

Untersuchung des Myo2-abhängigen Transports von Mitochondrien in *Saccharomyces cerevisiae*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften
(BayNAT)

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Nadine Susanne Karola Hock

aus *Groß-Umstadt*

Bayreuth, 2018

Zusammenfassung

Mitochondrien sind an wichtigen Prozessen eukaryotischer Zellen beteiligt und daher essentiell für deren Überleben. In den Zellen bilden sie ein dynamisches Netzwerk. Da Mitochondrien von der Zelle nicht *de novo* gebildet werden können, ist die korrekte Vererbung während der Zellteilung unabdingbar. In *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) werden sie mithilfe des Motorproteins Myo2 entlang des Aktin-Zytoskeletts in die Knospe transportiert. Der genaue Mechanismus, sowie ein mitochondrialer Myo2-Rezeptor sind bisher nicht bekannt und sollten im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden. Zur Identifizierung unbekannter Komponenten des Myo2-vermittelten Transports von Mitochondrien, wurde das artifizielle Konstrukt Myo2-Fis1 herangezogen (Förtsch et al., 2011). Dort ist die Aktinbindedomäne von Myo2 konstitutiv an Mitochondrien gebunden und forciert deren Transport in die Knospe. Myo2-Fis1 wurde in einem Hochdurchsatzverfahren in Hefe-Deletionsbibliotheken mit mehreren tausend mutanten Stämmen eingebracht und das Wuchsverhalten der einzelnen Stämme analysiert. Auf diese Art konnten ca. 150 Stämme identifiziert werden, deren Wachstum durch Myo2-Fis1 positiv oder negativ beeinflusst wurde. Es zeigte sich unter anderem ein starker Wuchsdefekt in Fusionsmutanten, deren Mitochondrien fragmentiert in der Zelle vorliegen. Ebenso war in diesen Fusionsmutanten die Kombination mit der Myo2-Variante Myo2(LQ) letal (Böckler et al., 2017). In *myo2(LQ)*-Zellen ist der Transport der Mitochondrien vermindert. Waren die Mitochondrien fragmentiert, konnten bei eingeschränktem Transport zu wenige Mitochondrien in die Knospe gelangen, während umgekehrt bei erzwungenem Transport in die Knospe nicht ausreichend Mitochondrien in der Mutter zurückgehalten wurden. Die Wiederherstellung eines verzweigten, jedoch adynamischen Netzwerkes in der Doppelmutante $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ war bereits ausreichend, um lebensfähige Hefen zu erhalten. Das bedeutet, dass das Vorhandensein wildtypischen Fzo1 nicht notwendig ist, sondern dass bereits der fusionierte Zustand der Mitochondrien die Überlebensfähigkeit von Zellen mit erniedrigtem oder erhöhtem Mitochondrientransport bedingt. Alterungsanalysen zeigten zudem, dass der eingeschränkte mitochondriale Transport der Mutante *myo2(LQ)* eine starke Rolle während des replikativen Alterns spielt. Es wurde daher angenommen, dass Knospen nicht oder vermindert lebensfähig sind, wenn zu wenig mitochondriale Masse aus der Mutter in die Tochterzelle gelangt.

Summary

Mitochondria are involved in important processes in eukaryotic cells and are therefore essential for their survival. They form a dynamic network in the cells. As mitochondria cannot be synthesized *de novo* by the cell, their correct inheritance during cell division is crucial. In *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) they are transported via the motor protein Myo2 along the actin-cytoskeleton into the bud. The exact mechanism, as well as the mitochondrial Myo2-receptor are unknown and were being further examined in this thesis. For the identification of further components involved in the Myo2-mediated transport of mitochondria, the artificial construct Myo2-Fis1 was used (Förtsch et al., 2011). In Myo2-Fis1 the actin-binding domain of Myo2 is constitutively bound to mitochondria and forces their transport into the bud. In a high throughput approach Myo2-Fis1 was introduced into yeast deletion libraries containing several thousand mutant strains and the growth of the strains was analyzed. That way, approximately 150 strains were identified, whose growth was positively or negatively influenced by Myo2-Fis1. Among others, a strong growth defect was observed in fusion mutants, which contained fragmented mitochondria. At the same time a combination of the fusion mutants with the Myo2 version Myo2(LQ) turned out to be lethal (Böckler et al., 2017). In *myo2(LQ)* cells the mitochondrial transport is decreased. When mitochondria were fragmented, upon forced transport into the bud too little of them could be retained in the mother cell. On the other hand, when the transport was diminished, not enough mitochondria reached the bud. The restoration of a branched, but undynamic network in the double mutant $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ was already sufficient to obtain viable yeast cells. This means that not the presence of wildtype Fzo1 is necessary. Instead even the fused state of mitochondria causes the survival of cells with reduced or elevated mitochondrial transport. Additionally, aging analysis showed that the reduced mitochondrial transport in the mutant *myo2(LQ)* plays a prominent role during replicative aging. It was assumed that buds of the transport mutant are less viable or even not viable at all when insufficient mitochondrial mass from the mother reaches the daughter cell.