gegeben sein.

3.2 Ema19- ein ER-Protein mit Relevanz für mitochondriale Protein

Das Ziel dieses Projekts war es, die genaue Funktion von Ema19 und seine Rolle im Transport von mitochondrialen Proteinen zu finden. Diese Aufgabe gestaltete sich im Laufe des Projekts jedoch schwieriger als angenommen, da kein eindeutiger Phänotyp der Deletionsmutante zu sehen war. Dennoch ist anzunehmen, dass Ema19 wichtig für die Zelle ist.

Ein starker Hinweis darauf ist die hohe evolutionäre Konservierung von Ema19. Es konnten nicht nur Homologe in anderen Pilzorganismen gefunden werden, sondern auch in Säugern, hier Tmem97 genannt ⁵⁶ (siehe 2.1). Da das Protein also im Laufe der Evolution nicht verloren ging, muss es wohl sehr wichtig für die Zelle sein. Auch auffällig war hier, dass alle 4 Transmembrandomänen erhalten blieben. Die Funktion liegt möglicherweise also vor allem in den Transmembrandomänen von Ema19. Unter anderem wurde deshalb eine Lipidanalyse durchgeführt, insbesondere nachdem weiße Einschlüsse in Zellen ohne Ema19 gesehen wurden (2.2). Hier gab es allerdings keine Unterschiede. Jedoch wurden keine Sterole und Speicherlipide gemessen. Hier wäre ein Unterschied zwischen Deletion und Wildtyp durchaus möglich. Grund zur Annahme zeigen Untersuchungen mit dem Homolog Tmem97. Studien haben einen Zusammenhang von Tmem97 mit dem Niemann-Pick Typ C Syndrom gezeigt, einer lysosomalen Speicherkrankheit. Tmem97 ist ein Sigma2-Rezeptor, der in Säugerzellen mit dem lysosomalen Cholesterintransporter NPC1 assoziiert ist. Außerdem ist eine Interaktion mit dem LDL Rezeptor bekannt, wodurch Tmem97 auch Einfluss auf den LDL Cholesteringehalt in der Zelle hat ^{59,103,104}. Da in der vorgenommenen Lipidanalyse jedoch kein Cholesterin gemessen wurde, kann ein Einfluss auf Sterole nicht ausgeschlossen werden.

Ursprünglich wurde angenommen, dass Ema19 möglicherweise Teil des ER-SURF-Transportweges ist, da Ema19 im gleichen Screen wie das Hauptprotein dieses Weges, Djpl, gesehen wurde. Da Ema19 nicht an den Mitochondrien liegt, sondern in der ER-Membran, sollte eine mögliche Störung des mitochondrialen Imports untersucht werden. Dies konnte nicht bestätigt werden, da beim Import *in vitro* in isolierte Mitochondrien und in semi-intakte Zellen kein Unterschied zwischen einer *EMA19* Deletionsmutante und dem Wildtyp gesehen wurde (siehe 2.7). Ein direkter Einfluss auf den Import ist daher unwahrscheinlich.

Dennoch konnten in einigen unabhängigen Experimenten ein Einfluss von Ema19 auf die Stabilität von Vorstufenproteinen gesehen werden. Die Lokalisation der nicht-importierten Proteine am ER (siehe 2.5), sowie die Stabilität (siehe 2.8; 2.9) könnten auf einen Abbaufekt in Δ *ema19* hindeuten. Dafür spricht auch, dass keine direkte Rolle von Ema19 beim Import von mitochondrialen Proteinen nachgewiesen werden konnte. Durch die Beeinflussung der mitochondrialen Proteine am ER könnte Ema19 trotzdem im ER-SURF Weg beteiligt sein. Allerdings ist Ema19 nicht an der Import- oder Transportroute beteiligt, sondern eher am Abbau nicht importierter Proteine, was auf einen weiteren Zweig des ER-SURF hindeutet.

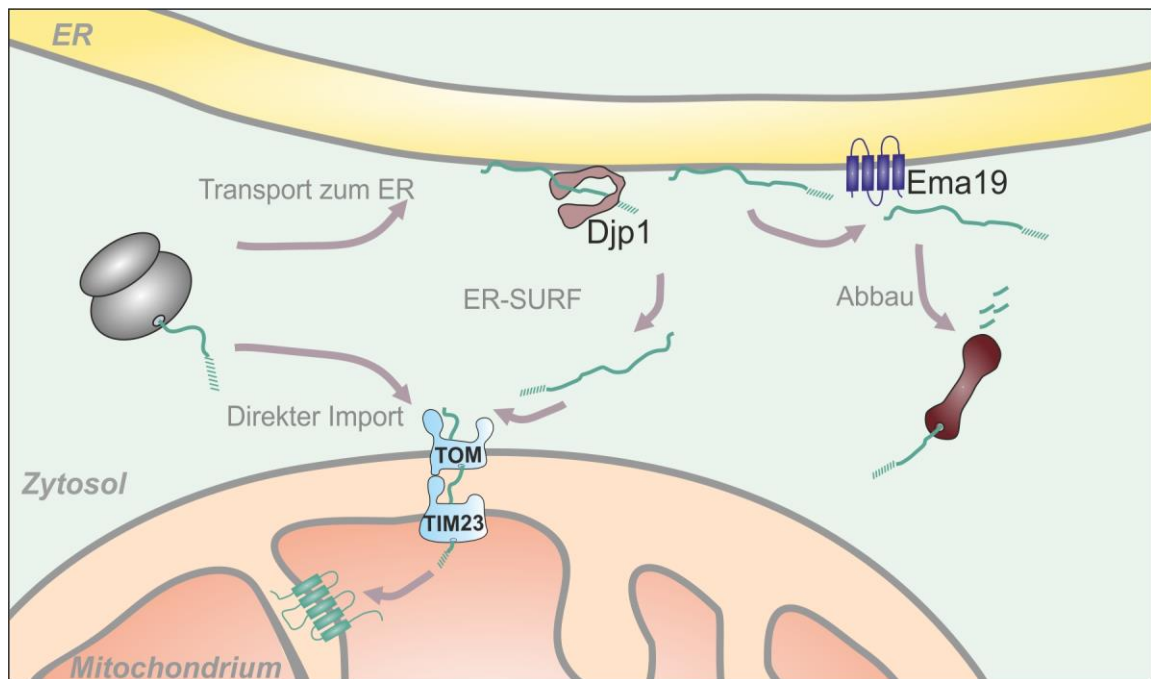


Abb. 32: Ema19 beeinflusst den Abbau mitochondrialer Proteine. Wird ein mitochondriales Protein im Zytosol synthetisiert, so kann es neben dem direkten Import auch an das ER transportiert werden^{56,86}. Über den ER-SURF Transportweg kann es an die Mitochondrien gebracht und importiert werden. Findet dieser Rücktransport jedoch nicht statt, kann das Protein vom Proteasom abgebaut werden. In einem Zwischenschritt vor dem Abbau des nicht importierten Proteins scheint Ema19 beteiligt zu sein.

Momentan ist allerdings nicht klar, ob der Abbau des Proteins direkt oder indirekt von Ema19 beeinflusst wird. Der Abbau von Proteinen am ER erfolgt üblicherweise über den ERAD-Weg. Hierbei wird das Protein entweder aus dem Lumen oder der Membran des endoplasmatischen Retikulums ins Zytosol gebracht, wo es vom Proteasom abgebaut werden kann⁹⁷. Es gibt jedoch keine Indizien, dass Ema19 direkt in ERAD beteiligt ist. Auch wurde bei einem Screen nach Komponenten der UPR Ema19 nicht gefunden¹⁰⁵. Ebenso konnte im Ema19-Interaktom (siehe 2.6) keine Komponenten des ERAD gefunden werden. Eine direkte Beteiligung an ERAD beziehungsweise eine Interaktion mit der ERAD-Maschinerie ist daher unwahrscheinlich.

Zusammenfassend konnten die in dieser Studie durchgeführten Versuche einige Hinweise bringen, bei welchen Abschnitten im Leben eines Proteins Ema19 eine Rolle spielen könnte. Jedoch bleiben noch sehr viele Fragen zu beantworten, denn die exakte Funktion konnte bisher nicht gezeigt werden. Aus diesem Grund ist eine klare Aussage zur Aufgabe von Ema19 in der Zelle zur Zeit nicht möglich.

4. Ausblick

Trotz vieler Versuche und Erkenntnisse bleiben noch einige Fragen offen, die in Zukunft beantwortet werden müssen. Ema19 könnte beim Abbau von mitochondrialen Proteinen am ER beteiligt sein. Bisher wurde keine Interaktion mit Komponenten der ERAD-Abbaus identifiziert. Ob eine Verbindung besteht, könnte durch die Generierung von Doppelmutanten nachgewiesen werden. Hier könnte untersucht werden, ob die Stämme einen Phänotyp im Wachstum aufweisen. Auch könnte eine Immunopräzipitation zeigen, ob eine direkte Interaktion zwischen den Proteinen besteht.

Ebenso kann getestet werden, ob die Deletion von *EMA19* eine Stressantwort in der Zelle auslösen kann. Hierzu können Reporter benutzt werden, wie sie schon in Boos *et al.* beschrieben wurden⁹⁵. Hier kontrollieren ein Core Promotor und vier HSE („*Heat Shock Element*“)-Elemente die Expression von YFP, sodass mittels Fluoreszenz die Hitzeschockantwort gemessen werden kann. Ebenso wird YFP von einem PACE („*Proteasome-Associated Control Element*“)-Element, einem Bindeelement von Rpn4, kontrolliert. Rpn4 reguliert Gene des Proteasoms. Wenn *EMA19* deletiert wird und so nicht mehr beim Abbau mitochondrialer Vorstufenproteine helfen könnte, könnte eine Akkumulation eben dieser Proteine im Zytosol entstehen. Dadurch könnte eine höhere Stressantwort in der Zelle entstehen, was in erhöhter Proteasom-, sowie Chaperonexpression resultiert. Diese Expression könnte mit den Reportern ermittelt werden. Genauso könnte eine qPCR Aufschluss auf die Expression proteasomaler Proteine bringen.

Interessant wäre auch zu sehen, ob eine Verbindung zwischen dem GET-Transportweg und Ema19 besteht. Get1 sowie Get2 sind beide als Interaktionspartner von Ema19 in den Proteomicsdaten zu sehen. Dies könnte deshalb wichtig sein, weil Xiao *et al.* auch beschrieben, dass der GET-Transportweg eventuell mit dem ER-SURF Weg zusammenhängen könnte⁸⁶. Ob wirklich eine Interaktion besteht, könnte auch hier durch die Generation einer Doppelmutante getestet werden. Mit diesen Mutanten könnte dann mittels *in vitro* Import in semi-intakte Zellen getestet werden, ob der Import hier gehemmt wird oder nicht. Ebenso kann mit diesen Doppelmutanten der Abbau mitochondrialer Vorstufenproteine untersucht werden und ob der Phänotyp hier stärker ist als eine *EMA19* Einzeldelation.

Ein weiterer Punkt zur Analyse der Aufgabe von Ema19 wäre die Auswertung der Massenspektrometrie. Hier wurden viele mitochondriale Proteine identifiziert. Ob hier wirklich eine Interaktion stattfindet oder ob es sich nur um Artefakte handelt, sollte ebenfalls getestet werden. Dafür könnte beispielsweise eine Immunopräzipitation mit anschließendem Western Blot durchgeführt werden, sodass die Interaktion bestätigt werden kann. Zusätzlich könnten mit den vorliegenden Proteinen ebenfalls Stabilitätsversuche durchgeführt werden, um so sehen, ob auch von diesen Proteinen der Abbau in Δ *ema19* gestört ist.

5. Material und Methoden

5.1 Medien

5.1.1 *YP-Medium*

1,1% Hefe-Extrakt und 2,1% Bactopepton wurden in Wasser gelöst und mithilfe von Salzsäure (HCL) auf einen pH von 5,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren erfolgte eine Zugabe von 2% der gewünschten Kohlenstoffquelle (Glukose [YPD], Glycerin [YPG], Galaktose [YPGal]).

5.1.2 *YP-Platten*

1,1% Hefeextrakt, 2,1% Bactopepton und 2% Agar wurden in Wasser gelöst und mit Salzsäure auf einen pH von 5,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 2% der jeweiligen Kohlenstoffquelle hinzugefügt (Glukose [YPD], Glycerin [YPG], Galaktose [YPGal]) und die noch flüssige Agar-Lösung in Petrischalen verteilt.

5.1.3 *5-fach S-Medium*

1% Yeast-Nitrogen Base und 2,5% Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) wurden in destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

5.1.4 *S-Medium*

Zu 1-fach S-Medium wurden jeweils 2% der gewünschten Kohlenstoffquelle (Glukose [YPD], Glycerin [YPG], Galaktose [YPGal]) sowie die entsprechende Menge Aminosäuren gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser (ddH₂O) auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Medien ohne entsprechende Aminosäuren werden dementsprechend gekennzeichnet.

5.1.5 *5-fach SLac-Medium*

Es wurde Yeast Nitrogen Base (YNB) als Stickstoffgrundlage mit Ammoniumsulfat sowie 90% Milchsäure gemischt und anschliesend mit Hilfe von KOH auf einen pH von 5,5 eingestellt. Der Ansatz erfolgte auf Eis.

5.1.6 *SLac-Medium*

Zu 1-fach SLac-Medium wurde die entsprechende Menge Aminosäuren gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser (ddH₂O) auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Medien ohne entsprechende Aminosäuren werden gekennzeichnet. Bei Bedarf wurden 0,5% Galaktose hinzugegeben.

5.1.7 Dropout-Mix

In einem Dropout-Mix sind alle Aminosäuren enthalten. Zur Selektion gegenüber Methionin und Cystein fehlen diese im Dropoutmix. In Tabelle 1 sind die Mengen der abgewogenen Aminosäuren angegeben. Diese wurden in Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

Tab. 2 : Zusammensetzung des Dropout-Mix. Zur Selektion der auxotrophen Stämme entfällt die jeweilige Aminosäure.

Aminosäure	mg/20xl
L-Adenin-Hemisulfat	400
L-Arginin	400
L-Histidin HCl Monohydrat	400
L-Isoleucin	600
L-Leucin	2000
L-Lysin HCl	600
L-Methionin	400
L-Phenylalanin	1000
L-Threonin	400
L-Tryptophan	400
L-Tyrosin	400
L-Uracil	400
L-Valin	3000

5.1.8 S-Platten

2% Agar wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. 1-fach S-Medium, 2% der gewünschten Kohlenstoffquelle (Glukose [YPD], Glycerin [YPG], Galaktose [YPGal]) und die entsprechende Menge des 1-fach konzentrierten Dropout-Mixes wurden hinzugefügt und die Agar-Lösung in Petrischalen gegossen.

5.1.9 ClonNAT-Platten

1.1% Hefeextrakt, 2,1% Bactopepton und 2% Agar wurden in Wasser gelöst und mit Salzsäure auf einen pH von 5,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 2% der jeweiligen Kohlenstoffquelle, sowie 0,5% des Antibiotikums ClonNAT bei lauwarmer Temperatur hinzugefügt und die noch flüssige Agar-Lösung in Petrischalen verteilt.

5.1.10 Geneticin (G418)-Platten

1.1% Hefeextrakt, 2,1% Bactopepton und 2% Agar wurden in Wasser gelöst und mit Salzsäure auf einen pH von 5,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 2% der jeweiligen Kohlenstoffquelle, sowie 0,5% des Antibiotikums Geneticin bei lauwarmer Temperatur hinzugefügt und die noch flüssige Agar-Lösung in Petrischalen verteilt.

5.1.11 LB-Medium

10 g Natriumchlorid, 10 g Tryptone und 5 g Yeast Extract werden abgewogen und in einem Liter sterilem Wasser gelöst. Der pH wird mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

5.1.12 LBamp-Medium

LB-Medium wurde mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt.

5.1.13 LBamp-Platten

LB-Medium mit 1,5% Agar wurde in Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die LB-Agar-Lösung bei lauwarmer Temperatur mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und auf Petrischalen verteilt.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR Polymerase chain reaction)

Als Polymerase wurde die Phusion-HF-Polymerase (2 kbp/min) von *New England Biolabs* (*NEB*) verwendet. Die Reaktion wurde in 50µl Gesamtvolumen durchgeführt.

Tab. 3: Zusammensetzung der unterschiedlichen PCR-Ansätze zur Gewinnung von PCR-Produkten, die zur Herstellung von Plasmiden oder zur Herstellung von Deletionsmutanten verwendet wurden.

	1x
5x Phusion-Puffer GC-reich	10 µl
dNTPs [10 mM]	1 µl
Forward Primer [10µM]	2,5 µl
Reverse Primer [10µM]	2,5 µl
Phusion-HF-Polymerase	0,5 µl
genomische DNA oder Plasmid (100ng/µl)	1 µl
H2O	32,5 µl

In Tabelle 4 sind die, für diese Arbeit entworfenen Primer, deren Sequenzen und ihre Verwendung angegeben.

Tab. 4: Verwendete Primer und deren Sequenz.

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung	Template
JL_Djp1-Kan-for	CACACCCTGAATTTTG	Homologe Rekombination zur Deletion von <i>DJP1</i>	gDNA von $\Delta djp1$

JL_Djp1-Kan-rev	TCCAGCCATAACCAC	Homologe Rekombination zur Deletion von <i>DJP1</i>	gDNA von $\Delta djp1$
JL_Djp1-Nat-for	CACACCCTGAATTTTG	Homologe Rekombination zur Deletion von <i>DJP1</i>	gDNA von $\Delta djp1$
JL_Djp1-Nat-rev	TCCAGCCATAACCAC	Homologe Rekombination zur Deletion von <i>DJP1</i>	gDNA von $\Delta djp1$
JL_Ema19-Nat-for	GAATTATCGGCTTTTGTACAGG	Homologe Rekombination zur Deletion von <i>EMA19</i>	gDNA von $\Delta ema19$
JL_Ema19-Nat-rev	CAAAAACCAGCCATTTC	Homologe Rekombination zur Deletion von <i>EMA19</i>	gDNA von $\Delta ema19$

Die PCR-Reaktionen liefen nach dem in Tabelle 5 dargestellten Zyklus ab. Die Reaktionen wurden in PCR-Maschinen automatisiert durchgeführt.

Tab. 5: Reaktionszyklen der PCR. Die Dauer der Elongationsphase wurde abhängig von der erwarteten Fragmentgröße und der Geschwindigkeit der Polymerase gewählt.

Temperatur	Zeit	Reaktion
98°C	3 min	Deaktivierung von Nukleasen und Denaturierung der DNA
98°C 35 Zyklen; 51°C-63°C 72°C	30 sek 1,5 min 1,5 min	Denaturierung der DNA Annealing der Primer Elongation der Primer
72°C	10 min	Finale Elongation
4°C	Kühlung	

Bis zum Start der Reaktion wurden die Ansätze auf Eis gelagert, um eine vorzeitige Aktivität oder eine Beeinträchtigung der Polymerase zu verhindern. Die PCR-Produkte wurden mit einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mithilfe des *NucleoSpin® and PCR Clean-Up Kit* von *Machinery-Nagel* aufgereinigt.

5.2.2 Präparative Gelelektrophorese

Die aus der PCR gewonnenen Fragmente wurden in einer horizontalen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Hierbei nutzt man die negative Ladung des DNA-Rückgrats aus. In dem angelegten elektrischen Feld laufen die DNA-Moleküle von der Kathode zur Anode durch ein Netz von untereinander verflochtenen Agarosemolekülen. Je größer ein DNA-Fragment, desto weniger weit migriert es durch das Gel. Kleinere Stücke laufen weiter und finden sich dementsprechend

weiter unten wieder. Um ein 1%iges Agarosegel zu erhalten, wurde 1% (w/v) Agarose in 1-fach TAE-Puffer (20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetat pH 7,5) durch Erhitzen aufgelöst. Abhängig von der Gelgröße wurden 30 bis 100 ml Agarosegel verwendet und mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (EtBR) versetzt. EtBr ist ein roter Farbstoff, der zum Nachweis von DNA unter UV-Strahlung benutzt wird. Er interkaliert zwischen den Basen der DNA und macht diese deswegen unter UV-Licht sichtbar. Die Proben aus der PCR-Reaktion wurden mit einem 6-fach Ladebuffer von *NEB* im Verhältnis 1:5 gemischt und auf das ausgehärtete Gel aufgetragen. In die Gelkammer wurde 1-fach TAE-Puffer gegeben bis das Gel vollständig bedeckt war. Bei einer Spannung von 100 V und einer Laufzeit von 30 bis 60 min wurden die Proben aufgetrennt. Danach wurden die Gele unter UV-Licht analysiert und das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

5.2.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel konnten die passenden Fragmente mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Es folgte die Bestimmung des Gewichts und die Aufreinigung der DNA mithilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit* von *Macherey-Nagel*. Die Elution wurde mit auf 96°C erhitztem Wasser durchgeführt.

5.2.4 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Alle Stämme wurden wie in 2.3.2 beschrieben in YPD-Medium angezogen und am nächsten Morgen mit YPD-Medium auf eine OD_{600} von 0,3 verdünnt. Sobald die Zellkultur bis zu einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,7 gewachsen war, wurde 1,5 ml Kultur entnommen und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Wasser gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm, wurde das Pellet in 1 ml 0,1 M Lithiumacetat (LiAc) resuspendiert und für 10 min bei 30 °C und 1000 rpm inkubiert. Dieser Schritt diente dazu die Zellwände porös und damit die Zellen für die nachfolgende Transformation kompetent zu machen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13.000 rpm. Zu dem Pellet wurden 74 µl, beziehungsweise 34 µl Wasser hinzugefügt, abhängig davon, ob ein Plasmid oder ein PCR-Produkt transformiert werden sollte. Außerdem wurden 240 µl 50% (w/v) Polyethylenglykol (PEG) 3350, 36 µl 1 M LiAc und 5 µl ssDNA, die zum Abfangen ausgetretener DNAsen diente, hinzupipettiert. Zuletzt wurden entweder 5 µl Plasmid oder 45 µl PCR-Produkt hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 1 min gevortext, um dann den Hitzeschock durchzuführen. Die erste Inkubation erfolgte für 30 min bei 30 °C und 1000 rpm, und anschließend direkt für 25 min bei 42°C und 1000 rpm. In Folge des Hitzeschocks gelangte das Plasmid bzw. die DNA in die Hefezellen. Nach dem Zentrifugieren für 1 min bei 13.000 rpm wurde das Pellet in 100 µl Wasser aufgenommen und auf Selektivmedium oder YPD ausplattiert. Die Platten wurden für 2 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde eine Replikation durchgeführt, wobei die Zellen komplett auf Selektivplatten übertragen wurden.

5.2.5 Transformation von *Escherichia coli*

Transformationen in *E. coli* dienen der Vermehrung von Plasmiden. Dazu wurden nun Aliquots von kompetenten *E. coli*-Zellen, hier MH1, auf Eis aufgetaut. Für jedes Plasmid wurde ein Aliquot benötigt. Es wurden dann 5 µl jedes Plasmids in je ein Aliquot der *E. coli*s pipettiert. Nun wurde 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1,5 min. Der Hitzeschock diente dazu, dass die Zellen sich öffnen und das Plasmid eindringen kann. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen wieder auf Eis gebracht und je 1 ml LB-Medium dazugegeben. Die Zellen im Medium wurden nun 45 min bei 37°C und 1000 rpm geschüttelt. Die Suspension wurde zentrifugiert, der Überstand abgeschüttelt, das Pellet indem restlichen Medium resuspendiert und ebenfalls auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert. Die Platten wurden dann über Nacht in den 37°C-Brutschrank gestellt. Die transformierten *E. coli* können auch direkt in flüssiges LB_{amp}-Medium gegeben werden, sodass sie sich über Nacht bei 37°C vermehren können und am nächsten Tag eine DNA-Isolation durchgeführt werden kann.

5.2.5.1 Vermehrung und Isolation von Plasmiden in *Escherichia coli*

Die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde durch die Vermehrung von *E. coli* Zellen ermöglicht. Um den Erfolg einer Klonierung zu verifizieren wurden kleinere Mengen Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits von Macherey-Nagel aus *E. coli* isoliert und aufgereinigt. Dafür wurde eine Übernachtskultur des jeweiligen Stammes in 4 ml LB_{Amp}-Flüssigkeit bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für die Plasmidisolierung wurden 2ml verwendet.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Die hier verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme wurden von der Arbeitsgruppe der Zellbiologie zur Verfügung gestellt, beziehungsweise wurden durch Transformation und homologe Rekombination erhalten. Schon vorhandene Stämme waren als Glycerinstocks verfügbar und wurden auf YPD-Platten angezogen. In Tabelle 11 sind die verwendeten Hefe-Stämme, die als Grundlage dienten, aufgelistet.

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Stämme. Aufgelistet sind die bereits vorhandenen Stämme mit ihrem Hintergrund und deren Referenz, sowie die Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit durch Transformation mit verschiedenen Plasmiden und durch homologe Rekombination generiert wurden.

Stamm	Hintergrund	Referenz
BY4742	-	Keiner
YPH499	-	Keiner
W303	-	Keiner
<i>Δema19</i>	BY4742	Diese Arbeit

<i>Δdjp1</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19Δdjp1</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19</i>	W303	Diese Arbeit
YPH499-pRS313	YPH499	Diese Arbeit
YPH499-pRS313- <i>OXA1-URA3</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pRS313	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pRS313- <i>OXA1-URA3</i>	YPH499	Diese Arbeit
BY4742-pRS313	BY4742	Diese Arbeit
BY4742-pRS313- <i>OXA1-URA3</i>	BY4742	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pRS313	BY4742	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pRS313- <i>OXA1-URA3</i>	BY4742	Diese Arbeit
W303-pRS313	W303	Diese Arbeit
W303-pRS313- <i>OXA1-URA3</i>	W303	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pRS313	W303	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pRS313- <i>OXA1-URA3</i>	W303	Diese Arbeit
YPH499-pYX223- <i>OXA1</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pYX223- <i>OXA1</i>	YPH499	Diese Arbeit
YPH499- pYX122- <i>SEC63-GFP1-10</i>	YPH499	Diese Arbeit
YPH499- pYX122- <i>SEC63-GFP1-10</i> + pYX142- <i>OXA1-GFP11</i>	YPH499	Diese Arbeit
YPH499- pYX122- <i>OXA1-GFP1-10</i> + pYX142- <i>OXA1-GFP11</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pYX122- <i>SEC63-GFP1-10</i>	YPH499	
<i>Δema19</i> -pYX122- <i>SEC63-GFP1-10</i> + pYX142- <i>OXA1-GFP11</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pYX122- <i>OXA1-GFP1-10</i> + pYX142- <i>OXA1-GFP11</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>NOPI-Ema19-GFP</i>	BY4741	Hansen <i>et al.</i> , 2018
YPH499-pYX232- <i>ERV1</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> - pYX232- <i>ERV1</i>	YPH499	Diese Arbeit
YPH499-pYX223- <i>ΔN-OXA1</i>	YPH499	Diese Arbeit
<i>Δema19</i> -pYX223- <i>ΔN-OXA1</i>	YPH499	Diese Arbeit

5.3.2 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen

Die Stämme der Glycerinstocks wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und für zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Platten mit den Hefestämmen bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlhaus gelagert. Diese Kulturen dienten als Material für alle nachfolgenden Versuche. Für Flüssigkulturen der entsprechenden Stämme wurde 20 ml YPD-Medium angeimpft (sofern nicht anders angegeben) und über Nacht bei 30°C im Schüttler wachsen gelassen. Die Übernachtskultur konnte am nächsten Morgen auf die gewünschte OD₆₀₀ eingestellt werden.

5.3.3 Wachstumskurven

Zur Ermittlung des Wachstumsverhaltens der einzelnen Stämme wurde die OD₆₀₀ über einen Zeitraum von ca. 72 h gemessen. Um eine regelmäßige Messung zu garantieren, wurde das automatische Photometer „ELx808 Absorbance Microplate Reader“ (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) verwendet und an einen Computer mit dem Programm „Gen5“ angeschlossen. In die Vertiefungen einer 96-well-Platte wurden je 90 µl der verschiedenen Medien (SD-His, SG-His, SLac-His, SLac + 0,5%Gal-His, YPD, YPGal) vorgelegt. Anschließend wurden 10 µl der zu untersuchenden Stämme mit einer OD₆₀₀ von 0,1 dazu pipettiert. Die Platte wurde in das temperierbare Photometer gestellt und bei 30°C über 72h schüttelnd inkubiert und alle 10 min wurde automatisiert die OD₆₀₀ gemessen. Mit den erhaltenen Daten konnten Wachstumskurven erstellt werden.

5.3.4 Tüpfeltest

Die Stämme wurden in YP- oder S-Medium mit 2% der gewünschten Kohlenstoffquelle über Nacht bei 30°C angezogen und morgens auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation von drei bis fünf Stunden, in denen die Zellen auf eine OD₆₀₀ von mindestens 0,5 wachsen konnten. Die Zellen wurden dann bei einer OD₆₀₀ von 1 abgenommen und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml Wasser gewaschen, erneut bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wieder verworfen und das Pellet letztlich wieder in 1 ml Wasser resuspendiert. Die Konzentration wurde auf eine OD₆₀₀ 0,5 verdünnt. Davon ausgehend wurde eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe (0,5; 0,05; 0,005; 0,0005) in einer 96-well Platte angelegt. Von jeder Verdünnung wurden 3 µl auf ein Selektiv- oder YP-Medium mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (Glukose, Glycerin, Galaktose oder Raffinose) getüpfelt und entweder bei 25°C, 30 °C oder 37 °C für zwei bis sieben Tage inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Wachstumsergebnisse fotografisch festgehalten.

5.3.5 Split-GFP Versuch

Die Stämme mit den jeweiligen Plasmiden wurden in SD-Medium über Nacht bei 30°C angezogen und morgens auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation von drei bis fünf Stunden, in denen die Zellen auf eine OD₆₀₀ von 0,8 – 1 wachsen konnten. Die Zellen wurden dann bei einer OD₆₀₀ von 5 abgenommen und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 500 µl S-Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 100 µl in ein well einer 96-well Flachboden-Platte (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) pipettiert. Es wurden technische Triplikate angefertigt. Die Zellen wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 30g sedimentiert. Die Fluoreszenz (Exzitation 497 nm, Emission 540 nm) konnte anschließend mit dem CLARIOstar Fluorescence Platereader von BMG-Labtech gemessen werden. Der entsprechende Wildtyp ohne YFP-Fluoreszenz wurde gemessen um die Autofluoreszenz der Hefezellen zu subtrahieren.

5.3.6 Mitochondrienisolation aus *S. cerevisiae*

Es wurden pro Stamm 3 Liter YPGal-Kultur auf eine OD₆₀₀ von ~1 angezogen und geerntet. Die Kultur wurde für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Wasser gewaschen und erneut für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Nachdem das Feuchtgewicht (FG) des Pellets ermittelt wurde, resuspendierte man es in MP1-Puffer (100 mM Tris, 10 mM DTT) (2 ml/g FG). Nach 10 min Inkubation bei 30°C wurde wieder für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1,2 M Sorbitol gewaschen und abermals für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in MP2-Puffer (1,2 M Sorbitol, 3 mg/g Zymolyase, 20 mM KH₂PO₄ pH 7,4) (6,7 ml/g FG) resuspendiert und für 60 min bei 30°C geschüttelt. Die Zymolyase verdaute die Zellwand und es entstanden Sphäroblasten. Nach diesem Schritt wurde auf Eis weitergearbeitet. Bei 4°C wurde für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert und das Pellet in der Hälfte des Homogenisierungspuffers (10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8; 0,2% BSA; 1 mM PMSF; 0,6 M Sorbitol) (13,4 ml/g FG) resuspendiert. Die Suspension wurde in einem eisgekühlten Glashomogenisator mittels 10 Stößen homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 5 min bei 3500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in der anderen Hälfte des Homogenisierungspuffers resuspendiert und erneut mit 10 Stößen homogenisiert. Daraufhin wurde die Suspension dreimal bei 4°C für 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Es wurde jeweils der Überstand, in dem sich die Mitochondrien befanden, behalten. Das Pellet mit den Zelltrümmern wurde verworfen. Es folgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei 4°C von 12 min bei 10000 rpm. Das entstandene Pellet wurde in 1000 µl SH-Puffer (600 mM Sorbitol, 20 mM HEPES pH 7,4) mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze resuspendiert. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (s. 2.3.5) und die Mitochondriensuspension auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt. 50 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.3.7 Präparation von Semi-intakten Zellen aus *S. cerevisiae*

Es wurden pro Stamm 250 ml YPGal- oder YPD-Kultur auf eine OD₆₀₀ von ~1 angezogen und geerntet. Die Kultur wurde für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Wasser gewaschen und erneut für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Danach resuspendiert man das Pellet in 25 ml SP1-Puffer (100 mM Tris, 10 mM DTT). Nach 10 min Inkubation bei 30°C wurde für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 6 ml SP2-Puffer (0,6 M Sorbitol, 3 mg/g Zymolyase, 1x YP-Medium, 50 mM KPi pH 7,4) resuspendiert und für 15-60 min bei 30°C geschüttelt. Die Zymolyase verdaute die Zellwand und es entstanden Sphäroblasten. Hier ist es wichtig in regelmäßigen Abständen zu beobachten, wann die Sphäroblasten entstehen und die Zellen nicht zu weit verdaut wurden. Nach diesem Schritt wurde auf Eis weitergearbeitet. Bei 4°C wurde für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 40 ml SP3-Puffer (1x YP, 1% Glucose, 0,7M Sorbitol) resuspendiert. Nach 20 min Inkubation bei 30°C wurde für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in je 20 ml Permealisationpuffer (20 mM HEPES pH6,8, 150 mM KoAc, 2 mM Mg-Acetate, 0,4 M Sorbitol) wurde das finale Pellet in 1 ml Permealisationpuffer mit 0,5 mM EGTA mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze resuspendiert. Anschließend wurden die Proben zu 100 µl Aliquots pipettiert. Die Zellen wurden dann 30 min über Flüssigstickstoff langsam eingefroren. So entstehen Poren in der Plasmamembran, die wichtig zur Aufnahme von Lysat oder anderen Substanzen sind. Wichtig dabei ist, dass ein Abstand von 30 cm von flüssigem Stickstoff zu den Proben eingehalten wird, damit die Poren in den richtigen Größen entstehen. Danach wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 SDS-Gelelektrophorese

Durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Zur Herstellung eines solchen Gels wurde zwischen zwei Glasplatten (Maß: 140x165 mm) und den dazwischen befindlichen Abstandshaltern (1 mm dick) nacheinander drei verschiedene Gelschichten gegossen: Basis-, Trenn- und Sammelgel. Das Basisgel diente der Abdichtung und der Verankerung der gesamten Konstruktion im Gelfuß. Das Trenngel enthielt 16% Acrylamid. Die restlichen Bestandteile und die gesamte Zusammensetzung der einzelnen Gele sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tab. 7: Zusammensetzung der verschiedenen Schichten eines Gels zur SDS-Gelelektrophorese.

Bestandteil	Basisgel [ml]	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
30% Acrylamid/ 0,2% Bisacrylamid	6,7	9	0,83
Tris 1,875M pH 8,8	2	-	-
Tris 0,6M pH6,8	-	3,5	0,5
Aqua dest.	1,1	4,2	3,6
10% SDS	0,1	0,167	0,05
TEMED	0,025	0,01	0,005
Gesamtvolumen	10	17	5

5.4.2 Zellausschluss

Die Stämme wurden über Nacht bei 30°C angezogen und morgens auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr fünf Stunden wurden Hefezellen einer OD₆₀₀ von 2 geerntet. Zunächst wurde eine Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet in 20 µl 1-fachem Laemmli (125mM Tris mit pH 6,8, 5% SDS, 25% Glycerin, 0,0005% Bromphenolblau, 50mM DTT) gelöst. Nach einer Inkubation von 3 min bei 96°C wurden fünf 0,5 cm große Glaskügelchen dazugegeben und für 1 min lang gevortext. Anschließend wurden nochmals 80 µl des 1-fachen Laemmli dazugegeben und vor dem Auftragen die Proben mit einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert. Die Laufzeit der SDS-PAGE betrug 150 min bei 21 mA in SDS-Laufpuffer (190 mM Glycerin, 25 mM Tris, 1% SDS).

5.4.3 Westernblot

Die Proteine, die sich in der SDS-PAGE befanden, wurden nach der Semi-Dry-Methode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde auf zwei in Blotpuffer (20mM Tris, 150 mM Glycin, 0,08% SDS, 20 Methanol) getränkte Whatmanpapiere die befeuchtete Nitrozellulosemembran gelegt und das in Blotpuffer inkubierte Gel darüber geschichtet. Auf das Gel kam ein weiteres Whatmanpapier, dann wurde die Blotkammer geschlossen und beschwert. Die Proteine wurden für 90 min bei 200 mA auf die Membran transferiert. Die auf der Membran befindlichen Proteine wurden mittels Ponceaufärbelösung (0,2% Ponceau, 3% Essigsäure) sichtbar gemacht und die Markerbanden auf der Membran nachgezeichnet. Danach wurde die Nitrozellulosemembran mit Wasser gewaschen. Das angefärbte Bandenmuster wurde zum Dokumentieren kopiert.

5.4.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Die auf der Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine konnten mittels Antikörper spezifisch detektiert werden. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, blockte man die Membran für 30 bis 60 min, je nach zu verwendendem Primär-Antikörper, in 20 ml TBS-Milchlösung (5% Milchpulver, 10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl). Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte entweder über Nacht oder für circa fünf Stunden über den Tag hinweg bei 4°C. Nach Gebrauch des Antikörpers wurde dieser wieder bei -20°C weggefroren, um ihn später erneut benutzen zu können. Die Membran wurde 3x für 10 min mit 1-fach TBS-Puffer (10mM Tris pH 7,4, 150mM NaCl) gewaschen. Damit konnten ungebundene und überschüssige Antikörper abgewaschen werden. Danach erfolgte die Inkubation mit dem in 20 ml Milchlösung 1:5000 verdünnten Sekundär-Antikörper (α -Hase) für 60 min. Der Sekundär-Antikörper ist mit einer Peroxidase konjugiert und bindet an den ersten Antikörper. Nach drei aufeinanderfolgenden Waschschritten für jeweils 10 min mit 1-fach konzentriertem TBS-Puffer wurden die Proteine detektiert. Hierfür musste zunächst die Biolumineszenz durch die Peroxidaseaktivität ausgelöst werden. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 1 ml 1:1 gemischtem ECL1 (100mM Tris pH 8,5, 2,5 mM Luminol [in DMSO], 90 mM Coumarinsäure) und ECL2 (100mM Tris pH 8,5, 0,2% H₂O₂) gestartet. Die Membran wurde sofort in eine Klarsichthülle gelegt und ein Röntgenfilm (*Fuji Super RX Medical X-Ray Film*) für 3 sek bis 10 min exponiert. Zum Entwickeln der Röntgenfilme wurde Entwicklungermaschine *Optimax TR (MS Laborgeräte)* verwendet.

5.4.5 Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden durch die Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Diese lagen in folgenden Verdünnungen vor:

Tab. 8: Antikörper, die in dieser Arbeit für Western Blots und Immunopräzipitationen verwendet wurden. Die jeweiligen Verdünnungen sind angegeben.

Antikörper	Verdünnung
α -Djp1	1:1000
α -Rpl6B	1:2000
α -Ilv5	1:5000
α -Oxa1	1:500
α -Erv1	1:500
α -HA	1:500

5.4.6 Pulse Chase

Bei der *in vivo* Translation werden neu synthetisierte Proteine durch Zugabe von radioaktivem ³⁵S-Methionin (³⁵S-Met) markiert und können anschließend detektiert werden. Die Stämme YPH499-pYX232-*ERV1*, Δ *ema19*-pYX232-*ERV1* wurden zwei Tage in einem SGal-Trp-Met-Cys-Medium angezogen. Morgens wurde eine OD₆₀₀ von 0,3 in 100 ml SGal-Trp-Met-Cys-Medium eingestellt und die Zellkulturen für drei weitere Stunden wachsen

gelassen. Anschließend wurden 100 ml jeder Kultur in ein 50 ml Falcon überführt und bei 4700 rpm für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit SGal-aa-Medium gewaschen (5000 rpm, 5 min) und dann in 1 ml desselben Mediums resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde gemessen und Zellen mit einer OD₆₀₀ von 8 entnommen. Die Suspension wurde mit SGal-aa Medium auf ein Endvolumen von 250 µl aufgefüllt. Zu dem Gemisch gab man 24 µl Aminosäure-Mix, 84 µl Tyrosin und 4 µl ³⁵S-Met. Es erfolgte eine 10- minütige Inkubation bei 30 °C und 1000 rpm im Schüttler. Zwischenzeitlich wurden 40 µl kaltes Methionin und 30 µl Cystein pro Probe in einem Eppendorfgefäß gemischt. Die Aminosäuren wurden zu den Zellen hinzugefügt. Nach 0 min, 10 min, 30 min und 90 min wurden 100 µl entnommen und 21 sek bei maximalen rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 12% TCA resuspendiert und siebenmal sonifiziert bei einer Amplitude von 50 und einem Zyklus von 0,5. Es wurden 2-3 Glasperlen zu jedem Aliquot dazugegeben und eine Minute lang gevortext. Der Überstand wurde in ein neues Eppi transferiert, die Glasbeads mit 200 µl 12% TCA gewaschen und der Überstand davon zu den restlichen Proben gegeben. Diese wurden dann bei -20°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben dann 20 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in den Radioaktivmüll verworfen. Es wurde 1 ml Aceton dazugegeben und vorsichtig invertiert und danach noch einmal zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in den Radioaktivmüll gegeben. Das nun entstandene Pellet wurde 5 min bei 30°C trocknen gelassen. Nun wurde das Pellet in Resuspensionspuffer (0.1% SDS, 20 mM Tris pH 7,4) gelöst. Danach wurden die Proben 5 min bei 96°C gekocht und dann gevortext. Es wurde 960 µl Lysepuffer II (2,5 % Triton X-100, 30 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl) zugegeben, invertiert und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden sie 60 min bei 35.000 x g und 4°C zentrifugiert und 800 µl vom Überstand wurden in ein neues Eppi übertragen. Zum Überstand wurden 30 µl Protein-A-Sepharose-Beads und 3 µl α-HA-Serum dazugegeben. Die Proben wurden dann über Nacht bei 4°C taumelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 2 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Die Beads wurden 2-mal mit 1 ml Lysepuffer II, 2-mal mit 1 ml Waschpuffer I (2,5 % Triton X-100, 30 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 M Harnstoff) und schließlich 2- mal mit 1 ml Waschpuffer II (30 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl) gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Beads in 30 µl 1xLaemmli resuspendiert und 5 min bei 96°C gekocht. Nachdem sie 21 s zentrifugiert wurden, wurde der Überstand in ein neues Eppi übernommen und nochmals 5 min bei 96°C gekocht. Dann konnten die Proben auf einem 16/0,2% SDS-Gel im Kühlraum bei 20 mA laufen gelassen werden. Die Gele wurden geblottet und ein Autoradiografie durchgeführt.

5.4.7 TCA-Fällung

Zur Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) wurde zu den jeweiligen Proben TCA mit einer Endkonzentration von 12% gegeben. Die Proben wurden über Nacht bei -20°C inkubiert. Daraufhin wurden die gefällten Proteine 30 min bei 25.000×g und 4°C sedimentiert, mit 1 ml Aceton (-20°C) gewaschen und erneut 30 min bei 25.000×g und 4°C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurden die Proben direkt in Ladepuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

5.4.8 Immunopräzipitation mit anschließender Massenspektrometrie

Die für die Massenspektrometrie benutzten Stämme wurden in YPD über Nacht angezogen und morgens auf eine OD 0,5 in einem Liter verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr fünf Stunden wurden Hefezellen geerntet. Zunächst wurde 5 min lang bei 4000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit Wasser gewaschen und erneut für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abermals verworfen wurde, wurde das Pellet in 200 µl Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA und 1 % Triton-X) gelöst. Die Proben wurden dann 30 min auf Eis inkubiert, im Abstand von 10 min wurden die Zellen nochmal aufgemischt. Nach der Inkubationszeit wurde das Lysat bei 20.000 g und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 300 µl Dilution/Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA) dazugegeben. Da alle Stämme einen GFP-Tag enthielten, mit dem die Immunopräzipitation durchgeführt werden sollte, wurden 50 µl GFP-Trap_A beads von Chromotek pro Stamm zuerst equilibriert. Dazu wurden sie drei mal mit 500 µl Lysepuffer gewaschen, der Puffer wurde bei 2.500 xg und 4°C für 2 min abzentrifugiert und verworfen. Anschließend wurde das Zelllysate zu den Beads gegeben und für 2h bei 4°C taumeln gelassen, sodass die beads an den GFP-Tag im Zelllysate binden kann. Danach wurden die Proben für 2 min bei 2000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden dann 3x mit 800 µl Waschpuffer I (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 % Glycerol, 0,05% NP40) gewaschen. Nach dem ersten Waschschrift wurden die Beads in ein neues Eppi überführt, um sicher zu gehen, dass kein überschüssiges Detergenz vom Lysepuffer am Rand des Eppis hängt und so die Proben im Massenspektrometer verunreinigen könnte. Die Proben wurden nach der dritten Zentrifugation zweimal mit 500 µl Waschpuffer II (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5% Glycerol) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig abgenommen und die Beads in 50 µl Elutionspuffer I (2M Urea, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 5 ng/µl Trypsin) resuspendiert. Das Eluat wurde eine Stunde bei Raumtemperatur eluiert, in dieser Zeit läuft der Verdau des Trypsin ab, wobei die Bindung des GFP an die Beads gelöst wird. Danach wird nochmals Trypsin dazugegeben, um die sichere Trennung aller Bindungen an die Beads zu gewährleisten. Das Eluat wurde dann 40 sek bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, da hier nun die gelösten Peptide vorliegen. Zum Überstand wurde nun 50 µl Elutionspuffer II (2M Urea, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM Chloracetamid) dazugegeben. Um die Proben durch das Chloracetamid zu alkylieren, wurden sie über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren gelassen.

Im nächsten Schritt wurden die Peptide auf C18 Stage Tips gebunden. Dazu wurden die Proben zunächst mit Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert, bis ein pH unter 2 nachzuweisen war. Die Stage Tips wurden zuerst für die Aufnahme der Peptide vorbereitet, indem sie mit 100µl Methanol und anschließend zweimal mit Puffer A (0,1% Formalinsäure) gewaschen wurden. Anschließend wurden die Proben auf die Stage Tips gegeben. Durch Waschen mit Puffer A, wurden nur noch die Peptide auf den Stage Tips festgehalten. Nach diesem Schritt können die Proben über mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Um die Peptide von den Stage Tips wieder zu lösen, wurden sie mit 40 µl Puffer B (80% Acetonitril, 0,1% Formalinsäure) in kleine Eppendorfgefäße eluiert. Die Proben wurden dann

in einem Speedvac von Eppendorf für 20 min bei Raumtemperatur verdunstet. Liegen die Proben dann in weniger als 4 µl vor, wird zuletzt 1 µl Puffer A* (0,1% Formalinsäure, 0,1% TFA) dazugegeben. Die Proben wurden dann im Q Exactive HF Massenspektrometer von Markus Räsche an der TU Kaiserslautern gemessen.

5.4.9 Synthese ³⁵S-markierter Proteine in vitro

Zur Synthese ³⁵S-markierter DeNovo-Proteine wurde der Vektor pGEM4 verwendet. Die in diesen Vektor klonierte Variante des Gens wurde mithilfe von *TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System* von *Promega* zur Herstellung von ³⁵S-markiertem Protein transkribiert und translatiert. Anschließend wurde das Lysat aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.4.10 In vitro Import radioaktiv markierter Lysate in isolierte Mitochondrien von *S. cerevisiae*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Importreaktionen wurden mit folgendem 2-fach konzentrierten Importpuffer durchgeführt: 1,2 M Sorbitol, 160 mM KCl, 20 mM Magnesium-Acetat (MgAc), 4 mM KH₂PO₄ und 100 mM HEPES-KOH pH 7,2-7,4 (eingesetzt wurde dieser Puffer letztlich in einfacher Konzentration). Darüber hinaus fanden alle Importreaktionen in Anwesenheit von ATP (Endkonzentration 2 mM) und NADH (Endkonzentration 2 mM) statt. Damit wurde die Energieversorgung der Importreaktion in die Mitochondrien gewährleistet. Für eine Importreaktion wurden 5 µg Mitochondrien sowie 0,3 µl Retikulozytenlysat in einem Ansatzvolumen von 100 µl verwendet. Der Import dauerte zwischen 2 und 15 min und wurde bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Jeweils 100 µl des Importreaktionsgemisches wurden in 900 µl eiskaltem SH-Puffer verdünnt und 10 µl Proteinase K (PK, 10 mg/ml) hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen und um alle nicht-importierten Proteine zu entfernen. Es folgte eine Inkubation von maximal 30 min auf Eis. Durch die Zugabe von 10 µl 200 mM PMSF (34,8 mg/ml in 100% EtOH) wurde der Proteaseverdau durch PK gestoppt. Im Anschluss wurden die Mitochondrien für 15 min bei 20.000xg und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Mitochondrien wurden zum Entfernen der noch vorhandenen Proteasen in 500 µl SH-KCl (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES-KOH pH 7,2, 150 mM KCl) mit 2 mM PMSF gewaschen und erneut sedimentiert (20.000xg, 15 min, 4°C). Nach Abnehmen des Überstands wurden die Mitochondrien in 25 µl Lae+ +50mM 22 DTT aufgenommen, 3 min auf 96°C erhitzt und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

5.4.11 In vitro Import radioaktiv markierter Lysate in semi-intakte Zellen von *S. cerevisiae*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Importreaktionen wurden mit folgendem Importpuffer durchgeführt: 20mM HEPES pH 6,8, 250 mM Sorbitol, 150 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂. Darüber hinaus fanden alle Importreaktionen in Anwesenheit von ATP (Endkonzentration 2 mM), NADH (Endkonzentration 2 mM) statt, Kreatinkinase (Endkonzentration 0,2 mg/ml)

und Kreatinphosphat (Endkonzentration 2,5 mM). Damit wurde die Energieversorgung der Importreaktion in den Zellen gewährleistet. Für eine Importreaktion wurden Zellen mit OD₆₀₀ 2 sowie 2 µl Retikulozytenlysat in einem Ansatzvolumen von 100 µl verwendet. Der Import dauerte zwischen 5 und 20 min und wurde bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Jeweils 100 µl des Importreaktionsgemisches wurden in 900 µl eiskaltem SH-Puffer verdünnt, um die Reaktion zu stoppen. Zur Hälfte der Proben wurde nach dem Import 10 µl Proteinase K (PK, 10 mg/ml) hinzugegeben, um alle nicht-importierten Proteine zu entfernen. Es folgte eine Inkubation von maximal 30 min auf Eis. Durch die Zugabe von 10 µl 200 mM PMSF (34,8 mg/ml in 100% EtOH) wurde der Proteaseverdau durch PK gestoppt. Im Anschluss wurden die semi-intakten Zellen für 5 min bei 4000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden zum Entfernen der noch vorhandenen Proteasen in 500 µl Importpuffer mit 2 mM PMSF gewaschen und nun 10 min bei 13000 xg und 4°C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurden die Zellen in 25 µl Lae+ +50 mM DTT aufgenommen, 3 min auf 96°C erhitzt und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

5.4.12 Autoradiographie

Zur Detektion der radioaktiv markierten Proteine wurde nach dem Westernblot auf die Nitrozellulosemembran ein Röntgenfilm (*BioMax MRFilm Scientific Imaging Film* der Firma *KODAK*) für einen Tag bis vier Wochen aufgelegt. Zum Entwickeln der Filme wurde die bereits oben genannte Entwicklermaschine verwendet.

Referenzen

- (1) Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms, *Cell* 138, 628–644.
- (2) Backes, S., and Herrmann, J. M. (2017) Protein Translocation into the Intermembrane Space and Matrix of Mitochondria: Mechanisms and Driving Forces, *Front. Mol. Biosci.* 4, 83.
- (3) Dasgupta, S. (2019) Mitochondrion: I am more than a fuel server, *Ann. Transl. Med.* 7, 594.
- (4) Delierneux, C., Kouba, S., Shanmughapriya, S., Potier-Cartereau, M., Trebak, M., and Hempel, N. (2020) Mitochondrial Calcium Regulation of Redox Signaling in Cancer, *Cells* Epub 2020. DOI: 10.3390/cells9020432.
- (5) Long, J. Z., Svensson, K. J., Bateman, L. A., Lin, H., Kamenecka, T., Lokurkar, I. A., Lou, J., Rao, R. R., Chang, M. R., Jedrychowski, M. P., Paulo, J. A., Gygi, S. P., Griffin, P. R., Nomura, D. K., and Spiegelman, B. M. (2016) The Secreted Enzyme PM20D1 Regulates Lipidated Amino Acid Uncouplers of Mitochondria, *Cell* 166, 424–435.
- (6) Sagan, L. (1967) On the origin of mitosing cells, *Journal of Theoretical Biology* 14, 225-IN6.
- (7) Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., and Scorrano, L. (2020) The cell biology of mitochondrial membrane dynamics, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 204–224.
- (8) Kühlbrandt, W. (2015) Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes, *BMC Biol.* 13, 89.
- (9) Laborenz, J., Hansen, K., Prescianotto-Baschong, C., Spang, A., and Herrmann, J. M. (2019) In vitro import experiments with semi-intact cells suggest a role of the Sec61 paralog Ssh1 in mitochondrial biogenesis, *Biol. Chem.* 400, 1229–1240.
- (10) Rampelt, H., Wollweber, F., Gerke, C., Boer, R. de, van der Klei, I. J., Bohnert, M., Pfanner, N., and van der Laan, M. (2018) Assembly of the Mitochondrial Cristae Organizer Mic10 Is Regulated by Mic26-Mic27 Antagonism and Cardiolipin, *J. Mol. Biol.* 430, 1883–1890.
- (11) González Montoro, A., Auffarth, K., Hönscher, C., Bohnert, M., Becker, T., Warscheid, B., Reggiori, F., van der Laan, M., Fröhlich, F., and Ungermann, C. (2018) Vps39 Interacts with Tom40 to Establish One of Two Functionally Distinct Vacuole-Mitochondria Contact Sites, *Developmental cell* 45, 621-636.e7.
- (12) Barazzuol, L., Giamogante, F., Brini, M., and Calì, T. (2020) PINK1/Parkin Mediated Mitophagy, Ca²⁺ Signalling, and ER-Mitochondria Contacts in Parkinson's Disease, *Int. J. Mol. Sci.* Epub 2020. DOI: 10.3390/ijms21051772.
- (13) Lee, S., and Min, K.-T. (2018) The Interface Between ER and Mitochondria: Molecular Compositions and Functions, *Mol. Cells* 41, 1000–1007.
- (14) Shai, N., Schuldiner, M., and Zalckvar, E. (2016) No peroxisome is an island - Peroxisome contact sites, *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1061–1069.
- (15) Schwarz, D. S., and Blower, M. D. (2016) The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling, *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 79–94.
- (16) Martucciello, S., Masullo, M., Cerulli, A., and Piacente, S. (2020) Natural Products Targeting ER Stress, and the Functional Link to Mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.* Epub 2020. DOI: 10.3390/ijms21061905.

- (17) Di Conza, G., and Ho, P.-C. (2020) ER Stress Responses: An Emerging Modulator for Innate Immunity, *Cells* Epub 2020. DOI: 10.3390/cells9030695.
- (18) Tran, D. M., Ishiwata-Kimata, Y., Mai, T. C., Kubo, M., and Kimata, Y. (2019) The unfolded protein response alongside the diauxic shift of yeast cells and its involvement in mitochondria enlargement, *Sci. Rep.* 9, 12780.
- (19) Wrobel, L., Topf, U., Bragoszewski, P., Wiese, S., Sztolsztener, M. E., Oeljeklaus, S., Varabyova, A., Lirski, M., Chroscicki, P., Mroczek, S., Januszewicz, E., Dziembowski, A., Koblowska, M., Warscheid, B., and Chacinska, A. (2015) Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol, *Nature* 524, 485–488.
- (20) Weidberg, H., and Amon, A. (2018) MitoCPR-A surveillance pathway that protects mitochondria in response to protein import stress, *Science* Epub 2018. DOI: 10.1126/science.aan4146.
- (21) Aviram, N., and Schuldiner, M. (2017) Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance, *J. Cell Sci.* 130, 4079–4085.
- (22) Rapoport, T. A. (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes, *Nature* 450, 663–669.
- (23) Conti, B. J., Elferich, J., Yang, Z., Shinde, U., and Skach, W. R. (2014) Cotranslational folding inhibits translocation from within the ribosome-Sec61 translocon complex, *Nature structural & molecular biology* 21, 228–235.
- (24) Conti, B. J., Devaraneni, P. K., Yang, Z., David, L. L., and Skach, W. R. (2015) Cotranslational stabilization of Sec62/63 within the ER Sec61 translocon is controlled by distinct substrate-driven translocation events, *Mol. Cell* 58, 269–283.
- (25) Tyedmers, J., Lerner, M., Wiedmann, M., Volkmer, J., and Zimmermann, R. (2003) Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum, *EMBO Rep.* 4, 505–510.
- (26) Ng, D. T., Brown, J. D., and Walter, P. (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane, *J. Cell Biol.* 134, 269–278.
- (27) Meyer, H. A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K. U., and Hartmann, E. (2000) Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63, *J. Biol. Chem.* 275, 14550–14557.
- (28) Haßdenteufel, S., Nguyen, D., Helms, V., Lang, S., and Zimmermann, R. (2019) ER import of small human presecretory proteins: components and mechanisms, *FEBS Lett.* 593, 2506–2524.
- (29) Denic, V., Dötsch, V., and Sinning, I. (2013) Endoplasmic reticulum targeting and insertion of tail-anchored membrane proteins by the GET pathway, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a013334.
- (30) Mateja, A., Paduch, M., Chang, H.-Y., Szydłowska, A., Kossiakoff, A. A., Hegde, R. S., and Keenan, R. J. (2015) Protein targeting. Structure of the Get3 targeting factor in complex with its membrane protein cargo, *Science* 347, 1152–1155.
- (31) Wang, F., Whynot, A., Tung, M., and Denic, V. (2011) The mechanism of tail-anchored protein insertion into the ER membrane, *Mol. Cell* 43, 738–750.
- (32) Wiedemann, N., and Pfanner, N. (2017) Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly, *Annu. Rev. Biochem.* 86, 685–714.

- (33) Priesnitz, C., and Becker, T. (2018) Pathways to balance mitochondrial translation and protein import, *Genes Dev.* 32, 1285–1296.
- (34) Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W., and Brunner, M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22, *Nature* 384, 582–585.
- (35) Backes, S., Hess, S., Boos, F., Woellhaf, M. W., Gödel, S., Jung, M., Mühlhaus, T., and Herrmann, J. M. (2018) Tom70 enhances mitochondrial preprotein import efficiency by binding to internal targeting sequences, *J. Cell Biol.* 217, 1369–1382.
- (36) Hansen, K. G., and Herrmann, J. M. (2019) Transport of Proteins into Mitochondria, *Protein J.* 38, 330–342.
- (37) Rahman, B., Kawano, S., Yunoki-Esaki, K., Anzai, T., and Endo, T. (2014) NMR analyses on the interactions of the yeast Tim50 C-terminal region with the presequence and Tim50 core domain, *FEBS Lett.* 588, 678–684.
- (38) Truscott, K. N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A. J., Rassow, J., Pfanner, N., and Wagner, R. (2001) A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23, *Nature structural biology* 8, 1074–1082.
- (39) Ramesh, A., Peleh, V., Martinez-Caballero, S., Wollweber, F., Sommer, F., van der Laan, M., Schroda, M., Alexander, R. T., Campo, M. L., and Herrmann, J. M. (2016) A disulfide bond in the TIM23 complex is crucial for voltage gating and mitochondrial protein import, *J. Cell Biol.* 214, 417–431.
- (40) Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A., and Pfanner, N. (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins, *Nature* 348, 137–143.
- (41) Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S. A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W., and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation, *EMBO J.* 21, 3659–3671.
- (42) Endo, T., and Yamano, K. (2009) Multiple pathways for mitochondrial protein traffic, *Biol. Chem.* 390, 723–730.
- (43) Stiller, S. B., Höpker, J., Oeljeklaus, S., Schütze, C., Schrempp, S. G., Vent-Schmidt, J., Horvath, S. E., Frazier, A. E., Gebert, N., van der Laan, M., Bohnert, M., Warscheid, B., Pfanner, N., and Wiedemann, N. (2016) Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins, *Cell Metab.* 23, 901–908.
- (44) Jia, L., Dienhart, M. K., and Stuart, R. A. (2007) Oxa1 directly interacts with Atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F1Fo-ATP synthase complex, *Mol. Biol. Cell* 18, 1897–1908.
- (45) Krüger, V., Deckers, M., Hildenbeutel, M., van der Laan, M., Hellmers, M., Dreker, C., Preuss, M., Herrmann, J. M., Rehling, P., Wagner, R., and Meinecke, M. (2012) The mitochondrial oxidase assembly protein1 (Oxa1) insertase forms a membrane pore in lipid bilayers, *J. Biol. Chem.* 287, 33314–33326.
- (46) Peleh, V., Cordat, E., and Herrmann, J. M. (2016) Mia40 is a trans-site receptor that drives protein import into the mitochondrial intermembrane space by hydrophobic substrate binding, *Elife* Epub 2016. DOI: 10.7554/eLife.16177.

- (47) Murschall, L. M., Gerhards, A., MacVicar, T., Peker, E., Hasberg, L., Wawra, S., Langer, T., and Riemer, J. (2020) The C-terminal region of the oxidoreductase MIA40 stabilizes its cytosolic precursor during mitochondrial import, *BMC Biol.* 18, 96.
- (48) Bykov, Y. S., Rapaport, D., Herrmann, J. M., and Schuldiner, M. (2020) Cytosolic Events in the Biogenesis of Mitochondrial Proteins, *Trends Biochem. Sci.* 45, 650–667.
- (49) Becker, T., Song, J., and Pfanner, N. (2019) Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria, *Trends Cell Biol.* 29, 534–548.
- (50) Tsuboi, T., Viana, M. P., Xu, F., Yu, J., Chanchani, R., Arceo, X. G., Tutucci, E., Choi, J., Chen, Y. S., Singer, R. H., Rafelski, S. M., and Zid, B. M. (2020) Mitochondrial volume fraction and translation duration impact mitochondrial mRNA localization and protein synthesis, *Elife* 9.
- (51) Medina-Munoz, H. C., Lapointe, C. P., Porter, D. F., and Wickens, M. (2020) Records of RNA locations in living yeast revealed through covalent marks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 23539–23547.
- (52) Endo, T., Mitsui, S., Nakai, M., and Roise, D. (1996) Binding of mitochondrial presequences to yeast cytosolic heat shock protein 70 depends on the amphiphilicity of the presequence, *J. Biol. Chem.* 271, 4161–4167.
- (53) Young, J. C., Hoogenraad, N. J., and Hartl, F.U. (2003) Molecular Chaperones Hsp90 and Hsp70 Deliver Preproteins to the Mitochondrial Import Receptor Tom70, *Cell* 112, 41–50.
- (54) Schmidt, O., Harbauer, A. B., Rao, S., Eyrich, B., Zahedi, R. P., Stojanovski, D., Schönfisch, B., Guiard, B., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2011) Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases, *Cell* 144, 227–239.
- (55) Opaliński, Ł., Song, J., Priesnitz, C., Wenz, L.-S., Oeljeklaus, S., Warscheid, B., Pfanner, N., and Becker, T. (2018) Recruitment of Cytosolic J-Proteins by TOM Receptors Promotes Mitochondrial Protein Biogenesis, *Cell Rep.* 25, 2036-2043.e5.
- (56) Hansen, K. G., Aviram, N., Laborenz, J., Bibi, C., Meyer, M., Spang, A., Schuldiner, M., and Herrmann, J. M. (2018) An ER surface retrieval pathway safeguards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast, *Science* 361, 1118–1122.
- (57) Htetema, E. H., Ruigrok, C. C., Koerkamp, M. G., van den Berg, M., Tabak, H. F., Distel, B., and Braakman, I. (1998) The cytosolic DnaJ-like protein djp1p is involved specifically in peroxisomal protein import, *J. Cell Biol.* 142, 421–434.
- (58) Papić, D., Elbaz-Alon, Y., Koerdt, S. N., Leopold, K., Worm, D., Jung, M., Schuldiner, M., and Rapaport, D. (2013) The role of Djpl in import of the mitochondrial protein Mim1 demonstrates specificity between a cochaperone and its substrate protein, *Mol. Cell. Biol.* 33, 4083–4094.
- (59) Ebrahimi-Fakhari, D., Wahlster, L., Bartz, F., Werenbeck-Ueding, J., Praggastis, M., Zhang, J., Joggerst-Thomalla, B., Theiss, S., Grimm, D., Ory, D. S., and Runz, H. (2016) Reduction of TMEM97 increases NPC1 protein levels and restores cholesterol trafficking in Niemann-pick type C1 disease cells, *Hum. Mol. Genet.* 25, 3588–3599.
- (60) Oyer, H. M., Sanders, C. M., and Kim, F. J. (2019) Small-Molecule Modulators of Sigma1 and Sigma2/TMEM97 in the Context of Cancer: Foundational Concepts and Emerging Themes, *Front. Pharmacol.* 10, 1141.

- (61) Zeng, C., Weng, C.-C., Schneider, M. E., Puentes, L., Riad, A., Xu, K., Makvandi, M., Jin, L., Hawkins, W. G., and Mach, R. H. (2019) TMEM97 and PGRMC1 do not mediate sigma-2 ligand-induced cell death, *Cell Death Discov.* 5, 58.
- (62) Schmit, K., and Michiels, C. (2018) TMEM Proteins in Cancer: A Review, *Front. Pharmacol.* 9, 1345.
- (63) Scott, L. L., Sahn, J. J., Ferragud, A., Yen, R. C., Satarasinghe, P. N., Wood, M. D., Hodges, T. R., Shi, T., Prakash, B. A., Friese, K. M., Shen, A., Sabino, V., Pierce, J. T., and Martin, S. F. (2018) Small molecule modulators of σ 2R/Tmem97 reduce alcohol withdrawal-induced behaviors, *Neuropsychopharmacology* 43, 1867–1875.
- (64) Tremblay, M.-E., Zhang, I., Bisht, K., Savage, J. C., Lecours, C., Parent, M., Titorenko, V., and Maysinger, D. (2016) Remodeling of lipid bodies by docosahexaenoic acid in activated microglial cells, *J. Neuroinflammation* 13, 116.
- (65) López-Damián, E. P., Jiménez-Medina, J. A., Lammoglia, M. A., Pimentel, J. A., Agredano-Moreno, L. T., Wood, C., Galina, C. S., and Fiordelisio, T. (2018) Lipid droplets in clusters negatively affect *Bos indicus* embryos during cryopreservation, *Anat. Histol. Embryol.* 47, 435–443.
- (66) Roingard, P., and Depla, M. (2011) The birth and life of lipid droplets: learning from the hepatitis C virus, *Biol. Cell* 103, 223–231.
- (67) Cali, T., Ottolini, D., Soriano, M. E., and Brini, M. (2015) A new split-GFP-based probe reveals DJ-1 translocation into the mitochondrial matrix to sustain ATP synthesis upon nutrient deprivation, *Hum. Mol. Genet.* 24, 1045–1060.
- (68) Pedelacq, J.-D., and Cabantous, S. (2019) Development and Applications of Superfolder and Split Fluorescent Protein Detection Systems in Biology, *Int. J. Mol. Sci.* Epub 2019. DOI: 10.3390/ijms20143479.
- (69) Breker, M., Gymrek, M., and Schuldiner, M. (2013) A novel single-cell screening platform reveals proteome plasticity during yeast stress responses, *J. Cell Biol.* 200, 839–850.
- (70) Wollweber, F., Malsburg, K. von der, and van der Laan, M. (2017) Mitochondrial contact site and cristae organizing system: A central player in membrane shaping and crosstalk, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 1481–1489.
- (71) Pfeffer, S., Woellhaf, M. W., Herrmann, J. M., and Förster, F. (2015) Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography, *Nat. Commun.* 6, 6019.
- (72) Rigby, K., Zhang, L., Cobine, P. A., George, G. N., and Winge, D. R. (2007) characterization of the cytochrome c oxidase assembly factor Cox19 of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 282, 10233–10242.
- (73) Bode, M., Longen, S., Morgan, B., Peleh, V., Dick, T. P., Bihlmaier, K., and Herrmann, J. M. (2013) Inaccurately assembled cytochrome c oxidase can lead to oxidative stress-induced growth arrest, *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1597–1612.
- (74) Bode, M., Woellhaf, M. W., Bohnert, M., van der Laan, M., Sommer, F., Jung, M., Zimmermann, R., Schroda, M., and Herrmann, J. M. (2015) Redox-regulated dynamic interplay between Cox19 and the copper-binding protein Cox11 in the intermembrane space of mitochondria facilitates biogenesis of cytochrome c oxidase, *Mol. Biol. Cell* 26, 2385–2401.

- (75) Beckers, C.J.M., Keller, D. S., and Balch, W. E. (1987) Semi-intact cells permeable to macromolecules: Use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex, *Cell* 50, 523–534.
- (76) Schlenstedt, G., Hurt, E., Doye, V., and Silver, P. A. (1993) Reconstitution of nuclear protein transport with semi-intact yeast cells, *J. Cell Biol.* 123, 785–798.
- (77) Sakaue, H., Shiota, T., Ishizaka, N., Kawano, S., Tamura, Y., Tan, K. S., Imai, K., Motono, C., Hirokawa, T., Taki, K., Miyata, N., Kuge, O., Lithgow, T., and Endo, T. (2019) Porin Associates with Tom22 to Regulate the Mitochondrial Protein Gate Assembly, *Mol. Cell* 73, 1044-1055.e8.
- (78) Endo, T., and Sakaue, H. (2019) Multifaceted roles of porin in mitochondrial protein and lipid transport, *Biochemical Society transactions* 47, 1269–1277.
- (79) Kargas, V., Castro-Hartmann, P., Escudero-Urquijo, N., Dent, K., Hilcenko, C., Sailer, C., Zisser, G., Marques-Carvalho, M. J., Pellegrino, S., Wawiórka, L., Freund, S. M., Wagstaff, J. L., Andreeva, A., Faille, A., Chen, E., Stengel, F., Bergler, H., and Warren, A. J. (2019) Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes, *Elife* Epub 2019. DOI: 10.7554/eLife.44904.
- (80) Petersen, J. G., and Holmberg, S. (1986) The ILV5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is highly expressed, *Nucleic Acids Res.* 14, 9631–9651.
- (81) Macierzanka, M., Plotka, M., Pryputniewicz-Drobinska, D., Lewandowska, A., Lightowers, R., and Marszalek, J. (2008) Maintenance and stabilization of mtDNA can be facilitated by the DNA-binding activity of Ilv5p, *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 107–117.
- (82) Peleh, V., Zannini, F., Backes, S., Rouhier, N., and Herrmann, J. M. (2017) Erv1 of *Arabidopsis thaliana* can directly oxidize mitochondrial intermembrane space proteins in the absence of redox-active Mia40, *BMC Biol.* 15, 106.
- (83) Kobayashi, J., Sasaki, D., Hara, K. Y., Hasunuma, T., and Kondo, A. (2017) Enzymatic improvement of mitochondrial thiol oxidase Erv1 for oxidized glutathione fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Microb. Cell Fact.* 16, 44.
- (84) Hell, K. (2008) The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 601–609.
- (85) Avendaño-Monsalve, M. C., Ponce-Rojas, J. C., and Funes, S. (2020) From cytosol to mitochondria: the beginning of a protein journey, *Biol. Chem.* 401, 645–661.
- (86) Xiao, T., Shakya, V. P.S., and Hughes, A. L. (2020) The GET pathway safeguards against non-imported mitochondrial protein stress.
- (87) Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H. D., Schwappach, B., and Weissman, J. S. (2008) The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane, *Cell* 134, 634–645.
- (88) Shakya, V. P.S., Barbeau, W. A., Xiao, T., Knutson, C. S., and Hughes, A. L. (2020) The nucleus is a quality control center for non-imported mitochondrial proteins.
- (89) Stehlik, T., Kremp, M., Kahnt, J., Bölker, M., and Freitag, J. (2020) Peroxisomal targeting of a protein phosphatase type 2C via mitochondrial transit, *Nat. Commun.* 11, 2355.
- (90) Itakura, E., Zavodszky, E., Shao, S., Wohlever, M. L., Keenan, R. J., and Hegde, R. S. (2016) Ubiquilins Chaperone and Triage Mitochondrial Membrane Proteins for Degradation, *Mol. Cell* 63, 21–33.

- (91) Cyr, D. M., and Douglas, M. G. (1991) Early events in the transport of proteins into mitochondria. Import competition by a mitochondrial presequence, *J. Biol. Chem.* *266*, 21700–21708.
- (92) Rosenthal, M., Metzl-Raz, E., Bürgi, J., Yifrach, E., Drwesh, L., Fadel, A., Peleg, Y., Rapaport, D., Wilmanns, M., Barkai, N., Schuldiner, M., and Zalckvar, E. (2020) Uncovering targeting priority to yeast peroxisomes using an in-cell competition assay, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *117*, 21432–21440.
- (93) Gamerdinger, M., Hanebuth, M. A., Frickey, T., and Deuerling, E. (2015) The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum, *Science* *348*, 201–207.
- (94) George, R., Beddoe, T., Landl, K., and Lithgow, T. (1998) The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 2296–2301.
- (95) Boos, F., Krämer, L., Groh, C., Jung, F., Haberkant, P., Stein, F., Wollweber, F., Gackstatter, A., Zöller, E., van der Laan, M., Savitski, M. M., Benes, V., and Herrmann, J. M. (2019) Mitochondrial protein-induced stress triggers a global adaptive transcriptional programme, *Nat. Cell Biol.* *21*, 442–451.
- (96) Neuber, O., Jarosch, E., Volkwein, C., Walter, J., and Sommer, T. (2005) Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation, *Nat. Cell Biol.* *7*, 993–998.
- (97) Lemus, L., and Goder, V. (2014) Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin, *Cells* *3*, 824–847.
- (98) Mårtensson, C. U., Priesnitz, C., Song, J., Ellenrieder, L., Doan, K. N., Boos, F., Floerchinger, A., Zufall, N., Oeljeklaus, S., Warscheid, B., and Becker, T. (2019) Mitochondrial protein translocation-associated degradation, *Nature* *569*, 679–683.
- (99) Matsumoto, S., Nakatsukasa, K., Kakuta, C., Tamura, Y., Esaki, M., and Endo, T. (2019) Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER, *Mol. Cell* *76*, 191-205.e10.
- (100) Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, *Science* *181*, 223–230.
- (101) Hirata, F., Sugita, M., Yoshida, M., and Akasaka, K. (2018) Perspective: Structural fluctuation of protein and Anfinsen's thermodynamic hypothesis, *J. Chem. Phys.* *148*, 20901.
- (102) Dahiya, V., and Buchner, J. (2019) Chapter One - Functional principles and regulation of molecular chaperones. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology : Molecular Chaperones in Human Disorders* (Donev, R., Ed.), pp 1–60, Academic Press.
- (103) Riad, A., Zeng, C., Weng, C.-C., Winters, H., Xu, K., Makvandi, M., Metz, T., Carlin, S., and Mach, R. H. (2018) Sigma-2 Receptor/TMEM97 and PGRMC-1 Increase the Rate of Internalization of LDL by LDL Receptor through the Formation of a Ternary Complex, *Sci. Rep.* *8*, 16845.
- (104) Bartz, F., Kern, L., Erz, D., Zhu, M., Gilbert, D., Meinhof, T., Wirkner, U., Erfle, H., Muckenthaler, M., Pepperkok, R., and Runz, H. (2009) Identification of cholesterol-regulating genes by targeted RNAi screening, *Cell Metab.* *10*, 63–75.
- (105) Cohen, N., Breker, M., Bakunts, A., Pesek, K., Chas, A., Argemí, J., Orsi, A., Gal, L., Chuartzman, S., Wigelman, Y., Jonas, F., Walter, P., Ernst, R., Aragón, T., van Anken, E.,

and Schuldiner, M. (2017) Iron affects Ire1 clustering propensity and the amplitude of endoplasmic reticulum stress signaling, *J. Cell Sci.* 130, 3222–3233.

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BiP	Binding Protein [Protein]
C, Cys	Cysteine
Cmc1	Cytochrome c Oxidase Assembly Factor Homolog Mitochondrial 1 [Protein]
Cox19	Cytochrome Oxidase Assembly 19 (or 23) [Protein]
Djp1	DnaJ Protein 1 [Protein]
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ema	Efficient Mitochondria Targeting–Associated
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-Associated Protein Degradation
ER-SURF	ER surface
EtBr	Ethidiumbromid
Erv1	Essential For Respiration And Vegetative Growth Protein 1 [Protein]
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Erdschwerebeschleunigung
GET	Guided-Entry Of Tail-Achored Protein Insertion
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSE	Heat Shock Element
Hsp70 (90, 40)	Hitzeschockprotein 70 (90, 40) [Protein]
IM	Innere Mitochondriale Membran
IMS	Intermembranraum
IMP	Inner Mitochondrial Membrane Peptidase
kbp	Kilo Base Pairs
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth Medium
LiAc	Lithiumacetat
M	Molarität
mg	Milligramm
Mia40	Mitochondrial Intermembrane Space Import and Assembly 40 [Protein]
MICOS	Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System
min	Minute
MIM	Mitochondrial Import
mitoTAD	Mitochondrial Protein Translocation-Associated Degradation
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPP	Mitochondrial Processing Peptidase [Protein]
MTS	Mitochondrial targeting sequence
nm	Nanometer
NAC	Nascent Chain Associated Complex
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OM	Outer Mitochondrial Membrane
ORF	Open Reading Frame

Oxa1	Cytochrome Oxidase Activity 1 [Protein]
PACE	Proteasome-Associated Control Element
PAGE	Polyacrylamid Gelelectrophorese
PAM	Presequence Translocase-Associated Motor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pex	Peroxin [Protein]
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNC	Ribosome-Nascent Chain Complex
rpm	Revolutions Per Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sec	Secretory [Protein]
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Triflouressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	Translocase Of The Inner Membrane
TOM	Translocase Of The Outer Membrane
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volume per Volume
w/v	Weight per Volume

°C	Grad Celsius
³⁵ S	Radioaktives Schwefelisotop
SRP	Signal Recognition Particle
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
UPR	Unfolded Protein Response
UTR	Untranslated Region
YNB	Yeast Nitrogen Base

Danksagung

Wer hätte es gedacht, es wurde tatsächlich eine ganze Doktorarbeit aus Ema19! Dieses Projekt hat wirklich versucht, uns fertig zu machen, aber keine Chance! Ohne euch alle wäre dies mit Sicherheit nicht möglich gewesen, deshalb vorab an jeden, der das liest: Du bist der Grund, warum diese Arbeit überhaupt existiert und ich danke dir dafür von Herzen.

Hannes, zuerst einmal Danke, dass du an mich geglaubt hast. Ich glaube, wir können nicht mehr zählen, wie oft ich bei dir ins Büro kam und schon wieder irgendwas anderes gesehen habe als vorher. Danke, dass du dann einfach mit mir gelacht hast und wir uns etwas neues überlegt haben. Aber am Ende haben wir Ema19 doch bezwungen, zumindest so einigermaßen. Vielen Dank für deine Unterstützung und deinen Rat, bei allem.

Vielen Dank an **Martin van der Laan** für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation und auch für das Feedback bei den IRTG-Treffen. Und auch danke, dass ihr mich in Homburg so lieb empfängt! Wir sehen uns dann im Januar.

Danke an **Ekkehart Neuhaus** für die freundliche Übernahme des Vorsitzes meiner Verteidigung. Durch die vielen Treffen vom IRTG1830 kommt mir meine Verteidigung nicht mehr ganz so formell vor, sondern eher wie ein kleines Familientreffen. Vielen Dank dafür.

Danke auch an **Gabi Amoroso**. Gabi, du bist einfach ein Organisationstalent. Ohne dich wären nicht so viele Seminare, Workshops und Treffen zustande gekommen. Und ohne dich wären wir bestimmt auch nicht so einfach nach Kanada geflogen. Es hat wirklich Spaß gemacht.

Simone, die beste Sekretärin aller Zeiten! Danke, dass du dich einfach um alles direkt kümmerst, auch wenn es gar nicht dein Zuständigkeitsbereich ist. Danke, dass wir dich immer um Rat fragen können und du irgendwie auch immer eine Lösung parat hast, ohne dich wären wir ziemlich verloren.

An unseren fleißigen Helfer, **Connie, Andrea, Vera** und **Sabine**. Ihr Lieben, falls euch das noch nie jemand gesagt hat: Das Labor lebt von euch! Ihr haltet alles in Schach, **Connie**, die darauf achtet, dass das Labor nicht im Chaos versinkt. **Andrea**, ohne dich wären unsere Vorräte leer. **Vera**, du hilfst einfach allen gleichzeitig, das Talent muss man auch erst mal besitzen! Und natürlich **Sabine**. Sabine, ich weiß nicht, ob ich ohne dich alles geschafft hätte. Wenn ich mal wieder alles gleichzeitig machen wollte, hast du mir einfach anstandslos Arbeit abgenommen und dadurch dafür gesorgt, dass ich nicht alles vermassele. Danke, dass ich mit dir immer über unsere Tiere quatschen konnte und das für dich auch nie langweilig war.

Steffen, ohne dich war das Labor nicht vollständig. Eine Ära geht zu Ende, auch wenn das für Sabine vielleicht nicht ganz so zutrifft. Danke für die gute Musik, das Quatschen und Süßigkeiten teilen. Danke für die Pause vom Pipettieren und die Ratschläge, wenn ich mit einem Versuch mal wieder nicht weiter gekommen bin. Du und Sabine habt unserem kleinen Labor so viel Leben eingehaucht, es war mir eine Ehre, ein Teil davon sein zu können.

Sandra, mir fehlen die Worte. Danke, dass du da warst, egal um was es ging. Danke fürs Zuhören, fürs Urlaub machen, fürs shoppen gehn. Ich finde es sehr passend, dass wir

zusammen starteten und jetzt zusammen unsere Doktorarbeit beenden. Ich bin froh, dass wir uns gefunden haben. Danke dafür, dass wir Freunde sind.

Katja! Es ist soweit, dein kleiner Bachelor hat's geschafft! Wie schnell die Zeit vergeht. Vor fünf Jahren wollte ich noch nicht mal meinen Master machen und jetzt schau uns an! Ich verdanke dir so viel in meiner Karriere als Wissenschaftlerin, du hast mir so viel beigebracht. Und auch, wenn du schon zwei Jahre in Harvard bist, weißt du immer noch mehr als ich im Labor. Kein Witz, wir finden immer noch manchmal Eppis von dir. Mittlerweile kenne ich mich sogar in deinen Sachen aus, haha. Danke für alles, besser kann ich es nicht ausdrücken.

Christian, Saskia, Patrick, meine Studis! Ich bin so unfassbar stolz auf euch. Ihr habt es schon so weit gebracht und ich bin froh, dass ich euch begleiten durfte. Ihr wisst ja, ich stehe euch immer mit Rat und Tat zur Seite, auch wenn ich nicht mehr im Labor bin, für euch habe ich immer ein offenes Ohr. Danke, dass ihr nicht nur meine Studenten wart, sondern auch meine Freunde seid.

Natürlich geht auch ein riesen Dank an das restliche Labor. **Felix** für deine Motivationsreden und dafür, dass du das meiste einfach cool findest. Für lustige Gespräche im heißen Eisen und dass du mich darin unterstützt, in der Lehre zu bleiben. Natürlich auch vielen Dank für die Korrektur dieser Arbeit, ich bin mir sicher, du hast sie um einiges besser gemacht, **Anna**, deine Begeisterung für Disney und Weihnachten freut mich jedes Mal wieder, danke, dass ich da nicht allein war im Labor. **Katha**, ohne dich wäre das Labor in Zeiten von Corona sehr einsam gewesen. Danke, dass wir uns das Labor geteilt haben, das hat die Arbeit wesentlich schöner gemacht. **Eva**, die Zeit in Kanada hätte ohne dich nur halb so viel Spaß gemacht! Kanada, Mac 'n Cheese, Horchata und super leckeres mexikanisches Essen werde ich immer mit dir verbinden. Du warst eine tolle Mitbewohnerin, danke für die schöne Zeit. **Carina**, danke für die etlichen Strickanleitungen, für unzählige Runden Yoga, für das Gequatsche in der Mittagspause. Danke für die Hilfe, wenn R mich mal wieder ärgert und du weißt, dass da nur ein Punkt fehlt. Ohne dich würde ich heute noch an so mancher Auswertung sitzen. **Lena**, danke, dass du immer so hilfsbereit bist. Egal, ob es ums Putzen im Labor geht oder um Versuche, die ich nicht alleine hinkriege, du und dein schlaues Büchlein seid parat. **Lea** und **Tamara**, bei euch hatte ich immer das Gefühl, dass ihr auch irgendwie meine Studis wart. Zeit mit euch in einem Labor zu verbringen, war toll, auch weil wir Steffen vielleicht manchmal ein bisschen zusammen zur Weißglut getrieben haben. Es hat mir wirklich Spaß gemacht mit euch. Auf euch bin ich genauso stolz, wie auf meine eigenen Studenten, ihr habt euch so toll entwickelt, ihr schafft eure Projekte mit links, da bin ich ganz sicher.

Jasmin und **Steven**, ich kann meinen Dank kaum ausdrücken. Auf euch kann ich wirklich immer zählen. Danke, dass ich bei euch immer willkommen bin, dass ich sogar einen eigenen Haustürschlüssel habe. Danke, dass ihr immer da wart, ihr habt mir so geholfen. Durch euch wäre ich nicht so gut durch alle schweren Zeiten durchgekommen. Ich bin so glücklich, dass ihr endlich euer kleines Glück erleben dürft. Ich verspreche hiermit, dass ich die beste Patentante aller Zeiten werden. Ich hab euch lieb.

Ganz klar hat mir nicht nur das Labor mega geholfen. Ein großer Dank geht an meine Eltern. **Mama, Papa**, danke, dass ihr mich in meinem Werdegang immer unterstützt hab, auch wenn

ich vielleicht mal gestrauchelt habt. Danke, dass ihr mich aufgefangen habt und immer da ward. Ohne euch ware ich nicht da, wo ich jetzt bin. Danke, dass ihr nie an mir gezweifelt habt. Ich hab euch so lieb.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund **Fabian** bedanken. Danke, dass du daheim alles über dich ergehen lässt, wenn ich mal wieder gestresst bin und das schon wieder an dir auslasse. Danke, dass du einfach ruhig bleibst und mich machen lässt. Danke, dass du bei mir bist. Ich liebe dich.

Curriculum vitae

Janina Laborenz

Master of Science

Ausbildung

- 07/2017-12/2020 PhD Student an der Technischen Universität Kaiserslautern
Abteilung Zellbiologie bei Prof. Dr. Johannes Herrmann
“Ema19- ein ER-Protein mit Relevanz für mitochondriale Proteine”
- 10/2015-06/2017 Masterstudium in Neuro- and Cell Biology an der Technischen
Universität Kaiserslautern
Master of Science in der Abteilung Zellbiologie bei Prof. Dr. Johannes
Herrmann
*“Untersuchungen zur Bedeutung von Cochaperonen der J-Familie für
die Proteinbiogenese in S. cerevisiae”*
- 10/2012-09/2015 Bachelorstudium in Biowissenschaften an der Technischen Universität
Kaiserslautern
Bachelor of Science in der Abteilung Zellbiologie bei Prof. Dr.
Johannes Herrmann
*“Die Bedeutung von Proteinen des peroxisomalen Transportweges für
die mitochondriale Fitness”*
- 2003-2012 Abitur am Sickingen Gymnasium Landstuhl

Fortbildungen

- 07/2017-12/2020 Mitglied ds Graduiertenkollegs IRTG1830
- 04/2018-06/2018 Forschungsaufenthalt im Rahmen des IRTG1830 an der University of
Alberta bei Dr. Nicolas Touret in Edmonton, Kanada
-

Publikationen

Zöllner E.*, **Laborenz J.***, Boos F., Krämer L., Räsche M., Alexander R.T., Herrman J.M.: Mix23 is a stress-protection factor in the intermembrane space of mitochondria, *J. Biol. Chem.* (2020), doi: 10.1074/jbc.RA120.014247

Laborenz J.*, Hansen K.*, Prescianotto-Baschong C., Spang A., Herrman J.M. (2019), In vitro import experiments with semi-intact cells suggest a role of the Sec61 paralog Ssh1 in mitochondrial biogenesis, *Biol. Chem.* 400(9): 1229–1240, doi: 10.1515/hsz-2019-0196

Hansen, K. G.*; Aviram, N.*; **Laborenz, J.**; Bibi, C.; Meyer, M.; Spang, A.; Schuldiner, M.#; Herrmann, J. M.#: An ER surface retrieval pathway safe guards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast. In: *Science (New York, N.Y.)*. 361, 1118–1122 (2018), doi:10.1126/science.aar8174.

Weill U., Yofe I., Sass E., Stynen B., Davidi D., Natarajan J., Ben-Menachem R., Avihou Z., Goldman O., Harpaz N., Chuartzman S., Kniazev K., Knoblach B., **Laborenz J.**, Boos F., Kowarzyk J., Ben-Dor S., Zalckvar E., Herrmann J.M., Rachubinski RA, Pines O, Rapaport D, Michnick SW, Levy ED, Schuldiner M. (2018). Genome-wide SWAp-Tag yeast libraries for proteome exploration. *Nature Methods* 15(8), 617–622., doi: 10.1038/s41592-018-0044-9

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel von mir persönlich angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Ich habe nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- beziehungsweise Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Die Bestimmungen der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie der Universität Kaiserslautern sind mir bekannt. Insbesondere weiß ich, dass ich vor Vollzug der Promotion zur Führung des Dokortitels nicht berechtigt bin.

Janina Laborenz

Kaiserslautern, den 29.10.2020

*“Nothing That Occurs In Nature Can Be
Unnatural”*

