

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut

Lehrstuhl: Physiologische Chemie (im BioMedizinischem Centrum München)

Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Andreas G. Ladurner

ehem. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Walter Neupert

Das Proteom der Mitochondrien: Submitochondriale Kompartimentierung

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Kaesmacher

aus Dormagen

2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Walter Neupert
Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Regina Fluhrer
Jun.Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Lesca M. Holdt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Max Harner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2018

Meiner Familie

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mitochondrien	1
1.1.1	Oxidative Phosphorylierung	2
1.1.2	Mitochondriale Fusions-Fissions-Maschinerie	4
1.1.3	Ultrastruktur von Mitochondrien und deren Dynamik	8
1.1.4	Molekularer Aufbau und mögliche Funktion von Crista junctions	13
1.1.5	Molekularer Aufbau und mögliche Funktion mitochondrialer Kontaktstellen	14
1.2	Mitochondriale Erkrankungen	15
1.2.1	Klinische Symptomatik und Syndromologie von Mitochondriopathien	17
1.2.2	Diagnose und Therapie mitochondrialer Erkrankungen in der Klinik	17
1.3	Zielsetzung der Arbeit	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Proteinchemische Methoden	22
2.1.1	Proteinpräzipitation mittels Trichloressigsäure	22
2.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen	22
2.1.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	22
2.1.4	Blau-Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-Page)	23
2.1.5	Coomassie-Färbung	24
2.1.6	Proteintransfer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen	24
2.1.7	Affinitätschromatographie von Proteinen mit Histidyl-Markierung	25
2.1.8	Affinitätschromatographie von Proteinen mit MBP-Markierung	25
2.1.9	Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität	26
2.1.10	Bestimmung der Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Aktivität	27
2.1.11	Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie	27
2.2	Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2.2	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>Escheria coli</i>	29
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation	29
2.2.4	Reinigung von PCR-Produkten	30
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	30
2.2.6	Agarosegelelektrophorese	31
2.2.7	Restriktionsenzymverdau und Ligation	31
2.2.8	Herstellung von elektrokompetenten <i>Escheria coli</i>	31
2.2.9	Transformation von <i>Escheria coli</i>	32
2.2.10	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.2.11	Expression von Plasmid-codierten Proteinen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.2.12	Deletion von Genen und Insertion chromosomaler Protein-Tags in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.2.13	Verwendete <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	35
2.2.14	Verwendete Plasmide	35
2.3	Immunologische Methoden	36
2.3.1	Herstellung polyklonaler Antikörper	36
2.3.2	Aufreinigung von Antikörperseren	36
2.3.3	Immundekoration von Proteinen	37
2.4	Methoden der Hefebiologie	38
2.4.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38

2.4.2	Analyse des Wachstumsphänotyps	38
2.4.3	„Schnelle“ Mitochondrien-Präparation	39
2.4.4	Isolierung von Mitochondrien aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2.4.5	Topologieanalyse von mitochondrialen Proteinen mittels Bestimmung der Sensitivität gegen Proteasen	40
2.4.6	Analyse der Membranassoziation durch Carbonatextraktion	41
2.4.7	Steady-State Expressionslevel von Proteinen	41
2.4.8	Subfraktionierung von Mitochondrien	42
2.4.9	Semiquantitative Mengen-Analyse in aufgetrennten mitochondrialen Membranvesikeln mittels Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)	42
2.5	Medien	44
2.5.1	Medien für die Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
2.5.2	Medien für die Kultivierung von <i>Escheria coli</i>	44
2.6	Geräte und Chemikalien	45
2.6.1	Geräte	45
2.6.2	Verbrauchsmaterialien	47
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Hintergrund der SILAC-Analyse	50
3.2	Überblick über die SILAC-Analyse	50
3.3	Innenmembranproteine und Proteine der ‚Intermediären Dichte‘	54
3.4	Matrix- und IMS-Proteine	62
3.5	Außenmembranproteine	66
3.6	Proteine des endoplastmatischen Retikulums (ER)	70
3.7	Proteine der mit Mitochondrien assoziierten ER-Membranen	73
3.8	Vakuolen-Proteine	77
3.9	Charakterisierung von YML030W	81
3.9.1	Zusammenfassung und Analyse bisheriger Daten	81
3.9.2	Phänotypisierung von $\Delta aim31$	83
3.9.3	Veränderungen der Enzymaktivität von Atmungskettenkomplexen in $\Delta aim31$	87
3.9.4	Topologieanalyse von Aim31	88
3.9.5	Analyse von möglichen Interaktionspartnern	89
3.9.6	Veränderungen im Expressionsmuster in der $\Delta aim31$ Deletionsmutante	92
3.9.7	Veränderungen der Atmungskettekomplexassemblierung in der $\Delta aim31$ Deletionsmutante	93
4	DISKUSSION	94
4.1	Evidenz für spezifische Proteinlokalisationen innerhalb der Innenmembran	94
4.2	Der MICOS-Komplex und weitere Proteine mit ähnlichen SILAC-Profilen	102
4.3	Kontaktstellen von Mitochondrien- und ER-Membranen	110

4.4	Kontaktstellen zwischen Vakuolen und Mitochondrien	113
4.5	Aim31 ist ein Aktivität-modulierendes Protein der Atmungskette	115
5	ZUSAMMENFASSUNG	123
6	LITERATUR	126
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	151
8	ANHANG	154
9	DANKSAGUNG	155
10	LEBENS LAUF	156
11	EIDESTÄTTLICHE VERSICHERUNG	160

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind essenzielle Organellen der eukaryotischen Zelle. Die Anzahl an Mitochondrien in einer Zelle variiert je nach metabolischem Zustand bzw. in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp (Alberts et al., 2008). Richard Altmann beschrieb 1894 als erster sogenannte Bioplasten als Organellen einer Zelle (Ernster and Schatz, 1981). Die Bezeichnung Mitochondrium (gr. *mitos* = Faden; *chondrion* = Körnchen) wurde 1898 von Carl Benda vorgeschlagen. Neben Plastiden sind Mitochondrien die einzigen Zellorganellen, welche eigenes genetisches Material tragen und durch eine doppelte Membran vom Cytosol getrennt sind (Nass and Nass, 1963a; Nass and Nass, 1963b). Die Genese von Mitochondrien und deren Abgrenzung durch eine Doppelmembran wird durch die Endosymbiontentheorie erklärt (Sagan, 1967). Nach dieser Theorie wird die Herkunft von Mitochondrien durch eine Endozytose eines aerob lebenden α -Proteobakteriums, im Speziellen *Rickettsia* des Stamms *Pelagibacteraceae*, durch eine anaerobe Archaeen-Zelle postuliert (Thrash et al., 2011; Gray, 1992; Lane and Martin, 2010).

Mitochondrien beherbergen Bestandteile unterschiedlichster Stoffwechsel- und Transduktionswege. Der Prozess, welcher Mitochondrien essentiell für das Überleben einer Zelle macht, ist die Synthese von Eisen/Schwefel-Clustern (Lill and Kispal, 2000). Selbige sind Strukturkomponenten von Eisen-Schwefel-Proteinen, welche wiederum zentrale Funktionen beim Elektronentransport, der Katalyse biochemischer Reaktionen und bei der Bildung von Ribosomen einnehmen (Kispal et al., 2005). Eine weitere Hauptaufgabe von Mitochondrien ist die sauerstoffabhängige Synthese von ATP durch oxidative Phosphorylierung (1.1.1). Darüber hinaus enthalten sie die Enzyme des Citratzyklus, der β -Oxidation, der Ketonkörpersynthese, der Hämbiosynthese und einige Enzyme des Aminosäuremetabolismus sowie der Steroid- und Phospholipidbiosynthese (Miller, 2011).

In Mitochondrien sind viele Redoxprozesse lokalisiert, was diese Organelle zu einem wichtigen Produktionsort reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) macht (Krishnan et al., 2007). Ein vermehrtes Auftreten dieser Oxidations-Äquivalente, welche sowohl zu Lipidperoxidation als auch zu DNA- und Proteindysfunktion führen können, wird mit vorzeitigem Altern, Apoptose und metabolischer Dysfunktion in Verbindung gebracht (Lenaz, 2012; Lee and Wei, 2012). Vor allem Mutation der mitochondrialen DNA (mtDNA)

stellen den Beginn eines Circulus vitiosus mit dysfunktionalen Atmungskettenenzymen und so vermehrter ROS-Produktion dar. Der erhöhte Gehalt an ROS wiederum begünstigt das Auftreten von mtDNA-Mutationen und der dadurch entstehende Kreislauf führt häufig zu einer terminalen respiratorischen Insuffizienz der Zelle (Davis et al., 1997; Carew et al., 2003). Um die Generierung schädlicher ROS zu minimieren, besitzen Mitochondrien ein fein abgestimmtes Regulationssystem, das Redoxprozesse in den Organellen kontrolliert und ein vermehrtes Auftreten von Radikalen verhindert (Diebold and Chandel, 2016).

Neben den genannten metabolischen Funktionen konnte Mitochondrien eine Schlüsselrolle in der Regulation der Apoptose und der damit verbundenen Regulation der Calciumhomöostase zugeschrieben werden (Bernardi et al., 2001; Bernardi and Rasola, 2007; Mishra and Kumar, 2005). Die Regulation der Calciumhomöostase spielt dabei nicht nur unter apoptotischen Bedingungen eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel, sondern ist auch unter physiologischen Bedingungen als Transduktionsendstrecke für einige Signalwege von Bedeutung.

Das menschliche, mitochondriale Genom codiert für weniger als 1% der Gesamtheit mitochondrialer Proteine. Das restliche mitochondriale Proteom ist Kern-codiert, wird cytosolisch translatiert und muss anschließend in das Mitochondrium und dessen Subkompartimente importiert werden (Neupert and Herrmann, 2007; Schmidt et al., 2010). Durch horizontalen Gentransfer vom Endosymbiontem zum Wirt hat sich das mitochondriale Genom im Laufe der Evolution zunehmend verkleinert (Burger et al., 2003). Für den Verbleib von mtDNA und den Erhalt einer damit einhergehenden energieverbrauchenden Transkriptions- und Translationsmaschinerie in den Organellen gibt es unterschiedliche Theorien, in welchen Importunfähigkeit (von Heijne, 1986), metabolische Kopplung (Allen, 2003) und genetische Inkompatibilität diskutiert werden (Barbrook et al., 2006).

1.1.1 Oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung beschreibt die Synthese von ATP mittels chemie-osmotischer Kopplung eines Redoxprozesses (Mitchell, 1961). An dem Prozess sind die Atmungskette, bestehend aus vier Proteinkomplexen, und die F_0F_1 -ATPase beteiligt. In der Atmungskette wird die stark exergone Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser durch die Reduktionsäquivalente NADH und $FADH_2$ aus dem katabolen Stoffwechsel katalysiert. Beim Elektronentransfer über die Komplexe der Atmungskette werden Protonen aktiv in den Intermembranraum transloziert. Daraus resultiert eine energiereiche und ungleiche Verteilung von Protonen, die auch als protonenmotorische Kraft bezeichnet wird.

Diese setzt sich zusammen aus dem chemischen Gradienten ΔpH und aus dem elektrischen Gradienten $\Delta\psi$ (Saraste, 1999). Die vier Komplexe der Atmungskette sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und bestehen aus Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat-Dehydrogenase-Ubiquinon-Oxidoreduktase), Komplex III (Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase) und Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) (Lardy and Ferguson, 1969). Protonenpumpende Eigenschaften wurde dabei den Komplexen I, III und IV zugeschrieben. Komplex II ist die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus und vermittelt den Quereinstieg von FADH_2 gebundenen Elektronen. Neben den Enzymkomplexen sind das in der Innenmembran diffundierende Ubichinon und das im Intermembranraum lösliche, aber membranassoziierte Cytochrom c am Elektronenfluss beteiligt. Die protonenmotorische Kraft kann durch Rückfluss von Protonen in den Matrixraum von der F_0F_1 -ATPase zur rotatorischen Katalyse von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt werden. Der ca. 600 kDa große Proteinkomplex besteht aus zwei funktionellen Bestandteilen. Dem in die Matrix ragendem, katalytischen F_1 -Komplex und einem F_0 -Komplex, welcher als Protonenkanal der Innenmembran fungiert (Rubinstein et al., 2003; Chen et al., 2004), Der F_1 -Komplex besteht aus den strukturellen Einheiten der katalytische Kopfgruppe ($\alpha\beta_3$) und des zentralen Stabs (γ,δ,ϵ), der F_0 -Komplex wird aus einem Membrananteil ($9_{10},6,8,f$) und einem peripheren Stab ($4,d,h$) zusammengesetzt. Weiterhin konnten vier andere Untereinheiten, welche nicht im F_1F_0 -Kernkomplex vorhanden sind, identifiziert werden (Sue, Sug, Suj und Suk). Diese Untereinheiten sind essenziell für die Oligomerisierung und haben dementsprechend einen Einfluss auf die mitochondriale Cristamembran-Geometrie (s.u. und 1.1.4.).

Die aus einer Reihe von Untereinheiten bestehenden Atmungskettenenzyme werden in mehreren Schritten und unter Hilfe einer Vielzahl von Assemblierungsfaktoren zu einer funktionellen Einheit vereint. Die Mechanismen der Regulation umfassen sowohl die Transkriptions- und Translationsebene, aber auch verschiedene Schritte der Membraninsertion (Herrmann and Funes, 2005; Rak et al., 2009; Straffon et al., 1998; Ghezzi and Zeviani, 2012). Der Assemblierung von Kofaktoren (z.B. Häm-Gruppen, Kupfer oder Eisen) konnten ebenfalls regulatorische Funktionen zugeschrieben werden. Um die Kumulation nicht assemblierter Untereinheiten zu vermeiden, unterliegt die Expression vieler Atmungskettenenzyme daher einer Regulation in Abhängigkeit von freien und nicht vollständig assemblierten Untereinheiten (Perez-Martinez et al., 2003).

In der Vergangenheit rückte neben der Einzelkomplex-Assemblierung auch eine höhermolekulare Organisation der Atmungskettenkomplexe zu sogenannten Superkomplexen (Schagger and Pfeiffer, 2000) oder Respirasomen bzw. „Respiratory strings“ (Wittig et al., 2006b) in den Fokus. In Bäckerhefe treten unter Wachstum auf nicht-fermentierbaren Medien besonders Superkomplexe der Atmungskettenenzyme III und IV in den Konformationen III_2V_1 und III_2IV_2 auf (Boumans et al., 1998). Als Strukturkomponente scheint auch das Mitochondrien-spezifische Phospholipid Cardiolipin für eine korrekte Assemblierung von besonderer Bedeutung (Zhang et al., 2005). Für Schweineherzmitochondrien wurde ein Superkomplex aus einem Komplex I, einem Komplex III und einem Komplex IV beschrieben ($I_1III_2V_1$) (Dudkina et al., 2011). Die Nomenklatur III_2 ist hierbei als strukturelles und funktionales Dimer der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase zu verstehen. Die Zusammensetzung und Anteile der Komplexe variieren je nach Wachstumsbedingungen und metabolischem Zustand. Mögliche Vorteile einer engen Assoziation der Komplexe können sowohl in einer Steigerung der Katalyse durch reduzierte Diffusion der Intermediate als auch in einer gesteigerten Substratkanalisierung bestehen. Auch die F_0F_1 -ATPase liegt unter physiologischen Bedingungen nicht primär als monomere Struktur in der inneren Mitochondrienmembran vor. Vielmehr sind die F_0F_1 -ATPasen entweder als in Reihen organisierter Dimere an den stark gebogenen Cristamembranen lokalisiert (Davies et al., 2012; Rabl et al., 2009) oder bilden noch höher organisierte Oligomerkomplexe (Habersetzer et al., 2012). Die Dimere sind typischerweise V-förmig mit einem Winkel von ca. 86° zueinander angeordnet. Für ihre Bildung sind die Untereinheiten Su e, g, und 4 erforderlich. Durch die Dimerisierung wird die umgebene Lipidmembran konvex verformt. Es wird vermutet, dass sich Dimere durch Minimierung der Verformungsarbeit, vornehmlich in Reihen entlang von Crista-Rändern anordnen (Davies et al., 2012).

1.1.2 Mitochondriale Fusions-Fissions-Maschinerie

Mitochondrien können nicht de novo entstehen und unterliegen in ihrer Biogenese einem Gleichgewicht von Fusion, Teilung und Wachstum (Diaz and Moraes, 2008). So bilden Mitochondrien in den Zellen Strukturen in Form von tubulären Netzwerken aus. Das Ausmaß der Verzweigungen ist abhängig vom metabolischen Zustand (Egner et al., 2002) und wird durch das Gleichgewicht zwischen Fusion und Teilung der Organellen bestimmt. Ein Übergewicht in der Teilung führt zur Fragmentierung (Rapaport et al., 1998), ein

Übergewicht von Fusion zu extrem verzweigten mitochondrialen Netzwerkstrukturen (Bleazard et al., 1999). Nicht nur für wachsende und sich teilende Zellen ist die mitochondriale Dynamik notwendig, um die Anzahl von Mitochondrien pro Zelle aufrecht zu erhalten. Auch für nicht proliferierende Zellen scheinen Teilungs- und Fusionsprozesse für ein Überleben essenziell zu sein (Chen and Chan, 2010). Deren Fehlregulation konnte in einen direkten Zusammenhang mit humanen Erkrankungen gebracht werden (Amiott et al., 2008). Ein mögliches Erklärungsmodell ist die fusionsabhängige Heteroplasmie von Mitochondrien, welche Mutationsungleichgewichte ausgleicht. So kann beispielsweise eine Fusion zwischen Mitochondrien mit unterschiedlichen Genmutationen in einer gegenseitigen Komplementierung des Defekts münden. Auch gibt es Evidenz für eine Abspaltung lokalisierter defekter Mitochondrienareale inklusive deren mutierter DNA durch Teilung und anschließende Autophagie (Youle and van der Blik, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine korrekte Fusion nur unter bestehendem Membranpotenzial der Innenmembran vonstatten geht. Dies könnte bewirken, dass nur funktionsfähige Mitochondrien in den Fusionspool eingehen und dysfunktionale Mitochondrien untergehen (Meeusen et al., 2004). Ebenso scheint die funktionsfähige dynamiksteuernde Maschinerie essenziell für ein Fortbestehen und korrekte Verteilung der mtDNA (Chen et al., 2010; Parone et al., 2008) und für eine funktionierende oxidative Phosphorylierung zu sein. In Tiermodellen führen Mutationen in Genen der Fusions- und Fissionsmaschinerie zum Absterben von Embryonen, welches auf eine bedeutende Rolle der Prozesse in der Embryogenese hindeutet (Chen et al., 2003; Ishihara et al., 2009). Sowohl Fissions- als auch Fusionsprozesse werden durch einer Reihe von Proteinen aus einer stark konservierten Dynamin-Familie (GTPasen) gesteuert (Hoppins et al., 2007). Der Teilungsapparat bei Säugern ist bislang durch die Proteine Drp1, Fis1 und Mff1 charakterisiert. In Hefezellen konnten die teilweise als Homologe zu betrachtenden Proteine Dnm1, Fis1, Mdv1 und Caf4 identifiziert werden (s. Abbildung 1). Das von cytosolischer Seite an der Außenmembran assoziierte Drp1/Dnm1 ist dabei durch Homooligomerisierung als Hauptstrukturkomponente an den Einschnürringen der Mitochondrienteilung beteiligt (Fukushima et al., 2001; Bleazard et al., 1999; Benard and Karbowski, 2009). Es wird durch das Protein Fis1 der Außenmembran rekrutiert und durch Bindung von GTP kommt es zur Ausbildung von spiralförmigen Strukturen. Die anschließende Abschnürung scheint eng mit der Nukleotidhydrolyse in Verbindung zu stehen. In der Innenmembran konnte ein homooligomerer Komplex des Proteins Mdm33 eine wichtige Funktion in der Mitochondrienteilung zugeschrieben werden (Messerschmitt et al., 2003). Stämme, welche dieses Protein nicht exprimieren, zeigen einen ähnlichen

morphologischen Phänotyp wie andere Deletionsstämme von Teilungsproteinen (z.B. $\Delta fis1$) (Messerschmitt et al., 2003).

In Säugern sind die Mitofusine (Mfn1 und 2) sowie Opa1 als die an der Mitochondrienfusion beteiligten Proteine identifiziert worden. In *S. cerevisiae* konnten die homologen Proteine Fzo1 (Mitofusine) und Mgm1 (OPA1) nachgewiesen werden (s. Abbildung 1). Weiterhin ist in Hefezellen das Protein Ugo1, für welches bislang kein Säugetierhomolog gefunden werden konnte, an der mitochondrialen Fusionsmaschinerie beteiligt. Fzo1 ist ein Protein aus der Dynamamin-ähnlichen Proteinfamilie, welches GTP-abhängig die Fusion der Außenmembran reguliert (Koshihara et al., 2004; Meeusen et al., 2004). Das ebenfalls für die Fusion essenzielle Ugo1 interagiert mit Fzo1, ist aber mit dessen Oligomerisierung nicht direkt verknüpft (Sesaki and Jensen, 2001; Sesaki and Jensen, 2004). Mgm1 ist eine GTPase, welche die Fusion der Innenmembran vermittelt. Die unterschiedlichen, in Hefe nachgewiesenen Isoformen der Dynamamin-ähnlichen GTPase müssen in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen, um eine Fusion der Innenmembran zu erreichen. Als treibende Kraft der energetisch aufwendigen Membranfusion wird nach heutigem Kenntnisstand das Innenmembranpotenzial angesehen. Während der Fusion können durch Interaktion des Fzo1-Ugo1-Komplexes mit Mgm1 dynamische Kontaktstellen von Außen- und Innenmembran nachgewiesen werden (Meeusen et al., 2004; Wong et al., 2000; Sesaki et al., 2003).

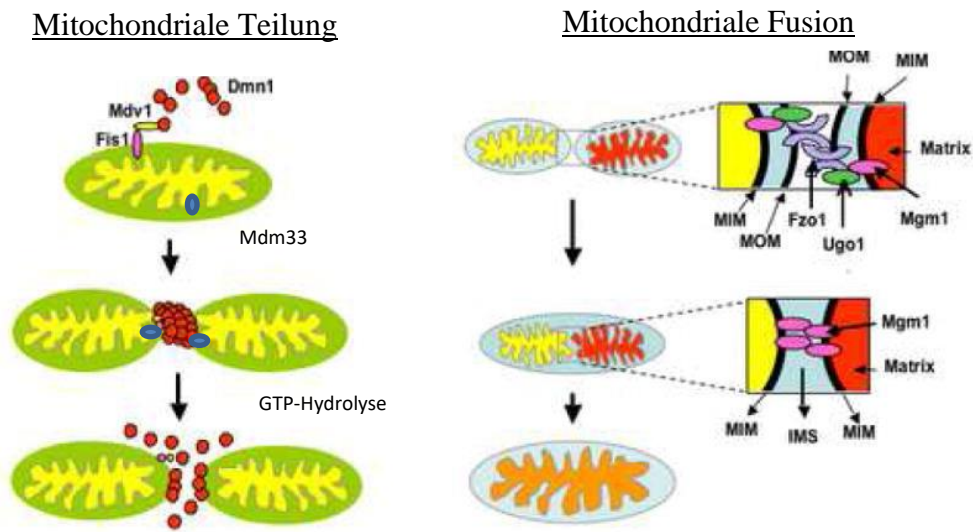


Abbildung 1 - Schematische Darstellung der mitochondrialen Fusion und Teilung in Hefe sowie der daran beteiligten Proteine

Links: Teilungsvorgang mit Rekrutierung von Dnm1 durch Mdv1 und Fis1. Durch Homoligomerisierung von Dnm1 entstehen spiralartige Abschnürringe. Die Schnürringe legen sich um die Organellen, bis die Membranen sich teilen.

Rechts: Fusionsvorgang mit Interaktion von Ugo1 und Fzo1, welche die Fusion der äußeren Membran initiieren. Anschließend erfolgt die Fusion der Innenmembran durch eine Interaktion mit Mgm1.

MIM, mitochondriale Innenmembran; **IMS**, Intermembranraum; **MOM**, mitochondriale Außenmembran

Nach Diaz and Moraes, 2008

1.1.3 Ultrastruktur von Mitochondrien und deren Dynamik

Mitochondrien bestehen aus zwei verschiedenen Membranen, der äußeren Membran (engl. *outer membrane*; OM) und der inneren Membran (engl. *inner membrane*; IM). Die Außenmembran zeichnet sich aus durch eine hohe Dichte von Porinen, spannungsabhängigen Anionen-selektiven Kanälen, welche die Außenmembran zu einer semipermeablen Membran für hydrophile, kleine Moleküle machen. Durch den hohen Lipidgehalt weist die Außenmembran ein Protein-Lipid-Gewichtsverhältnis von ungefähr 1:1 auf (De Pinto and Palmieri, 1992). Im Gegensatz zur Außenmembran ist die Innenmembran eine impermeable Barriere für Metaboliten und Ionen, welche den Intermembranraum bzw. das Cytosol von der Mitochondrienmatrix trennt (Bereiter-Hahn, 1990). Dem hohen Proteingehalt der inneren Mitochondrienmembran geschuldet ist das Protein-Lipid-Verhältnis selbiger deutlich höher (ca. 3:1). Die Innenmembran lässt sich in zwei weitere Subkompartimente unterteilen. Zum einen, an der Außenmembran anliegend, die innere Grenzmembran (engl. *inner boundary membrane*; IBM), zum anderen, die Cristamembranen, welche Einstülpungen der Innenmembran in die Mitochondrienmatrix darstellen. Den Einstülpungen entsprechend bietet die Innenmembran eine weitaus größere Oberfläche als die mitochondriale Außenmembran. Übergänge zwischen der IBM und Cristae wurden das erste Mal 1966 mittels Transmissionselektronenmikroskopie dargestellt und werden als *Pediculi Cristae* oder heute vornehmlich als *Crista junctions* bezeichnet (Daems and Wisse, 1966). Auf Grund der komplexen Membrananordnung lassen sich demnach Mitochondrienmatrix (engl. *mitochondrial matrix*; MM), Intermembranraum (engl. *intermembrane space*; IMS) und Intercristalraum (engl. *intercristal space*; ICS) als wässrige Subkompartimente der Mitochondrien unterscheiden.

Die erste Beschreibung und dreidimensionale Interpretation der elektronenmikroskopischen Mitochondrien-Bilder wurde von Palade und Sjostrand vorgenommen (Palade, 1952; Sjostrand, 1953). Das Baffle-Modell nach Palade geht von einer Einstülpung der Innenmembran in die Matrix mit einem konvexen geschlossenen Ende aus. Das Septa-Modell nach Sjöstrand interpretiert die Innenmembraneinstülpung als Septen, welche die Matrix vollständig in unterschiedliche Subkompartimente unterteilt. Die Septen haben, dieser Vorstellung nach, Verbindungen zu beiden Seiten des Intermembranraums; das Modell stellte sich jedoch als falsch heraus. Van Venetie und Verkleij beschrieben die Möglichkeit, dass es sich an den Stellen von *Crista junctions* um eine Semifusion von innerer und äußerer

Mitochondrienmembran handeln könnte (Van Venetie and Verkleij, 1982). Nach heutiger Annahme sind Crista junctions in den meisten Säugetiergeweben konstriktorisch-tubuläre, kleine Öffnungen, welche ein Netzwerk von verbundenen tubulären Cristae mit dem Intermembranraum verbinden (Mannella et al., 1994; Lea et al., 1994). Cristae können neben tubulären Konformationen auch eine lamelläre Struktur annehmen (Prince, 2002). Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass diese lamellär angeordneten Cristae immer multiple, tubuläre Ausläufer, die über gleich weite Crista junctions mit dem Intermembranraum verbunden sind, aufweisen. Als Genesemechanismus für lamelläre Anordnungen wurde ein Verschmelzen von tubulären Cristae mit lamellären Cristae vorgeschlagen (Perkins et al., 1997). Die Dichte von beobachtbaren Cristae in Mitochondrien korreliert mit der metabolischen Aktivität einer Zelle. Palade vermutete bereits, dass die Einstülpung in Form von Cristae als Oberflächenvergrößerung und Effizienzsteigerung für die oxidativen Phosphorylierung eine Rolle spielen könnte (Palade, 1953). Auch Crista junctions selbst unterscheiden sich in ihrer Struktur bei Vergleich von verschiedenen Gewebetypen (Zick et al., 2009b; Perkins et al., 1997; Frey et al., 2002). So wurden Crista junctions in neuronalen Mitochondrien als zirkulär mit einem Durchmesser von 28 nm (Perkins et al., 1997) beschrieben, wohingegen Crista junctions in Rattenlebern als elliptisch mit Durchmessern um die 20-50 nm charakterisiert worden sind (Mannella et al., 2001; Mannella et al., 1997).

Eine weitere morphologische Besonderheit von Mitochondrien sind Kontaktstellen der inneren und äußeren Membran. Sie sind durch eine im Elektronenmikroskop nicht mehr auflösbare Separierung beider Membranen charakterisiert. Die Kontaktstellen sind uniform und im Durchschnitt 7-14 nm breit (Pfanter et al., 1990; Hackenbrock, 1966). Zuerst beschrieben wurden die Kontaktstellen durch Hackenbrock, welcher metabolische Zustände mit mitochondrialer Ultrastruktur korrelierte (Hackenbrock, 1966; Hackenbrock, 1968a; Hackenbrock, 1968b). Nach Hackenbrock werden ein kondensierter und ein orthodoxer Zustand als charakteristische Mitochondrienkonformation beschrieben (Abbildung 2). Hierbei zeichnet sich der kondensierte Zustand durch Verringerung des Matrixvolumens mit konsekutiver Ablösung der inneren Grenzmembran von der Außenmembran aus. Auffällig ist ein selektives Fortbestehen von einigen wenigen Kontaktstellen der inneren und äußeren Membran. Diese Kontaktstellen konnten auch nach hypotonen Schwellen beobachtet werden und zeichnen sich durch eine hohe Detergenzienresistenz aus (van der Klei et al., 1994; Werner and Neupert, 1972). Über einen topologischen und funktionellen Zusammenhang von Crista junctions und Kontaktstellen bestehen bislang kontroverse Ergebnisse (Perkins et al.,

1997). Beide Membranen scheinen sich an Crista junctions anzunähern, entsprechen aber noch der doppelten Breite einer Membran (Abbildung 3) und unterscheiden sich demnach morphologisch von typischen Kontaktstellen. Beiden Strukturen wird jedoch eine wichtige Funktion im Aufrechterhalten von unterschiedlicher Protein- und Lipidzusammensetzung in der mitochondrialen Innenmembran zugeschrieben (van der Klei et al., 1994).

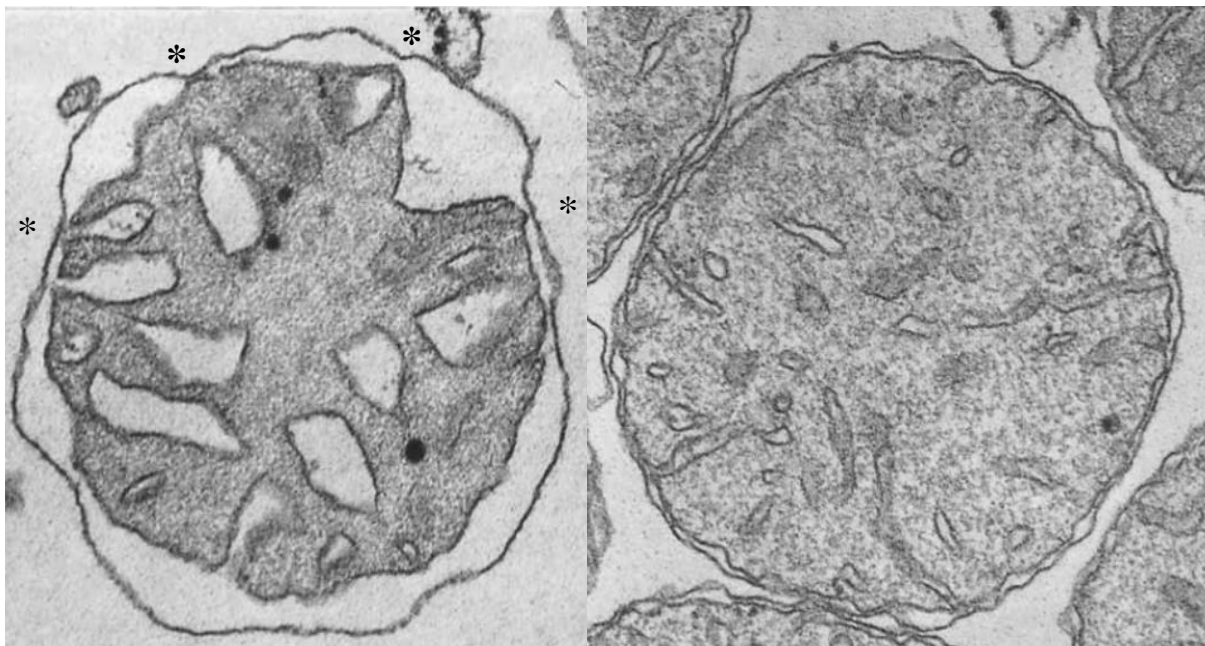


Abbildung 2 - Mitochondrien im kondensierten (links) und orthodoxen (rechts) Zustand

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die unvollständige Ablösung der mitochondrialen Innenmembran von der Außenmembran. Die adhärennten Membranabschnitte werden als Kontaktstellen bezeichnet (*). In Anlehnung an Hackenbrock, 1968.

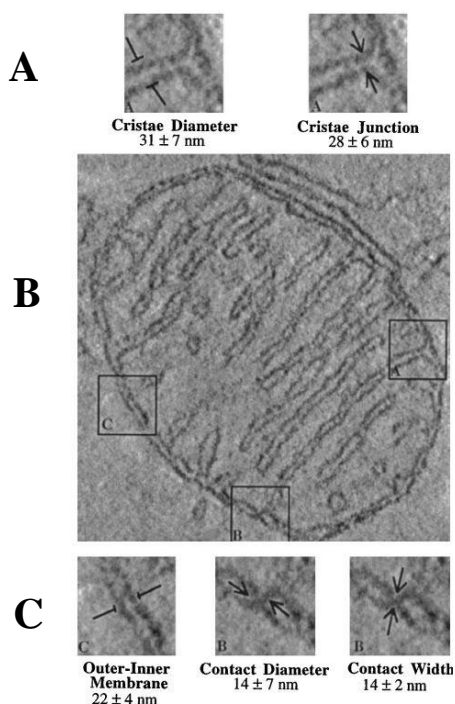


Abbildung 3 - Crista junctions und Kontaktstellen

Elektronenmikroskopie eines neuronalen Mitochondriums der Ratte (B). Vergrößerte Abschnitte im Bereich von Crista junctions (A) mit schnürringartig abnehmendem Durchmesser am Übergang zum Intermembranraum. (C) Vergrößerte Abschnitte von mitochondrialem Intermembranraum mit klarer Separation der Innen- und Außenmembran. An einigen Membranabschnitten zeigt sich eine zusammenhängende Innen- und Außenmembran (Kontaktstellen). Ein Intermembranraum lässt sich nicht mehr abgrenzen, die Separierung beider Membranen ist nicht möglich. Aus Perkins et al., 1997 (mit geänderter Beschriftung).

Ein Beispiel für den engen Zusammenhang von Funktion und Morphologie konnte bei Mitochondrien des braunen Fettgewebes beobachtet werden. In diesem Gewebe wurde nach Einschleusen von Reduktionsäquivalenten kein signifikanter Anstieg der Adenosin-Triphosphat-Konzentration nachgewiesen (Smith et al., 1966). Wenig später konnte hierfür ein unter adrenerger Kontrolle exklusiv im braunen Fettgewebe exprimiertes Protein (Thermogenin, Uncoupling Protein 1, UCP1) verantwortlich gemacht werden (Lean and James, 1983). Dieses Protein ist ein Fettsäure-abhängiger H^+ -Ionen-Kanal der Innenmembran (Fedorenko et al., 2012), welcher die elektrochemische Kopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthese aufhebt und so die durch Zellatmung gewonnen Energie dissipiert (Bouillaud et al., 1983). Dies ist die einzige Möglichkeit einer Muskelkontraktions-unabhängigen Wärmentwicklung im Körper. Auch die Ultrastruktur von Mitochondrien im braunen Fettgewebe unterscheidet sich deutlich von anderen Gewebetypen. Perkins et al. konnten zeigen, dass Mitochondrien des braunen Fettgewebes ausschließlich aus lamellären Cristae bestehen und deutlich prominentere Crista junctions aufweisen. Darüber hinaus reichen die lamellären Cristae nahezu über das gesamte Mitochondrienvolumen, also von einer Seite des Mitochondriums zur gegenüberliegenden Seite (Perkins et al., 1998).

Unter pathologischen Bedingungen wurden noch viele weitere morphologische Veränderungen von Mitochondrien beschrieben (Abbildung 4 und 5). So sind beispielsweise atypische Mitochondrien in M. Alzheimer, M. Wilson, M. Parkinson, Kardiomyopathien und nach Medikamenteneinnahme (beispielsweise bei Fluoxetin, Statinen sowie antiretrovirale Medikamenten) beschrieben worden (Baloyannis, 2006; Roberts et al., 2008; Chu, 2010; Bueler, 2010; Myung et al., 2003). Neben Kontaktstellen von mitochondrialer Außen- und Innenmembran konnten kürzlich auch Organellen-übergreifende Kontaktstellen, sog. *Mitochondrien-assoziierte ER-Membranen* (MAM), beobachtet werden (Lebiedzinska et al., 2009; Wieckowski et al., 2009). Die Membranen werden physikalisch durch Proteinkomplexe zusammengehalten. Die Kontaktstellen scheinen eine bedeutende physiologische Funktion im Calciumhaushalt, im Lipidtransfer, bei der Apoptose und Vererbung von mtDNA zu besitzen (Rizzuto et al., 2009; Hayashi et al., 2009; Decuypere et al., 2011; Hobbs et al., 2001). Der molekulare Aufbau des verbindenden Proteinkomplexes wurde kürzlich im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert und wird fortan als *ER-mitochondria encounter structure* (ERMES) bezeichnet. Es ist ein heterotetramerer Komplex aus den Proteinen Mmm1, Mdm12, Mdm34 und Mdm10 (Kornmann et al., 2009). Kontrolliert werden die Verbindungen durch die GTPase Gem1, welche Anzahl und Größe der ERMES-Komplexe reguliert (Kornmann et al., 2011).

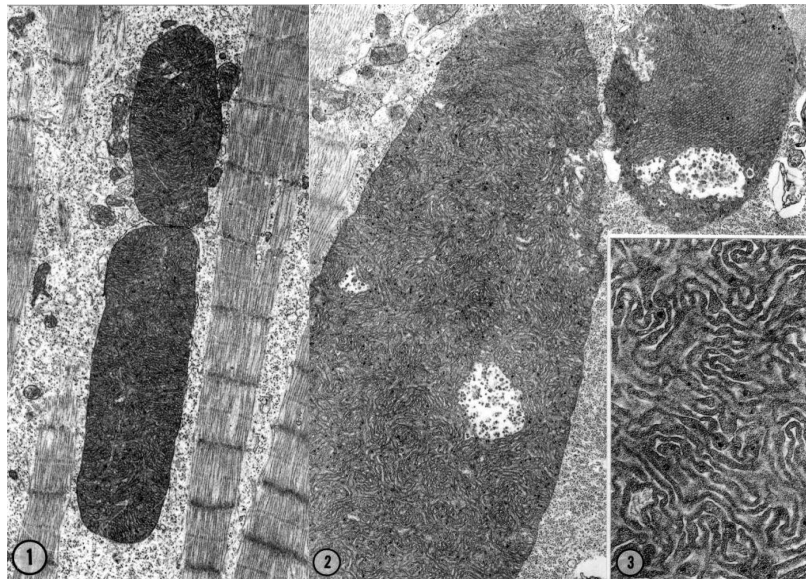


Abbildung 4 – Riesensarkomere

1: Interfibrillär lokalisierte Riesensarkomere bei Kardiomyopathie (zum Vergleich normale Mitochondrien umgebend), 2: Riesensarkomere mit Glykogeneinschlüssen und irregulär konfigurierten und dicht gepackten Cristae (3). Aus Tandler et al., 2002.

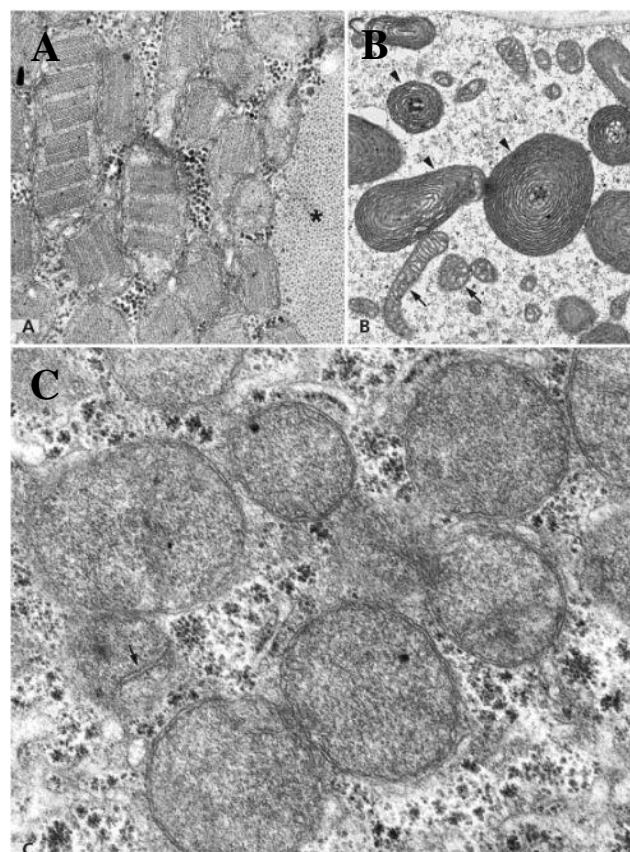


Abbildung 5 – Morphologische Vielfalt von Mitochondrien in pathologischen Zuständen

A, Mitochondrien aus Muskelfasern mit quergeschnittenen Myofibrillen (*); massive parakristalline Einschlüssen (typisch bei Mitochondriopathien); **B**, vollständig, konzentrische Cristae (▶) ohne abgrenzbare Matrix, daneben normale Mitochondrien (→); **C**, Leberbiopsie nach antiretroviraler Therapie mit vollständigem Verlust der Cristae mit wenigen Resten (→). Entnommen aus Pavelka et al., 2003 (mit geänderter Beschriftung).

1.1.4 Molekularer Aufbau und mögliche Funktion von Crista junctions

Der molekulare Aufbau von Crista junctions ist nicht gänzlich geklärt. Für die Entstehung und Aufrechterhaltung werden unterschiedliche Modelle angeführt. So postulieren Renken und Kollegen eine definierte Membranzusammensetzung und passive Druckvorgänge von Cytosol- und Matrixseite als Hauptgenesemechanismus der Crista junctions (Renken et al., 2002). Alternative Erklärungsversuche fokussieren sich auf die besondere Rolle von Proteinen und deren mögliche strukturgebende Funktionen. Bisher konnten bereits einige Proteine beschrieben werden, deren Mutation oder Deletion zu einer Alteration der Crista- bzw. Crista junction-Morphologie führt. Daher liegt bei diesen Proteinen eine entscheidende Rolle in der Struktur und Integrität für Crista junctions nahe. Zu den Vertretern zählen eine große Anzahl der die Dynamik von Mitochondrien regulierenden Proteine wie Ugo1 (Sesaki and Jensen, 2001), Mgm1 (Wong et al., 2003), Opa1 (Frezza et al., 2006) und Mdm31/32, sowie Komponenten des ERMES-Komplexes.

Ebenso wurde der konservierten Proteinfamilie der Prohibitine eine Rolle in der Genese von Crista junctions zugeschrieben (Merkwirth and Langer, 2009). Für den Mechanismus wurden zwei unterschiedliche Arten der Regulation von Crista junctions angeführt: zum einen eine indirekte Regulation durch Opa1 und der beschleunigte Abbau von Opa1 zur kurzen Isoform in Abwesenheit der Prohibitine (Merkwirth et al., 2008), zum anderen die Ring-ähnliche Konfiguration der Prohibitin-Oligomer-Komplexe, welche für die Ausbildung von Crista junctions prädestiniert (Tatsuta et al., 2005).

Darüber hinaus scheint auch die oligomere Struktur der F_1F_0 -ATPase und deren postulierter Antagonismus zu Mitofilin, bzw. Fcj1 (*F*ormation of *C*rista *J*unction protein *1*) in Hefe, eine wichtige Rolle in der Regulation der Cristaarchitektur zu spielen (Rabl et al., 2009). John und Kollegen beschrieben stapelartige Cristavesikel in HeLa-Zelllinien, in denen das Säugetierhomolog zu Mitofilin herunterreguliert war (John et al., 2005). Umgekehrt erzeugt die Überexpression von Fcj1 eine höhere Anzahl von Crista junction und internen Verzweigungen (Rabl et al., 2009). Sowohl Mitofilin als auch Fcj1 organisieren sich vermutlich in höhermolekularen Komplexen.

Über die Beziehung zwischen Struktur und Funktion der Crista junctions wurden unterschiedliche Vermutungen angestellt. Zu ihnen gehören eine selektive Proteinlokalisierung, Schaffung abgeschlossener metabolischer Räume sowie einer Regulation von apoptotischen Vorgängen (Cipolat et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass die Verteilung

mitochondrialer Proteine über die mitochondrialen Membranen nicht zufällig, sondern spezifisch ist. Für Proteine der Importmaschinerie scheint eine Anreicherung in der IBM, besonders nach induzierter Importaktivität und Arrest, für Komplexe der Atmungskette eine Anreicherung in Cristamembranen wahrscheinlich (Vogel et al., 2006; Wurm and Jakobs, 2006). Beide Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass eine spezifische Verteilung der Proteine in den Membranen ihrer Funktion entspricht. So ist eine für den Importmechanismus wichtige Annäherung von äußerer und innerer Membran in Bereichen der inneren Grenzmembran zu realisieren. Gleichzeitig ist unter der Bedingung einer nicht freien und mit ausreichend Geschwindigkeit stattfindenden Diffusion zwischen Cristae und Intermembranraum eine spezifischere, das Prinzip der chemiosmotischen Kopplung begünstigende Umgebung zu schaffen, als es im weitläufigen, nicht weiter abgegrenzten Intermembranraum der Fall wäre. Manella und Kollegen schlugen am Beispiel der Verteilung von ADP zwischen Intermembranraum und Intercristalraum auf der Grundlage von Computersimulation vor, dass Crista junctions ein Diffusionshindernis darstellen (Mannella et al., 2001). Demnach bestünde ein ADP-Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Subkompartimenten, der die Annahme nahelegt, dass die Bildung und Regulation von Crista junctions dieses Metabolitengleichgewicht beeinflussen könnte und damit indirekt die Aktivität und Effizienz der ATP-Synthese. Ebenso wurde eine ungleiche Verteilung für das Elektronen-transferierende Protein Cytochrom c beschrieben (Bernardi and Azzone, 1981). In diesem Zusammenhang schlugen Scorrano und Kollegen vor, dass die unter apoptotischen Bedingungen stattfindende Freisetzung von Cytochrom c mit einer Erweiterung der Crista junctions einhergeht (Scorrano et al., 2002). Eine besondere Rolle wird in diesem Zusammenhang dem bereits genannten Protein Opa1/Mgm1 und dessen unterschiedlichen Isoformen zugeschrieben (Cipolat et al., 2006).

1.1.5 Molekularer Aufbau und mögliche Funktion mitochondrialer Kontaktstellen

Der molekulare Aufbau mitochondrialer Kontaktstellen der Innen- und Außenmembran ist bislang unklar. Als molekulares Korrelat von transienten Kontaktstellen wird der TIM23-TOM-Superkomplex angesehen (Schleyer and Neupert, 1985; Schwaiger et al., 1987; Waegemann et al., 2015). Der Komplex setzt sich aus dem TOM-Komplex der Außenmembran (Translocase of the Outer Mitochondrial membrane) und dem TIM23/22-Komplex der Innenmembran zusammen (Translocase of the Innner Mitochondrial membrane). Er

ist neben mehreren Chaperonen und Copchaperonen für den Import cytosolisch translaterter Innenmembran- und Matrixproteine zuständig (Neupert and Herrmann, 2007). Diese durch Proteininteraktion hervorgerufenen Kontaktstellen können durch Importarrest mittels Fusionsproteinen oder Antikörperbindung im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden (Pon et al., 1989). Transiente Kontaktstellen beschreiben also einen bestimmten Funktionszustand von Proteinkomplexen und sind im Gegensatz zu permanenten Kontaktstellen nicht ohne Induktion durch Importarretierung im Elektronenmikroskop zu erkennen.

Untersuchungen von permanenten Kontaktstellen wurden bisher vornehmlich durch Auftrennung von osmotisch- und ultraschallbehandelten Mitochondrien durch einen Saccharosegradienten durchgeführt. Pon und Kollegen konnten zeigen, dass sich der TIM23-TOM-Superkomplex mittels Arretierung durch ein Vorstufenproteine in der intermediären Dichte, also in den kontakthaltenden Vesikeln der Innen- und Außenmembran, anreichert (Pon et al., 1989). Bisher wurde nur Hexokinase (Ohlendieck et al., 1986) als mögliche Proteinkomponente von Kontaktstellen charakterisiert. Andere in der intermediären Dichte angereicherte Proteine wurden von Perkins und Kollegen CSP1 (100kDa) und CSP2 (64kDa) genannt, konnten aber nicht genauer zugeordnet und analysiert werden (Perkins et al., 1997). Als weiteres mögliches molekulares Korrelat konnten Beutner und Kollegen einen Proteinkomplex aus ADP/ATP-Translokase, mitochondrialer Kreatinkinase (mtCK) und mitochondrialem Porin beschreiben (Beutner et al., 1998; Beutner et al., 1996). So wiesen Mitochondrien von transgenen Mäusen (mit Expression einer hepatischen mtCK) eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Detergenzien im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Beobachtung wurde auf eine erhöhte Anzahl mitochondrialer Kontaktstellen zurückgeführt. Speer und Kollegen konnten aber auch feststellen, dass der Komplex nicht einziges Korrelat mitochondrialer Kontaktstellen sein kann, da auch in hepatischen Wildtypmitochondrien, welche naturgemäß keine mitochondriale Isoform der Kreatinkinase exprimieren, Kontaktstellen zu detektieren waren (Speer et al., 2005).

1.2 Mitochondriale Erkrankungen

Mitochondriale Erkrankungen sind mit einer Prävalenz von 9,2/100.000 relativ seltene und eine klinisch heterogene Gruppe von Pathologien, welche durch eine Störung der mitochondrialen Funktion hervorgerufen werden (Schaefer et al., 2008). Daraus resultierend

sind Organe mit einer hoher Abhängigkeit von einem aeroben Metabolismus besonders von mitochondrialen Erkrankungen betroffen (Wallace, 1999). Unter primären mitochondrialen Erkrankungen im engeren Sinne verstehen sich Krankheiten, welche durch Mutationen in für mitochondriale Proteine codierenden Genen verursacht werden. Bisher wurden Mutationen in 228 Protein-codierenden Kern-DNA Genen und 13 Mitochondrien-DNA Genen mit humanen Krankheiten in Verbindung gebracht. Hinzu kommen 22 tRNA und 2rRNA codierende Gene der mtDNA (Koopman et al., 2012). Mutationen der mtDNA können sowohl sporadisch als auch maternal vererbt auftreten. Im Zusammenhang mit Mutationen der mtDNA sind die Begriffe Homoplasmie und Heteroplasmie von besonderer Bedeutung. Dabei bedeutet Homoplasmie ein Übereinstimmen von allen Kopien des mitochondrialen Genoms, Heteroplasmie ein Vorhandensein von zwei oder mehr mitochondrialen Genotypen. So können Zellen sowohl Anteile mutierter als auch intakter mtDNA enthalten. Im diesem Falle ist für viele Mutationsformen ein Schwellenwert postuliert, ab dem eine Abnahme der respiratorischen Effizienz signifikant ist und Krankheiten manifest werden. Der exakte Schwellenwert unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Gewebetypen, ist aber auch stark von der jeweiligen Mutation abhängig (DiMauro, 2004). Als allgemeiner Richtwert wird ein Anteil mutierter mtDNA von 60-80% angenommen (Boulet et al., 1992; Sciacco et al., 1994).

Primäre mitochondriale Erkrankungen können zum einen als Folge von Defekten in der Biogenese von Mitochondrien selbst und ihrer DNA, zum anderen durch Mutationen in Atmungskettenkomplexen und deren Assemblierungsfaktoren durch nukleäre Genmutation entstehen. Dementsprechend können sie auch Mendelschen Vererbungsregeln folgen (Craig, 2012). Zu den sekundären mitochondrialen Erkrankungen zählt man solche, die durch äußeren Einfluss entstehen, wie z.B. Pharmaka. Prominente Beispiele sind Amiodaron, Statine, Halothan, Doxorubicin und einige Antibiotika (Cohen, 2010). Weiterhin sind einige Viren in ihrer Pathogenese durch einen Eingriff in die mitochondriale Funktion gekennzeichnet (Williamson et al., 2012). Als Mitochondrien-assoziierte Erkrankungen werden alle nicht-monogenetischen Symptomenkomplexe verstanden, bei denen eine relevante Mitochondriendysfunktion im Rahmen der Pathogenese beobachtet wird. Hierzu zählen beispielhaft Morbus Alzheimer (Parker et al., 1994; Swerdlow, 2007), Morbus Parkinson (Correia et al., 2012), Amyotrophe Lateralsklerose (Martin, 2011), das Glaukom (Chrysostomou et al., 2012), Chorea Huntington (Costa and Scorrano, 2012; Shirendeb et al., 2012), Methylmalonazidurie, die Wilson-Krankheit und Diabetes mellitus (Schapira, 2012; Milone, 2012).

Warburg brachte 1956 das erste Mal auch neoplastische Vorgänge und mitochondriale Pathologie in einen funktionellen Zusammenhang. So generieren Tumorzellen, verglichen mit normalen Zellen, erheblich mehr ATP durch die Glykolyse als durch oxidative Phosphorylierung („Warburg-Effekt“) (Warburg, 1956). Dieser Effekt kann möglicherweise die Produktion von Lipiden, Aminosäuren und Nukleotiden begünstigen, das Zellüberleben durch erhöhte NADPH-Konzentrationen und erhöhte hypoxische Resistenz verbessern, und ein Tumorzellenwachstums begünstigendes azidotisches Milieu schaffen (Vander Heiden et al., 2009; Kroemer and Pouyssegur, 2008). In diesem Zusammenhang lässt sich auch die Beobachtung von „loss-of-function“-Mutationen in Enzymen des Citratzyklus bei Malignomen erklären (Bayley and Devilee, 2010; Baysal et al., 2000; Astuti et al., 2001). Die Komplexität der Klassifikation von mitochondrialen Erkrankungen kommt durch die schwache Korrelation von Geno- und Phänotyp zustande. So können gleiche Phänotypen durch unterschiedlichste Mutationen hervorgerufen werden, gleiche Mutationen aber auch zu unterschiedlichsten Phänotypen führen. Eine Klassifizierungsmöglichkeit ist die streng genetische. Tabelle 1 zeigt eine Einteilung und Übersicht der zugehörigen Phänotypen und Gene (zusammengestellt nach www.mitomap.org).

1.2.1 Klinische Symptomatik und Syndromologie von Mitochondriopathien

Die Manifestation einer mitochondrialen Erkrankung kann in jedem Alter auftreten (Leonard and Schapira, 2000). Relativ häufig ist eine pränatale Manifestation (von Kleist-Retzow et al., 2003). Mutationen von nukleären Genen, welche für Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe codieren, demaskieren sich gehäuft in der Kindheit und verlaufen normalerweise protrahiert (Schapira, 2012). Typisch klinische Erscheinungsformen einer mitochondrialen Erkrankung sind: Ptosis, Ophthalmoplegie (Payne et al., 2004), Kardiomyopathie (Griffiths, 2012), sensoneurale Blindheit, Atrophie des Nervus opticus, Diabetes mellitus, Demenz, Ataxie, Spastik und Chorea. Eine Vielzahl von Symptomen tritt gehäuft in komplexen Syndromen auf. Eine Zusammenstellung findet sich in Tabelle 2.

1.2.2 Diagnose und Therapie mitochondrialer Erkrankungen in der Klinik

Eine frühe und korrekte Diagnose mitochondrialer Erkrankungen ist in vielerlei Hinsicht entscheidend. Auch wenn die Handhabung der meisten Mitochondriopathien sich auf

eine symptomatisch-unterstützende Therapie beschränkt, können potenzielle Risiken und unnötige weitere Diagnostik vermieden werden. Beispielsweise können Aminoglykosid-Unverträglichkeiten bei bestimmten Mutationsformen erkannt, der häufig prävalente Diabetes in mitochondrialen Erkrankungen behandelt und Kardiomyopathien frühzeitig in ihrer Progression abgemildert werden. Die Möglichkeit einer mitochondrialen Erkrankung sollte prinzipiell bei allen bereits genannten (1.2.1), länger oder periodisch auftretenden typischen Symptomen in Betracht gezogen werden. Wichtige Säulen in der Diagnosefindung sind: Stammbaumanalyse, Bestimmung von Lactat im Blut, Urin und Liquor (Trijbels et al., 1988) sowie 3-Methyl-Glukonat im Serum (Wortmann et al., 2006), Belastungstests wie Fahrradergometrie oder Fasten, ophtalmologische Stuserhebung, Überprüfen einer Innenohrschwerhörigkeit, spektrometrische Erfassung der OXPHOS-Enzym-Aktivität aus Muskelbiopsien sowie Strukturanalyse mittels Blau-Nativ-Gelen von Gewebeproben und mtDNA-Sequenzierung (van Eijsden et al., 2006). In der Differenzialdiagnose einer mitochondrialen Erkrankung kann auch eine moderne neuroradiologische Diagnostik dienlich sein (Barragan-Campos et al., 2005). Einige strukturelle ZNS-Veränderungen deuten auf das Vorhandensein einer mitochondrialen Funktionsstörung hin. Zu den Veränderungen zählen beispielhaft cerebelläre Atrophie (Scaglia et al., 2005), fokale bilateral, symmetrische Läsionen in der grauen Substanz (Lee et al., 2009), sog. Schlaganfall-ähnliche Läsionen (Barkovich et al., 1993), regional erhöhte Lactat-Werte in der kranialen ^1H -MRT-Messung (Lin et al., 2003) und verminderte Werte für die ^{31}P -MRT-Messung mit hochenergetischen Phosphaten (Toscano et al., 1995). In der Vergangenheit wurden viele präventive und symptomatische Behandlungsstrategien einer Mitochondriopathie vorgeschlagen. Hierzu zählen: moderates Ausdauertraining, engmaschige Kontrolle bei Narkosen, kardiale Kontrollen, Vermeidung von mitochondriotoxischen Medikamenten wie Chloramphenicol, Tetrazykline und die bereits erwähnten Aminoglykoside. Neben der symptomatischen Behandlung, der genetischen Beratung und Aufklärung des Patienten wurden auch Medikamente bzw. Supplemente wie Ubichinon (Rotig et al., 2000; Ogasahara et al., 1986), Idebenone (Mashima et al., 2000; Mashima et al., 1992), Thiamin, Riboflavin, Ascorbat, Succinat, Creatin, Carnitin, Dichloracetat und Glukokortikoide für eine spezifischere Therapie getestet. Starke Evidenz für eine signifikante Verbesserung klinischer Symptome besteht nur für die Ubichinon-Supplementierung bei primärer, isolierter Ubichinon-Defizienz. Da aber sowohl Ubichinon als auch Riboflavin sehr wenig Nebenwirkungen zeigen und von einzelnen, den Krankheitsverlauf begünstigenden Ergebnissen berichtet wurde, raten viele Autoren, bei jedweder mitochondrialen Erkrankung eine Supplementierung der beiden Substanzen

vorzunehmen. Zurzeit wird intensiv an spezifischeren Pharmaka geforscht, die eine mitochondriale Fehlfunktion verzögern und die Genese von reaktiven Sauerstoffspezies und pathologischen Aggregaten verhindern.

Tabelle 1 - Übersicht über verschiedene nukleäre und mitochondriale Mutationen und der damit assoziierten Syndrome

nDNA-Mutationen	mtDNA-Mutationen
Mutation in Atmungskettenuntereinheiten <ul style="list-style-type: none"> Leigh-Syndrom, Komplex I Defizienz (Gene: NDUFS1, NDUFS4, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1) Leigh-Syndrom mit Komplex II Defizienz (Gen: SDHA) Leukodystrophie mit Komplex II-Defizienz (Gen SDHAF1) Optikus Atrophie und Ataxie mit Komplex II-Defizienz (Gen: SDHA) 	Deletionen/Duplikationen <ul style="list-style-type: none"> Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie Kearns-Sayre-Syndrom Taubheit
Mutationen in Atmungsketten-Assemblierungsfaktoren <ul style="list-style-type: none"> Leigh-Syndrom (Gene: SURF1, LRPPRC) Hepatopathie und Ketoazidose (Gene: SCO1) Leukodystrophie und renale Tubulopathie (Gen: COX10) Hypertrophe Cardiomyopathie (Gen: COX15) Encephalopathie (Gen: ATPAF2) 	Punktmutationen <ul style="list-style-type: none"> LHON Leigh-Syndrom
Mutationen in Atmungsketten-Translationsfaktoren <ul style="list-style-type: none"> Leigh-Syndrom (Gen: GFMI1) Lactat-Azidose und Dysmorphismus (Gen: MRPS16) Leigh-Syndrom mit Atrophie des N. opticus (Gen: TACO1) 	tRNA-Gene <ul style="list-style-type: none"> MELAS MERF Cardiomyopathie Encephalopathie
Mutationen mit Assoziation zu mtDNA-Deletionen <ul style="list-style-type: none"> Autosomal progressive externe Ophthalmoplegie (Gene: POLG, POLG2) Alpers-Huttenlocher-Syndrom (Gen: POLG) Spinale Muskelatrophie (Gen: TK2) Encephalopathie und Leberversagen (Gen: DGUOK) 	rRNA-Gene <ul style="list-style-type: none"> Aminoglykosid-induzierte Taubheit
Nicht zugeordnet <ul style="list-style-type: none"> Coenzym Q10-Defizienz (Gene: COQ2, COQ9) Barth-Syndrom (Gen: TAZ) 	

nDNA, nukleäre DNA; mtDNA, mitochondriale DNA; MELAS, engl. Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; MERF, engl. Myoclonic epilepsy with ragged red fibers; LHON, engl. Leber hereditary optic neuropathy. Die Gennamen bzw. deren Abkürzungen entsammen der NCBI-Gendatenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/).

Tabelle 2 - Übersicht über Symptomologie und Prävalenz verschiedener mitochondrialer Syndrome

Syndrom	Symptome	Fakultative Beobachtungen	Prävalenz	Quellen
Alpers-Huttenlocher Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • Hypotonie • Leberversagen • Epilepsie 	<ul style="list-style-type: none"> • Spastische Quadriplegie • Mikrozephalie • Mentale Retardierung 	1/100.000	(Davidzon et al., 2005; Gauthier-Villars et al., 2001; Naviaux and Nguyen, 2005; Sofou et al., 2012)
CPEO	<ul style="list-style-type: none"> • Ptosis • Externe Ophthalmoplegie 	<ul style="list-style-type: none"> • Ventilationsinsuffizienz 		(Smits et al., 2011; Saneto et al., 2013)
Kearns-Sayre Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • PEO <20 Jahre • Atypische Retinitis pigmentosa • Eins der Folgenden: CSF-Protein >1g/L, cerebelläre Ataxie, Errungsleitungsstörung 	<ul style="list-style-type: none"> • Myopathie • Dysphagie • Bilaterale Taubheit • Diabetes mellitus • Hypoparathyroidismus • Demenz • Fokale Fuß- und Handdystonie • Minderwuchs 	1,17/100.000	(Marie et al., 1999; Kearns and Sayre, 1958; Lestienne and Ponsot, 1988; Remes et al., 2005)
Pearson Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • Knochenmarksinsuffizienz mit rezidivierender sideroblastischer Anämie, Thrombo- und Neutropenie sowie typischen cytoplasmatischen Vakuolen • Exokrine Pankreas-Insuffizienz mit Pankreasfibrose 	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes • Gedeihstörung 	< 100 Fälle	(Demeocq et al., 1983; Pearson et al., 1979; Stoddard et al., 1981)
Leigh Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Kopfmuskulatur-Kontrolle, progredient diffuse Hypotonie • Fieber, Epilepsie • Dystonie, Dysarthrie • Diffuse Hypotonie 	<ul style="list-style-type: none"> • Lactatazidose, Fanconi-Syndrom • Hypertrophe Kardiomyopathie • Diabetes, Immunschwäche 	1/40.000	(Leigh, 1951; Morris and Harbord, 1993; Rahman et al., 1996; Ruhoy and Saneto, 2014)
NARP Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> • Hypotonie • Ataxie • Retinitis pigmentosa • Klinisches Kontinuum zu Leigh-Syndrom möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Epilepsie • Sensoneurale Taubheit • Diabetes mellitus • Lactatazidose 	unbekannt	(Sciacco et al., 2003; Fryer et al., 1994; Rawle and Larnar, 2013)
MELAS	<ul style="list-style-type: none"> • Schlaganfall-ähnliche Episoden • Epilepsie • Lactatazidose • 'ragged red fibers' 	<ul style="list-style-type: none"> • Kortikale Blindheit • Demenz • Muskelschwäche • Periphere Neuropathie 	16/100.000	(El-Hattab et al., 2015)
MERRF	<ul style="list-style-type: none"> • Myoklonus • Epilepsie • Cerebelläre Ataxie • Zottige Rote Fasern in der Muskelbiopsie 	<ul style="list-style-type: none"> • Lipomatose • Ptosis • Mirgräne • Diabetes • Taubheit 	0-1/100.000	(Fukuhara et al., 1980; Remes et al., 2003; Mancuso et al., 2013)
LHON	Schmerzloser, schnell progressiver uni- oder bilateraler Verlust der zentralen Sehschärfe		1/10.000	(Piotrowska et al., 2015)

CPEO, chronisch progressive externe Ophthalmoplegie; NARP-Syndrom, Neuropathie-Ataxie-Retinopathia-Pigmentosa-Syndrom; MELAS, engl. Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; MERRF, engl. Myoclonic epilepsy with ragged red fibers; LHON, engl. Leber hereditary optic neuropathy

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten permanenten Kontaktstellen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran am Modellorganismus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) näher charakterisiert werden. Die molekulare Natur dieser Kontaktstellen ist bisher nicht geklärt.

Durch eine Kombination der dichteabhängigen mitochondrialen Vesikeltrennung und neueren semiquantitativen Verfahren der Proteomik sollten Proteine, welche in Membranfraktionen der intermediären Dichte, also mit Bestandteilen von sowohl Außen- als auch Innenmembran, anreichern, identifiziert werden. Zunächst sollte ein Marker-Protein für diese Dichte-Fraktion etabliert werden, mit Hilfe dessen sich weitere Proteine mit gleicher Verteilung ausmachen lassen. Neben der Analyse neuer und bereits beschriebener Kontaktstellen-Proteine sollten mit der proteomischen Analyse weitere Fragen beantwortet werden: Zeigen unterschiedliche Proteinkomplexe spezifische Verteilungsmuster? Sind Innenmembranproteine zufällig oder spezifisch zwischen Cristamembran und innerer Grenzmembran verteilt? Können Proteine aus anderen Organellen auf Grund anderer Verteilungsmuster identifiziert werden? Wie verhalten sich Proteine in Mitochondrien-assoziierten Membranen? Zeigen z.B. Proteine des ERMES-Komplexes ein spezifisches Dichteverhalten? Gibt es weitere Proteine, die einen Organellen-übergreifenden Membran-Kontakt herstellen?

Neben der Identifikation von Proteinen, welche an der Ausbildung von Kontaktstellen zwischen mitochondrialen Membranen und dem endoplasmatischem Retikulum beteiligt sein könnten, sollte auch eine mögliche Funktion dieser Kontaktstellenkomplexe diskutiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte das Protein Aim31 und dessen Funktion im Rahmen der Atmungskette analysiert werden. Besonderer Wert sollte dabei neben grundlegender Charakterisierung und Bedeutung für das Zellwachstum auf möglichen topologischen und funktionellen Interaktionen mit der Cytochrom c-Oxidase und deren Assemblierung bzw. Heterooligomerisierung zu Superkomplexen liegen.

Dabei sollten auch eventuelle systembiologische Zusammenhänge zwischen Crista junctions, Atmungskettenassemblierung und Aufrechterhaltung eines unterschiedlichen Proteingradienten in den mitochondrialen Subkompartimenten in dieser Arbeit erörtert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Proteinchemische Methoden

2.1.1 Proteinpräzipitation mittels Trichloressigsäure

Zur Konzentrierung von Proteinen oder für Pufferwechsel wurden Proteinproben durch Zugabe von 72% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) bis zu einer Endkonzentration von 12% (w/v) und einer anschließenden Inkubation von mindestens 30 min auf Eis präzipitiert. Danach wurden die ausgefällten Proteine für 15 min bei 20000 xg und 4°C pelletiert und mittels Zugabe von eiskaltem Aceton lipidfrei gewaschen. Für eine sich anschließende SDS-Gelelektrophorese (2.1.3) wurden die Proben nach Lufttrocknung in SDS-Probenpuffer (2.1.3) gelöst und für mindestens 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 95°C.

2.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen

Die quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mittels der photometrischen Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Hierbei wurde die photometrische Extinktion der Probe bei 595nm (Biophotometer plus, Eppendorf, München) bestimmt. Zuvor wurde die Probe durch Zugabe von 1 ml einer 1:5 verdünnten Assayreagenz (Biorad, München) und eine sich anschließende Inkubation von 10 min vorbereitet. Analog wurde zur Erstellung einer Eichkurve eine Proteinkonzentrationsreihe mit unterschiedlichen, standardisierten Schweineserumalbumin-Proben (3, 6, 12 und 24 µg/ml) gemessen. Daraufhin erfolgte die Bestimmung der Probenproteinkonzentration mittels Berechnung aus selbiger Eichkurve.

2.1.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrer Molekülmasse erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-Page nach Laemmli (Laemmli, 1970). Hierzu wurde das Trenngel in eine Form zwischen zwei durch ein Bodengel abgedichtete 16 x 18 cm große Glasplatten gegossen. Die Dicke der Abstandhalter variierte je nach Versuch und verwendeten Probenkammern zwischen 0,8 - 1,4 mm. Sowohl die Acrylamidkonzentration (10 - 18%), als auch die Bis-acrylamidkonzentration (0,08 - 0,13%) variierten je nach gewünschter Auflösung. Die in die Probenaschen eingeführten Proben wurden vor der Elektrophorese in einen SDS-Probenpuffer gelöst und für 5 min bei 95°C erhitzt. Als Größenstandards dienten kommerzielle Proteinstandards (Biorad, München). Je nach verwendeter Geldichte erfolgte die Gelelektrophorese bei 30 mA für 1,5 - 3 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die

aufgetrennten Proteine je nach Experimentenansatz mit Comassie-Blau gefärbt (2.1.5) oder zur weiteren Analyse auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.1.6).

Bodengel	1-2% Agarose gelöst in SDS-Laufpuffer
Trenngel	8-16% (w/v) Acrylamid; 0,13-0,23% (w/v) Bis-acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 375mM Tris/HCl pH 8,8; <i>Polymerisationsbeginn</i> : 0,05% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
Sammelgel	5 % (w/v) Acrylamid; 0,08% (w/v) Bis-acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (w/v); 60mM Tris/HCl pH 6,8; <i>Polymerisationsbeginn</i> : 0,05% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	0,1% (w/v) SDS; 380mM Glycin; 50mM Tris/HCl pH 8,3
SDS-Probenlösung	2% (w/v) SDS; 5% (v/v) β -Mercaptothiophenol; 60mM Tris/HCl pH 6,8; 10% (v/v) Glycerol; Bromphenolblau pH 6,8

2.1.4 Blau-Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-Page)

Um eine Auftrennung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen zu erhalten, erfolgte eine Blau-Nativ-Gelelektrophorese nach Wittig und Schägger (Wittig et al., 2006a). Zunächst wurden die Gradienten-Separations-Gele mit Hilfe eines Gradientenmixers zwischen zwei Glasplatten bei 4°C gegossen (14 x 14 x ~0,16 cm). Die Polymerisation erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Polymerisation des Trenngels wurde bei Raumtemperatur das Sammelgel aufgegossen und ein entsprechender Probenkamm eingefügt. Anschließend wurde der Kamm entfernt und das Gel in Gelpuffer gelagert. Pro Gelspur wurden pelletierte (20000 xg, 10 min, 4°C) Mitochondrien (~400 μ g Protein) in 40 μ l des Solubilisierungspuffers 1 gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6 μ l 20% (w/v) Digitonin (3.0 g/g). Nach der Probenauftragung erfolgte die Gelelektrophorese bei 4°C für 2 - 4 h (15 mA, Spannungslimit: 500 V). Hierbei wurde bis zum Auslaufen der Front im oberen Drittel der konzentrierte Kathodenpuffer benutzt und anschließend durch den Anodenpuffer B/10 ersetzt, um die Effizienz des späteren Proteintransfers auf eine PVDF-Membran zu erhöhen. Als Größenstandards dienten kommerzielle Proteinstandards (Biorad, München).

Gelpuffer	75mM Imidazol; 1,5M 6-Aminocapronsäure; pH 7,0 angepasst mit HCl
Anodenpuffer	25mM Imidazol, pH 7,0 angepasst mit HCl
Kathodenpuffer	50mM Tricin; 0,02% (w/v) Coomassie Blau G-250; 7,5mM Imidazol; pH ~7,0; gelagert bei 4°C
Kathodenpuffer C/10	50mM Tricin; 0,002%(w/v) Coomassie Blau G-250; 7,5mM Imidazol
Solubilisierungspuffer 1	50mM NaCl, 50mM Imidazol/HCl, 2mM 6-Aminocapronsäure; 1mM EDTA; pH 7,0 (bei 4°C)
Solubilisierungspuffer 2	50mM Imidazol/HCl; 500mM 6-Aminocapronsäure, 1mM EDTA; pH 7,0 (bei 4°C)
AB-3 Mix	48% (w/v) Acrylamid; 1,5% (w/v) Bis-acrylamid
Sammelgel	0,44ml AB-3 Mix; 2ml 3x Gelpuffer; 3,4ml H ₂ O; 50 μ l 10% (w/v) APS; 5 μ l TEMED
Gradienten-Trenngel (4%)	1,5ml AB-3 Mix; 6ml 3x Gelpuffer; 10,4ml H ₂ O; 100 μ l 10% (w/v) APS; 10 μ ml TEMED
Gradienten-Trenngel (13%)	3,9ml AB-3 Mix; 5ml 3x Gelpuffer; 3g Glycerol; 3ml H ₂ O; 75 μ ml 10% (w/v) APS; 10 μ l TEMED

2.1.5 Coomassie-Färbung

Um elektrophoretisch separierte Proteine nach SDS-Page sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Hierzu wurden die Gele für ca. 1 - 1,5 h bei Raumtemperatur in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde durch Zugabe einer Entfärbelösung der Kontrast zwischen Proteinbanden und Hintergrund so lange erhöht, bis die gewünschte visuelle Differenzierbarkeit der Banden erreicht wurde.

Farblösung	0,1% (w/v) Coomassie Blau G-250; 30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

2.1.6 Proteintransfer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen

Durch SDS- oder Blau-Nativ-PAGE aufgetrennte Proteine wurden durch Elektrophorese in einem Halbtrocken- oder Nassverfahren auf eine Nitrozellulose- bzw. PDVF-Membran übertragen. Beim Halbtrockenverfahren wurden hierfür zunächst Nitrozellulosemembran, Gel und Whatman Filterpapier in einem Blot-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde auf die Graphitanode nacheinander eine Lage Filterpapier, die äquilibrierte Membran, das SDS-Gel und ein weiteres Filterpapier aufgebracht. Unter Druck wurde die Blot-Kammer mit der zweiten Graphit-Elektrode geschlossen. Der Proteintransfer erfolgt bei RT für 1,5 h mit 1,5 mA/cm². Anschließend folgten eine Sichtbarmachung der Proteine mittels Ponceau-Lösung sowie ihre nachfolgende Entfärbung mittels TBS (je unter leichtem Schwenken). Für das Nassverfahren wurde ein Tank-Blot (Hoefer, Inc., Holliston, USA) benutzt und die Membranaktivierung erfolgte über eine 15-minütige Inkubation in Methanol und anschließender Äquilibrierung in BN-Blot-Puffer. Analog zum halbtrockenen Verfahren wurden die Whatman Filterpapiere und das Gel ebenfalls im Blot-Puffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgt für 3 h bei 4°C mit 20 V und Stromstärkenlimitierung auf 0,5 mA cm⁻². Anschließend wurden eine Hintergrundentfärbung und Protein-Fixation mittels 25% Methanol und 10% Essigsäure durchgeführt. Vor Immundekoration wurde die Membran daraufhin vollständig mit reinem Methanol entfärbt.

Blot-Puffer	20% (v/v) Methanol; 0,02% (w/v) SDS; 20mM Tris; 150mM Glycin
TBS	10mM Tris/HCl; 150mM NaCl; pH 7,5
Ponceau-Lösung	0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA
BN-Blot-Puffer	50mM Tricin; 7,5mM Imidazol; pH~7,0

2.1.7 Affinitätschromatographie von Proteinen mit Histidyl-Markierung

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* wurden isolierte Mitochondrien von Histidyl-getagten Hefestämmen verwendet (2.2.12). Hierzu wurden mittels Kopräzipitation an Ni-NTA-Agarose-Kugeln und anschließender SDS-Page (2.1.3), Western-Blotting (2.1.6) und Immundekoration (2.3.3) Bindungspartner identifiziert. Nach Solubilisierung 1 mg isolierter Hefe-Mitochondrien in 1 ml Digitonin- bzw. Triton-Lysepuffer erfolgte die Pelletierung nicht solubilisierter Mitochondrien. Als Referenz dienten 10% des Überstandes, welche mit TCA-Fällung und anschließender Solubilisierung in SDS-Probenlösung (2.1.3) behandelt wurden (T/totales Lysat). Die Ni-NTA-Kugel-Suspension wurde dreimal mit entsalztem H₂O und zweimal mit 500 µl Äquilibrierungspuffer gereinigt beziehungsweise äquilibriert. Anschließend erfolgte die Auftragung von 90% des oben beschriebenen Überstandes auf die Ni-NTA-Kugeln. Danach folgte eine einstündige Inkubation im Rotationsschüttler bei 4°C zur Bindung der Hexahistidyl-markierten Proteine und der Interaktionspartner an die Ni-NTA-Oberfläche. Im Anschluss wurden 10% des Überstandes zur Kontrolle abgenommen und gleich der obigen ersten Referenz (T) behandelt (Ü/Überstand). Zur Spezifitätserhöhung wurde die Ni-NTA-Agarose dreimal mit je 400µl des Äquilibrierungspuffer bei 4°C gewaschen. Die darauffolgende Elution erfolgte mittels 20µl einer Elutionslösung, welches das um die Bindungsstellen konkurrierendes Imidazol enthielt (E/Eluat). Die Fraktionen totales Lysat (T), Überstand (Ü) und Eluat (E) wurden im Anschluss mittels SDS-Page (2.1.3), Westernblotting (2.1.6) und Immundekoration (2.3.3) oder Coomassie-Färbung (2.1.5) und anschließender Massenspektrometrie (2.1.11) weiter analysiert.

Digitonin-Lysepuffer	50mM Kaliumphosphat-Puffer; 50mM NaCl, 10mM Imidazol; 1mM PMSF; 1% (w/v) Digitonin; pH 8,0
Triton-Lysepuffer	50mM Kaliumphosphat-Puffer; 50mM NaCl; 10mM Imidazol; 1mM PMSF; 1% (v/v) Triton X-100; pH 8,0
Äquilibrierungspuffer	50mM Kaliumphosphat-Puffer; 50mM NaCl; 10mM Imidazol; 1mM PMSF; 0,05% (w/v) Digitonin / 0,05% (v/v) TritonX-100; pH 8,0
Elutionslösung	2% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptophenol; 60mM Tris/HCl pH 6,8; 10% (v/v) Glycerol; Bromphenolblau pH 6,8; 300mM Imidazol

2.1.8 Affinitätschromatographie von Proteinen mit MBP-Markierung

Zur Aufreinigung von Proteinen für die Immunisierung von Kaninchen wurde mit Maltose-bindendes Protein (MBP) fusioniertes Aim31 (MBP-Δ1-89Aim31) über eine Amylose-Säule aufgereinigt. Hierzu wurde zunächst ein MBP-Δ1-89Aim31-exprimierender *E. coli*-Stamm (pMAL-Vektor, New England Biolabs) über Nacht bei 37°C in einem LB^{Amp}-Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf eine 200 ml Kultur mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Nach einer Stunde wurde die Kultur mit 1,5 ml 0,1M IPTG (Isopropyl-β-D-

thiogalactopyranosid) zur Expression des Fusionsproteins angeregt. Nach weiterer Inkubation der Kultur für 2 h bei 37°C wurde die Kultur bei 6000 xg geerntet und das Pellet in 20 ml Säulenpuffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (6000 xg, 20 min, 4°C) wurde das Pellet in 10 ml Lyse-Puffer aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4°C im Überkopfschüttler wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (12 x 10 s, mit jeweils 10-sekündiger Unterbrechung; Output Control: 4; Duty Cycle: 60%; Branson Sonifier 250). Nicht-aufgeschlossene Zellen und Zellmembranfragmente wurden in einem weiteren Zentrifugationsschritt pelletiert (20000 xg, 4°C, 30 min). Während dieses Zentrifugationsschrittes wurden 600 µl Amylose-Beads (Amylose-Resin, New England Biolabs) in insgesamt 6 Waschschritten vorbereitet (3x mit 1 ml ionenfreies H₂O, 3x mit 1 ml Lyse-Puffer). Ein Waschschriff bestand jeweils aus 5 min Durchmischung im Überkopfschüttler bei 4°C und einer anschließenden Sedimentation für 20 s bei 16000 xg und 4°C. Die lysierte Zelllösung wurde zusammen mit den Amylose-Beads in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt. Die Bindung erfolgte bei 4°C im Überkopfschüttler für 1,5 h. Die Beads wurden im Anschluss in einer Falcon-Zentrifuge sedimentiert und der Überstand wurde verworfen. Nach einem 3-maligen Waschschriff mit je 1 ml des Lysepuffers folgte die Elution mit 0,5 ml Elutionspuffer und 5-minütiger Inkubation im Überkopfschüttler bei 4°C. Im Anschluss an die Zentrifugation (16000 xg, 20 s, 4°C) wurde der Überstand (aufgereinigte Antigenlösung) nach Konzentrationsbestimmung und etwaiger Verdünnung bei 4°C gelagert und zur Immunisierung verwendet (2.3.1).

Säulen-Puffer	20mM Tris; 200mM NaCl; 1mM EDTA; pH 7,4
Aufschluss-Puffer	Säulen-Puffer; 1mM PMSF; Roche Complete Protease Inhibitor; 1mg/ml Lysozym, DNase-Lösung
Elutions-Puffer	Säulen-Puffer; 10mM Maltose
Lysozym-Lösung	200mg Lysozym und 1mg DNase in 5ml H ₂ O
Proteaseinhibitor-Lösung (Roche®)	1 Tablette (cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail®) in 1ml H ₂ O

2.1.9 Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität

Die Bestimmung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität erfolgte durch spektrometrische Bestimmung der Differenz von Ferro- und Ferri-Cytochrom c bei 550 nm ($\Delta E_{\text{Red-Oxi}} = 21,1 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$). Hierzu wurde in Wasser und Kaliumphosphatpuffer gelöstes Cytochrom c (0,8mM) zunächst durch die Hinzugabe von kleinen Mengen Natriumdithionit reduziert bis die Extinktion von 100 µl Cytochrom c Lösung in 1 ml Wasser zwischen 1,8 und 1,9 lag. Das noch vorhandene reduzierende Dithionit wurde daraufhin durch Vortexen oxidiert. Zur Herstellung einer solubilisierten mitochondrialen Proteinlösung wurde 1 mg

Mitochondrienprotein bei 20000 xg für 10 min bei 4°C pelletiert und anschließend in 0,5% Triton-X100, 10mM Kaliumphosphat bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/µl resuspendiert. Im Anschluss folgte eine Inkubation (20 min) bei 4°C zur Membransolubilisierung. Daraufhin wurde eine Probenküvette mit 80 µl reduziertem Cytochrom c und 900 µl 10mM Kaliumphosphat-Puffer vorbereitet. Die Cytochrom c-Oxidase-Reaktion in der Probenküvette wurde durch Hinzugabe von 20 µl mitochondrialer Proteinlösung (1 µg/µl) gestartet. Die Absorption wurde für 2 min bei 550 nm im linearen Bereich gemessen. Um Hintergrundaktivitäten anderer enzymatischer Reaktionen zu berücksichtigen, wurde die Spezifität der Cytochrom c-Oxidation durch die Cytochrom c-Oxidase durch Hinzugabe von 40mM KCN verifiziert, bzw. ein etwaig fortbestehendes Hintergrundsignal wurde nicht in die Kalkulation der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität mit einbezogen. Die Messung wurde dreimal mit je einer neuen Probe von mitochondrialem Protein des jeweilig untersuchten Hefestammes durchgeführt.

2.1.10 Bestimmung der Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Aktivität

Die Bestimmung der Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Aktivität erfolgte ebenso durch spektrometrische Bestimmung der Differenz von Ferro- und Ferri-Cytochrom c bei 550nm ($\Delta E_{\text{Red-Oxi}} = 21.1 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$). Zunächst wurde nach den Angaben des Protokolls von Magri et al. eine reduzierte Ubichinon-Lösung hergestellt (Magri et al., 2010). Die Mitochondrien-Solubilisierung erfolgte wie bereits beschrieben (2.1.9). Daraufhin wurde eine Küvette mit 20µl mitochondrialer Proteinlösung (1µg/µl), 200 µl 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, 40 µl 50 mM NaN₃ und 50 µl 1 mM oxidiertem Cytochrom c vorbereitet. Das Gesamtvolumen wurde durch Zugabe von ionenfreiem Wasser auf 990 µl vergrößert. Nach Notieren der Hintergrundaktivität wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl einer reduzierten Ubichinon-Lösung gestartet. Die Extinktionsänderung über die Zeit wurde für 2 min registriert und im linearen Bereich ausgewertet. Um Hintergrundaktivitäten anderer enzymatischer Reaktionen zu berücksichtigen, wurde die Spezifität der Aktivität der Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase durch Hinzugabe von Antimycin A verifiziert. Die Messung wurde dreimal mit je einer neuen Probe von mitochondrialem Protein des korrespondierenden Stammes durchgeführt.

2.1.11 Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie

Die Analyse und Auswertung der Proben erfolgte durch Marc Borath und Dr. Ignasi Forne (Biomedizinisches Zentrum München, Zentrales Institut für Proteomanalytik;

Auftragsnummer: SID811_080910; Datum: 29.09.2010; Analyse: LC-MS). Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden zunächst in Anlehnung an vorbestehenden Protokolle verdaut (Wilm et al., 1996; Shevchenko et al., 2000). Hierzu wurden die Gelstücke vorerst zweimal mit 100 µl destilliertem Wasser und dreimal mit 100 µl 25mM NH₄HCO₃ gewaschen. Im Anschluss wurden die Proben dehydriert, in dem sie dreimal mit 100 µl Acetonitril gewaschen wurden. Die Gelstücke wurden daraufhin 1 h in 50µl 10mM DTT, das zuvor in 25mM NH₄HCO₃ gelöst wurde, inkubiert. Danach erfolgte die Reduktion von Cysteinresten durch eine Inkubation mit 50 µl 55 mM Iodoacetamid in 25mM NH₄HCO₃ und eine weitere Dehydrierung mit 100 µl Acetonitril. Nach Zugabe von 10 µl einer Trypsinlösung (Promega, Trypsin-Konzentration: 25 ng/µl gelöst in 25 mM NH₄HCO₃) wurden die Gelstücke für 45 min bei 4°C inkubiert. Nicht in die Gelstücke diffundierte Protease wurde abgenommen und die Gelfragmente wurden mit 25 mM NH₄HCO₃ bedeckt und für weitere 16 h bei 30°C verdaut. Für die Extraktion der verdauten Peptide wurden die Gelstücke zweimal mit 50 µl Lösung 1 und zweimal mit 50 µl Acetonitril inkubiert. Die Peptid-Lösung wurde getrocknet und die Peptide wurden im Anschluss wieder in 15 µl 0,1%iger Ameisensäure gelöst und bei -20°C gelagert. Für die sich anschließende Massenspektrometrie wurden 13 der 15 µl in ein Ultimate HPLC system (LC Packing) injiziert und mit Hilfe einer C18 Mikrosäule entsalzt (300µm Innendurchmesser x 5mm, geladen mit C18 Pepmap®, 5µm, 100 Å, LC Packings). Die entsalzten Proben wurden mit Hilfe einer analytischen C18-Mikrosäule (75µm Innendurchmesser, ReproSil-Pur C18-AQ 2.4µm, Dr. Maisch GmbH) und einem 40-minütigem Gradienten von 5% bis 60% Aceonitril in 0.1%iger Ameisensäure separiert. Das jeweilige Eluat wurde direkt mittels Elektrospraying in das LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer gespeist.

Die registrierten Peptide wurden durch Datenbankabgleich mittels Maskot 2.3 (Koenig et al., 2008; Perkins et al., 1999) mit dem Hefe-Proteom abgeglichen (Bedingungen: NCBI nr 200911/ taxonomy Fungi; MS tol, 10ppm; MS/MS tol, 0.5 Da; variable Modifikationen Oxidation (M); Fixe Modifikationen: Carbamidomethyl (C)). Peptid-Fragmente, die ausschließlich in den Histidyl-getagten Gel-Fragmenten (His1-13; Batch-Nr: SID811_080910_His), nicht aber in der Wildtyp-Spur (wt1-13, Batch-Nr: SID811_080911_wt) zu detektieren waren, wurden als mögliche Interaktionspartner gewertet. Die Online-Links zu den Rohdaten-Tabellen der identifizierten Peptide befindet sich in einer Tabelle im Anhang der Arbeit (8).

Lösung 1 | 50% Acetonitril; 0,25% Trifluoressigsäure (TFA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Vorbereitung einer Gewinnung genomischer DNA aus dem Organismus *S. cerevisiae* wurde der Wildtypstamm W303 oder YPH499 über Nacht in einem glukosehaltigen Vollmedium (YPD, siehe 2.5) bei 30°C inkubiert. Die am Folgetag durchgeführte DNA-Isolierung erfolgte nach Anleitung und mit Hilfe der Reagenzien eines kommerziellen Kits zur Extraktion genomischer DNA aus eukaryontischem Gewebeproben/Zellen (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega).

2.2.2 Plasmid-DNA-Isolierung aus *Escheria coli*

Das angewandte Verfahren zur Extraktion von Plasmid-DNA basiert auf den Grundsätzen der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979). Hierzu wurden *E. coli*-Bakterien in 5ml LB^{Amp}-Medium (2.5.2) über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Hälfte der Flüssigkultur wurde am Folgetag bei 160000 xg für eine Minute pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Bakterien in 100 µl der Lösung 1 resuspendiert. Die alkalische Lyse wurde nach Zugabe von 200 µl der Lösung 2 induziert. Es erfolgte ein vorsichtiger Mischvorgang durch manuelles Invertieren. Die Ausfällung der Proteine und genomischer DNA erfolgte durch Zugabe von 150 µl der Lösung 3. Das entstandene Protein/Genom-Präzipitat wurde im Anschluss durch einen Zentrifugationsschritt (20000 xg, 10 min, 4°C) pelletiert. Nach Überführen des Überstands in ein neues Gefäß, wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol ausgefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation (20000 xg, 10 min, 4°C) und eines zweimaligen Waschvorgangs mit je 600 µl 70%-igem, -20°C kaltem Ethanol wurde das Plasmid-Pellet getrocknet. Daraufhin erfolgte eine Resuspension in 30 µl sterilem Wasser und einer Verdünnung der Probe auf eine DNA-Konzentration von 1 µg/µl. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Lösung 1	10mM EDTA; 50mM Tris-Base; 0,1mg/ml RNase A; gelagert bei 4°C
Lösung 2	0,2M NaOH; 1% (w/v) SDS gelagert bei RT
Lösung 3	60ml 3M Kaliumacetat; 11,5 ml Eisessig; 28,5ml H ₂ O; gelagert bei 4°C

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt in vitro kurze, definierte Abschnitte eines DNA-Strangs (Amplicon). In einer sich wiederholenden Abfolge (20-50 Zyklen) von Reaktionen bei unterschiedlichen Temperaturen entstehen Kopien (Amplifikate) des Amplicons. Der

Prozess wurde mit einer initialen, 7-minütigen Denaturierung begonnen. Es folgten 25-30 Zyklen bestehend aus den Einzelschritten Denaturierung (1 min bei 95°C), Primerhybridisierung (1 min bei 45-60°C) und Elongation (1 - 6 min bei 72°C). Die Temperatureinstellung während des Schrittes der Primerhybridisierung wurde nach der ‚Faustformel‘: 2°C pro A/T + 4° pro G/C ermittelt. Die Länge des Elongationsschrittes richtete sich sowohl nach der Länge des Amplicons als auch nach der verwendeten Polymerase: Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Promega): ca. 0,5 kb pro min; Taq-Polymerase aus *Thermus quaticus* (Promega): ca. 1 kb pro min. Nach Abschluss des letzten Zyklus erfolgte eine finale Elongationsphase bei 72°C für 10 min. Die Amplifikate wurden zur Längenkontrolle und Isolation auf Agarosegele aufgetragen (2.2.5) oder direkt in Lösung über Mikrozentrifugationssäulchen isoliert (2.2.4). Ein Reaktionsansatz bestand typischerweise aus einem Volumen von 50 µl. Er enthielt 2 U der jeweiligen Polymerase, je 50 pmol der Primer-Oligonukleotide, 5 µl des vom Hersteller mitgelieferten zehnfach-konzentrierten Puffers, 50 ng der genomischen DNA/Plasmid-DNA und je 100 µM der Desoxyribonukleosidtriphosphate.

2.2.4 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte durch ein kommerziell erwerbliches Reinigungs-Kit (Promega, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System). Hierzu wurde in einem mehrschrittigen Verfahren die in Lösung befindliche DNA zunächst an die Mikrozentrifugationssäulchen gebunden, anschließend mehrfach mit Ethanol gewaschen und mit sterilem Wasser eluiert (s. auch Angaben und Anweisungen des Herstellers). Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurden zuvor die Banden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Durchleuchtung ausgeschnitten. Anschließend wurde das Agarosestück mit einem seiner Masse angepassten Volumen von Bindungspuffer (s. Herstellerangaben) versetzt und bei 55 - 60°C gelöst.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von in Lösung befindlicher DNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einem Spektralphotometer bestimmt (OD_{260}). Dabei entsprach eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Bestimmung der Extinktion im linearen Bereich wurden die Lösungen nach Bedarf mit Wasser verdünnt (typischerweise 1:100). Eine möglicherweise bestehende Proteinkontamination wurde mit der Quotientenbildung OD_{260}/OD_{280} evaluiert (optimaler Weise zwischen 1,8 - 2,0).

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente der größenabhängigen Auftrennung und Isolation von DNA-Fragmenten. Abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente wurde 1-2% (w/v) Agarose durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Vor Ausguss des Gels wurde Ethidiumbromid den Gelen in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die DNA-enthaltenden Proben wurden mit fünffach-konzentriertem Auftragspuffer gelöst und in geeigneten Porengrößen aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 15 V/cm durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden durch das interkalierende Ethidiumbromid in einem UV-Transilluminator visualisiert. Zur Größenbestimmung der getrennten DNA-Fragmente dienten Standards der Firma New England BioLabs (NEB, 1kb DNA ladder und 100 bp DNA ladder).

5x Auftragspuffer	0,25% (w/v) Xylencyanol; 0,25% (w/v) Orange; 40% (w/v) Glycerin
TAE-Puffer	20mM Natriumacetat; 1mM EDTA; 40mM Tris/Acetat; pH 7,4

2.2.7 Restriktionsenzymverdau und Ligation

Um Plasmide oder PCR-Fragmente sequenz-spezifisch zu spalten, wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB) verwendet. Ein Verdauansatz bestand aus 1 µg der jeweiligen zu spaltenden DNA, 2 U des Nuklease-Enzyms sowie des vom Hersteller empfohlenen 10x-Puffers. Die Ansätze wurden für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Zur anschließenden Ligation wurden eine T4-DNA-Ligase (NEB) und der vom Hersteller mitgelieferte 10x-Puffer verwendet. Ein Ligationsansatz wurde stets mit ca. 100 ng des linearisiertem Vektors und einem ca. fünffachen molaren Überschuss des zu inserierenden DNA-Fragments angefertigt. Die Ligation erfolgte bei 16°C für 6 – 12 h.

2.2.8 Herstellung von elektrokompetenten Escheria coli

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde eine Vorkultur über Nacht mit LB^{Tet}-Medium (2.5.2) bei 37°C kultiviert. Am Folgetag wurde mit dieser Vorkultur 2 l LB^{Tet} beimpft (Zelldichte: OD₆₀₀ von 0,05-0,1). Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer End-Dichte von 0,5 geschüttelt. Alle weiteren Schritte folgten auf Eis bzw. bei 4°C. Durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 xg wurden die Zellen pelletiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit sterilem 10% (v/v) Glycerol bei 4°C. Nach Aufnahme des gewaschenen Zellpellets in 1 ml 10% (v/v) Glycerol wurden die Zelllösung aliquotiert (je 30 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.9 Transformation von *Escheria coli*

Die Einbringung rekombinanter Plasmid-DNA in das Zellinnere von *E. coli*-Zellen erfolgte durch das Verfahren der Elektroporation (Fiedler and Wirth, 1988). Für einen Transformationsansatz wurden 30 µl in Glycerol aufgenommenen, elektrokompenten *E. coli* (2.2.8) auf Eis aufgetaut. Anschließend folgte der Zusatz von 0,5 µl des gereinigten Plasmids. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 5 min auf Eis erfolgte ein Stromstoß (2,5 kV; 400 Ω; 25 µF; Gene-Pulser, Bio-Rad). Danach erfolgte die sofortige Übergabe der Bakteriensuspension in 1 ml LB-Medium. Nach Verstreichen einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen sedimentiert und auf LB-Platten mit dem Selektionsmarker übertragen (2.5.2).

2.2.10 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation erfolgte nach dem überarbeiteten Lithium-Acetat/Polyethylen Glykol-Protokoll, welches von Gietz und Kollegen etabliert wurde (Gietz et al., 1995). Hierzu wurde eine Vorkultur des jeweiligen Stamms in einem YPD-Medium angelegt. Diese wurde über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde mit selbiger Kultur 50 ml YPD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft. Es folgte eine weitere Inkubation bei 30°C bis zu einer End-OD₆₀₀ von 1,0. Anschließend erfolgte die Hefezellsedimentation in einem sterilen Zentrifugationsröhrchen. Nach zwei Waschschritten, einmal mit 1 ml sterilem Wasser und einmal mit 1 ml des Puffers A, wurde das Zellpellet anschließend in 100 µl des Puffers A solubilisiert. Zur sich anschließenden Transformation wurden 50 µl dieser Suspension, 50 µg denaturierte Lachsspermien DNA, 2 µg Plasmid-DNA bzw. des PCR-Amplifikats und 300 µl Puffer B hinzugegeben. Die Hitzeschock-Transformation (15 min bei 42°C) erfolgte, nachdem die Probe vorher für 30 min bei 30° auf dem Schüttel-Mixer durchmischt wurde. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 30 s mit 9000 xg pelletiert und in 1 ml YPD-Medium solubilisiert. Im Anschluss an eine einstündige Inkubation bei 30°C wurden die Zellen erneut pelletiert und mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach Aufnehmen des gewaschenen Pellets in 100 µl sterilem Wasser erfolgte die Ausplattierung und Inkubation auf dem entsprechendem Auxotrophmedium (2.5.1).

Puffer A	1mM EDTA; 100mM Lithiumacetat; 10mM Tris-HCl pH 7,5
Puffer B	100mM Lithiumacetat; 40% (w/v) Polyethylenglycol 6000; 10mM Tris-HCl pH 7,5

2.2.11 Expression von Plasmid-codierten Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae*

Zunächst wurde der offene Leserahmen von YML030W/AIM31 mit Hilfe von Primern (s.u.) mittels PCR kopiert (2.2.3). Hierbei wurde eine für einen N- oder C-terminalen Hexahistidyl-

Anschließend erfolgte eine selektive Inkubation durch ein synthetisches, Histidin-freies Spezialmedium (2.5.1).

In der Arbeit wurden folgende Primer zur Deletion von Genen verwendet:

Aim31_KO_s	5' AATTCCTGGTACTAGAAAGCGATAACATCACAGTTATA GTTCAAGCGGATCCCCGGGTTAATTAA 3'
Aim31_KO_as	5'CTTCTTTCCAGCTTATTTTCCAGGTCGCTTATTCCTTTTCTAAATCGATGAAT TCGAGCTCG 3'

Der Mechanismus der homologen Rekombination wurde auch für das Einbringen C-terminaler Protein-Tags in chromosomaler Hefe-DNA genutzt. Hierzu wurde unter Zuhilfenahme der PYM9-Kassette der Proteintag zusammen mit einer Selektionskassette durch eine PCR vervielfacht (2.2.3). Für den PCR-Ansatz wurden sense-Primer mit 45 Nukleinsäuren vor dem Stoppkodon von Aim31 und der pYM9-spezifischen Sequenz erstellt. Als Antisense-Primer diente der Primer AIM31_KO_As (2.2.12). Das Amplifikat wurde im Anschluss wie beschrieben transformiert (2.2.10). Die erfolgreiche Rekombination wurde mittels YPD^{Gen}-Medium selektioniert (2.5.1).

In der Arbeit wurden folgende Primer zur Insertion von chromosomalen C-terminalen Tags verwendet:

Aim31-6xHis_s	5' TTAGAAAAGGAACTAAGCGACCTGGAAAATAAGCTTGGAAAGAAGCATCACC ATCACCATCACTAGG 3'
---------------	--

2.2.13 Verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
W303 α	<i>MATα, ade2-1, his3-11, 15 leu2, 112 trp1, ura23-53, can1-100</i>	(Rothstein and Sherman, 1980)
YPH499	<i>MATα ade2-101 his3-Δ200 leu2- trp1-Δ63 ura3-52 lys2-801</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
$\Delta aim31/yml030w$	YPH499, <i>aim31::HIS3</i> ,	Diese Arbeit
$\Delta aim31/yml030w$ + pYES2-Aim31	YPH499, <i>aim31::HIS3, PYES2-Aim31</i>	Diese Arbeit
$\Delta aim31/yml030w$ + pYES2-Aim31-6xNHis	YPH499, <i>aim31::HIS3, PYES2-Aim31-6xNHis</i>	Diese Arbeit
$\Delta aim31/yml030w$ + pYES2-Aim31-6xCHis	YPH499, <i>aim31::HIS3, PYES2-Aim31-6xCHis</i>	Diese Arbeit
Aim31-6xCHis	YPH499, <i>aim31::AIM31-6xHis-KAN</i>	Diese Arbeit

2.2.14 Verwendete Plasmide

Plasmid	Referenz	Organismus	Verwendung
pYES2	Invitrogen, (Oldenburg et al., 1997)	<i>S. cerevisiae</i>	Histidyl-getagtes Aim31 zur Affinitätschromatographie
pFA6a-His3MX6	(Wach et al., 1997)	<i>S. cerevisiae</i>	Genetische Manipulation zwecks Herstellung von Deletionsstämmen
pYM9	(Knop et al., 1999)	<i>S. cerevisiae</i>	Genetische Manipulation zwecks Einbringen eines chromosomalen Histidyl-Tags
pMAL-cRI	New England Biolabs (Sun et al., 1995)	<i>E. coli</i>	Fusionsprotein zur Antikörper-Herstellung

2.3 Immunologische Methoden

2.3.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Für das Protein Yml030w/Aim31 wurde in der vorliegenden Arbeit ein polyklonaler Antikörper generiert. Hierzu wurden zunächst das in *E. coli* exprimierte Antigen aufgereinigt (2.1.8). Anschließend wurden Kaninchen mit der entsprechenden Proteinlösung (1µg/µl) immunisiert. Die Primärimmunisierung wurde mit 200 µl Antigenlösung und 200 µl TiterMax Gold (Sigma) durchgeführt. Weitere Immunisierungen folgten typischerweise im Abstand von vier Wochen durch weitere Gabe von 200 µl Antigenlösung und 200 µl des Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma). Im Anschluss wurde den Kaninchen ab der zweiten Immunisierung alle 10 Tage 25 ml Blut abgenommen. Durch Abzentrifugation der korpuskulären Anteile (3000 xg, 5 min, Raumtemperatur) konnte Serum gewonnen werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 12000 xg für 12 min bei 4°C, wurde der Überstand des Serums für 30 min auf 56°C erhitzt, um die Aktivität von hitzelabilen störenden Kofaktoren zu reduzieren (z.B. Komplementfaktoren, Fibrin). Nach diesem Schritt wurden die Proben bei -20°C gelagert. Die Immunisierung der Tiere wurde im Tierstall durchgeführt.

2.3.2 Aufreinigung von Antikörperseren

Die Aufreinigung von Antikörpern erfolgte mittels an Säulen gebundenen Antigenen. Hierzu wurden zunächst die aufgereinigten Antigene an eine Säule (Sulfoink Coupling Gel, Thermo Fisher Scientific) gebunden. Für diesen Schritt wurde 1 ml des Säulenmaterials mit 1 ml des Kopplungspuffers gewaschen. Anschließend folgte die Antigenbindung durch eine 45-minütige Inkubation des Säulenmaterials mit 1 mg Antigen, welche zuvor in 1 ml des Kopplungspuffers aufgenommen worden war. Nach Verwerfen des Durchflusses folgte ein Waschschritt mit 3 ml des Kopplungspuffers. Anschließend wurde die Säule 45 min bei Raumtemperatur mit einem Blockpuffer inkubiert. Im Anschluss wurde die Säule mit 16 ml 1M NaCl gewaschen. Das Säulenmaterial wurde anschließend in einem fünfstufigem Verfahren gewaschen: Je 10 ml Waschpuffer 1, Elutionspuffer 2, Waschpuffer 2, Elutionspuffer 3, Waschpuffer 1. Zur anschließenden Antikörperbindung wurden zunächst 6 ml des Antiserums mit 24 ml Waschpuffer 1 und Zusatz von 1mM PMSF und des Roche EDTA-free Complete Protease Inhibitor® vorbereitet. Das Gemisch wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe auf die Säule aufgetragen. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei beim zweiten Mal der Durchfluss des vorangegangenen Schrittes verwendet wurde. Anschließend wurde die Säule zweimal gewaschen: je mit 10 ml Waschpuffer 1 und Waschpuffer 3. Die gebundenen Antikörper wurden durch aufeinander

folgende Zugabe von je 10 ml Elutionspuffer 1-3 eluiert und in 1 ml-Fractionen gesammelt. Eine pH-Neutralisierung erfolgte mittels Neutralisierungspuffer 1 (für die Fractionen mit Elutionspuffer 1 und 2) bzw. Neutralisierungspuffer 2 (für die Fractionen mit Elutionspuffer 3). Im Anschluss erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung (2.1.2). Eluatfractionen mit hohem Antikörpergehalt wurden in Block-Milch verdünnt (1:500) und mittels Western Blotting (2.1.6) und Immundekoration (2.3.3) dessen Bindung und Spezifität überprüft. Zur etwaigen Wiederverwendung wurde die Säule mit 10 ml Waschpuffer 1 gewaschen und zur Lagerung mit 0,05% (w/v) Natriumazid, welches in 2 ml des Waschpuffers 1 gelöst wurde, inkubiert und bei 4°C gelagert.

Kopplungspuffer	50mM Tris; 5mM EDTA; pH 8,5
Blockpuffer	50mM Cystein, 50mM Tris; 5mM EDTA; pH 8,5
Waschpuffer 1	10mM Tris/HCl; pH 7,5
Waschpuffer 2	10mM Tris/Base; pH 8,8
Waschpuffer 3	500mM NaCl; 10mM Tris/HCl; pH7,5
Elutionspuffer 1	100mM Natriumcitrat; pH 4,0
Elutionspuffer 2	100mM Glycin/HCl; pH 2,5
Elutionspuffer 3	100mM Na ₃ PO ₄ ; pH 11,5
Neutralisierungspuffer 1	1M Tris/Base; pH 8,8
Neutralisierungspuffer 2	1M Glycin/HCl; pH 2,5
Block-Milch	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer

2.3.3 Immundekoration von Proteinen

Die aufgereinigten Antikörper-Lösungen wurden zur Immundekoration von Proteinen auf Nitrozellulose oder PVDF-Membranen verwendet. Hierzu wurde der aufgereinigte Aim31-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in Block-Milch verdünnt. Die PVDF- oder Nitrozellulosemembranen wurden zunächst 1 h in Block-Milch bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend erfolgte die Dekoration mit dem affinitätsgereinigten Antikörper für 3 h bei RT. Alle nicht fest an die Membran beziehungsweise deren Proteine gebundenen Antikörper wurden daraufhin durch drei Waschschrte (5 min in TBS, 10 min in TBS/T, 5 min in TBS) entfernt. Hiernach erfolgte die Dekoration der gebundenen Antikörper durch einen gegen den Fc-Teil der Immunglobuline G von Kaninchen gerichteten Antikörper für 1 h bei RT (Goat Anti Rabbit-IgG Horseradish Peroxidase, Bio-Rad). Nach einem weiteren Waschschrte (wieder 2x TBS, 1x TBS/T) wurden die gebundenen Zweitantikörper über eine

Peroxidasereaktion auf Chemilumineszenz-Filmen nachgewiesen. Hierzu wurden die Membranen in der Dunkelkammer mit einer ECL1-ECL2-Mischung (Verhältnis 1:1) inkubiert und die Reaktion gestartet.

TBS/T	TBS-Puffer mit 0,05% Triton X-100
Block-Milch	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer
ECL1	100mM Tris/HCl; 0,044% (w/v) Luminol; 0,0066% (w/v) p-Coumarinsäure, pH 8,5
ECL2	100mM Tris/HCl; 0,024% (w/v) H ₂ O ₂ ; pH 8,5

2.4 Methoden der Hefebiologie

2.4.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Bei der Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden Voll- oder Selektivmedien verwendet (2.5.1). Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Anzucht bei 30°C. Je nach Experimentansatz diente Glukose oder Lactat als Kohlenstoffquelle. Die Selektion auxotropher Mutanten erfolgte mittels Selektivmedien (YPD^{Gen}, SD/Lac-His oder SD/Lac-Ura). Zur Evaluation von Wachstumsverhalten und für präparative Ansätze wurden Flüssigkeitskulturen nach einer Mindest-Inkubationszeit von einem Tag nach Animpfen von einer Platte verwendet. Flüssigkeitskulturen wurden stets verdünnt um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu belassen.

2.4.2 Analyse des Wachstumsphänotyps

Die Analyse des Wachstumsphänotyps auf verschiedenen Medien wurde mit dem sogenannten ‚Tüpfel-Test‘ oder einer Wachstumskurve durchgeführt. Für den Tüpfeltest wurden Zellen von einer exponentiell wachsenden Hefekultur entnommen und in genau so viel sterilem Wasser aufgenommen, sodass die OD₆₀₀ 0,7 betrug. Von dieser Suspension wurden vier Zehnfach-Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) erstellt. Diese wurden mit je 3 µl auf YPD oder Lactat-Medien aufgetragen. Das Wachstum der Stämme wurde nach zwei Tagen Inkubation ausgewertet und unter Weißlicht abfotografiert. Alternativ wurde das Zellwachstum in einer Flüssigkultur analysiert. Hierzu wurden Stämme in YPD- oder Lactat-Medium kultiviert. Nach einer Startzeit von ca. einem Tag und stetigem Verdünnen der Kultur, um ein Verbleiben in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase zu gewährleisten, wurden die Kulturen auf dieselbe optische Dichte verdünnt (Start-OD₆₀₀). Anschließend wurde der Verlauf der optischen Dichte über die Zeit notiert und ausgewertet. Die Verdopplungszeit wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$t_{1/2} = \ln(2) \times \Delta t \div \left(\ln \frac{OD_{Ende}}{OD_{Start}} \right)$$

Zur Analyse des Wachstums bei Diauxie-Shift (Galdieri et al., 2010) wurden Zellen zunächst in einem YPD-Medium angezüchtet. Nach mehrmaligem Verdünnen wurden die Kulturen auf dieselbe Dichte verdünnt und von nun an die OD₆₀₀ registriert. Nach einem ca. dreistündigen Wachstum und nach dreimaligem Waschen mit 10 ml sterilem Wasser wurde ein Teil der Kultur anschließend in ein Lactat-Medium aufgenommen und auf eine gleiche optische Dichte verdünnt. Im Anschluss erfolgte erneut die Registrierung der optischen Dichte über die Zeit, sowohl in der Lactat- als auch im Rest der YPD-Kultur.

2.4.3 „Schnelle“ Mitochondrien-Präparation

Die Schnellpräparation von Mitochondrien wurde zum Überprüfen der Proteinlokalisierung nach genetischer Manipulation verwendet. Hierzu wurden Hefezellen über Nacht bei 30°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden Zellen (Volumen entsprechend einer optischen Dichte von 10) durch Zentrifugation bei 5000 xg für 5 min bei Raumtemperatur geerntet. Auf Eis erfolgte die Aufnahme der Pellets in 800 µl SMK-Puffer mit Zusatz von 2mM PMSF zum Proteaseschutz. Die Zellwandlyse erfolgte mittels gekühlter Glasperlen (mittlerer Durchmesser: 0,5mm) und wiederholtem Schütteln (je 30 Sekunden) auf dem Vortex-Gerät. Zwischen den Vortex-Intervallen wurden die Proben jeweils auf Eis gelagert. Nicht-lysierte Zellen, Membranfragmente und die Glasperlen wurden in einem kurzen Zentrifugationsschritt (1000 xg, 3 min, 4°C) sedimentiert. Aus dem Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation (20000 xg, 10 min, 4°C) eine Mitochondrien-angereicherte Fraktion gewonnen.

SMK-Puffer | 80mM KCl; 20mM MOPS; 0,6M Sorbitol; pH 7,4

2.4.4 Isolierung von Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolierung von Hefe-Mitochondrien erfolgte nach den Grundzügen der von Zinser und Daum vorgeschlagenen Methodik (Zinser and Daum, 1995). Die Hefezellen wurden hierfür auf einem Laktatmedium bis zu einer OD₆₀₀ von ~1 in einer Großkultur (4 - 12 l) wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation mit 4000 xg für 5 min bei Raumtemperatur geerntet. Nach einem Waschvorgang mit 100 ml ionenfreiem Wasser wurden die Zellen gewogen und anschließend in 2 ml Zell-Puffer pro 1 g Zellmasse (Feucht-Gewicht) resuspendiert. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei Anzuchttemperatur (typischerweise 30°C) und ein Waschschrift mit 100 ml 1,2 M Sorbitol. Die Hefezellwände wurden durch Zugabe von Zymolase (6,6 ml Lysepuffer pro g Zellmasse;

Zymolasekonzentration: 5 mg/g Zellmasse) und anschließender Inkubation (1 h, 30°C) enzymatisch gespalten. Durch eine kurze Zentrifugation (700 xg, 5 min, 4°C) wurden die so entstandenen Sphäroplasten geerntet. Zur Lyse der Zellmembran wurden die Zellen in 6,6 ml Homogenisierungspuffer pro g Zellmasse resuspendiert und mit einem Dounce-Teflonhomogenisator bearbeitet (ca. 15 Stöße). Im Anschluss wurden Mitochondrien durch zweimalige Zentrifugation (3000 xg, 5 min, 4°C) von Zellresten getrennt. Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden in ein neues Gefäß überführt und mittels Zentrifugation isoliert (12 000 xg, 12min, 4°C). Das Pellet wurde in SM-Puffer aufgenommen und die letzten beiden Zentrifugationsschritte wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Mitochondrien in 0,5 – 1 ml SM-Puffer suspendiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Nach Verdünnung und Einstellen auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml wurde die Mitochondriensuspension in 50-100 µl Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zellpuffer	0,6M Sorbitol; 20mM MOPS; pH 7,4
Lyse-Puffer	20mM MOPS; pH 7,4
Homogenisierungs-Puffer	0,6M Sorbitol; 1mM EDTA; 1mM PMSF; 10mM Tris HCl; 0,2% (w/v) Fettsäure-freies BSA; pH 7,4
SM-Puffer	0,6 M Sorbitol; 20mM MOPS; pH 7,4

2.4.5 Topologieanalyse von mitochondrialen Proteinen mittels Bestimmung der Sensitivität gegen Proteasen

Zur Evaluation der mitochondrialen Topologie von Proteinen wurden einer zugegebenen Protease unterschiedliche mitochondriale Subkompartimente zugänglich gemacht. Hierzu wurden 50 µg isolierte Mitochondrien in 500 µl SM-Puffer oder Mitoblasten-Puffer bei 4°C resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Im SM-Puffer bleiben Mitochondrien intakt, daher sind nur Außenmembranproteine für Proteasen zugänglich. Durch die Zugabe des hypotonen Mitoblasten-Puffers vergrößert sich der Matrixraum und führt druckbedingt zum Aufbruch der äußeren Mitochondrienmembran. Dadurch werden Innenmembranproteine zugänglich. Der Verdau wurde nach Zugabe von 100 µg/µl Proteinase K gestartet. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Proteinase-Aktivität mit 1mM PMSF gestoppt. Nach einer Zentrifugation bei 20000 xg für 20 min bei 4°C wurde das mitochondriale Material in 500 µl SM-Puffer resuspendiert und TCA-gefällt (2.1.1). Die anschließende Analyse des selektiven

Verdau erfolgte mittels SDS-Page (2.1.3), Western Blotting (2.1.6) und Immunodekoration (2.3.3).

SM-Puffer	0,6M Sorbitol; 20mM MOPS; pH 7,4
Mitoplasten-Puffer	20mM MOPS; pH 7,4
Lyse-Puffer	20mM MOPS; 0,1% (v/v) TritonX-100; pH 7,4

2.4.6 Analyse der Membranassoziation durch Carbonatextraktion

Um zwischen integralen Membranproteinen und löslichen bzw. ausschließlich membranassoziierten Proteinen zu unterscheiden, wurden Mitochondrien mit Natriumcarbonat versetzt. Integrale Membranproteine werden unter alkalischen Bedingungen nicht von ihrer Membran abgelöst (Fujiki et al., 1982). Hierzu wurden 50 µg isolierte Mitochondrien durch Zugabe von SM-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Die alkalische Extraktion erfolgte durch Zugabe einer 20 mM Natriumkarbonatlösung. Nach manuellem Invertieren erfolgte eine Inkubation für 30 min auf Eis. Ungelöste, Membran-gebundene Proteine wurden durch eine Zentrifugation (91000 xg, 30 min, 4°C) sedimentiert. Die sich im Überstand befindlichen löslichen Proteine wurden TCA gefällt (2.1.1). Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-Page (2.1.3), Western Blotting (2.1.6) und Immundekoration (2.3.3).

SM-Puffer	0,6M Sorbitol; 20mM MOPS; pH 7,4
-----------	----------------------------------

2.4.7 Steady-State Expressionslevel von Proteinen

Um Proteinkonzentrationen zu bestimmen, wurden 400 µg isolierte Mitochondrien (2.4.4) zunächst bei 20000 xg für 15 min bei 4°C pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 160 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 60 µl abgenommen und mit 60 µl SDS-Probenpuffer 1:1-verdünnt. Dieser Schritt wurde mit 40 µl der bereits 1:1 verdünnten Probe und mit 40µl SDS-Probenpuffer wiederholt. Anschließend wurde nebeneinander vom Wildtyp-Stamm und der zu untersuchenden Deletionsmutante 25 µl der jeweiligen drei Lösungen (50 µg, 25 µg, 12,5 µg) auf ein Gel aufgetragen (2.1.3) und anschließend mit Western-Blotting (2.1.6) und Immundekoration (2.3.3) weiter analysiert. Die Signalintensitäten der jeweilig dekorierten Proteine wurden zwischen Wildtyp und Deletionsmutante mit dem Imaging-System The Imager™ (Appligene, Heidelberg) gemessen. Banden wurden stets dreimal gemessen. Die Signalintensität der Deletionsmutante ist als Prozentsatz der Wildtyp-Signalintensität angegeben (Mittelwert +/- Standardabweichung).

2.4.8 Subfraktionierung von Mitochondrien

Die Auftrennung und Generierung mitochondrialer Membranvesikel erfolgte nach einer Modifikation des Protokolls, welches von Pon und Kollegen verwendet wurde (Pon et al., 1989). Hierzu wurden aus großen Hefekulturen, welche bei 24°C auf einem Lactat-Medium kultiviert worden waren, Mitochondrien isoliert (2.4.4). Nach Isolierung wurde den Mitochondrien tröpfchenweise 20 ml Schwell-Puffer zugegeben. Das Gemisch wurde im Anschluss für 30 min unter vorsichtigem Rühren auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde 2,5 M Saccharose bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und die Mitochondrien wurden bei 4°C unter ständigem Rühren geschrumpft. Die Vesikelgenerierung fand durch Ultraschallbehandlung statt (3 x 30 s, je mit 30 s Unterbrechung; Output Control: 0; Duty Cycle: 60%; Branson Sonifier 250). Noch intakte Mitochondrien wurden durch einen Zentrifugationsschritt (20000 xg, 20 min, 4°C) von entstandenen Membranvesikeln getrennt. Um die Mitochondrienvesikel weiter aufzukonzentrieren, wurde der Überstand vorsichtig auf 200 µl 2,5 M Saccharose aufgetragen und für 100 min bei 118000 xg bei 4°C zentrifugiert (SW 41 Ti Rotor, Beckman Coulter). Der Großteil des Saccharose-Überstands wurde abgenommen und die sedimentierten Vesikel wurden in der verbliebenen 2,5 M Saccharose resuspendiert. Die Vesikelsuspension wurde mit einem Teflon-Homogenisator durchmischt und die Saccharosekonzentration bestimmt. Durch ionenfreies Wasser bzw. 2,5 M Saccharose wurde die Konzentration der Vesikelsuspension auf 1,3 M eingestellt. Diese wurde im Anschluss unter einen linearen Saccharose-Gradienten geschichtet (0,8 M - 1,25 M Saccharose in MOPS pH 7,4 mit 0,5 mM EDTA). Durch eine Zentrifugation wurden die Vesikel nach ihrer Dichte aufgetrennt (24 h bei 200.000 g und 4°C, SW 41 Ti Rotor, Beckman Coulter). Der Gradient wurde in 21 Fraktionen mit 600 µl geerntet. Die in den Fraktionen enthaltenden Proteine wurden für die weitere massenspektrometrische Analyse in Protein LoBind Reaktionsgefäße übertragen.

Schwell-Puffer	0,5mM EDTA; 1,0mM PMSF; Roche Complete Protease Inhibitor
----------------	---

2.4.9 Semiquantitative Mengen-Analyse in aufgetrennten mitochondrialen Membranvesikeln mittels Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)

SILAC ist ein massenspektrometrisches Verfahren, welches mittels nicht-radioaktiver Isotopenmarkierung zur Mengenbestimmung von Peptiden verwendet werden kann (Ong and Mann, 2006). Hierzu werden zunächst gleiche Zelllinien (im vorliegendem Fall der Lysin-auxotrophe Hefe-Wildtypstamm YPH499, 2.2.13) mit unterschiedlichen Nährmedien kultiviert. Eine der Zellkulturen wächst in einem Medium, welches mit stabilen (nicht-

radioaktiven) Isotopen (^2H , ^{13}C , oder ^{15}N) markierten Aminosäuren versetzt ist. Die Vergleichskultur hingegen wächst in Medien mit nicht-markierten Aminosäuren. Zur Markierung werden am häufigsten markiertes Arginin oder Lysin verwendet. Die markierten Aminosäuren werden genau wie nicht-markierte Aminosäuren in die Zellen aufgenommen und in das hierdurch markierte Proteom eingebaut. Mischt man nun das Proteom der beiden unterschiedlich kultivierten Ansätze, so können nach geeignetem Proteaseverdau (typischerweise Trypsin oder Lysin-C) und massenspektrometrischer Messung Signalkaare durch den spezifischen Isotop-bedingten Massenunterschied gebildet werden. Unterschiede in den gemessenen Einzelintensitäten der jeweiligen Signalkaare spiegeln so relative Häufigkeiten wider.

Die Prozessierung und massenspektrometrische Analyse der Proben wurde von Dr. Dirk Walther durchgeführt (aktuell: Biogen, Arbeitsgruppe: Mass Spectrometry-based Proteomic; durchgeführt am Max-Planck-Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe: ‚Proteomics and Signal Transduction‘). Für das in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Experiment wurden Wildtyp-Hefezellen (YPH499) entweder in einem markierten oder unmarkierten SLAC-Medium bei 24°C kultiviert. Zur Markierung wurde dem Minimalmedium schweres Lysin zugefügt (^{13}C und ^{15}N , Cambridge Isotope Laboratories). Das unmarkierte Medium enthielt ‚normales‘ Lysin (^{12}C , ^{14}N , SIGMA). Nach Mitochondrienisolierung (2.4.4) und Subfraktionierung (2.4.7) wurde jede zweite Fraktion des unmarkierten Ansatzes mit 10 µl des markierten („schweren“) SILAC-Standards gemischt. Als SILAC-Standard diente eine Mischung der Fraktionen 9-13 aus dem markierten Ansatz. Dieser Standard wurde gewählt, da Proteine der intermediären Dichte näher analysiert werden sollten. Somit wurde gewährleistet, dass die Wahrscheinlichkeit der Detektion dieser Proteine im SILAC-Standard möglichst groß ist. Die Proben wurden nach Zugabe von 60 µl Denaturierung-Puffer und einer sich anschließenden Inkubation für 30 min durch den darin enthaltenen Harnstoff denaturiert. Im Anschluss wurden Cystein-Reste durch Hinzugabe von 5,5 mM 2-Iodoacetamid alkyliert und so die Bildung von Disulfid-Brücken verhindert. Die Proben wurden 1:1 mit Wasser verdünnt und durch die C-terminal spaltende, Lysin-spezifische Endoprotease LysC aus dem Bakterium *Lysobacter enzymogenes* verdaut (Wako Bioproducts, Enzym/Protein-Verhältnis 20:1). Im Anschluss an den Verdau wurden die Proben mit 1% (v/v) Trifluoressigsäure angesäuert und mit C18 stage-tip (Thermo Fisher Scientific) entsalzt. Nach einer Umkehrchromatographie mittels Easy nLC Nanoflow HPLC Systems (Thermo Fisher Scientific) wurde die Peptid enthaltende Lösung auf eine RepoSil-Pur C18-AQ Säule (Dr. Maisch GmbH) geladen (Thakur et al., 2011) und für 5 h mit Hilfe

eines nicht-linearen Gradienten von 5 - 60% Acetonitril eluiert. Zur Massenanalyse der Peptide wurde ein LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Auswertung des Massenspektrums erfolgte mit der Software Max Quant (Cox and Mann, 2008) und eines Peptid-Datenbankabgleichs mittels Mascot (Koenig et al., 2008; Perkins et al., 1999).

Denaturierungs-Puffer	3M Thioharnstoff; 9M Harnstoff; 1,5mM DTT; 100mMTris/Hcl; pH 8,0
-----------------------	--

2.5 Medien

2.5.1 Medien für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

YP	1% (m/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Bacto-Pepton; pH 5 (eingestellt mit HCl)
YPD	YP + 2% (w/v) Glukose
YPD ^{Gen}	YPD; 500µg/ml Geneticin
YPG	YP + 3% (w/v) Glycerin
Lactat	3 g/l Hefeextrakt; 1 g/l K ₂ HPO ₄ ; 1g/l NH ₄ Cl; 0,5 g/l CaCl ₂ ; 0,5 g/l NaCl; 0,6 g/l MgSO ₄ ; 0,3 ml/l 1% (w/v) FeCl ₃ ; 2% (v/v) Laktat; pH 5,5 (eingestellt mit KOH)
SC-Medium	0,17% (w/v) Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren); 0,5% (w/v) NH ₄ SO ₄ ; Adenin (20 mg/ml), Uracil (20 mg/ml); Histidin (20 mg/ml); Lysin (30 mg/ml); Leucin (30 mg/ml); Tryptophan (20 mg/ml); 2% (w/v) Glukose; 2% Laktat (v/v)

2.5.2 Medien für die Kultivierung von *Escheria coli*

LB-Medium	1% (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl;
LB ^{AMP} -Medium	LB-Medium; 100µg/ml Ampicillin
LB ^{Tet} -Medium	LB-Medium; 10µg/ml Tetracyclin

2.6 Geräte und Chemikalien

2.6.1 Geräte

Autoklav

Varioclav® 400E; H + P Labortechnik, Oberschleißheim

Brutschränke, Inkubatoren

Heraeus Christ, Osterode

Blot-Systeme

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Wet-Tank-Blot, Hoefer

Elektroporationssystem

Gene Pulser; BioRad, München

Entwicklermaschine

Curix 60®; Agfa-Gevaert, München

Feinwaagen

Sartorius, Mainz

Fraktionensammler

Pharmacia LKB * Frac-100, Pharmacia, Erlangen

Gelkammern

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Ultrospec 10 Amersham Biosciences, Freiburg

HPLC System

Easy nLC Nanoflow HPLC System, Thermo Fisher Scientific, Bremen

Ultimate HPLC system, Dionex / LC Packing, Thermo Fisher Scientific, Bremen

Kolbenhubpipetten

Abimed, Düsseldorf

Magnetrührer

MR 3001 K; Heidorph Multipette Eppendorf, Hamburg

Massenspektrometer

LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer, Thermo Fisher Scientific, Bremen

LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer, Thermo Fisher Scientific, Bremen

Peristaltische Pumpe

P-1; Amersham Biosciences, Freiburg

Photometer

Enzym-Essays: Ultrospec 10 Amersham Biosciences, Freiburg

Kulturen: BioPhotometer plus; Eppendorf, Hamburg

Quarzküvetten

Hellma

Quantitative Signalintensitäts-Auswertung

Imaging-System The ImagerTM, Appligene, Heidelberg

Reinstwasseranlagen

PureLab Plus; ELGA Berkefeld GmbH, Celle

Rotoren

JA-10, JA-25.50, JLA-8.1000, SW 41 Ti, TLA55-Rotor

Semidry Blotapparatur

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Spannungsquellen

Electrophoresis Power Supply EPS 600; Amersham Biosciences, Freiburg

Sterilbank

BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Thermocycler

Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg

Thermomixer

Thermomixer compact; Eppendorf, Hamburg

Tieftemperaturschneidesystem

EM FCS; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Transiluminator

GDS-7900 System, Modell LM-26E; UVP, Upland (USA)

Überkopfschüttler

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Ultramikrotom

Ultracut E; Fa. Reichert-Jung

UCT Ultramikrotoms, Leica

Ultraschallgerät

Branson Sonifier 250; G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Vortex-Mixer

Bender und Hobein, München

Wärmeschränke

Memmert, Hannover

Zentrifugen

Allegra X-22 R, Avanti J-20 XP, Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld

Zentrifugen (Ultrazentrifugen)

Optima L8-M, Optima L-90K, Optima LE-80K, Optima MAX-XP, Beckman Coulter, Krefeld

Zentrifugen (Tischzentrifugen)

5415D, 5810R, Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen (Kühlzentrifuge)

3K30, Sigma, München

Microfuge® 22R Centrifuge, Beckman Coulter, Krefeld

2.6.2 Verbrauchsmaterialien

Agfa-Gevaert, München

Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

Agilent Technologies, Böblingen

E. coli XL-1 Blue

AppliChem, Darmstadt

Tris, Ampicillin, Magermilchpulver, APS, H₂O₂

Beckton Dickenson, Heidelberg

Bacto-Trypton

Biorad, München

Proteinstandard und Reagenzien zur Proteinbestimmung, Proteingrößenstandards, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-Antikörper

Biozym, Hessisch Oldendorf

Sp6-Polymerase

Braun, Melsungen

Kanülen, Spritzen

Cambridge Isotope Laboratories, Andover (USA)

¹³C, ¹⁵N-markiertes Lysin

Calbiochem

Adenin, Digitonin, Histidin, Uracil

Dr. Maisch GmbH

C18-Column

Eppendorf, Hamburg

Protein LoBind Reagenzgefäße

Fuji, Düsseldorf

Medical X-ray Film Super RX 13 x 18 cm

GE Healthcare, München

Bacto-Pepton

Gerbu, Gaiberg

DTT, HEPES, MOPS

Greiner, Kremsmünster

15- und 50 ml Reaktionsgefäße

Fermentas, St. Leon-Rot

Molekulargewichts-Standards für SDS-PAGE

Invitrogen, Groningen (NL)

anti-Porin-Antikörper, Yeast Nitrogen Base, NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System

Metabion, Martinsried

Oligonukleotide

New England BioLabs, Schwalbach

Amylose-Resin, DNA Ladder 1 kb, DNA Ladder 100 bp, pMAL-cRI, Restriktionsendonukleasen und 10 x Puffer für Restriktionsendonukleasen, Desoxynukleosid-triphosphate, T4-DNA-Ligase und dazugehörige 10 x Puffer

peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Elektroporationsküvetten

Promega, Heidelberg

GoTaq-Polymerase, Pfu-DNA-Polymerase, pGEM4, Pure Yield Plasmid Midi Prep System, Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Trypsin

Qiagen, Hilden

Ni-NTA-Agarose

Carl Roth, Karlsruhe

Roti®-PVDF-Membran, Saccharose

Sarstedt, Bad Homburg

Reaktionsgefäße, Petrischalen, Pipettenspitzen

Schleicher & Schüll, Kassel

Whatman Filterpapiere, Sterilfilter

Seikagaku, Tokyo (Japan)

Zymolyase 20T

Serva, Heidelberg

Acrylamid, Agar-Agar, Agarose, APS, Araldit-Kit CY-212, Bisacrylamid, Bis-Tris, BSA, Coomassie Brillant Blau R-250, Ethanol, Geneticin/G418, Hefeextrakt, Isopropyl- β -Dthiogalaktopyransid (IPTG), Lysozym, PMSF, Polyvinylpyrrolidon K15/MW 10000, Ponceau S, SDS, Serva Blau G, TEMED

SIGMA

ADP, Beta-Mercaptoethanol, DMSO, Geneticin, Galaktose, Glyzerin, L-Leucin, Lithiumacetat, Luminol, Sorbitol, Yeast nitrogen base, TiterMax Gold, Freund's Adjuvant Incomplete

Thermo Fisher Scientific, Bremen

Sulfolink Coupling Gel

3 Ergebnisse

3.1 Hintergrund der SILAC-Analyse

Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz besteht aus Ultraschallbehandlung mit nachfolgender isopyknischer Dichtegradientenzentrifugation von Mitochondrien im kondensierten Zustand. Nach hypotoner Schwellung von Mitochondrien liegt die Innenmembran nur noch im Bereich permanenter oder dynamischer Kontaktstellen der Außenmembran an. Durch die unterschiedlichen Protein-Lipid-Verhältnisse und resultierenden Dichteunterschiede von Innen- und Außenmembran kann eine Trennung der entstehenden Vesikel erreicht werden. Harner et al. konnten zeigen, dass ein sowohl Außen- als auch Innenmembran-durchspannendes GFP-Tim23-Fusionsprotein ein Markerprotein für Kontaktstellenkomplexe darstellt (Harner et al., 2011). GFP-Tim23 ist durch seine permanent beide Membranen durchspannende Topologie nach Ultraschallbehandlung und lateraler Diffusion präferenziell in den Bereichen von Kontaktstellen lokalisiert. Als bereits bekanntes, die Cristamorphologie beeinflussendes Protein konnten die Autoren im selben Experiment ein korrespondierendes Gradientenverteilungsmuster für das Protein Fcj1 (*formation of cristae junction 1*) zeigen (Harner et al., 2011). Mit dem vorliegenden Datensatz und einer Analyse von Fcj1-ähnlichen SILAC-Profilen konnte eine Reihe von Untereinheiten eines mitochondriale Architektur beeinflussenden Komplexes identifiziert werden. Somit konnte zum einen gezeigt werden, dass dieses Protein in der folgenden SILAC-Analyse als Markerprotein für weitere Kontaktstellenproteine dienen kann, zum anderen konnte gezeigt werden, dass gleiche SILAC-Profile auf einen topologischen und funktionellen Zusammenhang hindeuten. Unter diesem Gesichtspunkt wurde der gesamte Datensatz auf Komplex-Stabilitäten und spezifischer Membranassoziation von Proteinen sowie deren Anreicherung in Bereichen von intramitochondrialen oder Organellen-übergreifenden Kontaktstellen analysiert.

3.2 Überblick über die SILAC-Analyse

Mit Hilfe von mitochondrialer Subfraktionierung (2.4.8) und anschließender SILAC-Analyse (2.4.9) konnte ein Datensatz mit Informationen zu den relativen Häufigkeiten von Proteinen in den unterschiedlichen Dichtefractionen gewonnen werden. In der weiteren Analyse wurden 590 identifizierte Proteine mit hinreichend vollständigem Datensatz eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden cytosolische (n=73) und nukleäre (n=26) Proteine. Die meisten der identifizierten Proteine lassen sich dem mitochondrialen Proteom zuordnen. Die relativen Anteile der Proteine von anderen Kompartimenten sind in Abbildung 6 dargestellt. Des

Weiteren sind in Abbildung 7, sofern vorhanden, die Daten zur mitochondrialen Sublokalisierung der identifizierten Proteine implementiert. Ein Großteil der in die Analyse eingehenden mitochondrialen Proteine konnte unter Zuhilfenahme bisheriger Studienergebnisse als Innenmembranproteine charakterisiert werden.

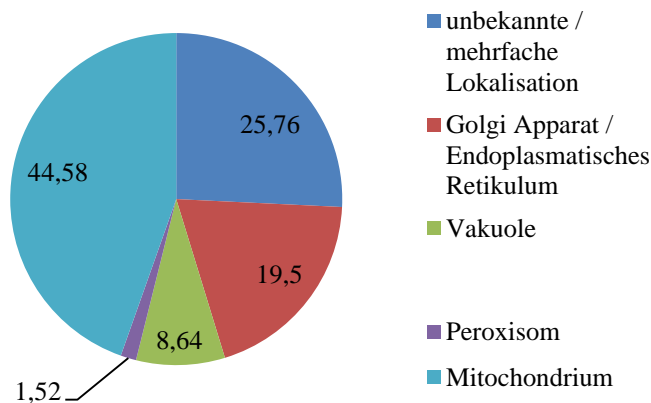


Abbildung 6 - Organellenverteilung der identifizierten Proteine mit hinreichend vollständigem Datensatz unter Aussparung des cytosolischen Proteoms

Angaben in % bezogen auf die Gesamtzahl der in die Analyse eingegangenen Proteine. Proteine mit in Studien gezeigter doppelter Lokalisation wurden mit Proteinen mit bisher unbekannter zellulärer Lokalisation zusammen klassifiziert.

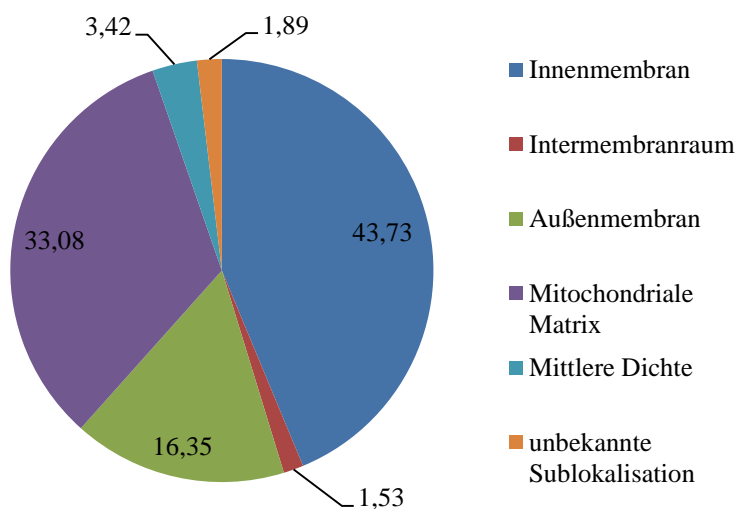


Abbildung 7 - Submitochondriale Lokalisation der mitochondrialen Proteine

Angaben in % bezogen auf 263 als in Mitochondrien lokalisierter Proteine der SILAC-Analyse

Für einen Überblick zeigt Abbildung 8 die typischen, häufig vertretenen SILAC-Profile einiger Proteine unterschiedlicher Kompartimente bzw. unterschiedlicher mitochondrialer Sublokalisierung. Ein Vergleich der Verteilung von Proteinen in zwei unterschiedlichen Experimentenansätzen (hier α -Ketoglutaratdehydrogenase) zeigt exemplarisch die Präzision der Methodik (Abbildung 8A). Innenmembranproteine besitzen ein Maximum in Fraktion 11 und/oder Fraktion 13 (Abbildung 8A-D). Das Beispiel des Prohibitin-Komplexes und der

Succinat-Dehydrogenase zeigt exemplarisch, dass Komplex-Untereinheiten gleiche SILAC-Profile aufweisen können (Abbildung 8B und C). Das Verteilungsmuster von Fcj1, welches von Harner und Kollegen (Harner et al., 2011) bereits als ein Kandidat für eine Anreicherung in der intermediären Dichte, hier Peak-Fraktion 9-13, identifiziert werden konnte, unterscheidet sich deutlich von den anderen Innenmembranproteinen (Abbildung 8D). Das SILAC-Profil von Fcj1 lässt sich durch seine Beteiligung an der Ausbildung von Kontaktstellen von innerer Grenzmembran und Außenmembran im Bereich von Crista junctions erklären. Somit ist das Dichte-Maximum dieser aus gemischten Vesikeln (mit Innen- und Außenmembrananteilen) bestehenden Fraktion leicht zugunsten einer geringeren Dichte verschoben. Außenmembranproteine zeigen durch ihre Assoziation mit wenig dichten Außenmembranvesikeln (Lipid-Protein-Verhältnis: ~ 1:1) eine nahezu selektive Anreicherung in der Fraktion mit dem niedrigsten Saccharoseanteil (Abbildung 8E). Lösliche Proteine sowohl der mitochondrialen Matrix als auch des Intermembranraums sind nahezu ausschließlich in Fraktion 21, dem dichtesten Saccharose-Kompartiment, angereichert, weil die löslichen Proteine wegen ihrer spezifischen Dichte nicht aufsteigen können (Abbildung 8F und G). Abbildung 8H zeigt gegenübergestellt die unterschiedlichen SILAC-Profile von Proteinen mit unterschiedlicher mitochondrialer Sublokalisierung, eingeschlossen Fcj1. Bei unbekannter Lokalisation könnten sich Proteine also der Außen- bzw. Innenmembran und einem der wässrigen Kompartimente des Mitochondriums zuordnen lassen. Neben mitochondrialen Proteinen sind in den Proben Proteine anderer Kompartimente zu detektieren. Proteine des endoplasmatischen Retikulums zeigen ein spezifisches SILAC-Profil mit relativen Maxima in den Fraktionen 1 oder 9 (Abbildung 8I). Vakuoläre Proteine hingegen zeigen einen relativ spitzen Peak in Fraktion 9 (Abbildung 8J). Im Folgenden wird genauer auf die einzelnen Kompartimente eingegangen. In jedem Kompartiment sollen die SILAC-Profile von Komplexen analysiert werden sowie eine Einteilung in Gruppen von unterschiedlichen SILAC-Profilen erfolgen. Ausnahmen von häufigen SILAC-Profilen sollen weiter erörtert und Proteine mit bisher unbekannter Lokalisation einem Kompartiment zugeordnet werden. Im Besonderen soll auf den Verlauf von SILAC-Profilen jener Proteine eingegangen werden, welche eine beschriebene Funktion im Bereich von mitochondrialen oder Organellen-übergreifenden Membran-Kontaktstellen besitzen.

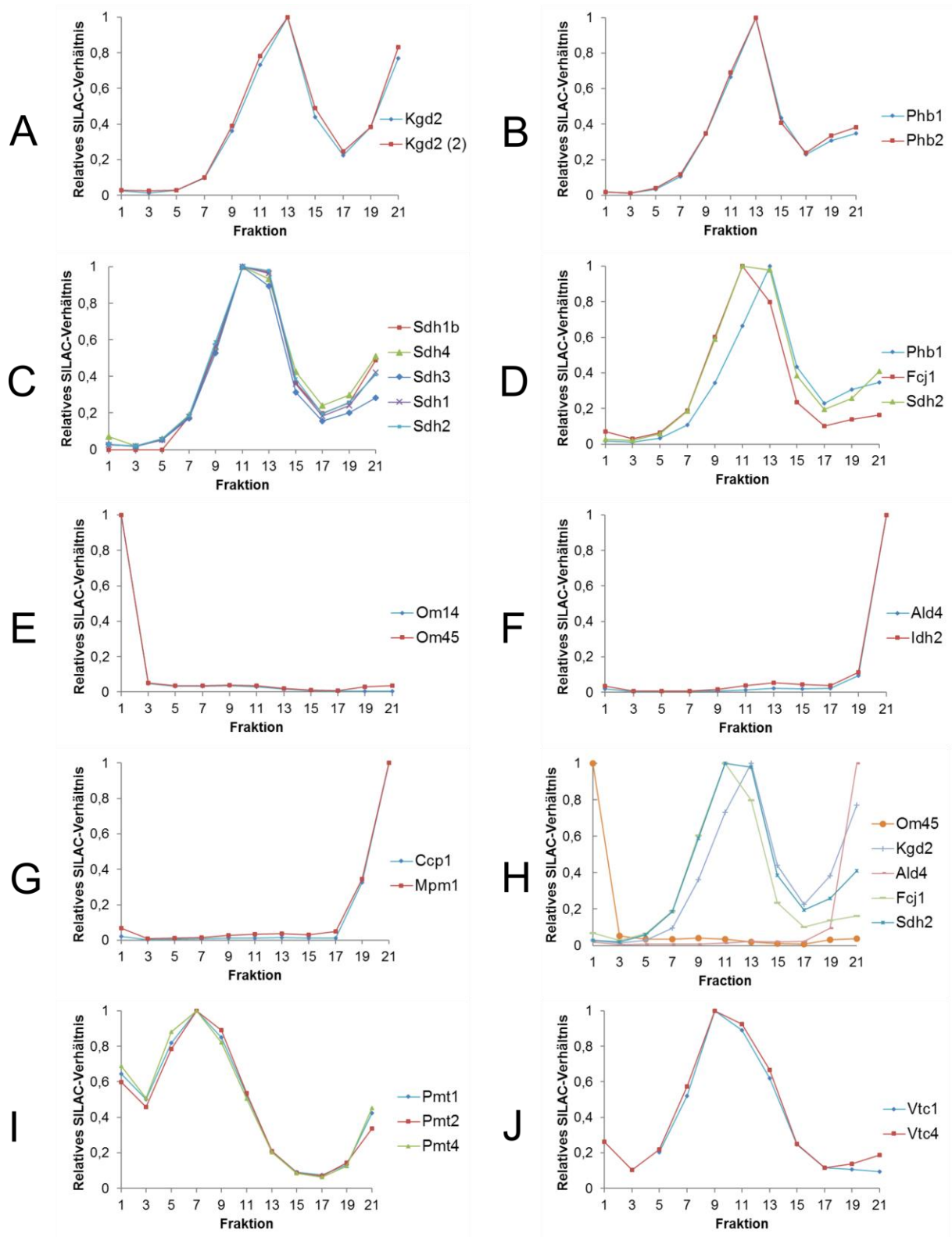


Abbildung 8 – SILAC-Profil von Proteinen in unterschiedlichen mitochondrialen Kompartimenten und Organellen

A-D, Proteine der Innenmembran; **A**, Vergleich von zwei unterschiedlichen Experimentenansätzen; **B**, Prohibitine; **C**, Succinatdehydrogenase; **D**, Vergleich von drei unterschiedlichen Innenmembranprotein-Profilen; **E**, Außenmembranproteine; **F**, Enzyme der mitochondrialen Matrix; **G**, Proteine des Intermembranraums; **H**, Vergleich von Proteinen unterschiedlicher mitochondrialer Sublokalisierung; **I**, Protein-O-Mannosyltransferase-Komplex des endoplasmatischen Retikulums; **J**, VTC Komplex der Vakuole

3.3 Innenmembranproteine und Proteine der ‚Intermediären Dichte‘

Eine genauere Analyse des identifizierten Innenmembranproteoms ergibt, dass sich teils ein nahezu identisches SILAC-Profil der Untereinheiten einzelner Komplexe und teils ein heterogeneres Bild des zugehörigen Verlaufs der SILAC-Profile einiger Untereinheiten ergibt. So zeigen die Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase (Abbildung 9A) und des Cytochrom-b-Synthese-Komplexes (Abbildung 9B) ein zueinander kohärentes Laufverhalten im Gradienten. Bei Betrachtung der Untereinheiten der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase fällt eine Diskrepanz im SILAC-Profil auf. Die Kgd1- und Kgd4-Untereinheiten zeigen relativ zu Fraktion 21, der löslichen Protein-Fraktion, ein geringeres SILAC-Verhältnis in den Fraktionen 9-15 (Abbildung 9C). Schließt man Fraktion 21 aus der Analyse aus und wählt das nächst höhere relative SILAC-Verhältnis als Maximum, so ergeben sich kongruente Verläufe der Untereinheiten (Abbildung 9D). Eine ähnliche Beobachtung lässt sich auch bei Untereinheiten der Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase, Cytochrom c-Oxidase sowie der F_1F_0 -ATPase nachweisen (Abbildung 9E-J). Einige Untereinheiten sind präferenziell in Fraktion 21 angereichert, wodurch die relativen Werte in den Fraktionen 9-15 abnehmen. Neben diesen möglicherweise dissoziationsbedingten Abweichungen fällt ein weiterer Unterschied einzelner Untereinheiten bei Betrachtung der SILAC-Profile der Ubichinol-Cytochrom c-Oxidase und Cytochrom c-Oxidase auf: Einige Untereinheiten zeigen einen spitzen Peak in Fraktion 13 (beispielsweise Rip1 oder Cox2), wohingegen andere Untereinheiten eine „ausladende Schulter“ mit einem ähnlich hohen Maximum in Fraktion 11 zeigen (beispielsweise Qcr7 oder Cox13). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neben übereinstimmenden SILAC-Profilen zwei diskrepante SILAC-Profile für Untereinheiten von Proteinkomplexen der Innenmembran auftreten. Erstens, eine durch eine Anreicherung in Fraktion 21 zustande kommende Minderung des SILAC-Verhältnisses in den Fraktionen 9-15. Zweitens, Abweichungen der Untereinheiten bezüglich ihres Maximums in den Fraktionen 11 oder 13. Zuerst genannte Diskrepanz lässt sich durch weitere Analyse (Subtraktion von Fraktion 21) in ein zu anderen Untereinheiten passendes SILAC-Profil überführen. Von dieser Art der Abweichung sind insbesondere Proteine ohne Transmembrandomäne (Cox4, Cox6 und Cox12) und die etwas peripher lokalisierte F_1 -Untereinheit der ATPase (Atp1, Atp 13, Atp 16, Atp 5, Atp2, Atp 15) sowie nicht fest membranverankerte Enzymkomplexe (α -Ketoglutaratdehydrogenase) betroffen. Möglicherweise vom Membrankomplex abgelöste Untereinheiten sind so stark in der Fraktion mit der höchsten Saccharosekonzentration angereichert.

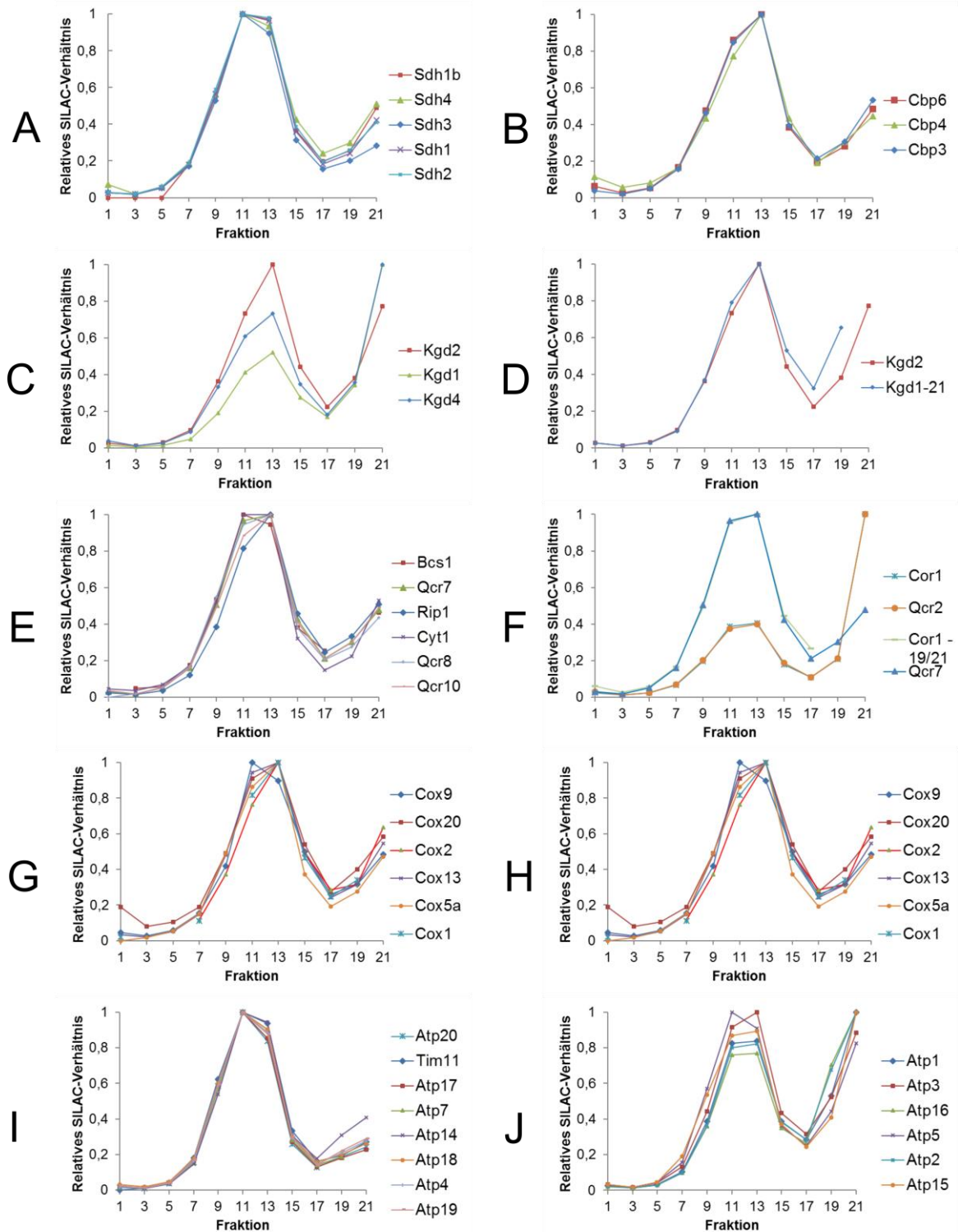


Abbildung 9 - SILAC-Profile von Protein-Komplex-Untereinheiten der Innenmembran

A, Succinat-Dehydrogenase; **B**, Cytochrom b-Synthase; **C**, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase; **D**, Vergleich der Kgd-Untereinheit 2 mit der Untereinheit 1 nach Subtraktion von Fraktion 21 (vgl. jetzt kongruentes Laufverhalten); **E**, Untereinheiten der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase; **F**, Untereinheiten der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase mit abweichendem Laufverhalten (vgl. kongruentes Laufverhalten von Cor1 durch Subtraktion von Fraktion 21); **G**, Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidoreduktase; **H**, Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidoreduktase mit abweichendem Laufverhalten; **I**, Untereinheiten der F₁-Untereinheit der F₁F₀-ATPase; **J**, Untereinheiten der F₀-Untereinheit der F₁F₀-ATPase

Bei weiterer Analyse können insgesamt vier unterschiedliche SILAC-Profile, welche im Folgenden IM-1-4 genannt werden, unterschieden werden.

Das Profil IM-1 (Abbildung 10A und B) ist durch einen charakteristisch spitzen Peak in Fraktion 13 gekennzeichnet. Hierbei kann weiterhin zwischen solchen mit sehr starkem Abfall in Fraktion 11 (>25%, IM-1B, Abbildung 10B) und solchen mit moderatem Abfall in Fraktion 11 (<25%, IM-1A, Abbildung 10A) differenziert werden. Die Gruppe IM-1 besteht vornehmlich aus Untereinheiten von AAA-Proteasen (Yme1, Yme2, Yta12, Mgr3), Assemblierungsfaktoren von Atmungskettenenzymen (Coq4, Sco1, Sco2, PEt100, Rcf1, Rcf2, Cbp3, Cbp4, Cbp6) sowie aus einer Gruppe von mit mtDNA assoziierten Proteinen (Rim1, Phb1, Phb2, Mdm38, Oms1, Kgd2). Weitere Vertreter dieses SILAC-Profiles sind Untereinheiten des TIM-Komplexes (Tim21, Tim22, Tim50) sowie die Untereinheit 1 der Lactatdehydrogenase (Dld1).

Im Gegensatz dazu sind Proteine aus der Gruppe IM-2 durch ein Maximum in Fraktion 11 und einen relativ starken Abfall des relativen SILAC-Verhältnisses in Fraktion 13 gekennzeichnet. Auch hier können solche mit starkem Abfall in Fraktion 13 (>20%, IM2-A, Abbildung 10C) und solche mit moderatem relativen Verlust (<20%, IM2-B, Abbildung 10D) unterschieden werden. Zur ersteren Gruppe zählen die Untereinheiten des von Harner et al. mittels des vorliegenden Datensatzes identifizierten MICOS (*m*itochondrial *c*ontact *s*ite and *c*ristae organizing *s*ystem)-Komplexes (Harner et al., 2011).

In der zweiten Untergruppe finden sich Untereinheiten der F₁-Untereinheit der F₁F₀-ATPase. Proteine der IM-3-Gruppe sind durch ein ähnlich hohes relatives SILAC-Verhältnis in den Fraktionen 11 und 13 gekennzeichnet (bis 90% des Maximalwertes). Ungefähr 50% der auf dieses SILAC-Profil entfallenden Proteine sind Carrier-Proteine (Abbildung 10E und F). So gehören zu dieser Gruppe die ADP/ATP- bzw. GDP/GTP-Translokasen (Aac1, Aac2, Aac3, Ggc1) und die Translokasen für Phosphat (Mir1, Pic2), Glycin (Ymc1), Pyruvat (Fmp37 und Fmp43), Succinat und Fumarat (Sfc1), Oxoglutarat und Citrat (Yhm2), Carnitin (Crc1), Oxodicarboxylat (Odc1 und Odc2), Oxalacetat und Sulfat (Oac1), Ornithin (Orc1 und Orc2) und Eisen-Schwefel-Cluster (Atm1). Zu den Nicht-Carrier-Proteinen (Abbildung 10G und H) dieses typischen SILAC-Profiles gehören vornehmlich Untereinheiten des Tim23-Komplexes (Pam17, Tim23, Tim14, Tim11), der Succinat-Dehydrogenase (Sdh1-4) und Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe bzw. der F₁F₀-ATPase sowie zwei Ribosomen assoziierte Proteine (Mba1, Ydr282c). Proteine, welche wie bereits an Komplex-Beispielen erläutert (s. oben) stark in den Fraktionen ohne Membranassoziation anreichern, wurden als

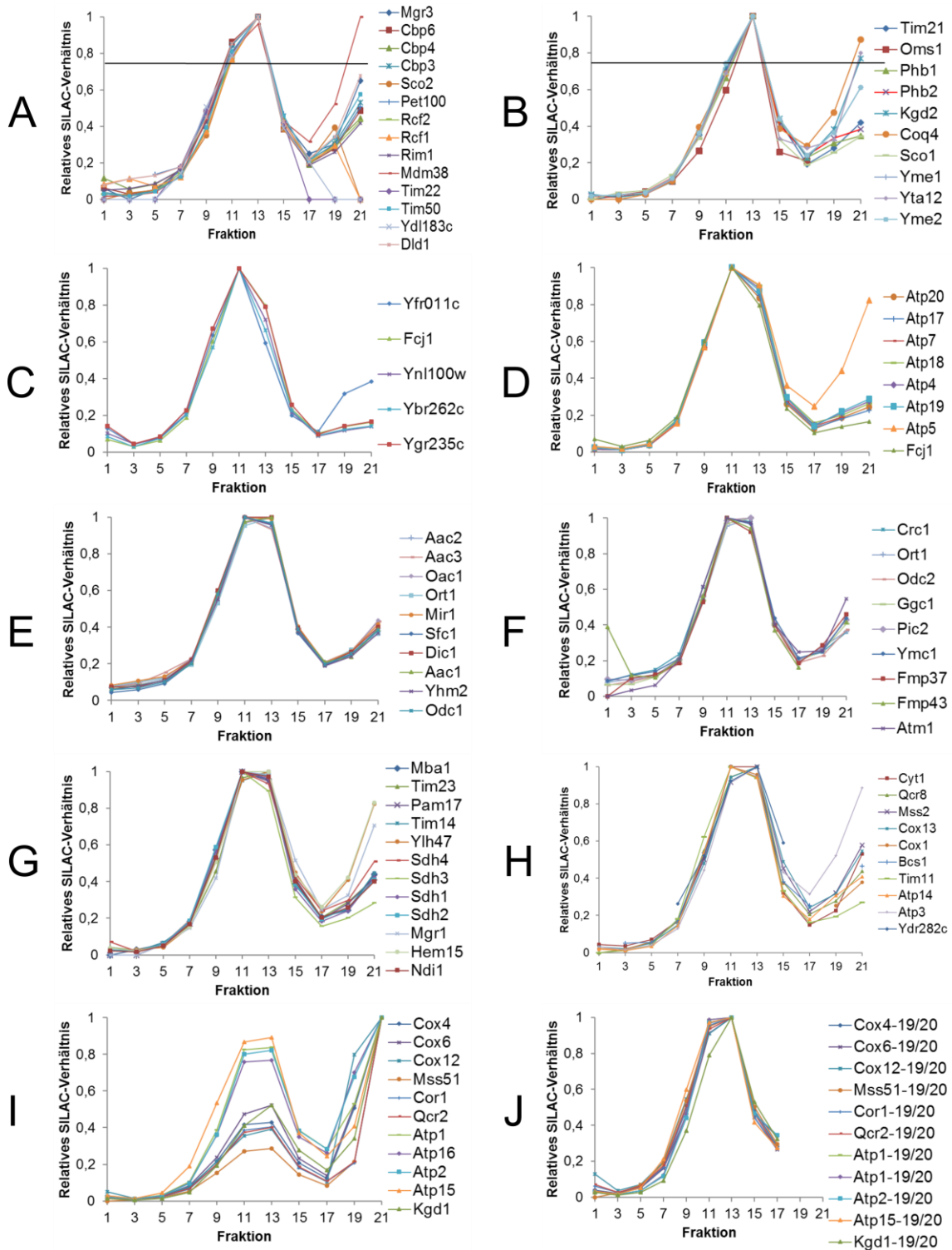


Abbildung 10 - SILAC-Profile von Proteinen der Innenmembran

A, IM-1B: spitzer Peak in Fraktion 13 und moderater Abfall des Verhältnisses in Fraktion 11; **B**, IM1-A: spitzer Peak in Fraktion 13 und starker Abfall des Verhältnisses in Fraktion 11; **C**, IM-2A: mit Anreicherung in der intermediären Dichte (Fraktion 11), Untereinheiten des MICOS-Komplexes; **D**, IM-2B-Muster mit relativer Anreicherung in der intermediären Dichte (Fraktion 11), Untereinheiten der F1-ATPase (zusammen dargestellt mit Fcj1); **E und F**, IM-3-Muster der Carrier-Proteine der Innenmembran; **G und H**, IM-3-Muster von Nicht-Carrier-Proteinen; **H**, IM4-Muster mit hohen Verhältnissen in der dichtesten Saccharose-Fraktion; **J**, IM-4-Muster nach Subtraktion der löslichen Fraktionen 19 und 21. Die meisten der Proteine zeigen einen IM-3-ähnlichen Verlauf.

IM-4 klassifiziert (Abbildung 10I). Hier finden sich vornehmlich Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase, der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase und der F_1F_0 -ATPase. Keines der Proteine dieses Verlaufsmusters besitzt eine Transmembrandomäne. Durch Subtraktion von Fraktion 21 können die meisten dieser Proteine einem IM-3-Profil zugeordnet werden (Abbildung 10J).

Auffällige Ausnahmen von den beschriebenen Innenmembranprofilen bilden die Proteine Afg1 und Mgm1, welche in beiden Experimentenansätzen ein nahezu identisches, aber deutlich von anderen Innenmembranproteinen abweichendes SILAC-Profil aufweisen (Abbildung 11A und B). Mgm1 ist in mehreren Studien als Protein der Innenmembran identifiziert worden. Es ist ein Protein mit Beteiligung an Fusionsprozessen der Innenmembran (1.1.2) und liegt in Hefezellen in zwei unterschiedlichen Isoformen vor (Wong et al., 2000; Zick et al., 2009a; Herlan et al., 2004). Die lange Isoform (l-Mgm1) verfügt über eine Transmembrandomäne in Form einer Transmembranhelix und ist in der Innenmembran inseriert. Die kurze Isoform (s-Mgm1) entsteht durch Proteaseaktivität der Rhomboidprotease 1 und ist trotz fehlender Transmembrandomäne durch Protein-Protein-Interaktion weiterhin membranassoziiert, auch an der Außenmembran (Shepard and Yaffe, 1999; Sesaki et al., 2003). Im vorliegenden Datensatz konnten keine Peptide, welche für die lange Isoform spezifisch wären, nachgewiesen werden. Dies ist bedingt durch die hohe Sensitivität gegenüber endogenen Proteasen, die während Isolierung und Fraktionierung die l-Mgm1 Isoform zu s-Mgm1 Isoform abbauen. Somit sind die detektierten Peptide von Mgm1 vermutlich in einem höheren Prozentsatz von der kurzen Variante stammend. Das Protein ist somit vornehmlich peripher außenmembranassoziiert (vgl. Peak in 1, Abbildung 11B) und gleichzeitig löslich (vgl. Peak in 19/21, Abbildung 11B), welches das „Wannen“-artige SILAC-Profil erklären könnte. Der kleine relative Anstieg im Bereich der mittleren Dichte könnte durch die Innenmembranassoziation der vermutlich niedrig frequenter detektierten langen Isoform zu Stande kommen.

Afg1 konnte in Hefe und menschlichen Zelllinien als Innenmembran-Chaperon für Komplex IV-Untereinheiten charakterisiert werden und soll zur Matrix-Seite hin mit der Innenmembran assoziiert sein (Khalimonchuk et al., 2007). Zahedi et al. konnten das Protein in einer großen proteomischen Studie allerdings auch dem Außenmembranproteom zuordnen (Zahedi et al., 2006). In wie weit Afg1 zwei mitochondriale Endlokalisationen besitzt oder dessen Detektion vornehmlich eine Akkumulation von nicht prozessierten Präproteinen darstellt, bleibt zunächst offen. Die vorliegenden Daten würden zumindest mit einer ggf. zusätzlichen Lokalisation im IMS mit Außenmembranassoziation vereinbar sein. Insgesamt können fünf

weitere (Ydr089w, Ypr010c-a, Ypl109c, und Aim46), bisher nicht näher charakterisierte Proteine der SILAC-Profil-Gruppe IM-2 zugeordnet werden (Abbildung 11). Weiterhin ist das SILAC-Profil des an der mitochondrialen Lipid-Homöostase beteiligten Ylr253w mit dieser Gruppe vereinbar (Tan et al., 2013). Diese Proteine gleichen demnach in ihrer Verteilung der SILAC-Verhältnisse dem in der intermediären Dichte angereicherten Protein Fcj1. Damit wiederum sind diese potenzielle Kandidaten für Proteine, welche im Bereich der Kontaktstellen von Innen- und Außenmembran lokalisiert sind. Weiterhin können die bisher nicht sicher lokalisierten Proteine Mgm101 und Yor20w-a der Innenmembran (Verlaufsmuster IM1-A, Abbildung 11D) zugeordnet werden. Dies gilt ebenso für die Proteine Ydr381c-a, Nat2, Ymr157c, Abf2 und Coq11, welche ein der Gruppe IM1-B ähnelndes SILAC-Profil zeigen (Abbildung 11F). Ein Carrier-ähnliches SILAC-Profil (IM-3) zeigen die Proteine Ybl095w, Fmp10 und Gep7 (Abbildung 11E). Einige dieser Proteine konnten bereits dem mitochondrialen Proteom zugeordnet werden und für manche ist eine Funktion postuliert. Eine Synopsis der bekannten Daten zu Funktion und Lokalisation sowie ein durch das SILAC-Profil vorhergesagter Lokalisationsvorschlag finden sich in Tabelle 3.

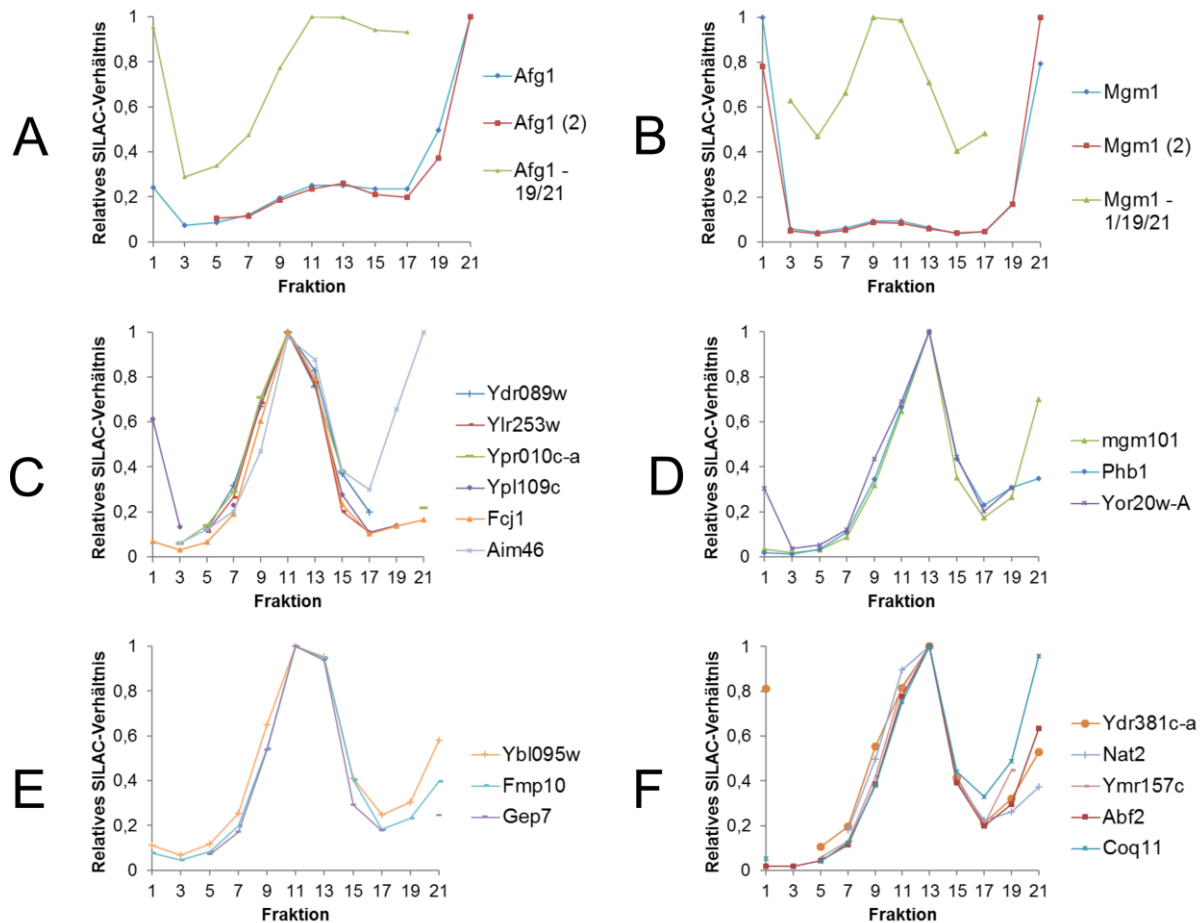


Abbildung 11 - SILAC-Profile von Mgm1 und Afg1 sowie von bisher nicht eindeutig lokalisierten Proteinen mit typischem Innenmembranprofil

A, Afg1-SILAC-Profil von Experiment 1 und 2 sowie mit Subtraktion der löslichen Fraktionen 19/21; **B**, Mgm1-SILAC-Profil von Experiment 1 und 2 sowie mit Subtraktion der löslichen Fraktionen 19/21; **C**, Proteine mit typischem IM-2-Profil; **D**, Proteine mit typischem IM1A-Profil; **E**, Proteine mit typischem IM-3-Profil; **F**, Proteine mit typischem IM-1-B-Profil

Tabelle 3 - Uncharakterisierte oder in unterschiedlichen Organellen lokalisierte Proteine mit Innenmembran-typischen SILAC-Profilen

Proteine	MTP	Andere Lokalisation	Referenz	TMD	Funktion	Lokalisationsvorschlag
Ydr089w	-	Vakuole	(Tkach et al., 2012)	4	Phosphat-Homöostase	Innenmembranprotein im Bereich von Kontaktstellen
Ylr253w	+	-	(Reinders et al., 2006; Huh et al., 2003)	2	Lipid-Homöostase, interagiert mit mitochondrialen Ribosomen	Integrales Innenmembranprotein im Bereich von Kontaktstellen
Ypr010c-a	-	-		1	unbekannt	Integrales Innenmembranprotein im Bereich von Kontaktstellen
Ypl109c	+	-	(Sickmann et al., 2003; Reinders et al., 2006)	2	unbekannt	Integrales Innenmembranprotein im Bereich von Kontaktstellen
Aim46	+	-	(Reinders et al., 2006)	1	unbekannt	Integrales Innenmembranprotein im Bereich von Kontaktstellen
Mgm101	+	-	(Reinders et al., 2006; Meeusen et al., 1999)	3	Mitochondriale DNA-Reparatur, Nukleoid-assoziiertes Protein	Integrales Innenmembranprotein mit ähnlichem Verteilungsmuster wie mitochondriale DNA-bindende Proteine
Yor020w-a	+	-	(Reinders et al., 2006; Brachat et al., 2003)	1	unbekannt	Integrales Innenmembranprotein mit ähnlichem Verteilungsmuster wie mitochondriale DNA-bindende Proteine
Ybl095w (Mrx3)	+	-	(Reinders et al., 2006)	1	Interagiert mit mitochondrialen Ribosomen	Integrales Innenmembranprotein mit einem Carrier-ähnlichen Verteilungsmuster
Fmp10	+	-	(Reinders et al., 2006)	1	unbekannt	Integrales Innenmembranprotein mit einem Carrier-ähnlichen Verteilungsmuster
Gep7	+	-	(Reinders et al., 2006; Huh et al., 2003)	1	Unbekannt, interagiert mit Phb1 und Gem1	Integrales Innenmembranprotein mit einem Carrier-ähnlichen Verteilungsmuster
Ydr381c-a	+	-	(Zahedi et al., 2006)	1	Unbekannt	Integrales Innenmembranprotein
Nat2	+	-		2	N-terminale Acyl-Transferase	Integrales Innenmembranprotein
Ymr157c	+	-	(Reinders et al., 2006)	2	unbekannt	Integrales Innenmembranprotein
Abf2	+	-	(Cho et al., 2001)	0	Bindet an mitochondriale DNA	Peripheres Innenmembranprotein
Coq11 (Mrx2)	+	-	(Huh et al., 2003)	0	Untereinheit von Coenzym Q-Synthase-Komplex, assoziiert mit mitochondrialen Ribosomen	Peripheres Innenmembranprotein

MTP, bekanntes mitochondriales Protein; TMD, Transmembran-Domäne (α -Helix-Prädiktion); OM, Außenmembran

3.4 Matrix- und IMS-Proteine

In Abbildung 12A und 12B sind zwei Komplexe der mitochondrialen Matrix dargestellt. Als Strukturkomponente des Mdj1-Ssc1-Mge1-Faltungskomplexes (Hsp70-Komplex) scheint Mdj1 die einzige Komponente zu sein, welche während des Experiments in Membranassoziation verbleibt (Abbildung 12A). Mdj1 wurde bereits als Innenmembran-assoziiert beschrieben (Rowley et al., 1994). Die anderen Untereinheiten des Komplexes zeigen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keine nennenswerte Assoziation mit der Innenmembran. In Abbildung 12B sind die Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase dargestellt. Diese zeigen in unterschiedlichem Ausmaß ein relatives Maximum in Fraktion 13 und sind somit ebenso teilweise Innenmembran assoziiert. In Abbildung 12C und D ist das am häufigsten identifizierte Profil von Matrixproteinen mit minimalen SILAC-Verhältnissen in den Fraktionen 1-17 und einem Maximum in Fraktion 21 dargestellt (MM-1). Ca. 60% aller identifizierter Matrixproteine zeigt ein solches SILAC-Profil (nicht alle detektierten Matrix-Proteine gezeigt). In Abbildung 12E und F bzw. G sind die beiden anderen SILAC-Profil-Gruppen MM-2 und MM-3 dargestellt. Beide sind durch ein relatives (MM-2) oder absolutes (MM-3) zusätzliches Maximum im Bereich der Dichte der Innenmembran (Fraktion 13) gekennzeichnet. Beide Profile lassen also eine teilweise während der experimentellen Prozedur fortbestehende Membranassoziation vermuten. Die Gruppe der MM-2-Proteine setzt sich zu einem Großteil aus Untereinheiten der kleinen (MRPS5, 8, 9, 1, 35, YMR31, RSM23) und großen (MRPL1, 16, 27, 35, 7, 8, 40, 49, 19) mitochondrialen ribosomalen Untereinheit zusammen. Andere Proteine dieser Profil-Gruppe haben vornehmlich essenzielle Funktionen im Rahmen der mitochondrialen Transkription, oder Translation und DNA-Stabilität. Beispiele sind der Elongationsfaktor Mss116, das für die DNA-Stabilität verantwortliche und einzelstrangbindende Protein Rim1, der Translationsaktivator für Cox11, Mss51 und die Cysteindesulfatase für mitochondriale tRNAs Nfs1 (Seraphin et al., 1989; Van Dyck et al., 1992; Perez-Martinez et al., 2009; Muhlenhoff et al., 2004). Weitere hier identifizierte Proteine sind die E2- (Lat1), E3- (Lpd1) und PDX1-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes sowie die vermutlich für den Transport von Acyl-Gruppen über die Innenmembran verantwortliche Acylcarnitintransferase (Cat2). Mit Ausnahme des an der Ubichinon-Synthese beteiligten Coq8 (Do et al., 2001), des Co-Chaperon aus der Hsp40-Familie Mdj1 (Rowley et al., 1994) sowie des an der Cardiolipin-Synthese beteiligten Gep4 (Osman et al., 2010) sind alle Proteine aus dem Gradientenmuster MM-3 Strukturkomponenten der großen Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms.

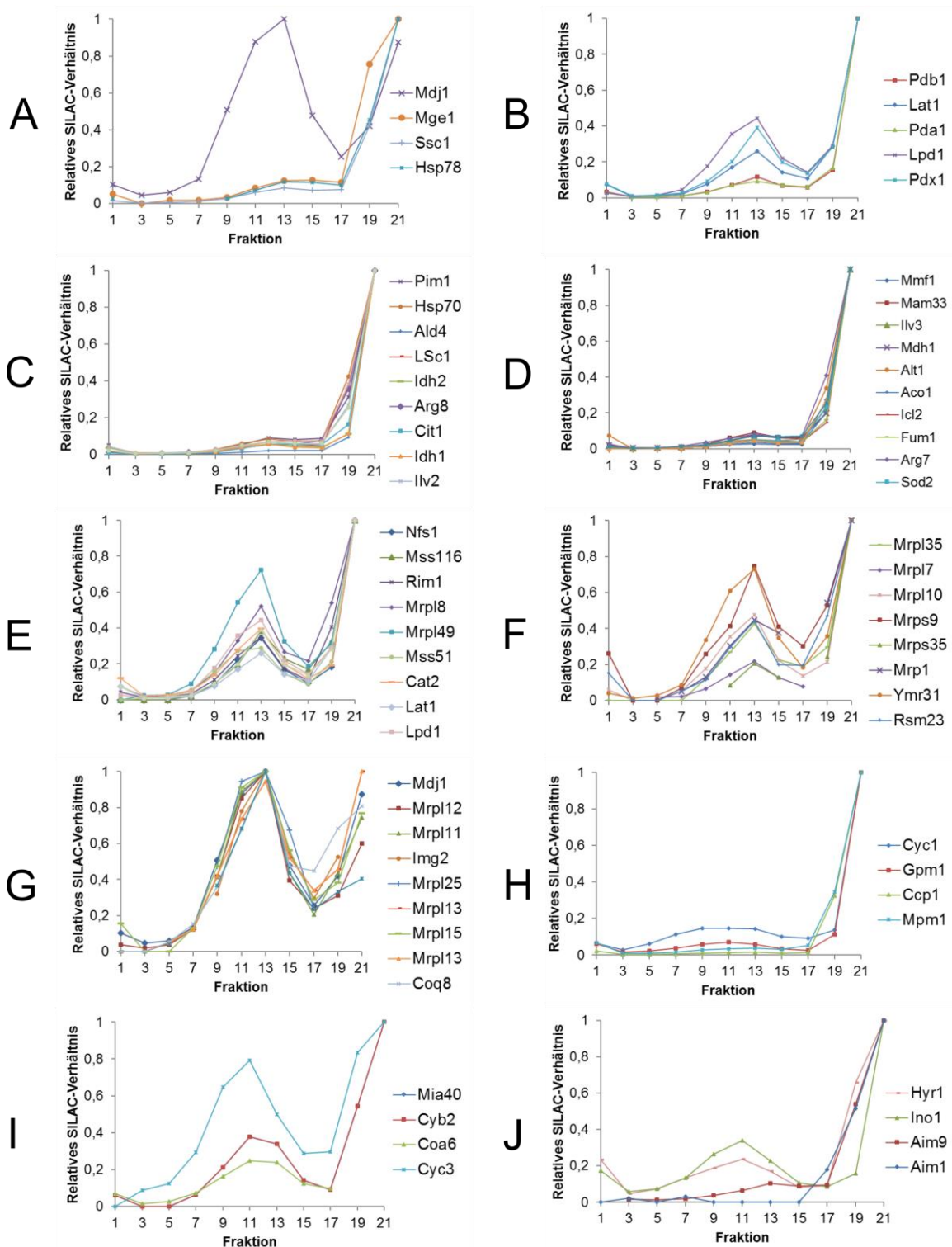


Abbildung 12 – SILAC-Profile von Proteinen der mitochondrialen Matrix (MM) und des Intermembranraums (IMS)

A, Hsp70-Komplex der mitochondrialen Matrix; **B**, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex; **C und D**, MM-1-Profil ohne Membranassoziation; **E und F**, MM-2-Profil mit partieller Membranassoziation; **G**, MM-3-Profil mit starker Membranassoziation und absolutem Maximum in Fraktion 13; **H**, IMS-1-Profil von Proteinen des Intermembranraums ohne Membranassoziation; **I**, IMS-2-Profil von Proteinen des Intermembranraums mit partieller Membranassoziation; **J**, Proteine mit bisher unbekannter Lokalisation

Die meisten mitochondrialen Ribosomen sind membrangebunden und der Membrankontakt wird über die 21rRNA und das Innenmembranprotein Mba1 hergestellt, welches mit der 54S Untereinheit des Ribosoms interagiert (Pfeffer et al., 2015). Die kleine Untereinheit ist hingegen nicht direkt mit der mitochondrialen Innenmembran verbunden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass vorwiegend Proteine der Transkription, der Translation und DNA-Erhaltungs-Maschinerie sowie die Untereinheiten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes ein SILAC-Profil aufweisen, welches eine Assoziation mit der Innenmembran nahelegt.

Nur wenige der identifizierten mitochondrialen Proteine konnten dem Intermembranraum zugeordnet werden. Diese Proteine zeigten entweder ein MM-1-ähnliches SILAC-Profil (IMS-1, Abbildung 12H) oder weisen wie MM-2-Proteine ein SILAC-Profil auf, welches eine partielle Membranassoziation vermuten lässt (IMS-2, Abbildung 12I). Zu den partiell Innenmembran-assoziierten Proteinen gehören das am Import beteiligte Mia40, Cytochrom b2, das an der Komplex IV-Assemblierung beteiligte Coa6 sowie die Holocytochrom c-Synthase Cyc3.

Insgesamt lässt sich mittels des Datensatzes nicht sicher zwischen Intermembranraum und mitochondrialer Matrix unterscheiden. Jedoch können mit Hilfe des Datensatzes Aussagen bezüglich des Grades der Membranassoziation von löslichen Proteinen gemacht werden, die gut mit bisherigen Erkenntnissen vereinbar sind (s. oben und Diskussion 4.1). Vier bisher nicht sicher einem Kompartiment zugeordnete Proteine zeigen einen MM-1/IMS-1- oder MM-2/IM-2-artigen Verlauf (Abbildung 12J). Der Hydroperoxid-Rezeptor Hyr1 ist als Protein des Intermembranraums charakterisiert, ist aber auch in Peroxisomen lokalisiert worden. Aus den vorliegenden Daten ist eine teilweise Assoziation mit Innen- und Außenmembranabschnitten wahrscheinlich. Das Protein Ino1 ist eine Inositol-3-phosphat-Synthase, welche im SILAC-Profil eine eindeutige Innenmembranassoziation aufweist (vgl. Peak in Fraktion 11). Aim1 und Aim9 sind vermutlich mitochondriale Proteine, die keine Membranassoziation aufweisen und einem der wässrigen Kompartimente zugeordnet werden können. Eine Synopsis der Daten zu den vier Proteinen findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4 - Uncharakterisierte oder in unterschiedlichen Organellen lokalisierte Proteine mit SILAC-Profilen, die typisch für ein wässriges mitochondriales Subkompartiment ist

Proteine	MTP	Andere Lokalisation	Referenz	TMD	MTS	Funktion	Lokalisationsvorschlag
Hyr1	+	Peroxisom		0/1	-	Thiol-Peroxidase	Lösliches IMS-Protein mit geringer Innen- und Außenmembranassoziation
Aim9	+	-	(Reinders et al., 2006)	0	+	unbekannt	Lösliches IMS- oder MM-Protein ohne Innenmembranassoziation
Aim1	-	-		0	+	unbekannt	Lösliches IMS- oder MM-Protein ohne Innenmembranassoziation
Ino1	-	Cytosol	(Dean-Johnson and Henry, 1989)	0	-	Inositol-3-Phosphat-Synthase	Lösliches IMS- oder MM-Protein mit Innenmembranassoziation

MTP, bekanntes mitochondriales Protein; TMD, Transmembran-Domäne (α -Helix-Prädiktion); MTS, Matrix targeting signal; das Vorhandensein einer MTS wurde getestet mit TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)

3.5 Außenmembranproteine

Abbildung 13 gibt einen Überblick über die detektierten Proteine der mitochondrialen Außenmembran. In Abbildung 13A sind die Untereinheiten des TOM-Komplexes dargestellt. Alle Untereinheiten zeigen ein kongruentes SILAC-Profil mit einem steil abfallenden Maximum in Fraktion 1. Dieses SILAC-Profil ist das häufigste Profil von Außenmembranproteinen (s. Abbildung 13B) und wird im Folgenden OM-1 bezeichnet. Abbildungen 13C und D zeigen das Verlaufsmuster OM-2, welches durch ein kleines weiteres, relatives Maximum im Bereich der intermediären Dichte (Fraktion 11) gekennzeichnet ist. Nach Subtraktion des Profils eines typischen OM-1-Proteins (z.B. Om14) entspricht das SILAC-Profil dem des Proteins Fcj1 der Innenmembran, welches in mitochondrialen Kontaktstellen lokalisiert wurde (3.3). Diese Außenmembranproteine reichern also zu einem kleinen Teil im Bereich der intermediären Dichte an. Zu diesen Proteinen gehören die an der Außenmembranfusion beteiligten Proteine Fzo1 und Ugo1 sowie Untereinheiten des TOB-Komplexes, welcher die Insertion von β -Barrel-Proteinen in die Außenmembran steuert. Für das SILAC-Profil OM-3 ist ein „Wannen“-artiges SILAC-Profil typisch. Es zeichnet sich durch eine hohe Konzentration der jeweiligen Proteine in den Fraktionen 1 und 21 aus. Zu den Proteinen dieser Gruppe gehören die an der mitochondrialen Teilungsmaschinerie beteiligten Proteine Fis1 und Caf4 sowie das an Außenmembran anliegenden Mdv1 und das bisher weitgehend uncharakterisierte Uip1. Insgesamt konnten vier uncharakterisierte Proteine der OM-1-Profil-Gruppe (Abbildung 13F) und drei nicht sicher lokalisierte Proteine der OM-3-Profil-Gruppe (Abbildung 13G) zugeordnet werden. In Abbildung 13H und I sind einige Ausnahmen von typischen SILAC-Profilen von Außenmembranproteinen dargestellt. Alle diese Proteine haben ein Maximum in Fraktion 1 gemeinsam. Zu diesen Proteinen gehört das bisher uncharakterisierte Ydr381c-a, das abgesehen vom Maximum in Fraktion 1 im weiteren Gradientenverlauf das typische Muster eines Innenmembranproteins widerspiegelt (vgl. spitzes Maximum in Fraktion 13, IM-1-ähnlich, Abbildung 13H). Ein ähnliches Profil bietet das Protein Fmp52, welches nach Subtraktion der löslichen Fraktion 21 eine Mischung aus Außenmembranprotein (Muster OM-1) und Carrier-like Protein der Innenmembran (Muster IM-3) darstellt. Ydr381c-a ist ein vermutlich mit einer α -Helix membraninsertiertes Protein, das sowohl in der Innen- als auch Außenmembran zu finden ist. Fmp52 hingegen scheint, der Struktur nach zu urteilen, ein lösliches Protein zu sein, welches eine starke Assoziation mit beiden mitochondrialen Membranen aufweist. Das bisher als Protein der Innenmembran beschriebene Nuc1 zeigt keinen Innenmembranprotein-typischen Verlauf. Es weist neben einem Maximum in Fraktion

1 einen kleinen ‚Bauch‘ in den Fraktionen 9-13 auf. Nach Subtraktion der Fraktion 1 demaskiert sich ein am ehesten zu vakuolären Proteinen passendes SILAC-Profil (Abbildung 13I, s. auch Abschnitt zu Kolokalisation von mitochondrialen und vakuolären Proteinen). Auch das am Vesikeltransport und Autophagie beteiligte Protein Sec4 zeigt einen Nucl1 ähnlichen Gradienten-Verlauf. Beide Proteine zeigen nicht das Muster, welches für eine Kolokalisation zwischen Mitochondrien und ER typisch wäre (s. 3.7).

In Abbildung 13J ist schließlich noch der Verlauf des mitochondrialen Porins (VDAC1) zusammen mit dem Protein ADP/ATP-Transporter Aac2, der Hexokinase des Intermembranraums (Hxk1) und Fcj1 gezeigt. Diese vergleichende Darstellung wurde gewählt, da VDAC1 und die Hexokinase als mögliche Kandidatenproteine für die Ausbildung von mitochondrialen Kontaktstellen der Innen- und Außenmembran diskutiert worden sind (1.1.5). Bei Betrachtung der Verläufe wird deutlich, dass das mitochondriale Porin das typische Profil eines Außenmembranproteins besitzt. Es zeigt im Gegensatz zu Untereinheiten des TOB-Komplexes kein weiteres relatives Maximum im Bereich der intermediären Dichte. Die Hexokinase weist als lösliches Protein die größten SILAC-Verhältnisse in der Fraktion 21 auf. Daneben zeigen sich höhere SILAC-Verhältnisse im Bereich der intermediären Dichte und der Außenmembran, welche eine geringe Membranassoziation vermuten lassen. Das Profil der intermediären Dichte gleicht dabei allerdings nicht dem der typischen Kontaktstellenproteine (3.3). Insgesamt unterstützt das SILAC-Profil der beiden Proteine VDAC und Hexokinase die Annahme einer Kontaktstellen-Anreicherung nicht.

Eine Synopsis der SILAC-Profile von bisher uncharakterisierten Proteinen, welche sich durch ihr SILAC-Profil der Außenmembran zuordnen lassen, findet sich in Tabelle 5. Zudem sind dort auch Vorschläge zur Lokalisation notiert.

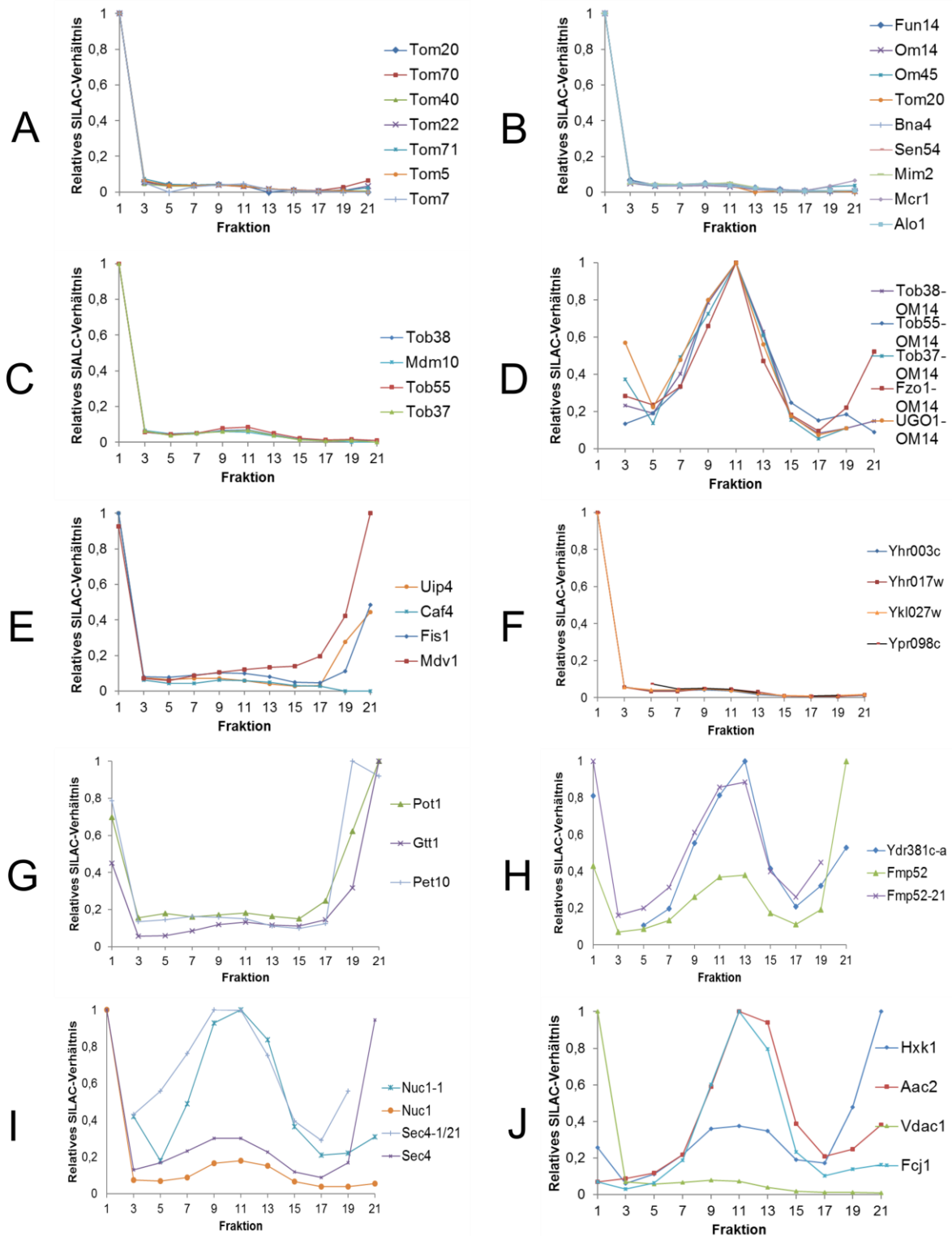


Abbildung 13 – SILAC-Profile von Proteinen der mitochondrialen Außenmembran (OM)

A, Untereinheiten des TOM-Komplexes; **B**, OM-1-Profil mit Maximum in Fraktion 1 und ansonsten sehr niedrigen SILAC-Verhältnissen; **C** und **D**, OM-2-Profil mit zweitem relatives Maximum im Bereich der intermediären Dichte (Fraktion 11); **D**, Profil der OM-2-Proteine nach Subtraktion der SILAC-Verhältnisse eines OM-1-Proteins (Om14); **E**, OM-3-Profil mit ‚Wannen‘-artigem Gradientenverlauf; **F**, uncharakterisierte Proteine mit OM-1-ähnlichem SILAC-Profil; **G**, uncharakterisierte Proteine oder Proteine mit diskrepanten Lokalisationangaben, welche ein OM-3-ähnliches Profil aufweisen; **H**, Proteine mit Außenmembran-typischem Profil und zusätzlichen Maxima im Bereich von Innenmembranproteinen; **I**, atypisches Profil der Proteine Nuc1 und Sec4; **J**, Darstellung des mitochondrialen Porins und Hexokinase im Vergleich zu Fcj1 und einem Carrier-Protein Aac2 der Innenmembran

Tabelle 5 - Uncharakterisierte oder in verschiedenen Organellen lokalisierte Proteine mit Außenmembran-typischen SILAC-Profilen

Proteine	MTP	Andere Lokalisation	Referenz	TMD	Funktion	Lokalisationsvorschlag
Yhr003c	+	-	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Zahedi et al., 2006)	2	tRNA Threonylcarbamoylarnosin-Dehydratase	Integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran
Yhr017w	+	-	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Zahedi et al., 2006)	2/3	Unbekannt	Integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran
Ykl027w	+	-	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Zahedi et al., 2006)	3	tRNA Threonylcarbamoylarnosin-Dehydratase	Integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran
Ypr098c	+	-	(Zahedi et al., 2006)	3	Unbekannt	Integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran
Pot1	+(IMS)	PM	(Vogtle et al., 2012; Glover et al., 1994)	0	3-ketoacyl-CoA thiolase	Lösliches IMS-Protein mit starker Außenmembranassoziation
Gtt1	+	ER/LP	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Zahedi et al., 2006; Choi et al., 1998)	0	Glutathion-S-Transferase	Lösliches, z.T. Außenmembranassoziiertes Protein
Pet10	-	LPM	(Athenstaedt et al., 1999)	2	Unbekannt, ggf. Lipidmetabolismus und Funktion bei respiratorischem Wachstum	Außenmembranprotein
Ydr381c-a	+	-	(Reinders et al., 2006; Zahedi et al., 2006)	1	Unbekannt	Integrales Protein der Innen- oder Außenmembran und ggf. zweite prozessierte Isoform mit Lokalisation in der jeweils anderen Mitochondrienmembran
Fmp52	+	ERM	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Zahedi et al., 2006; Huh et al., 2003)	0	Unbekannt	Lösliches IMS-Protein mit starker Außen- und Innenmembranassoziation

Nuc1	+	(IM)	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Zahedi et al., 2006)	1	Mitochondriale Nuklease	Integrales Außenmembranprotein mit einer Subpopulation, welche in engem Kontakt zur Innenmembran steht
Sec4	+	ERM/PM	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Zahedi et al., 2006)	0	GTPase der Rab-Familie; Vesikeltransport, Autophagie	

MTP, bekanntes mitochondriales Protein; TMD, Transmembran-Domäne (α -Helix-Prädiktion); IM, Innenmembran; IMS, Intermembranraum; PM, peroxisomale Matrix; ER, endoplasmatisches Retikulum; LP, Lipid particle; ERM, ER-Membran; LPM, LP-Membran; PM, Plasmamembran

3.6 Proteine des endoplastmatischen Retikulums (ER)

Abbildung 14 zeigt die SILAC-Profilen von verschiedenen ER-Proteinen. In Abbildung 14A und B sind die homogenen SILAC-Profilen der Untereinheiten der Protein O-Mannosyltransferase sowie des Sec61-Komplexes dargestellt. Abbildung 14C (SILAC-Profil ER-1) und D (SILAC-Profil ER-2) zeigt die beiden bei Weitem am häufigsten detektierbaren SILAC-Profilen von ER-Proteinen. Beide zeigen relative bzw. absolute Maxima in den Fraktionen 1 und 7 und einen sich anschließenden Verlauf in Form eines konkav verlaufenden ‚Abfalls‘ mit einem kleinen Maximum in Fraktion 21. In Abbildung 14E ist ein weiteres, häufig vertretenes SILAC-Profil des ER-Proteoms zu finden. Es unterscheidet sich von den beiden beschriebenen vornehmlich durch ein sägezahnähnlich konfiguriertes Muster in den Fraktionen 13-21. Alle dieser dritten SILAC-Profil-Gruppe zugeordneten Proteine sind als lösliche Proteine des ER-Lumens charakterisiert worden. Eine Ausnahme von den typischen ER-Profilen zeigt das im ER-Lumen lokalisierte und an der Protein-Faltung beteiligte Protein Scj1. Neben dem relativen Minimum in Fraktion 2 ist das Maximum in Fraktion 7 deutlicher ausgeprägt. Es ist das einzige der als im ER-Lumen lokalisierten Proteine, welches kein ER-3-Profil aufweist. Es lässt sich eine starke Membranassoziation vermuten. Der Verlauf könnte durch ein Fehlen der Fraktion 21 und damit durch eine Verschiebung der relativen Verhältnisse in den ersten 5 Fraktionen zustande gekommen sein.

Einen dem ER-1-Profil ähnlichen Verlauf zeigen die bisher weitgehend uncharakterisierten Proteine Ygl288w, Ykl077w und Ybl086c. Weiterhin konnten die Proteine mit diskrepanten Lokalisationsvorschlägen wie die Zink-Metalloprotease Ste24 und die doppelt lokalisierte Fumarat-Reduktase Osm1 diesem Gradientenmuster zugeordnet werden. Darüber hinaus wurden die uncharakterisierten Proteine Ygl140c, Pho88 und Ydr467c als ER-2-typische Proteine identifiziert. In diese SILAC-Profil-Gruppe fällt auch die Untereinheit der Serin-Palmitoyltransferase Lcb2. In das SILAC-Profil der löslichen ER-Proteine fallen die Proteine

Yhr138c und das als Innenmembran-assoziiert beschriebene Uth1 (Abbildung 14I). Auch einige bisher uncharakterisierte Proteine mit einem unvollständigen SILAC-Datensatz zeigen ein den ER-Proteinen ähnliches SILAC-Profil (Ydl121c, Ybr096w, Gnp1, Abbildung 14J). Eine Synopsis der bisher beschriebenen Funktion und Lokalisation der durch den SILAC-Verlauf neu dem ER-Proteom zugeordneten Proteine findet sich in Tabelle 6.

Tabelle 6 - Uncharakterisierte oder in unterschiedlichen Organellen lokalisierte Proteine mit ER-typischen SILAC-Profilen

Proteine	ERP	Andere Lokalisation	Referenz	TMD	Funktion	Lokalisationsvorschlag
Ykl0777w	-	Vakuole	(Huh et al., 2003)	2	Unbekannt	Integrales ER-Membranprotein
Ybl086c	-	Zell-peripherie	(Huh et al., 2003)	1	Unbekannt	Integrales ER-Membranprotein
Ste24	+	Nukleäre Innenmembran, Mitochondriale Außenmembran	(Zahedi et al., 2006; Tam et al., 2001)	5	Zink-Metalloprotease, Protein-Prozessierung	Integrales ER-Membranprotein
Osm1	+		(Williams et al., 2014; Muratsubaki and Enomoto, 1998)	1	Fumarat-Reduktase / oxidative Proteinfaltung	Integrales ER-Membranprotein
Pho88	-	Mitochondrium	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003)	2	Anorganisches Phosphat-Transporter	Integrales ER-Membranprotein
Ydr467c	-	-	-	2	Unbekannt	Integrales ER-Membranprotein
Lcb2	-	-	-	3	Serin-Palmitoyl-Transferase (Sphingolipid-Synthese)	Integrales ER-Membranprotein
Ygl140c	-	-	-	>10	Unbekannt	Integrales ER-Membranprotein
Uth1	-	Mitochondrium (IM), Zellwand	(Velours et al., 2002)	1/N-terminal	Mitophagie / Zellwandbiosynthese	Prozessiertes, lösliches ER-Protein
Yhr138c	-	-	-	1/N-terminal	Vakuolen-Fusionierung	Prozessiertes, lösliches ER-Protein
Ydl121c	+	-	(Huh et al., 2003)	1	Unbekannt	Integrales ER-Membranprotein
Ybr096w	+	-	(Huh et al., 2003)	1	Unbekannt	Integrales ER-Membranprotein
Gnp1	+	Mitochondrium	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003)	>10	Aminosäuretransporter	Integrales ER-Membranprotein

ERP, bekanntes Protein des endoplasmatischen Retikulums; TMD, Transmembran-Domäne (α -Helix-Prädiktion); ER, endoplasmatisches Retikulum; IM, mitochondriale Innenmembran

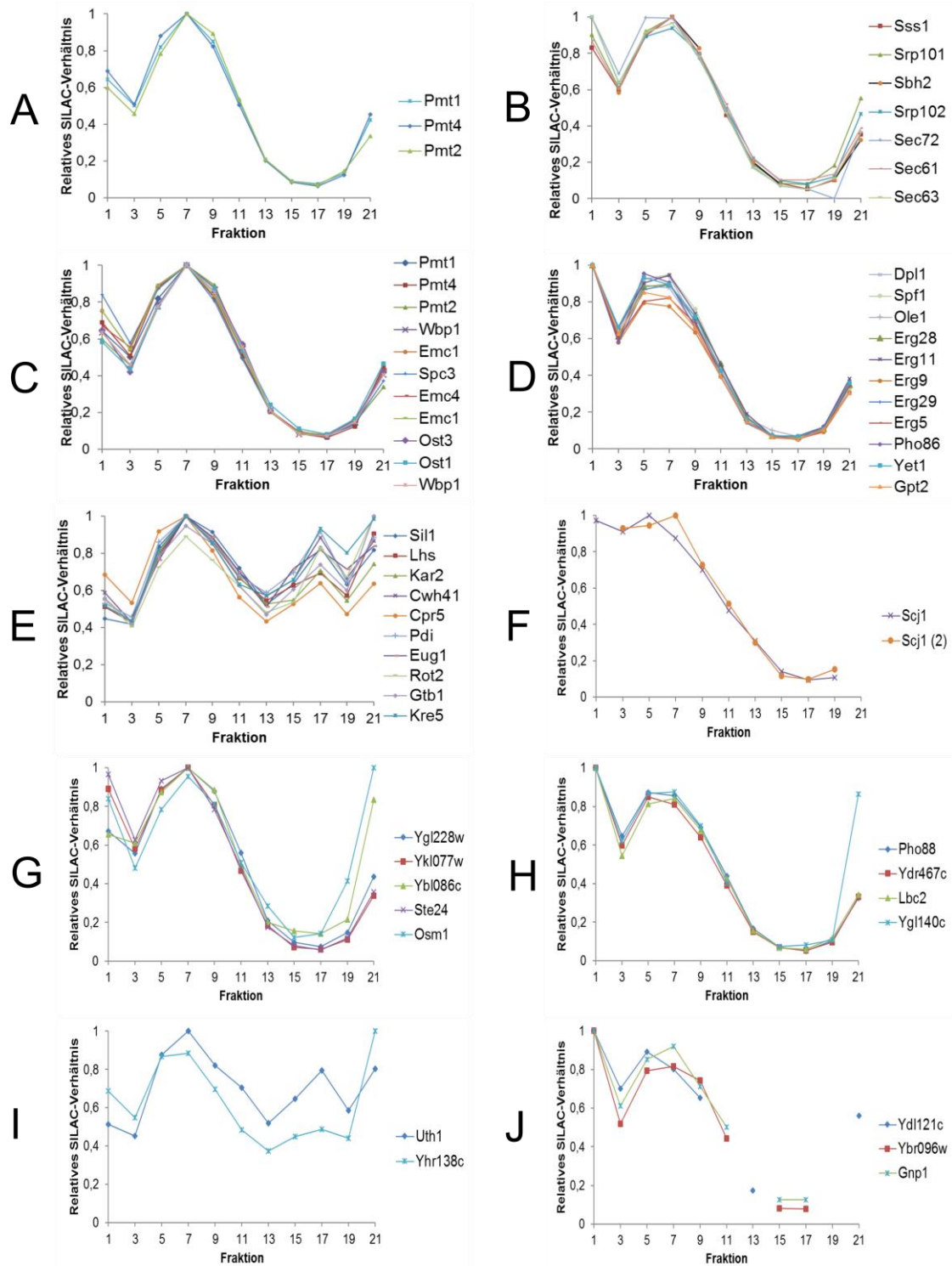


Abbildung 14 – SILAC-Profile von Proteinen des endoplasmatischen Retikulums (ER)

A, Untereinheiten des Protein-O-Mannosyltransferase-Komplexes; **B**, Untereinheiten des Sec61-Komplexes; **C**, ER-1-Profil mit Maximum in Fraktion 7; **D**, ER-2-Profil mit Maximum in Fraktion 1; **E**, ER-3-Profil mit „Sägezahn“-artigem Verlauf in den Fraktionen 11-21; **F**, atypischer Verlauf des ER-Proteins Scj1; **G**, uncharakterisierte Proteine oder Proteine mit diskrepanten Lokalisationsangaben, welche ein ER-1-ähnliches SILAC-Profil aufweisen; **H**, uncharakterisierte Proteine oder Proteine mit diskrepanten Lokalisationsangaben, welche ein ER-2-ähnliches SILAC-Profil aufweisen; **I**, ER-3-ähnliche uncharakterisierte Proteine; **J**, ER-ähnliche unvollständige SILAC-Profile von nicht-charakterisierten Proteinen

3.7 Proteine der mit Mitochondrien assoziierten ER-Membranen

Der ERMES-Komplex (1.1.3) besteht aus den Untereinheiten Mdm10, Mmm1, Mdm12 und Mdm34 sowie der assoziierten GTPase Gem1. Die SILAC-Profile von Mdm10 und Gem1 sind in Abbildung 15A und B dargestellt. Sie entsprechen dem typischen SILAC-Profil eines mitochondrialen Außenmembranproteins. Abbildung 15C und D zeigen die teilweise unvollständigen SILAC-Profile von den Proteinen Mmm1 und Mdm12. Mdm12 weist ein ER-typisches, Mmm1 dagegen ein etwas abgewandeltes SILAC-Profil auf. Das zweite breite Maximum in den Fraktionen 7 und 9 ist deutlich geringer ausgeprägt, als es bei typischen ER-Membranproteinen anzunehmen wäre (Abbildung 15C). Der Verlauf entspricht einem Mittel der Verhältnisse von einem typischen ER-Membranprotein und einem integralen Protein der mitochondrialen Außenmembran (Abbildung 15E, zum Vergleich Mittelung aus den Proteinen Sec61 und Om14). Selbiges SILAC-Profil könnte also einer Kolo-kalisation in beiden Organellen oder einer Lokalisation an Kontaktstellen der mitochondrialen und ER-Membran entsprechen. Mdm34 konnte im vorliegenden Datensatz nicht detektiert werden. In den Daten lassen sich einige weitere Proteine mit einem Mmm1-ähnlichen Verlauf ausmachen. Viele dieser Proteine sind an der zellulären Lipid-Homöostase beteiligt. So haben einige Proteine der Ergosterolsynthese (Erg1, Erg2, Erg6, Erg27), die Phospholipase C (Pgc1) und der Lipid-Carrier Lam6 neben einem absoluten Maximum in Fraktion 1 ein relatives, aber abgeschwächtes Maximum in den Fraktionen 7 und 9 gemeinsam (Abbildung 15F). Auch vier, nicht direkt am Lipidmetabolismus beteiligte, Proteine zeigen ein ähnliches Verlaufsmuster: Die Cytochrom b-Reduktase Cbr1, der Assemblierungsfaktor für das nukleäre Porin Snl1, der V-ATPase Assemblierungsfaktor Vph2 sowie das Zellzyklusarrest-Protein Far10 (Abbildung 15G). Neben dieser SILAC-Profil-Gruppe lässt sich ein weiteres Mmm1-ähnliches Verlaufsbild ausmachen. Proteine dieses Musters haben ein Maximum in Fraktion 21, zeigen aber ansonsten ein Mmm1-ähnliches SILAC-Profil (Abbildung 15H, Rdl1-21). Zu dieser Gruppe von Proteinen gehört der Rho GDP-Dissoziation-Inhibitor Rdi1, die Thiol-Transferase Grx2 und das an der Lipid-Homöostase beteiligte Scs2. Eine Synopsis der Proteine mit Mmm1-ähnlichem Verlauf und deren bisherige Charakterisierung und Lokalisationsvorschläge finden sich in Tabelle 7.

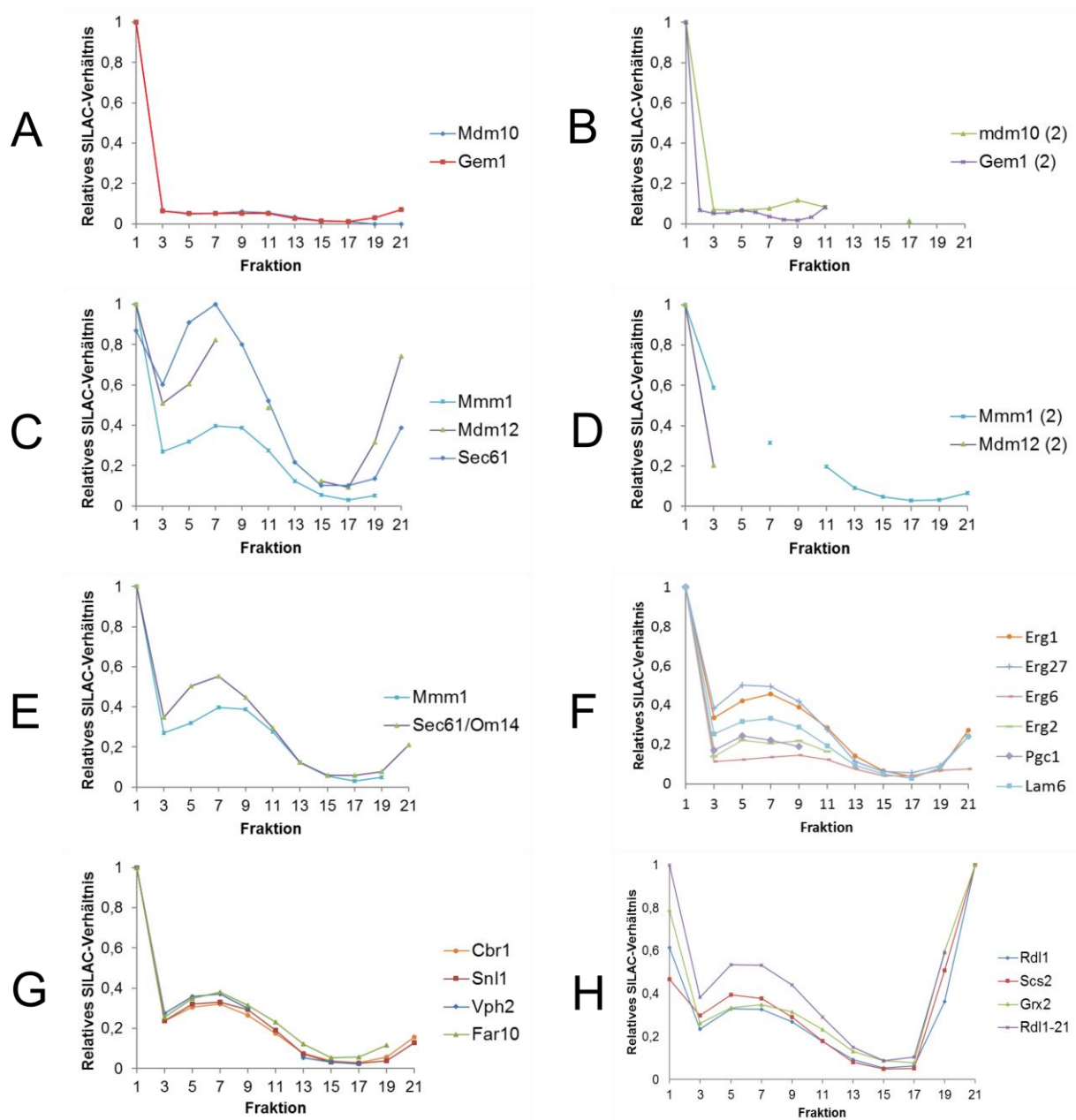


Abbildung 15 – SILAC-Profile von Proteinen des ERMES-Komplexes sowie von Proteinen mit einem Mmm1-ähnlichen SILAC-Profil

A, Untereinheiten Mdm10 und Gem1 des ERMES-Komplexes mit Verankerung in der mitochondrialen Außenmembran; **B**, SILAC-Profile der Untereinheiten Mdm10 und Gem1 aus dem zweiten Experiment; **C**, SILAC-Profile der ERMES-Untereinheiten Mmm1 und Mdm12; **D**, SILAC-Profile der Untereinheiten Mmm1 und Mdm12 aus dem zweiten Experiment; **E**, Vergleich des Proteins Mmm1 mit einer Mittelung der SILAC-Profile eines typischen ER-Membranproteins (Sec61) und eines integralen Außenmembranproteins (Om14); **F**, Proteine mit Mmm1-ähnlichem Gradientenmuster und Funktionen im Bereich der Lipidhomöostase; **G**, Proteine mit Mmm1-ähnlichem Verlauf ohne beschriebene Funktionen in der zellulären Lipidhomöostase; **H**, Proteine mit Maximum in Fraktion 21, aber ansonsten Mmm1-ähnlichen Verlaufsmustern

Tabelle 7 - Uncharakterisierte oder in unterschiedlichen Organellen lokalisierte Proteine mit Mmm1-ähnlichen SILAC-Profilen

Proteine	M T P	Andere Lokalisa- tion	Referenz	TMD	Funktion	Lokalisationsvor- schlag
Erg1	-	ER- Membran, Lipid- Particles	(Leber et al., 1998)	5	Squalen-Epoxidase	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Erg2	-	ER- Membran	(Grebek et al., 1998)	1	C8-Sterolisomerase	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Erg6	+	ER- Membran, Lipid par- ticle	(Zahedi et al., 2006; Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003)	0	Delta-24-C-Sterol- Methyltransferase	Lösliches, primär ER-assoziiertes Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Erg27	+	ER- Membran, Lipid par- ticle	(Zahedi et al., 2006)	1	3-Ketosterol- Reduktase	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Pgc1	+	Lipid par- ticles	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Huh et al., 2003)	2	Phosphatidylglyce- rol-Phospholipase C	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Lam6	+	ER- Membran- e, ER- Mito- chondrien- Kontakt- stellen	(Huh et al., 2003; Elbaz-Alon et al., 2015; Murley et al., 2015)	1	Sterol-Transporter, bekannte Lokalisa- tion zu Kontaktstel- len zwischen Mito- chondrien und ER	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Far10	-	ER- Membran	(Pracheil and Liu, 2013)	2	Zellzyklusarrest- Wiederherstellung	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Cbr1	+		(Sickmann et al., 2003; Zahedi et al., 2006; Reinders et al., 2006)	1	Cytochrom b- Reduktase	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Sn11	+	ER- Membran	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003)	1	Nuclear-pore- complex Biogenese	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-

Vph2	-	ER-Membran	(Jackson and Stevens, 1997)	2	Assemblierungsfaktor der V-ATPase	Mitochondrien-Kontaktstellen Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Rdl1	+	ER-Membran	(Sickmann et al., 2003; Zahedi et al., 2006; Reinders et al., 2006; Huh et al., 2003)	0	Thiosulfat-Schwefel-Transferase	Lösliches, primär ER-assoziiertes Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Scs2		ER/Nukleus-Membran / Plasmamembran – Kontaktstellen		1	Lipid-Homöostase, Beteiligung an Kontaktstellen von ER, Nukleus- und Plasmamembran	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen
Grx2	+		(Sickmann et al., 2003; Reinders et al., 2006)	1	Thioltransferase	Integrales ER-Protein mit präferenzierter Anreicherung im Bereich von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen

MTP, bekanntes mitochondriales Protein; TMD, Transmembran-Domäne (α -Helix-Prädiktion); ER, endoplasmatisches Retikulum

3.8 Vakuolen-Proteine

In Abbildung 16A und B sind die beiden am häufigsten identifizierten, charakteristischen Verläufe der SILAC-Profile von vakuolären Proteinen dargestellt. Sie zeichnen sich durch ein breites Maximum in Fraktion 9-13 (V-1) oder ein spitzes Maximum in Fraktion 9 (V-2) aus. Das in Abbildung 16C dargestellte V-3-Profil zeigt neben einem V-1-ähnlichen, relativen Maximum hohe SILAC-Verhältnisse in der Fraktion 21. Dies ist vermutlich, wie bereits für andere Organellen beschrieben, auf eine nur teilweise bestehenbleibende Membranassoziation zurückzuführen. Für das Protein Ypt7 zeigt sich ein etwas abgewandeltes SILAC-Profil, welches sich durch ein zusätzlich hohes SILAC-Verhältnis in der Fraktion 1 auszeichnet (Abbildung 16D). Dieses Muster ist ähnlich einer Mischung aus zwei SILAC-Verhältnissen von einem Protein der Außenmembran (Om14) und einem vakuolären Protein (Meh14, Abbildung 16E). Somit lässt sich für dieses Protein eine Kolokalisation oder Lokalisation im Bereich von Organellen-übergreifenden Kontaktstellen mutmaßen. Folgenden bisher nicht sicher dem vakuolären Proteom zugeordneten Proteine konnte ein Vakuolen-typisches SILAC-Profil zugeordnet werden: Ybr074w, Vtc4, Ygr125c und Neo1 (V2-Profil, Abbildung 16F); Adp1, Rmd8, Hsv2 (V1-Profil, Abbildung 16G); Ykl151c (V3-Profil, Abbildung 16H).

Einige Proteine zeigen ein Ypt7-ähnliches SILAC-Profil, welches gemäß der oben ausgeführten Analyse eine Kolokalisation in Außenmembran und Vakuole nahelegt (Abbildung 16I). So zeigen die Proteine Ady2, Vma2 und das bisher uncharakterisierte Yjl171c V2-typische SILAC-Profile mit zusätzlich relativ hohen SILAC-Verhältnissen in Fraktion 1 (~0,5). Der Außenmembrananteil ist jedoch deutlich geringer als bei Ypt7; die Proteine sind Vakuolen-dominant. Ein Ypt7-ähnliches SILAC-Profil zeigt der GDP-Dissoziationsfaktor Gdi1. Darüber hinaus weist das uncharakterisierte Aim18 und die GTPase Ypt32 neben einem Maximum in Fraktion 1 relative Vakuolen-typische Anhebungen des SILAC-Verhältnisses in Fraktion 9 auf. Diese Proteine werden daher ebenso als Kontaktstellen-Kandidaten eingestuft, sind aber Außenmembran-dominant. Eine Synopsis dieser und oben beschriebener, dem vakuolären Proteom zugeordneten Proteine und ihre bisherigen Funktions- und Lokalisationsdaten finden sich in Tabelle 8.

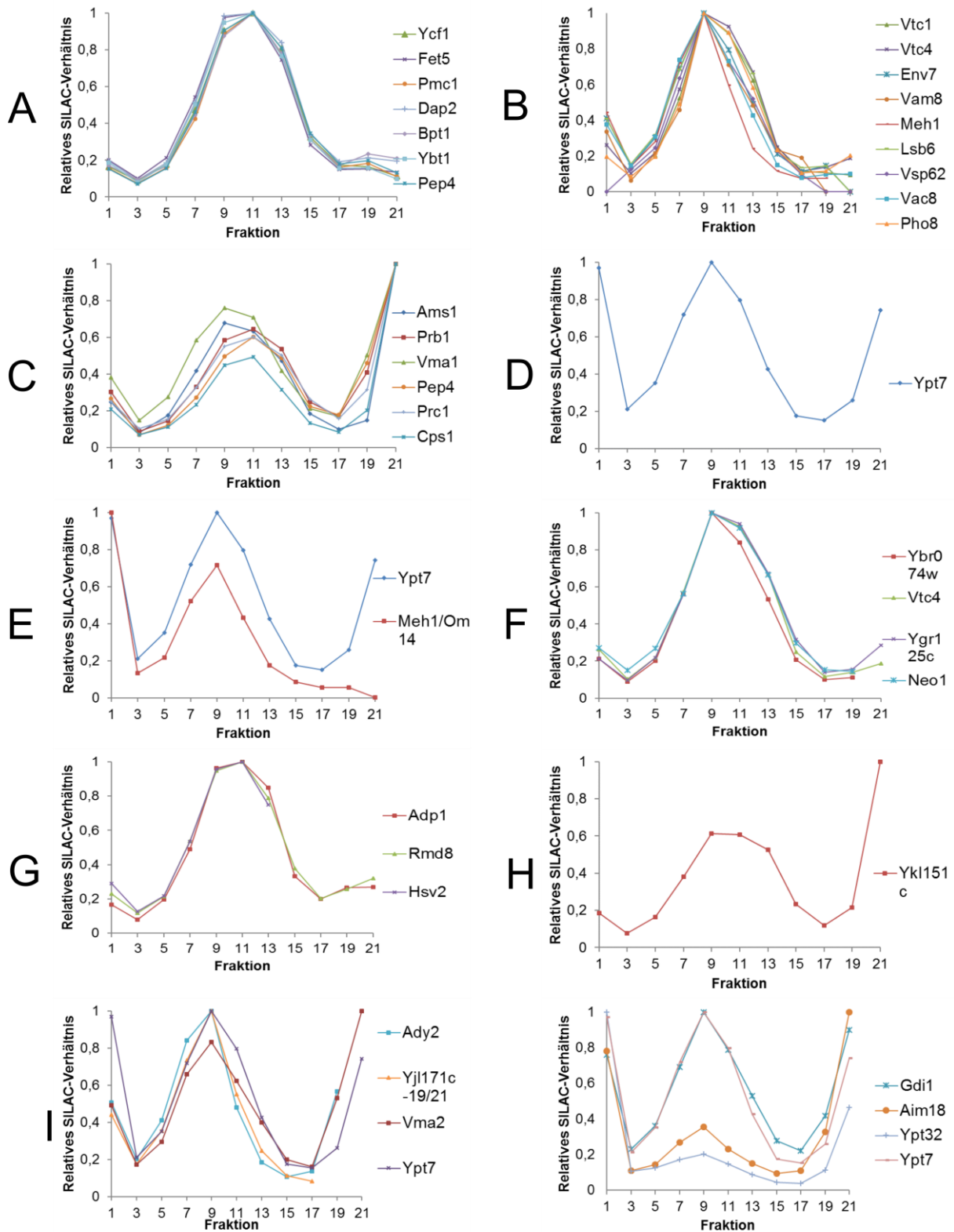


Abbildung 16 – SILAC-Profile von Proteinen der Vakuole

A, V-1-SILAC-Profil mit breitem Maximum in den Fraktionen 9-13; **B**, V-2-SILAC-Profil mit spitzem Peak in Fraktion 9; **C**, V-3-SILAC-Profil mit hohem Proteinanteil in den dichtesten Saccharose-Fractionen; **D**, atypisches SILAC-Profil des vakuolären Protein Ypt7; **E**, das SILAC-Profil von Ypt7 gleicht einer Mittelung aus einem typischen Außenmembran- und Vakuolen-SILAC-Profil (Om14/Meh1); **F-H**, Proteine mit bisher ungeklärter Lokalisation mit V1-V3-typischen SILAC-Profilen; **I**, Proteine mit Ypt7-ähnlichen SILAC-Profilen

Tabelle 8 - Uncharakterisierte oder in unterschiedlichen Organellen lokalisierte Proteine mit Vakuolen-typischen SILAC-Profilen

Proteine	V P	Andere Lokalisa- tion	Referenz	TMD	Funktion	Lokalisationsvor- schlag
Ybr074w	+	-	(Hecht et al., 2013)	8	Metalloprotease	Integrales Mem- branprotein der Vakuole
Vt4	+	ER- Membran	(Uttenweiler et al., 2007; Muller et al., 2003)	4	Vakuolen-Fusion	Integrales Mem- branprotein der Vakuole
Ygr125w	+	-	(Huh et al., 2003)	>10	Unbekannt	Integrales Mem- branproteine der Vakuole
Neo1	-	Endosom, Golgi	(Wicky et al., 2004; Hua et al., 2002)	>10	Vakuolen- Organisation, Gol- gi-ER-Transport	Integrales Mem- branproteine der Vakuole
Adp1	+	ER, Cyto- plasma	(Wiederhold et al., 2009)	8	ATP-abhängige Permease	Integrales Mem- branproteine der Vakuole
Rmd8	-	Cytoplas- ma	(Kumar et al., 2002)	2	Protein, welches für die Sporulation benötigt wird	Integrales Mem- branproteine der Vakuole
Hsv2	+	Endosom, Cytoplas- ma	(Krick et al., 2008)	1	Phosphatidylinosi- tol 3,5- bisphosphate- binding protein; Autophagie	Integrales Mem- branproteine der Vakuole
Ykl151c	-	Cytoplas- ma	(Huh et al., 2003)	1	NADHX- Dehydratase	Ggf. teilweise pro- zessiertes und hier- durch zum Teil lösliches, zum Teil membranegebunde- nes Protein der Vakuole
Ady2	-	Mito- chondri- um, Plasma- membran	(Reinders et al., 2007; Paiva et al., 2004)	6	Acetat-Transporter, benötigt für Sporu- lation	Integrales Mem- branprotein im Bereich von Kon- taktstellen der mi- tochondrialen und vakuolären Memb- ranen
Yjl171c	-	Zellwand, Mito- chondri- um, Plasma- membran	(Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Hamada et al., 1998)	2	Unbekannt	Integrales Mem- branprotein im Bereich von Kon- taktstellen der mi- tochondrialen und vakuolären Memb- ranen
Vma2	+	Mito- chondri- um, Mito- chondrien- Vakuolen- Kontakt- stellen	(Elbaz-Alon et al., 2014)	0	Periphere Unterein- heit der H ⁺ -ATPase	Lösliches, vor- nehmlich Vakuo- len-assoziiertes Protein im Bereich von Kontaktstellen der mitochondrialen und vakuolären Membranen
Gdi1	-	-		2	Vesikeltransport (GDP-	Integrales Mem- branprotein im

					Dissoziationsinhibitor)	Bereich von Kontaktstellen der mitochondrialen und vakuolären Membranen
Aim18	-	Mitochondrium	(Reinders et al., 2006)	0	Unbekannt	Lösliches, vornehmlich Außenmembran-assoziiertes Protein mit präferenzzieller Lokalisation an Kontaktstellen zwischen Mitochondrium und Vakuole
Ypt32	-	Golgi, Mitochondrium	(Zahedi et al., 2006; Benli et al., 1996)	3	GTPase (Rab-Familie)	Ggf. doppelt lokalisiertes integrales Membranprotein mit Endlokalisierung im Golgi-Apparat und der äußeren Mitochondrienmembran (hier mit Assoziation zu Vakuolen)

VP, bekanntes Protein der Vakuole; TMD, Transmembran-Domäne (α -Helix-Prädiktion); ER, endoplasmatisches Retikulum

3.9 Charakterisierung von YML030W

3.9.1 Zusammenfassung und Analyse bisheriger Daten

3.9.1.1 Daten zur Proteinstruktur

Laut Saccharomyces Genome Database (SGD) kodieren 480 Nukleinsäuren für das Protein Aim31. Dies entspricht einer Proteinlänge von 159 Aminosäuren (s.u. Aminosäuresequenz). Zur Vorhersage der Transmembrandomäne wurde das Programm DAS (Cserzo et al., 1997) verwendet. Die Profile Score für die Hydrophobizität der Proteinbereiche ergibt eine hohe Wahrscheinlichkeit für zwei Transmembrandomänen. Mittels des Paircoil2-Algorithmus (McDonnell et al., 2006) wurde eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Coiled-Coiled-Domäne am C-Terminus gefunden. Im Folgenden ist die Aminosäuresequenz des Proteins Aim31 dargestellt. Geladene Aminosäuren sind rot markiert, wohingegen aufeinanderfolgende hydrophobe Aminosäuren fett markiert sind. Diese Proteinabschnitte können somit den beiden prädizierten Transmembrandomänen entsprechen. Der Abschnitt der vorhergesagten Coiled-Coiled-Domäne ist grau unterlegt.

Aim31:

MSRMPSSFDVTERDLDDMTFGERIIYHCKKQPLVPIGCLLTTGAVILAAQNVRLGNK
 WKAQYYFRWRVGLQAATLVALVAGSFIYGTSGKELKAKKEEQLKEKAKMREKLWIQ
 ELERREEETEARRKRAELARMKTLENEEEIKNLEKELSDLENKLGKK

3.9.1.2 Daten zur Proteinkonservierung und Homologenanalyse

Das Protein Aim31 gehört zur Familie der Hypoxia-inducible Gene 1 (HIG1)-related Proteinfamilie. Die Domäne wurde in Proteinen gefunden, die an der Stoffwechselantwort bei hypoxischen Bedingungen beteiligt sind. Wie auch bei Aim31 ist die Domäne stets am N-Terminus des Proteins zu finden. In *Saccharomyces cerevisiae* lässt sich ein weiteres Protein der HIG1-Gene related Proteinfamilie zuordnen. Hierbei handelt es sich um das Protein Ynr018w/Aim38, welches ebenfalls ein mitochondriales Protein mit zwei möglichen Transmembrandomänen ist. Auffällig für die möglichen Homologen in höheren Organismen ist die Konsensussequenz in der N-terminalen Transmembrandomäne PLVP[I/L]G[.]T[A/G]A. Der C-Terminus hingegen scheint nur in Pilzen konserviert zu sein und verkürzt sich in Vergleich zu höheren Organismen zunehmend (Abbildung 17). Die Coiled-Coiled-Domäne scheint somit wenig konserviert. In *Drosophila melongaster* und *Homo sapiens* scheint HIGD2A (HIG1 hypoxia inducible domain family member 2A) das Homolog zum Hefeprotein Aim31 darzustellen (vgl. multiples Alignment in Abbildung 17).

Die Berücksichtigung von membranständigen Interaktionspartnern (3.9.5) und die starke Konservierung der ersten Transmembrandomäne lässt vermuten, dass dieser Bereich für die Funktion und Interaktion des Proteins von besonderer Bedeutung sein könnte.

```

H.s. -----
M.m. -----
D.m. -----
N.c. MWQAHRHRYRPSPLPLFHHREPSSTCLDSRHEAPNCAPICLISASQSPIARHSIDMPN
S.c. -----

H.s. -----MSTDTGVSL-PSYEEDQGSKLIIRKAKEAPFVFPVGIAGFAAIVA
M.m. PGP-VSPEAPFDPSKPPVIEGFSPV-YSNPEGFKEKFIIRKTRENPMVPIGCLGTAAALT
D.m. KIEVSLPEEELDWI--QLRQDLG--P-VAEVETTKKELQRKIKENPLVPLGCLATTAALT
N.c. STDN-QGSAPPGLSSRPLPSSFDDNA-DFYNENGFQKVSRRLEEPLIPIGCIATVAAFT
S.c. -----MSRMPSSFDVTERDLDDMTFGERI IYHCKKQPLVPIGCLLTGAVI
      :                               . . . : : * : * : * . . .

H.s. YGLYKLSRGN TKMSIHLIHM RVAAQGFVVGAMTVGMGYSMY-----REFWAKPKP----
M.m. YGLYCEH-RGQSHRSQLMMRTIRIAAOGFTVVAILLGLAASAMKSQA-----
D.m. AGLYNER-TGNRKMSQLMMRSRIAAGFTVMALVVGVMVMTYTDKK-----
N.c. GAYRAMR-RGDHEQVQRMFRARVAAQAF TVVAMVAGSWYYAADRQKQKELWKLKEQ--QD
S.c. LAAQNVRLGNKWKQAQYYFRWRVGLQAATLVALVAGSFIYGTSGKEL---KAKEEQLKEK
      . . : * : . . : * : * . . : * : *

H.s. -----
M.m. -----
D.m. -----
N.c. AEEKRQKWIRELEVRDAEDKALQERLEKRRKKAERDSAAGAPDGVAQAQAAYADAKEK
S.c. AKMREKLWIQELERREEETEARRKRAELARMKTLENEEEIKNLE-----KELSDLENK

H.s. -----
M.m. -----
D.m. -----
N.c. VSSPAGDVAPEDPNKSNITGVRERLPTWLGSGKADGSSRDKN
S.c. LGKK-----

```

Abbildung 17 – Multiples Alignment von Aim31

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von HIG1 domain family member 2A (*Homo sapiens*; H. s.), HIG1 domain family member 2A (*Mus musculus*; M. m.), CG9921, isoform B (*Drosophila melongaster*; D.m.), mitochondrial hypoxia responsive domain-containing protein (*Neurospora crassa*; N. c.) und von Aim31 (*Saccharomyces cerevisiae*; S. c.). Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des Programms Clustal Omega (Sievers et al., 2011) durchgeführt. Identische Aminosäuren (*) wurden grün unterlegt. Konservative (:) und semi-konservative (.) Substitutionen sind je türkis bzw. gelb unterlegt.

3.9.1.3 Daten zu möglichen Interaktionspartnern

Helbig et al. untersuchten die unterschiedliche Zusammensetzung und Assemblierung von Atmungskettenkomplexen unter anaeroben und aeroben Bedingungen mittels Blau-Nativ-Gelelektrophorese und anschließender massenspektrometrischer Proteinidentifikation (Helbig et al., 2009). Weiterhin konnten die Autoren durch ihre Komplexanalysen bisher unbekannte Proteine identifizieren, die eine ähnliche Anreicherung in Blau-Nativ-Gelabschnitten wie Atmungskettenenzyme zeigen. Hierzu zählt unter anderem das Protein Aim31. Aim31 zeigt in der Studie eine ähnliche Verteilung wie Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase. Diese Daten können als ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion des Proteins mit Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase bzw. dessen Formationen in Superkomplexen verwendet werden. Aim38, das bereits erwähnte zweite Protein der HIG-1 related Proteinfamilie, zeigt in den Daten von Helbig et al. einen kongruenten Verlauf zu Aim31 und Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase.

3.9.2 Phänotypisierung von $\Delta aim31$

Das Protein Aim31 war bislang weitgehend uncharakterisiert. Zur Wachstums-Phänotypisierung der $\Delta aim31$ -Mutante wurden drei unterschiedliche experimentelle Ansätze verwendet: Tüpfel-Test, Wachstum auf einem nicht-fermentierbaren Lactat-Medium und Wachstum nach Diauxie-Shift (2.4.2). In Abwesenheit von Glukose ist für Hefezellen eine funktionsfähige mitochondriale Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung obligat. Dementsprechend kann das Wachstum auf einem Lactat-haltigen Medium als Anhaltspunkt für die Effizienz dieser Form der Energiegewinnung gewertet werden. In Abbildung 18 wird ersichtlich, dass, unabhängig von der Wachstumstemperatur, die Deletionsmutante $\Delta aim31$ ein deutlich vermindertes Wachstum auf einem Lactat-Medium aufweist. In Anwesenheit von Glukose (YPD) ist dieser Unterschied nicht vorhanden oder nur minimal ausgeprägt.

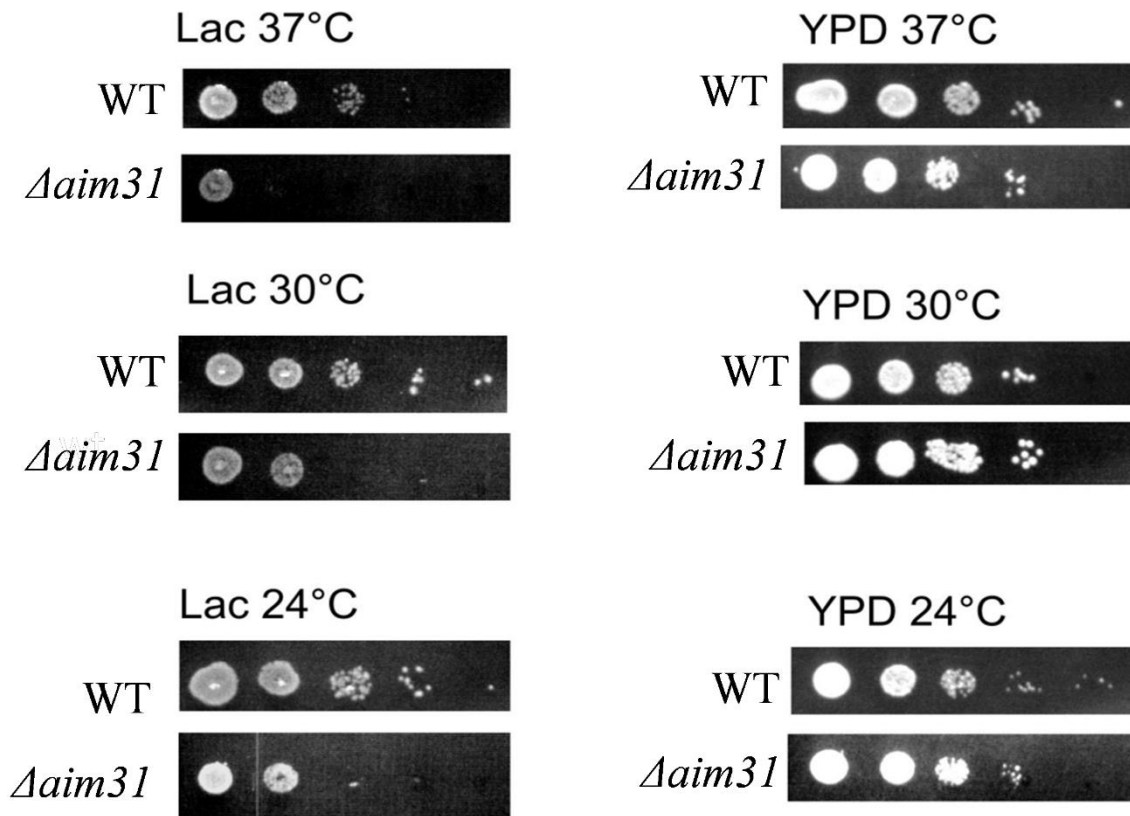


Abbildung 18 - Eingeschränktes Wachstum der $\Delta aim31$ -Mutante auf nicht-fermentierbarem Medium

„Tüpfel-Test“ bei verschiedenen Wachstumstemperaturen für den Wildtyp YPH499 im Vergleich zur Deletionsmutante $\Delta aim31$; je auf Lactat-Medium und YPD-Medium. Die Platten wurden unter Weißlicht nach 3 Tagen abfotografiert.

Aim31 scheint also für eine funktionierende oxidative Phosphorylierung von Bedeutung zu sein. Ergänzend zum „Tüpfel-Test“ wurde eine Wachstumskurve des Wildtyps und der Deletionsmutante aufgenommen. In Abbildung 19 ist der Verlauf der optischen Dichte (OD_{600}) der in einem Lactat-Medium kultivierten $\Delta aim31$ -Kultur im Vergleich zum Wildtyp gezeigt. Beide Kulturen wurden ab einer Start- OD_{600} von entweder 0,2 (A) oder 0,4 (B) beobachtet.

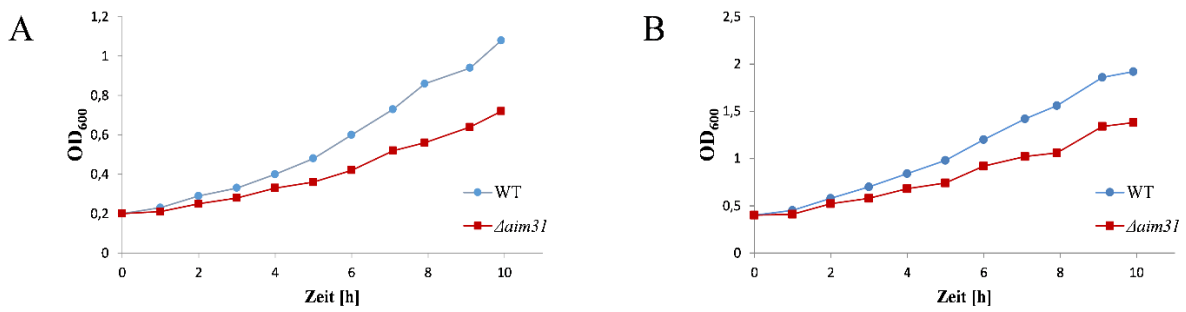
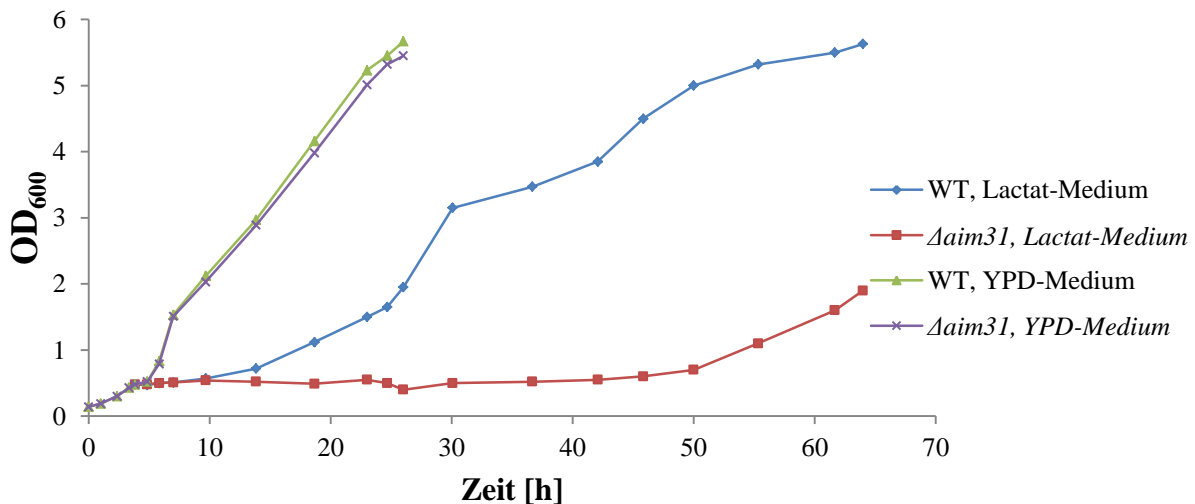


Abbildung 19 - Verlangsamtes Wachstum der $\Delta aim31$ -Mutante in der Flüssig-Lactat-Kultur

Wachstumskurve auf Lactat-Medium mit Start-OD 0,2 (A) und Start-OD 0,4 (B)

In beiden Graphen wird deutlich, dass die Mutante ein deutlich verlangsamtetes Wachstum in Lactatmedium aufweist. Bei einer Start-OD von 0,2 konnte für den Wildtyp eine Verdopplungszeit von 245 min ermittelt werden, wohingegen die Deletionsmutante $\Delta aim31$ 322 min für eine Verdopplung der Zellzahl benötigte. Ähnliche Ergebnisse lieferte der Ansatz mit einer Start-OD von 0,4 (Verdopplungszeit wt: 262 min vs. $\Delta aim31$: 333 min). Die Wachstumskurve bestätigt damit die Beobachtungen des Tüpfel-Tests. Nach zunächst qualitativen Beobachtungen, dass der Stamm $\Delta aim31$ besonders nach vorherigem Wachstum auf einem glukosehaltigen Medium ein schlechtes bzw. deutlich verzögertes Anwachsen (bis zu mehreren Tagen) auf einem nicht-fermentierbaren Medium zeigt, wurde zur quantitativen Analyse eine Wachstumskurve nach Diauxie-Shift durch Mediumwechsel von YPD auf Lactat angefertigt. Abbildung 20 zeigt den Verlauf der optischen Dichte in zunächst Glukose- und anschließend Lactat-haltigem Medium. Nach initialem Wachstum auf zuckerhaltigem Medium wurde ein Teil der Kulturen in ein Lactat-Medium gewechselt (2.4.1).



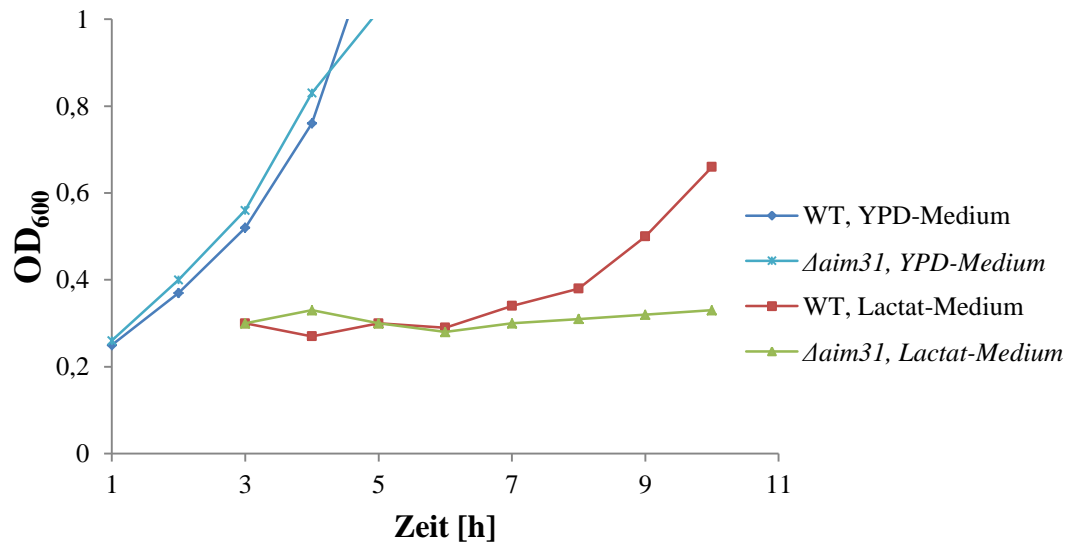


Abbildung 20 - Verzögertes Zellwachstum der Deletionsmutante $\Delta aim31$ nach Diauxie-Shift

Wachstumskurve in YPD und nach Wechsel auf ein Lactat-Medium. Die Zellen wurden zum Wechsel mehrfach gewaschen. Der Wildtyp-Stamm wächst nach einem kurzen Wachstumsarrest wieder an, bei der Deletionsmutante $\Delta aim31$ ist dieses Intervall deutlich prolongiert. Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente.

Beide Stämme zeigen bei Wachstum in einem YPD-Medium ein zunächst gleiches Wachstumsverhalten (Wildtyp-Verdopplungszeit wt 122 min; $\Delta aim31$ -Verdopplungszeit $\Delta aim31$: 121 min). Die Lag-Phase bestand im Wildtyp aus einem Intervall von ca. 6 h. Im Deletionsstamm hingegen war ein Ansteigen der Zelldichte erst 38 h nach Mediumwechsel zu registrieren. Im Anschluss an die Lag-Phase war das Wachstum von beiden Kulturen langsamer als in den vorherigen Wachstumstests (siehe oben), aber weiterhin deutlich verschieden (Wildtyp-Verdopplungszeit: 496 min; $\Delta aim31$ -Verdopplungszeit: 583 min).

Aim31 scheint also auch bei der Umstellung auf oxidative Energiegewinnung eine entscheidende Rolle zu spielen. Möglicherweise besitzt das Protein eine Funktion für die Expressionsveränderungen, Assemblierung oder Aktivität von Komponenten der Atmungskette, die auf respiratorischem Medium benötigt werden. Ob der Effekt nach Induktion des Diauxie-Shift nur eine Verstärkung des Wachstumsphänotyps darstellt oder auf eine besondere funktionelle Komponente in der zellulären Antwort auf die metabolische Veränderung darstellt, lässt sich durch dieses Experiment alleine nicht klären.

3.9.3 Veränderungen der Enzymaktivität von Atmungskettenkomplexen in $\Delta aim31$

Der Wachstumsphänotyp legt eine Einschränkung der mitochondrialen Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung nahe. Um dies weiter zu analysieren, wurden die Aktivitäten der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III; 2.1.10) und der Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV; 2.1.9) gemessen. Es konnte eine selektive Reduktion der Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität festgestellt werden. Diese ist im $\Delta aim31$ -Stamm im Vergleich zum Wildtyp um fast 50% reduziert (Abbildung 21). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Aktivität der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidase nicht zwischen Wildtyp und $\Delta aim31$.

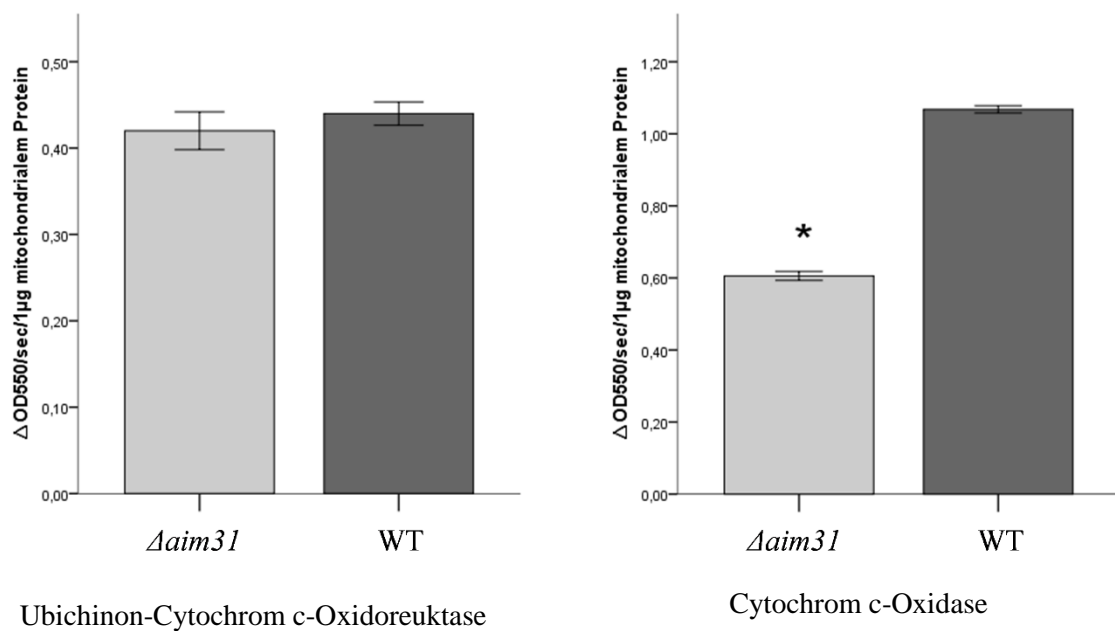


Abbildung 21 - Selektive Verringerung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität

Die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase ist in der Deletionsmutante $\Delta aim31$ auf fast die Hälfte (62%) der Wildtyp-Aktivität reduziert. Die Messung der Aktivität der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase zeigt keine signifikanten Unterschiede. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen. * $p < 0,05$

Die Verminderung der enzymatischen Aktivität kann sowohl durch eine geringere Enzymkonzentration, als auch durch eine eingeschränkte Funktion (beispielsweise durch unvollständige Assemblierung) des vorliegenden Enzyms zustande kommen. Trotz einer örtlichen Nähe und Komigration zu Komplex III im Superkomplex scheint das Fehlen von Aim31 dennoch funktionell ausschließlich die Cytochrom c-Oxidase in ihrer Aktivität zu mindern.

3.9.4 Topologieanalyse von Aim31

Zur Topologieanalyse wurden isolierte Mitochondrien (2.4.4) unter verschiedenen Bedingungen mit einer Protease behandelt (2.4.5) und eine Carbonat-Extraktion (2.4.6) durchgeführt. In unbehandelten Mitochondrien bleiben die Signale sowohl von Außenmembranproteinen (TOM70) und Innenmembranproteinen (Aac1) als auch von Matrixproteinen (Hep1) erhalten. Bei Protease-Zusatz werden ungeschützte Außenmembranproteine abgebaut. Dementsprechend kann Tom70 nach Protease-Verdau nicht länger dekoriert werden. Bei vorherigem hypotonen Schwellen und folgender Protease-Behandlung werden Innenmembranproteine verdaut (Aac1). Matrixproteine werden bei keinem der Ansätze abgebaut (Hep1). Das Verhalten von Aim31 entspricht einem Innenmembran-Protein (s. Abbildung 22). Integrale Membranproteine (Tom70, Aac1) werden durch Natriumcarbonat nicht von Membranen getrennt. Lösliche Matrixproteine (Hep1) hingegen zeigen nach Behandlung einen Übergang in die lösliche Phase. Aim31 zeigt wie die integralen Membranproteine Tom70 und Aac1 nach Natrium-Carbonat ein Verbleiben in Membranabschnitten und ist somit als integrales Innenmembranprotein anzusehen.

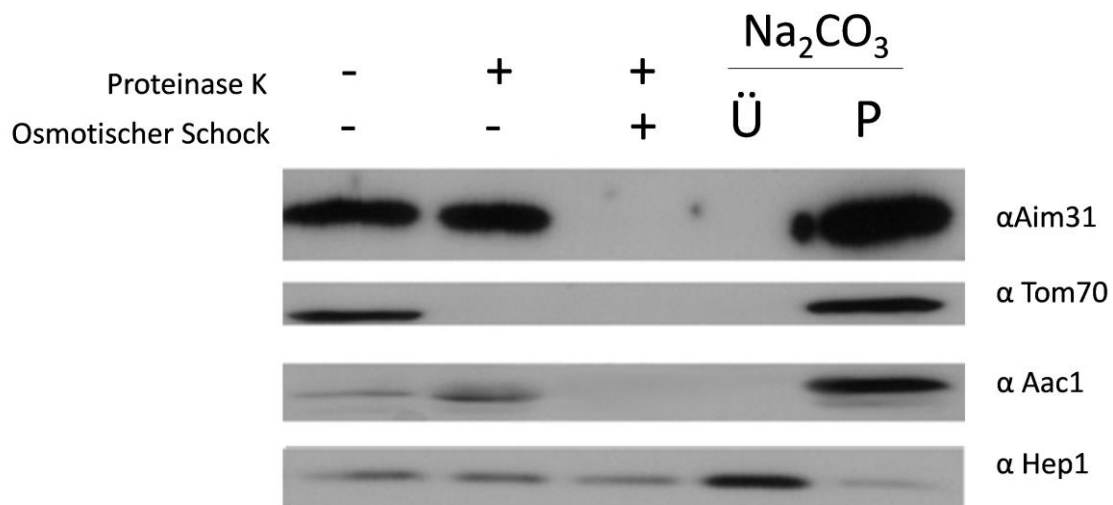


Abbildung 22 - Aim31 ist ein integrales Membranprotein der Innenmembran

Links: Protease Behandlung von Mitochondrien und Mitoplasten; rechts: Natrium-Carbonat Extraktion; P, Pellet; Ü, Überstand; Nach osmotischem Schock wird Aim31 der Protease zugänglich und verbleibt bei der Natrium-Carbonat-Extraktion im Pellet.

Dieses Ergebnis lässt sich auch mit dem Gradienten-Verlauf des Proteins Aim31 aus der SILAC-Analyse vereinbaren. Dieser zeigt mit einem steilen Maximum in Fraktion 13 den typischen Verlauf eines Innenmembranproteins (Abbildung 23, zum Vergleich Tim50). In Zusammenschau von SILAC-Daten des vorliegenden Experimentes und den Vorhersage-

Ergebnissen durch Simulations-Algorithmen (3.1.1) ist die in Abbildung 23 gezeigte Proteintopologie wahrscheinlich.

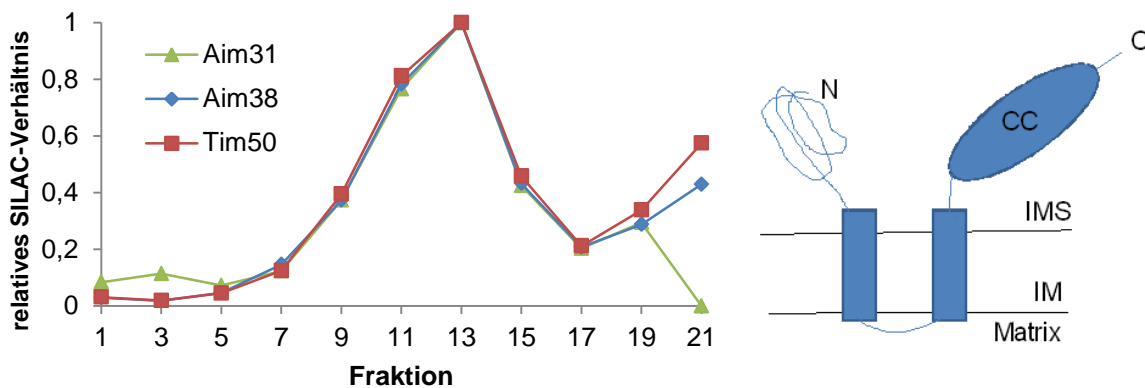


Abbildung 23 – Mitochondriale Topologie des Proteins Aim31

Links: Vergleich der SILAC-Profile von Aim31, Aim38 und Tim21. Sowohl Aim31 als auch das Homolog Aim38 verhalten sich wie das Innenmembranprotein Tim21.

Rechts: Lokalisation und Orientierung des Proteins Aim31 in der mitochondrialen Innenmembran; IMS = Intermembranraum (engl. intermembrane space); IM, Innere Mitochondrienmembran; Matrix, mitochondriale Matrix; N, N-Terminus des Proteins; C, C-Terminus des Proteins; CC, Coiled-Coiled-Domäne

3.9.5 Analyse von möglichen Interaktionspartnern

Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Aim31 die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase beeinträchtigt (3.9.3). Dies legt nahe, dass das Protein möglicherweise mit Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase interagiert oder sogar eine Untereinheit der Cytochrom c-Oxidase darstellt. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine Affinitätschromatographie mittels Histidyl-getagtem, Plasmid-codiertem Aim31 durchgeführt (2.1.7; 2.2.11). Sowohl N- als auch C-terminal Histidyl-getagtes Aim31 bindet gut an die Ni-NTA-Beads. Bei der N-terminalen Markierung ist eine prominente Abbau-Bande erkennbar (vgl. Abbildung 24). Mit Aim31 können Cox2, Cox3, Cox4 und Cyt1 kopräzipitiert werden. Als Negativkontrollen diente das Protein Tim17. Mit der N-terminalen His-Markierung scheint die Aufreinigung des Proteins Aim31 ähnlich effizient, jedoch werden deutlich weniger Interaktionspartner kopräzipitiert. Eine mögliche Erklärung ist, dass der N-terminale His-Tag die Interaktion mit anderen Proteinen verändert und so mögliche Komplexe zerfallen. Im Hinblick auf die Konservierung könnte es plausibel erscheinen, dass der konservierte N-terminale Proteinabschnitt für die Interaktion und Funktion des Proteins am wichtigsten ist und so eine C-terminale Proteinmodifikation zur Aufreinigung des Komplexes die besseren Ergebnisse liefert.

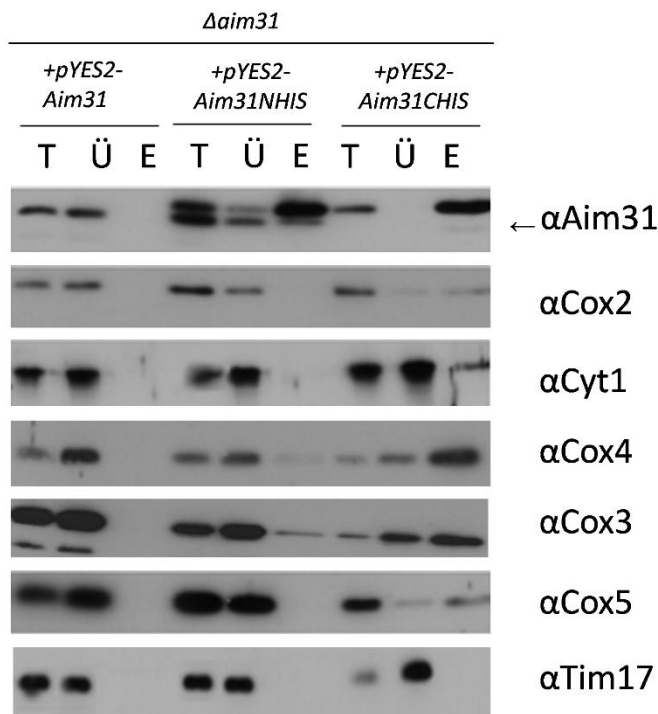


Abbildung 24 - Aim31 kopräzipitiert mit Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase

Affinitätschromatographie durch Histidyl-getagtes Aim31. Es können selektiv sowohl Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase als auch Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase koeluiert werden. Das Innenmembranprotein Tim17 interagiert nicht mit Aim31.

→ proteolytisches Abbauprodukt des Histidyl-Tags; **T**, 10% der lysierten Mitochondrien; **Ü**, 10% des Überstands nach Inkubation mit der Ni-NTA-Agarose; **E**, 50% des Eluats

Aufgrund fehlender zur Verfügung stehender Antikörper wurde eine massenspektrometrische Analyse der Elutionsfraktion einer weiteren Koreinigung mit Histidyl-getagtem Aim31 und einer Wildtyp-Kultur zur Kontrolle durchgeführt. Um eine möglichst physiologische Konzentration von Aim31 in den Hefezellen zu erhalten, wurde hierfür ein C-terminaler, chromosomaler His-Tag benutzt (2.2.12), welcher der Kontrolle des endogenen Promotors unterliegt. Dies konnte durchgeführt werden, weil die C-terminale Aufreinigung bezogen auf die Interaktionspartner deutlich effizienter war (s. oben). Die beiden Elutionsfraktionen (Aim31-His und WT) wurden Coomassie-Blau gefärbt (2.1.5) und anschließend die Aim31-His-spezifischen Protein-Banden und die korrespondierenden Gel-Abschnitte in der Wildtyp-Fraktion ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (2.1.11, Abbildung 25). Neben Aim31 konnten viele Proteine selektiv in Histidyl-getagten Mitochondrien identifiziert werden. Neben vielen Cytochrom c-Oxidase-Untereinheiten (Cox 2, 6, 12,13,14, 23) und Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Untereinheiten (Qcr8, Rip1, Cyt1) legt das Experiment auch weitere mögliche Interaktionspartner für das Protein Aim31 nahe. So konnten einige Assemblierungs-Faktoren (Pet100, Cox23), ribosomale Proteine (Mnp1, Mrp58), die MICOS-Untereinheit Mic10 und die beiden bisher nicht charakterisierten Proteine YDR286C und YHR199C zusammen mit Aim31 aufgereinigt werden. Die massenspektrometrische Auswertung bestätigt die Ergebnisse aus der erst beschriebenen

Affinitätschromatographie: Aim31 scheint mit Proteinen der Cytochrom c-Oxidase und deren Ko- und Assemblierungsfaktoren zu interagieren.

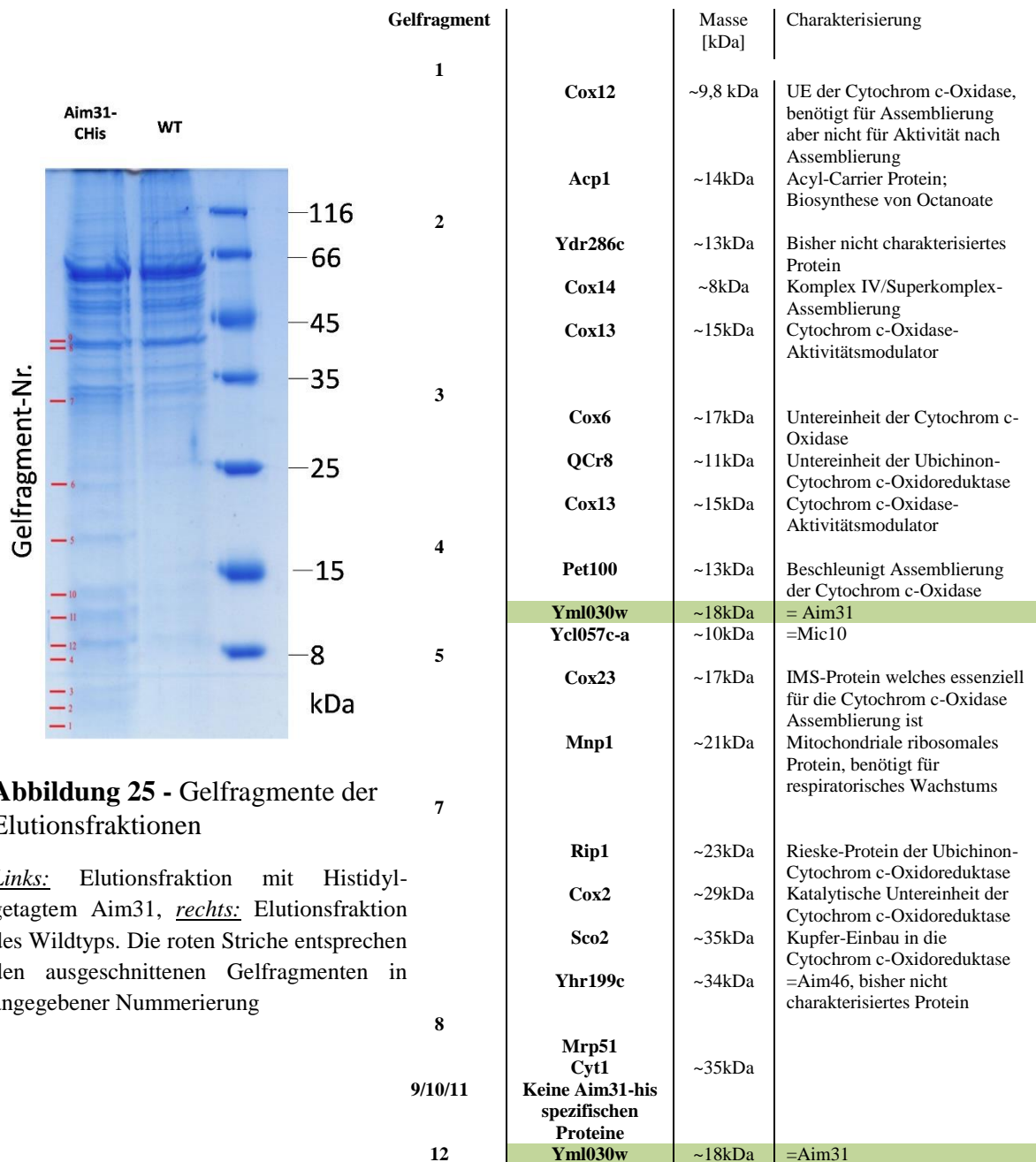


Abbildung 25 - Gelfragmente der Elutionsfraktionen

Links: Elutionsfraktion mit Histidyl-getagtem Aim31, rechts: Elutionsfraktion des Wildtyps. Die roten Striche entsprechen den ausgeschnittenen Gelfragmenten in angegebener Nummerierung

Tabelle 9 – selektive Proteinidentifikation in der Elutionsfraktion von Histidyl-getagtem Aim31

3.9.6 Veränderungen im Expressionsmuster in der $\Delta aim31$ Deletionsmutante

Um zu untersuchen, in welcher Weise sich die Expressionslevel von Proteinen zwischen $\Delta aim31$ und dem WT unterscheiden, wurde die Proteinkonzentration in isolierten Mitochondrien untersucht. Als Kontrollen dienten die Proteine Tom70 und Aconitase, die nach Quantifizierung der Banden keine signifikanten Unterschiede in ihrer Proteinkonzentration zeigten. Wie zu erwarten, kann das Protein Aim31 im Deletionsstamm nicht detektiert werden. Die meisten Untereinheiten des Cytochrom c-Oxidase-Komplexes sowie Cyt1 zeigten keine nennenswerten Konzentrationsunterschiede in beiden Hefe-Stämmen. Einzig eine Verringerung der Aac1-Konzentration in der Deletionsmutante ist nennenswert (s. Abbildung 26). Nach Bandenquantifizierung konnte eine Signalreduktion auf 55,9 +/- 5,3% des Wildtyps beobachtet werden ($p < 0.05$). Die Bandenintensität von Cox4 und Aco1 in $\Delta aim31$ unterschieden sich nicht signifikant von den Wildtypsignalen (Cox4: 102,4 +/- 5,9% des WT-Signals; Aco 104,6 +/- 4,9% des WT-Signals).

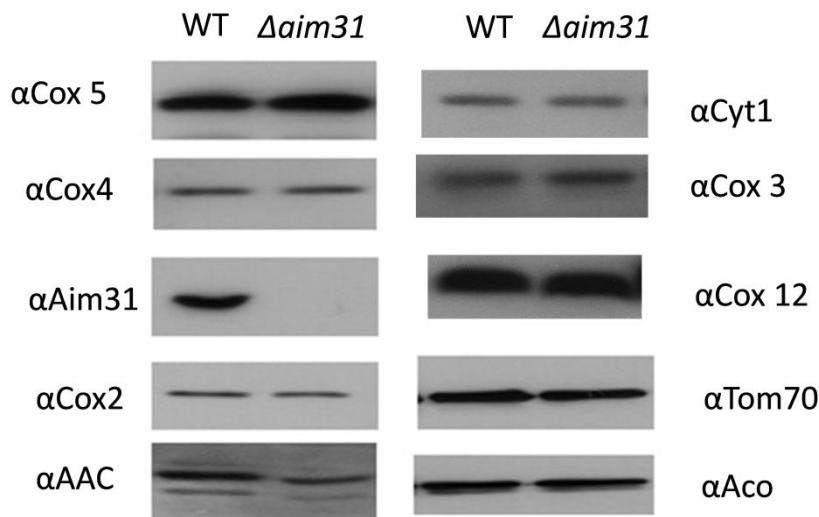


Abbildung 26 - Das Fehlen von Aim31 verändert die Expressionslevel der Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase nicht

Die Konzentration von Aac1 ist im Deletionsstamm deutlich reduziert. Für die Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase und Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase können keine Konzentrationsunterschiede festgestellt werden.

Die Verringerung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität lässt sich somit nicht mit einer geringeren Konzentration an Cytochrom c-Oxidase-Untereinheiten erklären. Vielmehr scheint die katalytische Effizienz reduziert.

3.9.7 Veränderungen der Atmungskettenkomplexassemblierung in der $\Delta aim31$

Deletionsmutante

Die Assoziation von Aim31 mit Superkomplexen macht eine funktionelle Rolle des Proteins in der Komplexbildung wahrscheinlich. Mit Blau-Nativ-Gelen (2.1.4) sollte untersucht werden, inwieweit die Deletionsmutante sich in ihrer Ausprägung und Konzentration von Superkomplexen im Vergleich zum Wildtyp unterscheidet. In $\Delta aim31$ -Mitochondrien ist die Konzentration an Superkomplexen im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Vor allem der Komplex V_1III_2 scheint im Vergleich zum Wildtyp in deutlich geringerer Konzentration vorhanden zu sein. Dies lässt sich sowohl in der Immundekoration mit Cox2 als auch Cyt1 nachvollziehen. Darüber hinaus lassen sich mit einem gegen einen aufgereinigten Cytochrom c-Oxidase-Komplex hergestellten Antikörper einige zusätzliche Banden der intermediären Größe in der Deletionsmutante nachweisen, welche nicht im Wildtyp nachzuweisen sind (Abbildung 27, Pfeile).

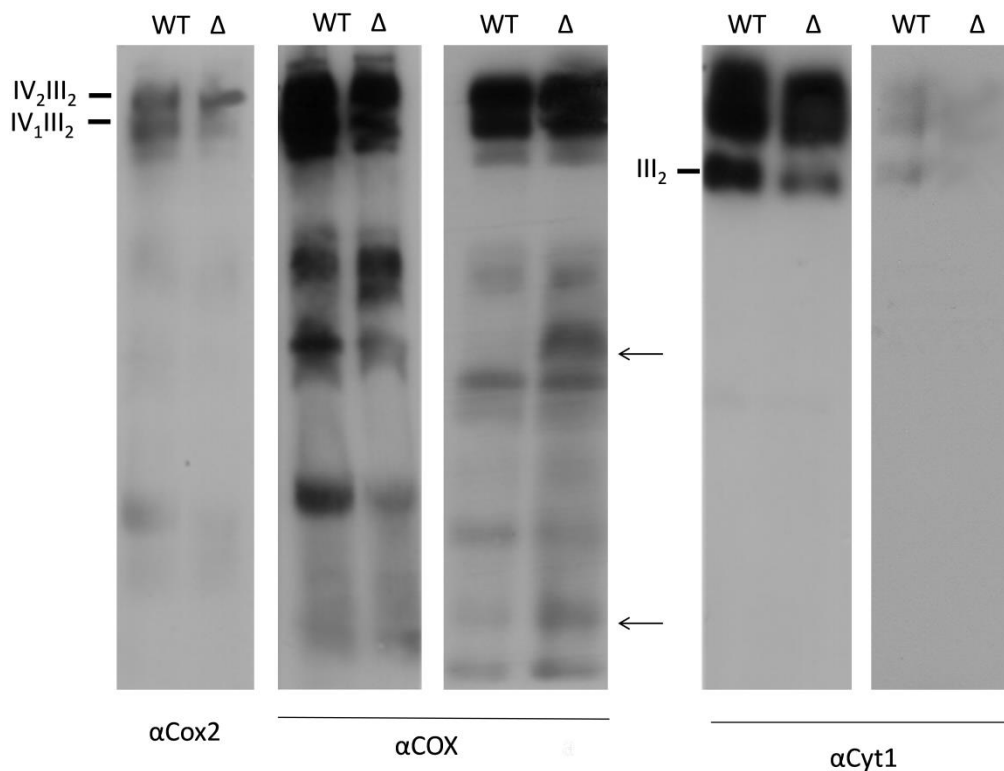


Abbildung 27 - Das Fehlen von Aim31 mindert die Konzentration an Superkomplexen der Cytochrom-C-Oxidase und Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidase

III_2 , Dimer der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidase; IV_2III_2 und IV_1III_1 , Superkomplexe der Cytochrom c-Oxidase und Ubichinon-Cytochrom c-Oxidase; αCOX , gegen aufgereinigte Cytochrom c-Oxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* gerichteter polyvalenter Antikörper; \rightarrow , Auftreten von Assemblierungsintermediaten

Aim31 ist für die Bildung von Superkomplexen der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase und Cytochrom c-Oxidase von Bedeutung. Ein Fehlen von Aim31 scheint darüber hinaus die Konzentration einiger Assemblierungsintermediate zu erhöhen, welches auf eine essentielle Funktion des Proteins für eine höhermolekulare Oligomerisierung hindeutet.

4 Diskussion

4.1 Evidenz für spezifische Proteinlokalisationen innerhalb der Innenmembran

Die Innenmembran von Mitochondrien ist als die proteinreichste Phospholipid-Doppelmembran in lebenden Organismen charakterisiert (Simbeni et al., 1991). Die abundantesten Proteinen sind die Enzymkomplexe, welche an der aeroben Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung beteiligt sind (Schwerzmann et al., 1986). Trotz ihrer Kontinuität scheint die innere Mitochondrienmembran in unterschiedliche Subkompartimente organisiert: innere Grenzmembran, Cristamembran und Übergangsbereiche (Crista junctions, s. auch 1.1.3). Erste Analysen durch Elektronenmikroskopie und Fraktionierung von mitochondrialen Membranvesikeln konnten Erkenntnisse über die unterschiedliche Differenzierung der inneren Mitochondrienmembran erbringen (Santiago et al., 1968; Werner and Neupert, 1972; Vazquez et al., 1968; Burstein et al., 1971). Mit den damaligen Methoden der Proteinidentifikation konnten die entstandenen Vesikel allerdings nur schwerlich mit dem jeweiligen Ursprungsfragment aus intakten Mitochondrien korreliert werden (Ohlendieck et al., 1986; Werner and Neupert, 1972). Schon früh wurde angenommen, dass die Sublokalisierung von Proteinen ihrer Funktion entspricht. Dies würde die präferenzielle Anreicherung in entweder der Cristamembran oder der inneren Grenzmembran erklären. So sind für die während des Imports in engen Kontakt tretenden TIM- und TOM-Komplexe eine präferenzielle Lokalisation in der inneren Grenzmembran nahegelegt worden (Schwaiger et al., 1987; Rassow et al., 1989). Eine ähnliche dominante Lokalisation in der inneren Grenzmembran wurde für Transport-Proteine (Dolder et al., 2001) und für Proteine mit Beteiligung an Fusions- und Teilungsprozessen vorgeschlagen (Okamoto and Shaw, 2005). Gilkerson und Kollegen konnten zeigen, dass Atmungskettenkomplexe und die ATP-Synthase hingegen mit einem relativen Konzentrationsverhältnis von etwa 2,5 vornehmlich in den Cristamembranen lokalisiert sind (Gilkerson et al., 2003). Diese Verteilung könnte nach den Interpretationen von Frey und Song et al. die chemiosmotische Kopplung durch

Kompartimentierung, Diffusionsbarrieren und Oberflächenvergrößerung begünstigen (Frey et al., 2002; Song et al., 2013).

Weitere technische Fortschritte in den Gebieten der Konfokal-Mikroskopie (Wurm and Jakobs, 2006; Stoldt et al., 2012) und Immuno-Gold-Elektronenmikroskopie (Suppanz et al., 2009; Vogel et al., 2006) sowie eine Weiterentwicklung der mitochondrialen Subfraktionierungs-Methode (Sato et al., 2003; Hovius et al., 1990) lieferten in den vergangenen Jahren neue Erkenntnisse über die spezifischen Verteilungen des Innenmembranproteoms. Selbige Ergebnisse sollen im Folgenden mit den Resultaten der präsentierten SILAC-Analyse verglichen und ein Modell über die spezifische Verteilung von Proteinen über die Abschnitte der inneren Mitochondrienmembran erarbeitet werden.

Zunächst werden einige theoretische Überlegungen bezüglich der Interpretation von SILAC-Profilen aus der mitochondrialen Subfraktionierung vorangestellt. Die beschriebenen SILAC-Profile von Innenmembranproteinen sind zum einen relativ homogen, zum anderen hoch spezifisch für die Innenmembran. Ausnahmen von als Innenmembranproteine charakterisierten Proteinen mit einem Innenmembran-untypischen Profil sind selten (vgl. 3.3, Mgm1, Afg1, Nuc1), aber können mit deren strukturellen und funktionellen Eigenschaften erklärt werden. Umgekehrt wiesen keine Proteine mit einer sicher anderen Lokalisation ein Innenmembran-typisches Profil auf. Trotz der Homogenität lassen sich untereinander abweichende Nuancen mit unterschiedlichen Maxima in den Fraktionen 11 und 13 feststellen. Diese unterschiedlichen Maxima können durch unterschiedliche Lokalisation in der Innenmembran erklärt werden. Ein Protein, welches vornehmlich in Cristamembranen lokalisiert ist, findet sich ausschließlich in ‚reinen‘ Innenmembran-Vesikeln (Abbildung 28C, blaue Rechtecke und Sanduhren). Proteine, welche vornehmlich in der inneren Grenzmembran lokalisiert sind, finden sich sowohl in ‚reinen‘ Innenmembranvesikeln als auch in Vesikeln, bei denen Außenmembran- und Innenmembran Kontakt halten (sog. intermediäre Dichte, Abbildung 28A, grüne Säulen). Proteine, die eine sehr hohe relative Dichte in Bereichen von Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran haben, zeigen einen hohen Grad an Assoziation mit Vesikeln bestehend aus Innen- und Außenmembran, ohne eine hohe Abundanz in ‚reinen‘ Innenmembranvesikeln aufzuweisen (Abbildung 28B, türkise Säule). Die relative Häufigkeit in den unterschiedlichen Vesikel lässt sich so den SILAC-Profilen von Proteinen zuordnen. Die schematische Darstellung ist überzeichnet und in den SILAC-Profilen sind keine Daten zum relativen Oberflächenanteil von Cristamembran zu innerer Grenzmembran

implementiert. Diese beträgt im Schnitt 1,5:1, kann jedoch erheblich variieren (Vogel et al., 2006). Dennoch können unterschiedliche SILAC-Profile präferenziellen Lokalisationen entsprechen und das Beispiel des MICOS-Komplexes (s. 4.2) bestätigt, dass gleiche Anreicherungen in Innenmembransubkompartimenten sogar zur Identifikation von Komplexen und einer Funktionsvorhersage in diesen Membranabschnitten genügen können.

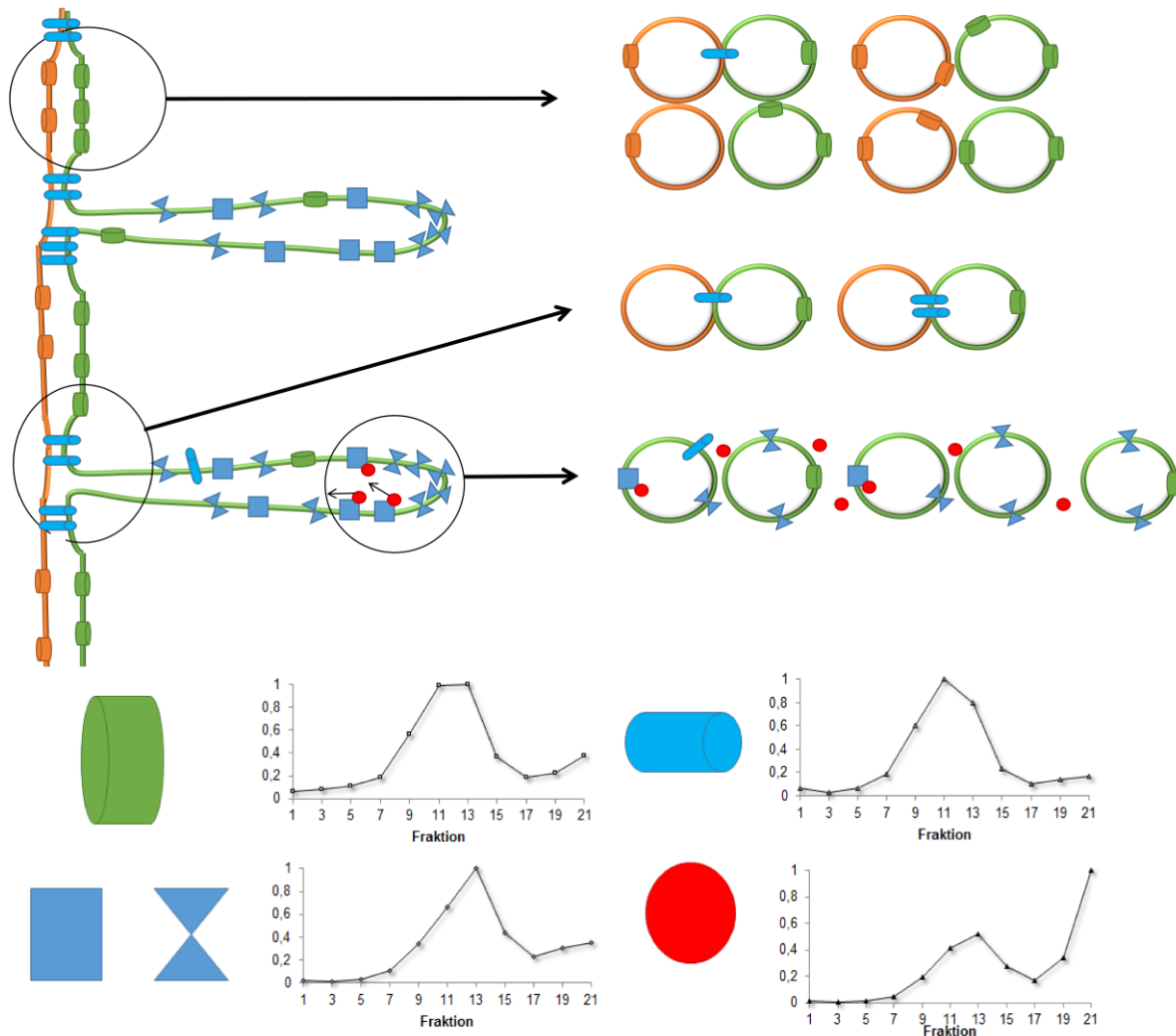


Abbildung 28 – Schematische Darstellung der Subkompartimentierung der mitochondrialen Innenmembran: Zusammenhang zwischen Vesikelgenerierung und SILAC-Profil

In **grün** ist ein Innenmembranprotein mit präferenzieller Anreicherung in der Grenzmembran dargestellt. In **blau** sind Cristamembran-dominante Proteine abgebildet und in **türkis** Proteine mit starker Anreicherung im Bereich von mitochondrialen Kontaktstellen (schematisch beide Membranen durchspannend). In **rot** ist beispielhaft ein mit Cristamembran-dominanten Proteinen assoziierendes Protein gezeigt, welches zum Teil durch die experimentellen Bedingungen dissoziiert und so neben einer teilweise erhaltenden Membranassoziation sich auch stark in den löslichen Gradientenfraktionen (19 und 21) anreichert.

A, Vesikel entstanden aus der inneren Grenzmembran bestehend aus reinen Außen- und Innenmembranvesikeln, sowie Kontakt-haltenden Vesikeln aus Innen- und Außenmembran (,Intermediäre Dichte'); **B**, Typische Vesikelgenerierung im Bereich von Kontaktstellen der inneren und äußeren Membran vornehmlich bestehend aus Vesikeln sowohl von Innen- als auch Außenmembran; **C**, entstehende Membranvesikel in Abschnitten von Cristamembranen aus ,reinen' Innenmembrananteilen. Weitere Erläuterung s. Fließtext.

Viele Studien konnten zeigen, dass Proteine der oxidativen Phosphorylierung präferenziell in Cristamembranen lokalisiert sind (Gilkerson et al., 2003; Ohlendieck et al., 1986; Perotti et al., 1983; Vogel et al., 2006; Wilkens et al., 2013; Wurm and Jakobs, 2006). Im Besonderen konnte eine homogene Verteilung der Komplexe I, III und IV über die gesamte Cristamembran gezeigt werden, wohingegen diese nur in geringen Konzentrationen in den inneren Grenzmembranen vorlagen (Wilkens et al., 2013). Der Komplex II ist das einzige Atmungskettenenzym, welches eine Anreicherung im Bereich von Crista junctions, also dem Übergangsbereich zwischen Cristamembran und innerer Grenzmembran, aufweist (Wilkens et al., 2013). Dies steht in Einklang mit zwei weiteren Studien, in denen ein großer Anteil der Enzymaktivität der Succinat-Dehydrogenase in der inneren Grenzmembran detektiert werden konnte (Kalina et al., 1969; Bertoni-Freddari et al., 2001). In der vorliegenden SILAC-Analyse zeigen die Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase ein homogenes Gradienten-Profil. Der Komplex scheint stabil und gemäß der oben dargelegten Interpretation zu relativ gleichen Anteilen in den ‚reinen‘ Innenmembranvesikeln und inneren Grenzmembran-Vesikeln (mit Außenmembrananteilen) vorhanden zu sein. Gemäß der unterschiedlichen Oberfläche ist die relative Dichte der Proteine im Bereich der inneren Grenzmembran größer, die Dichte in ‚reinen‘ Innenmembranvesikeln und damit in Cristamembranen hingegen kleiner. Die Ergebnisse sind also mit den bisherigen Lokalisationsstudien des Enzyms vereinbar. Die Succinat-Dehydrogenase ist ein sowohl am Citratzyklus als auch der oxidativen Phosphorylierung beteiligtes Protein. Es wurde vorgeschlagen, dass gemäß der fehlenden Protonen-pumpenden Eigenschaft von Komplex II die fehlende Anreicherung in den Cristamembranen keinen energetischen Nachteil nach sich zieht, das Enzym als Bestandteil des Citratzyklus aber gleichermaßen in engem Kontakt zu den Metaboliten transportierenden Proteinen der inneren Grenzmembran steht (Wilkens et al., 2013). Gegen diese Hypothese wiederum spricht, dass andere Membran-assoziierte Enzyme des Citratzyklus eine relative Anreicherung in Cristamembranen aufweisen (vgl. α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, 3.3). Die Untereinheiten der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase und Cytochrom c-Oxidase zeigen sehr unterschiedliche SILAC-Profile mit zusätzlicher Dissoziation von nicht fest membrangebundener Untereinheiten. Es findet sich keine homogene Anreicherung in reinen Innenmembranvesikeln. Es lässt sich mutmaßen, dass bei Zerfallen der monomeren Proteinstruktur auch keine höher-oligomere Organisation dieser beiden Enzyme mehr vorliegt. Genau diese höher-oligomere Struktur wurde als treibender Motor und Mechanismus für die Aufrechterhaltung von unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in den Subkompartimenten vorgeschlagen (sog. ‚Trapping‘) (Wilkens

et al., 2013; Vogel et al., 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Assemblierungsintermediate, im Gegensatz zu vollständig assemblierten Komplexen, vornehmlich in der inneren Grenzmembran zu finden sind (Vogel et al., 2006). Insgesamt lassen sich für die Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase und Cytochrom c-Oxidase keine Aussagen bezüglich einer Anreicherung in spezifischen Innenmembranabschnitten *in vivo* machen, da die Komplexe unter den experimentellen Bedingungen offensichtlich instabil sind und sowohl ihre monomere als auch höher-oligomere Organisation verloren haben. In Anbetracht bisher publizierter Daten könnte der Verlauf der SILAC-Profile von Atmungskettenkomplex III- und IV-Untereinheiten am ehesten die unterschiedlichen Dissoziationsgrade von Untereinheiten widerspiegeln. Vollständige Enzyme verbleiben in der Cristamembran, wohingegen dissoziierte Enzymkomplexe, ähnlich den Assemblierungsintermediaten, retrograd durch laterale Diffusion zurück in die innere Grenzmembran translozieren. Das Ausmaß der durch die experimentell herbeigeführte Dissoziation einzelner Untereinheiten ist unterschiedlich und hängt unter anderem vom Grad der Membranassoziation ab (vgl. Anzahl der Transmembrandomänen für das Muster IM-4, 3.3). Damit kann das insgesamt heterogene Bild der SILAC-Profile dieser Proteine erklärt werden.

Ähnlich eingeschränkte Aussagen sind über die Lokalisation der F_1F_0 -ATPase möglich. Auch diese scheint unter den zugrundeliegenden experimentellen Bedingungen zu zerfallen. So ist die F_1 -Untereinheit vornehmlich in löslichen Fraktionen des Saccharose-Gradienten zu finden, wohingegen die F_0 -Untereinheit zunächst überraschend eine relative Anreicherung im Bereich von Kontaktstellen der inneren und äußeren Membran bzw. Crista junctions aufweist (s. 3.3). Mehrfach wurde eine bevorzugte Lokalisation der F_1F_0 -ATPase-Dimere entlang der positiv gekrümmten Crista-Enden beobachtet und die Dimerisation scheint wiederum eine wichtige Determinante für die Crista-Architektur zu besitzen (Strauss et al., 2008; Rabl et al., 2009; Davies et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnten Wilkens et al. eine relativ homogene Verteilung der F_1F_0 -ATPase über die gesamte Cristamembran zeigen (Wilkens et al., 2013). Hierbei wurde von den Autoren allerdings nicht zwischen Monomer- und Dimer-Verteilung unterschieden. Die Dimerisierung ist bei Zerfall der einzelnen Untereinheiten unter den SILAC-Experimentbedingungen offensichtlich weitgehend aufgehoben. Die F_1F_0 -ATPase liegt also im Experiment vornehmlich als (teilweise dissoziiertes) Monomer vor. Für die weniger rigiden Monomere der F_1F_0 -ATPase wurde eine Anreicherung in negativ gekrümmten Crista junctions angenommen, welche wiederum den Fcj1-ähnlichen

Gradientenverlauf der F_0 -Untereinheit erklären könnte (Wilkens et al., 2013; Rabl et al., 2009).

Carrier-Proteine sind selektive Transportproteine für Metaboliten der sonst impermeablen Innenmembran (Monne et al., 2013; Palmieri, 1994). Viele detektierte Carrier-Proteine der Innenmembran zeigen einen typischen Verlauf im SILAC-Gradienten (siehe IM-4, 3.3). Das SILAC-Profil lässt eine starke Assoziation mit Vesikeln der inneren Grenzmembran vermuten. Carrier-Proteine sind anscheinend gemäß ihrer Funktion des Substrattransports präferenziell in den Innenmembranabschnitten lokalisiert, die in engem Kontakt zur Außenmembran stehen. Man könnte schlussfolgern, dass der hohe Anteil an Carrier-Proteinen in dieser Fraktion eine ihrer Funktion entsprechende Verteilung in unterschiedlichen Innenmembranabschnitten widerspiegelt. ATP wird über den ADP/ATP-Carrier (Aac) sowie dem Außenmembran Porin (VDAC1) in die Matrix exportiert. Viele Studien konnten zeigen, dass die beiden Proteine in Säugern über Oktamere der mitochondrialen Kreatinkinase in engem Kontakt zueinander stehen (Rojo et al., 1991a; Rojo et al., 1991b; Schlegel et al., 1990). Über diesen Kontakt müsste der ADP/ATP-Carrier und vermutlich auch andere Metaboliten-Carrier präferenziell in der inneren Grenzmembran lokalisiert sein. Dass das mitochondriale Porin speziell in Vesikeln mit sowohl Innen- als auch Außenmembrananteilen lokalisiert ist, wurde in der vorliegenden Analyse nicht bestätigt (3.5 vgl. VDAC1 vs. beispielsweise Tob55/Fzo1). Zum anderen konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass der ADP/ATP-Carrier als wichtige Struktur von Atmungsketten-Superkomplexen fungiert und diese wiederum primär in den Cristamembranen lokalisiert sind (Dienhart and Stuart, 2008). Die genaue Sublokalisierung von Carrier-Proteinen, und im Besonderen der ADP/ATP-Translokasen, bedarf weiterer Studien. Jedoch ist den vorliegenden Experimenten nach zu urteilen eine Anreicherung in der inneren Grenzmembran wahrscheinlich.

Mitochondriale DNA flottiert nicht frei in der mitochondrialen Matrix, sondern ist in DNA-Protein-Komplexen (sog. Nukleoide) organisiert (Gilkerson et al., 2013). Mitochondriale Nukleoide sind zum großen Teil an die Innenmembran gebunden (Hall et al., 1975; Albring et al., 1977; Echeverria et al., 1991), bestehen u.a. aus den teilweise direkt DNA-bindenden Proteinen Abf2, Mgm101, Rim1, Ilv5, Ald4, Kgd2, Hsp60, Lpd1, Aco1 (Kaufman et al., 2000), Yme2 (Park et al., 2006) und sind mit den Prohibitinen assoziiert (He et al., 2012). Viele dieser Proteine besitzen charakteristische SILAC-Profile, welche eine dominante Lokalisation in Cristamembranen vermuten lassen. Umgekehrt legen ähnliche SILAC-Profile

von bisher nicht näher charakterisierten Proteinen nahe, dass diese in örtlicher Nähe zu Nucleoiden lokalisiert sind. Auffällig ist, dass die meisten dieser Proteine Membran-Chaperone der Innenmembran darstellen und so die enge Assoziation mit Nucleoiden bzw. Ribosomen in einen funktionalen Zusammenhang stellen (s. 3.3). Weiterhin ist für das diesem Muster zugeordnete Protein Oms1 eine Nucleoid-assoziierte Lokalisation wahrscheinlich, da dieses Protein eine RNA-Methyltransferase darstellt (Szczepinska et al., 2014). Auch für das bisher als mitochondriales Protein charakterisierte Yor020w (Reinders et al., 2006) legt die SILAC-Analyse eine Nucleoid-Assoziation nahe. Zukünftige Studien sollten herausstellen, inwieweit auch dieses Protein eine Funktion im Bereich der Nucleoid-Bildung einnimmt.

Über welche Komponenten genau die Innenmembranassoziation der Nucleoide hergestellt wird, ist bislang nicht gänzlich geklärt. Allerdings konnte kürzlich für menschliche Mitochondrien nachgewiesen werden, dass das Membranlipid Cholesterol eine wichtige Funktion in der Verbindung einnimmt und Nucleoide an sog. Cholesterol-reichen Lipidflößen an die innere Mitochondrienmembran binden (Gerhold et al., 2015).

Neben Nucleoid-Proteinen wurde berichtet, dass mitochondriale Ribosomen im Kontakt zu mitochondrialer DNA lokalisiert sind (Bohne, 2014). Ribosomale Proteine sind darüber hinaus stark Membran-assoziiert (Pfeffer et al., 2015). Die mitochondrialen Ribosomen zeigen ein Nucleoid-typisches SILAC-Profil. Allerdings unterscheidet sich der Grad der Membranassoziation zwischen der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit. So legen die SILAC-Profile der ribosomalen Untereinheiten nahe, dass die große ribosomale Untereinheit deutlich stärker Innenmembran-assoziiert ist, als dies für die kleine ribosomale Untereinheit der Fall ist. Der Membrankontakt von Ribosomen wird zum einen über die 21S rRNA 96-ES1 und das am Ribosom-Ausgangstunnel lokalisierte Protein Mba1 hergestellt. Beide binden an die große Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen (Pfeffer et al., 2015; Ott et al., 2006) und können so die stärkere Membranassoziation der großen Untereinheit erklären.

Insgesamt legen die Beobachtungen nahe, dass mitochondrial translatierte Proteine gehäuft, aber nicht ausschließlich im Bereich von Cristamembranen in die Innenmembran inseriert werden und die mitochondriale DNA gehäuft in enger Assoziation zu Cristamembran und weniger im Bereich der inneren Grenzmembran vorliegt. Diese Erkenntnisse sind in Einklang mit den Ergebnissen von Vogel et al, welche ebenso eine relative Anreicherung von Ribosomen in Cristamembranen nachwiesen (Vogel et al., 2006; Watson, 1972). Die starke Dissoziation einzelner ribosomaler Untereinheiten könnte auch durch die Zugabe von EDTA während des Experimentes verstärkt werden, da Ribosomen in Anwesenheit von EDTA

zerfallen (Nolan and Arnstein, 1969; Rostom et al., 2000). Evidenz für eine Lokalisation von Nukleoiden an Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER (Mishra and Chan, 2014) konnte im vorliegenden SILAC-Datensatz nicht gefunden werden. Allerdings ist diese Lokalisation vornehmlich während der stattfindenden Mitochondrienteilung gezeigt worden (Murley et al., 2013)

Das an der Mitochondrienfusion beteiligte Protein Mgm1 zeigte in der SILAC-Analyse ein besonderes SILAC-Profil. Gemäß der dargelegten Detektion von Isoformen konnte eine vornehmliche Lokalisation im Intermembranraum mit einer Assoziation zur Außenmembran gezeigt werden (3.3). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Vogel et al, welche ebenso eine starke Anreicherung des Mgm1 im Kompartiment innere Grenzmembran/Außenmembran nachweisen konnten (Vogel et al., 2006). Mgm1 interagiert mit den Außenmembranproteinen Fzo1 und Ugo1 und bildet so transiente Kontaktstellen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran (Sesaki et al., 2003; Wong et al., 2003; Fritz et al., 2001). Dies bringt die vornehmliche Lokalisation im Bereich des Intermembranraums in einen funktionellen Zusammenhang und deckt sich mit der partiellen Anreicherung der Proteine Fzo1 und Ugo1 im Bereich der intermediären Dichte.

Neben den beobachteten, präferenziellen Sublokalisationen von Proteinen in der mitochondrialen Innenmembran gab es verschiedene Studien, welche zudem die Dynamik dieser Lokalisationen näher beleuchtet haben. So ist der Grad der Membranassoziation von ribosomalen Proteinen nicht statisch. Im Falle eines Translationsarrests ist für eine Subpopulation von Ribosomen eine Dissoziation von der Innenmembran beschrieben worden (Vogel et al., 2006). Eine ablaufende Translation scheint also für den über Mba1-hergestellten Membrankontakt wichtig. Dies steht in Einklang zu den Ergebnissen von Pfeffer et al, welche vermuteten lassen, dass Mba1 vornehmlich in Kontakt mit den gerade translatierten und jetzt in die Membran inserierten Proteinen steht (Pfeffer et al., 2015). Ebenso konnten Stoldt und Kollegen zeigen, dass die Verteilung der Protein-Insertase der Innenmembran (Chaperon) Oxa1 abhängig vom metabolischem Zustand ist (Stoldt et al., 2012). Werden unter respiratorischen Bedingungen vermehrt mitochondriale Proteine translatiert, so ist Oxa1 präferenziell in den Cristamembranen lokalisiert. Bei Wachstum in fermentierbarem Medium hingegen ist das Protein primär in der inneren Grenzmembran zu finden und prozessiert dort die vom Cytosol importierten Proteine. Die Hefezellen des vorliegenden SILAC-Experimentes wurden auf einem Lactat-Medium angezüchtet. Somit ist die präferenzielle

Lokalisation der an der Translation beteiligten Proteine in den Cristamembranen gut mit diesen Ergebnissen vereinbar.

Insgesamt deutet vieles darauf hin, dass die Subkompartimentierung der inneren Mitochondrienmembran ein sehr dynamisches Geschehen ist. Unterschiedliche Proteinkonzentrationen können vermutlich durch Ausbildung von oligomeren Komplexen und Diffusionsbarrieren (s. Crista junctions und MICOS-Komplex) aufrechterhalten werden. Gemäß ihrer Funktion und metabolischen Zustände können Proteine aber ebenso zwischen den Kompartimenten wechseln.

Die SILAC-Analyse legt nahe, dass Carrier-Proteine eine bevorzugte Lokalisation in der inneren Grenzmembran besitzen und die Nukleotide und Ribosomen in engem Kontakt zur Cristamembran organisiert sind. Allerdings lassen sich auf Grund der experimentell bedingten, artifiziellen Dissoziation von Proteinkomplexen teilweise nur bedingte Aussagen über die genaue Sublokalisierung *in vivo* treffen. Dies gilt insbesondere für die Proteine der oxidativen Phosphorylierung.

Jüngste Fortschritte im Bereich der csCLE (Cryogenic Super-resolution Correlative Light and Electron)-Mikroskopie (Liu et al., 2015) und der STAMP (Specifically Targeted Membrane nanoParticle)-Technik (Gold et al., 2014) können helfen, die fortbestehenden Fragen nach einer Subkompartimentierung der inneren Mitochondrienmembran weiter zu beantworten.

4.2 Der MICOS-Komplex und weitere Proteine mit ähnlichen SILAC-Profilen

Das primäre Ziel der mitochondrialen Subfraktionierung und anschließenden SILAC-Analyse bestand in der Identifikation von Proteinen mit spezifischer Anreicherung im Bereich von Kontaktstellen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran (1.3). Insgesamt konnten zehn bisher weitgehend uncharakterisierte Proteine mit einem Fcj1-ähnlichem Gradientenmuster identifiziert werden. Für einen Teil dieser Proteine konnten wir zeigen, dass sie, zusammen mit Fcj1, Bestandteil eines höher-molekularen Proteinkomplexes sind, dessen Verlust zu einer Veränderung der mitochondrialen Membranarchitektur führt und die respiratorische Kapazität der Zelle einschränkt (Harner et al., 2011). Als Bestandteile des Komplexes konnten wir die Proteine Fcj1 (Mic60), Ycl057c (Mic10), Ygr235C (Mic29), YN1100w (Mic27), Yfr011c (Mic19) und Ybr262c (Mic12) identifizieren. Alle Proteine sind, mit Ausnahme von Mic19, integrale Proteine der Innenmembran (Harner et al., 2011). Die

Interaktion zur Außenmembran wird über die Proteine des TOB-Komplexes (Translokase für β -Barrel-Proteine der Außenmembran) und die an der Mitochondrienfusion beteiligten Proteine Ugo1 und Fzo1 hergestellt (Harner et al., 2011). Interessanterweise konnte für diese Außenmembranproteine auch eine partielle Anreicherung in der intermediären Dichte von Kontakt-haltenden Vesikeln der Innen- und Außenmembran nachgewiesen werden (s. 3.5). Dass die Proteine Fzo1 und Ugo1 mit der Innenmembran interagieren, konnte schon früher gezeigt werden. Jedoch blieb der Interaktionspartner weitgehend unklar (Fritz et al., 2001). Besonders bei Fehlen der Untereinheiten Mic10 und Mic60 zerfällt der MICOS-Komplex und das Fehlen des Komplexes führt zu fast vollständigem Verlust von Crista junctions (Harner et al., 2011). Diese Ergebnisse wurden auch in höheren Organismen in zwei weiteren Studien bestätigt. Fortan ist die einheitliche Bezeichnung des MICOS (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*)-Komplexes etabliert (Pfanner et al., 2014).

Die Identifikation eines Proteinkomplexes durch gleiche SILAC-Profile zeigt, dass bei einer ähnlichen Anreicherung in unterschiedlich dichten Membranvesikeln eine physikalische Interaktion der Proteine naheliegt. Die proteomische Analyse eignet sich insbesondere zur Identifikation von Proteinkomplexen, die eine spezifische Vesikelanreicherung zeigen. Dies ist insbesondere für Proteine der intermediären Dichte sowie für weitere Mittelung von SILAC-Profilen aus beispielsweise Außenmembran und ER-Membran (s. unten) der Fall. Umgekehrt genügen aber gleiche SILAC-Profile wiederum nicht, um eine Komplex-Assoziation zu beweisen. Dies gilt umso mehr, je häufiger das jeweilige SILAC-Profil zu beobachten ist.

Untersuchungen der vergangenen Jahre deuten darauf hin, dass der MICOS-Komplex in unterschiedlichen Zusammensetzungen mit einem unterschiedlichen Anteil der jeweiligen Untereinheiten vorliegt (Bohnert et al., 2015). So konnten Subkomplexe mit variierenden Größen von einigen hundert kDa bis mehreren MDa ausgemacht werden (Rabl et al., 2009; Guarani et al., 2015; Huynen et al., 2016; Harner et al., 2011). Nach gegenwärtiger Vorstellung liegt der MICOS-Komplex in zwei unterschiedlichen Isoformen vor. Zum einem als Mic60-Subkomplex, welcher die Untereinheiten Mic60, Mic25 und Mic19 enthält und zum anderen ein Mic10-Subkomplex, welcher aus den Untereinheiten Mic10, Mic12, Mic26 und Mic27 besteht (van der Laan et al., 2016). Der Mic60-Komplex wird dabei als Hauptkomplex für die Interaktion von Innen- und Außenmembran angesehen, in dem Mic60 an Untereinheiten des TOB-Komplexes, Ugo1 oder Fzo1 bindet (Harner et al., 2011; Xie et al., 2007; von der Malsburg et al., 2011; Hoppins et al., 2011). Der Kontakt wird über die C-

Terminale Coiled-Coiled-Domäne des Proteins hergestellt (Korner et al., 2012). Bei fehlendem Mic60 werden die Interaktionspartner Mic19 und Mic25 nicht stabil exprimiert (Harner et al., 2011; van der Laan et al., 2016).

Der Mic10-Komplex hingegen scheint eine besondere Rolle in der Membrankrümmung im Bereich von Crista junctions einzunehmen. Das Protein Mic10 formt mit Hilfe der beiden Glycin-reichen Transmembrandomänen Oligomere, welche die haarnadelähnliche Topologie von Crista junctions verursachen (Bohnert et al., 2015; Milenkovic and Larsson, 2015; Barbot et al., 2015). Sowohl der Verlust von Mic10 als auch Mic60 führt zu einem nahezu vollständigen Verlust der Crista junctions. Dies lässt darauf schließen, dass beide Komplexe für die Crista-Bildung essenziell sind (Harner et al., 2011). Wichtig für eine organisierte Membranarchitektur und die Interaktion von Crista junctions mit Kontaktstellen der inneren und äußeren Membran scheint also auch eine Interaktion beider MICOS-Subkomplexe miteinander zu sein. Hier geht man davon aus, dass insbesondere das Protein Mic19 eine besondere Rolle einnimmt (Friedman et al., 2015). Mic19 scheint in Abhängigkeit vom Oxidationsstatus der proteineigenen Disulfidbrücke die Interaktion zwischen den beiden Subkomplexen zu fördern oder zu hemmen (Sakowska et al., 2015).

Als Organisationzentrum der Innenmembran und wichtige Determinante der Crista-Architektur ist der MICOS-Komplex in unterschiedliche Prozesse involviert (van der Laan et al., 2016). Für einen Überblick über die Interaktionen und Funktionen des MICOS-Komplexes und eine Darstellung der dadurch organisierten Innenmembranarchitektur siehe Abbildung 29. Die Respirationsrate in MICOS-Mutanten ist deutlich reduziert (Yang et al., 2015; Harner et al., 2014; Harner et al., 2011) und Untereinheiten des MICOS-Komplexes interagieren direkt mit Untereinheiten von Atmungskettenenzymen (Friedman et al., 2015; Chojnacka et al., 2015). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Beobachtungen, dass eine regelrechte Crista-Architektur für eine funktionsfähige oxidative Phosphorylierung vonnöten ist (Cogliati et al., 2013). Das Fehlen des MICOS-Komplexes führt zu einer aufgehobenen Organisation der Atmungskettenenzyme in der Innenmembran (Friedman et al., 2015). Dies ist wiederum mit den Überlegungen zum Vorhandensein einer Diffusionsbarriere bzw. eines Protein-Sortierungskomplexes vereinbar (Vogel et al., 2006). Der MICOS-Komplex scheint in der Tat für Adaptionsvorgänge der oxidativen Phosphorylierung während unterschiedlicher metabolischer Zustände relevant. So wurde eine durch Sauerstoff-Depletierung induzierte Herunterregulation von Mic60 mit einer Umformung von Crista hin zu plumpen weiten Cristaräumen beschrieben (Plecita-Hlavata et al., 2016). Dies führt unter anderem zu einer

Verschiebung des Verhältnisses von ATPase Dimeren und Monomeren und beeinflusst so Rate und Effektivität der oxidativen Phosphorylierung (Plecita-Hlavata et al., 2016). Insgesamt deutet vieles darauf hin, dass der MICOS-Komplex die Aktivität der oxidativen Phosphorylierung sowohl durch indirekte Effekte über die Architektur der Cristamembranen, als auch durch direkten Kontakt mit Atmungsketten-Enzymen moduliert.

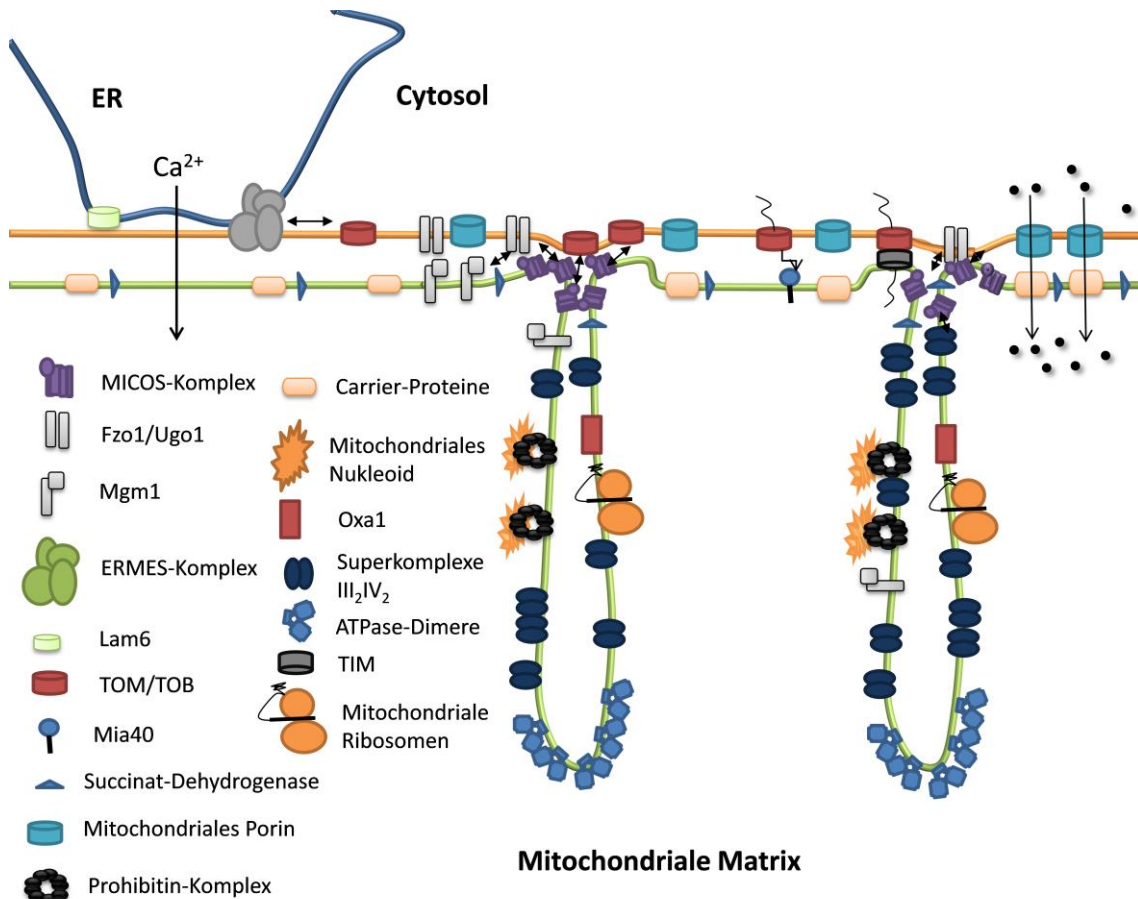


Abbildung 29 - Interaktionen des MICOS-Komplexes und mitochondriale Innenmembranorganisation

Überblick über Interaktionen des MICOS-Komplexes und die Subkompartimentierung der Innenmembran. An den Cristarändern sind in hoher Konzentration F₁F₀-ATPasen-Dimere lokalisiert. Die Atmungskettensuperkomplexe sind vornehmlich in Cristamembranen zu finden. Das mitochondriale Porin und Carrier-Proteine sind gemäß ihrer Funktion in der inneren Grenzmembran lokalisiert. Ribosomen und Nukleotide sind unter respiratorischen Bedingungen in Cristamembran lokalisiert, zeigen aber teilweise eine Assoziation zum MICOS-Komplex. Der MICOS-Komplex bildet die Crista junctions und interagiert mit unterschiedlichen Außenmembrankomplexen.

Darüber hinaus scheint der MICOS-Komplex eine wichtige Rolle im mitochondrialen Lipidmetabolismus zu besitzen. Der MICOS-Komplex teilt Bindungspartner mit dem TOB- und ERMES-Komplexen, welchen ebenfalls eine wichtige Funktion im Lipidmetabolismus

zugeschrieben wurde (s. 4.3). Beide Membrankomplexe weisen einen hohen Grad an genetischer Interaktion auf (Hoppins et al., 2011), Zerbes et al. gingen so von einem großen Membrankontaktstellen-organisierenden Komplex aus, welcher die drei Membranen, innere und äußere Mitochondrienmembran sowie ER-Membran, physikalisch und funktionell miteinander verbindet (sog. ERMIONE, engl. *ER-mitochondria organizing network*) (Zerbes et al., 2012). Weitere Hinweise auf einen engen Zusammenhang zum Lipidstoffwechsel lieferten die Analysen des Proteins Mic10 und eines MICOS-Komplex assoziierten Proteins Aim24. Harner et al. konnten nachweisen, dass das MICOS-assoziierte Aim24 an der Cardiolipin-Homöostase in Mitochondrien beteiligt ist (Harner et al., 2014). Darüber hinaus scheint Mic10 direkt an das Lipid Cardiolipin zu binden (Friedman et al., 2015). Die Außenmembran-Interaktionspartner des MICOS-Komplexes Fzo1 und Ugo1 wurden bereits als wichtige Strukturkomponenten von dynamischen Fusionen der Innen- und Außenmembran charakterisiert (Fritz et al., 2001). Diesen Kontaktstellen wiederum wurde eine essenzielle Rolle im Lipidaustausch und -transfer in Mitochondrien zugeschrieben (Simbeni et al., 1991; Fritz et al., 2001).

In Säugetieren interagiert das Mgm1-Homolog Opal mit Untereinheiten des MICOS-Komplexes und nimmt so eine zentrale Rolle im Bereich der Membranverschmelzung während der Mitochondrienfusion ein (Darshi et al., 2011). Diese Hypothese wird auch durch eine Interaktion des MICOS-Komplexes mit den Fusionsproteinen Fzo1 und Ugo1 bestätigt (Harner et al., 2011). Darüber hinaus führt eine gestörte MICOS-Assemblierung durch eine Störung der Fusions/Teilungs-Mechanismen zu sogenannten Riesenmitochondrien (Li et al., 2016). Eine Überexpression von Mic60 hingegen führt zu einer Unterdrückung von Teilungsprozessen und dementsprechend zu langen verzweigten Mitochondriennetzwerken (Van Laar et al., 2016).

Vielen der in Hefe charakterisierten MICOS-Untereinheiten konnten zuvor eine Funktion in der Vererbung von mtDNA zugeschrieben werden (Mic27=Aim37, Mic19=Aim13, Mic5=Mic12, Mic60=Aim28) (Hess et al., 2009). Wang et al. lieferten erste Evidenz dafür, dass diese Funktion des MICOS-Komplexes nicht nur indirekt über seine Interaktion mit Fusions- und Teilungsproteinen zustande kommt, sondern dass eine Subpopulation von Mic60-Proteinen in enger Nachbarschaft zu Nukleoiden lokalisiert zu sein scheint (Wang and Bogenhagen, 2006). Die Anordnung der mtDNA in MICOS-losen Mitochondrien ist desorganisiert und viele Nukleoid-assoziierte Proteine sind in ihrer Abundanz deutlich

reduziert. Besonders das Protein Yme1 scheint für die Regulation MICOS-Nukleoid-Interaktion von Bedeutung (Li et al., 2016).

Der Mic60-Subkomplex scheint darüber hinaus eine wichtige Funktion im Proteinimport einzunehmen. Mehrere Studien wiesen nach, dass Mic60 sowohl den TOB- als auch TOM-Komplex bindet (Ott et al., 2012; Xie et al., 2007; Harner et al., 2011; Korner et al., 2012). Mic60 ist für die Insertion von Proteinen der Außenmembran wichtig und scheint durch seine Interaktion mit Mia40 auch für die Assemblierung einiger Intermembranraum-Proteine von Bedeutung zu sein (von der Malsburg et al., 2011).

Gemäß seiner mannigfaltigen Funktionen in Mitochondrien wurden Alterationen im MICOS-Komplex mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert (Zerbes et al., 2012; van der Laan et al., 2016).

Beispielsweise wurden Veränderungen im Expressionsmuster oder der Aminosäuresequenz des Proteins Mic60 (Mitofilin) mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. In Parkinson-Modellen wurde eine vermehrte Oxidation und verminderte Mitofilin-Expressionen nachgewiesen (Van Laar et al., 2008). Darüber hinaus beschrieben Van Laar et al., dass sowohl eine Über- als auch Unterexpression von Mic60 zu einer herabgesetzten Resistenz von Neuronen gegenüber Parkinson-spezifischen Stressor-Molekülen führt (Van Laar et al., 2016). Veränderte Aminosäuresequenzen und sekundär veränderte Mitofilin-Moleküle wurden auch in zwei Tiermodellen für Epilepsie nachgewiesen (Omori et al., 2002) (Furukawa et al., 2011).

In einem Mausmodell für die Simulation eines Typ I-Diabetes wurden zudem starke proteomische Veränderungen in intersarkolemmalen Mitochondrien berichtet. Hierbei wurde Mic60 als eines der am stärksten herunterregulierten Proteine identifiziert. Dies wurde mit Veränderungen der mitochondrialen Architektur in Verbindung gebracht, die bei dieser Pathologie vorkommen (Baseler et al., 2011). Erst kürzlich konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine artifiziell herbeigeführte Überexpression des eigentlich deutlich reduziert exprimierten Mic60 in diabetischen Herzmuskelzellen die regelrechte Mitochondrienarchitektur wiederherstellt und so das Ausmaß der mitochondrialen Dysfunktion und Herzschwäche deutlich attenuiert (Thapa et al., 2015).

Das weitere Verständnis der Funktionen und Struktur des MICOS-Komplexes kann helfen, die Rolle dieses Proteinkomplexes in den erwähnten Krankheitsbildern weiter zu verstehen. Insbesondere bleibt zu klären, inwieweit die pathologischen Befunde sekundäre Merkmale

einer Mitochondriendysfunktion darstellen oder ob diese Proteine Teil der primären Pathogenese der jeweiligen Erkrankung sind. Neben einer weiteren Analyse des MICOS-Komplexes kann die vorliegende Analyse helfen, weitere Interaktionspartner bzw. weitere Membrankontaktstellen-Komplexe zu identifizieren.

So wurden neben den MICOS-Komplex-Untereinheiten fünf weitere, bisher nicht charakterisierte Proteine gefunden, die ein Fcj1-ähnliches SILAC-Profil aufwiesen. Drei (Ylr253w, Ypl109c, Aim46) der fünf Proteine wurden in großen proteomischen Studien bereits als mitochondriale Proteine identifiziert (Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003).

Dem Protein Aim46 wurde, wie vielen Untereinheiten des MICOS-Komplexes, eine Funktion in der Vererbung von mtDNA zugeschrieben (Hess et al., 2009). Die Aminosäuresequenz und der SILAC-Verlauf legen nahe, dass Aim46 ein integrales Protein der Innenmembran ist. Es teilt funktionelle Eigenschaften mit MICOS-Komplex-Untereinheiten und seine mögliche physikalische Assoziation mit dem MICOS-Komplex bedarf weiterer Analysen.

Das Protein Ypl109c ist ein UbiB-Familien-Protein, welches sich durch eine Kinase-Domäne auszeichnet (Stefely et al., 2015). Darüber hinaus besitzt das Protein eine ATP/ADP-Bindungs-Kassette. Verwandte Proteine wurden in einen Zusammenhang mit der Synthese des Coenzym Q gebracht, welches für die Isopren-Biosynthese erforderlich ist. Die Funktion des Proteins bleibt unklar, jedoch wären beispielsweise MICOS-modulierende Funktionen durch unterschiedliche Protein-Phosphorylierungen möglich.

Ylr253w wurde vor kurzem als Protein charakterisiert, welches eine wichtige Funktion im Bereich der mitochondrialen Lipid-Homöostase besitzt und genetisch mit Komponenten des ERMES-Komplexes interagiert (Tan et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein insbesondere die durch ein Fehlen von Mdm10 hervorgerufenen Lipidveränderungen in Mitochondrien ausgleichen kann (Tan et al., 2013). Insgesamt legt die beschriebene Interaktion und die beobachtbare Anreicherung in der intermediären Dichte nahe, dass das Protein eine essenzielle Rolle im Lipidtransfers zwischen ER, mitochondrialer Außenmembran und mitochondrialer Innenmembran einnimmt. Es könnte damit wichtiger Bestandteil des von Zerbes et al. vorgeschlagenem ERMIONE (s.o.) sein. Zukünftige Studien werden zeigen, ob Ylr235w direkt mit MICOS- oder ERMES-Untereinheiten interagiert oder ob es Bestandteil eines weiteren mitochondrialen Kontaktstellenkomplexes ist.

Ydr089w ist Protein mit einer sogenannten SPX-Domäne. SPX-Domänen sind bei Proteinen anzutreffen, welche in die Regulation der zelluläre Phosphathomöostase eingebunden sind

(Secco et al., 2012). Ergebnisse von Tkach et al. legen nahe, dass das Protein primär in der Vakuole lokalisiert ist und nach Induktion von DNA-Schäden in das Cytosol transloziert (Tkach et al., 2012). Dies spricht zusammen mit zwei C-Terminal lokalisierten Transmembrandomänen für eine Prozessierung des Proteins in Isoformen. Eine mitochondriale Lokalisation konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Dennoch ist das SILAC-Profil des Proteins hoch spezifisch für eine mitochondriale Lokalisation in der Innenmembran, insbesondere für eine Anreicherung in mitochondrialen Kontaktstellen.

YPR010C-A ist ein sehr kleines Protein (72 Aminosäuren) mit bisher unbekannter Funktion. Der Aminosäuresequenz nach zu urteilen, besitzt das Protein eine Transmembrandomäne. Bisher wurde es in großen Studien als dem cytosolischem Proteom zugehörig beschrieben (Yofe et al., 2016). Die Transmembrandomäne wie auch der SILAC-Verlauf legen jedoch eine integrale Verankerung in einer mitochondrialen Membran nahe.

4.3 Kontaktstellen von Mitochondrien- und ER-Membranen

Schon lange ist bekannt, dass Zellorganellen miteinander in Kontakt treten und Membrankontaktstellen ausbilden (Renken et al., 2002; Mannella et al., 1998; Robertson, 1960). Diese Kontaktstellen sind Zonen, in denen kleine Moleküle und Lipide zwischen den Organellen ausgetauscht werden können (Helle et al., 2013; Toulmay and Prinz, 2011; Prinz, 2014). In Hefe konnte der ERMES-Proteinkomplex als ein molekulares Korrelat dieser Kontaktstellen identifiziert werden (1.1.5). Eine schematische Darstellung des Komplexes ist in Abbildung 30 gezeigt.

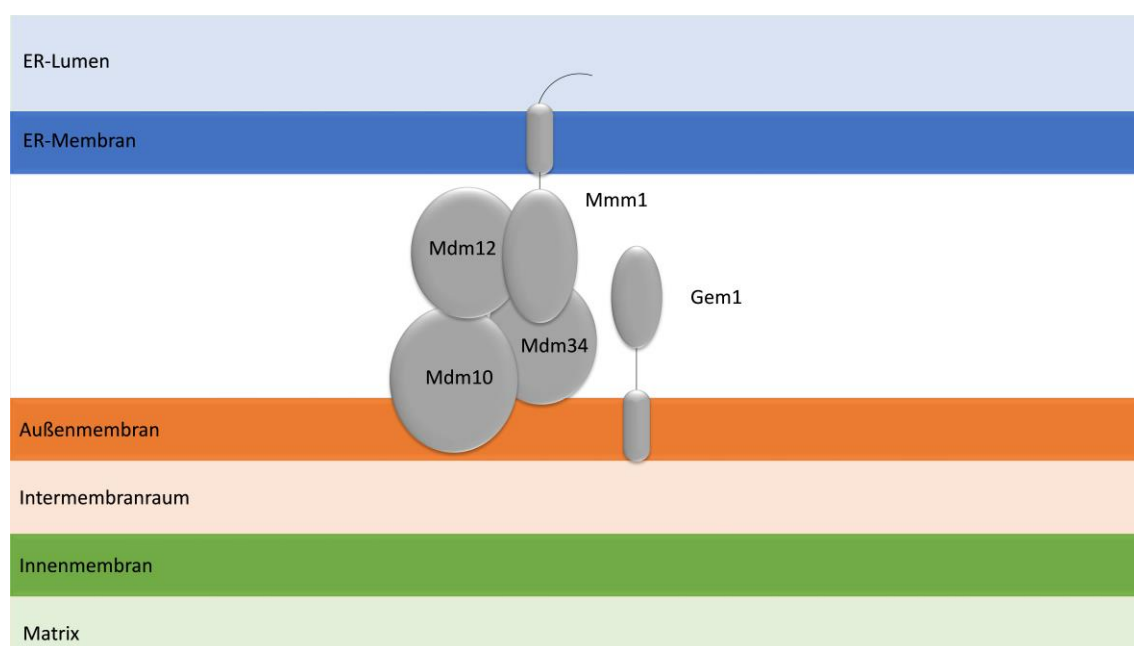


Abbildung 30 – Schematische Darstellung des ERMES-Komplexes

Der Komplex besteht aus den mitochondrialen Proteinen Mdm10 und Mdm34 sowie aus dem ER-Protein Mmm1 und dem cytosolischem Protein Mdm12. Gem1 ist eine die Komplex-Stabilität modulierende GTPase. **Oben**, ER; **unten**, Mitochondrium

Insbesondere das Protein Mmm1 wies im SILAC-Gradienten eine Mittelung aus einem typischen SILAC-Profil eines Proteins der mitochondrialen Außenmembran und eines ER-Proteins auf (3.7). Bei der Identifikation weiterer Proteine mit einem ähnlichen SILAC-Profil ist auffällig, dass vielen dieser Proteine eine wichtige Rolle im Lipid-Metabolismus zugeschrieben werden konnte. Dass die Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER als wichtige Regulation des Transfers von Lipiden dienen, wurde mehrfach gezeigt. Da Mitochondrien nicht direkt in das zelluläre, vesikuläre Transportsystem eingebunden sind,

müssen sie ihre Lipide über direkte Membraninteraktionen vom ER, dem Hauptproduktionsort von Phospholipiden, erhalten (Daum and Vance, 1997; Osman et al., 2011).

Das dem Mmm1-Verlauf ähnliche Pgc1 besitzt eine wichtige regulatorische Funktion im Cardiolipin-Metabolismus, in dem es in Mitochondrien Phosphatidylglycerol zu Diacylglycerin und Glycerol-3-Phosphat spaltet (Simockova et al., 2008). Erst kürzlich konnten Pokorna et al. zeigen, dass die Akkumulation von Phosphatidylglycerol in der inneren Mitochondrienmembran durch fehlendes Pgc1 zu Fehlbildungen der Crista-Architektur führt und die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase verändert (Pokorna et al., 2016). Dass das Protein an der Membrankontaktstelle zwischen Mitochondrien und ER lokalisiert zu sein scheint, ist bei seiner essenziellen Rolle in der mitochondrialen Lipid-Homöostase gut nachzuvollziehen.

Lam6 konnte ebenso als ein Protein mit Mmm1-ähnlichem SILAC-Profil charakterisiert werden und besitzt eine Schlüsselrolle in der Regulation interorganeller Kontaktstellen (Elbaz-Alon et al., 2015; Gatta et al., 2015). Es konnte als Bindungspartner des ERMES-Komplexes identifiziert werden, ist aber nicht essenzieller Teil des Komplexes, sondern hat vornehmlich regulatorische Funktionen (Elbaz-Alon et al., 2015). Eine erhöhte Abundanz geht sowohl mit vermehrten ER-Membrankontaktstellen als auch einer erhöhten Konzentration von Kontaktstellen von Vakuolen mit Mitochondrien einher. Dies lässt wiederum mutmaßen, dass Lam6 der limitierende Faktor für das Maß der Ausbildung der Kontaktstellen ist (Elbaz-Alon et al., 2015). Eine Formation von Lam6 in ERMES-Komplexen könnte so gleichzeitig mit einer geringeren Abundanz in Kontaktstellen von Vakuolen mit Mitochondrien assoziiert sein. Dass im vorliegenden SILAC-Datensatz Lam6 ein ‚ERMES-dominantes‘ Profil aufweist und keine Assoziation mit vakuolären Membranen zeigt, könnte an den Wachstumsbedingungen des Experimentes liegen. Kontaktstellen zwischen Vakuolen und Mitochondrien lassen sich nur selten unter respiratorischem Wachstum beobachten (Honscher et al., 2014). Die Zellen wurden im vorliegenden Experiment in einem Lactat-Medium angezchtet, welches die ER-Mitochondrien-Kontaktstellen im Vergleich zu Vakuolen-Mitochondrien-Kontaktstellen deutlich begünstigt und so das ERMES-dominante SILAC-Profil von Lam6 erklären kann.

Hefemitochondrien können Sterole nicht selber synthetisieren. Dementsprechend sind sie auf den Import und eine intramitochondriale Translokation in die Innenmembran angewiesen (Tuller and Daum, 1995). Interessanterweise ist die mitochondriale Ergosterol-Homöostase

bei unvollständiger Assemblierung des ERMES-Komplexes gestört (Tan et al., 2013). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Sterol-Transporter mit dem ERMES-Komplex interagiert (Murley et al., 2015). Die Identifikation von Sterol-Synthasen als Proteine mit Mmm1-ähnlichem SILAC-Profil untermauert die Bedeutung des ERMES-Komplexes im Steroltransfer. Anscheinend sind in mit den Mitochondrien assoziierte ER-Membranen nicht nur die strukturgebenden Proteine für die Kontaktstellenkomplexe und die für den Lipidtransfer nötigen Proteine, sondern auch die Proteine für die Lipid-Modifikation und -Synthese lokalisiert.

Auch die NADH:Cytochrome b5-Reduktase Cbr1 (Csukai et al., 1994) scheint, wenn auch nicht direkt ersichtlich, mit dem Lipidmetabolismus verknüpft. So konnte in Pflanzen gezeigt werden, dass die Aktivität von Cbr1 für die Desaturierung von Fettsäuren relevant ist (Wayne et al., 2013). Das Protein ist in Pflanzenzellen als Protein des endoplasmatischen Retikulums charakterisiert, wurde in Hefezellen aber auch in Mitochondrien gefunden (Sickmann et al., 2003). Veränderte Lipid-Sättigungen scheinen wiederum die Funktion von Mitochondrien direkt zu beeinträchtigen (Peck and Schulze, 2016).

Auch das Protein Scs2 konnte in einen Zusammenhang mit dem Phospholipid-Metabolismus der Zelle gebracht werden (Loewen et al., 2004). Das Protein enthält eine Phosphatidylinositol bindende Domäne (Loewen et al., 2003) und scheint für die Polarisierung des ERs und dessen Membranarchitektur wichtig. Darüber hinaus wurde es als ein Protein beschrieben, welches in unterschiedlichen interorganellären Kontaktstellen zu finden ist (Weber-Boyvat et al., 2015). Die vorliegende Analyse lässt vermuten, dass das Protein auch in hohen Konzentrationen an Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER-Membranen lokalisiert ist.

Die vorliegende proteomische Analyse deckt sich mit Charakterisierungen von Proteinen mit Beteiligungen am Lipidmetabolismus und steht im Einklang mit postulierten Funktionen der Organellen-übergreifenden Kontaktstellen. Insgesamt ist die Sensitivität der SILAC-Analyse bezüglich der Interaktion von Mitochondrium und ER technisch gesehen limitiert, da der SILAC-Standard als ein Mittel der mittleren Dichtefractionen gewählt wurde (2.4.9). Somit ist die Rate an der Identifizierung von vornehmlich in den leichteren Fraktionen vorkommenden Proteinen geringer (s. auch 3.2).

Neben seiner zentralen Funktion im Lipidmetabolismus scheint der ERMES-Komplex eine zentrale Rolle im Mechanismus der Mitochondrienteilung einzunehmen (Murley et al., 2013).

Durch eine Umwicklung der Mitochondrien wird die Konstriktion durch die cytosolischen Teilungsfaktoren begünstigt und der ERMES-Komplex scheint für eine korrekte Verteilung der mtDNA in den Tochterzellen obligat (Lang et al., 2015a). Neben dem ERMES-Komplex konnten darüber hinaus noch weitere Proteinkomplexe identifiziert werden, welche Mitochondrien und ER-Membran zusammenhalten und für den Transfer von Phospholipiden notwendig sind (Lahiri et al., 2014). Die genauen Einzelheiten der Funktionen des ERMES-Komplexes und anderer Kontaktstellen-Komplexe sind weiterhin unklar; kaum bestreitet werden kann jedoch die zentrale Rolle im Lipid-Metabolismus (für einen Überblick s. (Lang et al., 2015a)). Diese Funktion hat insofern medizinische Relevanz, da Erkrankungen durch eine primäre Alteration der Phospholipid-Homöostase als neue Untergruppe von Mitochondriopathien klassifiziert wurden (Lu and Claypool, 2015). Bisher sind nur wenige eindeutige Phänotyp-Genotyp-Korrelationen bei mitochondrialen Phospholipid-Störungen bekannt. So führen Mutationen in der an der Cardiolipin-Synthese beteiligten MLCL-Transacylase (Taz-Gen) zum Barth-Syndrom (Barth et al., 1983), Mutationen in dem an der Cardiolipin-Modifikation beteiligtem Serac1-Enzym zum MEGDEL-Syndrom (Wortmann et al., 2006; Sarig et al., 2013) und Mutationen in der Phospholipase A1 zur spastischen hereditären Paraplegie (Liguori et al., 2014; Magariello et al., 2014). Darüber hinaus konnten Veränderungen im Phosphatidylethanolamin-Stoffwechsel, welches ein Zusammenspiel mehrerer Organellen voraussetzt, mit nicht-alkoholischer Leberzirrhose, M. Parkinson, und M. Alzheimer in Verbindung gebracht werden (Calzada et al., 2016). Eine weitere Analyse der Funktionen und Proteine mit Beteiligung an Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER kann in Zukunft helfen, die Pathophysiologie von Phospholipid-Erkrankungen weiter zu verstehen.

4.4 Kontaktstellen zwischen Vakuolen und Mitochondrien

Neben den Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER rückte in jüngster Vergangenheit auch eine Assoziation der Vakuolenmembran mit der äußeren Mitochondrienmembran in den Fokus (Honscher et al., 2014; Elbaz-Alon et al., 2014; Klecker and Westermann, 2014). Diese Membranassoziation ist im Besonderen interessant, da durch diese Kontaktstellen eine Verbindung der Mitochondrien zum endosomalen System hergestellt wird (Elbaz-Alon et al., 2014). Darüber hinaus gibt es Evidenz dafür, dass der Lipid-Austausch in den einzelnen Organellen-übergreifende Kontaktstellen redundant ist und sowohl über unterschiedliche ER-Mitochondrien-Kontaktstellen als auch über einen Komplex in Kontaktstellen zwischen Mitochondrium und Vakuole ablaufen kann (Lang et al., 2015b). Der Vakuolen-

Mitochondrien-Komplex ist damit genau wie die Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrien ein wichtiger ‚Umschlagplatz‘ von Lipiden und Signalmolekülen (Klecker and Westermann, 2014).

In der SILAC-Analyse bot das Protein Ypt7 Maxima in Außenmembranfraktionen sowie in Fraktionen, welche typisch für die Vakuole sind. Dies legt eine Lokalisation im Bereich von Kontaktstellen beider Membranen bzw. eine Doppellokalisation nahe. Dabei ist hier, ähnlich wie bei Untereinheiten des ERMES-Komplexes, eine Mittelung von SILAC-Profilen von Proteinen der jeweils zugehörigen Membranen zu beobachten. Dies spricht insgesamt dafür, dass die Kontaktstellen partiell zerfallen, aber Proteine zu unterschiedlichem Ausmaß an entweder äußerer Mitochondrienmembran oder Vakuolenmembran anhaften. Ypt7 ist eine Rab-Familien-GTPase, welche schon früh in den Zusammenhang von Membranfusion und Endosomen-Organisation gebracht werden konnte (Liu et al., 2012; Schimmoller and Riezman, 1993). Die Ergebnisse von Honscher et al. decken sich gut mit dem SILAC-Profil des Proteins. Die Autoren konnten zeigen, dass das Protein präferenziell an der Bildung von Kontaktstellen der äußeren Mitochondrienmembran und Vakuolenmembran beteiligt ist (Honscher et al., 2014). In der hier diskutierten SILAC-Analyse konnten neben Ypt7 noch eine Reihe von anderen Proteinen identifiziert werden, welche ein ähnliches Profil aus einer Mischung von SILAC-Profilen der Außenmembran und Vakuolenmembran zeigten.

Ypt32 ist, wie Ypt7, als GTPase charakterisiert worden (Grosshans et al., 2006). Es hat eine essentielle Funktion im Post-Golgi Vesikeltransport (Benli et al., 1996), wurde aber von Zahedi und Kollegen auch als zum mitochondrialen Außenmembranproteom zugehörig beschrieben (Zahedi et al., 2006). Die Unstimmigkeiten der Lokalisationsstudien würden sich gut mit einer Doppellokalisation oder präferenziellen Lokalisation an Organellen-übergreifenden Kontaktstellen vereinbaren lassen.

Als weiteres Beispiel ist das Protein Vma2, welches von Elbaz und Kollegen ebenso als möglicher Kandidat für eine Anreicherung im Kontaktstellen-Komplex zwischen Mitochondrien und Vakuolen vorgeschlagen wurde (Elbaz-Alon et al., 2014), zu nennen. Darüber hinaus konnten der Monocarboxylat-Protonen-Symporter Ady2 und der GDP-Dissoziationsinhibitor Gdi1 diesem SILAC-Profil zugeordnet werden. Gdi1 reguliert den Vesikeltransport und die Membranorganisation durch Regulation der GDP-Dissoziation von kleinen Rab-Familien-GTPasen, wie z.B. dem oben genannten Ypt7 oder Ypt32 (Garrett et al., 1994). Somit kommt es als potenzieller Regulator für Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Vakuole in Betracht. Ady2 wurde bisher in keinen Zusammenhang zu

Mitochondrien-Vakuolen-Kontaktstellen gebracht. Es wurde aber in größeren Lokalisationsstudien sowohl in Mitochondrien, der Vakuole als auch in der Plasmamembran detektiert. In wieweit die spezifische Anreicherung an Kontaktstellen einer Transporterfunktion zwischen Vakuole und Mitochondrium entspricht, lässt sich mit der vorliegenden Analyse nicht klären.

Auch das bisher als mitochondrial charakterisierte Protein Aim18 (Reinders et al., 2006), welchem eine Beteiligung in der Vererbung der mtDNA zugeschrieben wurde (Hess et al., 2009), konnte als Protein mit Ypt7-ähnlichem SILAC-Profil identifiziert werden. Es ist ein Protein, das vermutlich mit zwei Transmembrandomänen in der Außenmembran inseriert ist. Es zeigt aber in geringen Anteilen auch ein Vorkommen in den Vakuolen-typischen Fraktionen.

Die Analyse des Proteoms von Kontaktstellen zwischen Vakuole und Mitochondrium bietet einige neue Kontaktstellenprotein-Kandidaten, ist unter den gegebenen Wachstumsbedingungen aber sicherlich eingeschränkt in ihrer Aussage. Zur genaueren Analyse könnte das Experiment wiederholt werden, die Zellen sollten jedoch nach Eintritt in die stationäre Phase analysiert werden. Hierbei sind Mitochondrien-Vakuolen-Kontaktstellen deutlich häufiger zu beobachten (Honscher et al., 2014). Einige Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen der beiden ersten Kontaktstellen-Charakterisierungen (Elbaz-Alon et al., 2014). Andere vorgeschlagene Proteine wurden bereits als Proteine mit essenziellen Funktionen in der Vakuolen- und Endosomen-Organisation beschrieben. Ihre spezifische Anreicherung in Kontaktstellen-Komplexen ist jedoch eine neue Erkenntnis.

4.5 Aim31 ist ein Aktivität-modulierendes Protein der Atmungskette

Aim31 wurde in den Ergebnissen als ein mitochondriales Innenmembranprotein und als eine Komponente der IV_1III_2 - bzw. IV_2III_2 -Superkomplexe identifiziert. Ein Fehlen von Aim31 destabilisiert die Superkomplexe. Insbesondere scheint Aim31 eine wichtige Funktion für die enzymatische Aktivität der Cytochrom c-Oxidase, nicht aber für die der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase zu besitzen. Aim31-defiziente Zellen zeigen ein deutlich verlangsamtes Wachstum in Medien, in welchen eine oxidative Phosphorylierung benötigt wird. Dieser Phänotyp ist besonders ausgeprägt, wenn die Zellen Stress ausgesetzt werden und die Synthese sowie Neuassemblierung von Atmungskettenenzymen gesteigert ist

(Diauxie-Shift). Der hohe Grad der Konservierung des wahrscheinlich für die Interaktionen verantwortlichen N-terminalen Proteinabschnitts lässt vermuten, dass die Assoziation mit der Cytochrom c-Oxidase und Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase bzw. deren Assemblierung in Atmungsketten-Superkomplexen eine konservierte Funktion der *Hypoxia-Inducible Gene 1* (Hig1)-Proteinfamilie darstellt.

Der Name Aim31 (*Altered inheritance of mitochondria 31*) entstammt einer großen Studie mit dem Ziel der Identifikation von Proteinen, welche eine Funktion in der Vererbung von mtDNA besitzen (Hess et al., 2009). Der Verlust der mtDNA oder Mutationen in der mtDNA führen langfristig zu einer stark verminderten Zellatmungs-Aktivität (McLendon et al., 2015; Larsson, 2010). Umgekehrt kann die Aufnahme von intakter mtDNA eine Wiederherstellung der zuvor defekten Zellatmung zur Folge haben (Tan et al., 2015). Diese Beobachtungen und die Identifikation von Aim31 als ein an der Vererbung von mtDNA beteiligtes Protein legen nahe, dass ein vermindertes Wachstum der Deletionsmutante auf einem nicht-fermentierbaren Medium durch Defekte oder Verluste der mtDNA zurückzuführen sein könnte (Hess et al., 2009). In Hefezellen kodiert die mtDNA unter anderem für die Cytochrom c-Oxidase-Untereinheiten Cox1, Cox2 und Cox3 sowie für die Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Untereinheit Cytochrom b (Bibb et al., 1981). Somit könnten verminderte Proteinkonzentrationen der mitochondrial kodierten Untereinheiten zu einer verminderten Aktivität der Atmungskettenenzyme führen. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass trotz gleicher Proteinkonzentrationen von Cytochrom c-Oxidase- und Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Untereinheiten in Aim31-defizienten und Wildtyp-Hefezellen das Fehlen von Aim31 selektiv die Funktion der Cytochrom c-Oxidase beeinträchtigt. Somit ist zum einen die Translation mitochondrial kodierter Untereinheiten nicht wesentlich beeinträchtigt und zum anderen die Assemblierung der Untereinheiten zu einem voll funktionsfähigen Enzym gestört. Alternativ kann Aim31 direkt die Aktivität des Enzyms modulieren. Darüber hinaus wäre bei einem allgemeinen Verlust der mtDNA zu erwarten, dass die Enzymaktivität der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase ebenso vermindert ist (Chabi et al., 2005). Anders als erwartet, ist der Verlust von mtDNA nicht primär durch das Fehlen des Proteins herbeigeführt, sondern die Aktivitätsreduktion der Cytochrom c-Oxidase erfolgt allein durch das Fehlen des Proteins Aim31. Das Fehlen von Aim31 könnte allerdings sekundär über eine eingeschränkte Effizienz des Elektronentransports die Vererbung der mtDNA beeinträchtigen, da diese Form der Energiegewinnung für Fusionsprozesse benötigt wird (Westermann, 2014). Diese wiederum nehmen eine bedeutende Rolle in der mtDNA-

Vererbung ein. Für eine definitive Klärung des Sachverhaltes können weitere inorganelle Translation-Experimente (WT vs. *Δaim31*) für z.B. Cox1 oder Cox3 dienen.

Aim31 konnte mit einer Vielzahl von Untereinheiten sowohl der Cytochrom c-Oxidase als auch der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidase aufgereinigt werden. Aim31 scheint darüber hinaus auch in örtlicher Nähe zu bzw. in größeren Proteinkomplexen mit an der Translation beteiligten Proteinen lokalisiert zu sein (3.9.1.3). Weiterhin konnten einige Proteine der Assemblierungsmaschinerie dem Aim31-Interaktom zugeordnet werden. So wurden die für den Kupfereinbau nötigen Assemblierungsfaktoren Sco2 (Glerum et al., 1996) und Cox23 (Barros et al., 2004) sowie das Cytochrom c-Oxidase-spezifische Membranchaperon Pet100 (Church et al., 2005) zusammen in der aufgereinigten Präparation detektiert. Dies legt insgesamt nahe, dass Aim31 schon zum Zeitpunkt der Assemblierung von Cytochrom c-Oxidase-Monomer mit den Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase interagiert und möglicherweise selbst eine Chaperon-Funktion einnimmt. Die hier beschriebenen Interaktionen des Aim31 mit der Cytochrom c-Oxidase und der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase wurde in drei anderen, unabhängigen Studien bestätigt (Chen et al., 2012; Strogolova et al., 2012; Vukotic et al., 2012). Zudem schlagen die Ergebnisse der Studien vor, dass Aim31 unabhängig vom jeweils anderen Enzym die Cytochrom c-Oxidase bzw. die Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase eigenständig bindet. Die Studien legen zudem eine Lokalisation von Aim31 an den Kontakten zwischen beiden Komplexen nahe. Aim31 scheint spezifisch für den Einbau von Cox12 und Cox 13 in die Cytochrom c-Oxidase verantwortlich zu sein. Diese Proteine konnten auch in den hier beschriebenen Experimenten als Interaktionspartner nachgewiesen werden (3.9.5).

Neben den beschriebenen Interaktionspartnern konnten zwei bislang uncharakterisierte, nicht essentielle Proteine mit Aim31 kopräzipitiert werden. Zum einen das bereits dem mitochondrialen Proteom zugeordnete Aim46 (Reinders et al., 2006; Sickmann et al., 2003; Huh et al., 2003), zum anderen, die bisher uncharakterisierte Thiol-Oxidoreduktase Ydr286c. Aim46 wurde, wie Aim31, als Protein mit einer Funktion in der Vererbung der mtDNA beschrieben (Hess et al., 2009). Des Weiteren teilt das Protein folgende Phänotypen mit Aim31: ein vermindertes Wachstum unter hypoxischen/anaeroben Bedingungen (Samanfar et al., 2013) und eine verminderte Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Brown et al., 2006) und Toxinen (Willingham et al., 2003). Zukünftige Arbeiten sollten analysieren, inwieweit diese Proteine möglicherweise ebenso an der Stabilität von Superkomplexen beteiligt sind und

mit Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase bzw. Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase interagieren.

Interessanterweise konnte auch das Protein Mic10 unter den möglichen mit Aim31 interagierenden Proteinen gefunden werden. Diese Beobachtung stärkt die Hypothese, dass der MICOS-Komplex mit Atmungskettenenzymen interagiert (Friedman et al., 2015) und möglicherweise über eine Regulation der Superkomplexe das Verteilungsungleichgewicht von Atmungskettenenzymen zwischen Cristamembran und innerer Grenzmembran beeinflusst (s. auch Diskussionsabschnitt 4.2).

Bislang konnten neben Aim31 nur die Proteine Aac2 (s. unten), Cox26 (Strecker et al., 2016) und Oma1 (ausschließlich höhere Organismen) sowie das Phospholipid Cardiolipin (Wenz et al., 2009; Mileykovskaya and Dowhan, 2014) als Stabilisatoren der Superkomplexe ausgemacht werden. Neben diesen scheint auch eine spezifische Form der Crista-Architektur die Assemblierung von Superkomplexen zu fördern bzw. zu verhindern. So führen Mutationen in Crista-Architektur-modulierenden Proteinen (z.B. OPA1) zu einer Destabilisierung von Superkomplexen (Cogliati et al., 2013). Diese Erkenntnisse verbinden den ersten Teil der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der mitochondrialen Membranarchitektur mit der Effizienz der Zellatmung und sind ein weiteres Beispiel für den engen Zusammenhang von Struktur und Funktion in Mitochondrien. Über die Funktion der Superkomplexe wurde lange spekuliert. So postulierten die Kollegen Boekema und Braun, dass durch Superkomplexe die Effizienz des Elektronentransports gesteigert wird, die ROS-Produktion vermindert und die jeweiligen Einzelkomplexe stabilisiert werden (Boekema and Braun, 2007; Dudkina et al., 2008). Indes konnte gezeigt werden, dass eine Aim31-abhängige Bildung von Superkomplexen die Lebensspanne von Pilzen deutlich verlängert (Fischer et al., 2015). Eine Destabilisierung der Superkomplexe durch fehlendes Aim31 (bzw. dessen Homologe) mit der Folge einer morphologischen Aberration wurde im Zebrafischmodell beschrieben. Zudem wurde ein möglicher Einfluss auf die Embryogenese berichtet. Dieser wiederum führt zu einer insgesamt deutlich reduzierten bioenergetischen Kapazität der Zellen (Bohovych et al., 2015).

Der in den gezeigten Experimenten beobachtete Aktivitätsverlust der Cytochrom c-Oxidase lässt sich allerdings nicht durch die beschriebene Dissoziation der Superkomplexe erklären, da diese unter den experimentell eingesetzten Detergenzien-Konzentrationen auch in Wildtyp-Zellen zerfallen. Somit scheint Aim31 nicht nur die Effizienz in den Superkomplexen zu stören, sondern reduziert auch die Aktivität der monomeren Cytochrom c-Oxidase. Eine

später veröffentlichte, genauere Strukturanalyse in höheren Organismen ergab, dass das Aim31-verwandte Protein Higd1A die Effizienz der Cytochrom c-Oxidase durch Veränderungen der Proteinstruktur um das Häm A, dem Kofaktor der Protonen-Pumpe, hervorruft (Hayashi et al., 2015). Zudem wurde in Hefezellen als auch in Cardiomyozyten nachgewiesen, dass die Effektivitätssteigerung durch Aim31 bzw. Higd1A für das Überleben der Zellen unter hypoxischen Bedingungen essenziell ist. Die Zellen werden dadurch vor dem ansonsten folgenden energetischen Kollaps und Zelltod bewahrt (Hayashi et al., 2015; Strogolova et al., 2012).

In einem glukosereichen Medium verstoffwechseln Hefezellen Zucker vornehmlich durch Fermentierung. Sobald der Glukosegehalt sinkt, werden hierarchisch strukturiert andere Kohlenstoffquellen in den ATP-generierenden Stoffwechsel einbezogen (Lactat, Ethanol, Glycerol, etc.). Es findet also eine Umstellung von anaerober Energiegewinnung zu aerober ATP-Synthese mittels oxidativer Phosphorylierung statt (DeRisi et al., 1997). Das Transkriptom von Hefezellen verändert sich bei Wechsel in ein nicht-fermentierbares Medium deutlich (Boy-Marcotte et al., 1998; Soontorngun, 2016; Peng et al., 2015; Galdieri et al., 2010). Erstaunlicherweise sind neben einem insgesamt verstärkt exprimierten, mitochondrialen Proteom die relativen Protein-Konzentrationen nicht wesentlich verändert. Diese Diskrepanz lässt sich allein durch unterschiedliche Regulationsmechanismen auf Proteom-Ebene erklären. So wurden beispielsweise deutlich erhöhte Turnover-Raten unter nicht fermentierbaren Wachstumsbedingungen postuliert (Stoldt et al., 2012). Während des Diauxie-Shifts werden nicht nur neue Proteine gebildet, assembliert oder abgebaut, sondern Proteine ändern ihre mitochondriale Sublokalisierung. Beispielsweise wird das Innenmembran Chaperon Oxa1 während des Diauxie Shifts von der inneren Grenzmembran in die Cristamembranen transloziert (Stoldt et al., 2012), um dort die mitochondrial translatierten Proteine in die Membranen zu inserieren. Viele der dort nun verstärkt translatierten Proteine sind Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase oder Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase. Diese Untereinheiten müssen nun sortiert werden und in vielen Einzelschritten zu Enzymen und Superkomplexen assembliert werden. Genau dieser Prozess scheint bei fehlendem Aim31 deutlich gestört. In der $\Delta Aim31$ -Deletionsmutante ist der Prozentsatz der Superkomplexe deutlich herabgesetzt und im Wildtyp nicht zu detektierende Assemblierungsintermediate reichern an. Dies kann neben einem oben beschriebenen Effizienzverlust der oxidativen Phosphorylierung weitere negative Folgen für die Zelle haben. Die Präsenz von Assemblierungsintermediaten der Cytochrom c-Oxidoreduktase ist mit dem Risiko einer erhöhten ROS-Produktion verbunden und diese verursachen wiederum Mutationen in der

mtDNA (Überblick in (Bourens et al., 2013)). Weiterhin kann die Assemblierung von funktionsfähigen Superkomplexen die ROS-Produktion minimieren und geht mit einer erhöhten Resistenz gegenüber exogenem oxidativem Stress einhergeht (Chen et al., 2012).

Die prolongierte Lag-Phase im Diauxie-Shift von Aim31-defizienten Zellen kann also durch mehrere direkte und indirekte Effekte erklärt werden. Zum einen werden die in dieser Phase vermehrt translatierten Cytochrom c-Oxidase-Untereinheiten deutlich geringer in funktionsfähige Superkomplexe assembliert. So ist die Effizienz der Energiebereitstellung auf einem nicht fermentierbaren Medium reduziert. Zum anderen, wird durch das Fehlen des Proteins Aim31 nicht nur das Äquilibrium zwischen Einzelkomplexen und Superkomplexen verschoben, sondern das Fehlen des Proteins könnte auch das Erreichen dieses Gleichgewichts verlangsamen (Chaperon-Funktion). Ein weiterer Grund könnte in der beschriebenen gesteigerten ROS-Produktion liegen. Ein Diauxie-Shift wird begleitet vom vermehrten Anfallen von ROS (Puig and Perez-Ortin, 2000). Diese können wegen unzureichender Superkomplexbildung und vermehrt anfallender Intermediate aber nur bedingt abgebaut werden, sodass ein Wachstumsarrest weiter begünstigt wird.

In Aim31-defizienten Zellen ist die Abundanz des Proteins Aac2 deutlich verringert. Aac2 ist der am stärksten exprimierte ADP/ATP-Transporter, welcher durch den Austausch von ADP und ATP über die mitochondriale Innenmembran eine zentrale Rolle im mitochondrialen Metabolismus einnimmt (Klingenberg, 1989; Duszynski et al., 1981). Indirekt sind Aac-Proteine somit essenzielle Komponenten der oxidativen Phosphorylierung. Aac-Proteine sind nicht zufällig über die mitochondriale Innenmembran verteilt, sondern ein großer Teil der Aac2-Population bildet höher organisierte Komplexe mit den Atmungskettensuperkomplexen (Dienhart and Stuart, 2008). Die Kolokalisation kann den Austausch von ADP^{3-} und ATP^{4-} , der nicht ladungsneutral erfolgt, energetisch begünstigen (Duszynski et al., 1981; Kuster et al., 1981) und scheint selbst die Stabilität der Atmungskettensuperkomplexe, insbesondere die des IV_2III_2 -Superkomplexes, zu fördern (Dienhart and Stuart, 2008). Damit ist Aac2 eines der wenigen Proteine, welches die Stabilität der Superkomplexe beeinflusst (siehe oben). Aac2 interagiert weiterhin mit Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase und Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase und teilt damit wichtige Eigenschaften mit dem Protein Aim31 (Dienhart and Stuart, 2008). Strogolova et al. wiesen nach, dass Aim31 zusätzlich direkt an Aac2-Proteine bindet (Strogolova et al., 2012). Somit könnte Aim31 als Verbindungsstelle zwischen den Atmungskettensuperkomplexen und Aac2-Proteinen fungieren. Ein Fehlen von Aim31 würde diese Verbindung destabilisieren und so möglicherweise die Expression von

Aac2-Proteinen negativ beeinflussen (negatives Feedback). Auch der Proteinabbau der nun Komplex-ungebundenen Aac-Monomere bzw. -Dimere könnte gesteigert sein (Dyall et al., 2003). Zwei Studien, die nach Anfertigung der vorliegenden Experimente publiziert wurden, berichteten, dass Aim31 einen synthetischen Phänotyp mit den Proteinen Aac2 und Crd1 (Cardiolipin-Synthase) teilt. Der Wachstumsphänotyp ist in Doppel-Deletionsstämmen mit fehlendem Aim31 und Aac2 fulminanter als die jeweiligen einzelnen Deletionsstämme (Mileykovskaya and Dowhan, 2014). Die einzelnen Mechanismen der Stabilisierung erscheinen somit kooperativ.

Einige Ergebnisse deuten auch auf einen weiteren regulatorischen Zusammenhang zwischen der Interaktion von Aim31 mit Superkomplexen und dem Aac2-Protein hin: So wurde die Interaktion zwischen Aim31 und Aac2 als abhängig von der jeweiligen Aac2-Konformation beschrieben (Strogolova et al., 2012). Es wurde spekuliert, dass die Aac2-Translokasen entweder zur Matrixseite hin ‚geöffnet‘ und gleichzeitig zum Intermembranraum ‚verschlossen‘ sind oder umgekehrt (Pebay-Peyroula and Brandolin, 2004). Diese unidirektionalen Konformationen würden abhängig vom jeweiligen Energieniveau der Zelle auftreten. Aim31 könnte so die Bildung von Atmungsketten-Superkomplexen und die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase in Abhängigkeit vom Energielevel der Zelle, welcher durch unterschiedliche Aac2-Konformationen registriert wird, beeinflussen.

Insgesamt lassen sich vier unterschiedliche Erklärungsmodelle für den Wachstumsphänotyp von Aim31 anführen. Erstens, eine direkte Beeinträchtigung der Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (in monomerer Form) als Aktivitätsmodulator. Zweitens, eine Veränderung der Assemblierung zu Superkomplexen, bei der durch geringere Konzentrationen an IV_2III_2 / IV_1III_2 die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung herabgesetzt wird. Drittens, eine durch geringere Proteinkonzentrationen von Aac2 hervorgerufener Aktivitätsverlust der oxidativen Phosphorylierung. Dieser kann direkt durch herabgesetzte Transportkapazität von ADP und ATP über die Innenmembran oder indirekt über eine weitere Destabilisation der Atmungskettenkomplexe hervorgerufen werden. Viertens, eine verminderte Stressresistenz durch vermehrt anfallende ROS durch die geringere Anzahl an Superkomplexen und eine erhöhte ROS-Produktion der Assemblierungsintermediate.

Die dargestellten Erkenntnisse und Spekulationen haben in mehreren Hinsichten medizinische Relevanz. So werden viele mendelisch vererbte Mitochondriopathien durch Mutationen in COX-Assemblierungsfaktoren verursacht (Shoubridge, 2001). Konkret konnten Mutationen für die Gene Surf1, Sco1 und Sco2, Cox10 und Cox15 mit mitochondrialer Dysfunktion und

respiratorischem Zellversagen in Verbindung gebracht werden. Für die meisten der beobachteten phänotypischen Atmungsketten-Defizienzen sind jedoch noch keine zugrunde liegenden Mutationen identifiziert worden. Die Identifikation eines weiteren Faktors, der die Stabilität von Superkomplexen beeinflusst, könnte helfen, die physiologische und pathophysiologische Relevanz von Superkomplexen weiter zu verstehen und die Ursache von Atmungsketten-Defizienzen näher zu bestimmen. Erste Erkenntnisse an Modellorganismen von Zebrafischen belegen bereits, dass die Superkomplexformation und dessen Stabilitätsfaktoren wichtige Funktionen im Organismus einnehmen.

Darüber hinaus legt der Aspekt einer durch Aim31-vermittelten Resistenz gegenüber Hypoxie- und oxidativem Stress (s. oben) nahe, dass das Protein eine zentrale Rolle in der Entartung von Zellen einnehmen könnte (Eales et al., 2016). Weitere Studien könnten eine mögliche Beteiligung des Proteins in der Kanzerogenese aufklären.

Ein weiterer interessanter medizinischer Aspekt ergibt sich aus einem kürzlich publizierten therapeutischen Erfolg bei Mitochondriopathien. In Mausmodellen wurde bei konstanter Hypoxie sowohl der Phänotyp als auch der Schweregrad von Erkrankungen, die auf Defekte der Atmungskette zurückzuführen sind, gemildert (Jain et al., 2016). Higd2A (das menschliche Aim31-Homolog) ist ein unter Hypoxie verstärkt exprimiertes Protein, welches Superkomplexe stabilisiert und die bei diesen Erkrankungen verstärkt auftretende ROS-Produktion reduziert (s.o.). Auch wenn dieser neue Therapieansatz zunächst beim Menschen evaluiert werden muss, so wäre das Aim31-Homolog als ein möglicher Mediator der Verminderung der ROS-Produktion in Betracht zu ziehen.

5 Zusammenfassung

Mitochondrien sind von Doppelmembranen umgebene Organellen und besitzen eine komplex organisierte Membranarchitektur, die sich an die metabolischen Zustände einer Zelle adaptiert. Die Außenmembran weist eine Hüllenstruktur auf. Die Innenmembran ist unterteilt in die innere Grenzmembran, die der Außenmembran eng anliegt, und in die Cristamembran, die durch Einstülpung in die mitochondriale Matrix die Cristae ausbildet. Die innere Grenzmembran ist mit der Cristamembran durch die Crista junctions verbunden. Dies sind enge, meist kurze röhrenförmige Membranstrukturen. Insbesondere in Membranabschnitten, in denen Crista junctions lokalisiert sind, ist die innere Grenzmembran zusätzlich durch Kontaktstellen mit der Außenmembran verbunden. Weiterhin treten Mitochondrien über ihre Außenmembran mit anderen Zellorganellen in Kontakt.

Aus mehreren experimentellen Befunden ergab sich die Vermutung, dass die unterschiedlichen Subkompartimente der mitochondrialen Membranen durch eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung charakterisiert sind. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, mit einem proteomischen Ansatz die Frage zu beantworten, welche Proteine in welchen Bereichen der mitochondrialen Membranen lokalisiert sind. Dazu wurden isolierte Mitochondrien mit einer Ultraschallbehandlung in kleine Vesikel zerlegt und diese Vesikel durch Gradientenzentrifugation entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Anschließend wurden sie einer semiquantitativen, proteomischen Analyse mittels Isotopen-basierte Massenspektrometrie (SILAC, *s*table *i*sotope *l*abeling with *a*mino acids in *c*ell culture) unterzogen. Durch diesen experimentellen Ansatz und unter Zuhilfenahme etablierter Markerproteine der jeweiligen Membranbereiche konnten Proteine den unterschiedlichen mitochondrialen Membranabschnitten und Mitochondrien-assoziierten Membranen zugeordnet werden.

Zuvörderst ist es gelungen, Proteine zu identifizieren, welche eine Anreicherung in Bereichen von Kontaktstellen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran aufweisen.

Zu diesen Proteinen gehören sechs Proteine eines großen Proteinkomplexes, welcher als eine wesentliche Determinante der mitochondrialen Membranarchitektur charakterisiert werden konnte (MICOS-Komplex; Mitochondrial *c*ontact site and crista *o*rganization *s*ystem). Zu den Proteinen gehören Fcj1, das Hefehomolog von Mitofilin, vier integrale, bisher nicht charakterisierte Innenmembranproteine (Ynl100w, Ygr235c, Ycl057c-a, Ybr262c) und das membranassoziierte Yfr011c. Diesen Proteinen wurden gemäß des Komplexnamens MICOS

die Bezeichnung Mic zusammen mit ihren Molekulargewichten zugewiesen: also Mic60 (für Fcj1), Mic27 (für Ynl100w), Mic26 (für Ygr235c), Mic19 (für Yfr011c), Mic12 (für Ybr262c) und Mic10 (für Ycl057c-a). Weitere Proteine mit einer Anreicherung im Bereich von mitochondrialen Kontaktstellen konnten ebenfalls identifiziert werden. Die genaue Charakterisierung dieser Proteine bedarf jedoch weiterer Studien.

Darüber hinaus konnten durch die proteomische Analyse Hinweise gefunden werden, dass die Proteinverteilung über die kontinuierliche Innenmembran nicht gleichmäßig, sondern strukturiert ist. So sind Carrier-Proteine präferenziell in der inneren Grenzmembran lokalisiert, wohingegen mit mitochondrialer DNA assoziierte Proteine und mitochondriale Ribosomen bevorzugt in enger Nachbarschaft zu Cristamembranen lokalisiert sind.

Neben mitochondrialen Proteinen konnte eine große Anzahl von Proteinen aus der Vakuole und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) detektiert werden, die zusammen mit Mitochondrien isoliert wurden. Dabei handelte es sich um Proteine, die entweder die isolierten Mitochondrien kontaminierten oder um Proteine von Membranen, die spezifisch mit der mitochondrialen Außenmembran interagieren. Auch diese Proteine wiesen typische SILAC-Profile auf.

Durch die relativ spezifische Korrelation von SILAC-Profilen und subzellulärer Lokalisation konnte für eine Vielzahl von bisher nicht charakterisierten Proteinen Lokalisationsvorschläge getätigt werden. Neben typischen SILAC-Profilen konnten auch Ausnahmen von Organellenspezifischen SILAC-Profilen gefunden werden. Diese legen eine Lokalisation von Proteinen in Organellen-übergreifenden Kontaktstellen nahe. So bot der Datensatz Nachweise dafür, dass Komponenten des ERMES-Komplexes (*e*ndoplasmic *r*eticulum-*m*itochondria encounter *s*tructure) an Kontaktstellen zwischen Mitochondrium und ER lokalisiert sind. Der ERMES-Komplex ist ein am Lipidtransfer und Lipidmetabolismus von Mitochondrien beteiligter Proteinkomplex. Auch für Enzyme der Ergosterol-Synthese, einen Sterol-Transporter sowie Phospholipasen konnte eine Anreicherung im Bereich von Membran-Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER gezeigt werden. Darüber hinaus legt die proteomische Lokalisationsstudie nahe, dass einige Proteine der Rab-GTPasen-Familie (Ypt-Proteine) eine essenzielle Funktion in der Herstellung und Modulierung von Organellen-übergreifenden Kontaktstellen haben.

Im weiteren Abschnitt der Arbeit wurde das Protein Aim31 als ein mitochondriales Innenmembran-Protein mit Atmungskettenenzym-modulierender Funktion charakterisiert. Aim31-defiziente Hefezellen zeigten ein eingeschränktes Wachstum auf einem nicht-

fermentierbaren Medium. Unter diesen Wachstumsbedingungen ist eine funktionierende oxidative Phosphorylierung essentiell. Weiterhin konnte ein deutlich prolongierter Wachstumsarrest bei einem Mediumwechsel von einer fermentierbaren auf eine nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle festgestellt werden. Das Protein interagiert mit Untereinheiten sowohl der Cytochrom c-Oxidase als auch der Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase. Das Fehlen des Proteins beeinträchtigt selektiv die enzymatische Aktivität der Cytochrom c-Oxidase sowie die Stabilität von höhermolekularen Superkomplexen der beiden Atmungskettenenzyme. Die eingeschränkte Enzymaktivität scheint nicht durch eine verminderte Abundanz der Untereinheiten zustande zu kommen, sondern ist vermutlich auf direkte Protein-Protein-Interaktionen von Aim31 mit Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase zurückzuführen.

Die hier vorgelegten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass mitochondriale Membranen heterogen sind. Obwohl die Membranen strukturell kontinuierlich sind, lassen sie sich in Abschnitte mit spezifischen Proteinverteilungen differenzieren. Die Analyse liefert weitere Evidenz für eine Kompartimentierung der Innenmembran und legt eine durch spezifische Membrankontakte vermittelte Kooperation der Außenmembran mit anderen Zellorganellen nahe. Die Charakterisierung des Proteins Aim31, welches die Stabilität von Atmungskettenenzymen beeinflusst, könnte eine Rolle in der Aufklärung der Pathophysiologie von Mitochondriopathien haben.

6 Literatur

- ALBERTS, B., WILSON, J. H. & HUNT, T. 2008. *Molecular biology of the cell*, New York, Garland Science.
- ALBRING, M., GRIFFITH, J. & ATTARDI, G. 1977. Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 1348-52.
- ALLEN, J. F. 2003. The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358, 19-37; discussion 37-8.
- AMIOTT, E. A., LOTT, P., SOTO, J., KANG, P. B., MCCAFFERY, J. M., DIMAURO, S., ABEL, E. D., FLANIGAN, K. M., LAWSON, V. H. & SHAW, J. M. 2008. Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp Neurol*, 211, 115-27.
- ASTUTI, D., LATIF, F., DALLOL, A., DAHIA, P. L., DOUGLAS, F., GEORGE, E., SKOLDBERG, F., HUSEBYE, E. S., ENG, C. & MAHER, E. R. 2001. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet*, 69, 49-54.
- ATHENSTAEDT, K., ZWEYTICK, D., JANDROSITZ, A., KOHLWEIN, S. D. & DAUM, G. 1999. Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 181, 6441-8.
- BALOYANNIS, S. J. 2006. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 9, 119-26.
- BARBOT, M., JANS, D. C., SCHULZ, C., DENKERT, N., KROPPE, B., HOPPERT, M., JAKOBS, S. & MEINECKE, M. 2015. Mic10 oligomerizes to bend mitochondrial inner membranes at cristae junctions. *Cell Metab*, 21, 756-63.
- BARBROOK, A. C., HOWE, C. J. & PURTON, S. 2006. Why are plastid genomes retained in non-photosynthetic organisms? *Trends Plant Sci*, 11, 101-8.
- BARKOVICH, A. J., GOOD, W. V., KOCH, T. K. & BERG, B. O. 1993. Mitochondrial disorders: analysis of their clinical and imaging characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol*, 14, 1119-37.
- BARRAGAN-CAMPOS, H. M., VALLEE, J. N., LO, D., BARRERA-RAMIREZ, C. F., ARGOTE-GREENE, M., SANCHEZ-GUERRERO, J., ESTANOL, B., GUILLEVIN, R. & CHIRAS, J. 2005. Brain magnetic resonance imaging findings in patients with mitochondrial cytopathies. *Arch Neurol*, 62, 737-42.
- BARROS, M. H., JOHNSON, A. & TZAGOLOFF, A. 2004. COX23, a homologue of COX17, is required for cytochrome oxidase assembly. *J Biol Chem*, 279, 31943-7.
- BARTH, P. G., SCHOLTE, H. R., BERDEN, J. A., VAN DER KLEI-VAN MOORSEL, J. M., LUYT-HOUWEN, I. E., VAN 'T VEER-KORTHOF, E. T., VAN DER HARTEN, J. J. & SOBOTKA-PLOJHAR, M. A. 1983. An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci*, 62, 327-55.
- BASELER, W. A., DABKOWSKI, E. R., WILLIAMSON, C. L., CROSTON, T. L., THAPA, D., POWELL, M. J., RAZUNGUZWA, T. T. & HOLLANDER, J. M. 2011. Proteomic alterations of distinct mitochondrial subpopulations in the type 1 diabetic heart: contribution of protein import dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300, R186-200.

- BAYLEY, J. P. & DEVILEE, P. 2010. Warburg tumours and the mechanisms of mitochondrial tumour suppressor genes. Barking up the right tree? *Curr Opin Genet Dev*, 20, 324-9.
- BAYSAL, B. E., FERRELL, R. E., WILLETT-BROZICK, J. E., LAWRENCE, E. C., MYSSIOREK, D., BOSCH, A., VAN DER MEY, A., TASCHNER, P. E., RUBINSTEIN, W. S., MYERS, E. N., RICHARD, C. W., 3RD, CORNELISSE, C. J., DEVILEE, P. & DEVLIN, B. 2000. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*, 287, 848-51.
- BENARD, G. & KARBOWSKI, M. 2009. Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 365-74.
- BENLI, M., DORING, F., ROBINSON, D. G., YANG, X. & GALLWITZ, D. 1996. Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *EMBO J*, 15, 6460-75.
- BEREITER-HAHN, J. 1990. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol*, 122, 1-63.
- BERNARDI, P. & AZZONE, G. F. 1981. Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem*, 256, 7187-92.
- BERNARDI, P., PETRONILLI, V., DI LISA, F. & FORTE, M. 2001. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci*, 26, 112-7.
- BERNARDI, P. & RASOLA, A. 2007. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem*, 45, 481-506.
- BERTONI-FREDDARI, C., FATTORETTI, P., CASOLI, T., DI STEFANO, G., SOLAZZI, M. & MEIER-RUGE, W. 2001. Quantitative cytochemical mapping of mitochondrial enzymes in rat cerebella. *Micron*, 32, 405-10.
- BEUTNER, G., RUCK, A., RIEDE, B. & BRDICZKA, D. 1998. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1368, 7-18.
- BEUTNER, G., RUCK, A., RIEDE, B., WELTE, W. & BRDICZKA, D. 1996. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett*, 396, 189-95.
- BIBB, M. J., VAN ETTEN, R. A., WRIGHT, C. T., WALBERG, M. W. & CLAYTON, D. A. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 26, 167-80.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.
- BLEAZARD, W., MCCAFFERY, J. M., KING, E. J., BALE, S., MOZDY, A., TIEU, Q., NUNNARI, J. & SHAW, J. M. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol*, 1, 298-304.
- BOEKEMA, E. J. & BRAUN, H. P. 2007. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem*, 282, 1-4.
- BOHNE, A. V. 2014. The nucleoid as a site of rRNA processing and ribosome assembly. *Front Plant Sci*, 5, 257.
- BOHNERT, M., ZERBES, R. M., DAVIES, K. M., MUHLEIP, A. W., RAMPALT, H., HORVATH, S. E., BOENKE, T., KRAM, A., PERSCHIL, I., VEENHUIS, M., KUHLEBRANDT, W., VAN DER KLEI, I. J., PFANNER, N. & VAN DER LAAN, M. 2015. Central role of Mic10 in the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Cell Metab*, 21, 747-55.
- BOHOVYCH, I., FERNANDEZ, M. R., RAHN, J. J., STACKLEY, K. D., BESTMAN, J. E., ANANDHAN, A., FRANCO, R., CLAYPOOL, S. M., LEWIS, R. E., CHAN, S. S. &

- KHALIMONCHUK, O. 2015. Metalloprotease OMA1 Fine-tunes Mitochondrial Bioenergetic Function and Respiratory Supercomplex Stability. *Sci Rep*, 5, 13989.
- BOUILLAUD, F., RICQUIER, D., GULIK-KRZYWICKI, T. & GARY-BOBO, C. M. 1983. The possible proton translocating activity of the mitochondrial uncoupling protein of brown adipose tissue. Reconstitution studies in liposomes. *FEBS Lett*, 164, 272-6.
- BOULET, L., KARPATI, G. & SHOUBRIDGE, E. A. 1992. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet*, 51, 1187-200.
- BOUMANS, H., GRIVELL, L. A. & BERDEN, J. A. 1998. The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem*, 273, 4872-7.
- BOURENS, M., FONTANESI, F., SOTO, I. C., LIU, J. & BARRIENTOS, A. 2013. Redox and reactive oxygen species regulation of mitochondrial cytochrome C oxidase biogenesis. *Antioxid Redox Signal*, 19, 1940-52.
- BOY-MARCOTTE, E., PERROT, M., BUSSEREAU, F., BOUCHERIE, H. & JACQUET, M. 1998. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 180, 1044-52.
- BRACHAT, S., DIETRICH, F. S., VOEGELI, S., ZHANG, Z., STUART, L., LERCH, A., GATES, K., GAFFNEY, T. & PHILIPSEN, P. 2003. Reinvestigation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome annotation by comparison to the genome of a related fungus: *Ashbya gossypii*. *Genome Biol*, 4, R45.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BROWN, J. A., SHERLOCK, G., MYERS, C. L., BURROWS, N. M., DENG, C., WU, H. I., MCCANN, K. E., TROYANSKAYA, O. G. & BROWN, J. M. 2006. Global analysis of gene function in yeast by quantitative phenotypic profiling. *Mol Syst Biol*, 2, 2006 0001.
- BUELER, H. 2010. Mitochondrial dynamics, cell death and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis*, 15, 1336-53.
- BURGER, G., GRAY, M. W. & LANG, B. F. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet*, 19, 709-16.
- BURSTEIN, C., LOYTER, A. & RACKER, E. 1971. Effect of phospholipases on the structure and function of mitochondria. *J Biol Chem*, 246, 4075-82.
- CALZADA, E., ONGUKA, O. & CLAYPOOL, S. M. 2016. Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol*, 321, 29-88.
- CAREW, J. S., ZHOU, Y., ALBITAR, M., CAREW, J. D., KEATING, M. J. & HUANG, P. 2003. Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. *Leukemia*, 17, 1437-47.
- CHABI, B., MOUSSON DE CAMARET, B., CHEVROLLIER, A., BOISGARD, S. & STEPIEN, G. 2005. Random mtDNA deletions and functional consequence in aged human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 332, 542-9.
- CHEN, C., KO, Y., DELANNOY, M., LUDTKE, S. J., CHIU, W. & PEDERSEN, P. L. 2004. Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*, 279, 31761-8.
- CHEN, H. & CHAN, D. C. 2010. Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann N Y Acad Sci*, 1201, 21-5.
- CHEN, H., DETMER, S. A., EWALD, A. J., GRIFFIN, E. E., FRASER, S. E. & CHAN, D. C. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160, 189-200.

- CHEN, H., VERMULST, M., WANG, Y. E., CHOMYN, A., PROLLA, T. A., MCCAFFERY, J. M. & CHAN, D. C. 2010. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*, 141, 280-9.
- CHEN, Y. C., TAYLOR, E. B., DEPHOURE, N., HEO, J. M., TONHATO, A., PAPANDREOU, I., NATH, N., DENKO, N. C., GYGI, S. P. & RUTTER, J. 2012. Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab*, 15, 348-60.
- CHO, J. H., LEE, Y. K. & CHAE, C. B. 2001. The modulation of the biological activities of mitochondrial histone Abf2p by yeast PKA and its possible role in the regulation of mitochondrial DNA content during glucose repression. *Biochim Biophys Acta*, 1522, 175-86.
- CHOI, J. H., LOU, W. & VANCURA, A. 1998. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 273, 29915-22.
- CHOJNACKA, M., GORNICKA, A., OELJEKLAUS, S., WARSCHEID, B. & CHACINSKA, A. 2015. Cox17 Protein Is an Auxiliary Factor Involved in the Control of the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System. *J Biol Chem*, 290, 15304-12.
- CHRYSOSTOMOU, V., REZANIA, F., TROUNCE, I. A. & CROWSTON, J. G. 2012. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*.
- CHU, C. T. 2010. A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 19, R28-37.
- CHURCH, C., GOEHRING, B., FORSHA, D., WAZNY, P. & POYTON, R. O. 2005. A role for Pet100p in the assembly of yeast cytochrome c oxidase: interaction with a subassembly that accumulates in a pet100 mutant. *J Biol Chem*, 280, 1854-63.
- CIPOLAT, S., RUDKA, T., HARTMANN, D., COSTA, V., SERNEELS, L., CRAESSAERTS, K., METZGER, K., FREZZA, C., ANNAERT, W., D'ADAMIO, L., DERKS, C., DEJAEGERE, T., PELLEGRINI, L., D'HOOGHE, R., SCORRANO, L. & DE STROOPER, B. 2006. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell*, 126, 163-75.
- COGLIATI, S., FREZZA, C., SORIANO, M. E., VARANITA, T., QUINTANA-CABRERA, R., CORRADO, M., CIPOLAT, S., COSTA, V., CASARIN, A., GOMES, L. C., PERALES-CLEMENTE, E., SALVIATI, L., FERNANDEZ-SILVA, P., ENRIQUEZ, J. A. & SCORRANO, L. 2013. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, 155, 160-71.
- COHEN, B. H. 2010. Pharmacologic effects on mitochondrial function. *Dev Disabil Res Rev*, 16, 189-99.
- CORREIA, S. C., SANTOS, R. X., PERRY, G., ZHU, X., MOREIRA, P. I. & SMITH, M. A. 2012. Mitochondrial importance in Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's diseases. *Adv Exp Med Biol*, 724, 205-21.
- COSTA, V. & SCORRANO, L. 2012. Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO J*, 31, 1853-64.
- COX, J. & MANN, M. 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 26, 1367-72.
- CRAIGEN, W. J. 2012. Mitochondrial DNA mutations: an overview of clinical and molecular aspects. *Methods Mol Biol*, 837, 3-15.
- CSERZO, M., WALLIN, E., SIMON, I., VON HEIJNE, G. & ELOFSSON, A. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng*, 10, 673-6.

- CSUKAI, M., MURRAY, M. & ORR, E. 1994. Isolation and complete sequence of CBR, a gene encoding a putative cytochrome b reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 219, 441-8.
- DAEMS, W. T. & WISSE, E. 1966. Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J Ultrastruct Res*, 16, 123-40.
- DARSHI, M., MENDIOLA, V. L., MACKEY, M. R., MURPHY, A. N., KOLLER, A., PERKINS, G. A., ELLISMAN, M. H. & TAYLOR, S. S. 2011. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem*, 286, 2918-32.
- DAUM, G. & VANCE, J. E. 1997. Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res*, 36, 103-30.
- DAVIDZON, G., MANCUSO, M., FERRARIS, S., QUINZII, C., HIRANO, M., PETERS, H. L., KIRBY, D., THORBURN, D. R. & DIMAURO, S. 2005. POLG mutations and Alpers syndrome. *Ann Neurol*, 57, 921-3.
- DAVIES, K. M., ANSELM, C., WITTIG, I., FARALDO-GOMEZ, J. D. & KUHLEBRANDT, W. 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13602-7.
- DAVIS, R. E., MILLER, S., HERRNSTADT, C., GHOSH, S. S., FAHY, E., SHINOBU, L. A., GALASKO, D., THAL, L. J., BEAL, M. F., HOWELL, N. & PARKER, W. D., JR. 1997. Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4526-31.
- DE PINTO, V. D. & PALMIERI, F. 1992. Transmembrane arrangement of mitochondrial porin or voltage-dependent anion channel (VDAC). *J Bioenerg Biomembr*, 24, 21-6.
- DEAN-JOHNSON, M. & HENRY, S. A. 1989. Biosynthesis of inositol in yeast. Primary structure of myo-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) and functional analysis of its structural gene, the INO1 locus. *J Biol Chem*, 264, 1274-83.
- DECUYPERE, J. P., MONACO, G., BULTYNCK, G., MISSIAEN, L., DE SMEDT, H. & PARYS, J. B. 2011. The IP(3) receptor-mitochondria connection in apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 1003-13.
- DEMEOCQ, F., STORME, B., SCHAISON, G., BEZOU, M. J., BOURGES, M. & CHASSAGNE, J. 1983. [Refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. Study of a new case]. *Arch Fr Pediatr*, 40, 631-5.
- DERISI, J. L., IYER, V. R. & BROWN, P. O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278, 680-6.
- DIAZ, F. & MORAES, C. T. 2008. Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium*, 44, 24-35.
- DIEBOLD, L. & CHANDEL, N. S. 2016. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic Biol Med*.
- DIENHART, M. K. & STUART, R. A. 2008. The yeast Aac2 protein exists in physical association with the cytochrome bc1-COX supercomplex and the TIM23 machinery. *Mol Biol Cell*, 19, 3934-43.
- DIMAURO, S. 2004. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1658, 80-8.
- DO, T. Q., HSU, A. Y., JONASSEN, T., LEE, P. T. & CLARKE, C. F. 2001. A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. *J Biol Chem*, 276, 18161-8.
- DOLDER, M., WENDT, S. & WALLIMANN, T. 2001. Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol Signals Recept*, 10, 93-111.

- DUDKINA, N. V., KUDRYASHEV, M., STAHLBERG, H. & BOEKEMA, E. J. 2011. Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 15196-200.
- DUDKINA, N. V., SUNDERHAUS, S., BOEKEMA, E. J. & BRAUN, H. P. 2008. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr*, 40, 419-24.
- DUSZYNSKI, J., BOGUCKA, K., LETKO, G., KUSTER, U., KUNZ, W. & WOJTCZAK, L. 1981. Relationship between the energy cost of ATP transport and ATP synthesis in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 637, 217-23.
- DYALL, S. D., AGIUS, S. C., DE MARCOS LOUSA, C., TREZEGUET, V. & TOKATLIDIS, K. 2003. The dynamic dimerization of the yeast ADP/ATP carrier in the inner mitochondrial membrane is affected by conserved cysteine residues. *J Biol Chem*, 278, 26757-64.
- EALLES, K. L., HOLLINSHEAD, K. E. & TENNANT, D. A. 2016. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*, 5, e190.
- ECHEVERRIA, M., ROBERT, D., CARDE, J. P. & LITVAK, S. 1991. Isolation from wheat mitochondria of a membrane-associated high molecular weight complex involved in DNA synthesis. *Plant Mol Biol*, 16, 301-15.
- EGNER, A., JAKOBS, S. & HELL, S. W. 2002. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3370-5.
- EL-HATTAB, A. W., ADESINA, A. M., JONES, J. & SCAGLIA, F. 2015. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab*, 116, 4-12.
- ELBAZ-ALON, Y., EISENBERG-BORD, M., SHINDER, V., STILLER, S. B., SHIMONI, E., WIEDEMANN, N., GEIGER, T. & SCHULDINER, M. 2015. Lam6 Regulates the Extent of Contacts between Organelles. *Cell Rep*, 12, 7-14.
- ELBAZ-ALON, Y., ROSENFELD-GUR, E., SHINDER, V., FUTERMAN, A. H., GEIGER, T. & SCHULDINER, M. 2014. A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev Cell*, 30, 95-102.
- ERNSTER, L. & SCHATZ, G. 1981. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol*, 91, 227s-255s.
- FEDORENKO, A., LISHKO, P. V. & KIRICHOK, Y. 2012. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, 151, 400-13.
- FIEDLER, S. & WIRTH, R. 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem*, 170, 38-44.
- FISCHER, F., FILIPPIS, C. & OSIEWACZ, H. D. 2015. RCF1-dependent respiratory supercomplexes are integral for lifespan-maintenance in a fungal ageing model. *Sci Rep*, 5, 12697.
- FREY, T. G., RENKEN, C. W. & PERKINS, G. A. 2002. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta*, 1555, 196-203.
- FREZZA, C., CIPOLAT, S., MARTINS DE BRITO, O., MICARONI, M., BEZNOUSSENKO, G. V., RUDKA, T., BARTOLI, D., POLISHUCK, R. S., DANIAL, N. N., DE STROOPER, B. & SCORRANO, L. 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, 126, 177-89.
- FRIEDMAN, J. R., MOURIER, A., YAMADA, J., MCCAFFERY, J. M. & NUNNARI, J. 2015. MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *Elife*, 4.

- FRITZ, S., RAPAPORT, D., KLANNER, E., NEUPERT, W. & WESTERMANN, B. 2001. Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol*, 152, 683-92.
- FRYER, A., APPLETON, R., SWEENEY, M. G., ROSENBLOOM, L. & HARDING, A. E. 1994. Mitochondrial DNA 8993 (NARP) mutation presenting with a heterogeneous phenotype including 'cerebral palsy'. *Arch Dis Child*, 71, 419-22.
- FUJIKI, Y., HUBBARD, A. L., FOWLER, S. & LAZAROW, P. B. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 93, 97-102.
- FUKUHARA, N., TOKIGUCHI, S., SHIRAKAWA, K. & TSUBAKI, T. 1980. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci*, 47, 117-33.
- FUKUSHIMA, N. H., BRISCH, E., KEEGAN, B. R., BLEAZARD, W. & SHAW, J. M. 2001. The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, 12, 2756-66.
- FURUKAWA, A., KAWAMOTO, Y., CHIBA, Y., TAKEI, S., HASEGAWA-ISHII, S., KAWAMURA, N., YOSHIKAWA, K., HOSOKAWA, M., OIKAWA, S., KATO, M. & SHIMADA, A. 2011. Proteomic identification of hippocampal proteins vulnerable to oxidative stress in excitotoxin-induced acute neuronal injury. *Neurobiol Dis*, 43, 706-14.
- GALDIERI, L., MEHROTRA, S., YU, S. & VANCURA, A. 2010. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *OMICS*, 14, 629-38.
- GARRETT, M. D., ZAHNER, J. E., CHENEY, C. M. & NOVICK, P. J. 1994. GDI1 encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *EMBO J*, 13, 1718-28.
- GATTA, A. T., WONG, L. H., SERE, Y. Y., CALDERON-NORENA, D. M., COCKCROFT, S., MENON, A. K. & LEVINE, T. P. 2015. A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport. *Elife*, 4.
- GAUTHIER-VILLARS, M., LANDRIEU, P., CORMIER-DAIRE, V., JACQUEMIN, E., CHRETIEN, D., ROTIG, A., RUSTIN, P., MUNNICH, A. & DE LONLAY, P. 2001. Respiratory chain deficiency in Alpers syndrome. *Neuropediatrics*, 32, 150-2.
- GERHOLD, J. M., CANSIZ-ARDA, S., LOHMUS, M., ENGBERG, O., REYES, A., VAN RENNES, H., SANZ, A., HOLT, I. J., COOPER, H. M. & SPELBRINK, J. N. 2015. Human Mitochondrial DNA-Protein Complexes Attach to a Cholesterol-Rich Membrane Structure. *Sci Rep*, 5, 15292.
- GHEZZI, D. & ZEVIANI, M. 2012. Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. *Adv Exp Med Biol*, 748, 65-106.
- GIETZ, R. D., SCHIESTL, R. H., WILLEMS, A. R. & WOODS, R. A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11, 355-60.
- GILKERSON, R., BRAVO, L., GARCIA, I., GAYTAN, N., HERRERA, A., MALDONADO, A. & QUINTANILLA, B. 2013. The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a011080.
- GILKERSON, R. W., SELKER, J. M. & CAPALDI, R. A. 2003. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*, 546, 355-8.

- GLERUM, D. M., SHTANKO, A. & TZAGOLOFF, A. 1996. SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271, 20531-5.
- GLOVER, J. R., ANDREWS, D. W. & RACHUBINSKI, R. A. 1994. *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10541-5.
- GOLD, V. A., IEVA, R., WALTER, A., PFANNER, N., VAN DER LAAN, M. & KUHLBRANDT, W. 2014. Visualizing active membrane protein complexes by electron cryotomography. *Nat Commun*, 5, 4129.
- GRAY, M. W. 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol*, 141, 233-357.
- GREBENOK, R. J., OHNMEISS, T. E., YAMAMOTO, A., HUNTLEY, E. D., GALBRAITH, D. W. & DELLA PENNA, D. 1998. Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* C-8,7 sterol isomerase: functional and structural similarities to mammalian C-8,7 sterol isomerase/emopamil-binding protein. *Plant Mol Biol*, 38, 807-15.
- GRIFFITHS, E. J. 2012. Mitochondria and heart disease. *Adv Exp Med Biol*, 942, 249-67.
- GROSSHANS, B. L., ORTIZ, D. & NOVICK, P. 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 11821-7.
- GUARANI, V., MCNEILL, E. M., PAULO, J. A., HUTTLIN, E. L., FROHLICH, F., GYGI, S. P., VAN VACTOR, D. & HARPER, J. W. 2015. QIL1 is a novel mitochondrial protein required for MICOS complex stability and cristae morphology. *Elife*, 4.
- HABERSETZER, J., ZIANI, W., LARRIEU, I., STINES-CHAUMEIL, C., GIRAUD, M. F., BRETHER, D., DAUTANT, A. & PAUMARD, P. 2012. ATP synthase oligomerization: From the enzyme models to the mitochondrial morphology. *Int J Biochem Cell Biol*.
- HACKENBROCK, C. R. 1966. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol*, 30, 269-97.
- HACKENBROCK, C. R. 1968a. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61, 598-605.
- HACKENBROCK, C. R. 1968b. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J Cell Biol*, 37, 345-69.
- HALL, R. M., MATTICK, J. S., MARZUKI, S. & LINNANE, A. W. 1975. Evidence for a functional association of DNA synthesis with the membrane in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Rep*, 2, 101-6.
- HAMADA, K., FUKUCHI, S., ARISAWA, M., BABA, M. & KITADA, K. 1998. Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 258, 53-9.
- HARNER, M., KORNER, C., WALTHER, D., MOKRANJAC, D., KAESMACHER, J., WELSCH, U., GRIFFITH, J., MANN, M., REGGIORI, F. & NEUPERT, W. 2011. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J*, 30, 4356-70.
- HARNER, M. E., UNGER, A. K., IZAWA, T., WALTHER, D. M., OZBALCI, C., GEIMER, S., REGGIORI, F., BRUGGER, B., MANN, M., WESTERMANN, B. & NEUPERT, W. 2014. Aim24 and MICOS modulate respiratory function, tafazzin-related cardiolipin modification and mitochondrial architecture. *Elife*, 3, e01684.
- HAYASHI, T., ASANO, Y., SHINTANI, Y., AOYAMA, H., KIOKA, H., TSUKAMOTO, O., HIKITA, M., SHINZAWA-ITOH, K., TAKAFUJI, K., HIGO, S., KATO, H., YAMAZAKI, S., MATSUOKA, K., NAKANO, A., ASANUMA, H., ASAKURA, M., MINAMINO, T., GOTO, Y., OGURA, T., KITAKAZE, M., KOMURO, I.,

- SAKATA, Y., TSUKIHARA, T., YOSHIKAWA, S. & TAKASHIMA, S. 2015. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 1553-8.
- HAYASHI, T., RIZZUTO, R., HAJNOCZKY, G. & SU, T. P. 2009. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*, 19, 81-8.
- HE, J., COOPER, H. M., REYES, A., DI RE, M., SEMBONGI, H., LITWIN, T. R., GAO, J., NEUMAN, K. C., FEARNLEY, I. M., SPINAZZOLA, A., WALKER, J. E. & HOLT, I. J. 2012. Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res*, 40, 6109-21.
- HECHT, K. A., WYTIAZ, V. A., AST, T., SCHULDINER, M. & BRODSKY, J. L. 2013. Characterization of an M28 metalloprotease family member residing in the yeast vacuole. *FEMS Yeast Res*, 13, 471-84.
- HELBIG, A. O., DE GROOT, M. J., VAN GESTEL, R. A., MOHAMMED, S., DE HULSTER, E. A., LUTTIK, M. A., DARAN-LAPUJADE, P., PRONK, J. T., HECK, A. J. & SLIJPER, M. 2009. A three-way proteomics strategy allows differential analysis of yeast mitochondrial membrane protein complexes under anaerobic and aerobic conditions. *Proteomics*, 9, 4787-98.
- HELLE, S. C., KANFER, G., KOLAR, K., LANG, A., MICHEL, A. H. & KORNMANN, B. 2013. Organization and function of membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 2526-41.
- HERLAN, M., BORNHOVD, C., HELL, K., NEUPERT, W. & REICHERT, A. S. 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol*, 165, 167-73.
- HERRMANN, J. M. & FUNES, S. 2005. Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene*, 354, 43-52.
- HESS, D. C., MYERS, C. L., HUTTENHOWER, C., HIBBS, M. A., HAYES, A. P., PAW, J., CLORE, J. J., MENDOZA, R. M., LUIS, B. S., NISLOW, C., GIAEVER, G., COSTANZO, M., TROYANSKAYA, O. G. & CAUDY, A. A. 2009. Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS Genet*, 5, e1000407.
- HOBBS, A. E., SRINIVASAN, M., MCCAFFERY, J. M. & JENSEN, R. E. 2001. Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol*, 152, 401-10.
- HONSCHER, C., MARI, M., AUFFARTH, K., BOHNERT, M., GRIFFITH, J., GEERTS, W., VAN DER LAAN, M., CABRERA, M., REGGIORI, F. & UNGERMANN, C. 2014. Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev Cell*, 30, 86-94.
- HOPPINS, S., COLLINS, S. R., CASSIDY-STONE, A., HUMMEL, E., DEVAY, R. M., LACKNER, L. L., WESTERMANN, B., SCHULDINER, M., WEISSMAN, J. S. & NUNNARI, J. 2011. A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol*, 195, 323-40.
- HOPPINS, S., LACKNER, L. & NUNNARI, J. 2007. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76, 751-80.
- HOVIUS, R., LAMBRECHTS, H., NICOLAY, K. & DE KRUIJFF, B. 1990. Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1021, 217-26.
- HUA, Z., FATHEDDIN, P. & GRAHAM, T. R. 2002. An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol Biol Cell*, 13, 3162-77.

- HUH, W. K., FALVO, J. V., GERKE, L. C., CARROLL, A. S., HOWSON, R. W., WEISSMAN, J. S. & O'SHEA, E. K. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425, 686-91.
- HUYNEN, M. A., MUHLMEISTER, M., GOTTHARDT, K., GUERRERO-CASTILLO, S. & BRANDT, U. 2016. Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 91-101.
- ISHIHARA, N., NOMURA, M., JOFUKU, A., KATO, H., SUZUKI, S. O., MASUDA, K., OTERA, H., NAKANISHI, Y., NONAKA, I., GOTO, Y., TAGUCHI, N., MORINAGA, H., MAEDA, M., TAKAYANAGI, R., YOKOTA, S. & MIHARA, K. 2009. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol*, 11, 958-66.
- JACKSON, D. D. & STEVENS, T. H. 1997. VMA12 encodes a yeast endoplasmic reticulum protein required for vacuolar H⁺-ATPase assembly. *J Biol Chem*, 272, 25928-34.
- JAIN, I. H., ZAZZERON, L., GOLI, R., ALEXA, K., SCHATZMAN-BONE, S., DHILLON, H., GOLDBERGER, O., PENG, J., SHALEM, O., SANJANA, N. E., ZHANG, F., GOESSLING, W., ZAPOL, W. M. & MOOTHA, V. K. 2016. Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science*, 352, 54-61.
- JOHN, G. B., SHANG, Y., LI, L., RENKEN, C., MANNELLA, C. A., SELKER, J. M., RANGELL, L., BENNETT, M. J. & ZHA, J. 2005. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell*, 16, 1543-54.
- KALINA, M., WEAVERS, B. & PEARSE, A. G. 1969. Fine structural localization of succinoxidase complex on the mitochondrial cristae. *Nature*, 221, 479-80.
- KAUFMAN, B. A., NEWMAN, S. M., HALLBERG, R. L., SLAUGHTER, C. A., PERLMAN, P. S. & BUTOW, R. A. 2000. In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7772-7.
- KEARNS, T. P. & SAYRE, G. P. 1958. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA Arch Ophthalmol*, 60, 280-9.
- KHALIMONCHUK, O., BIRD, A. & WINGE, D. R. 2007. Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, 282, 17442-9.
- KISPAL, G., SIPOS, K., LANGE, H., FEKETE, Z., BEDEKOVICS, T., JANAKY, T., BASSLER, J., AGUILAR NETZ, D. J., BALK, J., ROTTE, C. & LILL, R. 2005. Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J*, 24, 589-98.
- KLECKER, T. & WESTERMANN, B. 2014. Mitochondria are clamped to vacuoles for lipid transport. *Dev Cell*, 30, 1-2.
- KLINGENBERG, M. 1989. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 270, 1-14.
- KNOP, M., SIEGERS, K., PEREIRA, G., ZACHARIAE, W., WINSOR, B., NASMYTH, K. & SCHIEBEL, E. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, 15, 963-72.
- KOENIG, T., MENZE, B. H., KIRCHNER, M., MONIGATTI, F., PARKER, K. C., PATTERSON, T., STEEN, J. J., HAMPRECHT, F. A. & STEEN, H. 2008. Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *J Proteome Res*, 7, 3708-17.
- KOOPMAN, W. J., WILLEMS, P. H. & SMEITINK, J. A. 2012. Monogenic mitochondrial disorders. *N Engl J Med*, 366, 1132-41.
- KORNER, C., BARRERA, M., DUKANOVIC, J., EYDT, K., HARNER, M., RABL, R., VOGEL, F., RAPAPORT, D., NEUPERT, W. & REICHERT, A. S. 2012. The C-

- terminal domain of Fcjl is required for formation of crista junctions and interacts with the TOB/SAM complex in mitochondria. *Mol Biol Cell*, 23, 2143-55.
- KORNMANN, B., CURRIE, E., COLLINS, S. R., SCHULDINER, M., NUNNARI, J., WEISSMAN, J. S. & WALTER, P. 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*, 325, 477-81.
- KORNMANN, B., OSMAN, C. & WALTER, P. 2011. The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 14151-6.
- KOSHIBA, T., DETMER, S. A., KAISER, J. T., CHEN, H., MCCAFFERY, J. M. & CHAN, D. C. 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305, 858-62.
- KRICK, R., HENKE, S., TOLSTRUP, J. & THUMM, M. 2008. Dissecting the localization and function of Atg18, Atg21 and Ygr223c. *Autophagy*, 4, 896-910.
- KRISHNAN, K. J., GREAVES, L. C., REEVE, A. K. & TURNBULL, D. M. 2007. Mitochondrial DNA mutations and aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1100, 227-40.
- KROEMER, G. & POUYSSEGUR, J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13, 472-82.
- KUMAR, A., AGARWAL, S., HEYMAN, J. A., MATSON, S., HEIDTMAN, M., PICCIRILLO, S., UMANSKY, L., DRAWID, A., JANSEN, R., LIU, Y., CHEUNG, K. H., MILLER, P., GERSTEIN, M., ROEDER, G. S. & SNYDER, M. 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev*, 16, 707-19.
- KUSTER, U., LETKO, G., KUNZ, W., DUSZYNSKY, J., BOGUCKA, K. & WOJTCZAK, L. 1981. Influence of different energy drains on the interrelationship between the rate of respiration, proton-motive force and adenine nucleotide patterns in isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 636, 32-8.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAHIRI, S., CHAO, J. T., TAVASSOLI, S., WONG, A. K., CHOUDHARY, V., YOUNG, B. P., LOEWEN, C. J. & PRINZ, W. A. 2014. A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biol*, 12, e1001969.
- LANE, N. & MARTIN, W. 2010. The energetics of genome complexity. *Nature*, 467, 929-34.
- LANG, A., JOHN PETER, A. T. & KORNMANN, B. 2015a. ER-mitochondria contact sites in yeast: beyond the myths of ERMES. *Curr Opin Cell Biol*, 35, 7-12.
- LANG, A. B., JOHN PETER, A. T., WALTER, P. & KORNMANN, B. 2015b. ER-mitochondrial junctions can be bypassed by dominant mutations in the endosomal protein Vps13. *J Cell Biol*, 210, 883-90.
- LARDY, H. A. & FERGUSON, S. M. 1969. Oxidative phosphorylation in mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 38, 991-1034.
- LARSSON, N. G. 2010. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem*, 79, 683-706.
- LEA, P. J., TEMKIN, R. J., FREEMAN, K. B., MITCHELL, G. A. & ROBINSON, B. H. 1994. Variations in mitochondrial ultrastructure and dynamics observed by high resolution scanning electron microscopy (HRSEM). *Microsc Res Tech*, 27, 269-77.
- LEAN, M. E. & JAMES, W. P. 1983. Uncoupling protein in human brown adipose tissue mitochondria. Isolation and detection by specific antiserum. *FEBS Lett*, 163, 235-40.
- LEBER, R., LANDL, K., ZINSER, E., AHORN, H., SPOK, A., KOHLWEIN, S. D., TURNOWSKY, F. & DAUM, G. 1998. Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles. *Mol Biol Cell*, 9, 375-86.

- LEBIEDZINSKA, M., SZABADKAI, G., JONES, A. W., DUSZYNSKI, J. & WIECKOWSKI, M. R. 2009. Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 1805-16.
- LEE, H. C. & WEI, Y. H. 2012. Mitochondria and aging. *Adv Exp Med Biol*, 942, 311-27.
- LEE, H. F., TSAI, C. R., CHI, C. S., LEE, H. J. & CHEN, C. C. 2009. Leigh syndrome: clinical and neuroimaging follow-up. *Pediatr Neurol*, 40, 88-93.
- LEIGH, D. 1951. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 14, 216-21.
- LENAZ, G. 2012. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol*, 942, 93-136.
- LEONARD, J. V. & SCHAPIRA, A. H. 2000. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet*, 355, 299-304.
- LESTIENNE, P. & PONSOT, G. 1988. Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *Lancet*, 1, 885.
- LI, H., RUAN, Y., ZHANG, K., JIAN, F., HU, C., MIAO, L., GONG, L., SUN, L., ZHANG, X., CHEN, S., CHEN, H., LIU, D. & SONG, Z. 2016. Mic60/Mitofilin determines MICOS assembly essential for mitochondrial dynamics and mtDNA nucleoid organization. *Cell Death Differ*, 23, 380-92.
- LIGUORI, R., GIANNOCCARO, M. P., ARNOLDI, A., CITTERIO, A., TONON, C., LODI, R., BRESOLIN, N. & BASSI, M. T. 2014. Impairment of brain and muscle energy metabolism detected by magnetic resonance spectroscopy in hereditary spastic paraparesis type 28 patients with DDHD1 mutations. *J Neurol*, 261, 1789-93.
- LILL, R. & KISPAL, G. 2000. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25, 352-6.
- LIN, D. D., CRAWFORD, T. O. & BARKER, P. B. 2003. Proton MR spectroscopy in the diagnostic evaluation of suspected mitochondrial disease. *AJNR Am J Neuroradiol*, 24, 33-41.
- LIU, B., XUE, Y., ZHAO, W., CHEN, Y., FAN, C., GU, L., ZHANG, Y., ZHANG, X., SUN, L., HUANG, X., DING, W., SUN, F., JI, W. & XU, T. 2015. Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. *Sci Rep*, 5, 13017.
- LIU, T. T., GOMEZ, T. S., SACKEY, B. K., BILLADEAU, D. D. & BURD, C. G. 2012. Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol Biol Cell*, 23, 2505-15.
- LOEWEN, C. J., GASPAR, M. L., JESCH, S. A., DELON, C., KTISTAKIS, N. T., HENRY, S. A. & LEVINE, T. P. 2004. Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science*, 304, 1644-7.
- LOEWEN, C. J., ROY, A. & LEVINE, T. P. 2003. A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J*, 22, 2025-35.
- LONGTINE, M. S., MCKENZIE, A., 3RD, DEMARINI, D. J., SHAH, N. G., WACH, A., BRACHAT, A., PHILIPPSEN, P. & PRINGLE, J. R. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 953-61.
- LU, Y. W. & CLAYPOOL, S. M. 2015. Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Front Genet*, 6, 3.
- MAGARIELLO, A., CITRIGNO, L., ZUCHNER, S., GONZALEZ, M., PATITUCCI, A., SOFIA, V., CONFORTI, F. L., PAPPALARDO, I., MAZZEI, R., UNGARO, C., ZAPPIA, M. & MUGLIA, M. 2014. Further evidence that DDHD2 gene mutations cause autosomal recessive hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Eur J Neurol*, 21, e25-6.

- MAGRI, S., FRACASSO, V., RIMOLDI, M. & TARONI, F. 2010. Preparation of yeast mitochondria and *in vitro* assay of respiratory chain complex activities.
- MANCUSO, M., ORSUCCI, D., ANGELINI, C., BERTINI, E., CARELLI, V., COMI, G. P., MINETTI, C., MOGGIO, M., MONGINI, T., SERVIDEI, S., TONIN, P., TOSCANO, A., UZIEL, G., BRUNO, C., CALDARAZZO IENCO, E., FILOSTO, M., LAMPERTI, C., MARTINELLI, D., MORONI, I., MUSUMECI, O., PEGORARO, E., RONCHI, D., SANTORELLI, F. M., SAUCHELLI, D., SCARPELLI, M., SCIACCO, M., SPINAZZI, M., VALENTINO, M. L., VERCELLI, L., ZEVIANI, M. & SICILIANO, G. 2013. Phenotypic heterogeneity of the 8344A>G mtDNA "MERRF" mutation. *Neurology*, 80, 2049-54.
- MANNELLA, C. A., BUTTLE, K., RATH, B. K. & MARKO, M. 1998. Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *Biofactors*, 8, 225-8.
- MANNELLA, C. A., MARKO, M. & BUTTLE, K. 1997. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci*, 22, 37-8.
- MANNELLA, C. A., MARKO, M., PENCZEK, P., BARNARD, D. & FRANK, J. 1994. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech*, 27, 278-83.
- MANNELLA, C. A., PFEIFFER, D. R., BRADSHAW, P. C., MORARU, II, SLEPCHENKO, B., LOEW, L. M., HSIEH, C. E., BUTTLE, K. & MARKO, M. 2001. Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*, 52, 93-100.
- MARIE, S. K., CARVALHO, A. A., FONSECA, L. F., CARVALHO, M. S., REED, U. C. & SCAFF, M. 1999. Kearns-Sayre syndrome "plus". Classical clinical findings and dystonia. *Arq Neuropsiquiatr*, 57, 1017-23.
- MARTIN, L. J. 2011. Mitochondrial pathobiology in ALS. *J Bioenerg Biomembr*, 43, 569-79.
- MASHIMA, Y., HIIDA, Y. & OGUCHI, Y. 1992. Remission of Leber's hereditary optic neuropathy with idebenone. *Lancet*, 340, 368-9.
- MASHIMA, Y., KIGASAWA, K., WAKAKURA, M. & OGUCHI, Y. 2000. Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in Leber hereditary optic neuropathy? *J Neuroophthalmol*, 20, 166-70.
- MCDONNELL, A. V., JIANG, T., KEATING, A. E. & BERGER, B. 2006. Paircoil2: improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics*, 22, 356-8.
- MCLENDON, J. M., ALVAREZ, D. F., GORODNYA, O. M., SUKHANOV, S., RACHEK, L. I., GILLESPIE, M. N. & RUCHKO, M. V. 2015. Abstract 16301: Oxidative Mitochondrial DNA Damage Affects Mitochondrial Respiration and Cardiac Development in Mice With Altered DNA Repair. *Circulation*, 132, A16301.
- MEEUSEN, S., MCCAFFERY, J. M. & NUNNARI, J. 2004. Mitochondrial fusion intermediates revealed *in vitro*. *Science*, 305, 1747-52.
- MEEUSEN, S., TIEU, Q., WONG, E., WEISS, E., SCHIELTZ, D., YATES, J. R. & NUNNARI, J. 1999. Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *J Cell Biol*, 145, 291-304.
- MERKWIRTH, C., DARGAZANLI, S., TATSUTA, T., GEIMER, S., LOWER, B., WUNDERLICH, F. T., VON KLEIST-RETZOW, J. C., WAISMAN, A., WESTERMANN, B. & LANGER, T. 2008. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev*, 22, 476-88.
- MERKWIRTH, C. & LANGER, T. 2009. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 27-32.

- MESSERSCHMITT, M., JAKOBS, S., VOGEL, F., FRITZ, S., DIMMER, K. S., NEUPERT, W. & WESTERMANN, B. 2003. The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol*, 160, 553-64.
- MILENKOVIC, D. & LARSSON, N. G. 2015. Mic10 Oligomerization Pinches off Mitochondrial Cristae. *Cell Metab*, 21, 660-1.
- MILEYKOVSKAYA, E. & DOWHAN, W. 2014. Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem Phys Lipids*, 179, 42-8.
- MILLER, W. L. 2011. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Endocr Dev*, 20, 1-19.
- MILONE, M. 2012. Mitochondria, diabetes, and Alzheimer's disease. *Diabetes*, 61, 991-2.
- MISHRA, N. C. & KUMAR, S. 2005. Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death. *Indian J Exp Biol*, 43, 25-34.
- MISHRA, P. & CHAN, D. C. 2014. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 634-46.
- MITCHELL, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-8.
- MONNE, M., PALMIERI, F. & KUNJI, E. R. 2013. The substrate specificity of mitochondrial carriers: mutagenesis revisited. *Mol Membr Biol*, 30, 149-59.
- MORRIS, S. A. & HARBORD, M. G. 1993. Infant onset subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh's disease). *J Paediatr Child Health*, 29, 363-7.
- MUHLENHOFF, U., BALK, J., RICHHARDT, N., KAISER, J. T., SIPOS, K., KISPAL, G. & LILL, R. 2004. Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279, 36906-15.
- MULLER, O., NEUMANN, H., BAYER, M. J. & MAYER, A. 2003. Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking. *J Cell Sci*, 116, 1107-15.
- MURATSUBAKI, H. & ENOMOTO, K. 1998. One of the fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the OSM1 gene. *Arch Biochem Biophys*, 352, 175-81.
- MURLEY, A., LACKNER, L. L., OSMAN, C., WEST, M., VOELTZ, G. K., WALTER, P. & NUNNARI, J. 2013. ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife*, 2, e00422.
- MURLEY, A., SARSAM, R. D., TOULMAY, A., YAMADA, J., PRINZ, W. A. & NUNNARI, J. 2015. Ltc1 is an ER-localized sterol transporter and a component of ER-mitochondria and ER-vacuole contacts. *J Cell Biol*, 209, 539-48.
- MYUNG, J. K., GULESSERIAN, T., FOUNTOULAKIS, M. & LUBEC, G. 2003. Deranged hypothetical proteins Rik protein, Nit protein 2 and mitochondrial inner membrane protein, Mitofilin, in fetal Down syndrome brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 49, 739-46.
- NASS, M. M. & NASS, S. 1963a. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol*, 19, 593-611.
- NASS, S. & NASS, M. M. 1963b. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *J Cell Biol*, 19, 613-29.
- NAVIAUX, R. K. & NGUYEN, K. V. 2005. POLG mutations associated with Alpers syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol*, 58, 491.
- NEUPERT, W. & HERRMANN, J. M. 2007. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76, 723-49.
- NOLAN, R. D. & ARNSTEIN, H. R. 1969. The dissociation of rabbit reticulocyte ribosomes with EDTA and the location of messenger ribonucleic acid. *Eur J Biochem*, 9, 445-50.
- OGASAHARA, S., NISHIKAWA, Y., YORIFUJI, S., SOGA, F., NAKAMURA, Y., TAKAHASHI, M., HASHIMOTO, S., KONO, N. & TARUI, S. 1986. Treatment of Kearns-Sayre syndrome with coenzyme Q10. *Neurology*, 36, 45-53.

- OHLENDIECK, K., RIESINGER, I., ADAMS, V., KRAUSE, J. & BRDICZKA, D. 1986. Enrichment and biochemical characterization of boundary membrane contact sites from rat-liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 860, 672-89.
- OKAMOTO, K. & SHAW, J. M. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 39, 503-36.
- OLDENBURG, K. R., VO, K. T., MICHAELIS, S. & PADDON, C. 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res*, 25, 451-2.
- OMORI, A., ICHINOSE, S., KITAJIMA, S., SHIMOTOHNO, K. W., MURASHIMA, Y. L., SHIMOTOHNO, K. & SETO-OHSHIMA, A. 2002. Gerbils of a seizure-sensitive strain have a mitochondrial inner membrane protein with different isoelectric points from those of a seizure-resistant strain. *Electrophoresis*, 23, 4167-74.
- ONG, S. E. & MANN, M. 2006. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*, 1, 2650-60.
- OSMAN, C., HAAG, M., WIELAND, F. T., BRUGGER, B. & LANGER, T. 2010. A mitochondrial phosphatase required for cardiolipin biosynthesis: the PGP phosphatase Gep4. *EMBO J*, 29, 1976-87.
- OSMAN, C., VOELKER, D. R. & LANGER, T. 2011. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol*, 192, 7-16.
- OTT, C., ROSS, K., STRAUB, S., THIEDE, B., GOTZ, M., GOOSMANN, C., KRISCHKE, M., MUELLER, M. J., KROHNE, G., RUDEL, T. & KOZJAK-PAVLOVIC, V. 2012. Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes. *Mol Cell Biol*, 32, 1173-88.
- OTT, M., PRESTELE, M., BAUERSCHMITT, H., FUNES, S., BONNEFOY, N. & HERRMANN, J. M. 2006. Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J*, 25, 1603-10.
- PAIVA, S., DEVAUX, F., BARBOSA, S., JACQ, C. & CASAL, M. 2004. Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21, 201-10.
- PALADE, G. E. 1952. The fine structure of mitochondria. *Anat Rec*, 114, 427-51.
- PALADE, G. E. 1953. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*, 1, 188-211.
- PALMIERI, F. 1994. Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett*, 346, 48-54.
- PARK, S., HANEKAMP, T., THORSNESS, M. K. & THORSNESS, P. E. 2006. Yme2p is a mediator of nucleoid structure and number in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 50, 173-82.
- PARKER, W. D., JR., PARKS, J., FILLEY, C. M. & KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K. 1994. Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology*, 44, 1090-6.
- PARONE, P. A., DA CRUZ, S., TONDERA, D., MATTENBERGER, Y., JAMES, D. I., MAEHLER, P., BARJA, F. & MARTINOU, J. C. 2008. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One*, 3, e3257.
- PAVELKA, M., ROTH, J. 2015. Functional Ultrastructure. Atlas of Tissue Biology and Pathology. Third Edition. Springer Verlag. ISBN: 978-3-7091-1829-0. Page 157.
- PAYNE, M., YANG, Z., KATZ, B. J., WARNER, J. E., WEIGHT, C. J., ZHAO, Y., PEARSON, E. D., TREFT, R. L., HILLMAN, T., KENNEDY, R. J., MEIRE, F. M. & ZHANG, K. 2004. Dominant optic atrophy, sensorineural hearing loss, ptosis, and ophthalmoplegia: a syndrome caused by a missense mutation in OPA1. *Am J Ophthalmol*, 138, 749-55.

- PEARSON, H. A., LOBEL, J. S., KOCOSHIS, S. A., NAIMAN, J. L., WINDMILLER, J., LAMMI, A. T., HOFFMAN, R. & MARSH, J. C. 1979. A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J Pediatr*, 95, 976-84.
- PEBAY-PEYROULA, E. & BRANDOLIN, G. 2004. Nucleotide exchange in mitochondria: insight at a molecular level. *Curr Opin Struct Biol*, 14, 420-5.
- PECK, B. & SCHULZE, A. 2016. Lipid Desaturation: the next step in targeting lipogenesis in cancer? *FEBS J*.
- PENG, B., WILLIAMS, T. C., HENRY, M., NIELSEN, L. K. & VICKERS, C. E. 2015. Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities. *Microb Cell Fact*, 14, 91.
- PEREZ-MARTINEZ, X., BROADLEY, S. A. & FOX, T. D. 2003. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J*, 22, 5951-61.
- PEREZ-MARTINEZ, X., BUTLER, C. A., SHINGU-VAZQUEZ, M. & FOX, T. D. 2009. Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol Biol Cell*, 20, 4371-80.
- PERKINS, D. N., PAPPIN, D. J., CREASY, D. M. & COTTRELL, J. S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, 3551-67.
- PERKINS, G., RENKEN, C., MARTONE, M. E., YOUNG, S. J., ELLISMAN, M. & FREY, T. 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*, 119, 260-72.
- PERKINS, G. A., SONG, J. Y., TARSA, L., DEERINCK, T. J., ELLISMAN, M. H. & FREY, T. G. 1998. Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions. *J Bioenerg Biomembr*, 30, 431-42.
- PEROTTI, M. E., ANDERSON, W. A. & SWIFT, H. 1983. Quantitative cytochemistry of the diaminobenzidine cytochrome oxidase reaction product in mitochondria of cardiac muscle and pancreas. *J Histochem Cytochem*, 31, 351-65.
- PFANNER, N., RASSOW, J., WIENHUES, U., HERGERSBERG, C., SOLLNER, T., BECKER, K. & NEUPERT, W. 1990. Contact sites between inner and outer membranes: structure and role in protein translocation into the mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1018, 239-42.
- PFANNER, N., VAN DER LAAN, M., AMATI, P., CAPALDI, R. A., CAUDY, A. A., CHACINSKA, A., DARSHI, M., DECKERS, M., HOPPINS, S., ICHO, T., JAKOBS, S., JI, J., KOZJAK-PAVLOVIC, V., MEISINGER, C., ODGREN, P. R., PARK, S. K., REHLING, P., REICHERT, A. S., SHEIKH, M. S., TAYLOR, S. S., TSUCHIDA, N., VAN DER BLIEK, A. M., VAN DER KLEI, I. J., WEISSMAN, J. S., WESTERMANN, B., ZHA, J., NEUPERT, W. & NUNNARI, J. 2014. Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Cell Biol*, 204, 1083-6.
- PFEFFER, S., WOELLHAF, M. W., HERRMANN, J. M. & FORSTER, F. 2015. Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nat Commun*, 6, 6019.
- PIOTROWSKA, A., KORWIN, M., BARTNIK, E. & TONSKA, K. 2015. Leber hereditary optic neuropathy - historical report in comparison with the current knowledge. *Gene*, 555, 41-9.
- PLECITA-HLAVATA, L., ENGSTOVA, H., ALAN, L., SPACEK, T., DLASKOVA, A., SMOLKOVA, K., SPACKOVA, J., TAUBER, J., STRADALOVA, V., MALINSKY, J., LESSARD, M., BEWERSDORF, J. & JEZEK, P. 2016. Hypoxic HepG2 cell

- adaptation decreases ATP synthase dimers and ATP production in inflated cristae by mitofilin down-regulation concomitant to MICOS clustering. *FASEB J*, 30, 1941-57.
- POKORNA, L., CERMAKOVA, P., HORVATH, A., BAILE, M. G., CLAYPOOL, S. M., GRIAC, P., MALINSKY, J. & BALAZOVA, M. 2016. Specific degradation of phosphatidylglycerol is necessary for proper mitochondrial morphology and function. *Biochim Biophys Acta*, 1857, 34-45.
- PON, L., MOLL, T., VESTWEBER, D., MARSHALLSAY, B. & SCHATZ, G. 1989. Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. *J Cell Biol*, 109, 2603-16.
- PRACHEIL, T. & LIU, Z. 2013. Tiered assembly of the yeast Far3-7-8-9-10-11 complex at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 288, 16986-97.
- PRINCE, F. P. 2002. Lamellar and tubular associations of the mitochondrial cristae: unique forms of the cristae present in steroid-producing cells. *Mitochondrion*, 1, 381-9.
- PRINZ, W. A. 2014. Bridging the gap: membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. *J Cell Biol*, 205, 759-69.
- PUIG, S. & PEREZ-ORTIN, J. E. 2000. Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift. *Yeast*, 16, 139-48.
- RABL, R., SOUBANNIER, V., SCHOLZ, R., VOGEL, F., MENDEL, N., VASILJEV-NEUMEYER, A., KORNER, C., JAGASIA, R., KEIL, T., BAUMEISTER, W., CYRKLAFF, M., NEUPERT, W. & REICHERT, A. S. 2009. Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. *J Cell Biol*, 185, 1047-63.
- RAHMAN, S., BLOK, R. B., DAHL, H. H., DANKS, D. M., KIRBY, D. M., CHOW, C. W., CHRISTODOULOU, J. & THORBURN, D. R. 1996. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol*, 39, 343-51.
- RAK, M., ZENG, X., BRIERE, J. J. & TZAGOLOFF, A. 2009. Assembly of F0 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 108-16.
- RAPAPORT, D., BRUNNER, M., NEUPERT, W. & WESTERMANN, B. 1998. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 273, 20150-5.
- RASSOW, J., GUIARD, B., WIENHUES, U., HERZOG, V., HARTL, F. U. & NEUPERT, W. 1989. Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites. *J Cell Biol*, 109, 1421-8.
- RAWLE, M. J. & LARNER, A. J. 2013. NARP Syndrome: A 20-Year Follow-Up. *Case Rep Neurol*, 5, 204-7.
- REINDERS, J., WAGNER, K., ZAHEDI, R. P., STOJANOVSKI, D., EYRICH, B., VAN DER LAAN, M., REHLING, P., SICKMANN, A., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2007. Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. *Mol Cell Proteomics*, 6, 1896-906.
- REINDERS, J., ZAHEDI, R. P., PFANNER, N., MEISINGER, C. & SICKMANN, A. 2006. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res*, 5, 1543-54.
- REMES, A. M., KARPPA, M., MOILANEN, J. S., RUSANEN, H., HASSINEN, I. E., MAJAMAA, K., UIMONEN, S., SORRI, M., SALMELA, P. I., KARVONEN, S. L. & KARVONEN, S. L. 2003. Epidemiology of the mitochondrial DNA 8344A>G mutation for the myoclonus epilepsy and ragged red fibres (MERRF) syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74, 1158-9.
- REMES, A. M., MAJAMAA-VOLTTI, K., KARPPA, M., MOILANEN, J. S., UIMONEN, S., HELANDER, H., RUSANEN, H., SALMELA, P. I., SORRI, M., HASSINEN, I.

- E. & MAJAMAA, K. 2005. Prevalence of large-scale mitochondrial DNA deletions in an adult Finnish population. *Neurology*, 64, 976-81.
- RENKEN, C., SIRAGUSA, G., PERKINS, G., WASHINGTON, L., NULTON, J., SALAMON, P. & FREY, T. G. 2002. A thermodynamic model describing the nature of the crista junction: a structural motif in the mitochondrion. *J Struct Biol*, 138, 137-44.
- RIZZUTO, R., MARCHI, S., BONORA, M., AGUIARI, P., BONONI, A., DE STEFANI, D., GIORGI, C., LEO, S., RIMESSI, A., SIVIERO, R., ZECCHINI, E. & PINTON, P. 2009. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1342-51.
- ROBERTS, E. A., ROBINSON, B. H. & YANG, S. 2008. Mitochondrial structure and function in the untreated Jackson toxic milk (tx-j) mouse, a model for Wilson disease. *Mol Genet Metab*, 93, 54-65.
- ROBERTSON, J. D. 1960. The molecular structure and contact relationships of cell membranes. *Prog Biophys Mol Biol*, 10, 343-418.
- ROJO, M., HOVIUS, R., DEMEL, R., WALLIMANN, T., EPPENBERGER, H. M. & NICOLAY, K. 1991a. Interaction of mitochondrial creatine kinase with model membranes. A monolayer study. *FEBS Lett*, 281, 123-9.
- ROJO, M., HOVIUS, R., DEMEL, R. A., NICOLAY, K. & WALLIMANN, T. 1991b. Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J Biol Chem*, 266, 20290-5.
- ROSTOM, A. A., FUCINI, P., BENJAMIN, D. R., JUENEMANN, R., NIERHAUS, K. H., HARTL, F. U., DOBSON, C. M. & ROBINSON, C. V. 2000. Detection and selective dissociation of intact ribosomes in a mass spectrometer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5185-90.
- ROTHSTEIN, R. J. & SHERMAN, F. 1980. Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics*, 94, 871-89.
- ROTIG, A., APPELKVIST, E. L., GEROMEL, V., CHRETIEN, D., KADHOM, N., EDERY, P., LEBIDEAU, M., DALLNER, G., MUNNICH, A., ERNSTER, L. & RUSTIN, P. 2000. Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet*, 356, 391-5.
- ROWLEY, N., PRIP-BUUS, C., WESTERMANN, B., BROWN, C., SCHWARZ, E., BARRELL, B. & NEUPERT, W. 1994. Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell*, 77, 249-59.
- RUBINSTEIN, J. L., WALKER, J. E. & HENDERSON, R. 2003. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J*, 22, 6182-92.
- RUHOY, I. S. & SANETO, R. P. 2014. The genetics of Leigh syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet*, 7, 221-34.
- SAGAN, L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol*, 14, 255-74.
- SAKOWSKA, P., JANS, D. C., MOHANRAJ, K., RIEDEL, D., JAKOBS, S. & CHACINSKA, A. 2015. The Oxidation Status of Mic19 Regulates MICOS Assembly. *Mol Cell Biol*, 35, 4222-37.
- SAMANFAR, B., OMIDI, K., HOOSHYAR, M., LALIBERTE, B., ALAMGIR, M., SEAL, A. J., AHMED-MUHSIN, E., VITERI, D. F., SAID, K., CHALABIAN, F., GOLSHANI, A., WAINER, G., BURNSIDE, D., SHOSTAK, K., BUGNO, M., WILLMORE, W. G., SMITH, M. L. & GOLSHANI, A. 2013. Large-scale investigation of oxygen response mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biosyst*, 9, 1351-9.
- SANETO, R. P., COHEN, B. H., COPELAND, W. C. & NAVIAUX, R. K. 2013. Alpers-Huttenlocher syndrome. *Pediatr Neurol*, 48, 167-78.

- SANTIAGO, E., VAZQUEZ, J. J., GUERRA, F. & MACARULLA, J. M. 1968. Ascorbate induced lysis of inner mitochondrial membranes. Isolation and electron microscopic studies of three subfractions. *Rev Esp Fisiol*, 24, 31-5.
- SARASTE, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*, 283, 1488-93.
- SARIG, O., GOLDSHER, D., NOUSBECK, J., FUCHS-TELEM, D., COHEN-KATSENELSON, K., IANCU, T. C., MANOV, I., SAADA, A., SPRECHER, E. & MANDEL, H. 2013. Infantile mitochondrial hepatopathy is a cardinal feature of MEGDEL syndrome (3-methylglutaconic aciduria type IV with sensorineural deafness, encephalopathy and Leigh-like syndrome) caused by novel mutations in SERAC1. *Am J Med Genet A*, 161A, 2204-15.
- SATOH, M., HAMAMOTO, T., SEO, N., KAGAWA, Y. & ENDO, H. 2003. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 300, 482-93.
- SCAGLIA, F., WONG, L. J., VLADUTIU, G. D. & HUNTER, J. V. 2005. Predominant cerebellar volume loss as a neuroradiologic feature of pediatric respiratory chain defects. *AJNR Am J Neuroradiol*, 26, 1675-80.
- SCHAEFER, A. M., MCFARLAND, R., BLAKELY, E. L., HE, L., WHITTAKER, R. G., TAYLOR, R. W., CHINNERY, P. F. & TURNBULL, D. M. 2008. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol*, 63, 35-9.
- SCHAGGER, H. & PFEIFFER, K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, 19, 1777-83.
- SCHAPIRA, A. H. 2012. Mitochondrial diseases. *Lancet*, 379, 1825-34.
- SCHIMMOLLER, F. & RIEZMAN, H. 1993. Involvement of Ypt7p, a small GTPase, in traffic from late endosome to the vacuole in yeast. *J Cell Sci*, 106 (Pt 3), 823-30.
- SCHLEGEL, J., WYSS, M., EPPENBERGER, H. M. & WALLIMANN, T. 1990. Functional studies with the octameric and dimeric form of mitochondrial creatine kinase. Differential pH-dependent association of the two oligomeric forms with the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 265, 9221-7.
- SCHLEYER, M. & NEUPERT, W. 1985. Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell*, 43, 339-50.
- SCHMIDT, O., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 655-67.
- SCHWAIGER, M., HERZOG, V. & NEUPERT, W. 1987. Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins. *J Cell Biol*, 105, 235-46.
- SCHWERZMANN, K., CRUZ-ORIVE, L. M., EGGMAN, R., SANGER, A. & WEIBEL, E. R. 1986. Molecular architecture of the inner membrane of mitochondria from rat liver: a combined biochemical and stereological study. *J Cell Biol*, 102, 97-103.
- SCIACCO, M., BONILLA, E., SCHON, E. A., DIMAURO, S. & MORAES, C. T. 1994. Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Hum Mol Genet*, 3, 13-9.
- SCIACCO, M., PRELLE, A., D'ADDA, E., LAMPERTI, C., BORDONI, A., RANGO, M., CRIMI, M., COMI, G. P., BRESOLIN, N. & MOGGIO, M. 2003. Familial mtDNA T8993C transition causing both the NARP and the MILS phenotype in the same generation. A morphological, genetic and spectroscopic study. *J Neurol*, 250, 1498-500.
- SCORRANO, L., ASHIYA, M., BUTTLE, K., WEILER, S., OAKES, S. A., MANNELLA, C. A. & KORSMEYER, S. J. 2002. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*, 2, 55-67.

- SECCO, D., WANG, C., SHOU, H. & WHELAN, J. 2012. Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. *FEBS Lett*, 586, 289-95.
- SERAPHIN, B., SIMON, M., BOULET, A. & FAYE, G. 1989. Mitochondrial splicing requires a protein from a novel helicase family. *Nature*, 337, 84-7.
- SESAKI, H. & JENSEN, R. E. 2001. UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol*, 152, 1123-34.
- SESAKI, H. & JENSEN, R. E. 2004. Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem*, 279, 28298-303.
- SESAKI, H., SOUTHARD, S. M., YAFFE, M. P. & JENSEN, R. E. 2003. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell*, 14, 2342-56.
- SHEPARD, K. A. & YAFFE, M. P. 1999. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J Cell Biol*, 144, 711-20.
- SHEVCHENKO, A., CHERNUSHEVICH, I., WILM, M. & MANN, M. 2000. De Novo peptide sequencing by nanoelectrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments. *Methods Mol Biol*, 146, 1-16.
- SHIRENDEB, U. P., CALKINS, M. J., MANCZAK, M., ANEKONDA, V., DUFOUR, B., MCBRIDE, J. L., MAO, P. & REDDY, P. H. 2012. Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 21, 406-20.
- SHOUBRIDGE, E. A. 2001. Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet*, 106, 46-52.
- SICKMANN, A., REINDERS, J., WAGNER, Y., JOPPICH, C., ZAHEDI, R., MEYER, H. E., SCHONFISCH, B., PERSCHIL, I., CHACINSKA, A., GUIARD, B., REHLING, P., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13207-12.
- SIEVERS, F., WILM, A., DINEEN, D., GIBSON, T. J., KARPLUS, K., LI, W., LOPEZ, R., MCWILLIAM, H., REMMERT, M., SODING, J., THOMPSON, J. D. & HIGGINS, D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7, 539.
- SIKORSKI, R. S. & HIETER, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122, 19-27.
- SIMBENI, R., PON, L., ZINSER, E., PALTAUF, F. & DAUM, G. 1991. Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *J Biol Chem*, 266, 10047-9.
- SIMOCKOVA, M., HOLIC, R., TAHOTNA, D., PATTON-VOGT, J. & GRIAC, P. 2008. Yeast Pgc1p (YPL206c) controls the amount of phosphatidylglycerol via a phospholipase C-type degradation mechanism. *J Biol Chem*, 283, 17107-15.
- SJOSTRAND, F. S. 1953. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature*, 171, 30-2.
- SMITH, R. E., ROBERTS, J. C. & HITTELMAN, K. J. 1966. Nonphosphorylating respiration of mitochondria from brown adipose tissue of rats. *Science*, 154, 653-4.
- SMITS, B. W., HEIJDRRA, Y. F., CUPPEN, F. W. & VAN ENGELEN, B. G. 2011. Nature and frequency of respiratory involvement in chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Neurol*, 258, 2020-5.

- SOFOU, K., MOSLEMI, A. R., KOLLBERG, G., BJARNADOTTIR, I., OLDFORS, A., NENNESMO, I., HOLME, E., TULINIUS, M. & DARIN, N. 2012. Phenotypic and genotypic variability in Alpers syndrome. *Eur J Paediatr Neurol*, 16, 379-89.
- SONG, D. H., PARK, J., MAURER, L. L., LU, W., PHILBERT, M. A. & SASTRY, A. M. 2013. Biophysical significance of the inner mitochondrial membrane structure on the electrochemical potential of mitochondria. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 88, 062723.
- SOONTORNGUN, N. 2016. Reprogramming of nonfermentative metabolism by stress-responsive transcription factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*.
- SPEER, O., BACK, N., BUERKLEN, T., BRDICZKA, D., KORETSKY, A., WALLIMANN, T. & ERIKSSON, O. 2005. Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem J*, 385, 445-50.
- STEFELY, J. A., REIDENBACH, A. G., ULBRICH, A., ORUGANTY, K., FLOYD, B. J., JOCHEM, A., SAUNDERS, J. M., JOHNSON, I. E., MINOGUE, C. E., WROBEL, R. L., BARBER, G. E., LEE, D., LI, S., KANNAN, N., COON, J. J., BINGMAN, C. A. & PAGLIARINI, D. J. 2015. Mitochondrial ADCK3 employs an atypical protein kinase-like fold to enable coenzyme Q biosynthesis. *Mol Cell*, 57, 83-94.
- STODDARD, R. A., MCCURNIN, D. C., SHULTENOVER, S. J., WRIGHT, J. E. & DELEMOS, R. A. 1981. Syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction presenting in the neonate. *J Pediatr*, 99, 259-61.
- STOLDT, S., WENZEL, D., HILDENBEUTEL, M., WURM, C. A., HERRMANN, J. M. & JAKOBS, S. 2012. The inner-mitochondrial distribution of Oxa1 depends on the growth conditions and on the availability of substrates. *Mol Biol Cell*, 23, 2292-301.
- STRAFFON, A. F., PRESCOTT, M., NAGLEY, P. & DEVENISH, R. J. 1998. The assembly of yeast mitochondrial ATP synthase: subunit depletion in vivo suggests ordered assembly of the stalk subunits b, OSCP and d. *Biochim Biophys Acta*, 1371, 157-62.
- STRAUSS, M., HOFHAUS, G., SCHRODER, R. R. & KUHLBRANDT, W. 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J*, 27, 1154-60.
- STRECKER, V., KADEER, Z., HEIDLER, J., CRUCIAT, C. M., ANGERER, H., GIESE, H., PFEIFFER, K., STUART, R. A. & WITTIG, I. 2016. Supercomplex-associated Cox26 protein binds to cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 1643-52.
- STROGOLOVA, V., FURNESS, A., ROBB-MCGRATH, M., GARLICH, J. & STUART, R. A. 2012. Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc1-cytochrome c oxidase supercomplex. *Mol Cell Biol*, 32, 1363-73.
- SUN, L., LI, M. S., FISHER, L. M. & SPRY, C. J. 1995. Expression in *Escherichia coli* and purification of human eosinophil-derived neurotoxin with ribonuclease activity. *Protein Expr Purif*, 6, 685-92.
- SUPPANZ, I. E., WURM, C. A., WENZEL, D. & JAKOBS, S. 2009. The m-AAA protease processes cytochrome c peroxidase preferentially at the inner boundary membrane of mitochondria. *Mol Biol Cell*, 20, 572-80.
- SWERDLOW, R. H. 2007. Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, 2, 347-59.
- SZCZEPINSKA, T., KUTNER, J., KOPCZYNSKI, M., PAWLOWSKI, K., DZIEMBOWSKI, A., KUDLICKI, A., GINALSKI, K. & ROWICKA, M. 2014. Probabilistic approach to predicting substrate specificity of methyltransferases. *PLoS Comput Biol*, 10, e1003514.

- TAM, A., SCHMIDT, W. K. & MICHAELIS, S. 2001. The multispanning membrane protein Ste24p catalyzes CAAX proteolysis and NH₂-terminal processing of the yeast a-factor precursor. *J Biol Chem*, 276, 46798-806.
- TAN, A. S., BATY, J. W., DONG, L. F., BEZAWORK-GELETA, A., ENDAYA, B., GOODWIN, J., BAJZIKOVA, M., KOVAROVA, J., PETERKA, M., YAN, B., PESDAR, E. A., SOBOL, M., FILIMONENKO, A., STUART, S., VONDRUSOVA, M., KLUCKOVA, K., SACHAPHIBULKIJ, K., ROHLENA, J., HOZAK, P., TRUKSA, J., ECCLES, D., HAUPT, L. M., GRIFFITHS, L. R., NEUZIL, J. & BERRIDGE, M. V. 2015. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab*, 21, 81-94.
- TAN, T., OZBALCI, C., BRUGGER, B., RAPAPORT, D. & DIMMER, K. S. 2013. Mcp1 and Mcp2, two novel proteins involved in mitochondrial lipid homeostasis. *J Cell Sci*, 126, 3563-74.
- TANDLER, B., DUNLAP, M., HOPPEL, C. L. & HASSAN, M. 2002. Giant mitochondria in a cardiomyopathic heart. *Ultrastruct Pathol*, 26, 177-83.
- TATSUTA, T., MODEL, K. & LANGER, T. 2005. Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol Biol Cell*, 16, 248-59.
- THAKUR, S. S., GEIGER, T., CHATTERJEE, B., BANDILLA, P., FROHLICH, F., COX, J. & MANN, M. 2011. Deep and highly sensitive proteome coverage by LC-MS/MS without prefractionation. *Mol Cell Proteomics*, 10, M110 003699.
- THAPA, D., NICHOLS, C. E., LEWIS, S. E., SHEPHERD, D. L., JAGANNATHAN, R., CROSTON, T. L., TVETER, K. J., HOLDEN, A. A., BASELER, W. A. & HOLLANDER, J. M. 2015. Transgenic overexpression of mitofilin attenuates diabetes mellitus-associated cardiac and mitochondria dysfunction. *J Mol Cell Cardiol*, 79, 212-23.
- THRASH, J. C., BOYD, A., HUGGETT, M. J., GROTE, J., CARINI, P., YODER, R. J., ROBBERTSE, B., SPATAFORA, J. W., RAPPE, M. S. & GIOVANNONI, S. J. 2011. Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR11 clade. *Sci Rep*, 1, 13.
- TKACH, J. M., YIMIT, A., LEE, A. Y., RIFFLE, M., COSTANZO, M., JASCHOB, D., HENDRY, J. A., OU, J., MOFFAT, J., BOONE, C., DAVIS, T. N., NISLOW, C. & BROWN, G. W. 2012. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat Cell Biol*, 14, 966-76.
- TOSCANO, A., FAZIO, M. C., VITA, G., CANNAVO, S., BRESOLIN, N., BET, L., PRELLE, A., BARBIROLI, B., IOTTI, S., ZANIOL, P. & ET AL. 1995. Early-onset cerebellar ataxia, myoclonus and hypogonadism in a case of mitochondrial complex III deficiency treated with vitamins K3 and C. *J Neurol*, 242, 203-9.
- TOULMAY, A. & PRINZ, W. A. 2011. Lipid transfer and signaling at organelle contact sites: the tip of the iceberg. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 458-63.
- TRIJBELS, J. M., SENGERS, R. C., RUITENBEEK, W., FISCHER, J. C., BAKKEREN, J. A. & JANSSEN, A. J. 1988. Disorders of the mitochondrial respiratory chain: clinical manifestations and diagnostic approach. *Eur J Pediatr*, 148, 92-7.
- TULLER, G. & DAUM, G. 1995. Import of sterols into mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 372, 29-32.
- UTTENWEILER, A., SCHWARZ, H., NEUMANN, H. & MAYER, A. 2007. The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy. *Mol Biol Cell*, 18, 166-75.
- VAN DER KLEI, I. J., VEENHUIS, M. & NEUPERT, W. 1994. A morphological view on mitochondrial protein targeting. *Microsc Res Tech*, 27, 284-93.

- VAN DER LAAN, M., HORVATH, S. E. & PFANNER, N. 2016. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr Opin Cell Biol*, 41, 33-42.
- VAN DYCK, E., FOURY, F., STILLMAN, B. & BRILL, S. J. 1992. A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *EMBO J*, 11, 3421-30.
- VAN EIJSDEN, R. G., GERARDS, M., EIJSSEN, L. M., HENDRICKX, A. T., JONGBLOED, R. J., WOKKE, J. H., HINTZEN, R. Q., RUBIO-GOZALBO, M. E., DE COO, I. F., BRIEM, E., TIRANTI, V. & SMEETS, H. J. 2006. Chip-based mtDNA mutation screening enables fast and reliable genetic diagnosis of OXPHOS patients. *Genet Med*, 8, 620-7.
- VAN LAAR, V. S., BERMAN, S. B. & HASTINGS, T. G. 2016. Mic60/mitofilin overexpression alters mitochondrial dynamics and attenuates vulnerability of dopaminergic cells to dopamine and rotenone. *Neurobiol Dis*, 91, 247-61.
- VAN LAAR, V. S., DUKES, A. A., CASCIO, M. & HASTINGS, T. G. 2008. Proteomic analysis of rat brain mitochondria following exposure to dopamine quinone: implications for Parkinson disease. *Neurobiol Dis*, 29, 477-89.
- VAN VENETIE, R. & VERKLEIJ, A. J. 1982. Possible role of non-bilayer lipids in the structure of mitochondria. A freeze-fracture electron microscopy study. *Biochim Biophys Acta*, 692, 397-405.
- VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C. & THOMPSON, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-33.
- VAZQUEZ, J. J., SANTIAGO, E., GUERRA, F. & MACARULLA, J. M. 1968. Studies on the fine structure of the rat liver inner mitochondrial membranes negatively stained. *Rev Esp Fisiol*, 24, 43-5.
- VELOURS, G., BOUCHERON, C., MANON, S. & CAMOUGRAND, N. 2002. Dual cell wall/mitochondria localization of the 'SUN' family proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 207, 165-72.
- VOGEL, F., BORNHOVD, C., NEUPERT, W. & REICHERT, A. S. 2006. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, 175, 237-47.
- VOGTLE, F. N., BURKHART, J. M., RAO, S., GERBETH, C., HINRICHS, J., MARTINOU, J. C., CHACINSKA, A., SICKMANN, A., ZAHEDI, R. P. & MEISINGER, C. 2012. Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol Cell Proteomics*, 11, 1840-52.
- VON DER MALSBERG, K., MULLER, J. M., BOHNERT, M., OELJEKLAUS, S., KWIATKOWSKA, P., BECKER, T., LONIEWSKA-LWOWSKA, A., WIESE, S., RAO, S., MILENKOVIC, D., HUTU, D. P., ZERBES, R. M., SCHULZE-SPECKING, A., MEYER, H. E., MARTINOU, J. C., ROSPERT, S., REHLING, P., MEISINGER, C., VEENHUIS, M., WARSCHIED, B., VAN DER KLEI, I. J., PFANNER, N., CHACINSKA, A. & VAN DER LAAN, M. 2011. Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev Cell*, 21, 694-707.
- VON HEIJNE, G. 1986. Why mitochondria need a genome. *FEBS Lett*, 198, 1-4.
- VON KLEIST-RETZOW, J. C., CORMIER-DAIRE, V., VIOT, G., GOLDENBERG, A., MARDACH, B., AMIEL, J., SAADA, P., DUMEZ, Y., BRUNELLE, F., SAUDUBRAY, J. M., CHRETIEN, D., ROTIG, A., RUSTIN, P., MUNNICH, A. & DE LONLAY, P. 2003. Antenatal manifestations of mitochondrial respiratory chain deficiency. *J Pediatr*, 143, 208-12.
- VUKOTIC, M., OELJEKLAUS, S., WIESE, S., VOGTLE, F. N., MEISINGER, C., MEYER, H. E., ZIESENISS, A., KATSCHINSKI, D. M., JANS, D. C., JAKOBS, S.,

- WARSCHEID, B., REHLING, P. & DECKERS, M. 2012. Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab*, 15, 336-47.
- WACH, A., BRACHAT, A., ALBERTI-SEGUI, C., REBISCHUNG, C. & PHILIPPSEN, P. 1997. Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13, 1065-75.
- WAEGEMANN, K., POPOV-CELEKETIC, D., NEUPERT, W., AZEM, A. & MOKRANJAC, D. 2015. Cooperation of TOM and TIM23 complexes during translocation of proteins into mitochondria. *J Mol Biol*, 427, 1075-84.
- WALLACE, D. C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283, 1482-8.
- WANG, Y. & BOGENHAGEN, D. F. 2006. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem*, 281, 25791-802.
- WARBURG, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-14.
- WATSON, K. 1972. The organization of ribosomal granules within mitochondrial structures of aerobic and anaerobic cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 55, 721-6.
- WAYNE, L. L., WALLIS, J. G., KUMAR, R., MARKHAM, J. E. & BROWSE, J. 2013. Cytochrome b5 reductase encoded by CBR1 is essential for a functional male gametophyte in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25, 3052-66.
- WEBER-BOYVAT, M., KENTALA, H., PERANEN, J. & OLKKONEN, V. M. 2015. Ligand-dependent localization and function of ORP-VAP complexes at membrane contact sites. *Cell Mol Life Sci*, 72, 1967-87.
- WENZ, T., HIELSCHER, R., HELLWIG, P., SCHAGGER, H., RICHERS, S. & HUNTE, C. 2009. Role of phospholipids in respiratory cytochrome bc(1) complex catalysis and supercomplex formation. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 609-16.
- WERNER, S. & NEUPERT, W. 1972. Functional and biogenetical heterogeneity of the inner membrane of rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem*, 25, 379-96.
- WESTERMANN, B. 2014. Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 1039-46.
- WICKY, S., SCHWARZ, H. & SINGER-KRUGER, B. 2004. Molecular interactions of yeast Neolp, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and its role in membrane trafficking within the endomembrane system. *Mol Cell Biol*, 24, 7402-18.
- WIECKOWSKI, M. R., GIORGI, C., LEBIEDZINSKA, M., DUSZYNSKI, J. & PINTON, P. 2009. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc*, 4, 1582-90.
- WIEDERHOLD, E., GANDHI, T., PERMENTIER, H. P., BREITLING, R., POOLMAN, B. & SLOTBOOM, D. J. 2009. The yeast vacuolar membrane proteome. *Mol Cell Proteomics*, 8, 380-92.
- WILKENS, V., KOHL, W. & BUSCH, K. 2013. Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution. *J Cell Sci*, 126, 103-16.
- WILLIAMS, C. C., JAN, C. H. & WEISSMAN, J. S. 2014. Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, 346, 748-51.
- WILLIAMSON, C. D., DEBIASI, R. L. & COLBERG-POLEY, A. M. 2012. Viral product trafficking to mitochondria, mechanisms and roles in pathogenesis. *Infect Disord Drug Targets*, 12, 18-37.
- WILLINGHAM, S., OUTEIRO, T. F., DEVIT, M. J., LINDQUIST, S. L. & MUCHOWSKI, P. J. 2003. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science*, 302, 1769-72.

- WILM, M., SHEVCHENKO, A., HOUTHAEVE, T., BREIT, S., SCHWEIGERER, L., FOTSIS, T. & MANN, M. 1996. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 379, 466-9.
- WITTIG, I., BRAUN, H. P. & SCHAGGER, H. 2006a. Blue native PAGE. *Nat Protoc*, 1, 418-28.
- WITTIG, I., CARROZZO, R., SANTORELLI, F. M. & SCHAGGER, H. 2006b. Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 1066-72.
- WONG, E. D., WAGNER, J. A., GORSICH, S. W., MCCAFFERY, J. M., SHAW, J. M. & NUNNARI, J. 2000. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol*, 151, 341-52.
- WONG, E. D., WAGNER, J. A., SCOTT, S. V., OKREGLAK, V., HOLEWINSKE, T. J., CASSIDY-STONE, A. & NUNNARI, J. 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol*, 160, 303-11.
- WORTMANN, S., RODENBURG, R. J., HUIZING, M., LOUPATY, F. J., DE KONING, T., KLUIJTMANS, L. A., ENGELKE, U., WEVERS, R., SMEITINK, J. A. & MORAVA, E. 2006. Association of 3-methylglutaconic aciduria with sensori-neural deafness, encephalopathy, and Leigh-like syndrome (MEGDEL association) in four patients with a disorder of the oxidative phosphorylation. *Mol Genet Metab*, 88, 47-52.
- WURM, C. A. & JAKOBS, S. 2006. Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett*, 580, 5628-34.
- XIE, J., MARUSICH, M. F., SOUDA, P., WHITELEGGE, J. & CAPALDI, R. A. 2007. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS Lett*, 581, 3545-9.
- YANG, R. F., SUN, L. H., ZHANG, R., ZHANG, Y., LUO, Y. X., ZHENG, W., ZHANG, Z. Q., CHEN, H. Z. & LIU, D. P. 2015. Suppression of Mic60 compromises mitochondrial transcription and oxidative phosphorylation. *Sci Rep*, 5, 7990.
- YOFE, I., WEILL, U., MEURER, M., CHUARTZMAN, S., ZALCKVAR, E., GOLDMAN, O., BEN-DOR, S., SCHUTZE, C., WIEDEMANN, N., KNOP, M., KHMELINSKII, A. & SCHULDINER, M. 2016. One library to make them all: streamlining the creation of yeast libraries via a SWAp-Tag strategy. *Nat Methods*, 13, 371-8.
- YOULE, R. J. & VAN DER BLIEK, A. M. 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337, 1062-5.
- ZAHEDI, R. P., SICKMANN, A., BOEHM, A. M., WINKLER, C., ZUFALL, N., SCHONFISCH, B., GUIARD, B., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2006. Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell*, 17, 1436-50.
- ZERBES, R. M., VAN DER KLEI, I. J., VEENHUIS, M., PFANNER, N., VAN DER LAAN, M. & BOHNERT, M. 2012. Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol Chem*, 393, 1247-61.
- ZHANG, M., MILEYKOVSKAYA, E. & DOWHAN, W. 2005. Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 280, 29403-8.
- ZICK, M., DUVEZIN-CAUBET, S., SCHAFFER, A., VOGEL, F., NEUPERT, W. & REICHERT, A. S. 2009a. Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett*, 583, 2237-43.

- ZICK, M., RABL, R. & REICHERT, A. S. 2009b. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 5-19.
- ZINSER, E. & DAUM, G. 1995. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11, 493-536.

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen:

Harner, M., Korner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F., Neupert, W. (2011a). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J*.

7 Abkürzungsverzeichnis

<i>III₂IV_{1/2}</i>	Superkomplex der Atmungskettenenzyme Cytochrom c-Oxidase (einmal bzw. zweimal) und Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase (funktionales Dimer)
<i>α</i>	Antikörper
<i>ADP</i>	Adenosin-5'-diphosphat
<i>AIM</i>	Altered Inheritance rate of Mitochondria
<i>Amp</i>	Ampicilin
<i>APS</i>	Ammoniumperoxodisulfat
<i>ATP</i>	Adenosin-5'-triphosphat
<i>AS</i>	Aminosäure
<i>BN</i>	Blue native
<i>BN-PAGE</i>	Blue native polyacrylamide gel electrophoresis
<i>BSA</i>	Engl. bovine serum albumin
<i>C-terminal</i>	Carboxyterminal
<i>CPEO</i>	Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
<i>D</i>	Dextrose/Glucose
<i>DHFR</i>	Dihydrofolatreduktase
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>DTT</i>	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraacetat
<i>ER</i>	Endoplasmatisches Retikulum
<i>ERMES</i>	Engl. ER-mitochondria encounter structures
<i>ERMIONE</i>	Engl. ER-mitochondria organizing network
<i>g</i>	9,81 m/s ²
<i>Gen</i>	Gentamicin
<i>FADH₂</i>	Flavin-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form
<i>GTP</i>	Guanin-5'-triphosphat
<i>HIG1</i>	Engl. Hypoxia inducible gene family 1
<i>HIGD1A</i>	Engl. HIG1 domain family member 1A
<i>IgG</i>	Immunglobulin G
<i>IPTG</i>	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

<i>kb</i>	Kilobasen
<i>kDa</i>	Kilodalton
<i>LHON</i>	Engl. Leber hereditary optic neuropathy
<i>MBP</i>	Engl. Maltose binding protein
<i>MDa</i>	Megadalton
<i>MELAS</i>	Engl. Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes
<i>MERF</i>	Engl. Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
<i>MICOS</i>	mitochondrial contact site and cristae organizing system
<i>MOPS</i>	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
<i>MRT</i>	Magnetresonanztomographie
<i>NADH</i>	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
<i>NARP-Syndrom</i>	Syndrom aus Neuropathie, Ataxie und Retinopathia- [^] Pigmentosa
<i>N-terminal</i>	aminoterminal
<i>OD</i>	Optische Dichte
<i>OXPHOS</i>	Oxidative Phosphorylierung
<i>PCR</i>	Engl. Polymerase chain reaction
<i>PEG</i>	Polyethylenglykol
<i>PMSF</i>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>RNA</i>	Ribonukleinsäure
<i>ROS</i>	Engl. Reactive oxygen species
<i>RT</i>	Raumtemperatur
<i>SDS</i>	Natriumdodecylsulfat
<i>SDS-PAGE</i>	Engl. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>SILAC</i>	Engl. Stable isotope labeling with amino acids in cell culture
<i>TBS</i>	Tris gepufferte Saline
<i>TCA</i>	Trichloressigsäure
<i>TEMED</i>	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>Tet</i>	Tetrazyklin
<i>TIM</i>	Engl. Translocase of the inner membrane
<i>TMD</i>	Transmembrandomäne

<i>TOB</i>	Engl. topogenesis of mitochondrial outer membrane beta-barrel proteins
<i>TOM</i>	Engl. translocase of the outer membrane
<i>Tris</i>	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
<i>TX-100</i>	TritonX-100
<i>U</i>	Unit
<i>UV</i>	Ultraviolett
<i>Vs.</i>	Versus
<i>v/v</i>	Volumen pro Volumen
<i>w/v</i>	Gewicht pro Volumen
<i>WT</i>	Wildtyp

Abkürzung für Proteinnamen entstammen der Datenbank Saccharomyces Genome Database (www.yeastgenome.org).

Die Einheitenzeichen entsprechen den Vorgaben des Internationalen Einheitensystems (SI, *Système international d'unités*).

8 Anhang

Probenname	Link zu den Massenspektrometrie-Rohdaten
SID811_080910_His1	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015735.dat
SID811_080910_His2	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015736.dat
SID811_080910_His3	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015737.dat
SID811_080910_His4	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015738.dat
SID811_080910_His5	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015739.dat
SID811_080910_His6	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015740.dat
SID811_080910_His7	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015741.dat
SID811_080910_His8	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015742.dat
SID811_080910_His9	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015744.dat
SID811_080910_His10	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015745.dat
SID811_080910_His11	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015746.dat
SID811_080910_His12	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015747.dat
SID811_080910_His13	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015748.dat
SID811_080910_WT1	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015749.dat
SID811_080910_WT2	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015750.dat
SID811_080910_WT3	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015751.dat
SID811_080910_WT4	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015752.dat
SID811_080910_WT5	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015753.dat
SID811_080910_WT6	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015754.dat
SID811_080910_WT7	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015755.dat
SID811_080910_WT8	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015756.dat
SID811_080910_WT9	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015757.dat
SID811_080910_WT10	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015758.dat
SID811_080910_WT11	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015759.dat
SID811_080910_WT12	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015760.dat
SID811_080910_WT13	http://mbi08013.bio.med.uni-muenchen.de/mascot/cgi/master_results.pl?file=.%2Fdata%2F20101004%2FF015734.dat

9 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer.nat. Walter Neupert und Dr.rer.nat. Max Harner für die exzellente labor-technische und intellektuelle Betreuung.

Herrn Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Walter Neupert danke ich darüber hinaus für die Bereitstellung des Themas.

Ich möchte meinem jetzigen Arbeitgeber Herrn Prof. Dr.med. Claus Zimmer für die Möglichkeit der Freistellung zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit danken.

Darüber hinaus möchte ich allen Personen danken, die mir durch ihre persönliche Unterstützung, Motivation und Ratschläge bei der Fertigstellung geholfen haben.

Danke Beate, David, Jonas, Josef, Justus, Jutta, Madlena, Mirjam, Thomas, Tobias und Rahel

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Johannes Kaesmacher
 Geburtsdatum und -ort: 29.06.1988 in Dormagen
 Familienstand: ledig

Ausbildung

Seit 03/2015 **Abteilung für Neuroradiologie (Prof. Dr. Zimmer), Klinikum rechts der Isar, TU München**
Assistenzarzt, Wissenschaftlicher Mitarbeiter

10/2009 – 12/2014 **TU München – Klinikum rechts der Isar, Weil Cornell Medical College – Presbyterian Hospital (New York) und Methodist Hospital (Houston)**
Humanmedizin (Staatsexamen)

- PJ-Wahlfach: Neuroradiologie (TU München, Prof. Dr. Zimmer)

04/2010 – 04/2012 **Ludwigs-Maximilians-Universität München**
Promotionstudium „Molekulare Medizin“ (Dr.med.)

10/2007 – 10/2009 **Ludwig-Maximilians-Universität München / TU München**
Humanmedizin (Staatsexamen)

10/2004 – 07/2006 **Fachhochschule für Ökonomie und Management Neuss, Fachhochschule der Wirtschaft Bergisch Gladbach**
Academy of Junior Managers / Junior Management School

08/2000 – 07/2007 **Norbert-Gymnasium Knechtsteden**
Allgemeine Hochschulreife

Promotion

Seit 04/2010

**Institut für physiologische Chemie (LMU) und
Max-Planck-Institut für Biochemie**

AG: Prof. Dr.med. Dr. rer.nat. Walter Neupert

- Titel: „Das Proteom der Mitochondrien: Submitochondriale Kompartimentierung“

04/2010 – 04/2011

Vollzeit Laborkraft am Institut für physiologische Chemie
erlernte Labormethodik: Proteininteraktionsanalytik und funktionelle Charakterisierung, fortgeschrittene Techniken in der Molekularbiologie, Antikörperherstellung, Phänotypisierung verschiedenster Mikroorganismen

Weitere Engagements

2012 – 2013

**Wissenschaftliche Hilfskraft am Deutschen Herzzentrum
München, TU München**

„Etablierung eines E-Learning-Konzeptes“

Betreuer: PD Dr.med. Carolin Sonne

2010 – 2012

Leiter der Seminarreihe „medizinische Ethik“

Konrad-Adenauer-Stiftung, München

03/2009 – 07/2010

Stipendiatensprecher

Konrad-Adenauer-Stiftung, München

2008

Mitarbeit Jugendforum Nanomedizin

Bundesministerium für Bildung und Forschung, München

Publikationen

Harner M., Körner C., Walther D., Mokranjac D., **Kaesmacher J.**, Welsch U., Griffith J., Mann M., Reggiori F. and Neupert W., The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. **EMBO Journal (2011)**

Kaesmacher J., Müller-Leisse C., Huber T., Boeckh-Behrens T., Haller B., Shiban E., Friedrich B., Zimmer C., Dorn F. and Prothmann S., Volume versus standard coils in the treatment of intracranial aneurysms. **JNIS (2015)**

Kleine J. F., Wunderlich S., Zimmer C. and **Kaesmacher J.**, Time to redefine success? TICI 3 versus TICI 2b recanalization in middle cerebral artery occlusion treated with thrombectomy. **JNIS (2016)**

Kleine JF, Beller E, Zimmer C and **Kaesmacher J.**, Lenticulostriate infarctions after successful mechanical thrombectomy in middle cerebral artery occlusion. **JNIS (2016)**

Bette S.*, **Kaesmacher J.***, Huber T., Delbridge C., Ringel F., Boeckh-Behrens T., Meyer B., Zimmer C., Kirschke J. S. and Gempt J., * **geteilte Erstautorenschaft**, Value of Early Postoperative FLAIR Volume Dynamic in Glioma With No or Minimal Enhancement. **World Neurosurgery (2016)**

Bette S., Peschke P., **Kaesmacher J.**, Delbridge C., Pyka T., Zimmer C., Meyer B., Ringel F. and Gempt J., Static FET-PET and MR Imaging in Anaplastic Gliomas (WHO III). **World Neurosurgery (2016)**

Huber T., Kleine J. F., **Kaesmacher J.**, Bette S., Poppert H., Zimmer C. and Boeckh-Behrens T., Blood Leucocytes as Prognostic Parameter in Stroke Thrombectomy. **Cerebrovascular Diseases (2016)**

Beller E., Klopp D., Göttler J., **Kaesmacher J.**, Zimmer C., Kirschke J. and Prothmann S., Closed-cell Stent-assisted Coiling of Intracranial Aneurysms: Evaluation of Changes in Vascular Geometry using Digital Subtraction Angiography. **PLOS ONE (2016)**

Kaesmacher J. and Kleine J. F., Bridging Therapy with i. v. rtPA in MCA Occlusion Prior to Endovascular Thrombectomy: a Double-Edged Sword? **Clinical Neuroradiology (2016)**

Bette S., Wiestler B., **Kaesmacher J.**, Huber T., Gerhardt J., Barz M., Delbridge C., Ryang Y. M., Ringel F., Zimmer C., Meyer B., Boeckh-Behrens T., Kirschke J. S. and Gempt J., Infarct volume after glioblastoma surgery as an independent prognostic factor. **Oncotarget (2016)**

Kaesmacher J., Liebl H., Baum T. and Kirschke J. S., Bone Mineral Density Estimations From Routine Multidetector Computed Tomography: A Comparative Study of Contrast and Calibration Effects. **Journal of Computer Assisted Tomography (2016)**

Friedrich B., Lobsien D., Maegerlein C., Zimmer C., Wunderlich S., **Kaesmacher J.** and Kleine J. F., * **geteilte Letztautorenschaft**, Distance to Thrombus in acute middle cerebral artery stroke predicts basal ganglia infarction after mechanical thrombectomy. **Oncotarget (2016)**

Gersing A. S., Schwaiger B. J., Kleine J. F., **Kaesmacher J.**, Friedrich B., Prothmann S., Zimmer C. and Boeckh-Behrens T., Clinical Outcome Predicted by Collaterals Depends on Technical Success of Mechanical Thrombectomy in Middle Cerebral Artery Occlusion. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases (2016)**

Kongressvorträge

Bridging Therapy with i. v. rtPA in MCA Occlusion Prior to Endovascular Thrombectomy: a Double-Edged Sword? 39th ESNR Annual Meeting, 2016, Belgrad, Serbien

Hämorrhagische Imbibierung als Prognosemarker bei isolierten striatokapsulären Infarkten nach MCA-Rekanalisation, 51. Jahrestagung der DGNR, 2016, Köln, Deutschland

Impact of thrombus histology on safety and efficacy of endovascular stroke treatment, 10th World Stroke Congress, 2016, Hyderabad, Indien

Stipendien und Auszeichnungen

- Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
- Stipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung
- Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe), Ludwigs-Maximilians-Universität München
- Aufnahme in die „TUM: Junge Akademie“, Projektthema: Effizientere Nutzung von Energieträgern
- Auslands- und Kongressstipendien der TU München, Felgenhauer Stiftung und des DAAD
- Fakultätsinterne Förderung durch die Kommission für Klinische Forschung der TU München (KKF)

München, Januar 2017

11 Eidstattliche Versicherung

Kaesmacher, Johannes

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Das Proteom der Mitochondrien: Submitochondriale Kompartimentierung“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 30.06.2018

Johannes Kaesmacher