

**Die Ausbildung von Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und
Mitochondrien durch Proteine mit dualen Lokalisierungssignalen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Elena Bittner

aus Hünfeld

Marburg, Dezember 2023

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2020 bis Dezember 2023 in den Arbeitsgruppen von Dr. Johannes Freitag und Prof. Dr. Michael Bölker am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:
06.02.2024

Erstgutachter: Dr. Johannes Freitag
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2024

Teile dieser Arbeit werden/wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Bittner, E.*, Stehlik, T.*, Lam, J.*, Dimitrov, L., Heimerl, T., Schöck, I., Harberding, J., Dornes, A., Heymons, N., Bange, G., Schuldiner, M., Zalckvar, E., Bölker, M., Schekman, R., Freitag, J. (2024). Proteins that carry dual targeting signals can act as tethers between peroxisomes and partner organelles. accepted at *PLOS Biology*.

Weitere Veröffentlichungen:

Zheng, L.*, Hartmann, S.*, Bittner, E., Bäcker, N., Christ, M., Li, W., Büttner, L., Lechner, M., Sandrock, B., Bölker, M., Paczia, N., Bange, G., Freitag, J. (in preparation). Trans-aconitic acid as an appetizer for *Ustilago maydis* upon infection of maize.

Bittner, E., Stehlik, T., und Freitag, J. (2022). Sharing the wealth: The versatility of proteins targeted to peroxisomes und other organelles. *Frontiers in cell und developmental biology*, 10, 934331.

Ast, J., Bäcker, N., Bittner, E., Martorana, D., Ahmad, H., Bölker, M., und Freitag, J. (2022). Two Pex5 Proteins with Different Cargo Specificity Are Critical for Peroxisome Function in *Ustilago maydis*. *Frontiers in cell und developmental biology*, 10, 858084.

Kremp, M.*, Bittner, E.*, Martorana, D., Klingenberger, A., Stehlik, T., Bölker, M., und Freitag, J. (2020). Non-AUG Translation Initiation Generates Peroxisomal Isoforms of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in Fungi. *Frontiers in cell und developmental biology*, 8, 251.

*zu gleichen Teilen beigetragen

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Ausbildung von Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien durch Proteine mit dualen Lokalisierungssignalen“ selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 22.12.2023

Elena Bittner

Zusammenfassung

Der Transport von Proteinen in membranbegrenzte Organellen, wie Mitochondrien oder Peroxisomen wird über spezifische Zielsteuerungssignale erreicht. Wie Proteine mit Signalen für zwei Organellen in der Zelle verteilt werden und wie sich dies auf die subzelluläre Organisation von Organellen auswirkt wurde bislang wenig erforscht. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass die Phosphatase Ptc5 in *Saccharomyces cerevisiae*, die ein N-terminales Signal für Mitochondrien und ein C-terminales Signal für Peroxisomen aufweist, zunächst in die Mitochondrien inseriert, dort prozessiert und anschließend in die Peroxisomen überführt wird.

In meiner Arbeit habe ich untersucht, ob Proteine mit Zielsteuerungssignalen für Peroxisomen und Mitochondrien aufgrund ihrer Affinität zu beiden Importmaschinerien als Verbindungselemente (sog. Tether) zwischen diesen Organellen fungieren können und ihren physikalischen Kontakt beeinflussen. Zudem interessierte mich, welche Proteine an der peroxisomalen Translokalisierung von Ptc5 beteiligt sind und ob hierfür direkter Kontakt zwischen beiden Organellen notwendig ist.

Es konnte gezeigt werden, dass Proteine mit dualen Lokalisierungssignalen die Bildung von Organellkontakten induzieren. Ihre Überexpression steigerte den Anteil von Peroxisomen in Assoziation mit Mitochondrien. Dieser Phänotyp konnte sowohl durch Fluoreszenz- als auch Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Es fiel auf, dass die Assoziation von Organellen in Abhängigkeit des metabolischen Zustands der Zelle reguliert wird. Kontakte bildeten sich vermehrt unter Bedingungen, in denen Peroxisomen metabolisch aktiv waren (beispielsweise während der Lysinbiosynthese oder beim Wachstum mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle). Insbesondere Proteine mit ausgeprägter mitochondrialer Verankerung und ohne bzw. schwacher peroxisomaler Translokalisierung wirkten als starke Tether.

Die Phosphatase Ptc5 aus *Saccharomyces cerevisiae* translokalisiert aus Mitochondrien in Peroxisomen, ist aber kein starker Tether. In einem genetischen Screen wurden Mutanten identifiziert, die die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5 beeinträchtigen. Von Interesse war hierbei insbesondere die Identifizierung von $\Delta mdm10$ -Mutanten. Mdm10 ist Teil des ERMES-Komplexes, der ER und Mitochondrien verbindet und Lipidtransfer zwischen beiden Organellen ermöglicht. Im Einklang mit vorherigen Studien zeigte diese Arbeit die Rolle von ERMES bei der Entstehung von Kontakten zwischen Mitochondrien und Peroxisomen. Ein künstlicher Tether für beide Organellen supprimierte die Peroxisomen-spezifischen Phänotypen der Deletion von *MDM10*. Auch die peroxisomale Translokalisierung von Ptc5 war

in diesen Zellen wieder möglich. Der direkte Proteintransfer aus Mitochondrien in die Peroxisomen erfordert demnach physischen Kontakt.

ERMES-Komponenten akkumulierten außerdem an Knotenpunkten zwischen dem ER, Peroxisomen und Mitochondrien. Ob der ERMES-Komplex direkt als molekularer Tether für Peroxisomen fungiert oder diese Funktion indirekt über ERMES-abhängige Proteine vermittelt wird, konnte in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden. In ERMES-Mutanten zeigten viele Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen eine Fehllokalisierung, was wahrscheinlich zu einer Einschränkung ihrer Funktionalität als Tether führt. Dies ist ein Hinweis auf einen indirekten Beitrag von ERMES für die Bildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Organisation eukaryotischer Zellen geleistet werden. Ein Transit von Proteinen aus Mitochondrien in Peroxisomen war bis 2020 unbekannt. Es gelang die Charakterisierung neuer Faktoren, die an diesem Prozess beteiligt sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass Proteine mit zwei Zielsteuerungssignalen häufig als molekulare Tether fungieren. Dies offenbarte einen bisher kaum erforschten Mechanismus zur Bildung von Kontaktstellen zwischen Organellen.

Summary

The transport of proteins into membrane-bound organelles, such as mitochondria or peroxisomes, is mediated by specific targeting signals. How these proteins are distributed between two organelles and how this impacts the subcellular organization of organelles is largely elusive. A previous study demonstrated that the phosphatase Ptc5 from *Saccharomyces cerevisiae*, which possesses an N-terminal signal for mitochondria and a C-terminal signal for peroxisomes, initially inserts into mitochondria, is processed at the inner mitochondrial membrane, and subsequently translocates into peroxisomes.

My research focused on the investigation if proteins with targeting signals for peroxisomes and mitochondria act as tethers between these organelles, due to their affinity for both import machineries. Additionally, I was interested in the characterization of proteins relevant for the translocation of Ptc5 to peroxisomes. I probed the hypothesis that direct contact between the two organelles is necessary for this process to occur.

It was demonstrated that proteins with dual localization signals induce the formation of organelle contacts. Their overexpression increased the association of peroxisomes with mitochondria, as demonstrated by fluorescence and electron microscopy. I found that organelle association is regulated depending on the metabolic state of the cell. It was induced under conditions where peroxisomes are metabolically active (e. g. in conditions requiring lysine biosynthesis or in the presence of oleic acid as only carbon source). Particularly, proteins carrying two targeting signals, which were efficiently retained in mitochondria acted as strong tethers.

The phosphatase Ptc5 from *Saccharomyces cerevisiae* transits via mitochondria to peroxisomes but has no strong tethering function. A genetic screen identified mutants that impaired peroxisomal localization of Ptc5. Of particular interest was the Δ *mdm10* mutant. Mdm10 is part of the ERMES complex, which connects the endoplasmic reticulum and mitochondria and facilitates lipid transfer between these organelles. Consistent with previous studies, the results showed a role of ERMES in the formation of contacts between mitochondria and peroxisomes. An artificial tether for these organelles suppressed the peroxisome-specific phenotypes resulting from *MDM10* deletion. Peroxisomal localization of Ptc5 was restored in these cells, suggesting that that direct protein transfer from mitochondria to peroxisomes depends on physical contact.

ERMES components accumulated at three-way junctions between the ER, peroxisomes, and mitochondria. Whether the ERMES complex itself functions as a molecular tether for peroxisomes, or whether this function is mediated indirectly by ERMES-dependent proteins, or

both, has not yet been conclusively clarified. This work showed that in ERMES mutants, many proteins with dual targeting signals mislocalize, probably diminishing their tethering function. This points to an indirect contribution of ERMES for peroxisome–mitochondria tethering. In summary, this work contributed to a better understanding of eukaryotic cell biology. The transit of proteins from mitochondria to peroxisomes was unknown until 2020. This work identified new factors involved in this process and demonstrated that proteins with two targeting signals can function as molecular tethers, revealing a previously unexplored mechanism for the formation of contact sites between organelles.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
Cbx	Carboxin
CFP	eng. <i>cyan fluorescent protein</i>
C-terminal	carboxyterminal
CoA	Coenzym A
C	eng. <i>carbon</i>
Δ	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dYT	eng. <i>double yeast tryptone</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERMES	eng. <i>ER-mitochondrial encounter structure</i>
<i>et al.</i>	lat. <i>et alia</i>
Gent	Geneticin (G418)
GFP	eng. <i>green fluorescent protein</i>
H ₂ O bid.	zweifach destilliertes Wasser
Hyg	Hygromycin
<i>ip</i>	eng. <i>iron-sulphur protein</i>
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
mCherry	eng. <i>monomeric cherry</i>
MCS	eng. <i>membrane contact side</i>
min	Minuten
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
mNeonGreen	eng. <i>monomeric NeonGreen</i>
MTS	eng. <i>mitochondrial targeting signal</i>
R	Resistenz
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Nat	Nourseothricin
N-terminal	aminoterminal
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	eng. <i>open reading frame</i>

p.a.	lat. <i>pro analysi</i>
PCR	eng. <i>polymerase chain reaction</i>
PM	Plasmamembran
PMP	eng. <i>peroxisomal membrane protein</i>
PTS	eng. <i>peroxisomal targeting signal</i>
R	Resistenz
RFP	eng. <i>red fluorescent protein</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SC	eng. <i>Synthetic Complete</i>
SDS	eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SGA	eng. <i>synthetic genetic array</i>
SIM	eng. <i>structured illumination microscopy</i>
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	eng. <i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
YPD	eng. <i>yeast extract peptone dextrose</i>
YFP	eng. <i>yellow fluorescent protein</i>
YNB	eng. <i>yeast nitrogen base</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Inhaltsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Peroxisomen.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion	1
1.1.2 Import peroxisomaler Matrixproteine	3
1.1.3 Duale Lokalisation peroxisomaler Proteine	6
1.2 Mitochondrien.....	9
1.3 Membrankontaktstellen.....	12
1.4 Zielsetzung.....	14
2 Ergebnisse	15
2.1 Die Phosphatase Ptc5 als dynamischer Tether zwischen Mitochondrien und Peroxisomen in <i>U. maydis</i>	15
2.1.1 Um_Ptc5 erhöht den Kontakt zwischen Mitochondrien und Peroxisomen.....	15
2.1.2 Die Dynamik der dualen Lokalisierung von Ptc5 in <i>U. maydis</i>	19
2.2 Unterschiedliche Proteine mit dualen Lokalisierungssignalen können in <i>S. cerevisiae</i> die Bildung von Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beeinflussen.....	21
2.3 Die Importmaschinerie für peroxisomale Matrixproteine ist für die Ausbildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien relevant	30
2.4 Lysinmangel induziert den Kontakt zwischen Mitochondrien und Peroxisomen.....	32
2.4.1 Der Transit in Peroxisomen ist für die Ausbildung von Kontakten über Proteine mit dualen Zielsteuerungssequenzen nicht essenziell	32
2.4.2 Lys12 reguliert die Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in Abhängigkeit der Lysin-Verfügbarkeit.....	34
2.5 Identifikation weiterer Faktoren, die an der dualen Lokalisation von Ptc5 beteiligt sind....	36
2.6 Die subzelluläre Verteilung dual lokalisierter Proteine wird durch den ERMES-Komplex reguliert.....	40
2.6.1 Die Depletion des ERMES-Komplexes beeinflusst den mitochondrialen Import	40
2.6.2 Der ERMES-Komplex reguliert die intrazelluläre Verteilung dual lokalisierter Proteine.....	46
2.7 Der ERMES-Komplex ist an der Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beteiligt	49
2.7.1 Der peroxisomale Import ist durch die Depletion des ERMES-Komplexes leicht beeinträchtigt	49
2.7.2 In ERMES-Mutanten akkumulieren kleine Peroxisomen	51

2.7.3	Die Expression eines künstlichen Tethers supprimiert den Phänotyp von ERMES-Mutanten.....	53
2.7.4	Genetische Interaktion zwischen <i>PEX5</i> und <i>MDM10</i>	57
3	Diskussion.....	58
3.1	Proteine mit MTS und PTS1 fungieren als dynamische Tether zwischen Peroxisomen und Mitochondrien	58
3.1.1	Proteine mit konkurrierenden Lokalisationssignalen zeigen charakteristische Merkmale molekularer Tether	58
3.1.2	Die Regulation der Kontaktausbildung über Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen in Abhängigkeit des metabolischen Zustands der Zelle.....	63
3.2	Der ERMES-Komplex beeinflusst die Ausbildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien indirekt oder direkt.....	67
3.2.1	Die Rolle des ERMES-Komplexes in der Regulation der subzellulären Verteilung von Proteinen mit dualen Zielsteuerungssignalen	68
3.2.2	Der ERMES-Komplex als Tether zwischen Mitochondrien und Peroxisomen	69
3.2.3	Der ERMES-Komplex als Knotenpunkt zwischen Peroxisomen, Mitochondrien und dem ER	70
4	Material und Methoden	72
4.1	Mikroorganismen, Materialien und Chemikalien	72
4.1.1	Verwendete Mikroorganismen.....	72
4.1.2	Vektoren.....	80
4.1.3	Oligonukleotide (Primer)	84
4.1.4	Labormaterialien und Geräte.....	87
4.1.5	Kits	88
4.1.6	Chemikalien	88
4.1.7	Enzyme.....	88
4.1.8	Puffer, Lösungen und Nährmedien	88
4.1.9	Antibiotika.....	89
4.2	Kultivierung von Mikroorganismen.....	89
4.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	89
4.2.2	Kultivierung von <i>U. maydis</i>	90
4.2.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	91
4.3	Molekularbiologische Methoden	93
4.3.1	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	93
4.3.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	94
4.3.3	Synthetic Genetic Array (SGA)	95
4.3.4	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA.....	95
4.3.5	Gibson Assembly	96

4.3.6	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	96
4.3.7	DNA-Sequenzierungen	97
4.3.8	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	97
4.3.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	98
4.3.10	Exzision von Agarose-Gel-Fragmenten	99
4.4	Biochemische Methoden.....	99
4.4.1	Präparation von Proteinen	99
4.4.2	Auftrennung von Proteinen mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	100
4.4.3	Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	101
4.4.4	Subzelluläre Fraktionierung	102
4.5	Mikroskopie	104
4.5.1	Epifluoreszenzmikroskopie	104
4.5.2	SIM.....	104
4.5.3	TEM	105
4.6	Statistische Auswertung.....	105
5	Referenzen.....	106
6	Anhang	126

1 Einleitung

Die Kompartimentierung in membranbegrenzte Reaktionsräume (Organellen) ist ein grundlegendes Organisationsprinzip, das die Struktur und Funktion eukaryotischer Zellen maßgeblich prägt. Die räumliche Trennung ermöglicht es Zellen, eine Vielzahl von Prozessen effizient und unabhängig voneinander ablaufen zu lassen. Bedeutende Organellen sind zum Beispiel Mitochondrien, Peroxisomen und das endoplasmatische Retikulum. Jede dieser Organellen erfüllt spezifische Aufgaben, die zur Aufrechterhaltung der zellulären Gesamtfunktion beitragen (Lodish *et al.*, 2005).

1.1 Peroxisomen

Im Jahr 1954 wurden erstmals von einer Membran begrenzte *Microbodies* im Nierengewebe von Mäusen beschrieben, die ein eignes Organell darstellen könnten (Rhodin, 1954). Kurze Zeit später wurden derartige Strukturen mit kristallinen Kernen im Gewebe von Rattenlebern beobachtet (Rouiller und Bernhard, 1956). Mit verbesserten Verfahren zu Zellfraktionierung konnten diese *Microbodies* zu Beginn der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts isoliert und biochemisch charakterisiert werden. Eine wesentliche Gruppe von Enzymen waren H₂O₂-bildende Oxidasen und außerdem die Katalasen, die H₂O₂ in Wasser und Sauerstoff spalten können. Diesen enzymatischen Aktivitäten verdanken Peroxisomen ihren heutigen Namen (De Duve *et al.*, 1965; De Duve und Baudhuin, 1966).

1.1.1 Aufbau und Funktion

Peroxisomen kommen in den meisten eukaryotischen Zellen vor. Sie weisen eine sphärische Form auf, sind von einer einfachen Membran umgeben und haben in der Regel einen Durchmesser von 0,1 – 1 µm. Bei Peroxisomen handelt es sich jedoch um sehr heterogene Organellen (Islinger *et al.* 2010; Islinger *et al.* 2012; Islinger *et al.* 2018). Sowohl die Anzahl als auch die Größe von Peroxisomen kann in unterschiedlichen Organismen, Zelltypen und in Abhängigkeit der Entwicklungsphase stark variieren (Völkl *et al.*, 1999; Lingard *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2012). Zudem beeinflussen Umweltbedingungen sowohl die Morphologie als auch das Proteinrepertoire (Islinger *et al.* 2012; Schliebs und Kunau, 2006).

Im menschlichen Organismus spielen Peroxisomen eine entscheidende Rolle bei der Synthese von Etherlipiden, z.B. Plasmalogenen (Honsho *et al.*, 2017). Diese Lipide sind essenzielle Bestandteile der Zellmembranen und tragen zur Regulierung von Fluidität und Stabilität bei (Brites und Waterham, 2004). Die Bedeutung von Peroxisomen für die menschliche Physiologie wird bei Betrachtung des Zellweger-Syndrom besonders deutlich. Diese Klasse

von Erbkrankheiten resultiert aus Mutationen in relevanten Faktoren der Peroxisomenbiogenese und führt zu einem Mangel an Plasmalogenen sowie zur Anhäufung sehr langkettiger Fettsäuren und verursacht schwerwiegende gesundheitliche Probleme (Heymans *et al.*, 1983; Poulos *et al.*, 1986; Wanders *et al.*, 2014; Wanders *et al.*, 2018). Im Menschen spielen Peroxisomen auch eine entscheidende Rolle in der angeborenen antiviralen Immunantwort, indem sie gemeinsam mit den Mitochondrien einen wichtigen Knotenpunkt für die antivirale Signaltransduktion bilden (Dixit *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2019). Eine Beteiligung von Peroxisomen an der Regulation der Immunantwort auf mikrobielle Infektionen konnte auch in anderen tierischen Organismen, beispielsweise *Drosophila melanogaster*, belegt werden (Odendall *et al.*, 2014; Di Cara *et al.*, 2017; Di Cara, 2020).

In Pflanzen weisen Peroxisomen diverse Funktionen auf, die sich je nach Gewebetyp stark unterscheiden. Ein bemerkenswertes Beispiel ist ihre Rolle bei der Photorespiration: Während der Photosynthese in Blättern kann 2-Phosphoglycolat als toxisches Nebenprodukt entstehen. In einem Rückgewinnungsprozess, der sowohl Peroxisomen als auch Mitochondrien involviert, wird dieses Molekül in 3-Phosphoglycerat umgewandelt und dem Calvin-Zyklus zugeführt (Reumann und Weber, 2006; Bauwe *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2012; Dellerio *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2020). In Pflanzen und Pilzen enthalten Peroxisomen außerdem Enzyme des Glyoxylatzyklus, der die Konvertierung von Acetyl-CoA in C4-Körper ermöglicht und für das Wachstum auf Fettsäuren und C2-Körpern als Kohlenstoffquellen nötig ist (Kunze *et al.*, 2006). Pilzliche Peroxisomen sind metabolisch divers und an vielen Prozessen des Primär- und Sekundärstoffwechsels beteiligt (Van der Klei und Veenhuis, 2006; Bartoszewska *et al.*, 2011; Stehlik *et al.*, 2014). Die Peroxisomen methylotropher Hefen enthalten alle Schlüsselenzyme des Methanol-Metabolismus (Veenhuis *et al.*, 1978; Van der Klei *et al.*, 2006). In vielen Pilzen finden sich Isoformen glykolytischer Enzyme in den Peroxisomen (Freitag *et al.*, 2012). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* findet die Biosynthese von L-Lysin partiell in den Peroxisomen statt (Breitling *et al.*, 2002; Al-Saryi *et al.*, 2017). Neben der Beteiligung am Primärmetabolismus werden auch viele Sekundärmetaboliten in den Peroxisomen synthetisiert (Bartoszewska *et al.*, 2011). Die Biosynthese von Penicillinen in *Aspergillus nidulans* und *Penicillium chrysogenum* erfolgt teilweise in Peroxisomen (Müller *et al.*, 1991; Müller *et al.*, 1992; Spröte *et al.*, 2009; Kistler *et al.*, 2015). Auch für die Biosynthese von Glykolipiden im Basidiomycet *Ustilago maydis* sind Peroxisomen von entscheidender Bedeutung (Hewald *et al.*, 2006; Freitag *et al.*, 2014). In einigen Ascomyceten finden sich außerdem *Woronin Bodies*, eine hochspezialisierte Form der Peroxisomen, die bei einer

Verletzung der Hypen die entstandenen Poren verschließen und so das Auslaufen von Zytoplasma verhindern (Woronin, 1864; Collinge und Markham, 1985; Jedd und Chua, 2000). Der evolutionäre Ursprung von Peroxisomen wirft bis heute Fragen auf. Ein endosymbiontischer Vorfahre kommt aufgrund des fehlenden Genoms und der einfachen Membran vermutlich nicht in Frage (Gabaldón, 2010; Smith und Aitchison, 2013). In Anbetracht der Ähnlichkeit des Proteinimportsystems mit dem ERAD (*endoplasmic reticulum associated protein degradation*)-Systems des ER, wäre ein evolutionärer Ursprung ausgehend von diesem Organell denkbar (Gabaldón *et al.*, 2006; Schlüter *et al.*, 2006). Die Rolle von Peroxisomen als metabolischem Organell für den Abbau von Fettsäuren weist Parallelen zu Mitochondrien auf, die ebenfalls in der Lage sind, Fettsäuren zu metabolisieren (Speijer *et al.*, 2017; Bolte *et al.*, 2015). Neben ihrer Verbindung im Hinblick auf metabolische Prozesse teilen sich Peroxisomen und Mitochondrien auch Komponenten des Teilungsapparates. Der Teilungsfaktor Fis1 ist in der Bäckerhefe und menschlichen Zellen für die Rekrutierung der Dynamin-ähnlichen GTPase Dnm1 bzw. DRP1 verantwortlich, die sowohl für die Proliferation von Mitochondrien als auch Peroxisomen gebraucht wird (Koch *et al.*, 2005; Kuravi *et al.*, 2006; Motley *et al.*, 2008; Schrader *et al.*, 2022). Vermutlich haben sowohl Mitochondrien als auch das ER zum peroxisomalen Proteom beigetragen und sind bis heute an der Biogenese dieser Organellen beteiligt (Bittner *et al.*, 2022).

1.1.2 Import peroxisomaler Matrixproteine

Die Vielfalt peroxisomaler Funktionen benötigt den Import zahlreicher Proteine in die peroxisomale Matrix. Sämtliche peroxisomale Proteine müssen nach der Translation aus dem Zytosol importiert werden (Goldman *et al.*, 1978; Lazarow *et al.*, 1985). Im Gegensatz zu anderen bekannten Importsystemen weist der Mechanismus für den Import von peroxisomalen Matrixproteinen einige Besonderheiten auf. Während Proteine für den Import in Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und Chloroplasten durch zytosolische Chaperone im ungefalteten und monomeren Zustand gehalten werden (Rapoport *et al.*, 2017; Rochaix *et al.*, 2022; Busch *et al.*, 2023), können peroxisomale Proteine sowohl vollständig gefaltet als auch in oligomerisierter Form oder in Verbindung mit Kofaktoren importiert werden (Léon *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2016; Walter und Erdmann, 2019).

Die präzise und zielgerichtete Lokalisation eines Proteins in einem zellulären Kompartiment erfordert in den meisten Fällen das Vorhandensein eines spezifischen Zielsteuerungssignals innerhalb der Aminosäuresequenz des Proteins (Blobel und Sabatini, 1971). Im Falle peroxisomaler Matrixproteine wurden unterschiedliche Typen von Importsignalen beschrieben.

Die meisten peroxisomalen Membranproteine tragen charakteristische Motive an ihrem C-Terminus (Subramani *et al.*, 1998; Brocard und Hartig, 2006; Nötzel *et al.*, 2016). Das sogenannte *peroxisomal targeting signal 1* (PTS1) wurde ursprünglich als kurzes Tripeptid mit der Sequenz Serin-Lysin-Leucin (SKL) beschrieben und ist bereits ausreichend, um die effiziente Translokation eines Proteins in Peroxisomen zu gewährleisten (Gould *et al.*, 1987, Gould *et al.*, 1989). In nachfolgenden Studien wurde diese Sequenz erweitert, sodass sich bis heute die hochkonservierte Konsensussequenz (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M) herausgebildet hat (Subramani *et al.*, 1998; Brocard und Hartig, 2006). Die Interaktion mit dem peroxisomalen Rezeptor Pex5 erfolgt über dieses Tripeptid (Gatto *et al.*, 2000), wobei die Effizienz des Imports zusätzlich von der Identität der letzten zehn bis zwölf Aminosäuren beeinflusst wird (Brocard und Hartig, 2006; Nötzel *et al.*, 2016).

In einigen Fällen erfolgt der Import von peroxisomalen Matrixproteinen in Abhängigkeit eines *peroxisomal targeting signal 2* (PTS2). Dieses N-terminale Zielsteuerungssignal weist die Konsensussequenz (R/K)-(L/V/I)-X₅-(H/Q)-(L/A) auf (Lazarow, 2006). In einer Reihe von Organismen, wie z.B. *Caenorhabditis elegans* und manchen Algen fehlt der PTS2-Importweg gänzlich (Motley *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2011). In Pflanzen hingegen werden ca. ein Drittel aller peroxisomalen Proteine in Abhängigkeit eines PTS2 in die Peroxisomen transportiert (Reumann, 2004).

Im peroxisomalen Proteom finden sich auch Proteine, die weder ein PTS1 noch ein PTS2 aufweisen. Diese Proteine erreichen ihren finalen Bestimmungsort, indem sie an andere Proteine mit peroxisomaler Zielsteuerungssequenz binden (Yang *et al.*, 2001; Titorenko *et al.*, 2002; Effelsberg *et al.*, 2015; Gaby-Maskit *et al.*, 2020). In verschiedenen Hefen wird die Nikotinamidase Pnc1 in die Peroxisomen transportiert, indem sie an die Glycerol-Phosphat-Dehydrogenase 1 (Gpd1) bindet. Die Effizienz dieses Imports wird durch verschiedene Stressbedingungen beeinflusst (Anderson *et al.*, 2003; Effelsberg *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016; Al Saryi *et al.*, 2017). Neben diesem Mechanismus wurde für einige andere Proteine gezeigt, dass sie unabhängig von einem PTS1-Signal direkt mit dem N-terminalen Teil des Importrezeptors Pex5 interagieren können, (Van der Klei und Veenhuis, 2006; Rymer *et al.*, 2018; Kempniński *et al.*, 2020; Rosenthal *et al.*, 2020; Yifrach *et al.* 2021; Ast *et al.*, 2022). Im Falle der Acyl-CoA-Oxidase (AOx) der Bäckerhefe wurde demonstriert, dass auch die Sekundärstruktur eines Proteins für den peroxisomalen Import mittels Pex5 entscheidend sein kann (Kempniński *et al.*, 2020).

Der Importprozess beginnt mit der Erkennung und Bindung des Zielproteins im Zytosol durch einen Rezeptor (Abb. 1(1)). PTS1-Proteine werden durch Pex5 erkannt und anschließend zum

Peroxisom rekrutiert (McCollum *et al.*, 1993; Van Der Leij *et al.*, 1993). Dieses Protein enthält in seiner C-terminalen Region sieben Tetratricopeptid-Repeats, welche eine Bindetasche für das PTS1 der Zielproteine bilden (Gatto *et al.*, 2000). Die Erkennung von PTS2-Proteinen erfolgt durch Pex7. Dieser Rezeptor fungiert in vielen Organismen als Adapterprotein zwischen PTS2-Protein und Pex5 (Otera *et al.*, 1998; Woodward und Bartel, 2005; Galland *et al.*, 2007). In Pilzen bildet Pex7 hingegen einen Komplex mit Proteinen der Pex20-Familie (Edwards Purdue *et al.*, 1998; Sichtung *et al.*, 2003; Otzen *et al.*, 2005). Der Import von PTS2-Proteinen durch Pex7 und dessen Co-Rezeptoren erfolgt wahrscheinlich über einen ähnlichen Mechanismus wie der Import von PTS1-Proteinen (Rucktäschel *et al.*, 2011; Kunze, 2020).

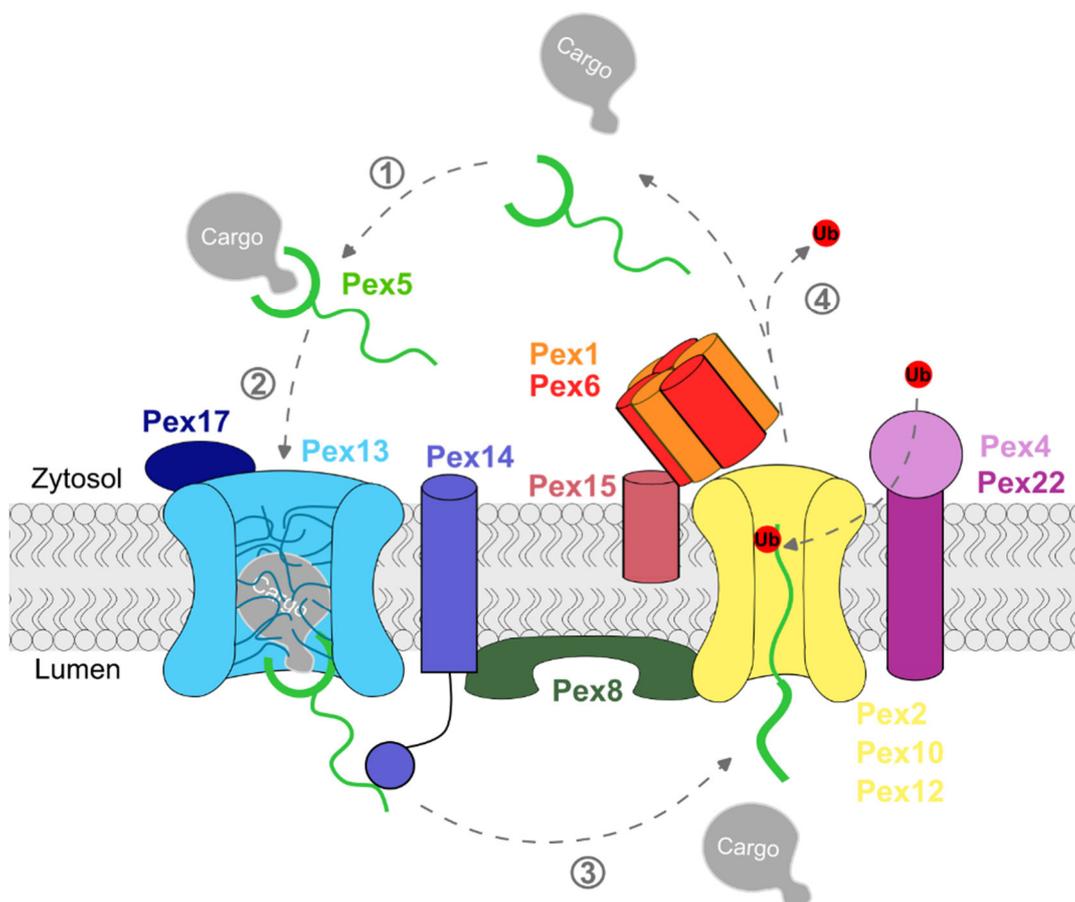


Abbildung 1: Model des peroxisomalen Matrixprotein-Imports in *S. cerevisiae* (1) Das PTS1 des Zielproteins wird im Zytosol durch den Rezeptor Pex5 erkannt und gebunden. (2) Der Rezeptor-Cargo-Komplex wird zur Membran rekrutiert, wobei Pex5 den Pex13-Kanal in der peroxisomalen Membran durchquert. Dieser Schritt beinhaltet die Interaktion der WxxxY-Motive in der N-terminalen Region von Pex5 mit den YG-Domänen von Pex13. Pex14 Extrahiert Pex5 aus dem Pex13-Kanal und verhindert einen Rücktransport des Rezeptor-Cargo-Komplexes ins Zytosol. (3) Pex5 wird durch Pex4 und den RING-Komplex (Pex2, Pex10, Pex12) mono-ubiquitiniert (Ub) und anschließend mithilfe eines ATPase-Komplexes (bestehend aus Pex1, Pex6, Pex15) aus den Peroxisomen entfernt. Dabei führt die Entfaltung der Proteinstruktur von Pex5 wahrscheinlich zur Freisetzung des Cargo-Proteins im peroxisomalen Lumen. (4) Im Zytosol erfolgt die Deubiquitinierung von Pex5.

Nachdem das Zielprotein gebunden wurde, erfolgt die Rekrutierung an die peroxisomale Membran (Abb. 1(2)). Hierfür zuständig sind die peroxisomalen Membranproteine Pex13, Pex14 und in *S. cerevisiae* zusätzlich Pex17 (Erdmann und Blobel, 1996; Gould *et al.*, 1996;

Albertini *et al.*, 1997; Huhse *et al.*, 1998). Ein oligomerer Komplex aus Pex13-Molekülen bildet einen Kanal durch die peroxisomale Membran, der starke Ähnlichkeit zu einer Kernpore zeigt. Das Zentrum dieser Pore ist durch ein dichtes Netzwerk aus Tyrosin-Glycin-Domänen charakterisiert. Pex5 durchquert den Kanal mithilfe von WxxxF/Y-Motiven in seiner N-terminalen Region, die das Netzwerk lokal auflösen können (Gao *et al.*, 2022). Das membrangebundene Protein Pex14, das mit der Pore assoziiert ist, trägt wahrscheinlich zur Extraktion von Pex5 aus dem Pex13-Kanal bei und verhindert einen vorzeitigen Rücktransport des Rezeptor-Cargo-Komplexes. Dieser Vorgang führt zur vollständigen Translokation in die peroxisomale Matrix (Dammai und Subramani, 2001; Nair *et al.*, 2004; Skowyra und Rapoport, 2022).

In Hefen ist der Importkomplex über Pex8 mit dem RING-Komplex assoziiert (Agne *et al.*, 2003). Obwohl die nachgewiesene Interaktion zwischen Pex8 und Pex5 die Vermutung nahelegt, dass Pex8 für die Entlassung des Cargo-Proteins vom Rezeptor verantwortlich ist (Wang *et al.*, 2003), hat eine kürzlich durchgeführte Studie die Entfaltung der TPR-Domänen von Pex5 während des Exports gezeigt. Diese Konformationsänderung bietet eine plausible Erklärung für die Freisetzung des PTS1-Proteins (Skowyra und Rapoport, 2022).

Für den Export ist die Mono-Ubiquitinierung von Pex5 an einem konservierten Cystein in der N-terminalen Region des Rezeptors erforderlich (Williams *et al.*, 2007, Okumoto *et al.*, 2011) (Abb. 1(3)). Für diesen Prozess sind das Ubiquitin-konjugierende Enzym Pex4 gemeinsam mit dem RING-Komplex, einem Ubiquitin-Ligase-Komplex aus Pex2, Pex10 und Pex12, verantwortlich (Platta *et al.*, 2004; 2007; Schliebs *et al.*, 2010). Dieser Komplex bildet einen Kanal mit offener Pore. Pex5 wird mit seiner N-terminalen Domäne in diesen Kanal eingeführt und anschließend von Pex2, das sich direkt über der Pore befindet, ubiquitiniert (Feng *et al.*, 2022; Feng *et al.*, 2022). Im Zytosol erfolgt die Deubiquitinierung von Pex5 durch Ubp15 (Debelyy *et al.*, 2011) (Abb. 1(4)). Nach diesem Schritt steht der Rezeptor für den nächsten Import-Zyklus zur Verfügung.

1.1.3 Duale Lokalisation peroxisomaler Proteine

Die Kompartimentierung eukaryotischer Zellen ermöglicht nicht nur das zeitlich koordinierte Zusammenspiel unterschiedlicher biologischer Prozesse innerhalb einer einzigen Zelle, sondern bildet auch die Grundlage für die Schaffung unterschiedlicher chemischer Milieus, isoliert potenziell reaktive oder toxische Zwischenprodukte und erlaubt die präzise Steuerung metabolischer Abläufe (Bar-Peled und Kory, 2022). Während einige Prozesse ausschließlich in einem bestimmten Zellkompartiment ablaufen, erfordern andere die Beteiligung mehrerer

Organellen oder finden parallel in verschiedenen Organellen statt. Demnach wird die enzymatische Aktivität und damit die Lokalisation bestimmter Proteine gleichzeitig in verschiedenen Kompartimenten benötigt. Eine solche duale Lokalisation kann durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen erreicht werden (Yogev und Pines, 2011; Freitag *et al.*, 2012; Ast *et al.*, 2013).

Die wohl einfachste Variante ist die Genduplikation. Insbesondere im Genom von *S. cerevisiae* werden häufig verschiedene Isoformen eines Enzyms codiert, da das gesamte Genom im Lauf der Evolution dupliziert wurde (Kellis *et al.*, 2004). So werden drei Isoformen der NADH-abhängigen Malat-Dehydrogenase (Mdh) codiert, die jeweils eine unterschiedliche Lokalisation im Zytosol (Mdh2), den Mitochondrien (Mdh1) oder den Peroxisomen (Mdh3) aufweisen (McAlister-Henn und Thompson, 1987; Minard und McAlister-Henn, 1991; Steffan und McAlister-Henn, 1992). Zusätzlich kann Mdh2 über die Assoziation mit der peroxisomalen Isoform Mdh3 in Peroxisomen transportiert werden. Dieser Importmechanismus steigert die Effizienz des Glyoxylatzyklus (Gabay-Maskit *et al.*, 2020).

Über diverse transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen können unterschiedliche Isoformen eines Proteins von einem Gen abgeleitet werden. In Pilzen werden die peroxisomalen Isoformen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und der 3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK) durch alternatives Spleißen oder das programmierte Überlesen von Stopcodons generiert, wobei der molekulare Mechanismus in unterschiedlichen Spezies variiert (Freitag *et al.*, 2012). Im menschlichen Organismus führt dieser Mechanismus ebenfalls zur Bildung peroxisomaler Isoformen der Laktat-Dehydrogenase und der Malat-Dehydrogenase 1 (Schueren *et al.*, 2014; Stiebler *et al.*, 2014). Über die Expression peroxisomaler und cytosolischer Isoformen beider Enzyme entstehen zwei redundante NAD⁺/NADH-Shuttle-Systeme, die der Aufrechterhaltung der peroxisomalen Redoxhomöostase dienen (Chorny *et al.*, 2022).

In *U. maydis* entsteht durch die Nutzung von zwei alternativen Startcodons eine N-terminal verlängerte Isoform der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, die ein PTS2 aufweist (Kremp *et al.*, 2020). In *Candida albicans* führt wiederum alternatives Spleißen zur Expression einer peroxisomalen Isoform dieses Enzyms (Strijbis *et al.*, 2012).

Eine duale Lokalisation im Zytosol und in den Peroxisomen wird häufig bei Proteinen beobachtet, die ein unkonventionelles PTS1-Motiv aufweisen, da diese Moleküle vor ihrem Import eine längere Zeit im Zytosol verbleiben (Ast *et al.*, 2013). Die subzelluläre Verteilung von Proteinen kann auch durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. Die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase 1 in *S. cerevisiae* trägt ein PTS2, die Lokalisation des

Proteins wird aber unter osmotischem Stressbedingungen beeinflusst, indem Serin-Reste nahe des PTS2 phosphoryliert werden (Jung *et al.*, 2010).

Einige Proteine weisen sowohl N-terminale Zielsteuerungssequenzen, beispielsweise für Mitochondrien oder das ER, sowie ein C-terminales PTS1 auf. Lange nahm man an, dass die frühere Zugänglichkeit des N-terminalen Motivs während der Translation zu einer Dominanz dieses Zielsteuerungssignals führt (Ast *et al.*, 2013; Kunze und Berger, 2015). Die Entdeckung eines bisher unbekanntes Mechanismus, bei dem die Proteinphosphatase Ptc5 aus *S. cerevisiae* nach ihrem Import in Mitochondrien in Peroxisomen überführt werden kann, brachte jedoch neue Erkenntnisse hinsichtlich der Lokalisation von Proteinen mit dualen Zielsteuerungssequenzen und ihrer physiologischen Funktion (Abb. 2).

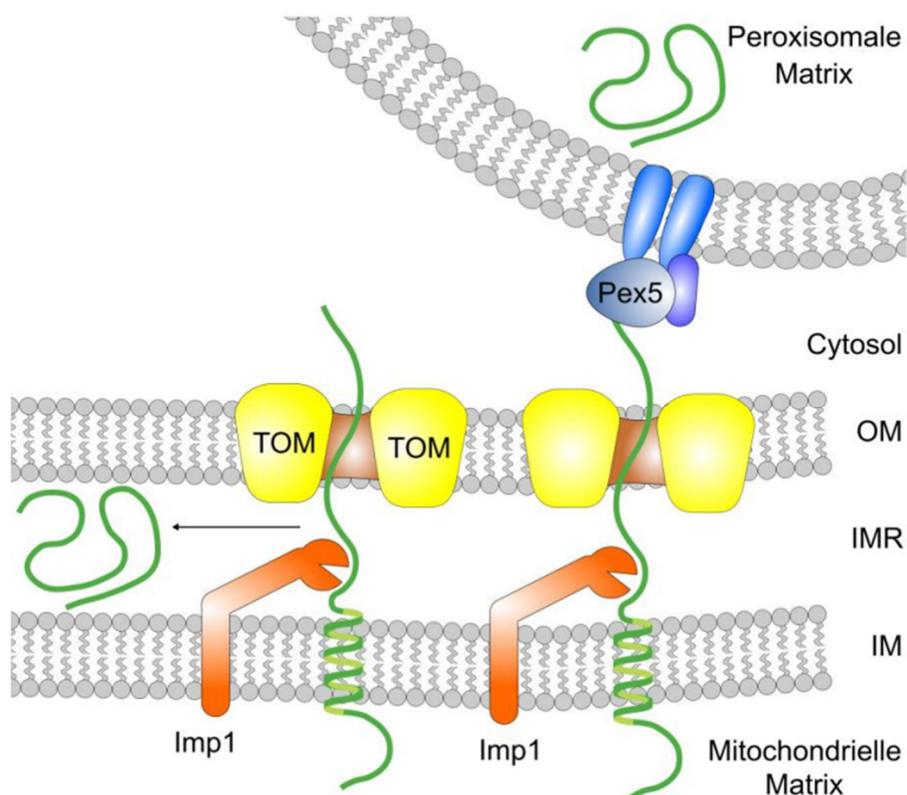


Abbildung 2: Model des Mechanismus zur dualen Lokalisation von Ptc5 in *S. cerevisiae*. Ptc5 (grün) wird über den TOM-Komplex (gelb) in Mitochondrien importiert und mit seiner Transmembrandomäne (grüne Helix) in der inneren mitochondrialen Membran (IM) verankert. Während dieses Vorgangs kann das C-terminale PTS1 von Ptc5 im Zytosol durch Pex5 (blau) erkannt und gebunden werden. Nach der Prozessierung durch den mitochondrialen IMP-Komplex (orange) wird Ptc5 in den mitochondrialen Intermembranraum (IMR) entlassen oder in Peroxisomen importiert (Stehlik *et al.*, 2020).

Auch dieses Protein weist eine N-terminale mitochondriale Präsequenz, gefolgt von einer Transmembrandomäne und ein C-terminales PTS1 auf. Es wird zunächst in Mitochondrien importiert und in der inneren mitochondrialen Membran verankert. Während des Imports ist das C-terminale PTS1 im Zytosol frei zugänglich und kann von Pex5 gebunden werden. In Abhängigkeit dieser Interaktion wird Ptc5 nach der Prozessierung durch den IMP-Komplex

entweder durch die peroxisomale Importmaschinerie aus den Mitochondrien herausgezogen und in Peroxisomen importiert oder in den mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt. Der Transit von Ptc5 über die Mitochondrien unterbindet die schädliche Aktivität der Phosphatase im Zytosol, da im Zuge des ko-translationalen Imports in die Mitochondrien die Faltung und damit die Aktivität von Ptc5 im Zytosol verhindert wird (Stehlik *et al.*, 2020).

1.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind essenzielle Organellen eukaryotischer Zellen und hauptverantwortlich für die Erzeugung von metabolischer Energie, die aus dem Abbau von Kohlenhydraten und Fettsäuren gewonnen und über den Zitronensäurezyklus und den Prozess der oxidativen Phosphorylierung in ATP umgewandelt wird. Mitochondrien sind für die Bildung von 90% der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle verantwortlich (Balaban *et al.*, 2005) wobei ein Großteil dieser Moleküle im Zuge der Elektronentransportkette bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser gebildet wird (Madamanchi und Runge, 2007). Mitochondriale ROS fungieren als vielseitige Signalmoleküle mit bedeutenden Rollen in zellulären Prozessen, die von Zelldifferenzierung, der Regulation von Autophagie und der Aktivierung des Immunsystems bis hin zu Auswirkungen auf den Alterungsprozess reichen (Sena und Chundel, 2012; Marchi *et al.*, 2012; Ziegler *et al.*, 2015; Choi und Kim, 2019).

Mitochondrien sind in eine Vielzahl anderer zellulärer Prozesse involviert. Hierzu zählen die Synthese von Aminosäuren, Lipiden, Eisen-Schwefel-Proteinen, Häm und Biotin (Vance, 1990, Clancey *et al.*, 1993; Trotter *et al.*, 1993; Baldet *et al.*, 1996; Ajioka *et al.*, 2006; Guda *et al.*, 2007; Lill, 2009). Sie sind außerdem an der Regulation der Apoptose und der zellulären Calcium-Homöostase beteiligt (Falkenberg *et al.*, 2007; Jeong und Seol, 2008; Raffaello *et al.*, 2016).

Ihr evolutionärer Ursprung liegt vermutlich in der Phagocytose eines α -Proteobakteriums durch einen Vorläufer der eukaryotischen Zellen vor etwa 2 Millionen Jahren. Dieser Symbiont wurde im Laufe der Zeit vollständig in die Wirtszelle integriert (Gray *et al.*, 1999; Lane und Martin, 2010). Wie ihr evolutionärer Vorfahre verfügen Mitochondrien über zwei Membranen. Die mitochondriale Matrix ist von der inneren mitochondrialen Membran (IMM) umgeben, der darauffolgende Intermembranraum (IMS) wird durch die äußere mitochondriale Membran (OMM) vom Rest der Zelle abgegrenzt. Die IMS gliedert sich in zahlreiche Membraneinstülpungen, sogenannte Cristae, die zu einer starken Oberflächenvergrößerung führen und Raum für die Atmungskettenkomplexe und die ATP-Synthasen bieten (Alberts *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2006).

Auch Mitochondrien sind dynamische Organellen, deren Morphologie, Verteilung und Proteom von Faktoren wie dem Zelltyp und den Umweltbedingungen beeinflusst wird (Bakeeva *et al.*, 1978; Mootha *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006; Jendrach *et al.*, 2008). In der Zelle bilden sie ein tubuläres Netzwerk, das sich kontinuierlich verändert (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994, Lackner *et al.*, 2014). Die Prozesse der mitochondrialen Teilung und Fusion werden von Dynamamin-ähnlichen GTPasen (DRPs) vermittelt. Das DRP Dnm1/DRP1 (Hefe/Säugetiere) treibt die Abschnürung der mitochondrialen Membranen voran, während die DRPs Fzo1/MFN1/2 und Mgm1/OPA1 die Fusion der äußeren und inneren mitochondrialen Membranen vermitteln (Hoppins *et al.*, 2007, Van der Blik *et al.*, 2013).

Aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs besitzen Mitochondrien ein eigenes Genom und einen vollständigen Transkriptions- und Translationsapparat (Schatz, 1963; Corneo *et al.*, 1966; Fox, 2012). Im Laufe der Evolution wurde das mitochondriale Genom jedoch stark reduziert und ins Wirtsgenom integriert (Gray *et al.*, 1999), sodass nur noch einige Proteine des Atmungsketten-Komplexes lokal codiert und synthetisiert werden (Foury *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2014; Kumari, 2018). Der übrige Teil des mitochondrialen Proteoms wird im Zytosol translatiert und über verschiedene Translokationssysteme in Mitochondrien importiert (Herrmann und Neupert, 2013, Pfanner *et al.*, 2019). Dazu besitzt ein Großteil der mitochondrialen Proteine eine N-terminale Präsequenz (Foury *et al.*, 1998; Vögtle *et al.*, 2009). Diese Präsequenz besteht aus 15-50 Aminosäuren, die positiv geladene α -Helices bilden (Vögtle *et al.*, 2009; Herrmann und Neupert, 2013). Eine zweite Gruppe mitochondrialer Proteine nutzt interne Signal, die sich über die Gesamtlänge des Proteins erstrecken. Bei solchen Proteinen handelt es sich meist um Membranproteine der IMM, OMM oder Proteine des IMS (Koehler *et al.*, 1999; Pfanner und Geissler, 2001). Da diese internen Signalsequenzen häufig hydrophobe Segmente aufweisen, werden sie mit Hilfe von Hitzeschockproteinen der Hsp70- bzw. Hsp90-Klasse vor Aggregation im Zytosol geschützt (Young *et al.*, 2003).

Der TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*) dient als allgemeine Eintrittspforte in die Mitochondrien. Es handelt sich um einen Multi-Protein-Komplex, der sich aus diversen Präprotein-Rezeptoren für unterschiedliche Klassen mitochondrialer Proteine und einer Pore zusammensetzt (Ryan und Pfanner, 1998; Koehler *et al.*, 1999). Nach der Translokation durch die OMM verzweigen sich die Importwege je nach Zielsteuerungssequenz (Koehler *et al.*, 1999; Herrmann und Neupert, 2000; Jensen und Johnson, 2001; Pfanner und Geissler, 2001; Endo *et al.*, 2003).

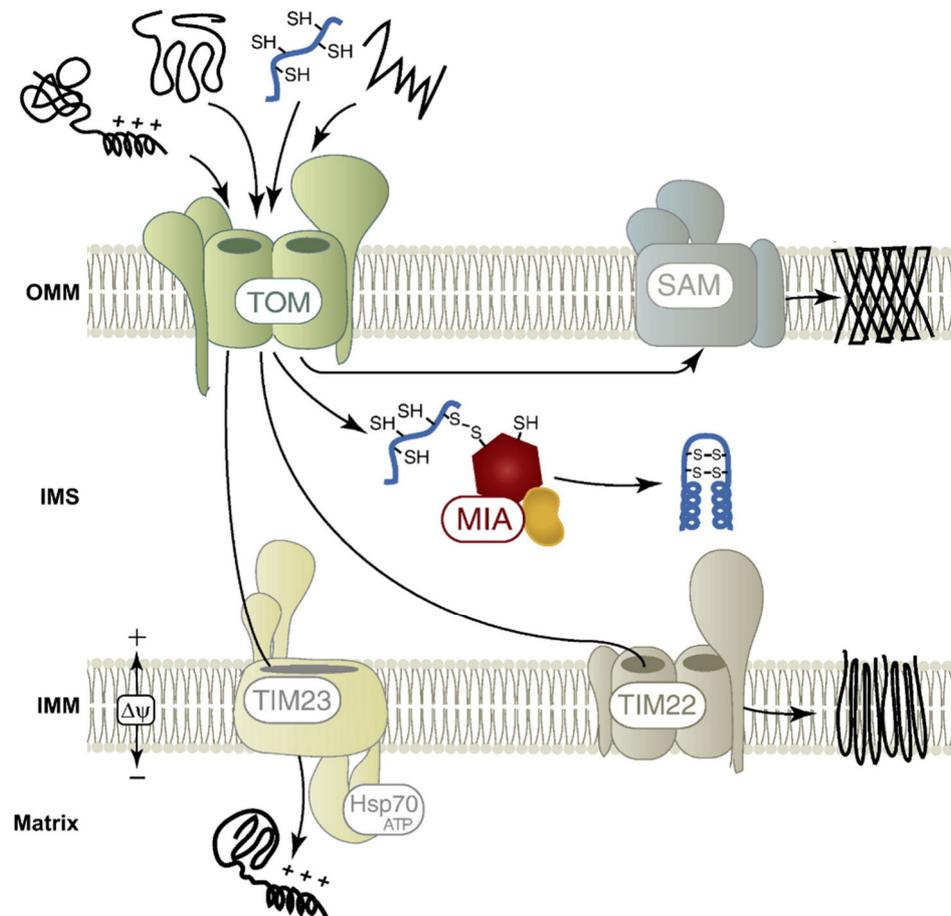


Abbildung 3: Schematische Übersicht des mitochondrialen Proteinimports. Präproteine durchqueren zunächst die äußere Membran über den TOM-Komplex und werden anschließend über verschiedene Importsysteme importiert. Die Insertion von Proteinen der äußeren Membran mit β -Faltblatt-Struktur erfordert die TIM-Chaperone des IMS (nicht gezeigt) und den SAM-Komplex. Cystin-reiche IMS-Proteine werden über den MIA-Weg importiert. Proteine der inneren mitochondrialen Membran werden von TIM-Chaperonen an den TIM22-Komplex übertragen, der ihre Membranintegration vermittelt. Vorläufer mit Präsequenzen werden vom TOM-Komplex direkt an die TIM23-Maschinerie transferiert, die diese Proteine in Kooperation mit dem Importmotor PAM in die Matrix transloziert. OMM: äußere Membran; IMS: Intermembranraum; IM: innere Membran; $\Delta\psi$: Membranpotential über die innere mitochondriale Membran (verändert nach Stojanovski *et al.*, 2007).

Präproteine mit N-terminaler Präsequenz werden in Abhängigkeit des Membranpotentials ($\Delta\psi$) an den TIM-Komplex übertragen (Bauer *et al.*, 1996; Lohret *et al.*, 1997). Dieser Komplex ist auf der Matrixseite über das Chaperon mtHsp70 mit dem PAM-Komplex (*presequence translocase-associated motor*) assoziiert, wodurch die ATP-abhängige Translokation angetrieben wird (Chacinska *et al.*, 2005; Mapa *et al.*, 2010). In der Matrix erfolgt die Prozessierung der Präproteine, in den meisten Fällen durch die MPP (*mitochondrial processing peptidase*) (Taylor *et al.*, 2001; Gakh *et al.*, 2002; Neupert und Herrmann, 2007). Im Anschluss können weitere Prozessierungen erfolgen, die zusätzliche Zielsteuerungssignale oder destabilisierende Reste entfernen (Isaya *et al.*, 1991; Chacinska *et al.*, 2009; Vögtle *et al.*, 2009).

Hydrophobe Proteine der IMM, welche interne Zielsteuerungssignale enthalten, werden über den Carrier-Weg importiert. Nach der Translokation durch den TOM-Komplex werden

diese Proteine von kleinen TIM-Chaperonen im IMS erkannt und über den TIM22-Komplex in die IMM inseriert (Sirrenberg *et al.*, 1996; Kerscher *et al.*, 1997; Rehling *et al.*, 2003). Auch Vorläufer von β -Barrel-Proteinen der OMM werden im IMS durch TIM-Chaperone erkannt und über den SAM-Komplex (*sorting und assembly machinery*) in die OMM inseriert (Wiedemann *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2012; Höhr *et al.*, 2018).

Ein dritter Importweg in Mitochondrien wird von Cystein-reichen Proteinen des Intermembranraums genutzt. Nach der Translokation über die OMM durch den TOM-Komplex werden sie von Mia40 erkannt und gebunden. Mia40 fungiert als Oxidoreduktase und induziert die Bildung von Disulfidbrücken. Diese Stabilisierung der Tertiärstruktur verhindert den Rücktransport der IMS-Proteine (Chacinska *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005; Backes und Herrmann, 2017).

1.3 Membrankontaktstellen

Während bereits in den 50er Jahren erste Studien über eine Assoziation zwischen verschiedenen Organellen vorlagen (Bernhard und Rouiller, 1956, Copel und Dalton, 1959), wurden Organellen bis vor wenigen Jahren hauptsächlich als isolierte Kompartimente mit definierten biologischen Funktionen erforscht. Obwohl Organellen teilweise hoch spezialisierte Stoffwechselwege beherbergen, sind Kommunikation und der Austausch von Metaboliten zwischen Organellen erforderlich. Dies kann sowohl über vesikuläre als auch über nicht-vesikuläre Transportwege oder Membrankontaktstellen (MCSs) erfolgen (Kornmann und Ungermann, 2017; Cohen *et al.*, 2018). Bei MSCs handelt es sich um Regionen, in denen die Membranen von Organellen in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander liegen, was den effizienten Austausch von Molekülen erleichtert (Scorrano *et al.*, 2019).

Die Identifikation und Quantifizierung von MCSs und insbesondere die Unterscheidung von stochastisch auftretenden Interaktionen zwischen Organellen kann sich als schwierig erweisen. Die räumliche Nähe zweier Organellen stellt die Basis einer MCS dar und wird mit 10-80 nm angegeben (West *et al.*, 2011; Fernandez-Busnadiego *et al.*, 2015; Eisenberg-Bord *et al.*, 2016; Scorrano *et al.*, 2019). Da die Abstände zwischen Membranen an Kontaktstellen jedoch auch deutlich größer sein können (Ping *et al.*, 2016), ist die Distanz zwischen zwei Organellen für die Definition einer MCS allein nicht ausreichend (Scorrano *et al.*, 2019). Die Bildung von MCSs wird durch sogenannte *Tether* induziert, physische Brücken, die auf Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Wechselwirkungen basieren (Prinz *et al.*, 2014; Scorrano *et al.*, 2019). Die Anreicherung spezifischer Proteine oder Lipide, die die Interaktion zwischen den Organellen vermitteln und regulieren, ist ein wesentlicher Bestandteil der Definition einer MCS. Darüber

hinaus zeichnen sich MCSs durch die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der beteiligten Organellen aus. Es erfolgt keine vollständige Verschmelzung der Membranen, obwohl vorübergehende Membranfusionen oder die Bildung von Vesikeln auftreten können. MCSs müssen zudem eine spezifische Auswirkung auf die Funktion oder Zusammensetzung mindestens eines der beteiligten Organellen haben (Prinz *et al.*, 2014; Scorrano *et al.*, 2019). MCS wurden bereits für nahezu alle Organellen beschrieben, darunter Mitochondrien, das ER, Peroxisomen, der Golgi-Apparat, Endosomen und die Plasmamembran (Helle *et al.* 2013; Eisenberg-Bord *et al.*, 2016).

Das Netzwerk des ERs durchzieht die gesamte Zelle und spielt eine zentrale Rolle bei der Biosynthese von Proteinen und Lipiden. Über sogenannte VAPs (*vesicle associated membrane protein*) können diverse MCS mit anderen Organellen etabliert werden (Murphy und Levine, 2016). Ein Beispiel hierfür findet sich in Säugetieren. ACBD5 (*Acyl-CoA binding domain containing 5*) ist ein Protein, welches in der peroxisomalen Membran verankert ist (Ferdinandusse *et al.*, 2017). Es interagiert mit den VAMP-assoziierten Proteinen A und B (VAPA und VAPB) und ermöglicht den Austausch von Lipiden zwischen beiden Organellen (Hua *et al.*, 2017; Costello *et al.*, 2017a).

In *S. cerevisiae* stellt der ERMES-Komplex (*ER-mitochondria encounter structure*) eine wichtige Verbindung zwischen den Mitochondrien und dem ER her (Kornmann *et al.*, 2009, Kornmann *et al.*, 2010; Kornmann *et al.*, 2011). Er setzt sich zusammen aus Mmm1, das in der ER-Membran verankert ist, sowie zwei mitochondrialen Proteinen, Mdm34 und Mdm10, welche sich in der OMM finden. Zusätzlich wird Mdm12 für die strukturelle Integrität des Komplexes benötigt (Lang *et al.*, 2015). Die GTPase Gem1 ist ebenfalls mit dem Komplex assoziiert und an dessen dynamischer Regulation beteiligt (Kornmann *et al.*, 2011). Die durch den ERMES-Komplex induzierte Nähe zwischen Mitochondrien und dem ER begünstigt vermutlich den Transfer von Calcium-Ionen vom ER in die Mitochondrien (Kornmann *et al.*, 2010). Ein Ortholog des Proteins Mmm1 ist auch in Säugetieren von kritischer Bedeutung für den Transfer von Calcium-Ionen (Hirabayashi *et al.*, 2017). Drei Proteine des ERMES-Komplexes weisen SMP (*synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding protein*) -Domänen für die Bindung von Lipiden auf (Kornmann *et al.*, 2009; Kornmann *et al.*, 2011; AhYoung *et al.*, 2015). In den entsprechenden Deletionsmutanten ist die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membran verändert (Osman *et al.*, 2009). Die jüngste Strukturaufklärung des ERMES-Komplexes zeigt, dass dieser eine kontinuierliche hydrophobe Rinne zwischen dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien bildet. Diese Struktur kann den Transfer von Lipiden ermöglichen (Wozny *et al.*, 2023). Eine weitere Studie zeigte eine

Interaktion zwischen Mdm34 und dem PMP Pex11, was auf eine Funktion des ERMES-Komplexes als Tether zwischen Mitochondrien und den Peroxisomen hindeuten könnte (Mattiuzzi-Ušaj *et al.*, 2015).

Auf eine enge Verbindung von Mitochondrien und Peroxisomen weist auch die Identifikation weiterer MCS zwischen beiden Organellen hin (Cohen *et al.*, 2014; Shai *et al.*, 2018). Sowohl das PMP Pex34 als auch das Mitofusin Fzo1 sind an der Ausbildung von MCS zwischen Mitochondrien und Peroxisomen beteiligt (Shai *et al.*, 2018).

1.4 Zielsetzung

Der erst kürzlich entdeckte Importmechanismus der Phosphatase Ptc5 in *S. cerevisiae*, der auf einem molekularen Tauziehmechanismus beruht, sowie die Beobachtung, dass Proteine mit dualen Zielsteuerungssequenzen die räumliche Nähe von Organellen beeinflussen können (Stehlik *et al.*, 2020), werfen die Frage auf, ob Proteine mit mehr als einer Zielsteuerungssequenz als Tether zwischen Organellen fungieren können. Diese Hypothese sollte systematisch in unterschiedlichen Modellorganismen überprüft werden.

Um Faktoren zu identifizieren, die die duale Lokalisierung von Ptc5 in *S. cerevisiae* und damit möglicherweise auch die Bildung von Kontaktstellen zwischen Organellen regulieren, wurde in Kooperation mit dem Labor von Maya Schuldiner und Einat Zalckvar am Weizmann-Institut für Wissenschaften ein genetischer Hochdurchsatz-Screen durchgeführt (Thorsten Stehlik, persönliche Mitteilung). Die hierbei identifizierten Kandidaten sollten im Hinblick auf ihre Funktion bei der peroxisomalen Translokalisierung von Ptc5 und der Ausbildung von Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen genauer untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Die Phosphatase Ptc5 als dynamischer Tether zwischen Mitochondrien und Peroxisomen in *U. maydis*

2.1.1 Um_Ptc5 erhöht den Kontakt zwischen Mitochondrien und Peroxisomen

In Pilzen sind Phosphatasen der PP2C-Familie mit konkurrierenden Zielsteuerungssequenzen phylogenetisch konserviert. Sie besitzen ein N-terminales MTS gefolgt von einer TMD sowie ein PTS1 am C-Terminus (Stehlik *et al.*, 2020). Auch in *S. cerevisiae* und *U. maydis* weist Ptc5 diese konservierte Domänenstruktur auf (Abb. 4; Stehlik *et al.*, 2020).

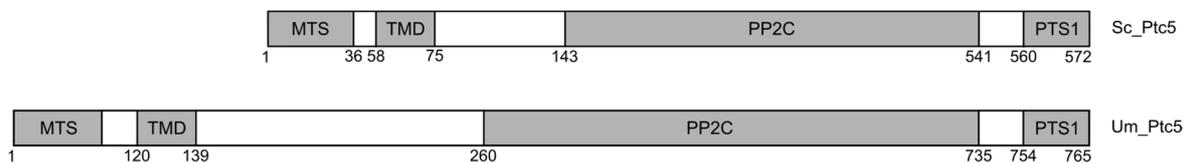


Abbildung 4: Domänenarchitektur von Ptc5 in *S. cerevisiae* und *U. maydis*. A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Ptc5 aus *S. cerevisiae*. B) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Ptc5 aus *U. maydis*. Um_Ptc5 weist im Vergleich zu Sc_Ptc5 einen um ca. 200 Aminosäuren erweiterten N-Terminus auf. MTS: mitochondrial targeting signal, TMD: Transmembrandomäne, PP2C: Protein-Phosphatase Typ 2C, PTS1: peroxisomal targeting signal 1.

U. maydis ist ein phytopathogener Basidiomycet der sich aufgrund seiner Kultivierbarkeit unter axenischen Bedingungen und der Verfügbarkeit etablierter molekularbiologischer Methoden sehr gut als Modellorganismus eignet (Kahman und Kämper, 2004; Kämper *et al.*, 2006; Brefort *et al.*, 2009). In vorherigen Untersuchungen konnte die Funktionalität des MTS und PTS1 des Orthologs von Ptc5 in *U. maydis* bereits belegt werden (Stehlik, 2019). In dieser Arbeit wurde Ptc5 im Hinblick auf seine Fähigkeit die Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien zu vermitteln untersucht.

Dafür wurden C-terminal GFP-markierte Varianten von Um_Ptc5 genutzt. Eine Variante, die in nachfolgend beschriebenen Experimenten als Kontrollprotein diente, setzte sich aus Um_Ptc5 und GFP (Um_Ptc5-GFP) zusammen. Hierdurch wird das C-terminale PTS1 des Proteins maskiert. In einer zweiten Variante wurden zusätzlich die letzten 12 Aminosäuren von Um_Ptc5 C-terminal an GFP fusioniert (Um_Ptc5-GFP-PTS). Die Expression wurde über den starken, konstitutiven *otef*-Promotor vermittelt (Spellig *et al.*, 1996). Die genetischen Konstrukte wurden stabil und ortsspezifisch in den *ip*-Lokus des Stamms Bub8 mCherry-PTS (Broomfield und Hargreaves, 1992; Freitag *et al.*, 2012) integriert.

Sowohl Um_Ptc5-GFP als auch Um_Ptc5-GFP-PTS lokalisierten gleichmäßig in tubulären Strukturen (Abb. 5A und A1), bei denen es sich um Mitochondrien handelt (Stehlik, 2019). Mithilfe des peroxisomalen Markers mCherry-PTS wurde die Anzahl von Peroxisomen in

räumlicher Nähe zu Mitochondrien quantifiziert (Abb. 5B; P_{XM}/P_{XT}). In diesem Zusammenhang wurden Peroxisomen als mit den Mitochondrien in Kontakt stehend betrachtet, wenn eine Überlagerung der Signale vorlag oder keine schwarzen Pixel zwischen diesen erkennbar waren. In Zellen, die eine GFP-markierte Variante von Um_Ptc5 mit maskiertem PTS exprimierten, waren etwa 60% der Peroxisomen in der Nähe von Mitochondrien zu beobachten. Im Gegensatz hierzu zeigten sich in Zellen, die das Protein Um_Ptc5-GFP-PTS exprimierten, nahezu alle Peroxisomen in engem Kontakt mit Mitochondrien.

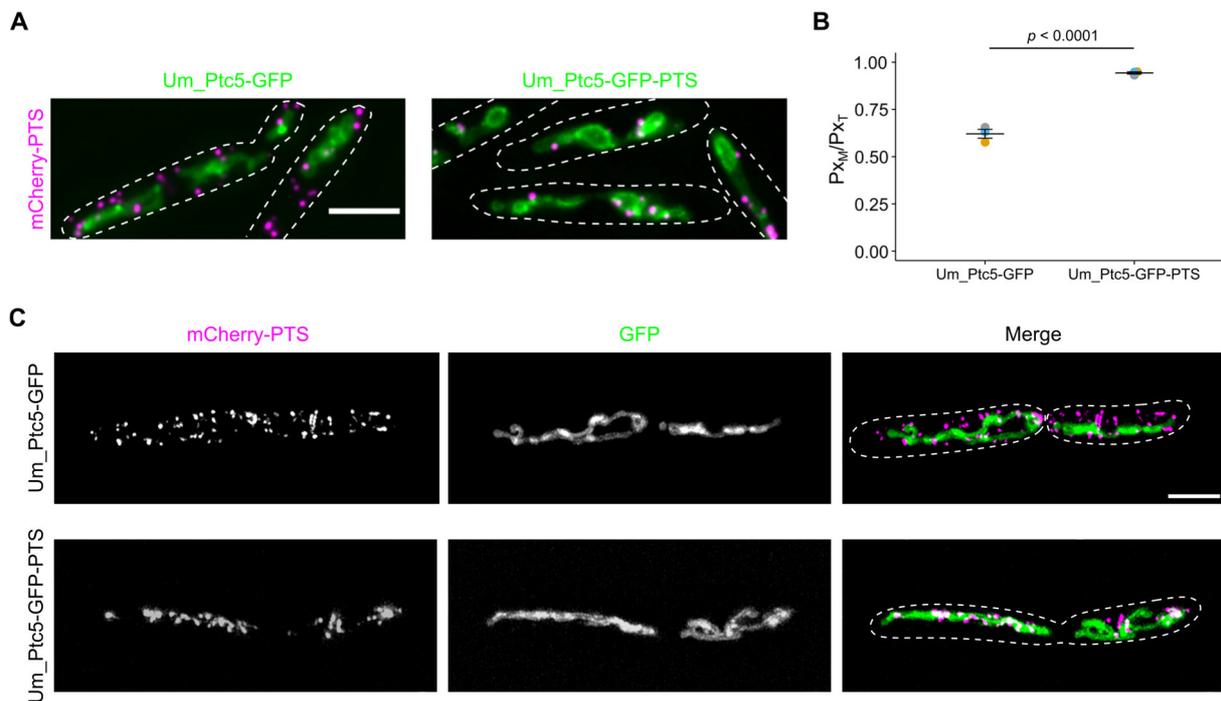


Abbildung 5: Die Überexpression von Um_Ptc5 erhöht die Anzahl von Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien. **A)** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen, welche Um_Ptc5-GFP oder Um_Ptc5-GFP-PTS (grün) unter Kontrolle des starken konstitutiven *otef*-Promoters (Spellig *et al.*, 1996) exprimierten. Die Expression erfolgte in einem Stamm der außerdem den peroxisomalen Marker mCherry-PTS (magenta) exprimierte (Freitag *et al.*, 2012). Der Maßstab entspricht 5 μ m. **B)** Quantifizierung der Kontaktaufbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in den in A) gezeigten Stämmen. P_{XM} : Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien; P_{XT} : Gesamtzahl der Peroxisomen pro Zelle. **C)** SIM-Bilder der Zellen aus A). Der Maßstab entspricht 5 μ m.

Epifluoreszenzmikroskopie kann als Methode zur Untersuchung von Kontaktstellen zwischen Organellen nur Indizien liefern. Die laterale Auflösung von etwa 250 nm und mehr als 500 nm in der axialen Ebene stellen eine Limitation dieser Methode dar, da der Abstand zwischen Organellen an Kontaktstellen meist geringer ist (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016; Scorrano *et al.*, 2019). *Structured illumination microscopy* (SIM) ist eine Methode, die ebenfalls die Verwendung klassischer fluoreszenz-basierter Marker erlaubt, im Vergleich zu traditioneller Epifluoreszenzmikroskopie aber eine verbesserte Auflösung von etwa 100 nm in der lateralen Ebene bietet (Manton *et al.*, 2022). In Kooperation mit Anita Dornes wurden die zuvor beschriebenen Stämme mit Hilfe von SIM untersucht (Abb. 5C). Beide Fusionsproteine waren

auch hier gleichmäßig in mitochondrialen Strukturen verteilt zu beobachten. Bei Anwesenheit des PTS1 war erneut eine Akkumulation von Peroxisomen an den Mitochondrien zu erkennen (Abb. 5C).

Der Goldstandard für die Charakterisierung von Kontaktstellen ist die Elektronenmikroskopie (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016; Scorrano *et al.*, 2019). Daher wurde die Ptc5-abhängige Kontaktausbildung zwischen Mitochondrien und Peroxisomen in Kooperation mit Thomas Heimerl mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Hierzu wurden die zuvor genutzten Stämme, die die beschriebenen Fusionsproteine exprimierten, präpariert und das peroxisomale Markerprotein mCherry-PTS einer Immunogoldfärbung unterzogen, sodass es durch die Anlagerung elektronen-dichter Gold- und Silberpartikel als kontrastreiche Punkte visualisiert werden konnte (Abb. 6A). Die Mitochondrien hingegen können über ihre charakteristische Struktur, die Doppelmembran und sichtbare Cristae, identifiziert werden (Duranova *et al.*, 2020).

In Zellen, die das Fusionsprotein mit funktionellem PTS1 exprimierten, stand ein deutlich erhöhter Anteil von Peroxisomen in direktem Kontakt zu Mitochondrien (Abb. 6A und 6B). Der Abstand zwischen den Organellen war in diesen Zellen ebenfalls geringer als in Kontrollzellen (Abb. 6C). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Überexpression von Um_Ptc5 in Abhängigkeit des PTS1 zur Bildung von Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beiträgt. Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen sind demnach tatsächlich in der Lage als molekulare Tether zu fungieren.

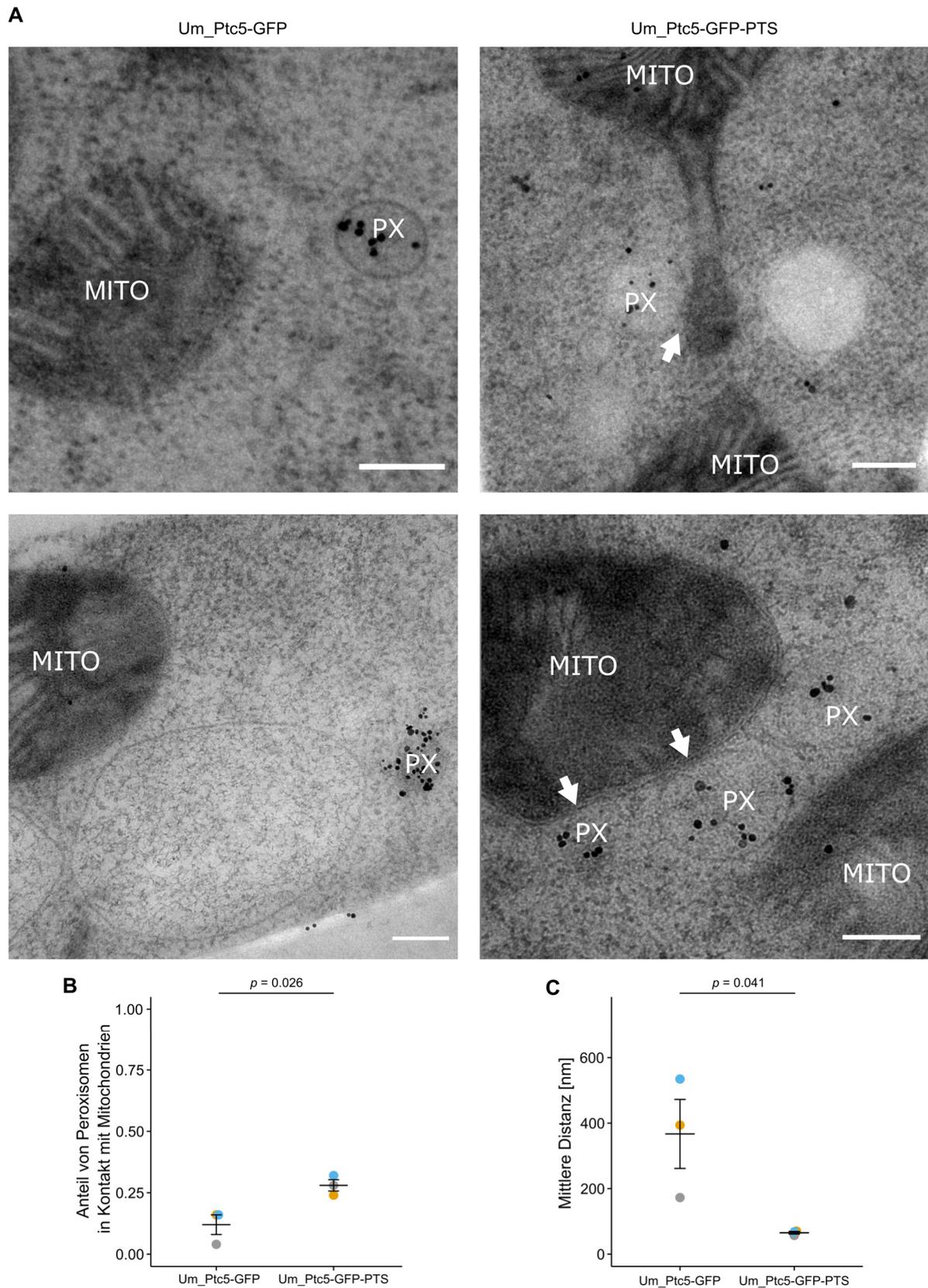


Abbildung 6: Analyse der Um_Ptc5-induzierten Bildung von Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien mittels TEM. A) TEM-generierte Bilder von Zellen, welche Um_Ptc5-GFP oder Um_Ptc5-GFP-PTS unter Kontrolle des starken konstitutiven *otef*-Promotors exprimierten. Das peroxisomale Markerprotein mCherry-PTS wurde durch Immunogoldfärbung visualisiert. Der Maßstab entspricht 200 nm. **B)** Quantifizierung der Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in den in A) gezeigten Stämmen. P_{XM} : Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien; P_{XT} : Gesamtzahl der Peroxisomen pro Zelle. **C)** Quantifizierung der Distanz zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in den in A) gezeigten Stämmen.

2.1.2 Die Dynamik der dualen Lokalisierung von Ptc5 in *U. maydis*

Eine biologische Funktion von Ptc5 in *S. cerevisiae* besteht in der Dephosphorylierung und Aktivierung der NAD-abhängigen Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (Gpd1, Stehlik *et al.*, 2020). Gpd1 ist an der Aufrechterhaltung der peroxisomalen Redoxhomöostase beteiligt (Jung *et al.*, 2010; Freitag *et al.*, 2012; Al-Saryi *et al.*, 2017) und vermutlich bei erhöhter peroxisomaler Aktivität, beispielsweise dem Wachstum in Anwesenheit von Fettsäuren, relevant.

Um die Lokalisierung von Um_Ptc5 unter möglichst physiologischen Bedingungen bestimmen zu können, wurde ein Stamm generiert, der Um_Ptc5 mit einer internen GFP-Fusion zwischen N-terminalem MTS und der TMD unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert (IntGFP-Um_Ptc5; Abb. 7A). Peroxisomen sind in *U. maydis* beim Wachstum auf Ölsäure (Z-9-Octadecensäure) essenziell (Freitag *et al.*, 2012; Ast *et al.*, 2022). Dies geht mit einer drastischen Proliferation dieser Organellen einher (Camões *et al.*, 2015). Während IntGFP-Um_Ptc5 in Anwesenheit von Glukose gleichmäßig in mitochondrialen Strukturen verteilt war, konnte bei Inkubation in Ölsäure eine Akkumulation an den Grenzflächen zu Peroxisomen beobachtet werden (Abb. 7B). Eine deutlich erhöhte Assoziation von Peroxisomen mit mitochondrialen Strukturen war ebenfalls erkennbar. Dieser Phänotyp ließ sich mittels SIM verifizieren (Abb. 7C). Die Foci an den Grenzflächen zu Peroxisomen könnten Um_Ptc5-abhängige Kontaktstellen darstellen. Es war jedoch keine eindeutige Translokalisierung in die Peroxisomen zu erkennen.

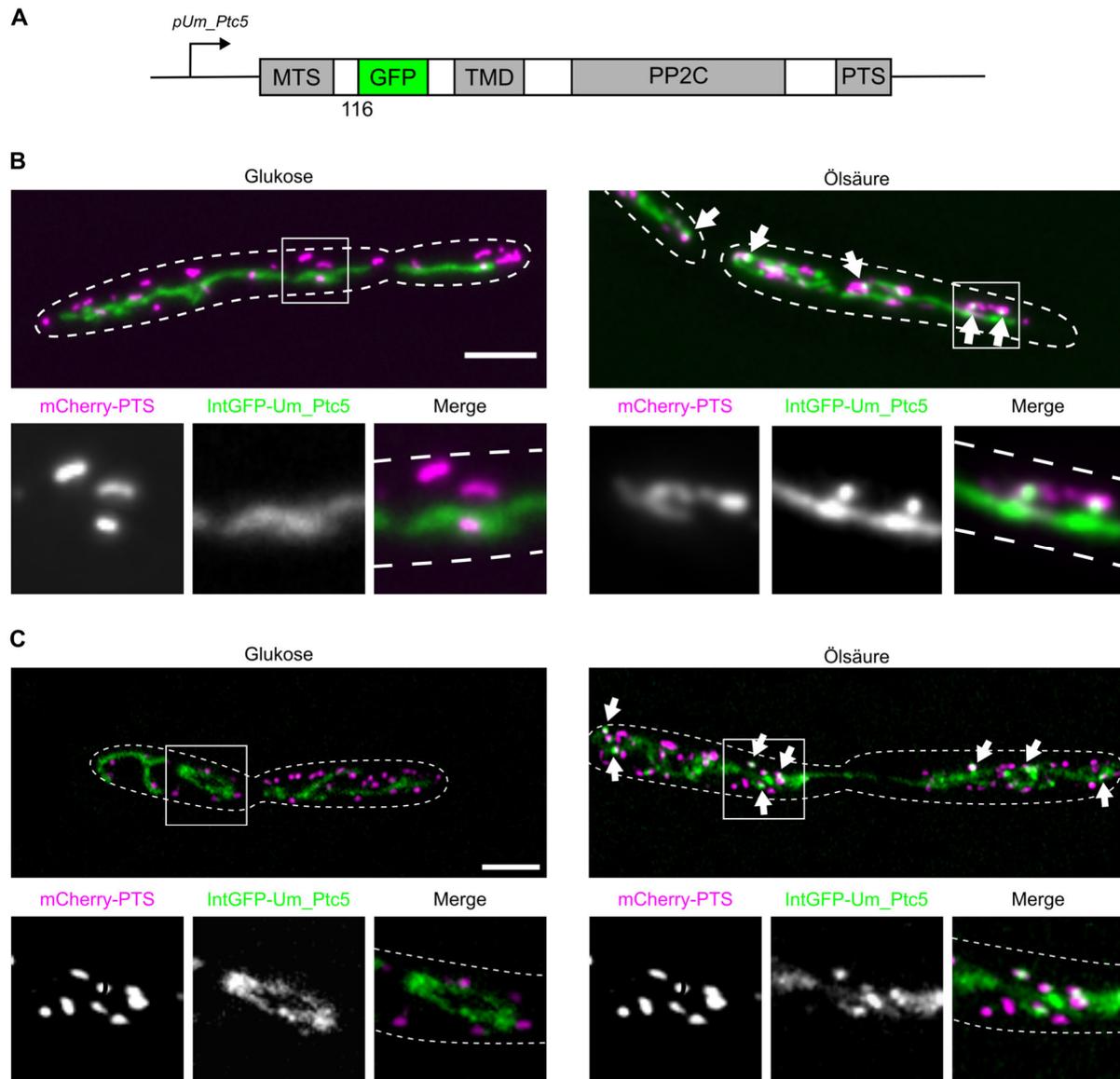


Abbildung 7: Die Um_Ptc5-abhängige Kontaktausbildung wird durch Ölsäure induziert. A) Schematische Darstellung des Konstrukts zur Herstellung einer Variante von Um_Ptc5 mit interner GFP-Fusion am endogenen Lokus. B) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen, die das Protein IntGFP-Um_Ptc5 (grün) exprimierten. Peroxisomen wurden durch das Markerprotein mCherry-PTS (magenta) visualisiert. Die Zellen wurden in Glukose- oder Ölsäurehaltigem Medium inkubiert. Der Maßstab entspricht 5µm. C) SIM-Bilder der Stämme aus B). Die Zellen wurden in Glukose- oder Ölsäurehaltigem Medium inkubiert. Der Maßstab entspricht 5µm.

Die Translokalisierung von Ptc5 aus den Mitochondrien in die Peroxisomen hängt in *S. cerevisiae* von der Prozessierung durch den mitochondrialen IMP-Komplex ab (Stehlik *et al.*, 2020). Die interne Fusion mit GFP behindert möglicherweise die Prozessierung von Um_Ptc5 oder erschwert die Extraktion des Proteins aus den Mitochondrien. Daher wurde ein Stamm, der eine C-terminal markierte Variante von Um_Ptc5 am endogenen Lokus enthält (Abb. 8A), in Glukose- oder Ölsäure-haltigem Medium inkubiert und mikroskopisch untersucht. Nach der Inkubation in Glukose-haltigem Medium lokalisierte Um_Ptc5-GFP-PTS in mitochondrialen Strukturen, wobei auch hier teilweise eine Akkumulation des Proteins an den Grenzflächen zu Peroxisomen beobachtet werden konnte. In Ölsäure-haltigem Medium war

hingegen eine Ko-Lokalisation von Um_Ptc5-GFP-PTS mit Peroxisomen zu erkennen (Abb. 8B). Die interne GFP-Fusion behindert also den peroxisomalen Transit und verstärkt so möglicherweise die Induktion der Kontaktausbildung (vgl. Stehlik *et al.*, 2020).

Insgesamt weisen die hier durchgeführten Experimente jedoch auf die Anwesenheit von Um_Ptc5 an Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien hin und belegen die Funktion des Proteins als Tether. Die Translokalisierung des Proteins und womöglich auch die Induktion von Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen scheint an den metabolischen Zustand der Peroxisomen gekoppelt zu sein.

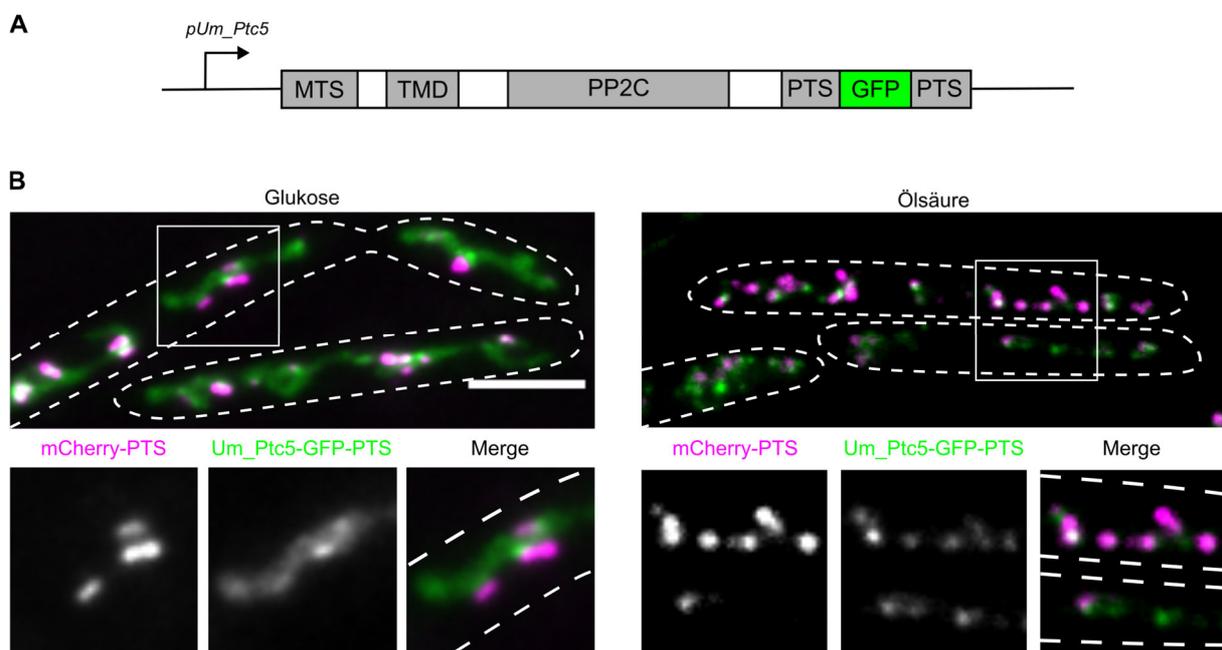


Abbildung 8: Die Ko-Lokalisation von Um_Ptc5 mit Peroxisomen wird durch Ölsäure verstärkt. **A)** Schematische Darstellung des Konstrukts zur Expression einer Variante von Um_Ptc5 mit C-terminaler GFP-PTS-Fusion am endogenen Lokus. **B)** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen, die das Protein Um_Ptc5-GFP-PTS (grün) unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimierten. Die Expression erfolgte in einem Stamm der außerdem den peroxisomalen Marker mCherry-PTS (magenta) exprimierten. Die Zellen wurden für vier Stunden in Glukose- oder Ölsäure-haltigem Medium inkubiert. Der Maßstab entspricht 5µm.

2.2 Unterschiedliche Proteine mit dualen Lokalisierungssignalen können in *S. cerevisiae* die Bildung von Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beeinflussen

Nach der Charakterisierung von Um_Ptc5 als Modell eines Tethers mit konkurrierenden Zielsteuerungssignalen, stellte sich die Frage nach der Verbreitung dieses neuartigen Mechanismus. Für die systematische Untersuchung wurde *S. cerevisiae* als Modellorganismus verwendet.

Neben Ptc5 konnten bereits weitere Proteine mit Signalen für Mitochondrien und Peroxisomen identifiziert werden (Tabelle 1; Stehlik, 2019; Stehlik *et al.*, 2020). Für einige dieser Kandidaten

wurde eine peroxisomale oder duale Lokalisation bereits beschrieben und erste Indizien für ihre Fähigkeit zur Induktion von Organellkontakten lagen vor (Elgersma *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1999; Petrova *et al.*, 2004; Stehlik, 2019; Stehlik *et al.*, 2020).

Tabelle 1: Liste mitochondrialer Proteine mit putativem PTS1. (Stehlik *et al.*, 2020). Der P-Score beschreibt die Wahrscheinlichkeit eines funktionellen PTS1 am C-Terminus. Ein positiver Wert spricht hierbei für eine peroxisomale Lokalisierung (Neuberger *et al.*, 2003a; Neuberger *et al.*, 2003b). Für rot markierte Proteine konnte die vorhergesagte peroxisomale Lokalisierung nicht experimentell bestätigt werden.

Name	Putatives PTS1	P-Score	Vorhersage der peroxisomalen Lokalisation	Verifizierte peroxisomale Lokalisation
Cat2	ALENENKRKAKL	11,229	peroxisomal	Elgersma <i>et al.</i> , 1995
Ptc5	NPEATTKPKPRL	10,411	peroxisomal	Stehlik <i>et al.</i> , 2020
Mrp7	IARRRAFLSKL	9,854	peroxisomal	
Tes1	VYGSEDIRAKF	9,571	peroxisomal	Jones <i>et al.</i> , 1999
Mss2	KDSIKLLDKARL	9,328	peroxisomal	Stehlik, 2019
Cit2	YKELVKNIESKL	9,312	peroxisomal	Lewin <i>et al.</i> , 1990
Pet309	RKSKRVLVSKF	8,830	peroxisomal	
Lys4	KGGLEGWVKSQI	8,383	peroxisomal	
Nsa1	VAASKASKKSKI	7,400	peroxisomal	
Mic10	FRSSAGLRSSKV	7,189	peroxisomal	
Lys12	TQQVVDVLSRL	7,008	peroxisomal	
Dpi8	ATRRHLAHAPKL	6,028	peroxisomal	Stehlik, 2019
Cta1	KHASELSSNSKF	4,375	peroxisomal	Petrova <i>et al.</i> , 2004
Mrs1	AGSSKFLKGAKI	2,750	peroxisomal	
Mrp137	QRIKQNNFLSQL	1,700	peroxisomal	
Utp6	RYKILDLIISKL	0,611	peroxisomal	
Rml2	VKDRPRGKDARL	0,073	peroxisomal	Stehlik, 2019
Pxp2	CGVSWKSGVVKL	-1,169	unklar	Stehlik <i>et al.</i> , 2020
Atp8	RLYVSRRLFISKL	-5,777	unklar	
Sod2	KEASRRFDAGKI	-8,224	unklar	
Min10	PISPIGNAGSQI	-10,522	nicht peroxisomal	
Dss1	DCLEGMLELEKL	-16,365	nicht peroxisomal	
Nde1	AKVYFLGRDSSI	-17,919	nicht peroxisomal	
Tma19	AIWKHGIVEEKI	-20,006	nicht peroxisomal	
Exg2	LAITIAALCASL	-24,671	nicht peroxisomal	
Cat5	ICRVAIWSAERI	-32,755	nicht peroxisomal	

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Thorsten Stehlik und Jannik Harberding eine Reihe von Proteinen zunächst hinsichtlich ihrer dualen Lokalisierung analysiert. Hierfür wurden Vektoren erstellt, die Fusionsproteine des jeweils zu untersuchenden Proteins in Verbindung mit TagRFP, einer hellen monomeren RFP-Variante (Merzlyak *et al.*, 2007), einem HA-Tag (Field *et al.*, 1988) und dem PTS1 des jeweiligen Kandidatenproteins exprimierten. Die Expression des Fusionsproteins erfolgte über den starken konstitutiven *tefl*-Promotor (Mumberg *et al.*, 1995).

Für diese Untersuchungen wurde ein Stamm verwendet, der ein Fusionsprotein aus Ant1 (peroxisomaler ATP-Transporter) (Palmieri *et al.*, 2001; Van Roermund *et al.*, 2001) und YFP exprimiert, um die Peroxisomen visualisieren zu können und der als mitochondrialen Marker außerdem ein Fusionsprotein aus Tim50 (Geissler *et al.*, 2002) und mTurquoise2 (CFP, Cranfill *et al.*, 2016) exprimiert.

Zur Quantifizierung der Ko-Lokalisierung der Kandidatenproteine mit Peroxisomen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient (PCC) zwischen dem RFP- und YFP-Signal bestimmt. Ein hoher positiver Koeffizient deutet auf starke Korrelation und räumliche Nähe hin, während ein niedriger oder negativer Wert auf geringe oder keine Überlappung hinweist (Manders *et al.*, 1992).

Das erste Kandidatenprotein, die putative Acyl-CoA Thioesterase Tes1, wurde bereits in Peroxisomen nachgewiesen (Jones *et al.*, 1999) und im mitochondrialen Proteom identifiziert (Morgenstern *et al.*, 2017). Die genaue Funktion von Tes1 ist noch nicht vollständig aufgeklärt, Deletionsmutanten zeigen jedoch einen Wachstumsdefekt auf Ölsäure-haltigem Medium (Jones *et al.*, 1999). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse des Fusionsproteins Tes1-RFP-HA-PTS zeigte eine Lokalisation in Foci, die sowohl mit dem peroxisomalen Marker Ant1-YFP als auch dem mitochondrialen Marker Tim50-CFP überlappten. In *Δpex5*-Zellen waren keine peroxisomalen Tes1-RFP-HA-PTS-Foci erkennbar (Abb. 9A). Die peroxisomale Lokalisation in Abhängigkeit von Pex5 wurde durch die Bestimmung des PCC quantifiziert und bestätigt (Abb. 9A, rechts).

Das zweite Kandidatenprotein Mss2 könnte an der Insertion von Cox2, einer Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase, in die innere Membran der Mitochondrien beteiligt sein (Broadley *et al.*, 2001). Das Fusionsprotein Mss2-RFP-HA-PTS zeigte eine ähnliche zelluläre Verteilung wie Tes1-RFP-HA-PTS. Es konnten sowohl peroxisomale als auch mitochondriale Foci beobachtet werden. Die Quantifizierung der Korrelation des Signals von Mss2-RFP-HA-PTS mit dem Signal von Ant1-YFP zeigte, dass eine peroxisomale Lokalisation des Fusionsproteins in Abwesenheit von Pex5 vollständig ausblieb (Abb. 9B). In beiden Fällen war außerdem im wildtypischen Hintergrund im Vergleich zu einer Deletion von *PEX5* die vermehrte Assoziation von Peroxisomen und Mitochondrien erkennbar (Abb. 9).

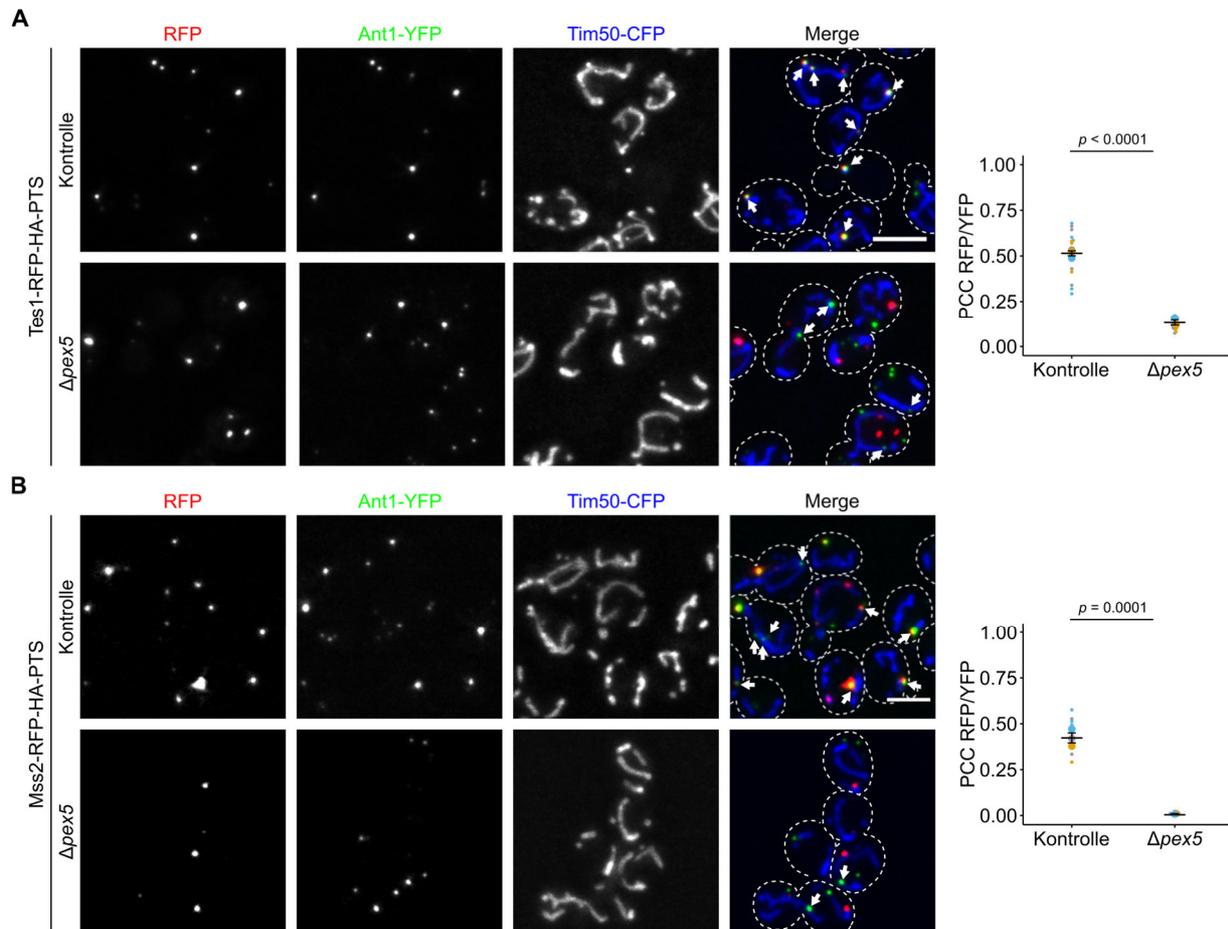


Abbildung 9: Tes1-RFP-HA-PTS und Mss2-RFP-HA-PTS lokalisieren dual in Mitochondrien und Peroxisomen. A) Links: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen, die das Protein Tes1-RFP-HA-PTS unter Kontrolle des konstitutiven *tefl*-Promotors exprimierten. Die Expression erfolgte in einem Stamm der außerdem den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50 (blau) exprimierten. Als Kontrolle wurde das Fusionsprotein zusätzlich in $\Delta pex5$ -Zellen exprimiert. **Rechts:** Quantifizierung der Korrelation des RFP und YFP-Signals mittels Pearson-Korrelationskoeffizient (PCC). **B) Siehe A),** in diesen Zellen wurde jedoch das Fusionsprotein Mss2-RFP-HA-PTS exprimiert. Weiße Pfeile markieren Peroxisomen in engem Kontakt zu Mitochondrien. Der Maßstab entspricht 5 μm .

Das dritte untersuchte Kandidatenprotein war die Carnitin-Acetyl-CoA-Transferase Cat2. Das Protein besitzt ein N-terminales MTS, gefolgt von einer Carnitin-Acetyl-Transferase-Domäne (CAT) und einem PTS1 (Fig. 10A). Die duale Lokalisierung dieses Proteins wurde bereits in früheren Studien belegt und basiert auf dem Mechanismus der alternativen Initiation der Transkription (Elgersma *et al.*, 1995). Die mitochondriale Isoform wird in der mitochondrialen Matrix vermutlich durch die beiden Proteasen MPP und Oct1 prozessiert (Abb. 10A; Vögtle *et al.*, 2009). Das Enzym katalysiert in den Peroxisomen den reversiblen Transfer von Acetylgruppen auf Carnitin, wodurch Acetyl-Carnitin gebildet wird. Dieses Molekül wird in Mitochondrien überführt, wo die Acetylgruppe durch die mitochondriale Isoform von Cat2 wieder auf CoA transferiert wird und in den Zitronensäurezyklus einfließt (Van Roermund *et al.*, 1995; Van Roermund *et al.*, 1999).

In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des Fusionsproteins Cat2-RFP-HA-PTS ließ sich eine duale Lokalisierung bestätigen (Abb. 10B). Das hier als Kontrolle verwendete

Fusionsprotein Cat2-RFP-HA, in welchem das PTS1 maskiert und demnach nicht-funktionell ist, zeigte auch peroxisomale Foci – jedoch deutlich seltener (Abb. 10B). Ein PTS1-unabhängiger Import von Cat2 ist bereits bekannt (Elgersma *et al.*, 1995, J. Harberding, persönliche Mitteilung). Der Anteil von Peroxisomen in enger räumlicher Nähe zu Mitochondrien war in Anwesenheit des PTS1 deutlich erhöht (Abb. 10B und C). Zudem konnte bei Überexpression des Fusionsproteins Cat2-RFP-HA-PTS eine Reduzierung der Anzahl an Peroxisomen pro Zelle beobachtet werden (Abb. 10B und 10C). Ein solcher Phänotyp resultiert auch aus der Expression eines artifiziellen Tethers für Peroxisomen und Mitochondrien (Shai *et al.*, 2018).

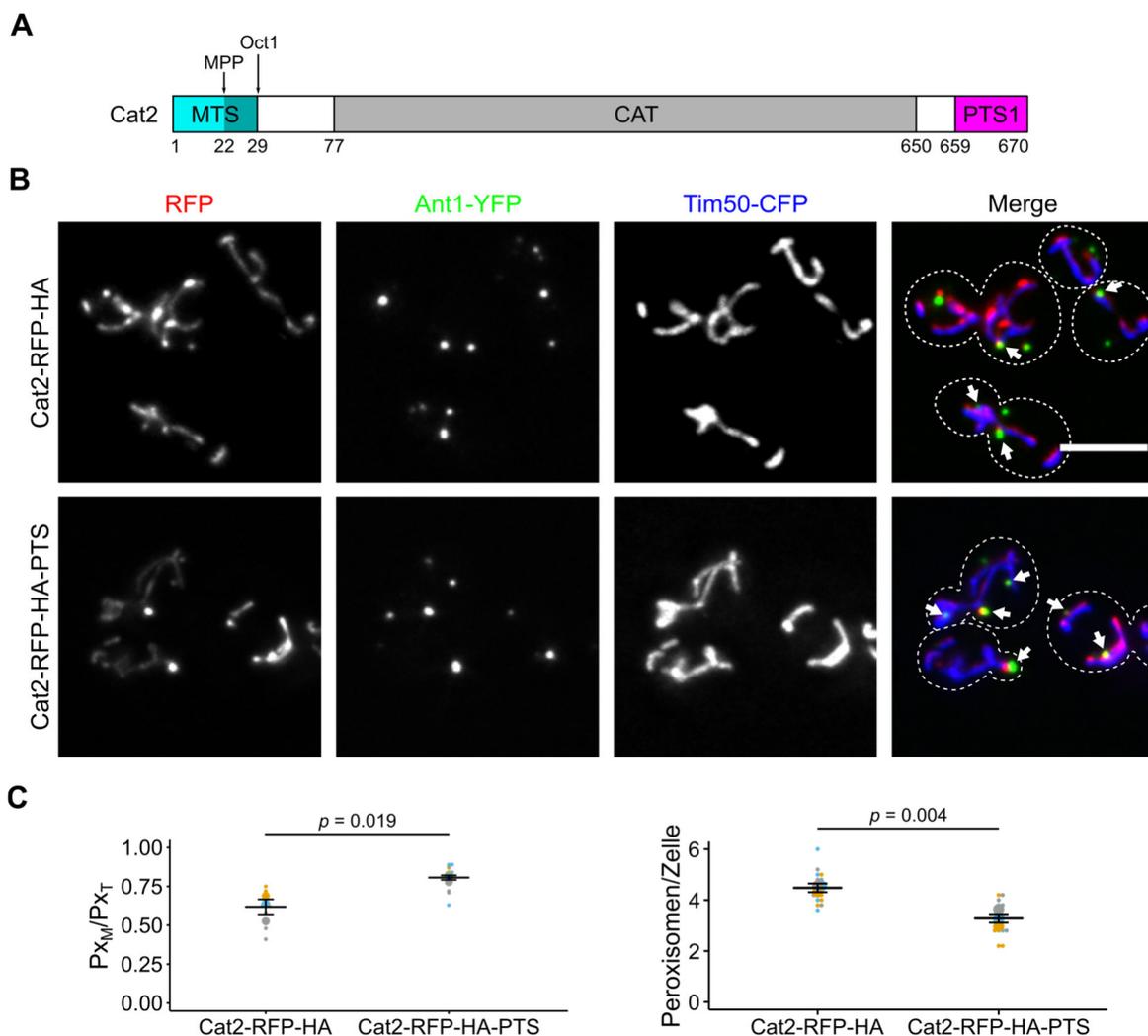


Abbildung 10: Die Überexpression des dual lokalisierten Proteins Cat2-RFP-HA-PTS induziert Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. **A**) Cat2 besitzt ein N-terminales MTS, eine Acetyl-Carnitin-Transferase-Domäne (CAT) und ein PTS1 (Elgersma *et al.*, 1995). In Mitochondrien erfolgt wahrscheinlich die Prozessierung durch zwei verschiedene mitochondriale Proteasen (MPP und Oct1) (Vögtle *et al.*, 2009). Es wurde eine duale Lokalisierung in Peroxisomen und Mitochondrien beschrieben (Elgersma *et al.*, 1995). **B**) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen, die das Protein Cat2-RFP-HA oder Cat2-RFP-HA-PTS unter Kontrolle des konstitutiven *tef1*-Promotors exprimierten. Die Expression erfolgte in einem Stamm der außerdem den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50 (blau) exprimierten. Der Maßstab entspricht 5 μ m. **C**) **Links:** Quantifizierung der Kontaktaufbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in den in A gezeigten Zellen. P_{xM} : Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien; P_{xT} : Gesamtzahl der Peroxisomen pro Zelle. **Rechts:** Quantifizierung der Anzahl an Peroxisomen pro Zelle in den in A) gezeigten Zellen.

Das vierte Kandidatenprotein Pxp2 besitzt ein N-terminales MTS, ein C-terminales PTS1 sowie eine putative Carboxymuconolacton-Decarboxylase-Domäne (CMD) (Abb. 11A) und lokalisiert dual in Mitochondrien und Peroxisomen (Stehlik *et al.*, 2020).

Während für das Enzym bisher noch keine genaue Funktion bekannt ist, zeigen Deletionsmutanten einen Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Die Überexpression sowie die Depletion des Proteins führen außerdem zu Veränderungen der intrazellulären Aminosäurezusammensetzung (Nötzel *et al.*, 2016.) Bei der Überexpression eines RFP-Fusionsproteins konnte in Abhängigkeit des PTS1 ein verstärkender Effekt auf die Ausbildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beobachtet werden (Stehlik *et al.*, 2020).

Pxp2-RFP-HA-PTS zeigte in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse, ähnlich wie die in Abbildung 9 untersuchten Fusionsproteine, eine Akkumulation in Foci, die sowohl mit dem peroxisomalen als auch mit dem mitochondrialen Marker ko-lokalisierten. Die peroxisomale Lokalisation war außerdem von der Anwesenheit des PTS1-Rezeptors Pex5 abhängig (Abb. 11B und C). Pxp2-RFP-PTS akkumuliert wie Tes1 und Mss1 im Mitochondrium in distinkten Foci. Im Falle von Pxp2 war in $\Delta pex5$ -Zellen eine gleichmäßigere Verteilung von Pxp2-RFP-HA-PTS in Mitochondrien erkennbar (Abb. 11B). Pxp2 könnte also ähnlich wie Um_Ptc5 an Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien akkumulieren. Vergleichbar zur Überexpression von Cat2-RFP-HA-PTS (Abb. 10C) führte die Überexpression von Pxp2-RFP-HA-PTS zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl an Peroxisomen pro Zelle (Abb. 11C).

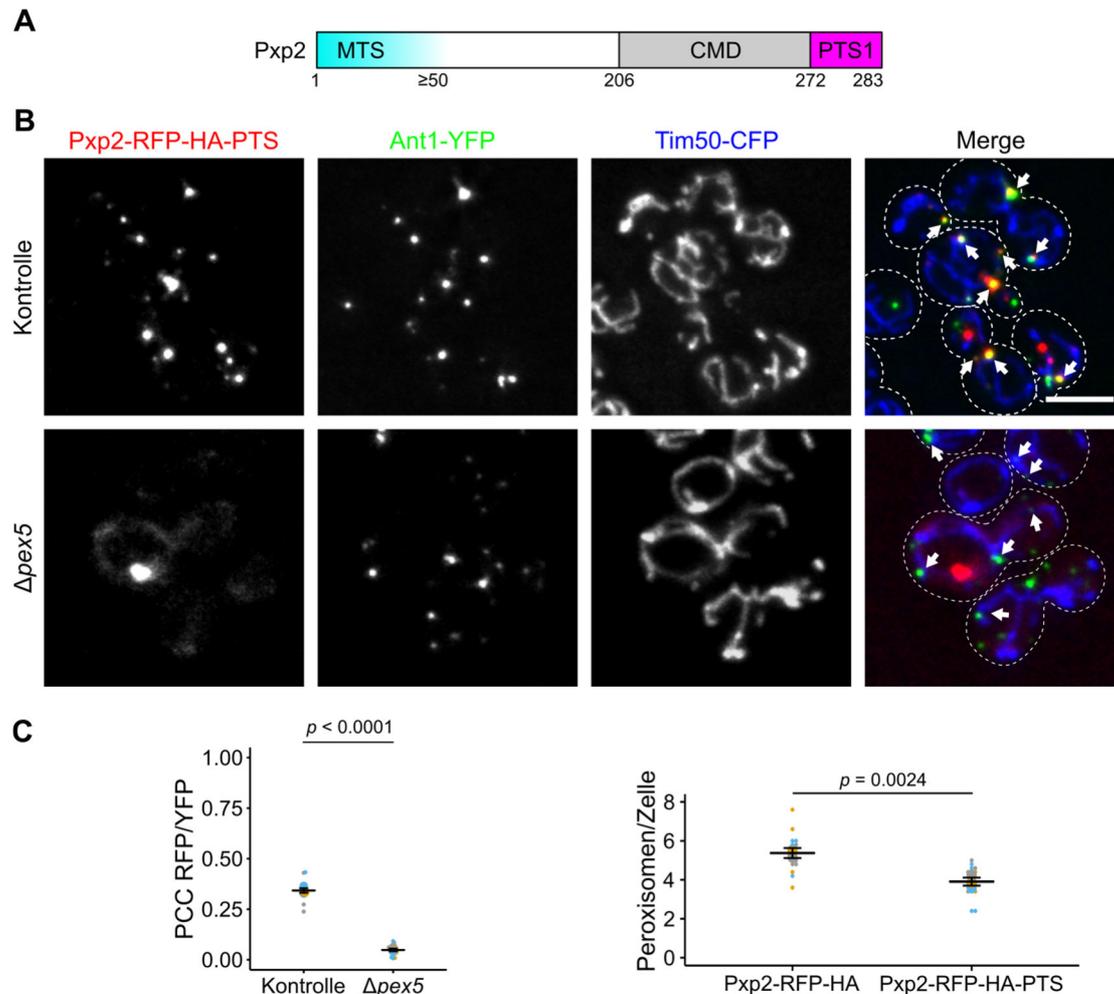


Abbildung 11: Die Überexpression des dual lokalisierten Proteins Pxp2-RFP-HA-PTS induziert Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. **A)** Pxp2 enthält ein N-terminales MTS, eine putative Carboxymuonolacton-Decarboxylase-Domäne (CMD) und ein PTS1. Es lokalisiert dual in Mitochondrien und Peroxisomen (Stehlik *et al.*, 2020). **B)** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen, die das Protein Pxp2-RFP-HA-PTS unter Kontrolle des konstitutiven *tef1*-Promotors exprimierten. Die Expression erfolgte in einem Stamm der außerdem den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50 (blau) exprimierte. Als Kontrolle wurde das Fusionsprotein zusätzlich in $\Delta pex5$ -Zellen exprimiert. Der Maßstab entspricht 5 μm . **C)** Links: Quantifizierung der Korrelation des RFP und YFP-Signals mittels Pearson-Korrelationskoeffizient (PCC). Rechts: Quantifizierung der Anzahl an Peroxisomen pro Zelle in den in A) gezeigten Zellen.

Die Fähigkeit zur Induktion von Kontaktstellen durch die hier untersuchten Kandidatenproteine war abhängig vom PTS1 bzw. vom PTS1-Rezeptor Pex5 (Abb. 10 und 11, Stehlik *et al.*, 2020). Im Umkehrschluss müsste auch das MTS für die Kontaktausbildung relevant sein. Pxp2 wurde mit einem N-terminalen RFP-HA-Tag unter Kontrolle des *tef1*-Promotors exprimiert wodurch das N-terminale MTS von Pxp2 maskiert wird. Das Fusionsprotein RFP-HA-Pxp2 lokalisierte im Zytosol, sowie in fokalen Strukturen, die mit dem peroxisomalen Marker Ant1-YFP kolo-kalisiert (Abb. 12A). Die Quantifizierung der Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien ließ keinen signifikanten Unterschied erkennen (Abb. 12B). Dies bestätigt die Annahme, dass auch das MTS für die Ausbildung von Kontakten mittels dual lokalisierter Proteine bedeutsam ist.

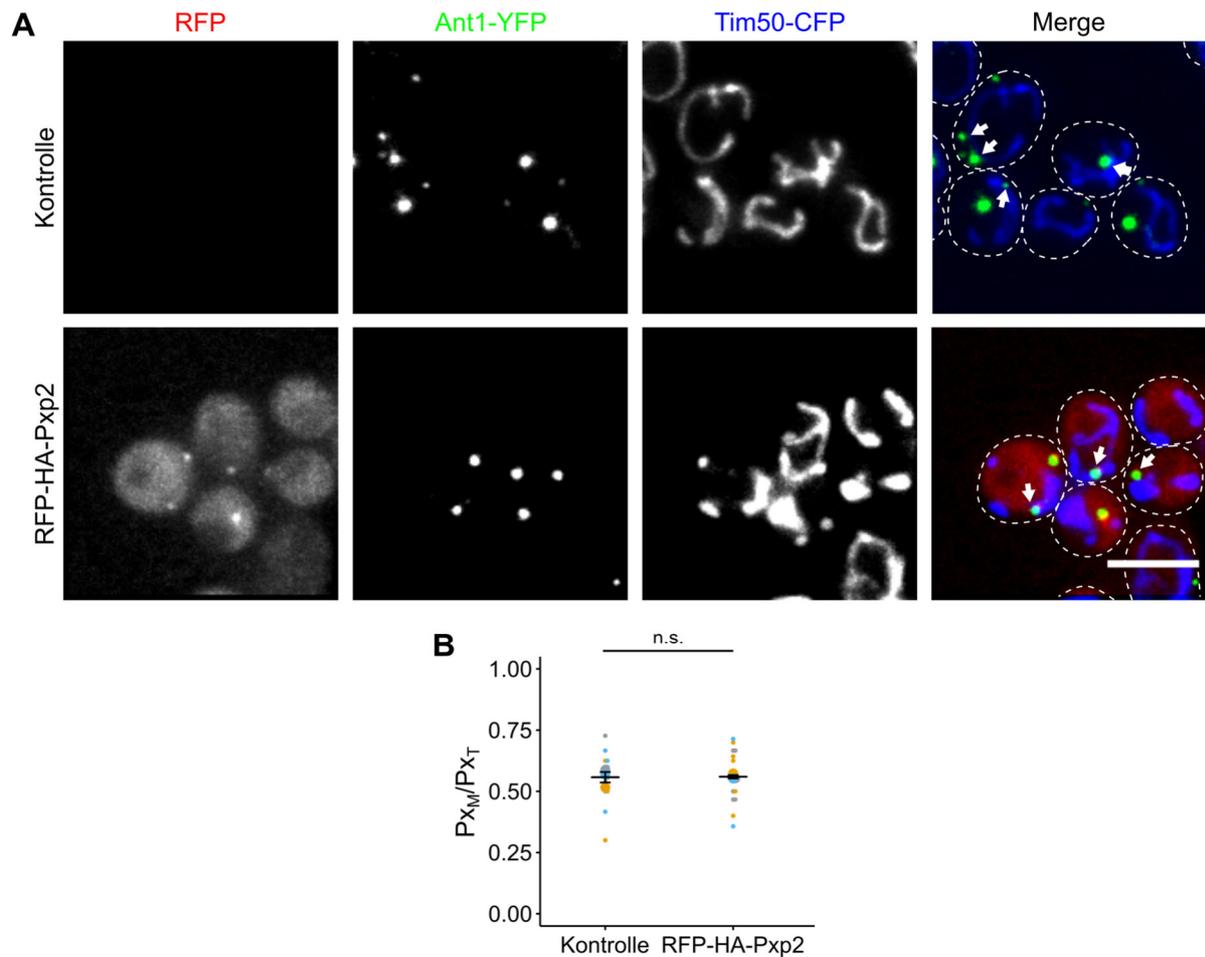


Abbildung 12: Die Überexpression des Proteins RFP-HA-Pxp2 hat keinen Einfluss auf die Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen, die das Protein RFP-HA-Pxp2 unter Kontrolle des konstitutiven *tef1*-Promotors exprimierten. Die Expression erfolgte in einem Stamm, der außerdem den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50 (blau) exprimierte. Der Maßstab entspricht 5 μ m. **B**) Quantifizierung der Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in den in A gezeigten Zellen. P_{XM} : Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien; P_{XT} : Gesamtzahl der Peroxisomen pro Zelle.

Die Nutzung von fluoreszenzmarkierten Fusionsproteinen ermöglicht eine einfache Visualisierung der Lokalisierung, kann jedoch auch die Translokation sowie die Kontaktausbildung beeinflussen (Abb. 7 und 8). Um zunächst Einblicke in die subzelluläre Verteilung zweier Kandidatenproteine unter physiologischen Bedingungen zu gewinnen, wurden Stämme erzeugt, bei denen zu untersuchende Proteine an ihrem endogenen Locus mit einem dreifachen Myc-Tag gefolgt vom jeweiligen PTS des Proteins, markiert wurden. Aus Zellen dieser Stämme wurden anschließend Organellen isoliert. Im Zuge der Präparation erfolgte die Inkubation in Ölsäure-haltigem Medium, wodurch die β -Oxidation induziert wird und die Dichte der Peroxisomen zunimmt. Dies verbessert die Trennung der Organellen mittels Dichtegradientenzentrifugation (Veenhuis *et al.*, 1987; Cramer *et al.*, 2015). Die isolierten Organellen wurden dann in einem Dichtegradienten mittels Ultrazentrifugation separiert, die gewonnenen Fraktionen auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und mittels Western Blot analysiert. Als Marker für Mitochondrien diente das Membranprotein Por1

(Mihara und Sato, 1985), als peroxisomaler Marker wurde Ant1-YFP genutzt. Ein verstärktes Signal war sowohl im Falle von Cat2-3xMyc-PTS als auch Pxp2-3xMyc-PTS in mitochondrialen und peroxisomalen Fraktionen detektierbar (Abb. 13). Demnach lokalisierten beide Proteine auch unter endogenen Bedingungen dual in Mitochondrien und Peroxisomen.

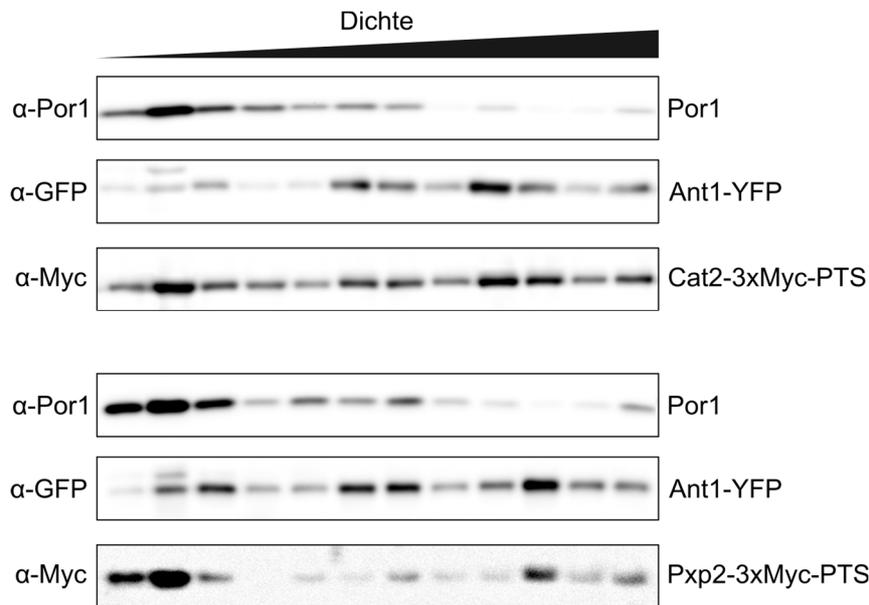


Abbildung 13: Endogen markierte Varianten von Cat2 und Pxp2 lokalisieren dual in Mitochondrien und Peroxisomen. Zellorganellen, die jeweils endogenen Fusionsproteine aus Cat2 (oben) oder Pxp2 (unten) sowie einem dreifachen Myc-Tag und dem jeweiligen PTS1 exprimieren, wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation separiert und mittels Western Blot detektiert. Die Dichte der Fraktionen nimmt von links nach rechts zu. Als mitochondriales Markerprotein diente Por1, als peroxisomaler Marker wurde Ant1-YFP nachgewiesen.

Neben der Lokalisation sollte auch der Einfluss der Proteine auf die Ausbildung von Organell-Kontakten unter möglichst physiologischen Bedingungen untersucht werden. Dazu wurden Vektoren generiert, die Fusionsproteine aus Cat2 oder Pxp2, einem dreifachen Myc-Tag und dem PTS1 des jeweiligen Proteins exprimieren. Da die Deletion eines einzelnen Tethers häufig die Bildung von Kontaktstellen zwischen Organellen nicht verhindert (Shai *et al.*, 2018), wurde hier auf die Nutzung des endogenen Promotors verzichtet und wie zuvor der starke konstitutive *tef1*-Promotor genutzt. Die Konstrukte wurden stabil in den *leu2*-Lokus eines Stamms integriert, der die zuvor beschriebenen peroxisomalen und mitochondrialen Markerproteine exprimiert. Zellen dieser Stämme wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Quantifizierung der Kontakte im Vergleich zum Kontrollstamm zeigte in beiden Fällen eine Zunahme des Anteils an Peroxisomen in räumlicher Nähe zu den Mitochondrien. Obwohl diese Zunahme im Falle von Cat2-3xMyc-PTS nicht signifikant war, ließ sich dennoch ein deutlicher Trend erkennen. Der Effekt war bei der Überexpression von Pxp2-3xMyc-PTS hingegen stärker ausgeprägt (Abb. 14).

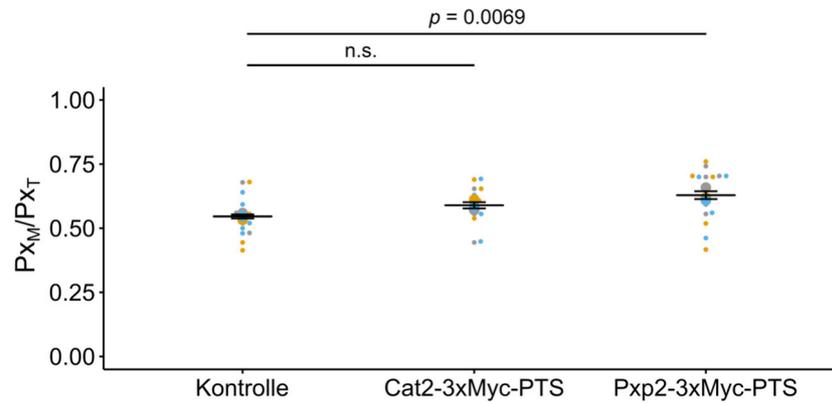


Abbildung 14: Die Überexpression von Cat2-3xMyc-PTS oder Pxp2-3xMyc-PTS erhöhen den Kontakt zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. Quantifizierung der Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien bei Überexpression der Fusionsproteine Cat2-3xMyc-PTS oder Pxp2-3xMyc-PTS. Px_M: Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien; Px_T: Gesamtzahl der Peroxisomen pro Zelle.

Die Resultate der Untersuchungen zu dual lokalisierten Proteinen deuten darauf hin, dass die Überexpression solcher Proteine in *S. cerevisiae* zu einer verstärkten Assoziation von Peroxisomen und Mitochondrien führt. Diese Assoziation scheint von den entsprechenden Zielsteuerungssignalen abhängig zu sein.

2.3 Die Importmaschinerie für peroxisomale Matrixproteine ist für die Ausbildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien relevant

Bei den meisten bisher identifizierten Tether-Proteinen handelt es sich um Membranproteine, die zwei Organellen miteinander verknüpfen können. Dies erfolgt entweder durch Wechselwirkungen mit anderen Tether-Proteinen oder durch direkte Bindung an Membranlipide der gegenüberliegenden Membran (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016; Kors *et al.*, 2022). Die Beobachtung, dass auch Matrixproteine die Bildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beeinflussen, war daher überraschend. Die Entstehung dieser Kontakte hängt sowohl von der Anwesenheit des PTS1 als auch vom peroxisomalen Importrezeptor Pex5 ab (Abb. 10 und 11), sodass die Assoziation dieser Organellen möglicherweise im Zuge des Imports von peroxisomalen Matrixproteinen vermittelt wird. Naheliegend war daher die Analyse der Kontaktausbildung in Mutanten mit gestörtem peroxisomalen Importsystem.

Als PTS1-Rezeptor ist Pex5 in *S. cerevisiae* für den Import des größten Teils der peroxisomalen Matrixproteine verantwortlich. Wenn die Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien über die duale Lokalisierung von Proteinen vermittelt wird, sollte demnach die Abwesenheit des Importrezeptors die Ausbildung von Kontakten beeinflussen. Daher wurde eine $\Delta pex5$ -Mutante im Hinblick auf die Assoziation der Organellen untersucht. Der Stamm

exprimierte Pex3-GFP, ein PMP, welches als peroxisomales Markerprotein diene. Zur Visualisierung mitochondrialer Strukturen wurde Tim50-RFP exprimiert. In Abwesenheit von Pex5 waren deutlich weniger Peroxisomen in enger räumlicher Nähe zu Mitochondrien zu beobachten (Abb. 15A und B). Während die Überexpression des dual lokalisierten Proteins Pxp2-RFP-HA-PTS zu einer verstärkten Kontaktausbildung zwischen den beiden Organellen führte, ließ sich dieser Effekt in $\Delta pex5$ -Zellen nicht mehr beobachten (Abb. 15C).

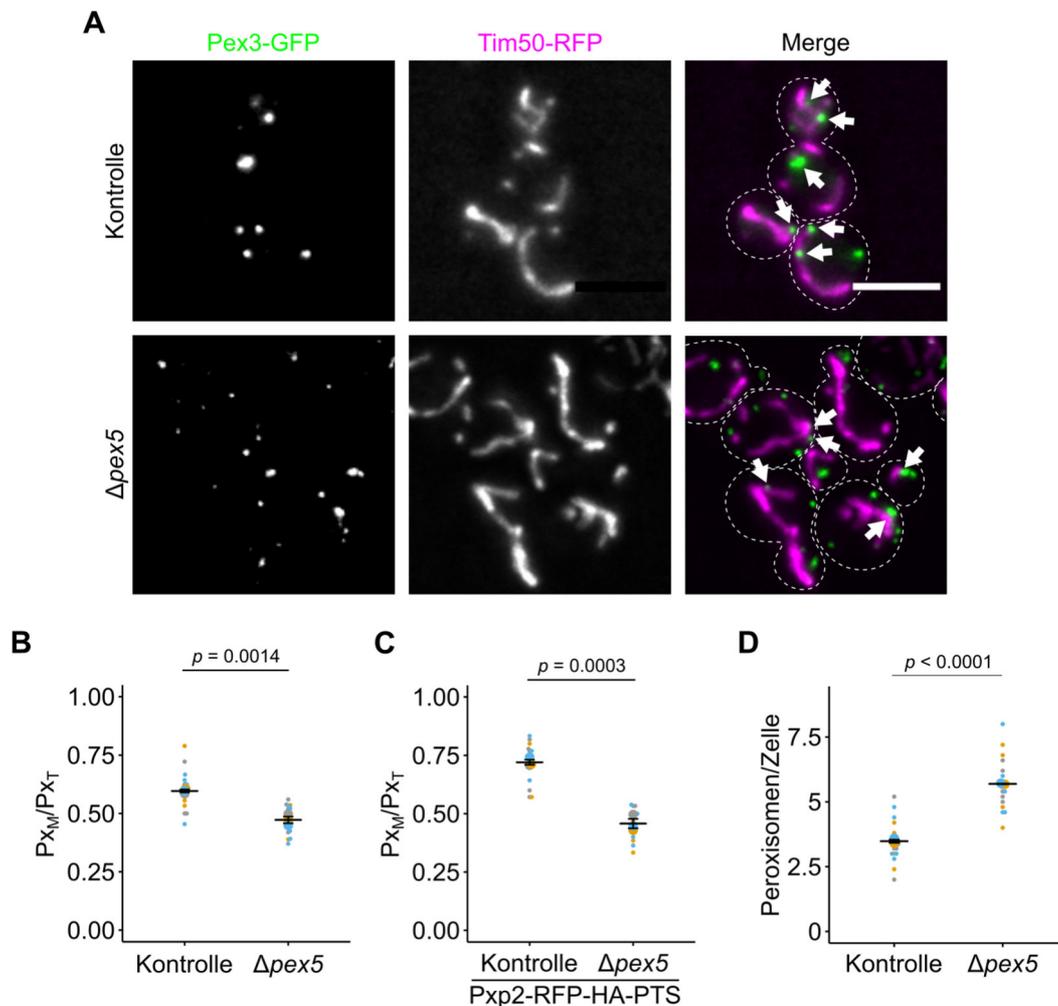


Abbildung 15: Die Deletion von PEX5 verringert die Ausbildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von $\Delta pex5$ -Zellen. Die Zellen exprimierten außerdem den peroxisomalen Marker Pex3-GFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50-RFP (magenta). Der Maßstab entspricht 5 μ m. **B)** Quantifizierung der Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien der in A) gezeigten Zellen. **C)** Quantifizierung der Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in An- und Abwesenheit von Pex5 und bei Überexpression des Proteins Pxp2-RFP-HA-PTS. **D)** Quantifizierung der Anzahl an Peroxisomen pro Zelle in den in A) gezeigten Zellen. P_{X_M} : Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien; P_{X_T} : Gesamtzahl der Peroxisomen pro Zelle.

Dieser Effekt könnte auch auf einer verringerten Anzahl von Peroxisomen durch fehlenden Import von peroxisomalen Matrixproteinen beruhen. Die Quantifizierung der Anzahl von Peroxisomen ergab jedoch den gegenteiligen Effekt (Abb. 15D), wobei auffiel, dass diese deutlich kleiner erschienen (Abb. 15A). Interessanterweise war zudem die Beweglichkeit der Peroxisomen in $\Delta pex5$ -Zellen erhöht (Video 1). Ein ähnliches Phänomen ist im Zusammenhang

mit reduzierteren peroxisomalen Kontakten bereits aufgefallen (David *et al.*, 2013; Costello *et al.*, 2017). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse auf eine Beteiligung des PTS1-Rezeptors Pex5 an der Ausbildung von Kontakten, die durch Proteine mit dualen Lokalisierungssignalen vermittelt werden, hin.



Video 1: Die Deletion von *PEX5* erhöht die Beweglichkeit von Peroxisomen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von $\Delta pex5$ -Zellen. Die Zellen exprimierten den peroxisomalen Marker Pex3-GFP. Die Aufnahme repräsentiert einen Zeitraum von 40 Sekunden. Der Maßstab entspricht 5 μ m.

2.4 Lysinmangel induziert den Kontakt zwischen Mitochondrien und Peroxisomen

Peroxisomen erfüllen vielfältige Funktionen und sind unter anderem an der Synthese von Aminosäuren beteiligt. In Hefen und anderen Pilzen erfolgt die Synthese von L-Lysin über den α -Aminoadipinsäure-Weg und findet im Zellkern, im Zytosol, in Mitochondrien und in Peroxisomen statt. Dabei katalysieren die Proteine Lys4 (Homoaconitase) und Lys12 (Homoisocitrat-Dehydrogenase) Teilschritte dieses Synthesewegs im Mitochondrium (Al-Saryi *et al.*, 2017). Interessanterweise konnten auch für diese mitochondrialen Proteine PTS1-Motive vorhergesagt werden (Tabelle 1; Breitling *et al.*, 2002; Stehlik *et al.*, 2020).

2.4.1 Der Transit in Peroxisomen ist für die Ausbildung von Kontakten über Proteine mit dualen Zielsteuerungssequenzen nicht essenziell

Um die Funktionalität der vorhergesagten peroxisomalen Zielsteuerungssequenzen *in vivo* zu überprüfen, wurden die C-terminalen 12 Aminosäuren der beiden Kandidatenproteine an RFP fusioniert. Die Ko-Lokalisierung mit dem peroxisomalen Marker Ant1-YFP zeigte, dass beide PTS1-Motive funktionell waren (Abb. 16).

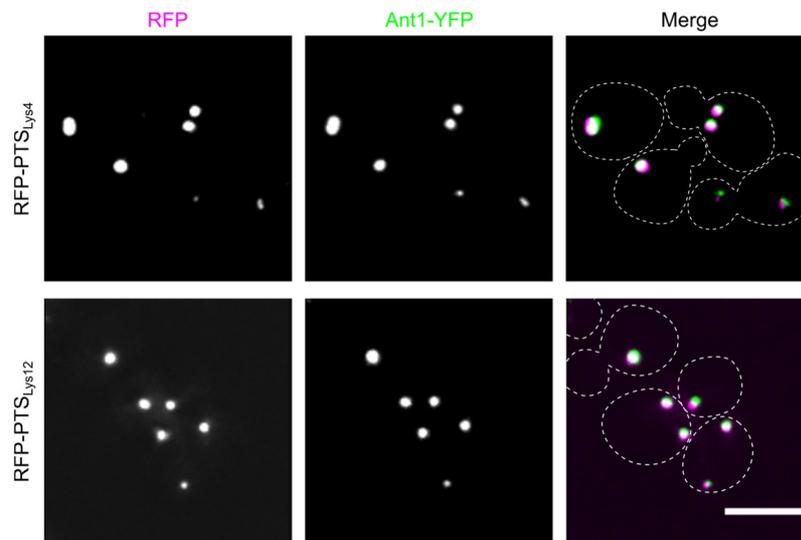


Abbildung 16: Die PTS1-Motive der Proteine Lys4 und Lys12 sind funktionell. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen, die ein Fusionsprotein aus RFP und dem PTS des Proteins Lys4 oder Lys12 exprimierten (magenta). Die Zellen exprimierten außerdem den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün). Der Maßstab entspricht 5µm.

Während das PTS1 von Lys4 und Lys12 den Import eines Reporterproteins in Peroxisomen ermöglichen kann, wurden beide Proteine bisher nicht im peroxisomalen Proteom identifiziert. Analog zur Vorgehensweise in Kapitel 2.2 wurden Stämme generiert, die Fusionsproteine von Lys4 und Lys12 mit RFP-HA mit und ohne C-terminales PTS1, unter der Kontrolle des *tef1*-Promotors sowie die beschriebenen Marker für Peroxisomen und Mitochondrien exprimierten. Die mikroskopische Untersuchung ergab, dass alle Fusionsproteine in Mitochondrien lokalisierten (Abb. 17). Eine eindeutige Translokalisierung in die Peroxisomen war nicht zu beobachten.

Die Expression beider Varianten mit PTS1 führte dennoch zu einer Erhöhung der Kontakte zwischen den Organellen (Abb. 17). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Translokalisierung in die Peroxisomen für den Mechanismus der Kontaktaufbildung über Proteine mit dualen Lokalisierungssignalen nicht essenziell ist. Es scheint, als würde eine stärkere Affinität zu den Mitochondrien die Stärke des Kontakts zwischen beiden Organellen erhöhen. Bereits im Fall von Ptc5 ist aufgefallen, dass eine Variante von Ptc5 ohne IMP-Spaltstelle die Assoziation der Organellen stark erhöht. Auch dieses Fusionsprotein lokalisierte nur noch wenig in den Peroxisomen (Stehlik *et al.*, 2020).

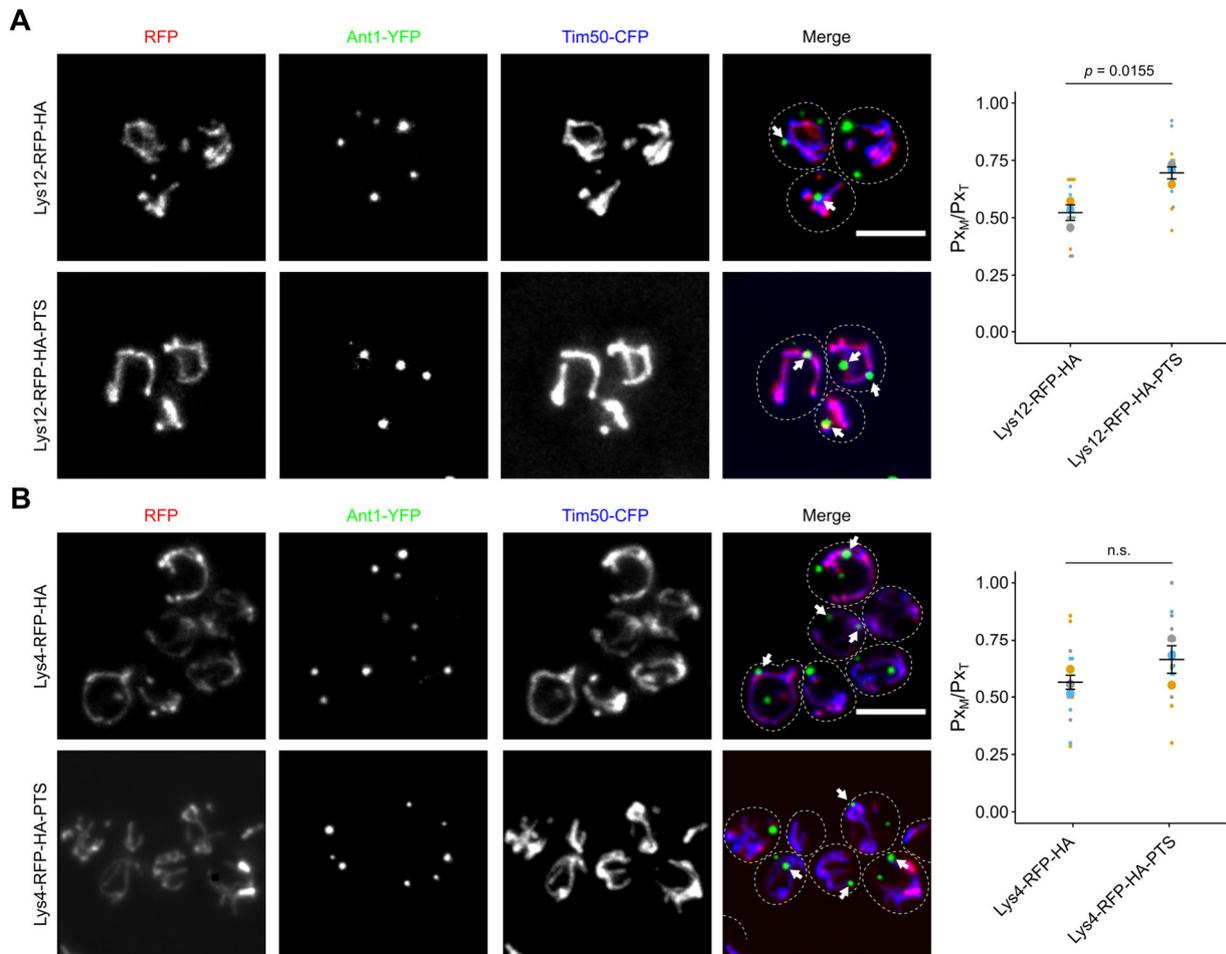


Abbildung 17: Die Überexpression der mitochondrialen Proteine Lys12-RFP-HA-PTS und Lys4-RFP-HA-PTS erhöht den Kontakt von Peroxisomen und Mitochondrien. A) links: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Zellen, die das Protein Lys12-RFP-HA(-PTS) unter Kontrolle des konstitutiven *tef1*-Promotors exprimierten. Die Expression erfolgte in einem Stamm, der außerdem den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50-CFP (blau) exprimiert. **Rechts:** Quantifizierung der Anzahl an Peroxisomen pro Zelle. P_{XM} : Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien; P_{XT} : Gesamtzahl der Peroxisomen pro Zelle. **B) Siehe A),** in diesen Zellen wurde jedoch das Fusionsprotein Lys4-RFP-HA(-PTS) exprimiert. Weiße Pfeile markieren Peroxisomen in engem Kontakt zu Mitochondrien. Der Maßstab entspricht 5 μ m.

2.4.2 Lys12 reguliert die Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in Abhängigkeit der Lysin-Verfügbarkeit

Da die Biosynthese von Lysin sowohl in Mitochondrien als auch Peroxisomen stattfindet, könnten die Kompartimente während der Synthese über Kontaktstellen miteinander verbunden werden. Ein Mangel an Lysin führt zur Induktion der Expression und Aktivität von Proteinen diese Synthesewegs (Breitling *et al.*, 2002), worüber die Ausbildung von Kontaktstellen induziert werden könnte.

Um die physiologische Regulation der Kontaktbildung analysieren zu können, wurden Stämme erzeugt, bei denen entweder ein Konstrukt das für einen neunfachen Myc-Tag oder einen neunfachen Myc-Tag gefolgt vom PTS1 von Lys12 codiert, am endogenen Locus C-terminal ins Genom integriert. Zellen dieser Stämme wurden anschließend in Medium mit und ohne Lysin angezogen und biochemisch auf die Expression der Lys12-Fusionsproteine hin

untersucht. Dazu wurden Gesamtzellextrakte mit gleichen Zellmengen präpariert und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte anschließend durch einen Western Blot. Sowohl in Zellen, die das Fusionsprotein Lys12-9xMyc als auch Lys12-9xMyc-PTS exprimierten, war bei Abwesenheit von Lysin eine deutliche Zunahme der Proteinmenge der Fusionsproteine detektierbar (Abb. 18A).

Im nächsten Schritt wurden Zellen, in denen das PTS1 von Lys12 maskiert war, sowie Zellen mit einem wildtypischen Allel in An- und Abwesenheit von Lysin angezogen und dann mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Beide Stämme exprimierten wiederum die zuvor genutzten peroxisomalen und mitochondrialen Marker, um die Quantifizierung der Kontakte zwischen beiden Organellen zu ermöglichen. In Abwesenheit von Lysin kam es im wildtypischen Hintergrund zu einer Erhöhung der Anzahl von Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien. Dieser Effekt war nicht mehr zu beobachten, wenn das PTS1 von Lys12 maskiert war (Abb. 18B). Die Wiedereinführung des PTS1 in das Fusionsprotein führte zur Wiederherstellung des zuvor beobachteten Phänotyps (Abb. 18C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von Kontakten über Proteine mit dualen Zielsteuerungssequenzen einen dynamischen Prozess darstellt, der an den metabolischen Zustand der Zelle gekoppelt ist. Über diesen Mechanismus könnten örtlich getrennte Reaktionen eines Stoffwechselwegs räumlich verbunden werden könnten.

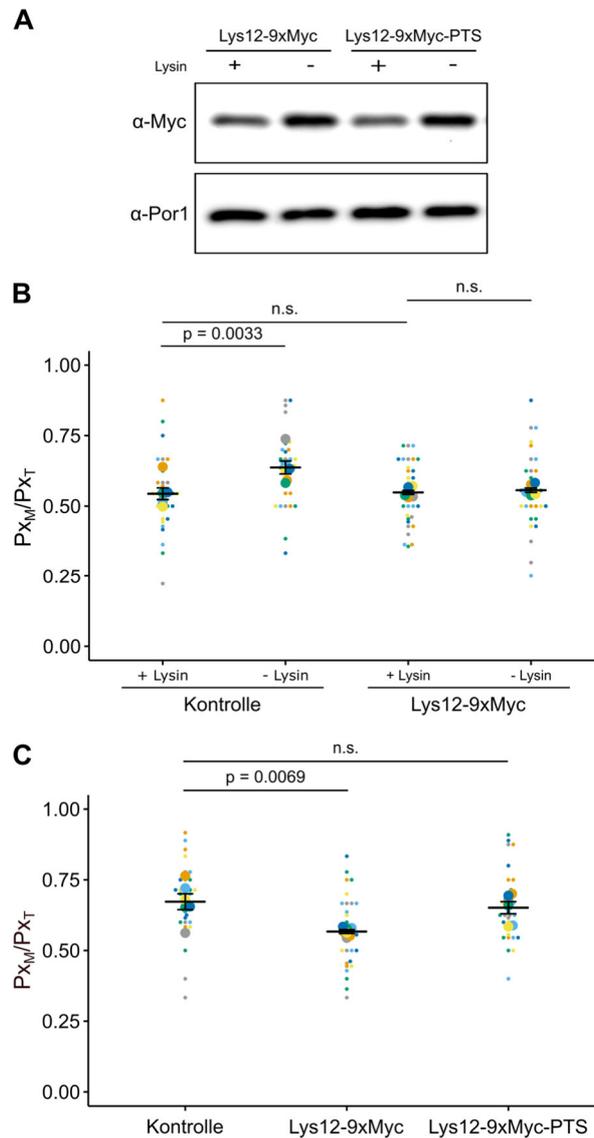


Abbildung 18: Die Lys12-abhängige Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien wird durch die Verfügbarkeit von Lysin beeinflusst. A) Biochemische Analyse der Proteinmenge von Lys12-9xMyc und Lys12-9xMyc-PTS nach Inkubation in An- oder Abwesenheit von Lysin. Das Protein Por1 diente als Mengenstandard **B)** Quantifizierung der Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in wildtypischen Zellen und in Zellen, in denen das PTS1 von Lys12 maskiert ist. Die Inkubation erfolgte in Medium mit und ohne Lysin. **C)** Quantifizierung der Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien in wildtypischen Zellen und Zellen, die das Fusionsprotein Lys12-9xMyc bzw. Lys12-9xMyc-PTS vom endogenen Locus aus exprimierten. Die Zellen wurden in Abwesenheit von Lysin angezogen. PX_M : Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien; PX_T : Gesamtzahl der Peroxisomen pro Zelle.

2.5 Identifikation weiterer Faktoren, die an der dualen Lokalisation von Ptc5 beteiligt sind

In einem zweiten Teilprojekt sollten Faktoren identifiziert werden, die an der Translokalisierung von Ptc5 aus den Mitochondrien in die Peroxisomen beteiligt sind. Dieser Prozess hängt sowohl von der mitochondrialen Prozessierung als auch dem peroxisomalen Import ab und könnte die räumliche Nähe zwischen Peroxisomen und Mitochondrien benötigen. Zu diesem Zweck wurde in Zusammenarbeit mit Thorsten Stehlik, Einat Zalckvar und Maya Schuldiner ein mikroskopischer Hochdurchsatz-Screen durchgeführt, der auf die Identifizierung von Mutanten abzielte, in denen die peroxisomale Translokalisierung von Ptc5

gestört ist. Zunächst wurde ein haploider Hefestamm erzeugt, der den peroxisomalen Marker Pex3-GFP und das Fusionsprotein Ptc5-RFP-PTS exprimierte. Mithilfe der *Synthetic Genetic Array* (SGA) -Technologie (Baryshnikova *et al.*, 2010) wurde dieser Stamm in eine Deletionsbibliothek (Giaever *et al.*, 2002) und in die DAMP-Bibliothek eingekreuzt, die hypomorphe Allele essenzieller Gene enthält (Breslow *et al.*, 2008). Über einen mehrstufigen Selektionsprozess wurden haploide Mutanten, die sowohl eine definierte Deletion als auch beide Fluoreszenzmarker besitzen, isoliert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS mittels automatisierter Bildgebung (Abb. 19).

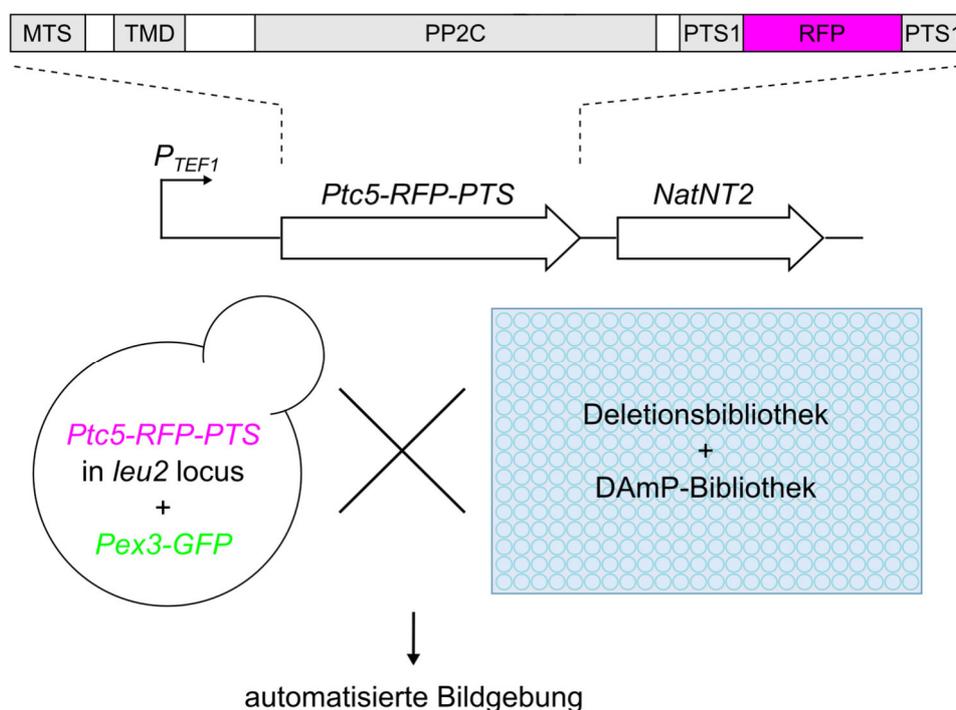


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Screens zur Identifizierung von Faktoren mit Relevanz für die peroxisomale Translokalisierung von Ptc5. Ein haploider Stamm, der Ptc5-RFP-PTS und Pex3-GFP exprimierte, wurde mittels SGA-Technologie in die angegebenen Hefebibliotheken (Giaever *et al.*, 2002; Breslow *et al.*, 2008) eingekreuzt. Haploide Nachkommen, die beide Fusionsproteine im Hintergrund einer Gendeletion exprimierten, wurden mit automatischer Fluoreszenzmikroskopie analysiert. MTS: *mitochondrial targeting signal*, TMD: *Transmembrandomäne*, PP2C: *Protein-Phosphatase Typ 2C*, PTS1: *peroxisomal targeting signal 1*.

Mit Hilfe dieses Screens konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, deren Deletion die peroxisomale Lokalisation von Ptc5 ganz oder teilweise verhinderte (Tabelle A1, Abb. 20). Zu diesen Genen gehörten erwartungsgemäß viele Peroxine, die an der Biogenese von Peroxisomen beteiligt sind (Tabelle A1). Neben diesen Genen, konnte auch *SOM1* identifiziert werden. Das Protein Som1 ist Teil des mitochondrialen IMP-Komplexes (Jan *et al.*, 2000), der für die Ptc5-Prozessierung zuständig ist (Stehlik *et al.*, 2020). Die Identifikation dieser Kandidatengene spricht für die Validität des Screeningverfahrens.

Die identifizierten Mutanten wurden zur Validierung der Daten nochmals manuell generiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 20A und A2). Hierbei wurde neben dem wildtypischen Ausgangsstamm eine $\Delta coq9$ -Mutante, die keinen Einfluss auf die Lokalisation von Ptc5 hat (Stehlik *et al.*, 2020), als Kontrolle verwendet.

Sowohl in $\Delta pex5$ -Mutanten als auch $\Delta imp1$ -Mutanten ist bereits beobachtet worden, dass Ptc5-RFP-PTS in den Mitochondrien akkumuliert (Stehlik *et al.*, 2020). Auch der für $\Delta som1$ -Mutanten beobachtete Phänotyp ließ sich mittels manueller Fluoreszenzmikroskopie verifizieren (Abb. 20A und A2).

Auch die Deletion von *PEX34* schien einen Einfluss auf die Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS zu haben. Pex34 wurde bereits als Tether-Protein zwischen Mitochondrien und Peroxisomen identifiziert (Shai *et al.*, 2018). Obwohl sich in $\Delta pex34$ -Zellen bei der visuellen Charakterisierung eine Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS in mitochondrialen Strukturen beobachten ließ (Abb. 20A und A2), konnte diese durch die Quantifizierung des PCCs nicht bestätigt werden (Abb. 20B). Dieser Widerspruch könnte auf die besonders großen Peroxisomen in $\Delta pex34$ -Mutanten zurückzuführen sein (Abb. 20A und A2; vgl. Tower *et al.*, 2011).

Ein weiteres identifiziertes Kandidatengenen war *DJPI* (Abb. 20), das für ein ER-assoziiertes Chaperon kodiert und von dem bereits eine Beteiligung am peroxisomalen Import bekannt ist (Hetteema *et al.*, 1998). Auch die Deletion von *GUTI*, einer mitochondrialen Glycerol-Kinase (Pavlik *et al.*, 1993), führte zu einer signifikanten Verringerung der peroxisomalen Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS (Abb. 20 und A2). Von besonders hohem Interesse war die Identifikation von *MDM10* als Kandidatengenen mit Relevanz für die peroxisomale Translokalisierung (Abb. 20 und A7).

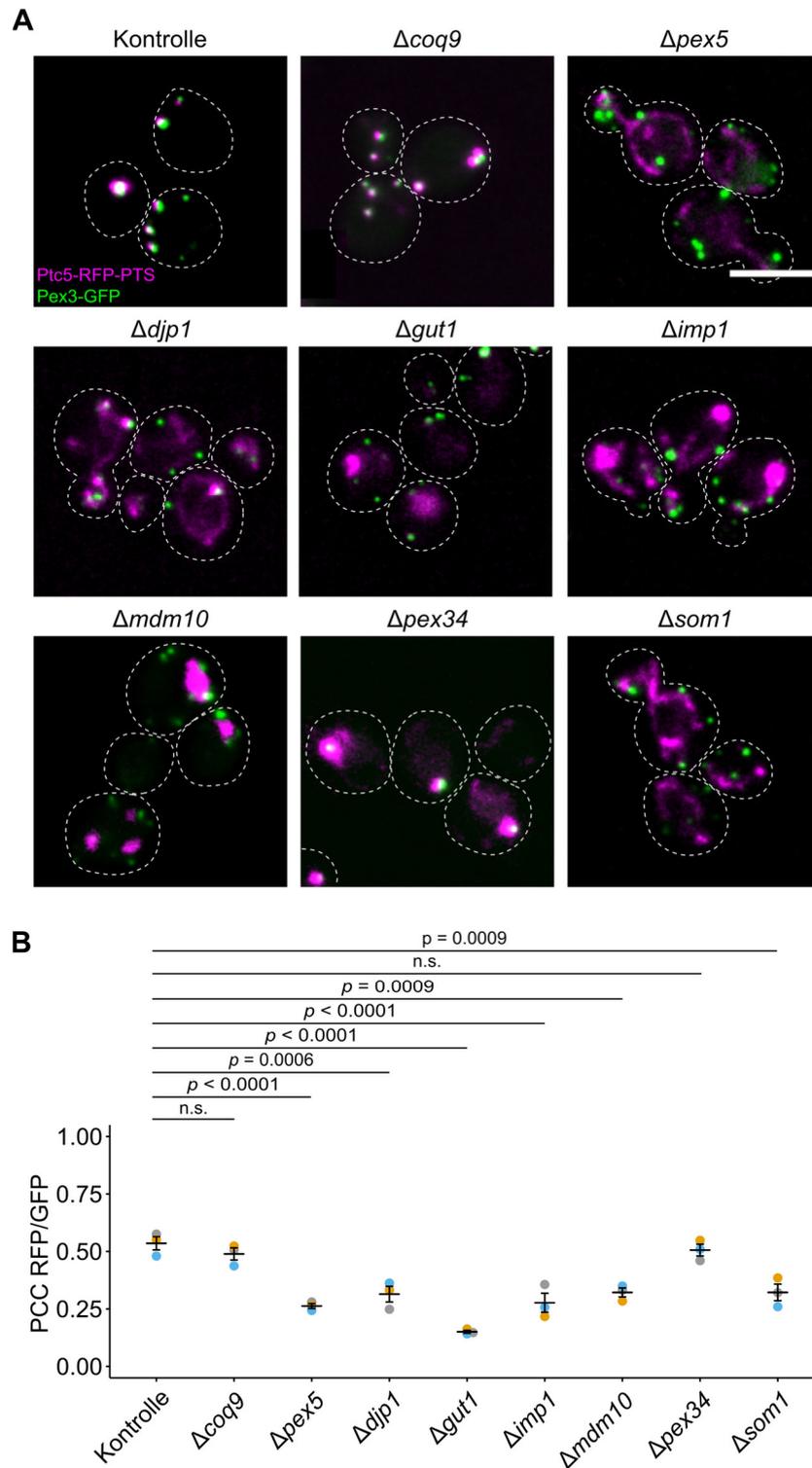


Abbildung 20: Identifikation weiterer Faktoren der Translokalisierung von Ptc5. **A)** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der identifizierten Mutanten, in denen die peroxisomale Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS beeinträchtigt ist. Die Zellen exprimierten Ptc5-RFP-PTS (magenta) unter Kontrolle des konstitutiven *tef1*-Promotors sowie den peroxisomalen Marker Pex3-GFP (grün). Der Maßstab entspricht 5µm. **B)** Quantifizierung der Korrelation des RFP- und GFP-Signals mittels Pearson-Korrelationskoeffizient (PCC).

2.6 Die subzelluläre Verteilung dual lokalisierter Proteine wird durch den ERMES-Komplex reguliert

2.6.1 Die Depletion des ERMES-Komplexes beeinflusst den mitochondrialen Import

Mdm10 ist als Komponente des ERMES-Komplexes an der Ausbildung von Kontakten zwischen den Mitochondrien und dem ER beteiligt (Kornmann *et al.*, 2009, Kornmann *et al.*, 2010; Kornmann *et al.*, 2011). Zusätzlich wurde beobachtet, dass Mdm10 mit dem SAM-Komplex assoziiert ist und über diese Interaktion an der Integration von Carrier-Proteinen in die innere mitochondriale Membran beteiligt ist (Meissinger *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2008; Yamano *et al.*, 2010; Ellenrieder *et al.*, 2016)

Zunächst stellte sich die Frage, ob der beobachtete Phänotyp spezifisch von Mdm10 abhängt oder auch bei Depletion anderer Komponenten des ERMES-Komplexes auftritt. Dieser setzt sich neben Mdm10 aus Mdm12, Mdm34 und Mmm1 zusammen (Kornmann *et al.*, 2009). Die Depletion aller ERMES-Komponenten führte zu einer verringerten Ko-Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS mit dem peroxisomalen Marker Ant1-YFP (Abb. 21A). Der Effekt war in $\Delta m d m 1 0$ -Mutanten am stärksten und in $\Delta m m m 1$ -Mutanten am schwächsten ausgeprägt (Abb. 21B). Demnach ist die verringerte peroxisomale Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS nicht nur von Mdm10 abhängig, sondern in allen ERMES-Mutanten beeinträchtigt.

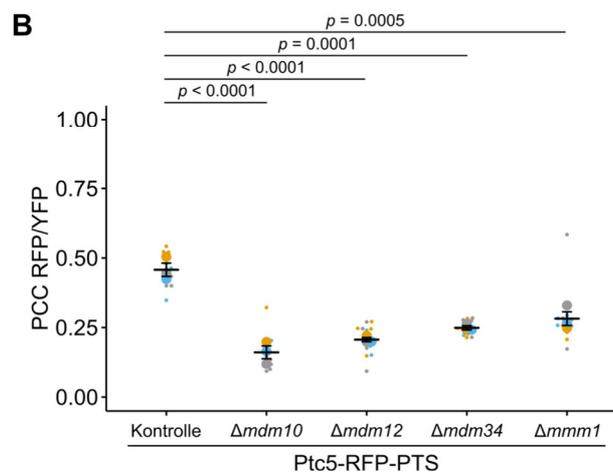
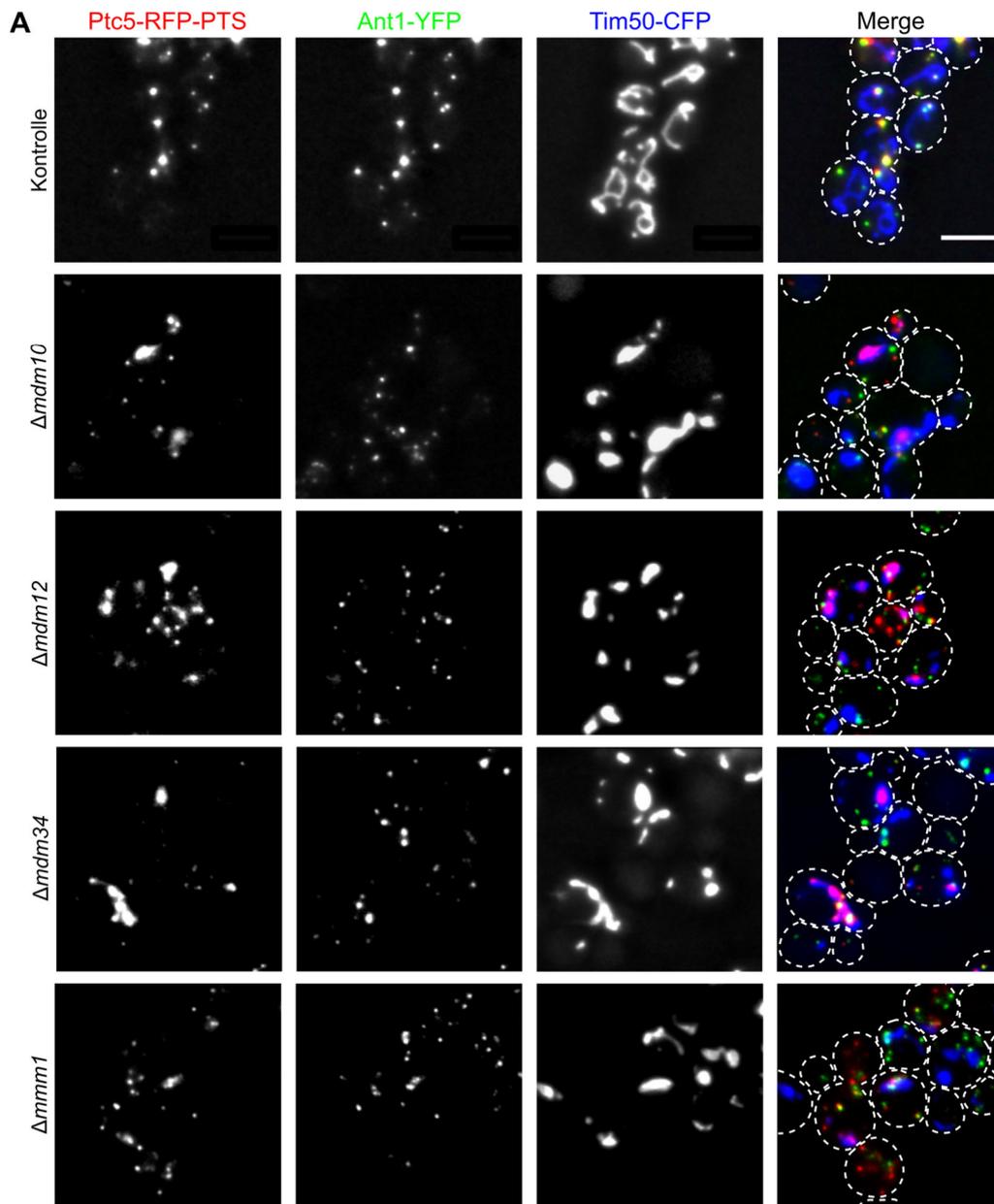


Abbildung 21: Die peroxisomale Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS hängt vom ERMES-Komplex ab. A) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung verschiedener ERMES-Mutanten. Die Zellen exprimierten Ptc5-RFP-PTS (rot) unter Kontrolle des konstitutiven *tefl*-Promotors sowie den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50-CFP (blau). Der Maßstab entspricht 5 μ m. **B)** Quantifizierung der Korrelation des RFP- und YFP-Signals mittels Pearson-Korrelationskoeffizient (PCC) in den in A) gezeigten Zellen.

Die fehlende peroxisomale Lokalisierung von Ptc5 in ERMES-Mutanten könnte verschiedene Ursachen haben. Denkbar wäre eine Störung des initialen mitochondrialen Imports, der anschließenden Translokalisierung oder des peroxisomalen Imports *per se*. Ersteres wurde durch die Untersuchung der Prozessierung von Ptc5 in ERMES-Mutanten analysiert (Stehlik *et al.*, 2020). Hierfür wurde ein Konstrukt verwendet, das die Expression eines Fusionsproteins aus den ersten 201 Aminosäuren von Ptc5, RFP und einem HA-Tag vermittelt (Abb. 22A; Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA). Wie bei den meisten mitochondrialen Proteinen erfolgt die Prozessierung von Ptc5 in Mitochondrien zunächst durch die MPP, wodurch die Präsequenz entfernt wird (Vögtle *et al.*, 2009). Ptc5 weist zusätzlich zwischen Position 81 und 84 eine IMP-Schnittstelle mit der Sequenz LSDL auf. Die Spaltung erfolgt zwischen Aminosäure 83 und 84 (Abb. 22A; Stehlik *et al.*, 2020). Proteine aus Zellen unterschiedlicher genetischer Hintergründe, die Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA exprimierten, wurden präpariert und Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA mittels Western Blot nachgewiesen. Während in wildtypischen Zellen nahezu ausschließlich die vollständig prozessierte Form des Proteins Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA detektierbar war (m), akkumulierte bei Deletion von *IMP1* eine intermediäre Form (i), die von MPP, jedoch nicht vom IMP-Komplex, prozessiert wurde (Stehlik *et al.*, 2020). In allen ERMES-Mutanten war außerdem ein Anteil der unprozessierten Form des Fusionsproteins nachweisbar (p) (Abb. 22B). Diese Ergebnisse weisen auf einen beeinträchtigten mitochondrialen Import von Ptc5 in ERMES-Mutanten hin.

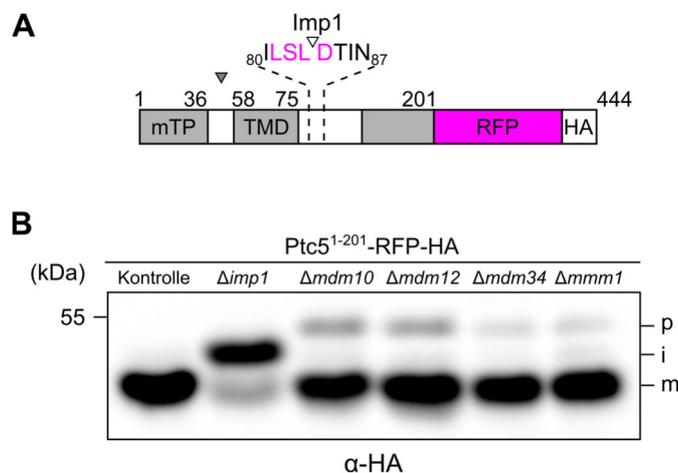


Abbildung 22: Die Depletion von ERMES-Komponenten verhindert die vollständige Prozessierung von Ptc5. **A)** Schematische Darstellung des truncierten Fusionsproteins Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA. Die MPP-Schnittstelle wird durch einen grauen Pfeil, die Imp1-Schnittstelle durch einen weißen Pfeil markiert. **B)** Biochemische Analyse der Prozessierung von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA in ERMES-Mutanten mittels Western Blot. Als Kontrolle wurde das Konstrukt in einem Stamm mit wildtypischem Hintergrund sowie eine *imp1*-Mutante transformiert. p: Präprotein, i: intermediate Isoform; m: matures Protein.

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob der ERMES-Komplex einen generellen Einfluss auf den mitochondrialen Import haben könnte. Daher wurde die Prozessierung und damit indirekt der initiale mitochondriale Import für zufällig gewählte mitochondriale Proteine in $\Delta mdm10$ -Mutanten untersucht. Dafür wurden Stämme erzeugt, die C-terminale GFP-fusionierte Varianten der mitochondrialen Proteine Isu1, Isa2, Cyt1, Mrp20 oder Mrps17 exprimierten (Huh *et al.*, 2003) und in denen zusätzlich *MDM10* deletiert wurde. Anschließend

erfolgte die biochemische Untersuchung der Prozessierung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.

In Folge der Deletion von *MDM10* war bei vielen dieser Proteine eine veränderte Prozessierung erkennbar (Abb. 23). Dies deutet darauf hin, dass Mdm10 einen generellen Einfluss auf den mitochondrialen Import und die Prozessierung von Proteinen in Mitochondrien hat.

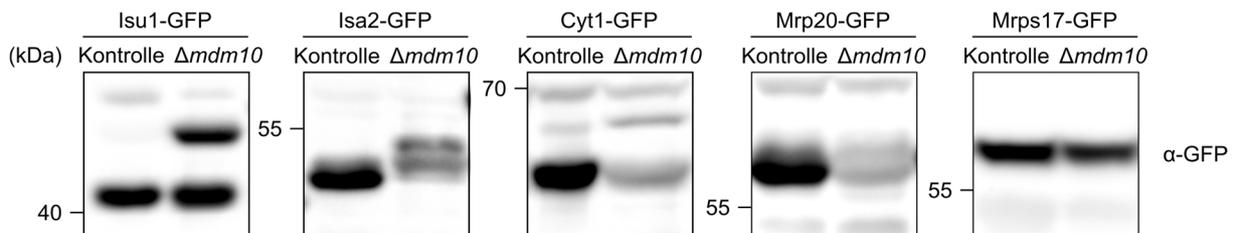


Abbildung 23: Mdm10 beeinflusst den Import und die Prozessierung mitochondrialer Proteine. Biochemische Untersuchung von Zellen, die C-terminal GFP-markierte Varianten mitochondrialer Proteine in einem wildtypischen Hintergrund oder einer $\Delta mdm10$ -Mutante exprimierten.

Falls die verminderte peroxisomale Lokalisation von Ptc5 in ERMES-Mutanten auf einen gestörten Import zurückzuführen ist, sollte dieser Phänotyp auch in Mutanten der mitochondrialen Importmaschinerie auftreten. Im Hochdurchsatz-Screen konnten solche Mutanten jedoch nicht identifiziert werden. Um falsch negative Ergebnisse auszuschließen, wurde die peroxisomale Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS in verschiedenen Mutanten des mitochondrialen Imports und der mitochondrialen Biogenese untersucht. Zu diesem Zweck wurden Gene für verschiedene Komponenten der mitochondrialen Importmaschinerie und Biogenese deletiert. Dazu zählten die offenen Leserahmen von Tom70, einem zentralen Protein des TOM-Komplexes, das an der Erkennung nahezu aller mitochondrialen Präproteine beteiligt ist (Young *et al.*, 2003), von Tom22, das als Rezeptor, als Organisator des TOM-Komplexes und Verbindungselement zwischen dem TOM- und TIM-Komplex fungiert (Hönlinger *et al.*, 1995; Bolliger *et al.*, 1995; Mayer *et al.*, 1995; Van Wilpe *et al.*, 1999; Chacinska *et al.*, 2003), und Fzo1, einem Mitofusin, dessen Fehlen zu einer gestörten mitochondrialen Morphologie führt (Hermann *et al.*, 1998). Die Deletion wurde in einem Stamm durchgeführt, der sowohl Ant1-YFP als auch Tim50-CFP exprimiert. Zudem wurde ein Vektor, der die Expression von Ptc5-RFP-PTS vermittelt, in die Zellen transformiert.

Anschließend erfolgte die Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 24A). Die Ko-Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS mit dem peroxisomalen Marker Ant1-YFP war in allen Mutanten deutlich erkennbar. Eine verstärkte Retention von Ptc5-RFP-PTS in Mitochondrien wurde hingegen nicht beobachtet. In Abwesenheit von Tom70 war ein abgeschwächtes Signal des Fusionsproteins zu erkennen, dennoch ko-lokalisierte Ptc5-RFP-PTS auch in diesen Zellen mit dem peroxisomalen Marker (Abb. 24A).

Auch in diesen Mutanten wurde die biochemische Analyse der Prozessierung von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot durchgeführt. Die Deletion von *FZO1* führte zu einer Anreicherung des unprozessierten Präproteins, während in den Mutanten der Importmaschinerie bezüglich der Prozessierung kein Unterschied zur wildtypischen Kontrolle erkennbar war (Abb. 25B). Die biochemische Analyse bestätigte die vorherige Beobachtung, dass die Deletion von *TOM70* zu einer Reduktion der Proteinmenge von Ptc5-Fusionsproteinen führt (Abb. 25). Die Resultate dieser Untersuchungen zeigen, dass ein gestörter mitochondrialer Import nicht ausreicht, um die peroxisomale Lokalisation von Ptc5 zu unterbinden. Der beobachtete Phänotyp in ERMES-Mutanten scheint demnach auf eine andere Weise begründet zu sein.

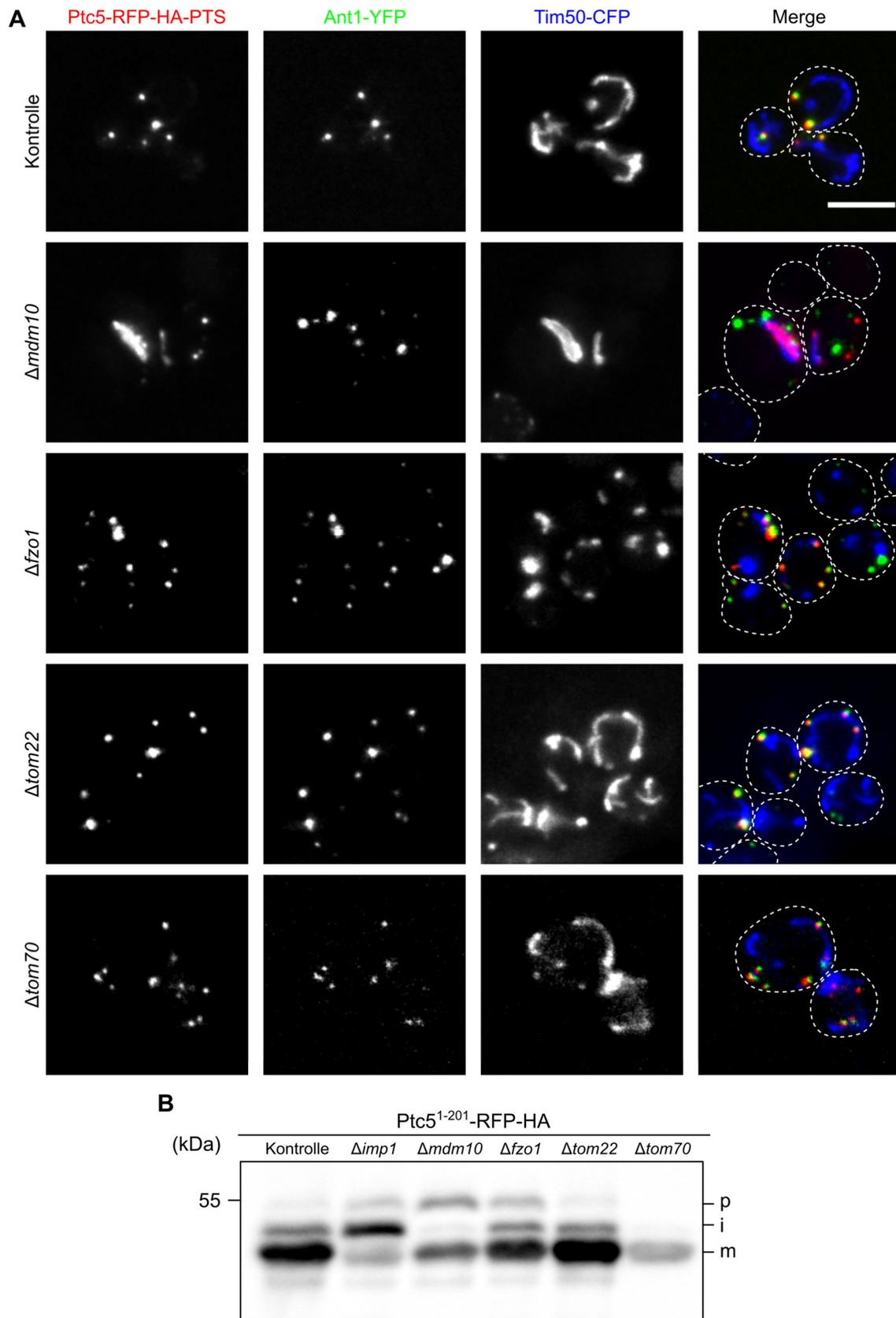


Abbildung 24: Ein mitochondrialer Importdefekt verhindert die peroxisomale Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS nicht. **A)** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS in Mutanten des mitochondrialen Imports und der Morphogenese. Die Zellen exprimierten neben Ptc5-RFP-PTS (rot) unter Kontrolle des konstitutiven *tef1*-Promotors den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50-CFP (blau). Der Maßstab entspricht 5 μ m. **B)** Biochemische Analyse der Prozessierung von Ptc5¹⁻²⁰¹-RFP-HA in den in A) gezeigten Mutanten. p: Präprotein, i: intermediate Isoform; m: matures Protein.

2.6.2 Der ERMES-Komplex reguliert die intrazelluläre Verteilung dual lokalisierter Proteine

Die Identifizierung des ERMES-Komplexes als wichtiger Faktor für die subzelluläre Verteilung von Ptc5 warf die Frage nach seinem Einfluss auf andere Proteine mit dualen Zielsteuerungssequenzen auf.

Das Fusionsprotein Cat2-RFP-HA-PTS zeigte in Abwesenheit von Mdm10 eine verringerte Ko-Lokalisation mit dem peroxisomalen Marker Ant1-YFP, ähnlich der bereits beobachteten Lokalisierung von Ptc5-RFP-PTS. Stattdessen akkumulierte es in Mitochondrien (Abb. 25A und A3A). Interessanterweise wurde bei anderen analysierten Proteinen ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Sowohl Pxp2-RFP-HA-PTS (Abb. 25B und A3B), Tes1-RFP-HA-PTS (Abb. 25C und A4A) als auch Mss2-RFP-HA-PTS (Abb. 25D und A4B) zeigten in $\Delta mdm10$ -Zellen eine Ko-Lokalisation mit dem peroxisomalen Marker Ant1-YFP, während eine mitochondriale Lokalisation selten zu beobachten war.

Um Einblicke in den Mdm10-abhängigen Import und die Prozessierung dieser Proteine zu erhalten, wurde analog zum bisherigen Vorgehen eine biochemische Analyse durchgeführt. Weder für Pxp2-RFP-PTS noch Tes1-RFP-HA-PTS oder Mss2-RFP-HA-PTS ließen sich mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot in Kontroll- und $\Delta mdm10$ -Zellen unterschiedlich prozessierte Varianten nachweisen (Abb. 26D). Die Ergebnisse könnten auf einen ungewöhnlichen mitochondrialen Import dieser Proteine hindeuten.

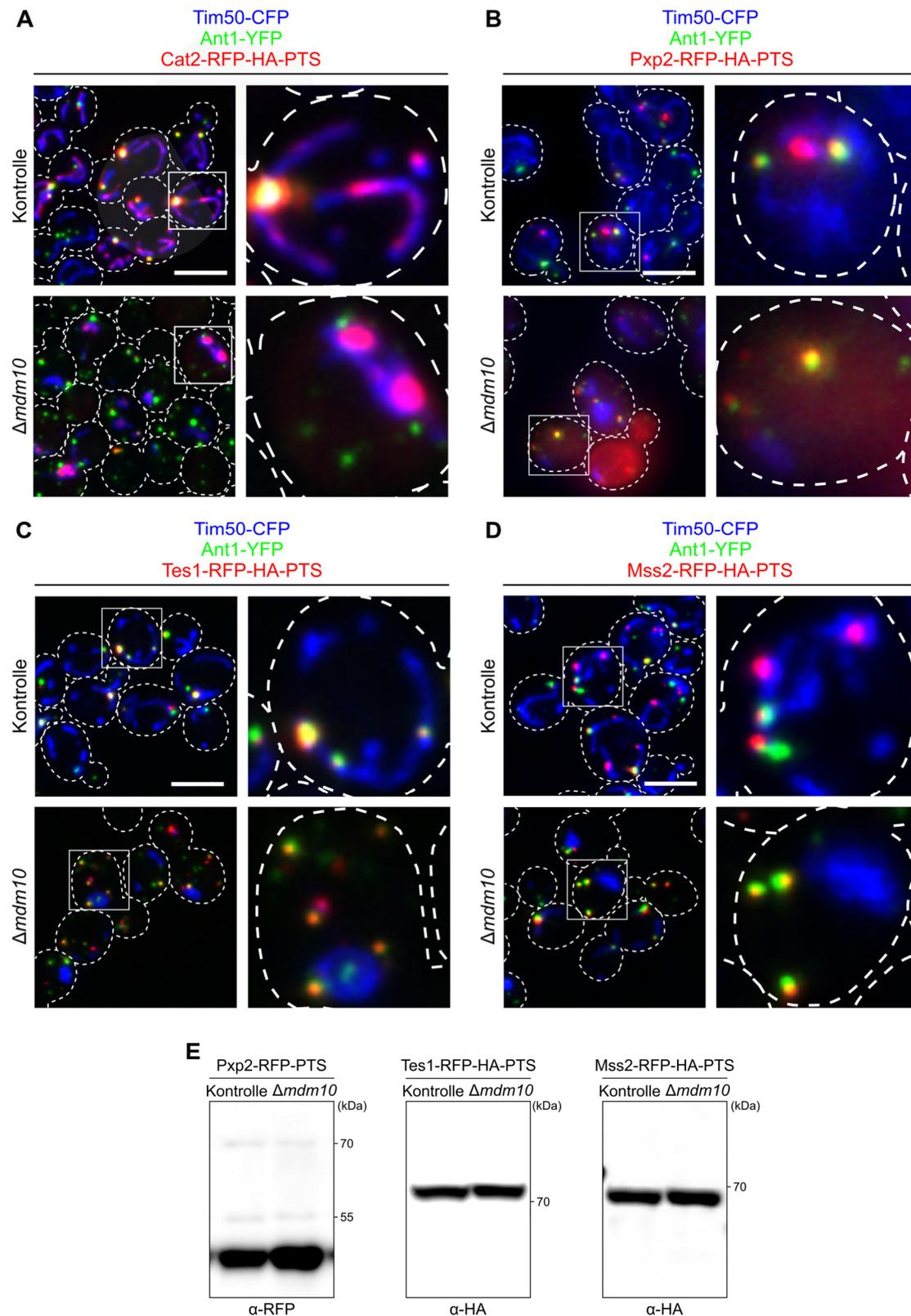


Abbildung 25: Die subzelluläre Verteilung dual lokalisierter Proteine wird durch Mdm10 beeinflusst. A) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Cat2-RFP-HA-PTS (rot) in $\Delta mdm10$ -Zellen. Die Zellen exprimierten außerdem den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50-CFP (blau). Der Maßstab entspricht 5 μ m. **B)** Wie in A). Die Zellen exprimierten Pxp2-RFP-HA-PTS (rot). **C)** Wie in A). Die Zellen exprimierten Tes1-RFP-HA-PTS (rot). **D)** Wie in A). Die Zellen exprimierten Mss2-RFP-HA-PTS. **E)** Biochemische Analyse der Prozessierung der in B) – D) untersuchten Fusionsproteine.

Während die Anzahl mitochondrialer Pxp2-RFP-HA-PTS-Foci in $\Delta mdm10$ -Mutanten signifikant reduziert war, blieb die Assoziation dieser Foci mit peroxisomalen Strukturen unbeeinflusst (Abb. 26). Die Verringerung der mitochondrialen Lokalisation von Pxp2 in Abwesenheit von Mdm10 scheint die Kontaktausbildung also nicht gänzlich zu verhindern.

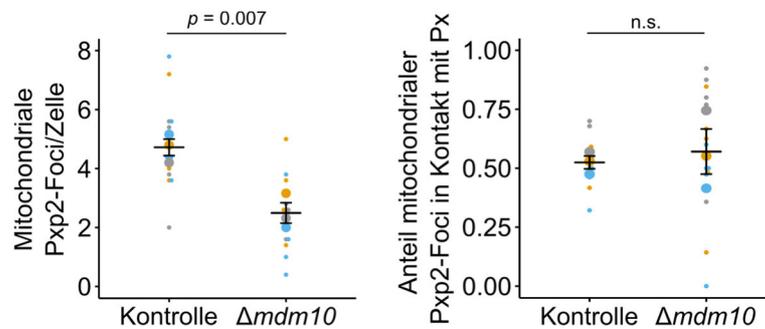


Abbildung 26: Die Assoziation zwischen Peroxisomen und Mitochondrien über Pxp2 hängt nicht von Mdm10 ab. Links: Quantifizierung der mitochondrialen Pxp2-RFP-HA-PTS-Foci pro Zelle in Kontrollzellen und $\Delta mdm10$ -Mutanten. **Rechts:** Quantifizierung des Anteils mitochondrialer Pxp2-RFP-HA-PTS-Foci in Kontakt mit Peroxisomen in Kontrollzellen und $\Delta mdm10$ -Mutanten.

Die Akkumulation von Proteinen an MCS ist ein charakteristisches Merkmal ihrer Funktion als Tether. Pxp2, Tes1 und Mss1 zeigten eine ungleichmäßige Verteilung in mitochondrialen Strukturen und sammelten sich in distinkten fokalen Bereichen innerhalb der Mitochondrien an (Abb. 25B-D). Dabei könnte es sich um Kontaktstellen handeln. Es wurde bereits beobachtet, dass ein synthetischer Tether für Mitochondrien und Peroxisomen in unmittelbarer Nähe zum ERMES-Komplex lokalisiert ist (Shai *et al.*, 2018). In einem weiteren Schritt wurde die Lokalisation des Fusionsproteins Pxp2-RFP-HA-PTS im Vergleich zu Mmm1 untersucht. Hierzu wurde der offene Leserahmen für das Fluoreszenzprotein mNeonGreen (Shaner *et al.*, 2013) am endogenen Lokus C-terminal in *MMM1* inseriert und der zuvor verwendete Vektor zur Expression von Pxp2-RFP-HA-PTS in die Zellen transformiert. Anschließend wurde eine fluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt. Die Untersuchung ergab, dass 38 +/- 5% der Pxp2-RFP-HA-PTS-Foci mit dem Signal von Mmm1-mNeonGreen überlappten oder sich in direkter räumlicher Nähe dazu befanden (Abb. 27). Die Ergebnisse zeigen, dass Proteine, die die Kontaktausbildung zwischen Mitochondrien und Peroxisomen induzieren können, in räumlicher Nähe zum ERMES-Komplex akkumulieren. Der ERMES-Komplex scheint ein wichtiger Faktor für die Determination der intrazellulären Verteilung von Proteinen mit dualen Zielsteuerungssignalen zu sein und beeinflusst interessanterweise unterschiedliche Arten von dual lokalisierten Proteinen auf verschiedene Weise.

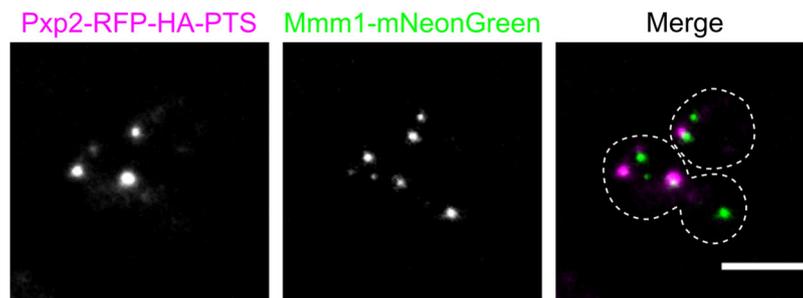


Abbildung 27: Pxp2-RFP-HA-PTS akkumuliert in räumlicher Nähe zu Mmm1-mNeonGreen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Pxp2-RFP-HA-PTS (magenta) und Mmm1-mNeonGreen (grün). Der Maßstab entspricht 5µm.

2.7 Der ERMES-Komplex ist an der Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beteiligt

2.7.1 Der peroxisomale Import ist durch die Depletion des ERMES-Komplexes leicht beeinträchtigt

Die bisher erzielten Ergebnisse zeigen die Relevanz von ERMES für die subzelluläre Verteilung von Ptc5 und anderen Proteinen mit dualen Zielsteuerungssequenzen für Mitochondrien und Peroxisomen. Der beobachtete Phänotyp für Ptc5 lässt sich nicht allein auf einen Defekt des mitochondrialen Imports zurückführen. Alternativ könnte eine Beeinträchtigung des peroxisomalen Imports den Transit von Ptc5 verhindern. Daher wurde im nächsten Schritt der Einfluss des ERMES-Komplexes auf die Effizienz des peroxisomalen Imports untersucht.

Tatsächlich akkumulierte RFP-PTS, ein Marker für die peroxisomale Matrix, in $\Delta mdm10$ -Mutanten verstärkt im Zytosol (Abb. 28A). Die Quantifizierung bestätigte die Abnahme der Korrelation zwischen dem RFP- und dem YFP-Signal nach der Deletion von *MDM10* (Abb. 28B). Eine deutliche Ko-Lokalisierung mit Peroxisomen war jedoch immer noch erkennbar (Abb. 28).

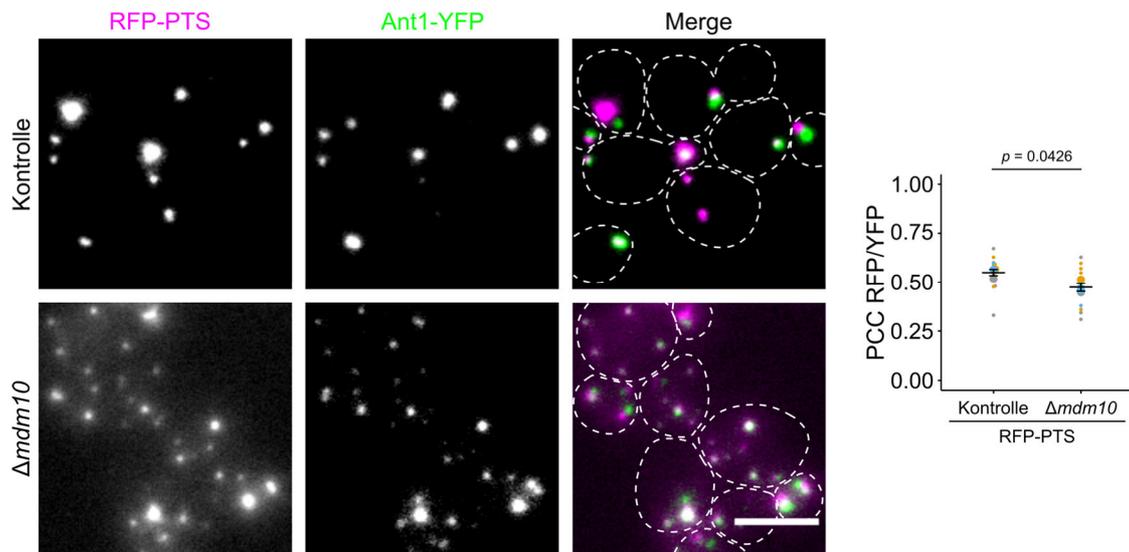


Abbildung 28: Der peroxisomale Import ist in Abwesenheit von Mdm10 leicht beeinträchtigt. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von RFP-PTS (magenta) und Ant1-YFP (grün) in wildtypischen und $\Delta mdm10$ -Zellen. Der Maßstab entspricht 5 μ m.

Außerdem wurde ein Konstrukt generiert, das die Expression einer N-terminal trunkeierten Variante des Proteins Ptc5 ohne MTS, fusioniert an ein RFP sowie das PTS1 (Ptc5 Δ^{1-83} -RFP-PTS) vermittelt. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt für die Expression des Fusionsproteins Ptc5-RFP-PTS genutzt. Die Expression erfolgte in $\Delta mdm10$ -Mutanten, die den peroxisomalen Marker Ant1-YFP sowie den mitochondrialen Marker Tim50-CFP exprimierten.

Während Ptc5-RFP-PTS bei Depletion von Mdm10 eine vornehmlich mitochondriale Lokalisierung aufwies (vgl. Abb. 21 und 24) und in $\Delta mdm10$ -Zellen weniger als 25% des Signals von Ptc5-RFP-PTS mit dem von Peroxisomen ko-lokalisierten, war bei Expression der N-terminal verkürzten Variante ein Anteil von fast 75% des Gesamtsignals in peroxisomalen Strukturen zu finden (Abb. 29). Die Ergebnisse zeigen, dass die mitochondriale Anreicherung von Ptc5-RFP-PTS vermutlich nicht nur auf einen beeinträchtigten peroxisomalen Import zurückzuführen ist.

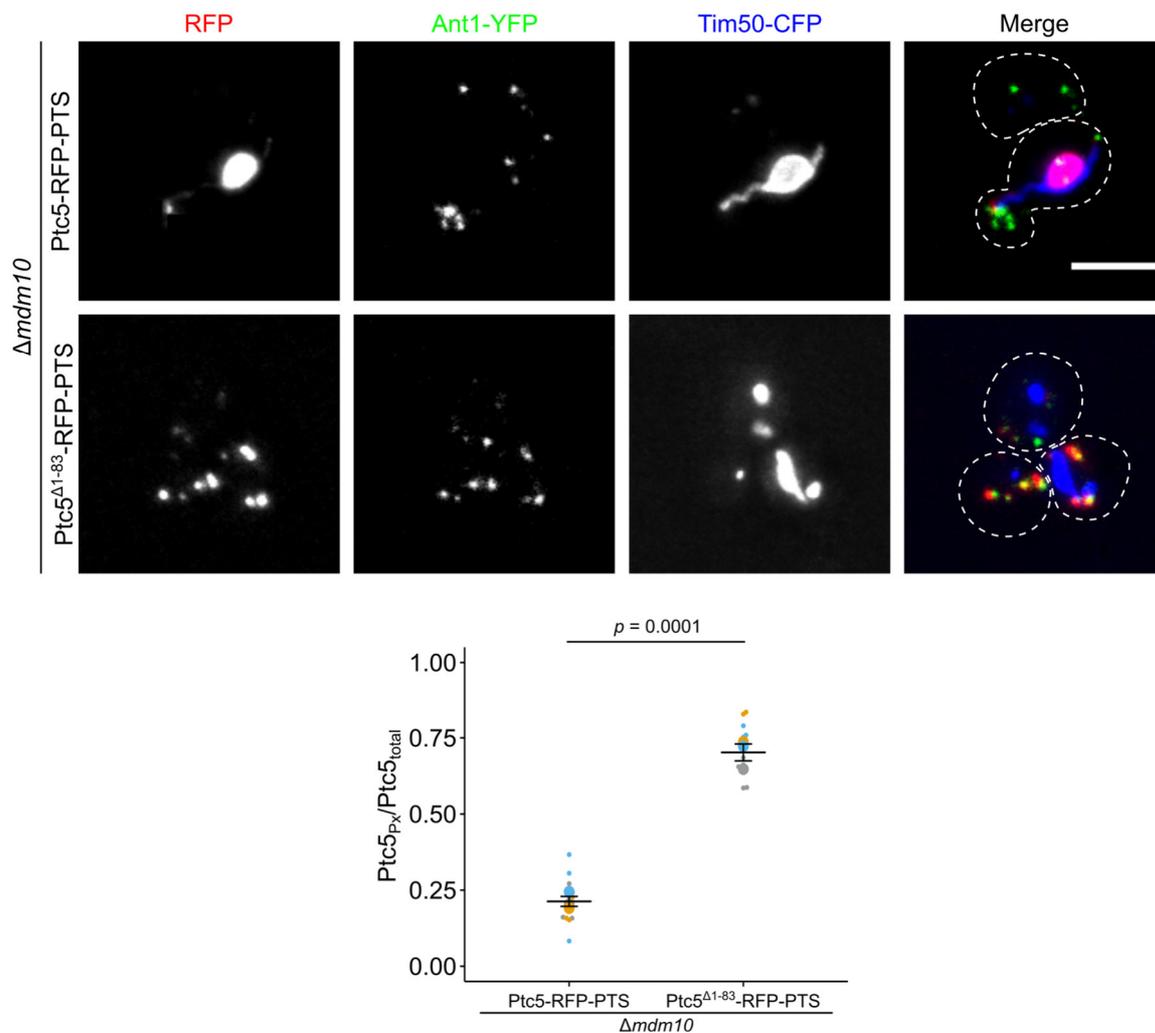


Abbildung 29: Die Depletion von Mdm10 verhindert den peroxisomalen Import von Ptc5 nicht. Oben: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS (rot) oder Ptc5^{Δ1-83}-RFP-PTS (rot) in $\Delta mdm10$ -Zellen. Die Visualisierung von Peroxisomen erfolgte durch das Markerprotein Ant1-YFP (grün), mitochondriale Strukturen wurden durch Tim50-CFP (blau) visualisiert. Der Maßstab entspricht 5 μ m. **Unten:** Quantifizierung des Anteils des peroxisomalen Signals von Ptc5-RFP-PTS oder Ptc5^{Δ1-83}-RFP-PTS am Gesamtsignal.

2.7.2 In ERMES-Mutanten akkumulieren kleine Peroxisomen

Während der experimentellen Untersuchungen wurde beobachtet, dass in ERMES-Mutanten die Anzahl der Peroxisomen erhöht ist. Ein solcher Phänotyp wurde bereits in vorangegangenen Studien für Mutanten beobachtet, denen Komponenten des ERMES-Komplexes fehlten (Cohen *et al.*, 2014, Esposito *et al.*, 2019).

In sämtlichen untersuchten Mutanten war den Erwartungen entsprechend im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle eine deutliche Zunahme der Anzahl an Peroxisomen festzustellen, wobei dieser Phänotyp bei der Deletion von *MDM10* am deutlichsten ausgeprägt war (Abb. 30A). Zusätzlich zeigte sich in diesen Mutanten eine deutliche Erhöhung der Mobilität der Peroxisomen (Video 2).



Video 2: Die Deletion von *MDM10* erhöht die Beweglichkeit von Peroxisomen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von $\Delta mdm10$ -Zellen. Die Zellen exprimierten den peroxisomalen Marker mCherry-PTS. Die Aufnahme repräsentiert einen Zeitraum von 40 Sekunden. Der Maßstab entspricht 5 μm .

Beide Phänotypen wurden zuvor bereits in $\Delta pex5$ -Zellen beobachtet (Abb. 15; Video 1). Vergleichbar zu $\Delta pex5$ -Mutante war auch in ERMES-Mutanten eine signifikante Abnahme des Anteils an Peroxisomen in unmittelbarer räumlicher Nähe zu Mitochondrien festzustellen (Abb. 30B). Der ERMES-Komplex scheint demnach für die Regulation der Anzahl von Peroxisomen als auch an der Ausbildung von Kontakten zu Mitochondrien beteiligt zu sein. Die erhöhte Proliferation und Beweglichkeit könnten also eine generelle Folge verminderter Kontakte sein. Ähnliches wurde bereits für Pex30, einem Tether zwischen den Peroxisomen und dem ER, festgestellt (David *et al.*, 2013).

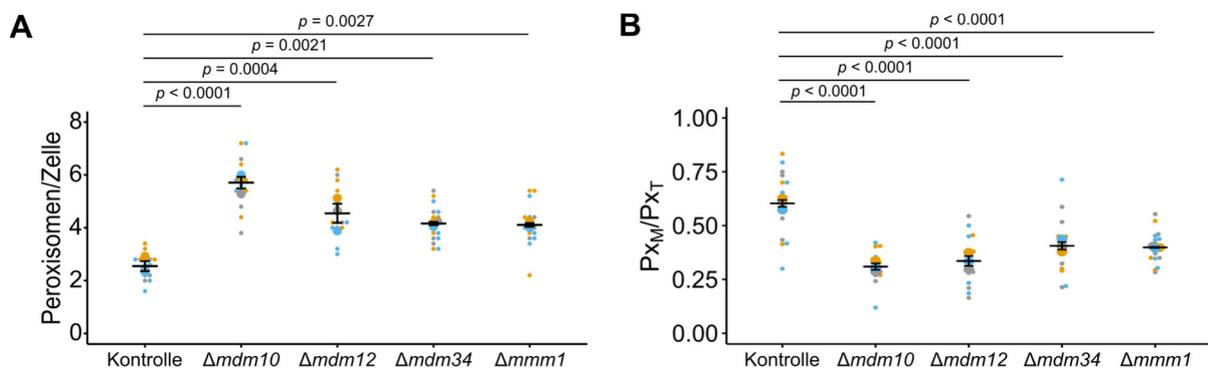


Abbildung 30: Der ERMES-Komplex ist an der Proliferation von Peroxisomen und deren Kontaktausbildung zu Mitochondrien beteiligt. A) Quantifizierung der Anzahl an Peroxisomen pro Zelle in wildtypischen Zellen und ERMES-Mutanten. B) Quantifizierung des Anteils von Peroxisomen in enger räumlicher Nähe zu Mitochondrien in wildtypischen Zellen und ERMES-Mutanten.

2.7.3 Die Expression eines künstlichen Tethers supprimiert den Phänotyp von ERMES-Mutanten

Während die Depletion von Komponenten des ERMES-Komplexes den Anteil von Peroxisomen in räumlicher Nähe zu Mitochondrien reduziert und die Anzahl der Peroxisomen pro Zelle erhöht (Abb. 30) konnte der gegenteilige Effekt bei der Überexpression von Proteinen mit dualen Zielsteuerungssequenzen für Peroxisomen und Mitochondrien beobachtet werden (Kapitel 2.2 – 2.4). Eine verstärkte Kontaktausbildung führt demnach zu weniger, jedoch eher größeren Peroxisomen, während fehlende Kontaktausbildung den umgekehrten Effekt hat.

Um die Funktion des ERMES-Komplexes im Hinblick auf die Ausbildung von Kontakten zwischen beiden Organellen nachzuweisen, wurde ein synthetischer Tether generiert (Abb. 31). Der künstliche Tether besteht aus den ersten 30 Aminosäuren des mitochondrialen Membranproteins Tom70 und dem C-terminalen Teil des peroxisomalen Proteins Pex15. Der N-terminale Bereich von Tom70 codiert für eine TMD und ist sowohl für die Lokalisation als auch die Verankerung des Proteins in der OMM verantwortlich (McBride *et al.*, 1992; Shore *et al.*, 1995). Die C-terminale Domäne des PMP Pex15 verfügt ebenfalls über eine TMD und ein peroxisomale Zielsteuerungssequenz (mPTS) (Elgersma *et al.*, 1997). Als Verbindungsstruktur der mitochondrialen und peroxisomalen Ankerdomänen wurde Protein A gewählt.



Abbildung 31: Schematische Darstellung des synthetischen Tethers für Peroxisomen und Mitochondrien. Das Fusionsprotein setzte sich aus den ersten 30 Aminosäuren des mitochondrialen Membranproteins Tom70 (mit TMD und mitochondrialem Lokalisierungssignal) und dem C-terminalen Teil von Pex15 als peroxisomaler Anker zusammen. Als Verbindungsstruktur diente Protein A. Mito: Mitochondrium; Px: Peroxisom.

Als Kontrolle wurde ein ähnliches Konstrukt, jedoch ohne die C-terminale Pex15-Domäne generiert, sodass keine Insertion in die peroxisomale Membran erfolgen kann. Beide Konstrukte wurde anschließend stabil in den *leu2*-Lokus von Δ *mdm10*-Mutanten integriert, und die subzelluläre Lokalisierung von RFP-PTS fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Die Expression des synthetischen Tethers führte zu einer deutlich verringerten Anzahl an Peroxisomen, während die Expression des Kontrollproteins in Δ *mdm10*-Mutanten keinen Effekt hatte. Die Peroxisomen waren bei Expression des künstlichen Tethers stark vergrößert, sodass sogar die Unterscheidung zwischen der Matrix (RFP-PTS) und der peroxisomalen Membran (Ant1-YFP) möglich war (Abb. 32).

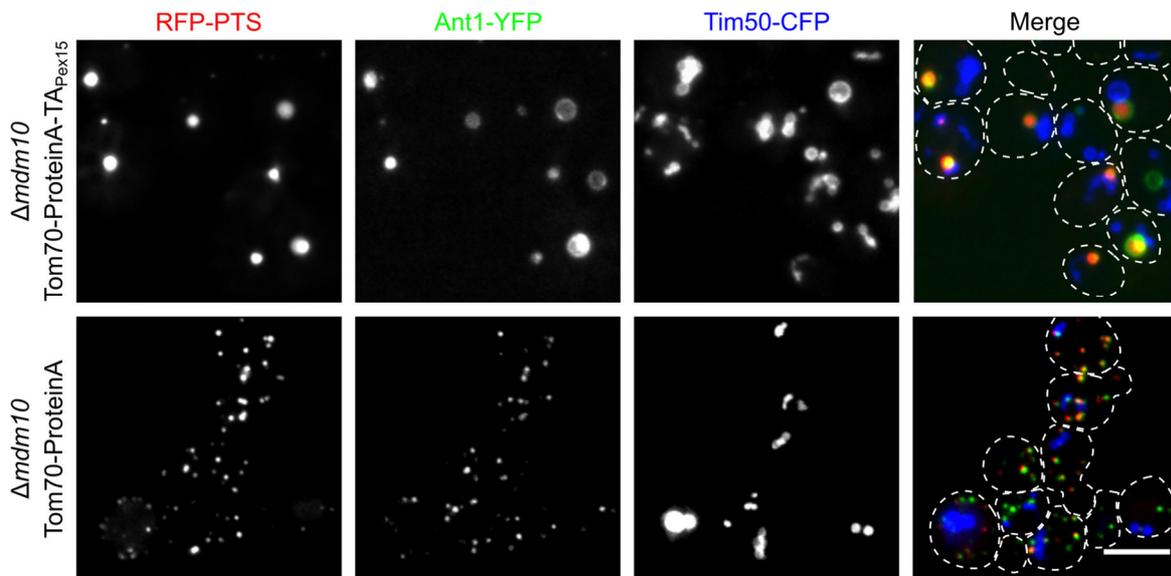


Abbildung 32: Ein synthetischer Tether zwischen Mitochondrien und Peroxisomen unterdrückt die Akkumulation kleiner Peroxisomen in Abwesenheit von Mdm10. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *Amdm10*-Zellen bei Expression eines synthetischen Tethers für Mitochondrien und Peroxisomen. Die Visualisierung der peroxisomalen Membran erfolgte durch das Markerprotein Ant1-YFP (grün), die der peroxisomalen Matrix durch das Protein RFP-PTS (rot) und mitochondriale Strukturen wurden durch Tim50-CFP (blau) visualisiert. Der Maßstab entspricht 5µm.

Anschließend wurde die subzelluläre Lokalisation dual lokalisierte Proteine bei Expression des synthetischen Tethers analysiert. Falls die fehlende Translokalisierung von Ptc5 aus den Mitochondrien in die Peroxisomen durch die Abwesenheit von Kontaktstellen hervorgerufen wird, sollte sich dieser Effekt durch die Expression des synthetischen Tethers unterdrücken lassen.

Tatsächlich ließ sich diese Hypothese bestätigen. In Zellen, die das funktionelle Tetherprotein exprimierten, wurde Ptc5-RFP-PTS vermehrt in Strukturen detektiert, die auch das peroxisomale Membranprotein Pex3-GFP enthielten. Bei Expression des Kontrollproteins war dieser Phänotyp nicht zu beobachten und Ptc5-RFP-PTS lokalisierte vornehmlich in mitochondrialen Strukturen. Die Ko-Lokalisierung mit Pex3-GFP war deutlich reduziert (Abb. 33). Diese Untersuchungen zeigen, dass der Transit von Ptc5 durch die artifizielle Etablierung der räumlichen Nähe von Mitochondrien und Peroxisomen in *Amdm10*-Mutanten ermöglicht werden kann. Eine Funktion von ERMES scheint also die Ausbildung von Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen zu sein.

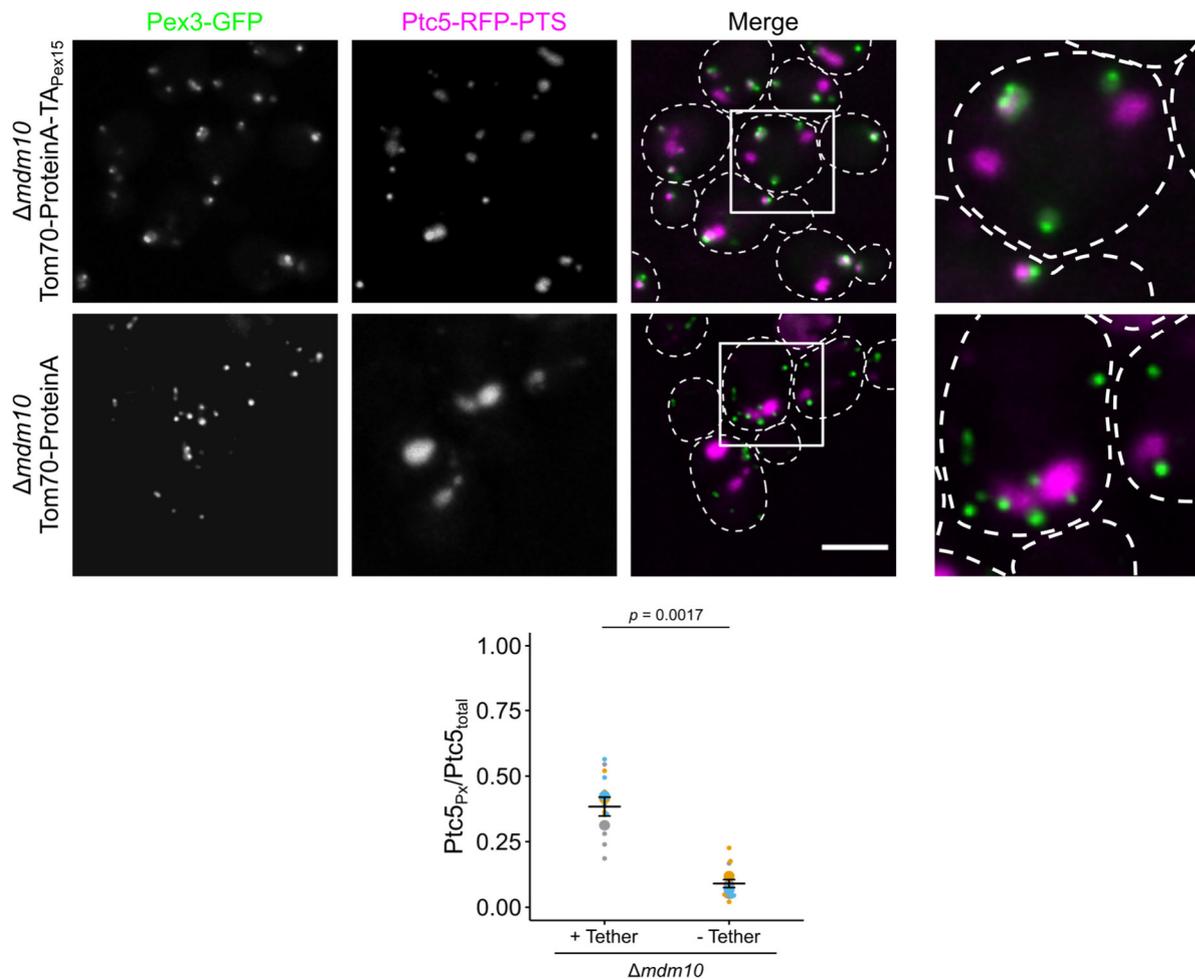


Abbildung 33: Ein synthetischer Tether für Mitochondrien und Peroxisomen verstärkt die peroxisomale Lokalisierung von Ptc5-RFP-PTS in $\Delta mdm10$ -Mutanten. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS (magenta) in $\Delta mdm10$ -Zellen, die den synthetischen Tether Tom70¹⁻³⁰-ProteinA-Pex15_{TA} oder ein Kontrollprotein exprimierten. Als peroxisomaler Marker diente das Fusionsprotein Pex3-GFP (grün). Der Maßstab entspricht 5 μ m. **Unten:** Quantifizierung des peroxisomalen Anteils des Signals von Ptc5-RFP-PTS bezogen auf das Gesamtsignal.

Im Gegensatz zur Lokalisierung von Ptc5 befand sich das dual lokalisierte Protein Pxp2-RFP-HA-PTS in $\Delta mdm10$ -Zellen vermehrt in Peroxisomen (Abb. 25B). Auch die Lokalisierung von Pxp2-RFP-PTS wurde in Anwesenheit eines synthetischen Tethers in $\Delta mdm10$ - und $\Delta mdm34$ -Zellen untersucht. Bemerkenswert war die Beobachtung, dass Pxp2-RFP-HA-PTS vermittelt durch den synthetischen Tether in $\Delta mdm34$ -Zellen, eine Akkumulation in Foci an den Grenzflächen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien aufwies (Abb. 36, A5). Dies legt nahe, dass Proteine mit dualen Zielsteuerungssequenzen dazu neigen, an solchen Kontaktstellen zu akkumulieren.

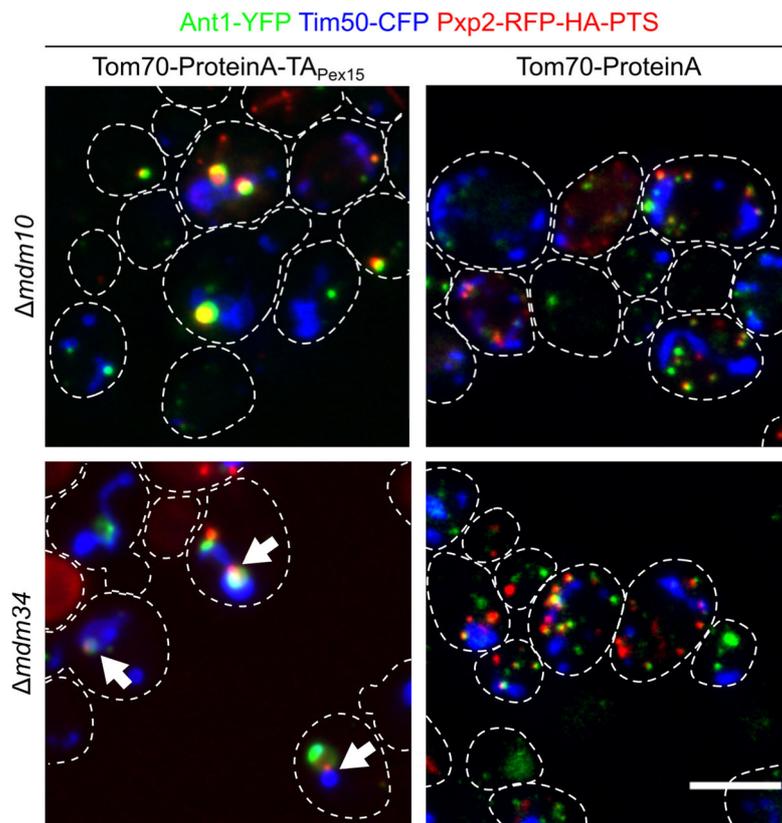


Abbildung 34: Pxp2-RFP-HA-PTS lokalisiert an Grenzflächen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Pxp2-RFP-HA-PTS (rot) in ERMES-Mutanten, die einen synthetischen Tether für Peroxisomen und Mitochondrien exprimierten. Die Visualisierung von Peroxisomen erfolgte durch das Markerprotein Ant1-YFP (grün) und mitochondriale Strukturen wurden durch Tim50-CFP (blau) visualisiert. Der Maßstab entspricht 5 μ m.

2.7.4 Genetische Interaktion zwischen *PEX5* und *MDM10*

Im experimentellen Verlauf dieser Studie wurde festgestellt, dass Mutanten mit gestörtem Import in Peroxisomen oder Mitochondrien eine erhöhte Anzahl von kleinen, hoch mobilen Peroxisomen aufweisen. Dies galt sowohl in Abwesenheit des PTS1-Rezeptors Pex5 (Abb. 15A und 15D, Video 1) als auch in Abwesenheit von Mdm10 (Abb. 30A, Video 2), welche zu einem verminderten mitochondrialen Import führte (Abb. 22 und 23).

Um den Zusammenhang dieser Phänotypen zu überprüfen, wurden $\Delta pex5\Delta mdm10$ -Doppelmutanten erzeugt. Die gleichzeitige Deletion beider Gene verstärkte den Phänotyp der Einzelmutanten nicht (Abb. 35). Die Anzahl der Peroxisomen wird demnach von Pex5 und Mdm10 in einer gegenseitigen Abhängigkeit beeinflusst. Pex5 benötigt Mdm10 oder dessen indirekte Funktion für das Tethering und umgekehrt. Diese Beobachtung unterstützt die Theorie, dass Proteine mit dualen Zielsteuerungssequenzen abhängig von den Importfaktoren beider Partnerorganellen als Tether zwischen Organellen fungieren.

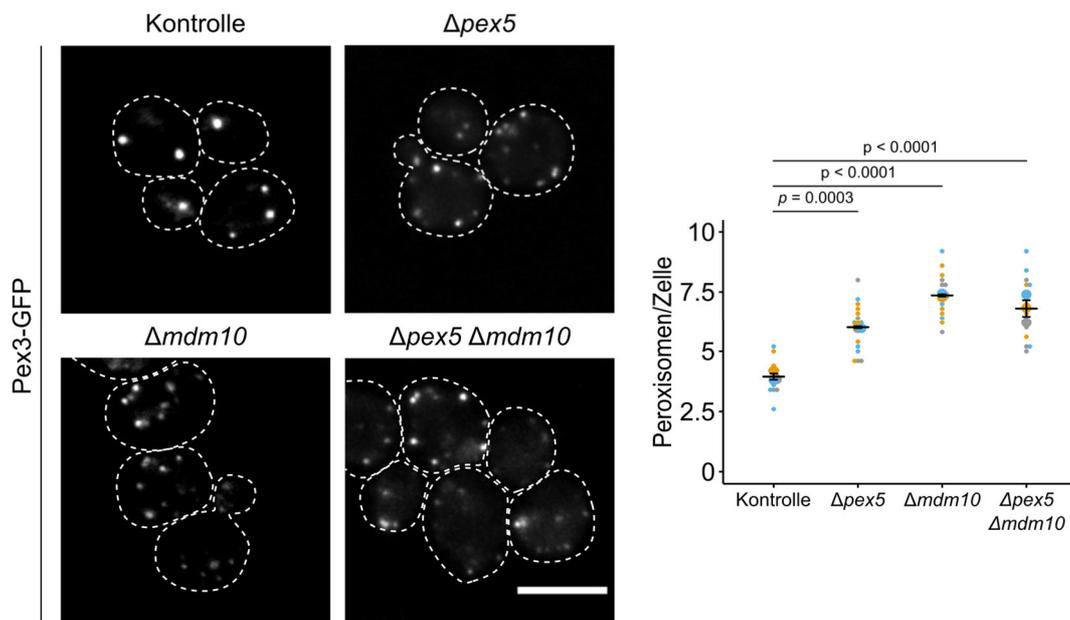


Abbildung 35: *PEX5* und *MDM10* zeigen im Kontext der Akkumulation kleiner Peroxisomen eine genetische Interaktion. Links: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung peroxisomaler Strukturen in $\Delta pex5$, $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm10 \Delta pex5$ -Zellen. Die Visualisierung von Peroxisomen erfolgte durch das Markerprotein Pex3-GFP. Der Maßstab entspricht 5 μm . Rechts: Quantifizierung der Anzahl an Peroxisomen pro Zelle in Zellen der links gezeigten Stämme.

3 Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Proteine mit Zielsteuerungssequenzen für Mitochondrien und Peroxisomen zur Ausbildung von Kontaktstellen zwischen beiden Organellen beitragen können. Die Ausbildung dieser Kontakte und die subzelluläre Verteilung dual lokalisierter Proteine hing vom metabolischen Zustand der Zellen ab. Entscheidend für die Ausbildung der Kontaktstellen war das Vorhandensein beider Zielsteuerungssignale in den untersuchten Proteinen und der peroxisomalen Importmaschinerie für Matrixproteine. In einem Hochdurchsatzscreen wurde eine Komponente des ERMES-Komplexes als ein entscheidender Faktor für die Translokalisierung der Phosphatase Ptc5 von Mitochondrien in Peroxisomen identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Proteinkomplex nicht nur den mitochondrialen Proteinimport beeinflusste, sondern darüber hinaus wesentlich zur Bildung von Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beitrug.

3.1 Proteine mit MTS und PTS1 fungieren als dynamische Tether zwischen Peroxisomen und Mitochondrien

3.1.1 Proteine mit konkurrierenden Lokalisationssignalen zeigen charakteristische Merkmale molekularer Tether

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung von Organell-Kontaktstellen mit unterschiedlichen zellulären Funktionen immer klarer. Für die Bildung solcher Kontaktstellen spielen molekulare Tether eine Schlüsselrolle. Sie sind mannigfaltig und treten sowohl als einzelne Moleküle als auch als Multiproteinkomplexe auf (Prinz *et al.*, 2014, Eisenberg-Bord *et al.*, 2016). Der überwiegende Teil der bisher identifizierten Tether weist Domänen auf, die direkt oder indirekt eine Verankerung in den Membranen der Partnerorganellen ermöglichen. Dabei kann es sich um Transmembrandomänen oder Domänen handeln, die eine direkte feste Membranassoziation erlauben (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016).

Das Protein Num1 aus *S. cerevisiae* ist ein Beispiel für einen Tether, der über beide Wege mit Membranen assoziiert ist. Als Teil des MECA (*mitochondria-ER-cortex anchor*) spielt Num1 eine Rolle bei der Ausbildung von Kontakten zwischen Mitochondrien, der Plasmamembran (PM) und dem ER (Cervený *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2012; Klecker *et al.*, 2013; Lackner *et al.*, 2013). Die N-terminale Coiled-Coil-Domäne interagiert dabei direkt mit der äußeren mitochondrialen Membran, während die C-terminale Pleckstrin-Homologie-Domäne an spezifische Komponenten der PM bindet (Tang *et al.*, 2009; Jong *et al.*, 2004). Die Assoziation

mit dem ER erfolgt durch die Interaktion mit dem integralen ER-Protein Scs2 (Chao *et al.*, 2014; Omer *et al.*, 2018).

Auch Inp1 ist ein Tether, der über die Interaktion mit dem peroxisomalen Protein Pex3 mittels C-terminalem LNYLL-Motiv und der direkten Bindung an spezifische Phospholipide der PM über seine N-terminale Domäne, eine Verknüpfung zwischen Peroxisomen und der PM vermittelt. Diese Verbindung ist für die Retention der Peroxisomen in der Mutterzelle während der Zellteilung erforderlich (Hulmes *et al.*, 2020; Krikken *et al.*, 2020).

Da verschiedene molekulare Mechanismen die Assoziation von Organellen beeinflussen können, werden Tether nach funktionellen Merkmalen definiert. Gemäß dieser Definition muss ein Tether an Kontaktstellen akkumulieren, strukturelle Merkmale aufweisen, die die Ausübung einer Zugkraft zwischen den Organellen ermöglichen, und die Bildung von MCS *in vivo* oder *in vitro* fördern (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016). Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine mit MTS und PTS1 erfüllen diese Kriterien zumindest teilweise und können als Tether zwischen Peroxisomen und Mitochondrien fungieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei prinzipielle Typen von Proteinen mit dualen Zielsteuerungssequenzen identifiziert, die sich in ihren Lokalisationsmechanismen unterscheiden (Abb. 36). Nachfolgend werden diese Typen detailliert beleuchtet und im Hinblick auf ihre Funktion als molekularer Tether diskutiert.

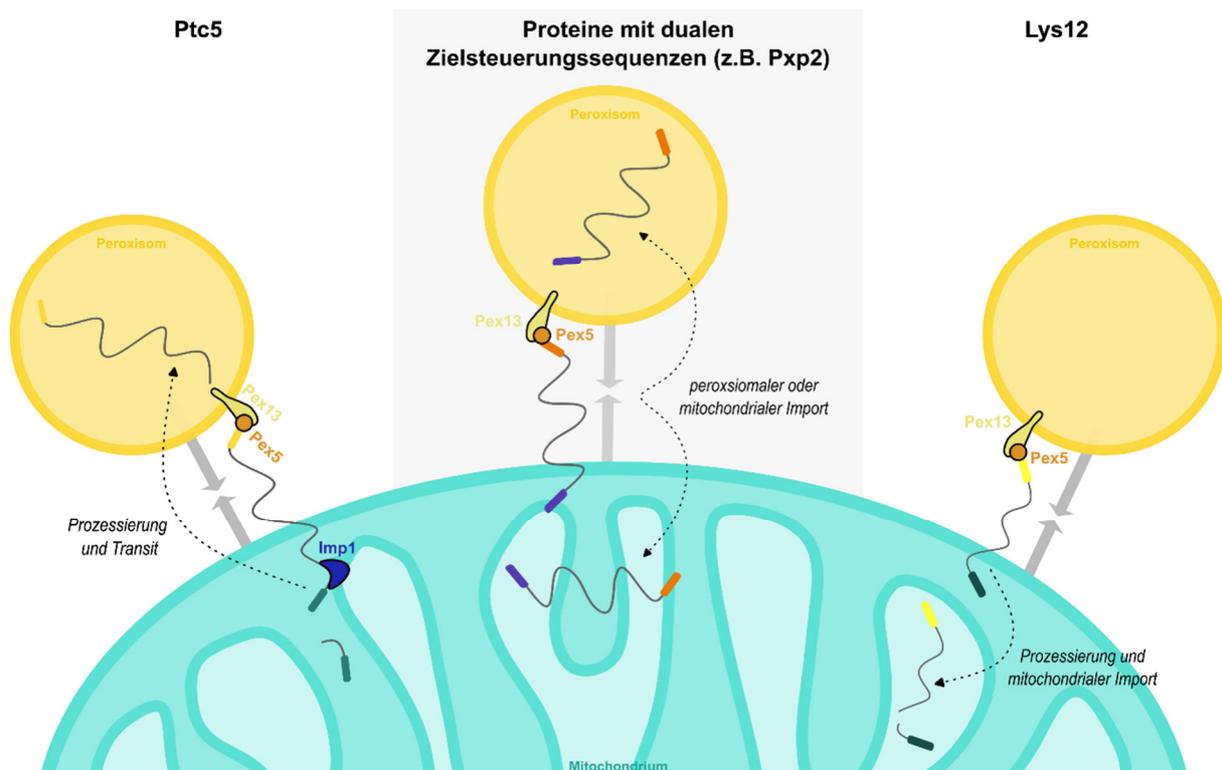


Abbildung 36: Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen als Tether zwischen Mitochondrien und Peroxisomen. Links: Während des Transits zwischen Mitochondrien und Peroxisomen trägt Ptc5 zur Ausbildung von Kontakten zwischen beiden Organellen bei. Nach der Prozessierung durch die Peptidase Imp1 wird Ptc5 über die peroxisomale Importmaschinerie für Matrixproteine in Peroxisomen importiert oder verbleibt im Intermembranraum (Stehlik *et al.*, 2020). **Mitte:** Weitere Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen, wie Pxp2, tragen zur Bildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien bei und zeigen eine duale Lokalisierung in beiden Organellen. **Rechts:** Das mitochondriale Protein Lys12 enthält ein PTS1, über dessen Erkennung der Kontakt zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beeinflusst werden kann.

Ptc5 aus der Bäckerhefe wird in den Mitochondrien durch Imp1 prozessiert und anschließend in die Peroxisomen überführt. Die Prozessierung führt zum Verlust der Verankerung in den Mitochondrien, was höchstwahrscheinlich die Fähigkeit Kontakte zwischen beiden Organellen zu induzieren beeinträchtigt. Diese Annahme wird durch frühere Forschungsergebnisse gestützt. In einer Studie wurde gezeigt, dass eine Variante von Ptc5 ohne TMD und Imp1-Spaltstelle die Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien erhöht (Stehlik *et al.*, 2020). Dies legt nahe, dass die beim Import in die mitochondriale Matrix entstehende Kraft, zusammen mit der wahrscheinlich synchronen Bindung an Pex5 über das C-terminale PTS1, ausreicht, um die Ausbildung von Kontakten zwischen den Organellen zu induzieren.

Zwei Proteine der Lysinbiosynthese weisen eine ähnliche Struktur auf. Eines dieser Proteine, Lys12, fungiert als Tether (Abb. 36). In Abwesenheit von Lysin nahmen Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien nur dann zu, wenn das PTS1 in Lys12 zugänglich war (Abb. 18). Unter diesen Bedingungen war die Expression des Proteins erhöht (Abb. 18A). Es wurde jedoch keine Translokation in die Peroxisomen beobachtet (Abb. 17). Lys12 erfüllt somit zwei der drei oben genannten Kriterien eines Tether: In Abhängigkeit seiner intrazellulären

Konzentration induziert es Kontakte und weist mit seinem MTS und PTS einen strukturellen Aufbau auf, der eine zumindest temporäre Verankerung in Organellen ermöglicht. Es wurden jedoch keine fokalen Strukturen innerhalb der Mitochondrien beobachtet (Abb. 17). Daher kann das dritte Kriterium - eine spezifische Lokalisierung an Kontaktstellen (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016) - nach den bisherigen Untersuchungsergebnissen nicht als erfüllt betrachtet werden. In Anbetracht der katalytischen Funktion des Proteins in der Lysinbiosynthese ist die verteilte Lokalisation in der mitochondrialen Matrix nicht überraschend. Möglicherweise fungiert nur der unter Lysin-Mangel neusynthetisierte Anteil von Lys12 als Tether. Eine mögliche Regulation der Lokalisation könnte durch die Untersuchung einer endogen fluoreszenz-markierten Variante in An- und Abwesenheit von Lysin aufgedeckt werden (vgl. Abb. 7 und 8).

Um_Ptc5 zeigt im Gegensatz zu seinem Ortholog in *S. cerevisiae* eine konstitutive Funktion als Tether, insbesondere wenn es durch Überexpression hochabundant und mit einer C-terminalen GFP-Fusion vorlag (Abb. 5 und 6). Die beiden Proteine unterscheiden sich jedoch in der Struktur ihrer N-Termini. Bisher konnte beispielsweise keine Prozessierung von Um_Ptc5 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was die Möglichkeit einer längeren Verankerung in der IMM nahelegt. Die verstärkte mitochondriale Verankerung könnte wiederum eine Voraussetzung dafür sein, eine Zugkraft zwischen den Organellen auszuüben.

Im Fall von Um_Ptc5 akkumulierten die untersuchten Varianten in Foci an den Grenzflächen der Organellen, womit das Kriterium einer Kontaktstellen-spezifischen Lokalisierung erfüllt ist (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016). Interessanterweise wurden diese Foci bei der Untersuchung der endogen markierten Varianten nur nach Inkubation in Ölsäure beobachtet (Abb. 7 und 8). Dies deutet darauf hin, dass diese Lokalisierung – und möglicherweise die damit verbundene Ausbildung einer Kontaktstelle – je nach Aktivität und Proliferation der Peroxisomen variiert. Die ultrastrukturelle Analyse von Kontaktstellen nach Überexpression von Um_Ptc5 unterstützt die hier vorgeschlagene Funktion, da die ermittelte mittlere Distanz von 65 nm zwischen Peroxisomen und Mitochondrien (Abb. 6C) im typischen Bereich einer Kontaktstelle von 10-80 nm liegt (Eisenberg-Bord *et al.*, 2016; Scorrano *et al.*, 2019).

Pxp2, Tes1 und Mss2 unterscheiden sich von den zuvor besprochenen Proteinen, da sie möglicherweise nicht dem konventionellen mitochondrialen Importweg folgen und nicht von der Matrixprotease MPP prozessiert wurden (Abb. 25C). Sie lokalisierten nicht gleichmäßig verteilt in den Mitochondrien, sondern hauptsächlich in Foci, die oft mit peroxisomalen Strukturen assoziiert waren (Abb. 9 und 11). In Zellen, die aufgrund des synthetischen Tethers vergrößerte Peroxisomen aufwiesen, sammelte sich Pxp2-RFP-HA-PTS deutlich in Foci an den

Verbindungspunkten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien an (Abb. 34). Außerdem war in Abwesenheit von Pex5 eine regelmäßige Verteilung von Pxp2-RFP-HA-PTS in den Mitochondrien zu beobachten (Abb. 11). Die Bildung von Kontaktstellen durch Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen hing also von deren Interaktion mit den Importfaktoren der Organellen ab (Abb. 11, 12 und 15).

Auf Seiten der Peroxisomen könnte die starke Interaktion der WxxxY-Motive von Pex5 mit der luminalen Domäne von Pex14 die Zugkraft zur Ausbildung der Kontakte vermitteln (Gao *et al.*, 2022; Skowyra und Rapoport, 2022). Dafür spricht, dass in $\Delta pex5$ -Mutanten kleine, hochmobile Peroxisomen vorhanden waren (Video 1), während die Überexpression der in dieser Arbeit untersuchten Proteine zu weniger und größeren Peroxisomen führte, die an Mitochondrien fixiert zu sein schienen (Abb. 9 bis 11).

Auch in Säugetieren konnte bereits ein Beispiel charakterisiert werden, bei dem konkurrierende Zielsteuerungssignale eines Proteins zur Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien führen. In Leydig-Zellen wird über alternatives Spleißen eine Isoform der Enoyl-CoA- Δ -Isomerase 2 (ACBD2/ECI2) generiert, die sowohl ein N-terminales MTS als auch ein PTS1 besitzt. Dieses Protein induziert, wahrscheinlich über die Interaktion mit dem mitochondrialen Importrezeptor TOMM20 und PEX5, die Kontaktausbildung zwischen Mitochondrien und Peroxisomen (Fan *et al.*, 2016).

In *S. cerevisiae* wurde kürzlich ein ähnlicher Mechanismus zur Bildung von Kontaktstellen zwischen der Kernmembran und Mitochondrien identifiziert. Hieran beteiligt ist das Protein Cnm1, welches über zwei N-terminale TMDs sowie interne mitochondriale Zielsteuerungssignale (iMTS) verfügt und durch die Interaktion mit Tom70 Kontaktstellen zwischen der Kernmembran und Mitochondrien ausbildet (Eisenberg-Bord *et al.*, 2021). Die grundlegende Struktur dieses Proteins ähnelt stark den hier charakterisierten Proteinen mit dualen Zielsteuerungssignalen für Peroxisomen und Mitochondrien. Die Kontaktausbildung über Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen könnte daher ein weit verbreitetes Prinzip in eukaryotischen Zellen sein (Abb. 37).

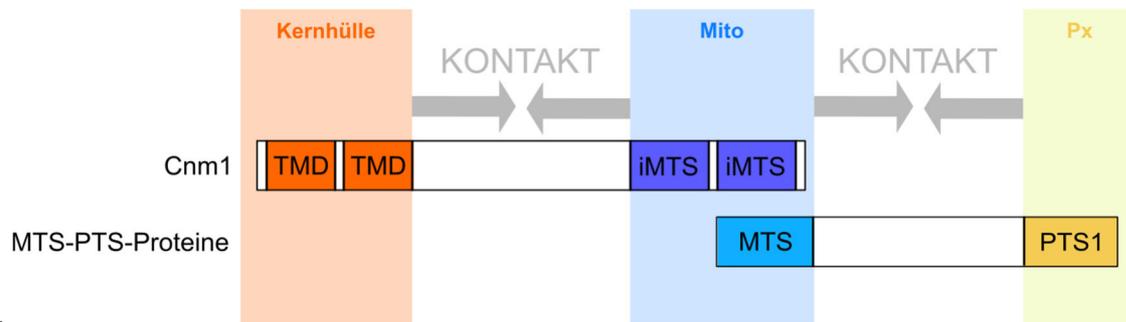


Abbildung 37: Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen fungieren als Tether zwischen verschiedenen Organellen. Das Protein Cnm1 besitzt zwei N-terminale Transmembrandomänen (TMD) sowie interne mitochondriale Zielsteuerungssignale (iMTS) und induziert Kontakte zwischen der Kernhülle und Mitochondrien (Eisenberg-Bord *et al.*, 2021). MTS-PTS-Proteine besitzen N-terminale mitochondriale Zielsteuerungssignale und ein C-terminales PTS1 und induzieren Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. Mito: Mitochondrium; Px: Peroxisom.

Generell könnten dual lokalisierte Proteine eine wesentliche Bedeutung für die Bildung von Membrankontaktstellen haben. Interessanterweise sind die meisten Proteine, die bisher in genomweiten Screens als putative Tether für Peroxisomen und Mitochondrien identifiziert wurden vermutlich dual lokalisiert (Cohen *et al.*, 2014; Mattiazzi-Usaj *et al.*, 2015; Shai *et al.*, 2018) und zeigen daher möglicherweise eine Tendenz an Kontaktstellen zu akkumulieren.

3.1.2 Die Regulation der Kontaktausbildung über Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen in Abhängigkeit des metabolischen Zustands der Zelle

Die Bildung einer Membrankontaktstelle erfolgt häufig durch mehrere Tether (Prinz *et al.*, 2014, Eisenberg-Bord *et al.*, 2016). Um die Kontakte zwischen dem ER und der PM in *S. cerevisiae* zu reduzieren, ist es beispielsweise erforderlich sechs im ER lokalisierte Proteine zu eliminieren (Manford *et al.*, 2012; Stefan *et al.*, 2013). Die Bildung einer Kontaktstelle durch redundante Faktoren deutet auf ihre wesentliche Bedeutung für die Physiologie der Zelle hin. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Proteine mit dualen Lokalisierungssignalen die Bildung von Kontakten beeinflussen können. Vermutlich ist für die Ausbildung einer Kontaktstelle die Summe aller Kräfte der beteiligten Einzelproteine relevant.

Die Redundanz ermöglicht außerdem ein hohes Maß an regulatorischer Flexibilität, beispielsweise in Anpassung an Umwelt- oder Stressbedingungen. Unter Stressbedingungen wie Hypoxie und Nährstoffmangel nimmt in humanen Zellen der Abstand zwischen Mitochondrien und dem ER zu (Sood *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016). Die Assoziation beider Organellen ist auch an den Metabolismus von Fettsäuren gekoppelt. Bei erhöhter Aktivität der β -Oxidation, die in Säugetieren sowohl in Peroxisomen als auch Mitochondrien stattfindet, stehen die Organellen in engem Kontakt. Die Anwesenheit von Glukose hingegen inhibiert die Assoziation der Organellen (Theurey *et al.*, 2016). Auch in *S. cerevisiae* zeigt sich eine

Erhöhung der Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien während des Wachstums auf Ölsäure (Shai *et al.*, 2018). Da die β -Oxidation in diesem Organismus ausschließlich in den Peroxisomen stattfindet und das resultierende Acetyl-CoA zur Einspeisung in den Zitronensäurezyklus in die Mitochondrien transportiert werden muss (Poirier *et al.*, 2006), ist die Assoziation der beiden Organellen unter diesen Bedingungen von Vorteil. Die Überexpression des Proteins Pex34, das als Tether zwischen Peroxisomen und Mitochondrien fungiert, verstärkt den Transfer von Acetyl-Carnitin und insbesondere Citrat (Shai *et al.*, 2018). Dabei handelt es sich um Moleküle, die in Hefe dem Transport von Acetyl-CoA von Peroxisomen in die Mitochondrien dienen (Van Roermund *et al.*, 1995).

Einige der hier untersuchten Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen sind ebenfalls am Transfer von Molekülen der β -Oxidation beteiligt. In Gegenwart von Ölsäure kommt es zur Induktion von *CAT2* und *TES1* (Smith *et al.*, 2002). Die verstärkte Expression dieser Proteine könnte nicht nur den erhöhten Bedarf ihrer enzymatischen Aktivität kompensieren, sondern gleichzeitig zur verstärkten Kontaktausbildung und zum effizienten Transfer von Intermediaten beitragen. Daher wäre die systematische Untersuchung der Kontakte nach Inkubation in Ölsäure und bei Überexpression der Kandidatenproteine interessant. Die manuelle Quantifizierung in Anwesenheit von Ölsäure erwies sich aufgrund stark fragmentierter Mitochondrien jedoch als schwierig (Daten nicht gezeigt, vgl. Kuravi *et al.*, 2008). Hier könnte ein Split-Venus-System genutzt werden. Dabei werden abundante Membranproteine der Partnerorganellen mit dem N- oder C-terminalen Teil des Fluoreszenzproteins fusioniert. Kommen beide Teile in enge räumliche Nähe bilden sie einen funktionellen Fluorophor, was die Detektion und Quantifizierung von Kontaktstellen ermöglicht (Shai *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Cieri *et al.*, 2017).

Während der peroxisomalen β -Oxidation ist eine effiziente Regeneration von NAD^+ unerlässlich (Poirier *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang spielen die Enzyme Mdh3 und Gpd1 eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung des peroxisomalen Redoxgleichgewichts (Freitag *et al.*, 2012; Al-Saryi *et al.*, 2017). Die Aktivität von Gpd1 in Peroxisomen wird durch seine Dephosphorylierung gesteigert, wobei Ptc5 als katalytisches Enzym dieser Reaktion identifiziert wurde (Jung *et al.*, 2010; Stehlik *et al.*, 2020).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ptc5 in *U. maydis* die Assoziation zwischen Peroxisomen und Mitochondrien erhöhen kann (Abb. 5 und 6) und dessen Lokalisation in Abhängigkeit von Ölsäure reguliert wird (Abb. 7 und 8). Eine höhere Abundanz des Proteins in Peroxisomen könnte unter Bedingungen, die die Regeneration von Redox-Kofaktoren erfordern, von Vorteil sein. Hierfür spricht auch, dass die gleichzeitige Deletion von *PTC5* und

MDH3 in *S. cerevisiae* zu einem synthetischen Wachstumsdefekt führt (T. Stehlik, persönliche Mitteilung).

Auch für die Herstellung von Lysin ist die Regeneration von NAD^+ in den Peroxisomen notwendig. Der letzte Schritt dieser Synthese, die Spaltung von Saccharopine in L-Lysin und 2-Ketoglutarinsäure durch die Saccharopin-Dehydrogenase Lys1 erfordert NAD^+ und erfolgt in Peroxisomen. Der Reaktionsweg findet teilweise auch in Mitochondrien statt (Al-Saryi *et al.*, 2017). Das mitochondriale Protein Lys12 ist nicht nur selbst an der Biosynthese von Lysin beteiligt, sondern reguliert die Assoziation dieser Organellen in Abhängigkeit der Aktivität dieses Reaktionswegs (Abb. 18). Ein Wachstumsdefekt bei Lysin-Mangel in Folge der Blockade dieses Mechanismus durch die Maskierung des PTS1 von Lys12 konnte jedoch nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es ist möglich, dass ein redundanter Mechanismus über das Protein Lys4, das ähnliche Eigenschaften wie Lys12 aufwies (Abb. 17), die Detektion eines möglichen Phänotyps erschwert. Zudem ist selbst die Deletion von *PEX5* nicht ausreichend, um in Abwesenheit von Lysin einen Wachstumsphänotyp auszulösen (Al-Saryi *et al.*, 2017). Die Biosynthese funktioniert folglich auch im Zytosol. Verstärkte Kontakte der beteiligten Organellen könnten unter kombinierten Stressbedingungen von größerer Bedeutung sein. So könnte sich ein möglicher Phänotyp z.B. in Anwesenheit von Ölsäure und unter Lysin-Mangelbedingungen bemerkbar machen, da hier sowohl ein effizienter Austausch von Intermediaten der β -Oxidation und Lysinbiosynthese als auch die Aktivität von Ptc5 in Peroxisomen zur Aufrechterhaltung des peroxisomalen Redoxgleichgewichts erforderlich sein könnte.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf ein interessantes, bisher teilweise spekulatives Tether-Modul hin, das die Kontaktaufbildung zwischen Mitochondrien und Peroxisomen mit der Lysinbiosynthese verbindet. Die Expression von Lys12 und vermutlich auch Lys4 wurden in Abwesenheit von Lysin induziert und verstärkten die Kontakte zwischen Peroxisomen und Mitochondrien (Abb. 17 und 18). Hierdurch kann Ptc5 effizienter translokalisieren und Gpd1 aktivieren (siehe auch nächstes Kapitel). Dies trägt wiederum zur Regeneration von NAD^+ in Peroxisomen bei (Abb. 38). Ob auch der Transport von Intermediaten in die Peroxisomen vereinfacht wird, bleibt abzuwarten.

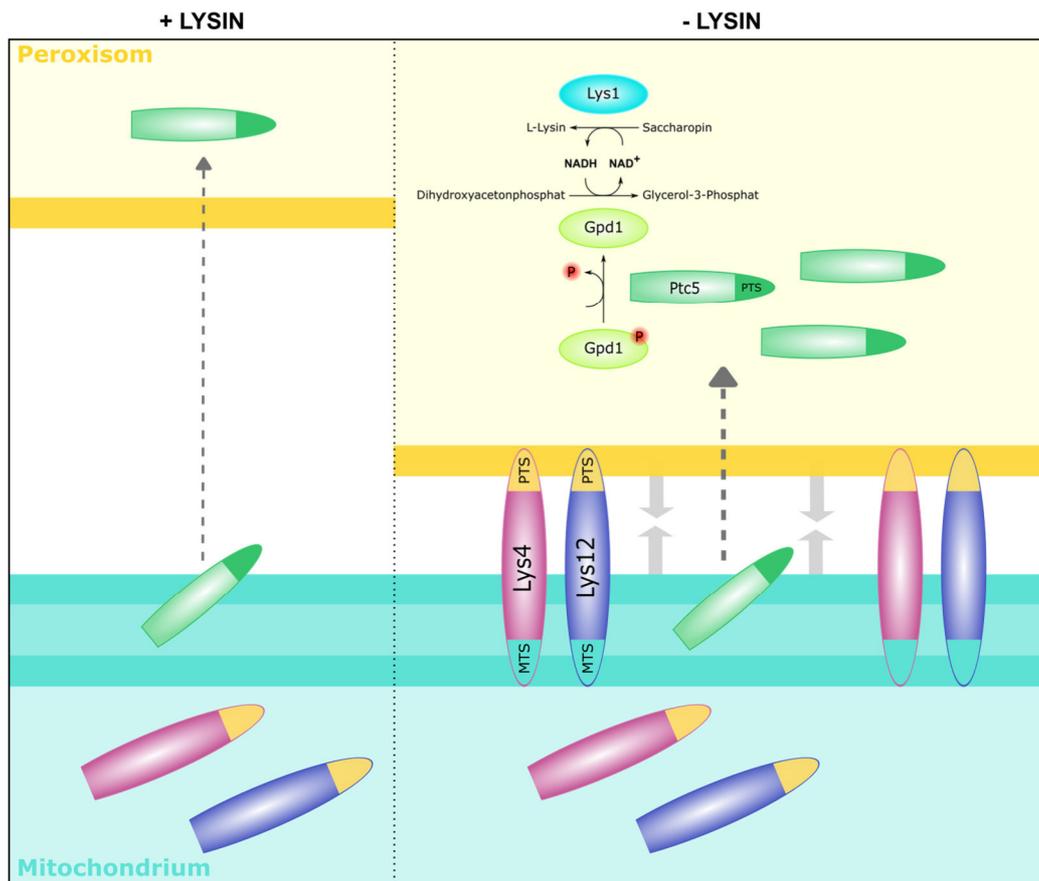


Abbildung 38: Model zur durch Lysinmangel induzierten Bildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. In Abwesenheit von Lysin, wird die Expression von Lys12 und vermutlich auch Lys4 induziert, was zu einer verstärkten Kontaktausbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien führt und die Translokation von Ptc5 aus den Mitochondrien in Peroxisomen erleichtern könnte. In Peroxisomen dephosphoryliert Ptc5 das Enzym Gpd1 (Jung *et al.*, 2010, Stehlik *et al.*, 2020), was die Regeneration von NAD⁺ fördert. NAD⁺ wird für den letzten Schritt der Lysinbiosynthese von Lys1 als Redoxcoenzym benötigt (Al-Saryi *et al.*, 2017). Ptc5: Protein-Phosphatase Typ 2C; Gpd1: Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase 1; Lys1: Saccharopin-Dehydrogenase.

3.2 Der ERMES-Komplex beeinflusst die Ausbildung von Kontakten zwischen Peroxisomen und Mitochondrien indirekt oder direkt

Eine wichtige Kontaktstelle eukaryotischer Zellen findet sich zwischen Mitochondrien und dem ER. Diese als MAMs (*mitochondria-associated ER membranes*) bezeichneten Regionen sind für eine Reihe essenzieller Funktionen der Zelle relevant, zu denen insbesondere der Transfer von Calcium-Ionen, die Regulation der Apoptose aber auch die Synthese und der Transfer von Phospholipiden gehören (Raturi *et al.*, 2013; Marchi *et al.*, 2014).

Obwohl in Säugetieren bereits viele Proteine identifiziert wurden, die an der Aufrechterhaltung der Verbindung zwischen dem ER und den Mitochondrien beteiligt sind, sind in Hefe bisher wesentlich weniger Interaktoren dieser Kontaktstellen bekannt (Zung und Schuldiner, 2020). Eine Schlüsselrolle bei der Etablierung von Kontaktstellen zwischen dem ER und Mitochondrien spielt der ERMES-Komplex (Kornmann *et al.*, 2009, 2010, 2011), der als einer der am besten charakterisierten Tether zwischen Mitochondrien und dem ER gilt.

Zusätzlich zu seiner Rolle als Tether ist er an zahlreichen zellulären Funktionen beteiligt. Er beeinflusst beispielsweise die Verteilung von Mitochondrien während der Zellteilung (Boldogh *et al.*, 2003; Murley *et al.*, 2013) und ist in die Replikation des mitochondrialen Genoms (Hobbs *et al.*, 2001; Meeusen und Nunnari, 2003) sowie Mitophagie (Böckler *et al.*, 2014) involviert. Das Protein Mdm10 ist zudem mit dem SAM-Komplex assoziiert und spielt über diese Interaktion eine Rolle in der Biogenese von Tom40 und Tom22 (Meissinger *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2008; Yamano *et al.*, 2010; Ellenrieder *et al.*, 2016). In diesem Prozess konkurriert Mdm10 mit Tom40 um die Bindung an den SAM-Komplex, was zur Freisetzung von Tom40 führt (Yamano *et al.*, 2010). Gleichzeitig ermöglicht Mdm10 durch die Bildung eines Kanals die Insertion von Tom22 in die OMM (Ellenrieder *et al.*, 2016).

Der ERMES-Komplex spielt ebenfalls eine Rolle beim direkten Transfer von Phospholipiden zwischen dem ER und den Mitochondrien. Die Komponenten des ERMES-Komplexes, mit Ausnahme von Mdm10, verfügen über lipidbindende SMP (*synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding protein*) -Domänen. Mutationen in *MMM1* oder *MDM12* beeinträchtigen diesen Transfer, haben jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Membranzusammensetzung der Mitochondrien (Elbaz-Alon *et al.*, 2014; Hönscher *et al.*, 2014; Lahiri *et al.*, 2014; Kawano *et al.*, 2018). Die kürzlich aufgedeckte Struktur des ERMES-Komplexes zeigt, dass er durch die Bildung einer hydrophoben Rinne den Transfer von Lipiden ermöglichen kann (Wozny *et al.*, 2023).

3.2.1 Die Rolle des ERMES-Komplexes in der Regulation der subzellulären Verteilung von Proteinen mit dualen Zielsteuerungssignalen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass der ERMES-Komplex eine entscheidende Rolle beim Import verschiedener Proteine in die Mitochondrien spielt (Abb. 23). In ERMES-Mutanten lokalisierte Ptc5 überwiegend in den Mitochondrien und wies eine unvollständige Prozessierung auf (Abb. 20, 21 und 22). Es waren verschiedene Szenarien denkbar, um die gestörte peroxisomale Translokation von Ptc5 bei Depletion von ERMES-Komponenten zu erklären. Einerseits könnte die Abwesenheit von ERMES-Untereinheiten dazu führen, dass Ptc5 von mitochondrialen Rezeptoren schlechter erkannt oder durch eine unvollständige Assemblierung von Tom40-Kanälen weniger effizient importiert wird und daher länger an der mitochondrialen Membran verweilt. Angesichts der Lokalisation der mitochondrialen Peptidasen an der inneren Membran oder in der mitochondrialen Matrix (Gakh *et al.*, 2002) könnte dies die unvollständige Prozessierung und Retention von Ptc5 in Mitochondrien erklären.

Die Abwesenheit von Tom70, einem Rezeptor für Chaperon-Präprotein-Komplexe, führte zu einer drastischen Reduzierung der Proteinmenge von Ptc5 (Abb. 24B). Die ausbleibende Erkennung von Ptc5 an Mitochondrien führt möglicherweise zu einer längeren Verweildauer und verstärkter Degradation des Proteins im Zytosol. Des Weiteren zeigten $\Delta tom70$ -Mutanten, ähnlich wie $\Delta mdm10$ -Mutanten, kleine Peroxisomen und ein deutlich schwächeres Signal des peroxisomalen Markers Ant1-YFP (Abb. 24A), der an die Phänotypen einer Deletion von *PEX5* oder *MDM10* erinnerte. Interessanterweise rekrutieren Tom70 und dessen Paralog Tom71 das Protein Lam6, das einen wichtigen Regulator verschiedener Kontaktstellen darstellt (Elbaz-Alon *et al.*, 2015). Allerdings erschien die peroxisomale Translokalisierung von Ptc5 in $\Delta tom70$ -Mutanten unverändert (Abb. 24A). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein gestörter mitochondrialer Import die Translokalisierung von Ptc5 aus den Mitochondrien in die Peroxisomen nicht verhindert (siehe auch Kapitel 3.2.2).

Es war weiterhin denkbar, dass der peroxisomale Import in ERMES-Mutanten gestört sein könnte. Sowohl RFP-PTS als auch eine Variante von Ptc5 ohne MTS lokalisierten in $\Delta mdm10$ -Mutanten in Peroxisomen (Abb. 28 und 29), sodass dies keine Erklärung für die mitochondriale Retention von Ptc5 darstellt.

Eine zweite Gruppe von Proteinen zeigte in $\Delta mdm10$ -Mutanten den gegensätzlichen Phänotyp und eine hauptsächlich peroxisomale Lokalisation (Abb. 25B-D). Prozessierungsdefekte konnten für diese Kandidaten nicht beobachtet werden, was auf ungewöhnliche mitochondriale Zielsteuerungssignale hinweist (Abb. 25E). Es ist denkbar, dass Proteine dieser Gruppe

mitochondriale Zielsteuerungssignale aufweisen, die lediglich ineffizient durch Rezeptoren der mitochondrialen Importmaschinerie erkannt werden. Eine plausible Hypothese wäre, dass solche Proteine durch den Rezeptor Tom22, dessen Biogenese von Mdm10 abhängt (Ellenrieder *et al.*, 2016) erkannt werden. In Abwesenheit von Mdm10 könnten diese Proteine direkt in Peroxisomen importiert werden. Das Fusionsprotein Pxp2-RFP-HA-PTS zeigte eine häufige Ko-Lokalisation mit Mmm1 (Abb. 27), was einen Hinweis auf eine mögliche direkte Beteiligung des ERMES-Komplexes am mitochondrialen Import des Proteins liefert. Mdm10 bildet hydrophobe Kanäle in der OMM, die für die Insertion von Tom22 genutzt werden (Ellenrieder *et al.*, 2016). Es wäre denkbar, dass über einen solchen Kanal auch andere Proteine die mitochondriale Membran durchqueren können.

Die Interaktion von Mdm10 mit dem SAM-Komplex und den ERMES-Komponenten erfolgt über unterschiedliche Bindungsstellen des Proteins. Es wurden Mutanten identifiziert, bei denen entweder die Funktion von Mdm10 im mitochondrialen Proteinimport oder als Teil des ERMES-Komplexes beeinträchtigt ist (Ellenrieder *et al.*, 2016). Eine detaillierte Charakterisierung dieser Mutanten könnte tiefere Einblicke in die Ursachen der reduzierten peroxisomalen Translokalisierung von Ptc5 in ERMES-Mutanten ermöglichen.

3.2.2 Der ERMES-Komplex als Tether zwischen Mitochondrien und Peroxisomen

Die Wiederherstellung der Translokation von Ptc5 in $\Delta mdm10$ -Zellen durch die Expression eines synthetischen Tethers (Abb. 33) sowie die Suppression des Phänotyps der kleinen Peroxisomen (Abb. 32) legen nahe, dass der ERMES-Komplex eine Funktion in der Etablierung von Kontaktstellen zwischen Peroxisomen und Mitochondrien hat.

Die Zunahme der Anzahl von Peroxisomen pro Zelle in Abwesenheit bestimmter ERMES-Untereinheiten sowie die Ko-Lokalisation von Komponenten des Komplexes mit Peroxisomen wurden bereits von anderen Gruppen beobachtet und auf eine Rolle des ERMES-Komplexes bei der Etablierung von MCS zwischen Peroxisomen und Mitochondrien zurückgeführt (Cohen *et al.*, 2014; Esposito *et al.*, 2019).

Offen bleibt die Frage, ob der Einfluss des Komplexes auf die Bildung von Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen auf direkten (etwa die fehlende Interaktion von ERMES-Komponenten mit peroxisomalen Membranproteinen) oder indirekten Ursachen basiert. Die Akkumulation kleiner Peroxisomen wurde sowohl in $\Delta mdm10$ - als auch in $\Delta pex5$ -Mutanten beobachtet. Die gleichzeitige Abwesenheit beider Faktoren führte hingegen nicht zu einer Verstärkung des Phänotyps (Abb. 35). Diese Beobachtung legt nahe, dass beide Faktoren über einen gemeinsamen Weg zur Akkumulation kleiner Peroxisomen in Zellen beitragen

könnten. Möglicherweise erfolgt diese Verknüpfung im Zusammenhang mit der Ausbildung von Kontakten über Proteine mit dualen Zielsteuerungssignalen, die in $\Delta pex5$ -Mutanten ihre Affinität zu den Peroxisomen und in $\Delta mdm10$ -Mutanten ihre Affinität zu den Mitochondrien verlieren. Für die indirekte Funktion von Mdm10 in diesem Prozess spricht, dass in $\Delta mdm10$ -Mutanten die mitochondrialen Pxp2-RFP-HA-PTS-Foci nicht mehr zu beobachten waren (Abb. 25B). Die Expression eines künstlichen Tethers führte hingegen zur Bildung von Pxp2-RFP-HA-PTS-Foci an den Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen (Abb. 34).

Eine physikalische Interaktion zwischen Mdm34 und Pex11 konnte von anderen Autoren bereits nachgewiesen werden (Mattiuzzi-Usaj *et al.*, 2015), was eine direkte Funktion von ERMES für die Kontaktbildung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien impliziert. Jedoch konnte Ptc5-RFP-PTS auch in Abwesenheit von Pex11 in die Peroxisomen translokalisieren (vorläufige Daten). Möglicherweise existieren weitere ERMES-Interaktionspartner auf der Seite der Peroxisomen oder die diskutierte indirekte Funktion ist für den peroxisomalen Phänotyp der ERMES-Mutanten ausschlaggebend. Hierfür spricht auch, dass die Überexpression des dual lokalisierten Proteins Mss2 den peroxisomalen Phänotyp von ERMES-Mutanten supprimiert (Abb. 25D).

3.2.3 Der ERMES-Komplex als Knotenpunkt zwischen Peroxisomen, Mitochondrien und dem ER

Peroxisomen sind nicht nur funktionell eng mit Mitochondrien verknüpft, sondern kooperieren auch mit dem ER. Ihr evolutionärer Ursprung ist mit beiden Organellen verbunden. Sowohl das ERAD (*endoplasmic reticulum associated protein degradation*) -System des ER (Gabaldón *et al.*, 2006; Schlüter *et al.*, 2006; Bittner *et al.*, 2022) als auch mitochondriale Prozesse, einschließlich Fettsäureabbau und Teilungsmechanismen (Koch *et al.*, 2005; Kuravi *et al.*, 2006; Motley *et al.*, 2008; Schrader *et al.*, 2022), teilen entscheidende Komponenten mit Peroxisomen. Beide Organellen spielen eine Rolle für die Biogenese der Peroxisomen (Bittner *et al.*, 2022). Der ERMES-Komplex könnte wie bereits vorgeschlagen einen Knotenpunkt zwischen allen drei Organellen darstellen (Shai *et al.*, 2019, Esposito *et al.*, 2019). In Leberzellen von Mäusen wurden bereits komplexe Netzwerke beobachtet, über die der Kontakt zwischen Peroxisomen, Mitochondrien und dem ER insbesondere während dem Abbau von Fettsäuren realisiert wird (Ilacqua *et al.*, 2022). Auch in Hefe wurden potenzielle *Triple Junctions* zwischen weiteren Organellen postuliert (Eisenberg-Bord *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2018; Hariri *et al.*, 2019).

Die strukturelle Charakterisierung des ERMES-Komplexes zeigte, dass stabile Lipid-transferierende Brücken zwischen dem ER und Mitochondrien entstehen (Wozyn *et al.*, 2023). Interessanterweise wurden auch Peroxisomen in der Nähe dieser Strukturen beobachtet und es gibt Hinweise auf eine mögliche Dimerisierung von ERMES-Komplexen (Wozny *et al.*, 2023). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass der ERMES-Komplex eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Kontaktstellen zwischen Peroxisomen, Mitochondrien und dem ER spielt.

Im Zusammenhang mit der Interaktion zwischen Peroxisomen, Mitochondrien und dem ER könnte Pex11 eine wichtige Rolle spielen. Neben der Interaktion mit Mdm34 (Mattiuzzi-Usaj *et al.*, 2015) ist Pex11 in *Hansenula polymorpha* gemeinsam mit Proteinen der Pex23-Familie an der Bildung von MCS zwischen Peroxisomen und dem ER beteiligt (Wu *et al.*, 2020).

Durch die Vielzahl redundanter Tether könnte eine hochdynamische Verbindung zwischen Peroxisomen, Mitochondrien und dem ER entstehen über die der Lipid- und Proteintransfer sowie der Austausch von Intermediaten reguliert werden. Diese spezielle Form der Kontaktausbildung könnte ein Schlüsselement für die Koordination komplexer zellulärer Prozesse unter spezifischen metabolischen Bedingungen darstellen.

4 Material und Methoden

4.1 Mikroorganismen, Materialien und Chemikalien

4.1.1 Verwendete Mikroorganismen

E. coli-Stämme

Für alle in dieser Arbeit mit *E. coli* durchgeführten Klonierungen wurde der Stamm Top10 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieser Stamm besitzt folgende genetische Marker: Top10 (Invitrogen) Marker: $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$

U. maydis-Stämme

Die folgende Tabelle listet alle hier verwendeten *U. maydis* Stämme auf. Alle unten genannten Stämme basieren auf dem Stamm Bub8 (Weinzierl *et al.*, 2002).

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *U. maydis*-Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
Bub8	<i>a2 b4</i>	-	Weinzierl <i>et al.</i> (2002)
Bub8 mCherry-SKL	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL</i>	Hyg	Freitag <i>et al.</i> (2012)
TSUM325	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL</i> <i>Um_ptc5-gfp-pt_{sptc5}</i>	Hyg, Nat	T. Stehlik
TSUM568	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL</i> $\Delta Um_ptc5 ip^R [Potef:Um_ptc5-gfp] ip^S$	Hyg, Nat, Cbx	T. Stehlik
TSUM569	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL</i> $\Delta Um_ptc5 ip^R [Potef:Um_ptc5-gfp-pt_{sptc5}] ip^S$	Hyg, Nat, Cbx	T. Stehlik
TSUM669	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL</i> $\Delta Um_ptc5 ip^R [Pum_ptc5:1-116-Um_ptc5-gfp-117-765-UM_ptc5] ip^S$	Hyg, Gent, Cbx	T. Stehlik

***S. cerevisiae*-Stämme**

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Stämme waren Derivate von BY4741 (Genotyp: *MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) oder BY4742 (Genotyp *MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0*) (Mortimer und Johnston, 1986; Euroscarf). Deletionsmutanten wurden jeweils in Triplikaten, zumindest aber in Duplikaten generiert und analysiert.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae* -Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al</i> (1998)
BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al</i> (1998)
Y10732	<i>impl::kanMX4</i>	Euroscarf
Y13319	<i>fzo1::kanMX4</i>	Euroscarf
YY22945	<i>tom22::kanMX4</i>	Euroscarf
YY2294	<i>tom70::kanMX4</i>	Euroscarf
YTS229	<i>impl::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA</i>	T. Stehlik
YTS230	<i>P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA</i>	T. Stehlik
YTS323	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i>	T. Stehlik
YTS324	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-PXP2-RFP-HA</i>	T. Stehlik
YTS325	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-PXP2-RFP-HA-PTS</i>	T. Stehlik
YTS327	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm10::hph</i> <i>P_{TEF1}-MSS2-RFP-HA-PTS</i>	T. Stehlik
YTS548	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph</i>	T. Stehlik
YTS364	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm10::hph</i>	T. Stehlik

YTS366	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm34::hph</i>	T. Stehlik
YTS370	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm10::hph</i> <i>P_{TEF1}-PXP2-RFP-HA-PTS</i>	T. Stehlik
YTS370	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm10::hph</i> <i>P_{TEF1}-MSS2-RFP-HA-PTS</i>	T. Stehlik
YTS373	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm10::hph</i> <i>P_{TEF1}-PTC5-RFP-PTS</i>	T. Stehlik
YTS378	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm34::hph</i> <i>P_{TEF1}-PTC5-RFP-PTS</i>	T. Stehlik
YTS385	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2</i> <i>pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}-</i> <i>T_{CYCI}-NAT</i>	T. Stehlik
YTS429	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph kanMX4-P_{GALI}-</i> <i>pex5</i>	T. Stehlik
YTS450	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 som1::hph</i>	T. Stehlik
MB4316	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph kanMX4-P_{GALI}-</i> <i>pex5 leu2::P_{TEF1}-ptc5^{ΔTM}-rfp-pts_{Ptc5}-T_{CYC}-HIS3</i>	T. Stehlik
YTS550	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mmm1::hph</i>	T. Stehlik
YTS551	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>leu2::P_{TEF1}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-T_{CYCI}-URA3</i>	T. Stehlik
YTS553	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>leu2::P_{TEF1}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-pex15³²⁷⁻³⁸³-</i> <i>T_{CYCI}-URA3</i>	T. Stehlik
YTS555	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm12::hph</i>	T. Stehlik
YTS557	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph pxp2-</i> <i>3xmyc::kanMX4</i>	T. Stehlik
YTS559	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph pxp2-3xmyc-</i> <i>pts_{Pxp2}::kanMX4</i>	T. Stehlik

YTS563	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph cat2-3xmyc-pts_{Cat2}::kanMX4</i>	T. Stehlik
YTS567	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph leu2::P_{TEF1}-cat2-3xmyc-pts_{Cat2}-T_{cyc}-HIS3</i>	T. Stehlik
YTS571	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph leu2::P_{TEF1}-pxp2-3xmyc-pts_{Pxp2}-T_{cyc}-HIS3</i>	T. Stehlik
YTS616	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 pex5::hph</i>	T. Stehlik
YTS675	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 pex5::hph P_{TEF1}-PXP2-RFP-HA</i>	T. Stehlik
YTS678	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 P_{TEF1}-TES1-RFP-HA-PTS</i>	T. Stehlik
YTS681	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 leu2::P_{TEF1}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-T_{CYCI}-URA3 mdm10::hph</i>	T. Stehlik
YTS685	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 leu2::P_{TEF1}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-T_{CYCI}-URA3 mdm34::hph</i>	T. Stehlik
YTS689	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 leu2::P_{TEF1}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-pex15³²⁷⁻³⁸³-T_{CYCI}-URA3 mdm10::hph</i>	T. Stehlik
YTS693	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 leu2::P_{TEF1}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-pex15³²⁷⁻³⁸³-T_{CYCI}-URA3 mdm34::hph</i>	T. Stehlik
YEB32	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 mdm10::hph P_{ADHI}-tagRFP-PTS_{PGK} (P. chrysogenum)</i>	diese Arbeit
YEB38	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 P_{ADHI}-tagRFP-PTS_{PGK} (P. chrysogenum)</i>	diese Arbeit
YEB81	<i>isu1-gfp::HIS3MX6</i>	Huh <i>et al</i> (2003)
YEB55	<i>isa2-gfp::HIS3MX6</i>	Huh <i>et al</i> (2003)
YEB67	<i>cyt1-gfp::HIS3MX6</i>	Huh <i>et al</i> (2003)
YEB73	<i>mrp20-gfp::HIS3MX6</i>	Huh <i>et al</i> (2003)

YEB78	<i>mrps17-gfp::HIS3MX6</i>	Huh <i>et al</i> (2003)
YEB173	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm10::hph</i> <i>P_{TEF1}-PTC5^{A1-83}-RFP-HA-PTS</i>	diese Arbeit
YEB174	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mmm1::hph</i> <i>P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA</i>	diese Arbeit
YEB175	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm10::hph</i> <i>P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA</i>	diese Arbeit
YEB176	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm12::hph</i> <i>P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA</i>	diese Arbeit
YEB177	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm34::hph</i> <i>P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA</i>	diese Arbeit
YEB178	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mmm1::hph</i> <i>P_{TEF1}-PTC5-RFP-HA-PTS</i>	diese Arbeit
YEB179	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm12::hph</i> <i>P_{TEF1}-PTC5-RFP-HA-PTS</i>	diese Arbeit
YEB192	<i>isu1-gfp::HIS3MX6 mdm10::URA3</i>	diese Arbeit
YEB180	<i>Isa2-gfp::HIS3MX6 mdm10::URA3</i>	diese Arbeit
YEB183	<i>cyt1-gfp::HIS3MX6 mdm10::URA3</i>	diese Arbeit
YEB186	<i>mrp20-gfp::HIS3MX6 mdm10::URA3</i>	diese Arbeit
YEB190	<i>mrps17-gfp::HIS3MX6 mdm10::URA3</i>	diese Arbeit
YEB209	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph cta1-3xmyc-</i> <i>pts_{Cta1}::kanMX4</i>	diese Arbeit
YEB222	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph tes1-3xmyc-</i> <i>pts_{Tes1}::kanMX4</i>	diese Arbeit

YEB320	<i>mmm1-mNeonGreen::hph</i>	diese Arbeit
YEB343	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>leu2::P_{TEFI}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-T_{CYCI}-URA3</i> <i>mdm10::hph P_{TEFI}-PXP2-RFP-HA-PTS</i>	diese Arbeit
YEB344	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>leu2::P_{TEFI}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-pex15³²⁷⁻³⁸³-</i> <i>T_{CYCI}-URA3 mdm10::hph P_{TEFI}-PXP2-RFP-</i> <i>HA-PTS</i>	diese Arbeit
YEB345	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>leu2::P_{TEFI}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-T_{CYCI}-URA3</i> <i>mdm34::hph P_{TEFI}-PXP2-RFP-HA-PTS</i>	diese Arbeit
YEB346	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>leu2::P_{TEFI}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-pex15³²⁷⁻³⁸³-</i> <i>T_{CYCI}-URA3 mdm34::hph</i> <i>P_{TEFI}-PXP2-RFP-HA-PTS</i>	diese Arbeit
YEB347	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>leu2::P_{TEFI}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-T_{CYCI}-URA3</i> <i>mdm10::hph</i> <i>P_{ADHI}-tagRFP-PTS_{PGK} (P. chrysogenum)</i>	diese Arbeit
YEB348	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>leu2::P_{TEFI}-Tom70¹⁻³⁰-proteinA-pex15³²⁷⁻³⁸³-</i> <i>T_{CYCI}-URA3 mdm10::hph</i> <i>P_{ADHI}-tagRFP-PTS_{PGK} (P. chrysogenum)</i>	diese Arbeit
YEB364	<i>mdm10::URA3</i>	diese Arbeit
YEB398	<i>URA3::P_{TDHI}-mCherry-PTS1 tim50-cfp::hph</i>	diese Arbeit
YEB426	<i>URA3::P_{TDHI}-mCherry-PTS1 mdm10::hph</i>	diese Arbeit
YEB530	<i>pex3-gfp::hph</i>	diese Arbeit
YEB532	<i>pex3-gfp::hph pex5::NAT</i>	diese Arbeit
YEB544	<i>pex3-gfp::hph mdm10::URA3</i>	diese Arbeit
YEB546	<i>pex3-gfp::hph pex5::NAT mdm10::URA3</i>	diese Arbeit

YEB552	<i>pex3-gfp::hph tim50-yoTagRFP::spHIS5</i>	diese Arbeit
YEB554	<i>pex3-gfp::hph tim50-yoTagRFP::spHIS5</i> <i>pex5::NAT</i>	diese Arbeit
YEB564	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2</i> <i>pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}-</i> <i>T_{CYC1}-NAT mdm10::kanMx4 his3::P_{TEF1}-</i> <i>Tom70¹⁻³⁰-proteinA-pex15³²⁷⁻³⁸³-T_{CYC1}-URA3</i>	diese Arbeit
YEB566	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2</i> <i>pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}-</i> <i>T_{CYC1}-NAT mdm10::kanMx4 his3::P_{TEF1}-</i> <i>Tom70¹⁻³⁰-proteinA-T_{CYC1}-URA3</i>	diese Arbeit
YEB647	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-RFP-HA-PTS_{Lys4}</i>	diese Arbeit
YEB648	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-RFP-HA-PTS_{Lys12}</i>	diese Arbeit
YEB686	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-LYS4-RFP-HA</i>	diese Arbeit
YEB688	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-LYS4-RFP-HA-PTS</i>	diese Arbeit
YEB690	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-LYS12-RFP-HA</i>	diese Arbeit
YEB692	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-LYS12-RFP-HA-PTS</i>	diese Arbeit
YEB713	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph LYS12-</i> <i>9xMyc::kanMX4</i>	diese Arbeit
YEB760	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::hph LYS12-9xMYC-</i> <i>PTS_{Lys12}::URA3::kanMX4</i>	diese Arbeit
YEB763	<i>ant1-yfp::hph tim50-cfp::NAT fzo1::kanMX4</i>	diese Arbeit
YEB764	<i>ant1-yfp::hph tim50-cfp::NAT</i> <i>tom22::kanMX4</i>	diese Arbeit
YEB765	<i>ant1-yfp::hph tim50-cfp::NAT</i> <i>tom70::kanMX4</i>	diese Arbeit
YEB766	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>P_{TEF1}-RFP-Pxp2</i>	diese Arbeit

YEB785	<i>URA3::P_{TDH1}-mCherry-PTS1</i>	diese Arbeit
YEB818	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2 pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}- T_{CYC1}-NAT pex34::kanMX4</i>	diese Arbeit
YEB836	<i>ant1-yfp::hph tim50-cfp::NAT fzo1::kanMX4 P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA</i>	diese Arbeit
YEB837	<i>ant1-yfp::hph tim50-cfp::NAT tom22::kanMX4 P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA</i>	diese Arbeit
YEB838	<i>ant1-yfp::hph tim50-cfp::NAT tom70::kanMX4 P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA</i>	diese Arbeit
YJH08	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2 pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}- T_{CYC1}-NAT pex5::kanMX4</i>	J. Harberding
YJH12	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2 pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}- T_{CYC1}-NAT gut1::kanMX4</i>	J. Harberding
YJH18	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2 pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}- T_{CYC1}-NAT som1::kanMX4</i>	J. Harberding
YJH19	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2 pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}- T_{CYC1}-NAT coq9::kanMX4</i>	J. Harberding
YJH20	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2 pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}- T_{CYC1}-NAT mdm10::kanMX4</i>	J. Harberding
YJH21	<i>Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2 pex3- gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-pts_{Ptc5}-T_{CYC1}- NAT imp1::kanMX4</i>	J. Harberding
YJH26	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 P_{TEF1}-TES1-RFP-HA-PTS</i>	J. Harberding
YJH34	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 P_{TEF1}-CAT2-RFP-HA-PTS</i>	J. Harberding
YJH35	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4 P_{TEF1}-CAT2-RFP-HA</i>	J. Harberding

YJH53	<i>can1Δ::P_{STE2}-spHIS5 lyp1Δ::P_{STE3}-LEU2</i> <i>pex3-gfp::hph leu2::P_{TEF1}-Ptc5-rfp-ptS_{Ptc5}-</i> <i>T_{CYC1}-NAT djp1::kanMX4</i>	J. Harberding
YJH102	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm10::hph</i> <i>P_{TEF1}-CAT2-RFP-HA-PTS</i>	J. Harberding
YJH106	<i>ant1-yfp::NAT tim50-cfp::kanMX4</i> <i>mdm10::hph</i> <i>P_{TEF1}-TES1-RFP-HA-PTS</i>	J. Harberding

4.1.2 Vektoren

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit entsprechender Referenz dargestellt.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Vektoren

Name	Genotyp	Herkunft
pJET1.2	<i>ori bla Eco47IR</i>	Thermo Fisher
pCT310	<i>HIS3 ARS/CEN P_{GALI}-YFP-p14^{D122Y}-TEV^{234STOP}</i>	Renicke <i>et al</i> (2013a)
pCT310-URA	<i>URA3 ARS/CEN P_{GALI}-YFP-p14^{D122Y}-TEV^{234STOP}</i>	T. Stehlik
pCT320	<i>pRS315 P_{ADHI}-tagRFP</i>	Renicke <i>et al</i> (2013b)
pYM4	<i>3xMyc KanMX4</i>	Janke <i>et al</i> (2004)
pKS133	<i>pFA6 hphNT1</i>	Janke <i>et al</i> (2004)
pKS134	<i>pFA6 NatNT2</i>	Janke <i>et al</i> (2004)
pYM25	<i>yeGFP hphNT1</i>	Janke <i>et al</i> (2004)
pYM18	<i>9xMyc KanMX4</i>	Janke <i>et al</i> (2004)
pYM30	<i>ECFP KanMX5</i>	Janke <i>et al</i> (2004)

pUG72	<i>pFA6 loxP-P_{kiURA3}-kiURA3-T_{kiURA3}-loxP</i>	Güldener <i>et al</i> (2002)
pJA48	<i>P_{ADHI}-tagRFP-PTS_{PGK} (P. chrysogenum) in pCT320</i>	Freitag <i>et al</i> (2012)
pMS151	<i>pFA6a mNeonGreen-hph</i>	M. Skruzny
pMS158	<i>pFA6a mTurquoise2-natNT2</i>	M. Skruzny
pJA512	<i>LEU2 HDEL-RFP</i>	J. Audhya
mtGFP	<i>LEU2 mt-GFP</i>	J. Nunnari
pCR124	<i>OriR bla yomTagRFP-T::spHIS5</i>	C. Renicke
pLND83	<i>URA3 P_{TDHI}-mCherry-PTS1</i>	L. Dimitrov
pTS72	<i>P_{TEF1}-PTC5-RFP-PTS in pCT310</i>	Stehlik <i>et al</i> (2020)
pTS97	<i>P_{TEF1}-PTC5¹⁻²⁰¹-RFP-HA in pCT310</i>	Stehlik <i>et al</i> (2020)
pTS252	<i>P_{TEF1}-PTC5^{Δ1-83}-RFP-PTS in pCT310</i>	Stehlik <i>et al</i> (2020)
pTS295	<i>P_{TEF1}-PXP2-RFP in pCT310</i>	Stehlik <i>et al</i> (2020)
pTS296	<i>P_{TEF1}-PXP2-RFP-HA-PTS in pCT310</i>	Stehlik <i>et al</i> (2020)
pTS310	<i>P_{TEF1}-MSS2-RFP-HA-PTS in pCT310</i>	T. Stehlik
pJH12	<i>P_{TEF1}-CAT2-RFP-HA in pCT310</i>	J. Harberding
pJH11	<i>P_{TEF1}-CAT2-RFP-HA-PTS in pCT310</i>	J. Harberding
pJH08	<i>P_{TEF1}-TES1-RFP-HA-PTS in pCT310</i>	J. Harberding
pTS332	<i>P_{TEF1}-PTC5-RFP-PTS-T_{CYCI}-NatNT2 in pJET1.2</i>	T. Stehlik
pTS378	<i>P_{TEF1}-TOM70¹⁻³⁰-ProteinA in pCT310-URA</i>	T. Stehlik
pTS379	<i>P_{TEF1}-TOM70¹⁻³⁰-ProteinA-PEX15³²⁷⁻³⁸³ in pCT310-URA</i>	T. Stehlik

pTS392	<i>P_{TEF1}-CAT2-3xMyc -PTS in pCT310</i>	T. Stehlik
pTS393	<i>P_{TEF1}-PXP2-3xMyc -PTS in pCT310</i>	T. Stehlik
pEB84	<i>P_{TEF1}-LYS4-RFP-HA-PTS in pCT310</i>	diese Arbeit
pEB85	<i>P_{TEF1}-LYS4-RFP-HA in pCT310</i>	diese Arbeit
pEB86	<i>P_{TEF1}-LYS12-RFP-HA-PTS in pCT310</i>	diese Arbeit
pEB87	<i>P_{TEF1}-LYS12-RFP-HA in pCT310</i>	diese Arbeit
pEB89	<i>P_{TEF1}-RFP-HA-PTS_{Lys4} in pCT310</i>	diese Arbeit
pEB90	<i>P_{TEF1}-RFP-HA-PTS_{Lys12} in pCT310</i>	diese Arbeit
pEB105	<i>P_{TEF1}-RFP-Pxp2 in pCT310</i>	diese Arbeit

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit hergestellte Plasmide aufgelistet.

pEB84: P_{TEF1}-LYS4-RFP-HA-PTS

Dieses Plasmid enthält den ORF von *lys4* gefolgt von *tagRFP-HA-PTS_{Lys4}*. Zur Herstellung wurde *lys4* mit MK274 und MK275 und *tagRFP* mit MK276 und MM419 amplifiziert. Der Primer MM419 enthält die Sequenz des PTS1 von *lys4*. Gleichzeitig wurden Überhänge für eine Gibson Assembly eingefügt. Das Plasmid pJH11 wurde mit BamHI und XhoI verdaut. Der geschnittene Vektor und die amplifizierten Fragmente wurden mittels Gibson Assembly zusammengefügt. Die Amplifizierung erfolgte in *E. coli*. Das Plasmid wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

pEB85: P_{TEF1}-LYS4-RFP-HA

Dieses Plasmid enthält den ORF von *lys4* gefolgt von *tagRFP-HA*. Zur Herstellung wurde *lys4* mit MK274 und MK275 und *tagRFP* mit MK276 und MM420 amplifiziert. Gleichzeitig wurden Überhänge für eine Gibson Assembly eingefügt. Das Plasmid pJH11 wurde mit BamHI und XhoI verdaut. Der geschnittene Vektor und die amplifizierten Fragmente wurden mittels Gibson Assembly zusammengefügt. Die Amplifizierung erfolgte in *E. coli*. Das Plasmid wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

pEB86: P_{TEF1}-LYS12-RFP-HA-PTS

Dieses Plasmid enthält den ORF von *lys12* gefolgt von *tagRFP-HA-PTS_{Lys12}*. Zur Herstellung *lys4* mit MK278 und MK279 und *tagRFP* mit MK276 und MM421 amplifiziert. Der Primer MM421 enthält die Sequenz des PTS1 von *lys12*. Gleichzeitig wurden Überhänge für eine Gibson Assembly eingefügt. Das Plasmid pJH11 wurde mit BamHI und XhoI verdaut. Der geschnittene Vektor und die amplifizierten Fragmente wurden mittels Gibson Assembly zusammengefügt. Die Amplifizierung erfolgte in *E. coli*. Das Plasmid wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

pEB87: P_{TEF1}-LYS12-RFP-HA

Dieses Plasmid enthält den ORF von *lys12* gefolgt von *tagRFP-HA*. Zur Herstellung wurde *lys4* mit MK278 und MK279 und *tagRFP* mit MK276 und MM420 mit amplifiziert. Gleichzeitig wurden Überhänge für eine Gibson Assembly eingefügt. Das Plasmid pJH11 wurde mit BamHI und XhoI verdaut. Der geschnittene Vektor und die amplifizierten Fragmente wurden mittels Gibson Assembly zusammengefügt. Die Amplifizierung erfolgte in *E. coli*. Das Plasmid wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

pEB89: P_{TEF1}- RFP-HA-PTS_{Lys4}

Dieses Plasmid enthält den ORF von *tagRFP-HA* mit dem PTS1 von *lys4*. Zur Herstellung wurde *tagRFP* mit MM422 und MM419 amplifiziert. Der Primer MM419 enthält die Sequenz des PTS1 von *lys4*. Gleichzeitig wurden Überhänge für eine Gibson Assembly eingefügt. Das Plasmid pJH11 wurde mit BamHI und XhoI verdaut. Der geschnittene Vektor und die amplifizierten Fragmente wurden mittels Gibson Assembly zusammengefügt. Die Amplifizierung erfolgte in *E. coli*. Das Plasmid wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

pEB90: P_{TEF1}- RFP-HA-PTS_{Lys12}

Dieses Plasmid enthält den ORF von *tagRFP-HA* mit dem PTS1 von *lys12*. Zur Herstellung wurde *tagRFP* mit MM422 und MM421 amplifiziert. Der Primer MM421 enthält die Sequenz des PTS1 von *lys12*. Gleichzeitig wurden Überhänge für eine Gibson Assembly eingefügt. Das Plasmid pJH11 wurde mit BamHI und XhoI verdaut. Der geschnittene Vektor und die amplifizierten Fragmente wurden mittels Gibson Assembly zusammengefügt. Die Amplifizierung erfolgte in *E. coli*. Das Plasmid wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

pEB105: P_{TEF1}- RFP-Pxp2

Dieses Plasmid enthält den ORF von *tagRFP-HA* gefolgt von *pxp2*. Zur Herstellung wurde *tagRFP* mit MM553 und MM554 und *pxp2* mit MM555 und MM556 amplifiziert. Gleichzeitig wurden Überhänge für eine Gibson Assembly eingefügt. Das Plasmid pJH11 wurde mit BamHI und XhoI verdaut. Der geschnittene Vektor und die amplifizierten Fragmente wurden mittels Gibson Assembly zusammengefügt. Die Amplifizierung erfolgte in *E. coli*. Das Plasmid wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

4.1.3 Oligonukleotide (Primer)

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und deren Verwendung aufgelistet. Sie wurden von der Firma ‚Sigma-Aldrich Biotechnology, L.P. Und Sigma-Aldrich Co.‘ synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils in 5‘ nach 3‘-Richtung angegeben.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
MJ484	atgattacgccaagcgcgcaattaa ccctcactaaaggaacaaaagct ggatccccacacacccatagc	Amplifikation des <i>TEF1</i> Promotors mit Überhang zu pCT310
MK273	ggatcctttgtaattaaacttagatt agattgctatgc	
ML468	ttatattgactttcgtgtacattgatca catcgactgttctattcggctcctatgt tgtgtgg	Amplifikation von Integrationskassetten basierend auf pCT310 zur Integration in den <i>leu2</i> -Lokus von S288C
ML593	cctttacatcctccttttctccttctgat aaatgtatgtagattgcgtaactatg cggcatcagagc	
ML754	aagaatataactaaaaatgagcag gcaagataaacgaaggcaaagg cgttggccgattcattaatg	Amplifikation von Integrationskassetten basierend auf pCT310 zur Integration in den <i>his3</i> -Lokus von S288C
ML755	acatgtatatatcgtatgctgcagc ttaaataatcgggtgcataactatgc ggcatcagagc	
ML121	tatacggttaggaaaaagacacgaa cagagaagaccgatcttgatgcgta cgctgcaggctcgac	S1 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>mdm10</i>
ML122	taacctgtatattaaacctttattttat ttcacattactcatcaatcgatgaatt cgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>mdm10</i>
ML095	tgcaaaataaccctatggagg	Forward Primer zur Verifikation von <i>mdm10</i> -Knockouts

ML399	taacggtgaaacagatcataagct ggcttcaactaatccaaatgcgtac gctgcaggctgac	S1 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>mdm12</i>
ML400	gttttttatgtagacactatttcaaac tatctttgtaaattaatcgatgaattc gagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>mdm12</i>
ML096	atacgtatgatcagtatctttacagg	Forward Primer zur Verifikation von <i>mdm12</i> - Knockouts
ML134	tataacaaaaaaaaacacaactgca agaaactcagcatcgcgatgcgta cgctgcaggctgac	S1 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>mdm34</i>
ML135	gtatgtattgtgtagttatgtactaga tatgtaacttaattaatcgatgaattc gagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>mdm34</i>
ML141	cagataaacgatgcaatcagg	Forward Primer zur Verifikation von <i>mdm34</i> - Knockouts
ML132	ctttgagagagtcaatataaacctg tagcctttttctgaaatgcgtacgct gcaggctgac	S1 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>mmm1</i>
ML133	aagataggaaaagatagaacaa aaaattgtacataaatattaatcga tgaattcgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>mmm1</i>
ML987	tggccacgtagtaaaaatcagaga gaagaaaagcctacagagttacgt acgctgcaggctgac	S3 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>mmm1</i>
ML101	aaaatcggaatctggaattacg	Forward Primer zur Verifikation von <i>mmm1</i> - Knockouts
Ant1_S3	tctttttcctaaagcacaacggaca acgcaagctggcttccactcgtacg ctgcaggctgac	S3 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>ant1</i>
Ant1_S2	tgagaatccttactattactgaaata agcacattgcgtttagaatatcgatg aattcgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>ant1</i>
MJ789	acgccttattgaagaggaaaaga aaaagaagaagattgctgaatcca aacgtacgctgcaggctgac	S3 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>tim50</i>
MJ790	tacacacatagatacgtagatacat gagaagagggtttacatgaaaatta atcgatgaattcgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>tim50</i>
MK723	gtatacagcaacttggcgtctccag ctcgttttcctcaagcctcgtacgctg caggctgac	S3 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>pex3</i>
MK724	tatatatatattctggtgtgagtgctcag tacttattcagagattaatcgatgaat tcgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>pex3</i>
MK230	tcctatTTTTGGATATATACATCAAT AAACAATATATACAACATGCGT ACGCTGCAGGCTGAC	S1 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>pex5</i>
MK231	atgaatttgggcagtgatgcgagaa cataaaattgcggagaacccatcatca atcgatgaattcgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>pex5</i>

MK235	gagccattttgcttgatgg	Forward Primer zur Verifikation von <i>pex5</i> -Knockouts
MK653	aaagaggagatgaataaaagtaa aggaagaagaaaagaaagttgac gtacgctgcaggctgac	S1 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>pex34</i>
MK652	ttgaaggagctgggcttacagaact aaattcgttcaagcataaaaatcga tgaattcgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>pex34</i>
MK645	gactgttgatgtgtctgc	Forward Primer zur Verifikation von <i>mdm34</i> -Knockouts
ML630	catatattatgagcataacgagtg ccgatcggcaaaggggcttaacg atgaattcgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>pxp2</i>
ML663	tctcagtgtgtgggttagttgaaa tctggtgtttaaattgcgtacgctg caggctgac	S3 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>pxp2</i>
MM500	gtcactcattcattatttattcgtttctat tttctattatagcttaacgatgaat tcgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>lys12</i>
MM501	gtggaaggcttactcaacaagtc gttgacgacgtttgcgagattacgt acgctgcaggctgac	S3 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer für <i>lys12</i>
MM551	gaacaaaaattaatctcagaagaa gactgaacggatccactagcactc aacaagtcgttgacgacgtttgctg agattatgacgtacgctgcaggctg ac	S1 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer angepasst für die Insertion des <i>PTS_{Lys12}</i> am endogenen Locus
MM552	ccttaattaacccgggatctctga atgatcgtccacttttaacgatgaa ttcgagctcg	S2 (Janke <i>et al</i> (2004)) Primer angepasst für die Insertion des <i>PTS_{Lys12}</i> am endogenen Locus
MM553	caatctaactaagtttaattacaaa ggatccatgtctgaattaattaaga aatatgc	Amplifikation von <i>tagRFP-HA</i> mit Überhängen zu P_{TEF1}
MM554	Cgcatagtcaggaacatcgt	
MM555	gtgacataactaattacatgactcga gttacaattttacaacaccagatttc	Amplifikation von <i>pxp2</i> mit Überhängen zu <i>HA</i> und pCT310
MM556	cccatacgatgttctgactatgcca tgaaccagataactaatgc	
MK274	aagaaagcatagcaatctaacta agtttaattacaaggatccatgct acgatcaaccacatttac	Amplifikation von <i>lys4</i> mit Überhängen zu P_{TEF1} und <i>tagRFP-HA</i>
MK275	catatataattcatatgcatatttcttt aattaattcagacattagttggattt gaccaacc	
MK276	atgtctgaattaattaagaaaatat gcatatg	Amplifikation von <i>tagRFP-HA</i>

MK278	aagaaagcatagcaatcta agtttaattacaaggatccatg agatctgttgctactagattatc	Primer zur Amplifikation von <i>lys12</i> mit Überhängen zu P_{TEF1} und <i>tagRFP-HA</i>
MK279	catatataatttcattatgcatatttctt aattaattcagacattaatctcgaca aaacgctgctc	
MM419	gtgacataactaattacatgactcga gctataatctcgacaaaacgctgctc aacgactgttgagtcgcatagtcag gaacatcg	Amplifikation von <i>tagRFP-HA</i> mit $PTS1_{Lys4}$ mit Überhängen zu pCT310; Für-Primer: MK276
MM420	gtgacataactaattacatgactcga gtcagcgcgatagtcaggaacatcg	Amplifikation von <i>tagRFP-HA</i> mit Überhängen zu pCT310; Für-Primer: MK276
MM421	gtgacataactaattacatgactcga ggtatagttgggattgacccaacctt ccaagcctccttcgcatagtcagg aacatcg	Amplifikation von <i>tagRFP-HA</i> mit $PTS1_{Lys12}$ mit Überhängen zu pCT310; Für-Primer: MK276
MM422	caatctaactaagtttaattaca ggatccatgtctgaattaattaaga aaatag	Amplifikation von <i>tagRFP-HA</i> mit Überhängen zu P_{TEF1}

4.1.4 Labormaterialien und Geräte

Spezielle Geräte für bestimmte Methoden sind in der jeweiligen Methodenbeschreibung aufgeführt. Zur Zentrifugation von Reaktionsgefäßen (1,5 und 2 ml) diente eine Heraeus Biofuge pico und der Zentrifugation größerer Reaktionsgefäße (15 und 50 ml) eine Heraeus Multifuge. Der Erwärmung von Reaktionsgefäßen auf eine definierte Temperatur dienten Thermomixer (Eppendorf, Hamburg).

Weitere allgemeinen Materialien sind mit ihren Bezugsquellen untenstehend gelistet:

Blottingpapier (Roth)

Cryo-Röhrchen (Sarstedt)

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml; Sarstedt)

Kunststoff-Küvetten (Sarstedt)

Petrischalen (Sarstedt)

Pipettenspitzen (Sarstedt)

PVDF-Membran (Roth)

Sterile Spritzen und Kanülen (Braun)

Sterilfilter (Sarstedt)

4.1.5 Kits

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Fertigkits

Kit	Bezugsquelle	Verwendung
ZR Plasmid Miniprep-Classic Kit	<i>Zymo Research</i> (Kalifornien, USA)	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>
Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit	Geneaid (Hamburg)	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

4.1.6 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden vornehmlich von Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und waren von der Qualität überwiegend p.a..

4.1.7 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von Fermentas/Thermo Scientific (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB; Frankfurt) bezogen. Für die DNA-Amplifikation kamen die Polymerasen Phusion Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes/NEB, Frankfurt), oder die KOD Extreme Polymerase (Novagen/Merck, Darmstadt) zum Einsatz. Der enzymatische Abbau von RNA bzw. DNA erfolgte unter Verwendung von RNase A von AppliChem (Gatersleben). Für den Gibson-Mix wurde die T4 DNA Ligase (Roche; Mannheim) verwendet. Bakterielle Zellwände wurden mit Lysozym (Roche) degradiert. Für den Abbau der Zellwände von *U. maydis* wurden Lysing enzymes aus *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) und für die Zellwände von *S. cerevisiae* wurde Lyticase (Sigma-Aldrich) eingesetzt.

4.1.8 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Standardlösungen und Puffer wurden nach Sambrook *et. al.*, 1989 hergestellt. Die benötigten Puffer für die einzelnen Methoden sind in der Beschreibung der Methoden aufgeführt. Falls erforderlich wurden die Puffer, Lösungen und Nährmedien vor ihrer Verwendung in einem Autoklav bei 121°C für 20 min autoklaviert oder mit Hilfe eines Sterilfilters sterilisiert.

4.1.9 Antibiotika

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotika	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg / ml
Geneticin (G418)	200 - 400 µg / ml
Hygromycin B	200 - 300 µg / ml
Nourseothricin	150 µg / ml

4.2 Kultivierung von Mikroorganismen

4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde als Flüssigkultur in autoklaviertem dYT-Medium bei 37°C angezogen. Falls nötig, wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Zur Kultivierung auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet. Zur Selektion auf positive Transformanden wurde dem Agar 100µg/ml Ampicillin zugegeben. Zur Lagerung wurden dichtgewachsene *E. coli*-Kulturen in dYT-Glycerin (50:50) gemischt und bei -80°C eingefroren.

dYT-Flüssigmedium

16 g/l Trypton

10 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCL

falls erforderlich: 100 µg/ml Ampicillin

dYT- Glycerin

dYT-Medium

80% (v/v) 87% Glycerin

dYT-Agar

dYT mit 2,0 % (w/v) Agar

falls erforderlich: 100 µg/ml Ampicillin

4.2.2 Kultivierung von *U. maydis*

Die Kultivierung von *U. maydis* erfolgte in YEPS-light Flüssigmedium auf einem Schüttler bei 200 Upm und 30°C. Für Medien mit bestimmten Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen wurden YNB-Medium die entsprechenden Zusatzstoffe beigemischt. Zur Kultivierung auf Festmedien wurde Potato-Dextrose (PD)-Agar sowie Regenerationsagar-light verwendet. Den Festmedien wurden gegebenenfalls das Antibiotikum Carboxin (2 µg/ml) zugegeben. Die dauerhafte Lagerung von *U. maydis*-Kulturen erfolgte unter Zugabe von 50% NSY-Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur bei -80°C. Falls nicht anders angegeben, wurden Kulturen aus logarithmischen Wachstumsphase mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,7 bis 1 verwendet.

YEPS-light Flüssigmedium

10 g/l Hefeextrakt

4 g/l Pepton

0,4 % (w/v) Saccharose

YNB-Medium

1,7 g/l Yeast Nitrogen Base

0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat

Zusätze:

1,0 % (w/v) Glukose oder/und

0,1% (v/v) Ölsäure

0,05% (v/v) Tween40

PD-Agar

24 g/l Potato-Dextrose Broth

2,0 % (w/v) Agar

NSY-Glycerin

0,8 % (w/v) Nutrient Broth

0,1 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) Sucrose

80% (v/v) 87% Glycerin

4.2.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte in YPD- oder SC-Medium mit entsprechendem Selektionsdruck auf einem Schüttler bei 180 Upm und 30°C. Die dauerhafte Lagerung erfolgte unter Zugabe von 50% NSY-Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur bei -80°C. Falls nicht anders angegeben, wurden Kulturen aus logarithmischen Wachstumsphasen mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,7 bis 1 verwendet.

YPD-Medium

2% (w/v) Pepton

1% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Glucose (nach dem Autoklavieren)

in H₂O_{bid}: pH 6,0

Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar

SC-Medium

0,17% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o Aminosäuren

0,2% (w/v) Ammoniumsulfat

2% (w/v) Glucose (nach dem Autoklavieren)

0,0147% (w/v) Dropout-Mix aus:

2 g	L-Adenin,
2 g	L-Alanin,
0,2 g	p-Aminobenzoesäure,
2 g	L-Arginin,
2 g	L-Asparaginsäure,
2 g	L-Asparagin,
2 g	L-Cystein,
2 g	L-Glutaminsäure,
2 g	L-Glutamin,
2 g	L-Glycin,
2 g	Inositol,
2 g	L-Isoleucin,
2 g	L-Lysin,
2 g	L-Phenylalanin,
2 g	L-Prolin,
2 g	L-Serin,
2 g	L-Tryptophan,
2 g	L-Threonin,
2 g	L-Valin

Folgende Aminosäuren wurde dem Medium nach dem Autoklavieren in Lösung zugegeben:

0,04% (w/v)	L-Histidin
0,08% (w/v)	L-Leucin
0,04% (w/v)	Uracil

je nach Selektionsbedingung wurden einzelne dieser Komponenten nicht zugesetzt

in H₂O_{bid}: pH 6,0

Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch-kompetenter Top10-*E. coli*-Zellen erfolgte nach der Methode nach Hanahan *et al.*, 1991. Die Zellen wurden zunächst in magnesiumfreien SOB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,3 bis 0,4 angezogen. Danach wurden die Zellen in eiskalte 50 ml Falcon-tubes überführt und zentrifugiert (4000 Upm, 10 min, 4°C). Die sedimentierten Zellen wurden in 20 ml eiskaltem CCMB80-Puffer resuspendiert und für 20 min in einem Eis-Wasserbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 Upm, 10 min, 4°C) wurden die sedimentierten Zellen in 4ml CCMB80-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

SOB-Medium

20 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

CCMB80-Puffer

10 mM KAc pH 7,0

80 mM CaCl₂

20 mM MnCl₂

10 mM MgCl₂

10 % Glycerin

in H₂O_{bid}: pH 6,4 mit 0,1 M HCl einstellen und steril filtrieren

Zur Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde 20 µl eines Gibsonreaktionsansatzes oder 1 µl einer Plasmidlösung mit einem Aliquot (ca. 50µl) chemisch-kompetenter Zellen gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1 min bei 42°C wurden die Zellen 2 min lang auf Eis abgekühlt. Der Transformationsansatz wurde dann auf Selektivmediumplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.3.2 Transformation von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 in YEPD kultiviert. Es wurden die Zellen einer 20 ml Kultur geerntet (3.000 Upm, 5 min). Anschließend wurden die Zellen in 15 ml SORB äquilibriert, erneut abzentrifugiert und in 180 µl SORB aufgenommen. Dann wurden 20 µl einer denaturierten DNA-Lösung (10 mg/ml *salmon sperm* DNA) zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden direkt transformiert oder bei 80°C mehrere Monate aufbewahrt.

SORB

100 mM Lithium-Acetat

1 mM Na₂-EDTA

1 M Sorbitol

10 mM Tris-HCl, pH 8,8

in H₂O_{bid}: pH 8,0 und steril filtrieren

Li-PEG

100 mM Lithium-Acetat

1 mM Na₂-EDTA

40% PEG3350

in 10 mM Tris-HCl, pH 8,8

in H₂O_{bid}: pH 8,0 und steril filtrieren

Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen mit bis zu 10 µl Plasmid-Lösung (etwa 1 µg DNA) und 200 µl Li-PEG für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 15-30 min bei 42°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (2.000 Upm, 3 min). Bei Selektion durch Auxotrophie wurden die Zellen in H₂O_{bid} resuspendiert und auf entsprechendes SC-Selektionsmedium ausplattiert. Für eine Antibiotika-vermittelte Selektion wurden die Zellen in 1 ml YPD resuspendiert und nach mindestens vierständiger Inkubation bei 30°C wurde auf YPD-Medium mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten zwei bis vier Tage bei 30°C inkubiert. Genomische Integrationsereignisse wurden durch PCR-Analyse verifiziert.

4.3.3 Synthetic Genetic Array (SGA)

Die Generierung von Hefe-Bibliotheken zur Identifizierung von Faktoren der peroxisomalen Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS erfolgte in Kooperation mit Thorsten Stehlik, Einat Zalckvar und Maya Schuldiner am Weizmann-Institut für Wissenschaften in Rehovot.

Ein SGA-kompatibler Reporterstamm (YTS385) wurde automatisiert in eine Deletionsbibliothek (Giaever *et al.*, 2002) und die DAmP-Bibliothek (Breslow *et al.*, 2008) eingekreuzt. Hefemanipulationen für den Hochdurchsatzscreen wurden auf einem RoToR Bench-Top-Kolonie-Arrayer (Singer Instruments) durchgeführt. Die Kreuzungen fanden auf Vollmedium (YPD) statt, die Auswahl von diploiden Zellen erfolgte auf SD-Mononatriumglutamat (MSG)-Platten, die Geneticin (Formedium, 500 µg ml⁻¹), Nourseothricin (WERNER BioAgents "ClonNat", 200 µg ml⁻¹) und Hygromycin B (Formedium, 500 µg ml⁻¹) enthielten. Nach der Übertragung der Zellen auf Platten mit stickstoffarmem Medium wurde die Sporulation für 7 Tage induziert. Haploide Zellen mit den gewünschten Mutationen wurden selektioniert, indem die Zellen auf SD MSG-Platten mit Geneticin, Nourseothricin und Hygromycin B übertragen wurden. Die Platten enthielten außerdem die toxischen Aminosäurederivate Canavanin und Thialysin (Sigma-Aldrich), um gegen verbleibende diploide Zellen zu selektieren.

4.3.4 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen können aufgrund ihrer Schnittstellen-Spezifität dazu benutzt werden, einen Vektor zu analysieren. Für solche Analysen wurde zunächst die einzusetzende Menge des jeweiligen Enzyms berechnet:

$$\text{Enzymmenge für } 1 \mu\text{g DNA} = \frac{\text{Größe von } \lambda \times \text{Schnittstellen im Vektor}}{\text{Größe des Plasmids (kb)} \times \text{Schnittstellen in } \lambda}$$

Eine Einheit (U) schneidet 1 µg λ-DNA bei 37°C in einer Stunde vollständig. Die verwendeten Enzyme lagen in der Regel in einer Konzentration von 10 U/µl vor. Um eine Restriktion durchführen zu können, benötigt man außerdem einen für das Enzym spezifischen Puffer (10x), der dem Ansatz zugefügt werden musste. Das Volumen des Restriktionsansatzes war abhängig von der eingesetzten Menge an DNA.

4.3.5 Gibson Assembly

Die Gibson-Assembly ermöglicht die Fusion von mehreren DNA-Fragmenten, unabhängig von der Sequenz oder Länge der Fragmente (Gibson *et al.*, 2009). Grundsätzlich finden drei enzymatische Vorgänge statt: Im ersten Schritt verdaut die T5-Exonuklease die DNA-Fragmente und führt zu einzelsträngigen 3'-Überhängen. Diese ermöglichen das Annealing von Fragmenten mit komplementären Sequenzbereichen. Im zweiten Schritt füllt die Phusion-DNA-Polymerase die Lücken zwischen den zusammengefügt Fragmenten auf. Im dritten und letzten Schritt verbindet die Taq-DNA-Ligase die freien 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen der einzelnen Basen und fügt so die Fragmente zusammen.

Für eine Gibson-Assembly-Reaktion wurden die entsprechenden Produkte in äquimolaren Mengen einem Ansatz von 5 µl zusammengefügt und zu 15 µl des 1,33x-konzentrierten Gibson-Assembly-Mastermix gegeben. Die Reaktion erfolgte für 60 Minuten bei 50°C.

Gibson-Assembly-Mastermix

5x Isothermaler Reaktionspuffer

10 U/µl T5 Exonuklease

2 U/µl Phusion-DNA-Polymerase

40 U/µl Taq-DNA-Ligase

H₂O_{bid} ad 1,2 ml

Ansatz für eine Reaktion

15 µl Gibson-Assembly-Mix (1,33x)

1-4 µl zu inserierendes DNA-Fragment, bei Bedarf mehrere unterschiedliche Fragmente

1 µl verdauter Vektor

H₂O_{bid} ad 20 µl

4.3.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde anhand des Vergleiches mit einem Mengenstandard (λ-DNA in definierter Konzentration, 50 bzw. 100 ng DNA) im Agarosegel unter UV-Licht abgeschätzt.

4.3.7 DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Plasmiden erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) und wurde von der Firma MWG Eurofinns durchgeführt, indem die entsprechenden Fragmente im folgenden Ansatz eingeschickt wurden:

5 µl DNA des Fragments/Plasmids

2 µl forward oder reverse Primer

10 µl H₂O

4.3.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt (Sharp *et al.* 1973). Hierbei wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Die Agarosekonzentration der verwendeten Gele lag in der Regel bei 1,0%. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die jeweilige Menge an Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt. Das flüssige Gel wurde in eine etwa 1 cm hohe Gelform (Maße 10 x 12 cm) mit eingestecktem Kamm gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Kamm gezogen und das feste Agarosegel in eine dafür vorgesehene Gelkammer transferiert und mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Die DNA wurde in Auftragspuffer aufgenommen und auf der Kathodenseite in die Taschen des Gels geladen. Bei einer Stromstärke von 120 mA bzw. 130 V wurde die DNA der Größe nach aufgetrennt. Als Größenstandard diente der GenerulerTM DNA-Ladder-Mix der Firma Fermentas. Die DNA-Banden wurden nach Abschluss der Elektrophorese durch UV-Licht (304 nm) sichtbar gemacht und fotografiert (Geldokumentationssystem: GelDoc-EZ Imager, BioRad, München).

50x TAE-Puffer

2 M Tris-Base

2 M Acetat

50 mM EDTA

in H₂O_{bid}

Als Auftragspuffer wurde der 6x-Ladepuffer der Firma Fermentas benutzt.

4.3.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion (Mullis *et al.* 1986; Bell, 1989) ist eine Methode, die zur Amplifikation von spezifischen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten eingesetzt wird. Durch den Einsatz einer thermostabilen Polymerase werden mit Hilfe von Primern (Oligonukleotide) und dNTPs spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. In dieser Arbeit wurde die Phusion-DNA-Polymerase benutzt. Dieses hitzestabile Enzym besteht aus einer DNA-Bindedomäne, die mit einer *Pyrococcus*-ähnlichen Proofreading-Polymerase fusioniert wurde. Die PCR-Reaktion läuft in vier charakteristischen Schritten ab. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 98°C denaturiert und in einzelsträngige DNA überführt. Im darauffolgenden Schritt, dem Annealing, binden die spezifischen PCR-Primer bei einer Temperatur zwischen 50 bis 65°C an die einzelsträngige DNA. Es folgt die Elongation, bei der die Polymerase bei 72°C, ausgehend von dem Primer und der Matrizen-DNA, neue, komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Durch eine erneute Denaturierung der DNA bei 98°C beginnt der PCR-Zyklus von vorne. Nach Abschluss jedes Zyklus wird die Ziel-DNA vervielfacht, wodurch sich bei einer großen Anzahl an Zyklen bereits aus wenigen Mengen Gesamt-DNA eine erhebliche Menge Ziel-DNA synthetisieren lässt. Standard-PCRs mit der Phusion-Polymerase wurden in einem Endvolumen von 50 µl angesetzt (Bestandteile siehe unten). Die Parameter der Annealing-Temperatur und der Elongationszeit sind variabel und können je nach Primer und Größe der zu amplifizierenden DNA verändert werden. PCR-Reaktionen wurden in einem TPpersonel Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Phusion-Polymerase

1 ng - 300 ng Matrizen-DNA

250 µM dNTPs (1:1:1:1 Verhältnis)

1 µM Oligonukleotid forward

1 µM Oligonukleotid reverse

1 x konzentrierter Phusion GC-Puffer (Finnzymes)

0,5 U Phusion-Polymerase

Programm: 98°C/1 min – (98°C/30 s - 50-65°C/15 s - 72°C/ x min) x 32 - 72°C/5 min (Ansatz zwischen 20 und 50 µl)

KOD Extreme Polymerase

1 ng - 300 ng Matrizen-DNA
 250 µM dNTPs (1:1:1:1 Verhältnis)
 1 µM Oligonukleotid 1
 1 µM Oligonukleotid 2
 1 x konzentrierter KOD-Puffer (Novagen)
 1 U KOD-Extreme Polymerase

Programm: 94°C/2 min – (94°C/30 s - 50-65°C/15 s - 68°C/x min) x 32- 68°C/10 min

4.3.10 Exzision von Agarose-Gel-Fragmenten

Zur Isolation spezifischer Fragmente aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA mithilfe des „Gel/PCR Fragment Extraktions-Kit“ der Firma Geneaid den Herstellerangaben entsprechend extrahiert.

4.4 Biochemische Methoden**4.4.1 Präparation von Proteinen**

Die Proteinextrakte aus *S. cerevisiae* wurden nach Kushnirov (2000) hergestellt. Dabei wurde die benötigte Menge Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur abzentrifugiert (13000 U/min, 1 min), in 200 µl einer Lösung vom 0,1 M Natriumhydroxid resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Pelletierung der Zellen, und einer Denaturierung bei 95°C für 5 min in Gegenwart von SDS-Probenpuffer (Zellmaterial äquivalent zu 2 OD₆₀₀ pro 25 µl SDS-Probenpuffer). Die Zellrückstände wurden durch Zentrifugation (13000 Upm, 1 min) pelletiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

SDS-Probenpuffer

2% (w/v) SDS
 6% (v/v) Glycerin
 0.025% (w/v) Bromphenolblau
 50 mM Dithiothreitol in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8

4.4.2 Auftrennung von Proteinen mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) angewandt. Hierbei erhalten Proteine durch Bindung an SDS eine negative Ladung und können dadurch in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Gele bestanden aus zwei Schichten. Die untere Schicht stellt das Trenngel dar, welches die Proteine nach ihrer jeweiligen Molekülgröße auftrennt. Bei der oberen Schicht handelte es sich um das Sammelgel, in dem die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel konzentriert waren. Das fertige Gel wurde in eine Gelkammer (Mini Protean System; Bio-Rad) gesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer befüllt. Die Molekülmassen der aufgetragenen Proteine wurden mit Hilfe des Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Science) bestimmt. Die Auftrennung erfolgte bei 20 - 25 mA pro Gel.

SDS-Laufpuffer

200 mM Glycin

0,2 % w/v) SDS

in 25 mM Tris-HCl, pH 8,8

Sammelgel

5 % (v/v) Acrylamid

0,1 % (w/v) SDS

in 125 mM Tris-HCl pH 6,8

0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

0,05 % (v/v) TEMED

Trenngel

8 bis 10 % (v/v) Acrylamid

0,1 % (w/v) SDS

in 375 mM Tris-HCl pH 8,8

0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

0,05 % (v/v) TEMED

4.4.3 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Die im Gel aufgetragenen Proteine wurden mithilfe des Wet-Transfer-System (Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Aktivierung wurde die Membran kurz in Methanol gelegt. Das Gel wurde möglichst luftblasenfrei auf die Membran gelegt und anschließend mit je drei in Western-Transfer-Puffer getränkten Whatman-Papieren oben und unten beschichtet und zwischen ebenfalls in Transfer-Puffer getränkte Schwämme gelegt. Der Stapel wurde dann in einer Kassette befestigt und in die mit Western-Transfer-Puffer gefüllte Wet-Blot Apparatur eingelegt. Diese Apparatur wurde auf Eis gestellt und die Proteine bei 35 V über Nacht auf die Membran transferiert.

Western-Transfer-Puffer

200 mm Glycin

20 % (v/v) Methanol

in 25 mM Tris-HCl; pH 10,4

Die transferierten Proteine wurden auf der Membran mithilfe von Antikörpern detektiert. Zunächst wurde die Membran in Blockierlösung (TBS-T mit 5% Milchpulver) für 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden Antikörper (verdünnt zwischen 1:1000 – 1:5000) in TBS-T (5% Milchpulver) und für 2 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Danach wurde die Membran fünfmal für 30 Sekunden unter starkem Schütteln mit TBS-T gewaschen, der sekundäre, HRP (horse raddish peroxidase) gekoppelte Antikörper in einer 1:20000 Verdünnung in Blockierlösung zugefügt und für 45 min mit der Membran schwenkend inkubiert. Die Membran wurde erneut fünfmal für 30 Sekunden unter starkem Schütteln mit TBS-T gewaschen und der Western Blot ausgelesen. Zur Entwicklung wurde die Membran mit Super Signal™ West Pico (Thermo Fisher Scientific) oder Super Signal™ West Femto (Thermo Fisher Scientific) 3 min inkubiert. Die Signale wurden mit einem Chemocam Imaging System (Intas, Göttingen) aufgenommen und mit ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) ausgewertet.

TBS-T

0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

Primäre Antikörper

Anti-GFP (Torrey Pines; 1:5000)

Anti-Por1 (R. Lill, pers. Mitteilung; 1:1000)

Anti-tagRFP (Evrogen; 1:1000)

Anti-HA (Invitrogen; 1:3000)

Anti-Myc (Cell Signaling Technology; 1:2000)

Sekundäre Antikörper

Ziege-Anti-Maus-HRP (1:10.000 – 1:50.000; ThermoFisher).

Ziege-Anti-Hase-HRP (1:10.000 – 1:50.000; ThermoFisher)

4.4.4 Subzelluläre Fraktionierung

Die biochemische Analyse der Proteinlokalisierung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurde nach einem geänderten Protokoll von Cramer *et al.* (2015) durchgeführt. Zunächst wurde nach Schritten 1-16 ein „post nuclear supernatant“ (PNS) gewonnen. Anschließend wurde die Konzentration des PNS mittels Photometer bestimmt und durch Zugabe von Lysis-Puffer auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und Portionen von 1000 µl bei -80°C gelagert. Für die Dichtegradienten wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet anschließend in 210 µl Lysis-Puffer resuspendiert. Der Dichtegradient setzt sich zusammen aus Schichten von 333 µl 35%, 666 µl 30%, 666 µl 25% und 333 µl 20% NycoDenz (gelöst in Gradientenbuffer A), die in 3 ml Polycarbonatröhrchen (Beckman Coulter, Brea) vorsichtig übereinandergeschichtet wurden. Anschließend wurde der Gradient mit 200 µl des jeweiligen PNS überschichtet und in einer Beckman L7-65 Ultrazentrifuge mit einem Sorwall TST 60.4 Schwenkrotor zentrifugiert (35000 Upm, 90 min, 4°C). Dann wurden 12 Fraktionen zu je 182 µl vorsichtig von der Oberfläche des Gradienten abgenommen und mit einer entsprechenden Menge Protein-Probenpuffer gemischt oder direkt bei -80°C gelagert.

Lysis-Puffer

0,5 mM Na₂-EDTA

1 mM KCl 0,6 M Sorbitol

Protease-Inhibitoren:

1 µg/mL	Antipain
1 µg/mL	Aprotinin
0,2 mg/mL	Benzamidinehydrochlorid
1 µg/mL	Bestatin
1 µg/mL	Chymostatin
1 µg/mL	Leupeptin
0,2 mg/mL	NaF
1 µg/mL	Pepstatin
10 µg/mL	PMSF

Gradientenpuffer A (ohne Sucrose)

1 mM Na₂-EDTA

1 mM KCl

0.1 % (v/v) ethanol

in 5 mM MES; pH 6, eingestellt mit KOH

DTT Puffer

10 mM Dithiotreitol (direkt vor Benutzung zugesetzt)

in 100 mM Tris

Sorbitol-Puffer zur Spheroplastierung

1,2 M Sorbitol

in 20 mM MES, pH 7,4

4.5 Mikroskopie

4.5.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von *U. maydis* erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops des Typs Axioskop 2 (Firma Zeiss). Die Anregung der unterschiedlichen Chromophore erfolgte mittels zur Wellenlänge passender Filter (Tabelle 11). Die zu untersuchenden Zellen wurden in einem Volumen von 4 μ l auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wasseragarschicht (1%) bedeckten Objektträger aufgetropft. Anschließend wurde das Deckglas aufgelegt. Der Wasseragar diente zur Fixierung der Zellen an ihrer Position, um unscharfe Bilder zu vermeiden. Vergleichsfotos wurden im Durchlicht gemacht. Die Dokumentation der Aufnahmen erfolgte mit einer Kamera der Firma Zeiss (Typ MegaFire) und der Software Volocity (Improvision). Die Aufnahme von Videos erfolgte über einen Zeitraum von 60 Sekunden mit 2 Frames pro Sekunde. Gezeigt werden die mittleren 80 Frames, welche einen Zeitraum von 40 Sekunden repräsentieren. Die Proteinlokalisierung wurde mithilfe von dekonvolvierten Z-Stapeln der entsprechenden Fluoreszenzkanäle bestimmt. Die Punktspreizfunktionen (PSF), die für die Dekonvolution erforderlich waren, wurden unter Verwendung des Richards und Wolf-Modells mit dem ImageJ-Plugin "PSF Generator" erstellt (Kirshner *et al.*, 2013). Die Dekonvolution der einzelnen Z-Stapel wurde dann mit dem ImageJ-Plugin "DeconvolutionLab" durchgeführt, wobei der Richardson-Lucy-Algorithmus mit 25 Wiederholungen angewendet wurde (Vonesch und Unser, 2008).

4.5.2 SIM

Zur Visualisierung von *U. maydis*-Zellen mittels SIM wurden 5 μ l logarithmisch wachsender Zellen auf Objektträger aufgetragen und mit einer 1%igen YNB-Agarose bedeckt. SIM-Bilder wurden mit einem Zeiss ELYRA PS.1-Mikroskop und einer UNDOR iXon 987 EMCCD-Kamera (Belichtungszeit: 50 ms, Verstärkung: 5) unter Verwendung eines Alpha Plan-Apochromat 100x/1,46 Oil DIC M27 Elyra-Objektivs mit 488 nm (HR Diode 488-200, 3%) und 564 nm (HR DPSS 561-200, 5%) Laserlinien als Anregungsquellen aufgenommen. Pro Ebene wurden 15 Bilder (3 Rotationen, 5 Phasen) gesammelt. Die Software ZEN (Zeiss) wurde zur Verarbeitung der SIM-Rekonstruktionen verwendet.

4.5.3 TEM

Zur Visualisierung von *U. maydis*-Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden 50 ml logarithmisch wachsender Zellen geerntet und unter Druck eingefroren (Wohlgend HPF Compact 02). Nach der Gefriersubstitution (Aceton mit 0,25% Osmiumtetroxid, 0,2% Uranylacetat und 5% Wasser) (Leica AFS2) wurden die Zellen in Epon812-Ersatzharz eingebettet (Fluka). Eingebettete Zellen wurden zu 100 nm dünnen Schnitten (Leica EM UC7 RT) verarbeitet, die zur Immunmarkierung mit Anti-mCherry (A121603; antibodies.com; Verdünnung 1:100) verwendet wurden. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit Goldpartikeln gekoppelter Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper (Aurion, Verdünnung 1:100) verwendet. Anschließend wurde ein Silberverstärkungsverfahren durchgeführt und die Schnitte wurden mit 2% Uranylacetat und 0,5% Bleicitrat nachgefärbt. Die Analyse der Proben wurde mit einem JEOL JEM2100 TEM durchgeführt, das mit einer 2k CCD TVIPS (Gauting) F214-Kamera ausgestattet war.

4.6 Statistische Auswertung

Mikroskopische Daten wurden in drei unabhängigen Replikaten gesammelt. Pro Kultur wurden mindestens fünf Bilder quantifiziert. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde mit Volocity 5.5.2 berechnet. Superplots und Student's t-Tests wurden mit RStudio 1.2.1335 und R 3.6.0 durchgeführt. Plots sind wie folgt strukturiert: Mittellinie: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts; große Kreise: Mittelwert der Experimente; kleine Kreise: Datenpunkte der Experimente. P-Werte wurden mit einem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test berechnet. Für Daten mit mehreren Vergleichen wurde mit dem Programm GraphPad Prism (8.0.2) ein 1-Wege-Anova in Verbindung mit einem Tukey-Post-Test durchgeführt. Zur Quantifizierung von Kontakten zwischen Mitochondrien und Peroxisomen wurden fünf Bilder pro Stamm mit mindestens fünf Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten analysiert. Peroxisomen wurden als Mitochondrien-assoziiert gezählt, wenn keine schwarzen Pixel zwischen den fluoreszierenden Signalen der jeweiligen Markerproteine erkennbar waren. Zur Berechnung der Pearson-Korrelationskoeffizienten enthielten alle analysierten Bilder zehn oder mehr Zellen. Die Auswertung wurde ohne Kenntnis der Genotypen durchgeführt. Für die Quantifizierungen von Signalintensitäten wurde die Intensität des peroxisomalen Signals im Verhältnis zum Gesamtsignal pro Zelle mit ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) quantifiziert. Alle Experimente wurden zumindest in Triplikaten durchgeführt.

5 Referenzen

- AhYoung, A. P., Jiang, J., Zhang, J., Khoi Dang, X., Loo, J. A., Zhou, Z. H., Egea, P. F. (2015). Conserved SMP domains of the ERMES complex bind phospholipids and mediate tether assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(25), E3179-E3188.
- Ajioka, R. S., Phillips, J. D., Kushner, J. P. (2006). Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim. Biophys. Acta - Molecular Cell Research*, 1763, 723–73.
- Albertini, M., Rehling P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J. A., Veenhuis, M., Kunau, W. H. (1997). Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell*, 89(1), 83-92.
- Al-Saryi, N. A., Al-Hejjaj, M. Y., Van Roermund, C. W. T., Hulmes, G. E., Ekal, L., Payton, C., *et al.* (2017). Two NAD-linked redox shuttles maintain the peroxisomal redox balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 7, 11868.
- Anderson, R. M., Bitterman, K. J., Wood, J. G., Medvedik, O., Sinclair, D. A. (2003). Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 423(6936), 181-185.
- Ast, J., Bäcker, N., Bittner, E., Martorana, D., Ahmad, H., Bölker, M., Freitag, J. (2022). Two Pex5 proteins with different cargo specificity are critical for peroxisome function in *Ustilago maydis*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 858084.
- Ast, J., Stiebler, A. C., Freitag, J., Bölker, M. (2013). Dual targeting of peroxisomal proteins. *Frontiers in Physiology*, 4, 297.
- Backes, S., Herrmann, J. M. (2017). Protein translocation into the intermembrane space and matrix of mitochondria: mechanisms and driving forces. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4, 83.
- Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., Skulachev, V. P. (1978). Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochimica et Biophysica Acta. (BBA)-Bioenergetics*, 501(3), 349-369.
- Baker Brachmann, C., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., *et al.* (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14, 115–132.
- Balaban, R. S. (2006). Modeling mitochondrial function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(6), C1107-C1113.
- Baldet, P., Alban, C., Douce, R. (1997). Biotin synthesis in higher plants: Purification and characterization of bioB gene product equivalent from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli* and its subcellular localization in pea leaf cells. *FEBS Lett.*, 419, 206–210.
- Barlowe, C. K., Miller, E. A. (2013). Secretory Protein Biogenesis and Traffic in the Early Secretory Pathway. *Genetics*, 193, 383–410.
- Bar-Peled, L., Kory, N. (2022). Principles and functions of metabolic compartmentalization. *Nature metabolism*, 4(10), 1232-1244.
- Bartoszewska, M., Opaliński, L., Veenhuis, M., Van der Klei, I. J. (2011). The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 33(10), 1921–1931.

- Baryshnikova, A., Costanzo, M., Kim, Y., Ding, H., Koh, J., Toufighi, K., ... Myers, C. L. (2010). Quantitative analysis of fitness and genetic interactions in yeast on a genome scale. *Nature methods*, 7(12), 1017-1024.
- Bauer, M. F., Sirrenberg, C., Neupert, W., Brunner, M. (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, 87(1), 33–41.
- Bauwe, H., Hagemann, M., Fernie, A. R. (2010). Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci*, 15(6), 330–336.
- Bereiter-Hahn, J., Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy research and technique*, 27(3), 198-219.
- Bernhard, W., Rouiller, C. (1956). Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity. *J Biophys Biochem Cytol*, 2,4 Suppl, 73-8.
- Bittner, E., Stehlik, T., Freitag, J. (2022). Sharing the wealth: The versatility of proteins targeted to peroxisomes and other organelles. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 934331.
- Böckler, S., Westermann, B. (2014). Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast. *Developmental cell*, 28(4), 450–458.
- Böhmer, C., Böhmer, M., Bölker, M., Sandrock, B. (2008). Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J Cell Sci*, 121, 143–148.
- Boldogh, I. R., Nowakowski, D. W., Yang, H. C., Chung, H., Karmon, S., Royes, P., Pon, L. A. (2003). A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 14(11), 4618-4627.
- Bolliger, L., Junne, T., Schatz, G., Lithgow, T. (1995). Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria. *EMBO Journal*, 14, 6318–6326.
- Bolte, K., Rensing, S. A., Maier, U. G. (2015). The evolution of eukaryotic cells from the perspective of peroxisomes: phylogenetic analyses of peroxisomal beta-oxidation enzymes support mitochondria-first models of eukaryotic cell evolution. *BioEssays*, 37(2), 195-203.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., Kahmann, R. (2009). *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annual review of phytopathology*, 47, 423-445.
- Breitling, R., Sharif, O., Hartman, M. L., Krisans, S. K. (2002). Loss of Compartmentalization Causes Misregulation of Lysine Biosynthesis in Peroxisome-Deficient Yeast Cells. *Eukaryot Cell*, 1, 978–986.
- Breslow, D. K., Cameron, D. M., Collins, S. R., Schuldiner, M., Stewart-Ornstein, J., Newman, H. W., et al. (2008). A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nat Methods*, 5, 711–718.
- Brites, P., Waterham, H. R., Wanders, R. J. (2004). Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1636(2-3), 219–231.
- Broadley, S. A., Demlow, C. M., Fox, T. D. (2001). Peripheral Mitochondrial Inner Membrane Protein, Mss2p, Required for Export of the Mitochondrially Coded Cox2p C Tail in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*.
- Brocard, C., Hartig, A. (2006). Peroxisome targeting signal 1: Is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763(12), 1565-1573.

- Broomfield, P. L. E., Hargreaves, J. A. (1992). A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet*, 22, 117–121.
- Busch, J. D., Fielden, L. F., Pfanner, N., Wiedemann, N. (2023). Mitochondrial protein transport: Versatility of translocases and mechanisms. *Molecular Cell*, 83(6), 890-910.
- Bykov, Y. S., Rapaport, D., Herrmann, J. M., Schuldiner, M. (2020). Cytosolic Events in the Biogenesis of Mitochondrial Proteins. *Trends Biochem Sci*, 45, 650–667.
- Camões, F., Islinger, M., Guimarães, S. C., Kilaru, S., Schuster, M., Godinho, L. F., *et al.* (2015). New insights into the peroxisomal protein inventory: Acyl-CoA oxidases and-dehydrogenases are an ancient feature of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res*, 1853, 111–125.
- Castro, I. G., Richards, D. M., Metz, J., Costello, J. L., Passmore, J. B., Schrader, T. A., *et al.* (2018). A role for Mitochondrial Rho GTPase 1 (MIRO1) in motility and membrane dynamics of peroxisomes. *Traffic*, 19, 229–242.
- Castro, I. G., Shortill, S. P., Dziurdzik, S. K., Cadou, A., Ganesan, S., Valenti, R., *et al.* (2022). Systematic analysis of membrane contact sites in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers modulators of cellular lipid distribution. *Elife*, 11, e74602.
- Cervený, K. L., Studer, S. L., Jensen, R. E., Sesaki, H. (2007). Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical num1 protein. *Developmental cell*, 12(3), 363-375.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*, 138(4), 628-644.
- Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A. E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., ... Rehling, P. (2005). Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell*, 120(6), 817-829.
- Chacinska, A., Rehling, P. (2004). Moving proteins from the cytosol into mitochondria. *Biochemical Society transactions*, 32(5), 774–776.
- Chacinska, A., Rehling, P., Guiard, B., Frazier, A. E., Schulze-Specking, A., Pfanner, N., Voos, W., Meisinger, C. (2003). Mitochondrial translocations contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in the formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex. *The EMBO Journal*, 22(20), 5370–5381.
- Chan, N. C., Lithgow, T. (2008). The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 19(1), 126-136.
- Chao, J. T., Wong, A. K., Tavassoli, S., Young, B. P., Chruscicki, A., Fang, N. N., ..., Loewen, C. J. (2014). Polarization of the endoplasmic reticulum by ER-septin tethering. *Cell*, 158(3), 620-632.
- Chen, Y., Pieuchot, L., Loh, R. A., Yang, J., Kari, T. M., Wong, J. Y., Jedd, G. (2014). Hydrophobic handoff for direct delivery of peroxisome tail-anchored proteins. *Nature communications*, 5, 5790.
- Choi, T. G., Kim, S. S. (2019). Physiological functions of mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radic. Med. Biol.*
- Chornyj, S., Costa, C. F., IJlst, L., Fransen, M., Wanders, R. J., Van Roermund, C. W., Waterham, H. R. (2023). Human peroxisomal NAD⁺/NADH homeostasis is regulated by two independent NAD (H) shuttle systems. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Cichocki, B. A., Krumpke, K., Vitali, D. G., Rapaport, D. (2018). Pex19 is involved in importing dually targeted tail-anchored proteins to both mitochondria and peroxisomes. *Traffic*, 19, 770–785.

- Cieri, D., Vicario, M., Giacomello, M., Vallese, F., Filadi, R., Wagner, T., ..., Cali, T. (2018). SPLICS: a split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell Death & Differentiation*, 25(6), 1131-1145.
- Cohen, S., Valm, A. M., Lippincott-Schwartz, J. (2018). Interacting organelles. *Current opinion in cell biology*, 53, 84-91.
- Cohen, Y., Klug, Y. A., Dimitrov, L., Erez, Z., Chuartzman, S. G., Elinger, D., *et al.* (2014). Peroxisomes are juxtaposed to strategic sites on mitochondria. *Mol BioSyst*, 10(7), 1742-1748.
- Collinge, A. J., Markham, P. (1985). Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. *Exp Mycol*, 9(1), 80-85.
- Corneo, G., Zardi, L., Polli, E. (1968). Human mitochondrial DNA. *Journal of molecular biology*, 36(3), 419-423.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E. D., Sevier, C. S., *et al.* (2010). The Genetic Landscape of a Cell. *Science*, 327, 425-431.
- Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E. N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., *et al.* (2016). A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science*, 353(6306), aaf1420.
- Costello, J. L., Castro, I. G., Hacker, C., Schrader, T. A., Metz, J., Zeuschner, D., *et al.* (2017). ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *Journal of Cell Biology*, 216, 331-342.
- Covill-Cooke, C., Toncheva, V. S., Drew, J., Birsa, N., López-Doménech, G., Kittler, J. T. (2020). Peroxisomal fission is modulated by the mitochondrial Rho-GTPases, Miro1 and Miro2. *EMBO Rep*, 21, e49865
- Cramer, J., Effelsberg, D., Girzalsky, W., Erdmann, R. (2015). Isolation of Peroxisomes from Yeast. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(9), pdbtop074500.
- Cranfill, P. J., Sell, B. R., Baird, M. A., Allen, J. R., Lavagnino, Z., De Gruiter, H. M., ... Piston, D. W. (2016). Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nature methods*, 13(7), 557-562.
- Dahan, N., Bykov, Y. S., Boydston, E. A., Fadel, A., Gazi, Z., Hochberg-Laufer, H., *et al.* (2022). Peroxisome function relies on organelle-associated mRNA translation. *Sci Adv*, 8, eabk2141.
- Dammai, V., Subramani, S. (2001). The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell*, 105(2), 187-196.
- David, C., Koch, J., Oeljeklaus, S., Laernsack, A., Melchior, S., Wiese, S., *et al.* (2013). A Combined Approach of Quantitative Interaction Proteomics and Live-cell Imaging Reveals a Regulatory Role for Endoplasmic Reticulum (ER) Reticulon Homology Proteins in Peroxisome Biogenesis. *Molecular cell Proteomics*, 12, 2408-2425.
- De Duve, C. (1965). The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey Lect*, 59, 49-87.
- De Duve, C., Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev*, 46, 323-35.
- Debelyy, M. O., Platta, H. W., Saffian, D., Hensel, A., Thoms, S., Meyer, H. E., Erdmann, R. (2011). Ubp15p, a ubiquitin hydrolase associated with the peroxisomal export machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32), 28223-28234.
- Dederer, V., Khmelinskii, A., Huhn, A. G., Okreglak, V., Knop, M., Lemberg, M. K. (2019). Cooperation of mitochondrial and ER factors in quality control of tail-anchored proteins. *Elife*, 8, e45506.

- Dellero, Y., Jossier, M., Schmitz, J., Maurino, V. G., Hodges, M. (2016). Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 67(10), 3041–3052.
- Di Cara, F. (2020). Peroxisomes in host defense. *PLoS Pathog*, 16(7), e1008636.
- Di Cara, F., Sheshachalam, A., Braverman, N. E., Rachubinski, R. A., Simmonds, A. J. (2017). Peroxisome-Mediated Metabolism Is Required for Immune Response to Microbial Infection. *Immunity*, 47(1), 93–106e7.
- Dias, A. F., Francisco, T., Rodrigues, T. A., Grou, C. P., Azevedo, J. E. (2016). The first minutes in the life of a peroxisomal matrix protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1863(5), 814–820.
- Dixit, E., Boulant, S., Zhang, Y., Lee, A. S., Odendall, C., Shum, B., Hacoen, N., Chen, Z. J., Whelan, S. P., Fransen, M., Nibert, M. L., Superti-Furga, G., Kagan, J. C. (2010). Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell*, 141(4), 668–681.
- Duranova, H., Valkova, V., Knazicka, Z., Olexikova, L., Vasicek, J. (2020). Mitochondria: A worthwhile object for ultrastructural qualitative characterization and quantification of cells at physiological and pathophysiological states using conventional transmission electron microscopy. *Acta Histochemica*, 122(8), 151646.
- Edward Purdue, P., Yang, X., Lazarow, P. B. (1998). Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *The Journal of cell biology*, 143(7), 1859–1869.
- Effelsberg, D., Cruz-Zaragoza, L. D., Tonillo, J., Schliebs, W., Erdmann, R. (2015). Role of Pex21p for piggyback import of Gpd1p and Pnc1p into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(42), 25333–25342.
- Eisenberg-Bord, M., Shai, N., Schuldiner, M., Bohnert, M. (2016). A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites. *Dev Cell*, 39, 395–409.
- Eisenberg-Bord, M., Zung, N., Collado, J., Drwesh, L., Fenech, E. J., Fadel, A., *et al.* (2021). Cnm1 mediates nucleus-mitochondria contact site formation in response to phospholipid levels. *Journal of Cell Biology*, 220, e202104100.
- Elbaz-Alon, Y., Eisenberg-Bord, M., Shinder, V., Stiller, S. B., Shimoni, E., Wiedemann, N., ... Schuldiner, M. (2015). Lam6 regulates the extent of contacts between organelles. *Cell Reports*, 12(1), 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. *Developmental cell*, 30(1), 95–102.
- Elgersma, Y., Kwast, L., Van den Berg, M., Snyder, W. B., Distel, B., Subramani, S., Tabak, H. F. (1997). Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *The EMBO journal*, 16(24), 7326–7341.
- Elgersma, Y., Van Roermund, C. W., Wanders, R. J., Tabak, H. F. (1995). Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene. *EMBO J*, 14(14), 3472–3479.
- Endo, T., Yamamoto, H. Esaki, M- (2003) Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J. Cell Sci.* 116, 3259–3267
- Erdmann, R., Blobel, G. (1996). Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *The Journal of cell biology*, 135(1), 111–121.
- Esposito, M., Hermann-Le Denmat, S., Delahodde, A. (2019). Contribution of ERMES subunits to mature peroxisome abundance. *PLoS One*, 14, 1–19.

- Falkenberg, M., Larsson, N-G., Gustafsson, C. M. (2007). DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 679–699.
- Fan, J., Li, X., Issop, L., Culty, M., Papadopoulos, V. (2016). ACBD2/ECI2-mediated peroxisome-mitochondria interactions in Leydig cell steroid biosynthesis. *Molecular Endocrinology*, 30(7), 763-782.
- Feng, P., Skowyra, M. L., Rapoport, T. A. (2022). Structure and function of the peroxisomal ubiquitin ligase complex. *Biochemical Society Transactions*, 50(6), 1921-1930.
- Feng, P., Wu, X., Erramilli, S. K., Paulo, J. A., Knejski, P., Gygi, S. P., ..., Rapoport, T. A. (2022). A peroxisomal ubiquitin ligase complex forms a retrotranslocation channel. *Nature*, 607(7918), 374-380.
- Ferdinandusse, S., Falkenberg, K. D., Koster, J., Mooyer, P. A., Jones, R., Van Roermund, C. W., ... Waterham, H. R. (2017). ACBD5 deficiency causes a defect in peroxisomal very long-chain fatty acid metabolism. *Journal of medical genetics*, 54(5), 330-337.
- Ferreira, A. R., Marques, M., Ribeiro, D. (2019). Peroxisomes and Innate Immunity: Antiviral Response and Beyond. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3795
- Ferreira, J. V., Carvalho, P. (2021). Pex30-like proteins function as adaptors at distinct ER membrane contact sites. *Journal of Cell Biology*, 220, e202103176.
- Field, J., Nikawa, J. I., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I. A., ... Wigler, M. (1988). Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Molecular and cellular biology*, 8(5), 2159-2165.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 440(3), 325-33.
- Fox, T. D. (2012). Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics*, 192(4), 1203-1234.
- Fransen, M., Lismont, C., Walton, P. (2017). The peroxisome-mitochondria connection: how and why? *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1126.
- Freitag, J., Ast, J., Bölker, M. (2012). Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature*, 485, 522–525.
- Freitag, J., Ast, J., Bölker, M., Linne, U., Stehlik, T., Martorana, D., *et al.* (2014). Peroxisomes contribute to the biosynthesis of extracellular glycolipids in fungi. *Mol Microbiol*, 93(1), 24-36.
- 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, e07739.
- Gabaldón, T. (2010). Peroxisome diversity and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1541), 765-773.
- Gabaldón, T., Snel, B., Zimmeren, F. V., Hemrika, W., Tabak, H., Huynen, M. A. (2006). Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biology Direct*, 1(1), 1-14.
- Gabay-Maskit, S., Cruz-Zaragoza, L. D., Shai, N., Eisenstein, M., Bibi, C., Cohen, N., *et al.* (2020). A piggybacking mechanism enables peroxisomal localization of the glyoxylate cycle enzyme Mdh2 in yeast. *Journal of cell science*, 133(24), jcs244376.
- Gakh, O., Cavadini, P., Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1592(1), 63-77.

- Galland, N., Demeure, F., Hannaert, V., Verplaetse, E., Vertommen, D., Van Der Smissen, P., Michels, P. A. (2007). Characterization of the role of the receptors PEX5 and PEX7 in the import of proteins into glycosomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(4), 521-535.
- Gao, Y., Skowyra, M. L., Feng, P., Rapoport, T. A. (2023). Protein import into peroxisomes occurs through a nuclear pore-like phase. *Science*, 378, eadf3971.
- Gatto, G. J., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J., Berg, J. M. (2000). Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nature structural biology*, 7(12), 1091-1095.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K. N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., ... Rehling, P. (2002). The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, 111(4), 507-518.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418, 387-391.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison III, C. A., Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 6, 343.
- Gietz, R. D., Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, 350, 87-96.
- Goldman, B. M., Blobel, G. (1978). Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10), 5066-5070.
- Gonzalez, N. H., Felsner, G., Schramm, F. D., Klingl, A., Maier, U. G., Bolte, K. (2011). A single peroxisomal targeting signal mediates matrix protein import in diatoms. *PLoS one*, 6(9), e25316.
- Gould, S. G., Keller, G. A., Subramani, S. (1987). Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *The Journal of cell biology*, 105(6), 2923-2931.
- Gould, S. J., Kalish, J. E., Morrell, J. C., Bjorkman, J., Urquhart, A. J., Crane, D. I. (1996). Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PEX1 receptor. *Journal of Cell Biology*, 135(1), 85-95.
- Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J., Subramani, S. (1989). A conserved tripeptide sorts of proteins to peroxisomes. *The Journal of cell biology*, 108(5), 1657-1664.
- Gray, M. W., Burger, G., Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* (80-), 283, 1476-1481.
- Gray, M. W., Lang, B. F., Burger, G. (2004). Mitochondria of protists. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 477-524.
- Guda, P., Guda, C., Subramaniam, S. (2007). Reconstruction of pathways associated with amino acid metabolism in human mitochondria. *Genomics, proteomics bioinformatics*, 5(3-4), 166-176.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D., Hegemann, J. H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 30, e23-e23.
- Hanahan, D., Jessee, J., Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*, 204, 63-113.
- Hansen, K. G., Aviram, N., Laborenz, J., Bibi, C., Meyer, M., Spang, A., *et al.* (2018). An ER surface retrieval pathway safeguards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast. *Science*, 361, 1118-1122.
- Helle, S. C., Kanfer, G., Kolar, K., Lang, A., Michel, A. H., Kornmann, B. (2013). Organization and function of membrane contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833(11), 2526-2541.

- Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J., Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *The Journal of cell biology*, 143(2), 359-373.
- Herrmann, J.M. Neupert, W. (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 210–214.
- Herrmann, J.M. Neupert, W. (2013) Protein Import into Mitochondria. *Encycl. Biol. Chem. Second Ed.* 66, 632– 636.
- Herrmann, J.M. Riemer, J. (2010) The intermembrane space of mitochondria. *Antioxidants Redox Signal.* 13, 1341–1358.
- Hettema, E. H., Ruigrok, C. C. M., Koerkamp, M. G., Van den Berg, M., Tabak, H. F., Distel, B., *et al.* (1998). The Cytosolic DnaJ-like Protein Djplp Is Involved Specifically in Peroxisomal Protein Import. *Journal of Cell Biology*, 142, 421–434.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M. A., Kämper, J., Bölker, M. (2006). Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol*, 72(8), 5469-5477.
- Heymans, H. S., Schutgens, R. B., Tan, R., Van den Bosch, H., Borst, P. (1983). Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome). *Nature*, 306(5938), 69–70.
- Hinnebusch, A. G. (1992). General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell Biol yeast Saccharomyces*, 2, 319–414.
- Hirabayashi, Y., Kwon, S. K., Paek, H., Pernice, W. M., Paul, M. A., Lee, J., ... Polleux, F. (2017). ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca²⁺ dynamics in mammalian neurons. *Science*, 358(6363), 623-630.
- Hobbs, A. E. A., 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. *The Journal of Cell Biology*, 152(2), 401-410.
- Hoffman, C. S., Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267–272.
- Höhr, A. I., Lindau, C., Wirth, C., Qiu, J., Stroud, D. A., Kutik, S., ... Wiedemann, N. (2018). Membrane protein insertion through a mitochondrial β -barrel gate. *Science*, 359(6373), eaah6834.
- Hönlinger, A., Kübrich, M., Moczko, M., Gärtner, F., Mallet, L., Bussereau, F., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., Jacquet, M. (1995). The mitochondrial receptor complex: Mom22 is essential for cell viability and directly interacts with preproteins. *Molecular and cellular biology*, 15(6), 3382–3389.
- Hönscher, C., Mari, M., Auffarth, K., Bohnert, M., Griffith, J., Geerts, W., ... Ungermann, C. (2014). Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Developmental Cell*, 30(1), 86-94.
- Honsho, M., Abe, Y., Fujiki, Y. (2017). Plasmalogen biosynthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Sci Rep*, 7, 43936.
- Hoppins, S., Lackner, L., Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 751-780.
- Hu, J., Baker, A., Bartel, B., Linka, N., Mullen, R. T., Reumann, S., Zolman, B. K. (2012). Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell*, 24(6), 2279–2303.

- Hua, R., Cheng, D., Coyaud, É., Freeman, S., Di Pietro, E., Wang, Y., *et al.* (2017). VAPs and ACBD5 tether peroxisomes to the ER for peroxisome maintenance and lipid homeostasis. *Journal of Cell Biology*, 216, 367–377.
- Huhse, B., Rehling, P., Albertini, M., Blank, L., Meller, K., Kunau, W. H. (1998). Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *The Journal of cell biology*, 140(1), 49-60.
- Hulmes, G. E., Hutchinson, J. D., Dahan, N., Nuttall, J. M., Allwood, E. G., Ayscough, K. R., Hettema, E. H. (2020). The Pex3–Inp1 complex tethers yeast peroxisomes to the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 219(10), e201906021.
- Ilacqua, N., Anastasia, I., Raimondi, A., Lemieux, P., de Aguiar Vallim, T. Q., Toth, K., Koonin, E. V., Pellegrini, L. (2022). A three-organelle complex made by wrappER contacts with peroxisomes and mitochondria responds to liver lipid flux changes. *Journal of Cell Science*, 135(5), jcs259091.
- Isaya, G., Kalousek, F., Fenton, W. A., Rosenberg, L. E. (1991). Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide. *The Journal of cell biology*, 113(1), 65-76.
- Islinger, M., Cardoso, M. J. R., Schrader, M. (2010). Be different-The diversity of peroxisomes in the animal kingdom. *Biochim Biophys Acta - Molecular cell Res*, 1803(7), 881–897.
- Islinger, M., *et al.* (2012). The peroxisome: an update on mysteries. *Histochem Cell Biol*, 137, 547-574.
- Islinger, M., Voelkl, A., Fahimi, H. D., Schrader, M. (2018). The peroxisome: an update on mysteries 20. *Histochem Cell Biol*, 150(5), 443–471.
- Jan, C. H., Williams, C. C., Weissman, J. S. (2014). Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, 346(6210), 1257521.
- Jan, P.-S., Esser, K., Pratje, E., Michaelis, G. (2000). Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2. *Mol Gen Genet MGG*, 263(3), 483–491.
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., *et al.* (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 21(11), 947–962.
- Jedd, G., Chua, N. H. (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol*, 2(4), 226-231.
- Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Vöth, M., Bereiter-Hahn, J. (2008). Short-and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion*, 8(4), 293-304.
- Jensen, R. E. Johnson, A.E. (2001) Opening the door to mitochondrial protein import. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1008– 1010.
- Jeong, S. Y., Seol, D. W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports*, 41(1), 11–22.
- Jones, J. M., Nau, K., Geraghty, M. T., Erdmann, R., Gould, S. J. (1999). Identification of peroxisomal acyl-CoA thioesterases in yeast and humans. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9216-9223.
- Jong, W. Y., Mendrola, J. M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D. B., ..., Lemmon, M. A. (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Molecular cell*, 13(5), 677-688.

- Joshi, A. S., Huang, X., Choudhary, V., Levine, T. P., Hu, J., Prinz, W. A. (2016). A family of membrane-shaping proteins at ER subdomains regulates pre-peroxisomal vesicle biogenesis. *Journal of Cell Biology*, jcb--201602064.
- Joshi, A. S., Nebenfuhr, B., Choudhary, V., Satpute-Krishnan, P., Levine, T. P., Golden, A., *et al.* (2018). Lipid droplet and peroxisome biogenesis occur at the same ER subdomains. *Nat Commun*, 9(1), 1–12.
- Joshi, A. S., Zhang, H., Prinz, W. A. (2017). Organelle biogenesis in the endoplasmic
- Jung, S., Marelli, M., Rachubinski, R. A., Goodlett, D. R., Aitchison, J. D. (2010). Dynamic changes in the subcellular distribution of Gpd1p in response to cell stress. *Journal of Cell Biology*, 285(9), 6739–6749.
- Kahmann, R., Kämper, J. (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist*, 164(1), 31-42.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., *et al.* (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*.
- Kawano, S., Tamura, Y., Kojima, R., Bala, S., Asai, E., Michel, A. H., ... Endo, T. (2018). Structure–function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm1–Mdm12 of ERMES. *Journal of Cell Biology*, 217(3), 959-974.
- Kellis, M., Birren, B. W., Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 428(6983), 617-624.
- Kempiński, B., Chelstowska, A., Poznański, J., Król, K., Rymer, Ł., Frydzińska, Z., Skoneczny, M. (2020). The peroxisomal targeting signal 3 (PTS3) of the budding yeast acyl-CoA oxidase is a signal patch. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 198.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R. S., Jensen, R. E. (1997). The Tim54p–Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *Journal of Cell Biology*, 139(7), 1663-1675.
- Kistler, H. C., Broz, K. (2015). Cellular compartmentalization of secondary metabolism. *Front Microbiol*, 6, 68.
- Klecker, T., Scholz, D., Förtsch, J., Westermann, B. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *Journal of cell science*, 126(13), 2924-2930.
- Klein, A., Israel, L., Lackey, S. W., Nargang, F. E., Imhof, A., Baumeister, W., ... Thomas, D. R. (2012). Characterization of the insertase for β -barrel proteins of the outer mitochondrial membrane. *Journal of Cell Biology*, 199(4), 599-611.
- Koch, A., Yoon, Y., Bonekamp, N. A., McNiven, M. A., Schrader, M. (2005). A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 16(11), 5077–5086.
- Koch, J., Pranjic, K., Huber, A., Ellinger, A., Hartig, A., Kragler, F., Brocard, C. (2010). PEX11 family members are membrane elongation factors that coordinate peroxisome proliferation and maintenance. *Journal of Cell Science* 123(19), 3389-3400.
- Koehler CM, Merchant S Schatz G (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem. Sci.* 24, 428–432.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S., *et al.* (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*, 325(5939), 477–481.

- Kornmann, B., Osman, C., Walter, P. (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum–mitochondria connections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14151-14156.
- Kornmann, B., Ungermann, C. (2017). Membrane contacts sites. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1864(9).
- Kornmann, B., Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *Journal of cell science*, 123(9), 1389-1393.
- Kors, S., Kurian, S. M., Costello, J. L., Schrader, M. (2022). Controlling contacts—Molecular mechanisms to regulate organelle membrane tethering. *BioEssays*, 44(11), 2200151.
- Kovermann, P., Truscott, K. N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N. B., Müller, H., ... Pfanner, N. (2002). Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Molecular cell*, 9(2), 363-373.
- Krikken, A. M., Wu, H., de Boer, R., Devos, D. P., Levine, T. P., Van der Klei, I. J. (2020). Peroxisome retention involves Inp1-dependent peroxisome–plasma membrane contacts sites in yeast. *Journal of Cell Biology*. *er219*, e201906023.
- Kumar, S., Singh, R., Williams, C. P., Van der Klei, I. J. (2016). Stress exposure results in increased peroxisomal levels of yeast Pnc1 and Gpd1, which are imported via a piggy-backing mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1863(1), 148-156.
- Kumari, T., Vachher, M., Bansal, S., Bamezai, R. N., Kumar, B. (2018). Meta-analysis of mitochondrial T16189C polymorphism for cancer and Type 2 diabetes risk. *Clinica Chimica Acta*, 482, 136-143.
- Kunze, M. (2020). The type-2 peroxisomal targeting signal. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1867(2), 118609.
- Kunze, M., Berger, J. (2015). The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. *Frontiers in physiology*, 6, 259.
- M., Hartig, A. (2006). A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochim Biophys Acta*, 1763(12), 1441–1452.
- Kuravi, K., Nagotu, S., Krikken, A. M., Sjollem, K., Deckers, M., Erdmann, R., Van Der Klei, I. J. (2006). Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 119(19), 3994-4001.
- Kushnirov, V. V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 16(9), 857–860.
- Lackner, L. L. (2014). Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC biology*, 12, 1-10.
- Lackner, L. L., Ping, H., Graef, M., Murley, A., Nunnari, J. (2013). Endoplasmic reticulum-associated mitochondria–cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), E458-E467.
- Lahiri S, Chao JT, Tavassoli S, Wong AK, Choudhary V, Young BP, Loewen CJ, Prinz WA. (2014). A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biol.*, 12(10), e1001969.
- Lam, S., Yoda, N., Schekman, R. (2010). A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci*, 21523–21528.
- Lane, N., Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, 467, 928–928.
- Lang, A., Peter, A. T. J., Kornmann, B. (2015). ER–mitochondria contact sites in yeast: beyond the myths of ERMES. *Current opinion in cell biology*, 35, 7-12.

- Lazarow, P. B. (1987). The role of peroxisomes in mammalian cellular metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 10(Suppl 1), 11-22.
- Lazarow, P. B. (2006). The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12), 1599-1604.
- Léon, S., Goodman, J. M., Subramani, S. (2006). Uniqueness of the mechanism of protein import into the peroxisome matrix: transport of folded, co-factor-bound and oligomeric proteins by shuttling receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12), 1552-1564.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460, 831–838.
- Lingard, M. J., Bartel, B. (2009). Arabidopsis LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. *Plant Physiol*, 151(3), 1354–1365.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2005). Organelles of the Eukaryotic cell. *Molecular Cell Biology*, 5. Ausgabe, WH Freeman.
- Lohret, T. A., Jensen, R. E., Kinnally, K. W. (1997). Tim23, a protein import component of the mitochondrial inner membrane, is required for normal activity of the multiple conductance channel, MCC. *The Journal of cell biology*, 137(2), 377-386.
- Lord, S. J., Velle, K. B., Mullins, R. D., Fritz-Laylin, L. K. (2020). SuperPlots: Communicating reproducibility and variability in cell biology. *Journal of Cell Biology*, 219.
- Madamanchi, N. R., Runge, M. S. (2007). Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation research*, 100(4), 460-473.
- Manders, E. M., Verbeek, F. J., Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy*, 169(3), 375-382.
- Manford, A. G., Stefan, C. J., Yuan, H. L., MacGurn, J. A., Emr, S. D. (2012). ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Developmental cell*, 23(6), 1129-1140.
- Manton, J. D. (2022). Answering some questions about structured illumination microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 380(2220), 20210109.
- Mapa, K., Sikor, M., Kudryavtsev, Waegemann, K., Kalinin, S., Seidel, C. A., Neupert, W., Lamb, D. C., Mokranjac, D. (2010). The conformational dynamics of the mitochondrial Hsp70 chaperone. *Molecular cell* 38, 89–100.
- Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., ... Pinton, P. (2012). Mitochondria-ROS crosstalk in the control of cell death and aging. *Journal of signal transduction*, 2012, 329635.
- Marchi, S., Patergnani, S., Pinton, P. (2014). The endoplasmic reticulum–mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochimica et Biophysica*, 1837(4), 461-469.
- Matsuzaki, T., Fujiki, Y. (2008). The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway. *Journal of Cell Biology*, 183(7), 1275–1286.
- Mattiazzi Ušaj, M. M., Brložnik, M., Kaferle, P., Žitnik, M., Wolinski, H., Leitner, F., et al. (2015). Genome-wide localization study of yeast Pex11 identifies peroxisome--mitochondria interactions through the ERMES complex. *J Mol Biol*, 427(11), 2072–2087.
- Mayer, A., Nargang, F. E., Neupert, W., Lill, R. (1995). MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *EMBO Journal*, 14, 4205–4211.

- McAlister-Henn, L., Thompson, L. M. (1987). Isolation and expression of the gene encoding yeast mitochondrial malate dehydrogenase. *Journal of bacteriology*, 169(11), 5157-5166.
- McBride, H. M., Millar, D. G., Li, J. M., Shore, G. C. (1992). A signal-anchor sequence selective for the mitochondrial outer membrane. *The Journal of Cell biology*, 119(6), 1451-1457.
- McCollum, D., Monosov, E., Subramani, S. (1993). The pas8 mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells--the PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal and is a member of the TPR protein family. *The Journal of Cell biology*, 121(4), 761-774.
- McConnell, S. J., Stewart, L. C., Talin, A., Yaffe, M. P. (1990). Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *The Journal of Cell biology*, 111(3), 967-976.
- Meeusen, S., Nunnari, J. (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *The Journal of Cell Biology*, 163(3), 503-510.
- Meisinger, C., Rissler, M., Chacinska, A., Szklarz, L. K. S., Milenkovic, D., Kozjak, V., ... Pfanner, N. (2004). The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Developmental Cell*, 7(1), 61-71.
- Merzlyak, E. M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M. E., Shcheglov, A. S., Fradkov, A. F., ... Chudakov, D. M. (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature methods*, 4(7), 555-557.
- Metzger, M. B., Maurer, M. J., Dancy, B. M., Michaelis, S. (2008). Degradation of a Cytosolic Protein Requires Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Machinery. *J Biol Chem*, 283(47), 32302-32316.
- Michail Woronin (1864). *Zur Entwicklungsgeschichte des Ascobolus pulcherrimus Cr und Pezizen*. Senckenbergische Naturforschende Gesellschaft.
- Mihara, K., Sato, R. (1985). Molecular cloning and sequencing of cDNA for yeast porin, an outer mitochondrial membrane protein: a search for targeting signal in the primary structure. *The EMBO journal*, 4(3), 769-774.
- Minard, K. I., McAlister-Henn, L. (1991). Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the MDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Molecular and cellular biology*, 11(1), 202-210.
- Mootha, V. K., Bunkenborg, J., Olsen, J. V., Hjerrild, M., Wisniewski, J. R., Stahl, E., ... Mann, M. (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, 115(5), 629-640.
- Morgenstern, M., Stiller, S. B., Lübbert, P., Peikert, C. D., Dannenmaier, S., Drepper, F., et al. (2017). Definition of a high-confidence mitochondrial proteome at quantitative scale. *Cell Rep*, 19(13), 2836-2852.
- Motley, A. M., Hettema, E. H., Ketting, R., Plasterk, R., Tabak, H. F. (2000). *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO reports*, 1(1), 40-46.
- Müller, W. H., Bovenberg, R. A., Groothuis, M. H., Kattevilder, F., Smaal, E. B., Van der Voort, L. H., Verkleij, A. J. (1992). Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subjects*, 1116(2), 210-213.
- Müller, W. H., Van der Krift, T. P., Krouwer, A. J., Wösten, H. A., Van Der Voort, L. H., Smaal, E. B., Verkleij, A. J. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *The EMBO J*, 10(2), 489-495.

- Mumberg, D., Müller, R., Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156(1), 119-122.
- Murley A, Lackner LL, Osman C, West M, Voeltz GK, Walter P, Nunnari J. (2013). ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife*, 2, e00422.
- Murphy, S. E., Levine, T. P. (2016). VAP, a versatile access point for the endoplasmic reticulum: review and analysis of FFAT-like motifs in the VAPome. *Biochimica et Biophysica Acta. . (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(8), 952-961.
- Naón D, Hernández-Alvarez MI, Shinjo S, Wieczor M, Ivanova S, Martins de Brito O, Quintana A, Hidalgo J, Palacín M, Aparicio P, Castellanos J, Lores L, Sebastián D, Fernández-Veledo S, Vendrell J, Joven J, Orozco M, Zorzano A, Scorrano L. (2023) Splice variants of mitofusin 2 shape the endoplasmic reticulum and tether it to mitochondria. *Science*, 380(6571), eadh9351.
- Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A, Eisenhaber F. (2003) Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol*, 328, 581–592.
- Neupert, W. (2015). A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *Journal of molecular biology*, 427(6), 1135-1158.
- Nötzel C, Lingner T, Klingenberg H, Thoms S. (2016) Identification of new fungal peroxisomal matrix proteins and revision of the PTS1 consensus. *Traffic*, 17, 1110–1124.
- Nuebel, E., Morgan, J. T., Fogarty, S., Winter, J. M., Lettlova, S., Berg, J. A., *et al.* (2021). The biochemical basis of mitochondrial dysfunction in Zellweger Spectrum Disorder. *EMBO-Reports*, 22, e51991.
- Odendall, C., Dixit, E., Stavru, F., Bierne, H., Franz, K. M., Durbin, A. F., Boulant, S., Gehrke, L., Cossart, P., Kagan, J. C. (2014). Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol*, 15(8), 717–726.
- Oldenburg KR, Vo KT, Michaelis SD, Paddon C. (1997) Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res*, 25, 451–452.
- Omer, S., Greenberg, S. R., Lee, W. L. (2018). Cortical dynein pulling mechanism is regulated by differentially targeted attachment molecule Num1. *Elife*, 7, e36745.
- Osman, C., Merkwirth, C., Langer, T. (2009). Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *Journal of cell science*, 122(21), 3823-3830.
- Otera, H., Okumoto, K., Tateishi, K., Ikoma, Y., Matsuda, E., Nishimura, M., Fujiki, Y. (1998). Peroxisome targeting signal type 1 (PTS1) receptor is involved in import of both PTS1 and PTS2: studies with PEX5-defective CHO cell mutants. *Molecular and cellular biology*, 18(1), 388-399.
- Otzen, M., Wang, D., Lunenborg, M. G., Van der Klei, I. J. (2005). *Hansenula polymorpha* Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2). *Journal of cell science*, 118(15), 3409-3418.
- Palmieri, L., Rottensteiner, H., Girzalsky, W., Scarcia, P., Palmieri, F., Erdmann, R. (2001). Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *The EMBO journal*, 20(18), 5049-5059.
- Pan, R., Liu, J., Wang, S., Hu, J. (2020). Peroxisomes: versatile organelles with diverse roles in plants. *New Phytol*, 225(4), 1410–1427.

- Park, J. S., Thorsness, M. K., Policastro, R., McGoldrick, L. L., Hollingsworth, N. M., Thorsness, P. E., Neiman, A. M. (2016). Yeast Vps13 promotes mitochondrial function and is localized at membrane contact sites. *Molecular biology of the cell*, 27(15), 2435-2449.
- Paschen, S. A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., ... Neupert, W. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature*, 426(6968), 862-866.
- Pavlik, P., Simon, M., Schuster, T., Ruis, H. (1993). The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Current genetics*, 24(1-2), 21-25.
- Petrova, V. Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V., Schmitt, M. J. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochemical Journal*, 380(2), 393-400.
- Pfanner, N., Geissler, A. (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 339-349.
- Pfanner, N., Warscheid, B., Wiedemann, N. (2019). Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(5), 267-284.
- Ping, H. A., Kraft, L. M., Chen, W., Nilles, A. E., Okreglak, L. L. (2016). Num1 anchors mitochondria to the plasma membrane via two domains with different lipid binding specificities. *Journal of Cell Biology*, 213(5), 513-524.
- Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T., Hiltunen, J. K. (2006). Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta.* , 1763(12), 1413-1426.
- Prinz, W. A. (2014). Bridging the gap: membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. *Journal of Cell Biology*, 205(6), 759-769.
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends in biochemical sciences*, 41(12), 1035-1049.
- Raturi, A., Simmen, T. (2013). Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochimica et Biophysica Acta.* 1833(1), 213-224.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H. E., ... Pfanner, N. (2003). Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science*, 299(5613), 1747-1751.
- Renicke C, Allmann AK, Lutz AP, Heimerl T, Taxis C. (2017) The mitotic exit network regulates spindle pole body selection during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 206(2), 919-937.
- Renicke C, Schuster D, Usherenko S, Essen L-O, Taxis C. (2013) A LOV2 Domain-Based Optogenetic Tool to Control Protein Degradation and Cellular Function. *Chem Biol*, 20(5), 619-626.
- Renicke C, Spadaccini R, Taxis C. (2013) A Tobacco Etch Virus Protease with Increased Substrate Tolerance at the P1'position. *PLoS One*, 8(7), e67915.
- Reumann, S. (2004). Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiology*, 135(2), 783-800.
- Reumann, S., Weber, A. P. (2006). Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled--others remain. *Biochim Biophys Acta*, 1763(12), 1496-1510.
- Rochaix, J. D. (2022). Chloroplast protein import machinery and quality control. *The FEBS Journal*, 289(22), 6908-6918.

- Rosenthal, M., Metzl-Raz, E., Bürgi, J., Yifrach, E., Drwesh, L., Fadel, A., Zalckvar, E. (2020). Uncovering targeting priority to yeast peroxisomes using an in-cell competition assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(35), 21432-21440.
- Rucktäschel, R., Girzalsky, W., Erdmann, R. (2011). Protein import machineries of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta. (BBA)-Biomembranes*, 1808(3), 892-900.
- Ryan, M. T., Pfanner, N. (1998). The preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane. *Biological Chemistry*, 379(3), 289-294.
- Rymer, Ł., Kempniński, B., Chelstowska, A., Skoneczny, M. (2018). The budding yeast Pex5p receptor directs Fox2p and Cta1p into peroxisomes via its N-terminal region near the FxxxW domain. *Journal of Cell Science*, 131(17), jcs216986.
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schatz, G., Haslbrunner, E., Tuppy, H. (1964). Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*, 15(2), 127-132.
- Schliebs W, Kunau WH (2006) PTS2 Co-receptors: Diverse proteins with common features. *Biochim Biophys Acta - Molecular cell Res*, 1763, 1605–1612.
- Schlüter, A., Fourcade, S., Ripp, R., Mandel, J. L., Poch, O., Pujol, A. (2006). The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Molecular Biology and Evolution*, 23(4), 838-845.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675.
- Schrader, T. A., Carmichael, R. E., Islinger, M., Costello, J. L., Hacker, C., Bonekamp, N. A., Schrader, M. (2022). PEX11 β and FIS1 cooperate in peroxisome division independently of mitochondrial fission factor. *Journal of Cell Science*, 135(13), jcs259924.
- Schueren, F., Lingner, T., George, R., Hofhuis, J., Dickel, C., Gärtner, J., Thoms, S. (2014). Peroxisomal lactate dehydrogenase is generated by translational readthrough in mammals. *Elife*, 3, e03640.
- Schulz B, Banuett F, Dahl M, Schlesinger R, Schäfer W, Martin T, *et al.* (1990) The b alleles of U maydis, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, 60(2), 295–306.
- Scorrano, L., De Matteis, M. A., Emr, S., Giordano, F., Hajnóczky, G., Kornmann, B., ... Schuldiner, M. (2019). Coming together to define membrane contact sites. *Nature communications*, 10(1), 1287.
- Sena, L. A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D. A., ... Chandel, N. S. (2013). Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*, 38(2), 225–236.
- Shai N, Schuldiner M, Zalckvar E. (2016) No peroxisome is an island - Peroxisome contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta.* , 1863(5), 1061-1069.
- Shai N, Yifrach E, Roermund CWT, Cohen N, Bibi C, IJlst L, *et al.* (2018) Systematic mapping of contact sites reveals tethers and a function for the peroxisome-mitochondria contact. *Nat Communications*, 9, 1761.
- Shaner, N. C., Lambert, G. G., Chammas, A., Ni, Y., Cranfill, P. J., Baird, M. A., ... Wang, J. (2013). A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nature methods*, 10(5), 407-409.

- Shore, G. C., McBride, H. M., Millar, D. G., Steenaart, N. A., Nguyen, M. (1995). Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. *European journal of biochemistry*, 227(1-2), 9-18.
- Sichting, M., Schell-Steven, A., Prokisch, H., Erdmann, R., Rottensteiner, H. (2003). Pex7p and Pex20p of *Neurospora crassa* function together in PTS2-dependent protein import into peroxisomes. *Molecular biology of the cell*, 14(2), 810-821.
- Silva, B. S. C., DiGioVanni, L., Kumar, R., Carmichael, R. E., Kim, P. K., Schrader, M. (2020). Maintaining social contacts: The physiological relevance of organelle interactions. *Biochim Biophys Acta - Molecular cell Res*, 1867(11), 118800.
- Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W., Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, 384(6609), 582-585.
- Skowrya, M. L., Rapoport, T. A. (2022). PEX5 translocation into and out of peroxisomes drives matrix protein import. *Molecular cell*, 82(17), 3209–3225.e7.
- Smith, J. J., Aitchison, J. D. (2013). Peroxisomes take shape. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), 803-817.
- Smith, J. J., Marelli, M., Christmas, R. H., Vizeacoumar, F. J., Dilworth, D. J., Ideker, T., Galitski, T., Dimitrov, K., Rachubinski, R. A., Aitchison, J. D. (2002). Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. *Journal of Cell Biology*, 158, 259-271.
- Sood, A., Jeyaraju, D. V., Prudent, J., Caron, A., Lemieux, P., McBride, H. M., ..., Pellegrini, L. (2014). A Mitofusin-2–dependent inactivating cleavage of Opa1 links changes in mitochondria cristae and ER contacts in the postprandial liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(45), 16017-16022.
- Speijer, D. (2017). Evolution of peroxisomes illustrates symbiogenesis. *BioEssays*, 39(9), 1700050.
- Spellig, T., Bottin, A., Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, 252, 503–509.
- Spröte, P., Brakhage, A. A., Hynes, M. J. (2009). Contribution of peroxisomes to penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 8(3), 421-423.
- Stefan, C. J., Manford, A. G., Emr, S. D. (2013). ER–PM connections: sites of information transfer and inter-organelle communication. *Current opinion in cell biology*, 25(4), 434-442.
- Steffan, J. S., McAlister-Henn, L. (1992). Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(34), 24708-24715.
- Stehlik, T. (2019) Ein molekularer Tauziehmechanismus für den Proteintransport aus Mitochondrien in Peroxisomen (Dissertation). Philips-Universität Marburg, Marburg.
- Stehlik, T., Kremp, M., Kahnt, J., Bölker, M., Freitag, J. (2020). Peroxisomal targeting of a protein phosphatase type 2C via mitochondrial transit. *Nat Commun*, 11, 2355.
- Stehlik, T., Sandrock, B., Ast, J., Freitag, J. (2014). Fungal peroxisomes as biosynthetic organelles. *Curr Opin Microbiol*, 22, 8–14.
- Stiebler, A. C., Freitag, J., Schink, K. O., Stehlik, T., Tillmann, B. A., Ast, J., Bölker, M. (2014). Ribosomal readthrough at a short UGA stop codon context triggers dual localization of metabolic enzymes in Fungi and animals. *PLoS genetics*, 10(10), e1004685.
- Strijbis, K., Spooner, E., Ploegh, H. L. (2012). Protein ligation in living cells using sortase. *Traffic*, 13(6), 780-789.

- Subramani, S. (1993). Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annual review of cell biology*, 9(1), 445-478.
- Sugiura A, Mattie S, Prudent J, McBride HM (2017) Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature*, 542, 251–254.
- Tang, X., Germain, B. S., Lee, W. L. (2012). A novel patch assembly domain in Num1 mediates dynein anchoring at the cortex during spindle positioning. *Journal of Cell Biology*, 196(6), 743-756.
- Tang, X., Punch, J. J., Lee, W. L. (2009). A CAAX motif can compensate for the PH domain of Num1 for cortical dynein attachment. *Cell Cycle*, 8(19), 3182-3190.
- Taylor, A. B., Smith, B. S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., ... Deisenhofer, J. (2001). Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure*, 9(7), 615-625.
- Terziyska, N., Lutz, T., Kozany, C., Mokranjac, D., Mesecke, N., Neupert, W., ... Hell, K. (2005). Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Letters*, 579(1), 179-184.
- Theurey, P., Tubbs, E., Vial, G., Jacquemetton, J., Bendridi, N., Chauvin, M. A., ..., Rieusset, J. (2016). Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. *Journal of molecular cell biology*, 8(2), 129-143.
- Titorenko, V. I., Nicaud, J. M., Wang, H., Chan, H., Rachubinski, R. A. (2002). Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of cell biology*, 156(3), 481-494.
- Tower, R. J., Fagarasanu, A., Aitchison, J. D., Rachubinski, R. A. (2011). The peroxin Pex34p functions with the Pex11 family of peroxisomal divisional proteins to regulate the peroxisome population in yeast. *Molecular biology of the cell*, 22(10), 1727-1738.
- Trotter, P. J., Hagerman, R. A., Voelker, D. R. (1999). A yeast strain defective in oleic acid utilization has a mutation in the RML2 gene. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1438, 223–238.
- Trotter, P. J., Pedretti, J., Voelker, D. R. (1993). Phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of mutants, cloning of the gene, and creation of a null allele. *Journal of Biological Chemistry*, 268(28), 21416-21424.
- Van der Klei, I. J., Yurimoto, H., Sakai, Y., Veenhuis, M. (2006). The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1763(12), 1453–1462.
- Van der Leij, I., Franse, M. M., Elgersma, Y., Distel, B., Tabak, H. F. (1993). PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11782-11786.
- Van Roermund, C. W., Drissen, R., Van den Berg, M., Ijlst, L., Hetteema, E. H., Tabak, H. F., ... Wanders, R. J. (2001). Identification of a peroxisomal ATP carrier required for medium-chain fatty acid β -oxidation and normal peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 21(13), 4321-4329.
- Van Roermund, C. W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R. J., Tabak, H. (1995). The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD (H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *The EMBO journal*, 14(14), 3480-3486.
- Van Roermund, C. W., Hetteema, E. H., Van den Berg, M., Tabak, H. F., Wanders, R. J. (1999). Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *The EMBO Journal*, 18(21), 5843-5852.

- Van Wilpe, S., Ryan, M., Hill, K., *et al.* (1999). Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, *401*, 485–489.
- Veenhuis, M., Van Dijken, J. P., Pilon, S. A. F., *et al.* (1978). Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Arch Microbiol*, *117*, 153–163.
- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology*, *175*(2), 237–247.
- Vögtle FN, Burkhart JM, Rao S, Gerbeth C, Hinrichs J, Martinou J-C, *et al.* (2012) Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Molecular cell Proteomics*, *11*, 1840–1852.
- Vögtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C (2009) Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell*, *139*(2), 428-39.
- Völkl A, Mohr H, Fahimi HD. (1999) Peroxisome Subpopulations of the Rat Liver: Isolation by Immune Free Flow Electrophoresis. *J Histochem Cytochem*, *47*(9), 1111-1117.
- Walter T, Erdmann R (2019) Current Advances in Protein Import into Peroxisomes. *Protein J*, *38*, 351–362.
- Wanders, R. J. A. (2014). Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie*, *98*, 36-44.
- Wanders, R. J. A., Waterham, H. R., Ferdinandusse, S. (2018). *Sub-cell Biochem*, *89*, 345–365.
- Weber, T. A., Koob, S., Heide, H., Wittig, I., Head, B., Van der Blik, A., ... Reichert, A. S. (2013). APOOL is a cardiolipin-binding constituent of the Mitofilin/MINOS protein complex determining cristae morphology in mammalian mitochondria. *PLoS one*, *8*(5), e63683.
- West, M., Zurek, N., Hoenger, A., Voeltz, G. K. (2011). A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *Journal of Cell Biology*, *193*(2), 333-346.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M. T., ... Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*, *424*(6948), 565-571.
- Woodward, A. W., Bartel, B. (2005). The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Molecular biology of the cell*, *16*(2), 573-583.
- Woronin. (1864). Zur Entwicklungsgeschichte des *Ascobolus pulcherrimus* Cr und Pezizen. *Senckenberg Naturforsch Gesell.*
- Wozny, M. R., Di Luca, A., Morado, D. R., Picco, A., Khaddaj, R., Campomanes, P., ..., Kukulski, W. (2023). In situ architecture of the ER-mitochondria encounter structure. *Nature*, *618*, 188-192.
- Wu, W., Lin, C., Wu, K., Jiang, L., Wang, X., Li, W., ..., Feng, D. (2016). FUNDC 1 regulates mitochondrial dynamics at the ER-mitochondrial contact site under hypoxic conditions. *The EMBO journal*, *35*(13), 1368-1384.
- Yamano, K., Tanaka-Yamano, S., Endo, T. (2010). Tom7 regulates Mdm10-mediated assembly of the mitochondrial import channel protein Tom40. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(53), 41222-41231.
- Yang, X., Purdue, P. E., Lazarow, P. B. (2001). Eci1p uses a PTS1 to enter peroxisomes: either its own or that of a partner, Dci1p. *European Journal of Cell Biology*, *80*(2), 126-138.

- Yang, Z., Zhao, X., Xu, J., Shang, W., Tong, C. (2018). A novel fluorescent reporter detects plastic remodeling of mitochondria–ER contact sites. *Journal of Cell Science*, 131(1), jcs208686.
- Yifrach, E., Rudowitz, L. D., Cruz-Zaragoza, L., Tirosh, A., Gazi, Z., Peleg, *et al.* (2023). Determining the targeting specificity of the selective peroxisomal targeting factor Pex9. *Biological chemistry*, 404(2-3), 121-133.
- Yofe, I., Weill, U., Meurer, M., Chuartzman, S., Zalckvar, E., Goldman, O., ..., Schuldiner, M. (2016). One library to make them all: streamlining the creation of yeast libraries via a SWAp-Tag strategy. *Nat Methods*, 13, 371–378.
- Yogev, O., Pines, O. (2011). Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochimica et Biophysica Acta. (BBA)-Biomembranes*, 1808(3), 1012-1020.
- Yu, T., Robotham, J. L., Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2653-2658.
- Ziegler, D. V., Wiley, C. D., Velarde, M. C. (2015). Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging cell*, 14(1), 1–7.#
- Zung, N., Schuldiner, M. (2020). New horizons in mitochondrial contact site research. *Biological Chemistry*, 401(6-7), 793-809.

6 Anhang

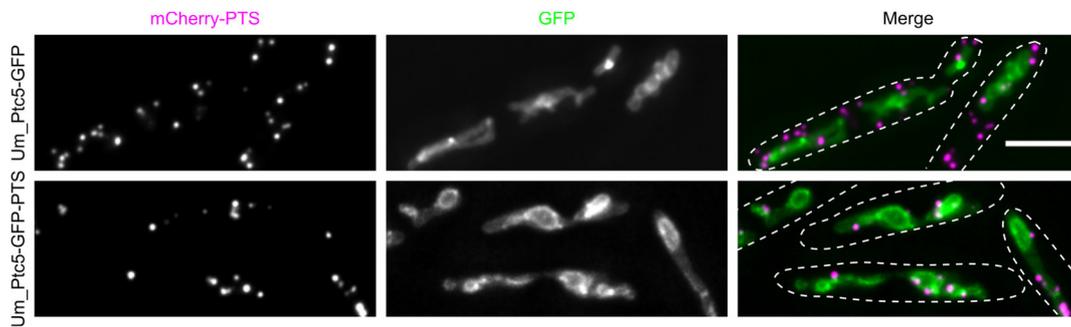


Abbildung A1: Einzelkanäle der Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung aus Abb. 5A. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Stämmen, die Um_Ptc5-GFP oder Um_Ptc5-GFP-PTS (grün) unter Kontrolle des starken konstitutiven *otef*-Promoters exprimieren. Die Expression erfolgte in einem Stamm der außerdem den peroxisomalen Marker mCherry-PTS (magenta) exprimierte. Der Maßstab entspricht 5µm.

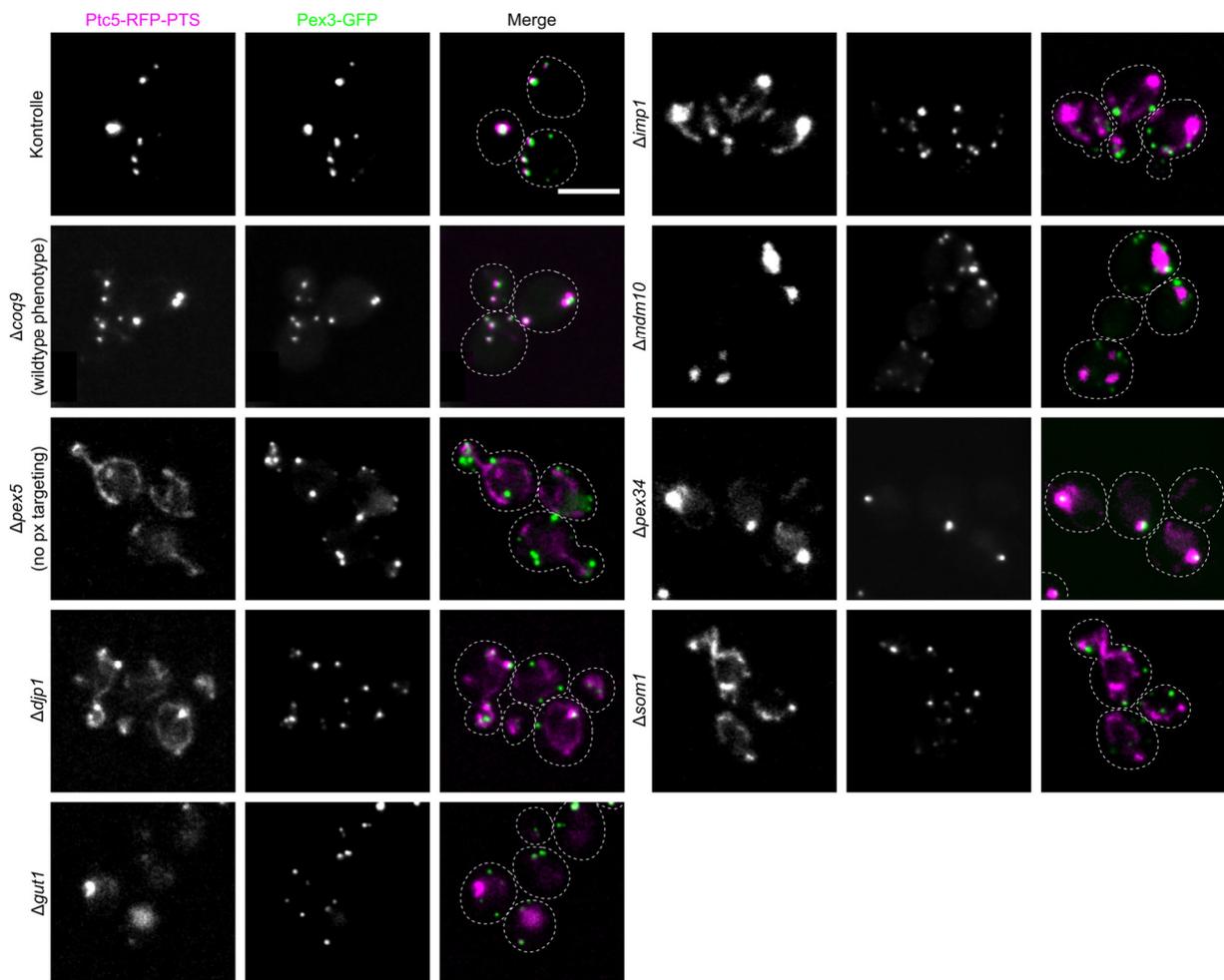


Abbildung A2: Einzelkanäle der Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung aus Abb. 20A. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der identifizierten Mutanten, in denen die peroxisomale Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS beeinträchtigt ist. Die Zellen exprimierten Ptc5-RFP-PTS (magenta) unter Kontrolle des konstitutiven *tefl*-Promoters sowie den peroxisomalen Marker Pex3-GFP (grün). Der Maßstab entspricht 5µm.

Tabelle A1: Liste der im Hochdurchsatzscreen identifizierten Kandidatengene mit Einfluss auf die peroxisomale Lokalisation von Ptc5-RFP-PTS.

Gen	Beschreibung (Lokalisierung und Funktion des Genprodukts)
<i>CNL1</i>	Zytosol; Untereinheit des BLOC-1-Komplexes, beteiligt an der Endosomenreifung
<i>DJP1</i>	ER; Chaperon, das am Protein-Targeting beteiligt ist (ER-SURF)
<i>ERI1</i>	ER; Beteiligt an der Biosynthese von GPI-Ankern
<i>GCD2</i>	Cytosol; Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF2B
<i>GUT1</i>	Mitochondrien; Glycerinkinase
<i>IMP1</i>	Mitochondrien; Untereinheit des IMP-Komplexes
<i>LRP1</i>	Zellkern; Mit dem Exosom assoziiertes nukleinsäurebindendes Protein
<i>MDL2</i>	Mitochondrien; ABC-Transporter der inneren Membran
<i>MDM10</i>	Mitochondrien; Untereinheit des ERMES- und des SAM-Komplexes
<i>MET7</i>	Zytosol/Zellkern; Folylpolylglutamat-Synthetase
<i>OPI3</i>	ER/Mitochondrien; Metylen-Fettsäure-Phospholipid-Synthase
<i>PEX1</i>	Peroxisom; AAA-ATPase
<i>PEX10</i>	Peroxisom; E3-Ubiquitin-Ligase
<i>PEX12</i>	Peroxisom; C3HC4-Typ-RING-Finger-Peroxin und E3-Ubiquitin-Ligase
<i>PEX13</i>	Peroxisom; Komponente des Importomer-Komplexes
<i>PEX14</i>	Peroxisom; Komponente des Importomer-Komplexes
<i>PEX15</i>	Peroxisom; Erfürderlich für die Peroxisombiogenese
<i>PEX19</i>	Peroxisom; Chaperon und Importrezeptor für PMPs
<i>PEX2</i>	Peroxisom; RING-Finger-Peroxin und E3-Ubiquitin-Ligase
<i>PEX4</i>	Peroxisom; Ubiquitin-Konjugase
<i>PEX5</i>	Peroxisom; PTS1-Importrezeptor
<i>PEX6</i>	Peroxisom; AAA-ATPase
<i>PEX8</i>	Peroxisom; Intraperoxisomaler Organisator der peroxisomalen Importmaschinerie
<i>SAM4</i>	Cytosol/Zellkern; S-Adenosylmethionin-Homocystein-Methyltransferase
<i>SOM1</i>	Mitochondrien; Untereinheit des IMP-Komplexes
<i>SWR1</i>	Zellkern; Swi2/Snf2-verwandte ATPase
<i>VAM3</i>	Vakuole; Syntaxin-ähnliche t-SNARE
<i>YDL023C</i>	nicht charakterisierter ORF, überlappt mit <i>GDP1</i>
<i>YIM2</i>	nicht charakterisierter ORF, überlappt mit <i>IMP1</i>
<i>YKR078W</i>	Zytosol; uncharakterisiert
<i>YNL226W</i>	nicht charakterisierter ORF, überlappt mit <i>JJJ1</i>

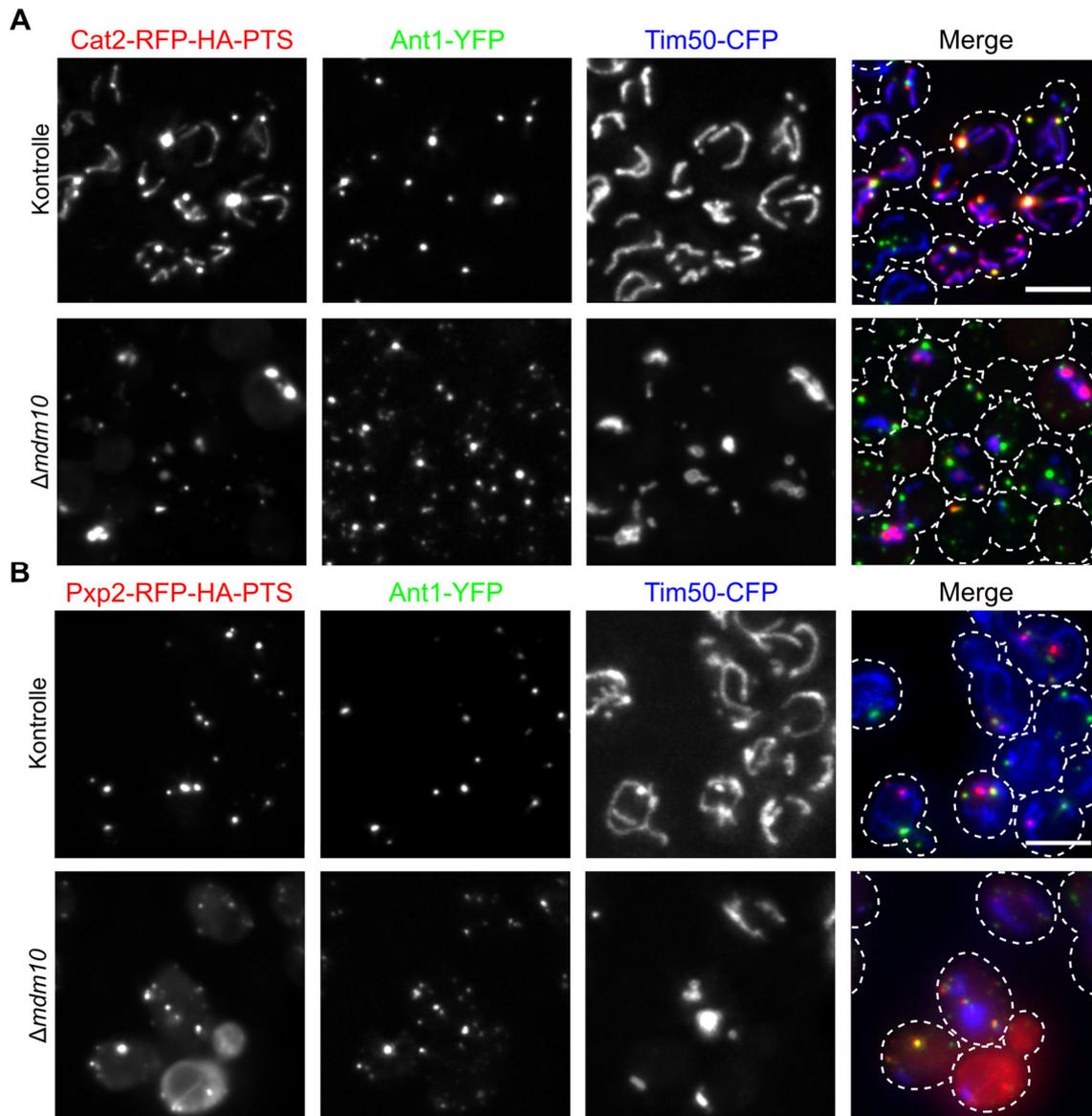


Abbildung A3: Einzelkanäle der Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung aus Abb. 25A und B. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Cat2-RFP-HA-PTS (rot) in $\Delta mdm10$ -Zellen. Die Zellen exprimierten außerdem den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50-CFP (blau). Der Maßstab entspricht 5 μ m. B) Wie in A). Die Zellen exprimierten Pxp2-RFP-HA-PTS (rot).

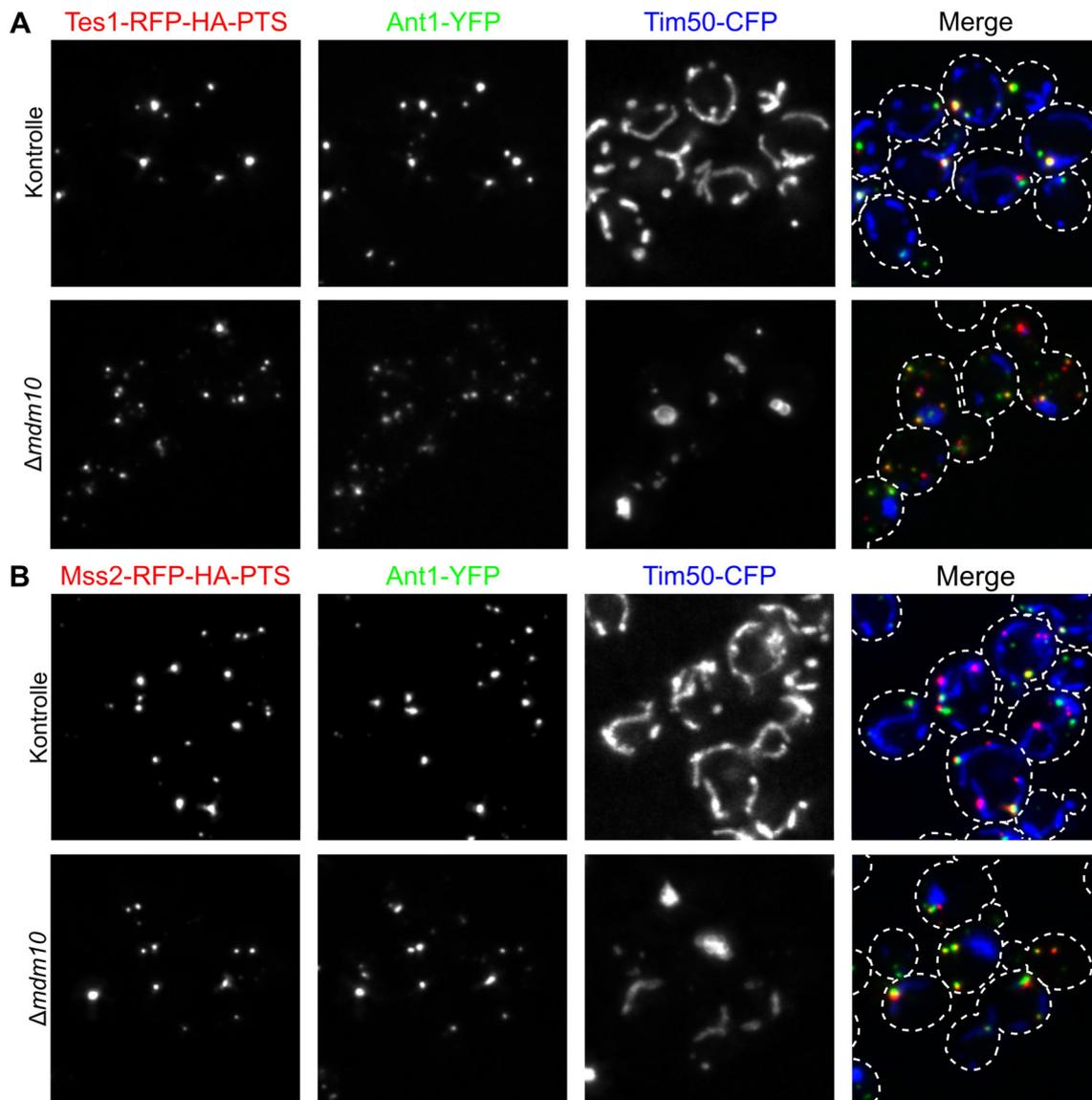


Abbildung A4: Einzelkanäle der Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung aus Abb. 25C und D. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Tes1-RFP-HA-PTS (rot) in $\Delta mdm10$ -Zellen. Die Zellen exprimierten außerdem den peroxisomalen Marker Ant1-YFP (grün) und den mitochondrialen Marker Tim50-CFP (blau). Der Maßstab entspricht 5 μ m. B) Wie in A). Die Zellen exprimierten Mss2-RFP-HA-PTS (rot).

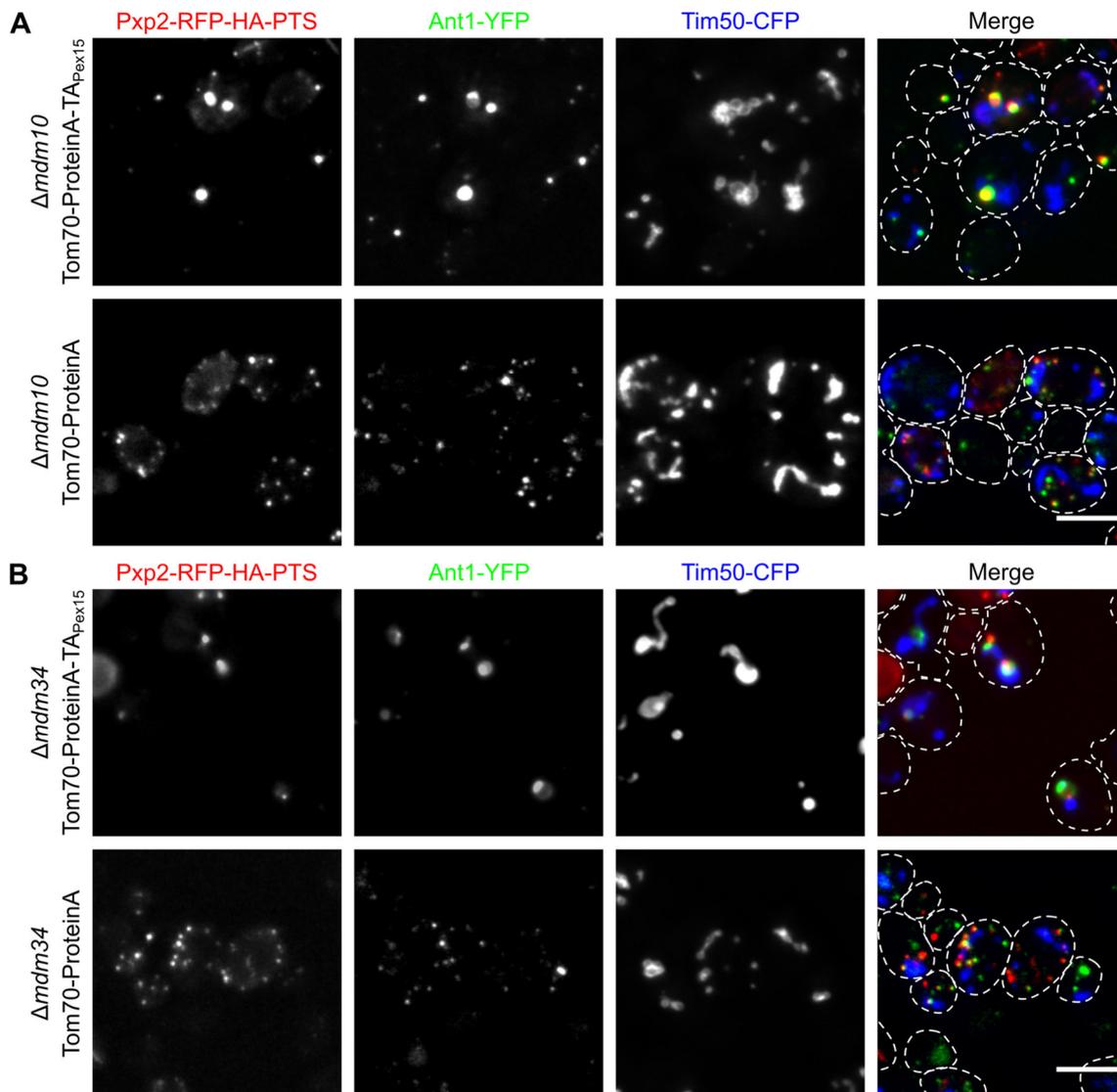


Abbildung A5: Einzelkanäle der Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung aus Abb. 35. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von Pxp2-RFP-HA-PTS (rot) in ERMES-Mutanten, die einen synthetischen Tether für Peroxisomen und Mitochondrien exprimierten. Die Visualisierung von Peroxisomen erfolgte durch das Markerprotein Ant1-YFP (grün) und mitochondriale Strukturen wurden durch Tim50-CFP (blau) visualisiert. Der Maßstab entspricht 5µm.

Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich an Johannes Freitag richten. Seine wissenschaftliche Anleitung und die Zusammenarbeit waren für mich von unschätzbarem Wert. Darüber hinaus verdient er meinen aufrichtigen Dank für seine hilfreiche Unterstützung bei der Planung, Umsetzung und Korrektur dieser Arbeit. Die Zusammenarbeit in einem freundschaftlichen und vertrauensvollen Umfeld war eine Bereicherung.

Einen weiteren Dank richte ich an Michael Bölker, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Auch für das Erstellen eines zweiten Gutachtens und die Unterstützung in allen anderen Anliegen bin ich ihm sehr dankbar.

Gert Bange danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine Unterstützung und Bereitschaft, Mitglied meiner Prüfungskommission zu sein. Ebenso gilt mein Dank Martin Thanbichler für seine Unterstützung als weiteres Mitglied meiner Prüfungskommission.

Allen Mitgliedern der ehemaligen AG Bölker möchte ich herzlich für die vertrauensvolle und familiäre Arbeitsatmosphäre danken. Der regelmäßige Austausch von Ideen und Materialien sowie die vielen schönen Momente im Labor und darüber hinaus haben mein Leben bereichert. Insbesondere möchte ich Thorsten für die jahrelange Anleitung im Laboralltag, seine Geduld und zuverlässige Hilfe bei allen kleinen und großen Problemen meinen Dank aussprechen.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitgliedern der AG Bange für die herzliche Aufnahme und Integration in das Team. Besonders Victor, Marvin und Paul danke ich für zahlreiche entspannende Kaffeepausen, die Hilfe bei der Orientierung im neuen Labor und natürlich die schönen Erlebnisse außerhalb des Arbeitsalltags. Thomas Heimerl möchte ich für die erfolgreiche Kooperation und die spannende Einführung in die Elektronenmikroskopie danken. Meinen Freunden danke ich für die gemeinsam verbrachte schöne Zeit in Marburg. Fabienne und Nils für die vielen Abendessen und die Unterstützung in jeder Lebenslage – nicht zu vergessen auch das liebevolle Hüten meiner Katze während langer und kurzer Reisen. Und natürlich das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ein besonderer Dank gilt auch Jannik, der mich während meines gesamten Studiums als wissenschaftlicher Partner und guter Freund begleitet hat. Bei Julia möchte ich mich herzlich für die lange Freundschaft und das spontane Korrekturlesen dieses kryptischen Textes bedanken.

Auch meiner Mutter möchte ich einen besonderen Dank aussprechen. Ihre bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums hat einen maßgeblichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.