

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

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 10/2012 bis 07/2018 in Bayreuth am Institut für Zellbiologie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Benedikt Westermann angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 24.07.2018

Zulassung durch das Leitungsgremium: 30.07.2018

Wissenschaftliches Kolloquium: 05.12.2018

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Dirk Schüler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Benedikt Westermann (Gutachter)

Prof. Dr. Stefan Heidmann (Gutachter)

Prof. Dr. Angelika Mustroph (Vorsitz)

Prof. Dr. Klaus Ersfeld

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Benedikt Westermann, dass er mir die Möglichkeit geboten hat diese Arbeit durchzuführen. Vielen Dank für die stets offene Tür und die Unterstützung in allen Situationen.

Danke auch an Herrn Prof. Dr. Olaf Stemmann und Herrn Prof. Dr. Klaus Ersfeld für die konstruktiven Mentoratsgespräche.

Weiterhin danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie, die mich während der Promotion begleitet und unterstützt haben. Besonderer Dank geht an Maria Stenger, Xenia Chelius, Stefan Böckler und Till Klecker für die hilfreichen und auch lustigen Gespräche.

Danke an Annette Suske und Petra Helies, ohne die im Labor gar nichts laufen würde.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an meinen Freund Sebastian und meine Familie, die mich stets in allen Lagen unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

5-FOA	5-Fluororotische Säure (<i>5-fluoroorotic acid</i>)
Amp	Ampicillin
Can	Canavanin
DAmP	<i>decreased abundance by mRNA perturbation</i>
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIC	differentieller Interferenzkontrast (<i>differential interference contrast</i>)
DOX	Doxycyclin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCs	<i>extrachromosomal rDNA circles</i>
ERMES	<i>ER mitochondria encounter structure</i>
G418	Geneticin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Kan	Kanamycin
NAT, NTC	Nourseothricin
MEP	<i>mother enrichment program</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSG	<i>mono-sodium glutamate</i>
gDNA	genomische DNA
mtDNA	mitochondriale DNA
mtGFP	GFP mit mitochondrialer Präsequenz
mtRFP	RFP mit mitochondrialer Präsequenz
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
rDNA	ribosomale DNA

RFP	rot fluoreszierendes Protein
RLS	replikative Lebensspanne
RT	Raumtemperatur
SC	<i>synthetic complete</i>
SCD	synthetisches Medium mit Glucose (Dextrose) als Kohlenstoff-Quelle
SGA	<i>synthetic genetic array</i>
ÜNK	Übernachtkultur
vCLAMP	<i>vacuolar and mitochondrial patch</i>
WT	Wildtyp
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast extract + peptone + dextrose</i>
YPG	<i>yeast extract + peptone + glycerol</i>

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	IX
Summary	X
1. Einleitung	1
1.1 Die Mitochondrien	1
1.2 Fusion und Teilung der Mitochondrien	3
1.3 Der mitochondriale Transport in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.4 Alterungsprozesse in Zellen	10
1.5 Die asymmetrische Zellteilung	13
1.6 <i>S. cerevisiae</i> als Modellorganismus	15
1.7 <i>Synthetic Genetic Array</i> (SGA)	16
1.8 Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Molekularbiologische Methoden	19
2.1.1 Plasmide und Primer	19
2.1.2 Klonierung Haploidenselektionsplasmid	20
2.2 Methoden der Hefegenetik	21
2.2.1 Hefestämme	21
2.2.2 Stammkonstruktion für den Überexpressionsscreen	26
2.2.3 Alterungsanalysen	27
2.2.3.1 Mother Enrichment Program	27
2.2.3.2 Alterungsanalyse am Mikromanipulator	27
2.2.4 Tüpfeltest	28

2.2.5 Tetradendisektion	28
2.2.6 <i>Synthetic genetic array (SGA)</i>	28
2.2.7 Auswertung der SGA	30
2.3 Fluoreszenzmikroskopie	31
2.3.1 Färbung von Zellstrukturen für die Mikroskopie	32
2.3.1.1 Rhodaminfärbung.....	32
2.3.1.2 CMAC Färbung.....	32
2.4 Statistik	32
3. Ergebnisse und Diskussion	33
3.1 Methoden zur Selektion haploider Hefezellen.....	33
3.2 Versuch der Analyse essentieller Gene im Hochdurchsatz-Verfahren	36
3.3 Identifizierung von Interaktoren des Myo2-abhängigen Mitochondrien-Transportes..	40
3.3.1 SGA-Screen ausgewählter <i>MMR1</i> -Doppelmutanten bei Expression von Myo2-Fis1	40
3.3.2 SGA-Screen der <i>MATa</i> -Bibliothek bei Expression von Myo2-Fis1	50
3.3.2.1 Einfluss positiver Interaktoren von Myo2-Fis1 auf die mitochondriale Vererbung	57
3.4 Untersuchung des Zusammenhangs von Fusion und Transport von Mitochondrien....	60
3.4.1 $\Delta fzo1$ <i>myo2-fis1</i> ist letal.....	60
3.4.2 Der Verlust mitochondrialer DNA bedingt nicht die verringerte Lebensfähigkeit von <i>$\Delta fzo1$ myo2-fis1</i>	64
3.4.3 Mitochondrien werden in <i>$\Delta fzo1$</i> nicht ausreichend in der Mutterzelle zurückgehalten.....	65
3.4.4 <i>$\Delta fzo1$ myo2(LQ)</i> ist letal	68
3.4.5 <i>Multi-Copy-Suppressor-Screen</i> mit <i>$\Delta fzo1$ myo2(LQ)</i>	71
3.5. Rolle der Mitochondriendynamik bei Alterungsprozessen	73
3.5.1 Mother Enrichment Program.....	73

3.5.2 Alterungsanalysen am Mikromanipulator	76
3.5.2.1 <i>myo2(LQ)</i> und $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ <i>myo2(LQ)</i> weisen eine signifikant verminderte durchschnittliche Lebensspanne auf.....	76
3.5.2.2 Die verkürzte Lebensspanne von <i>myo2(LQ)</i> ist unabhängig von der Vakuolenvererbung.....	78
4. Schlussfolgerungen und Ausblick	83
Literaturverzeichnis.....	86
Anhang.....	101
Bibliothek negativer Interaktoren von <i>MMR1</i>	101
Überlapp der Interaktoren der beiden SGA-Durchgänge der <i>MATa</i> -Bibliothek mit <i>myo2-fis1</i>	102
GO-Term Analysen negativer Interaktoren der beiden SGA-Durchgänge der <i>MATa</i> -Bibliothek mit <i>myo2-fis1</i>	104
Beiliegende CD.....	106
(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen	107

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.

1. Einleitung

1.1 Die Mitochondrien

Bereits vor über 160 Jahren wurden Mitochondrien in Muskelzellen beobachtet (von Kölliker, 1857). Carl von Benda gab ihnen 1898 diesen Namen, der sich aus den griechischen Wörtern *mitos* (Faden) und *chondrion* (Körnchen) zusammensetzt. Vor mehr als 100 Jahren wurde zudem die Endosymbiontentheorie formuliert und in den 1960er Jahren des letzten Jahrhunderts wieder aufgegriffen (Margulis, 1970; Mereschkowsky, 1905; Sagan, 1967; Schimper, 1883). Diese besagt, dass es sich bei Mitochondrien anfänglich um Bakterien handelte, die von einer anderen Zelle aufgenommen wurden. Die Sequenzanalyse 16S ribosomaler RNA der Mitochondrien erbrachte, dass sie von einem α -Proteobakterium abstammen dürften (Yang et al., 1985). Ein Relikt dieses Vorgangs ist, dass Mitochondrien von zwei Membranen umgeben sind. Zwischen der mitochondrialen Außenmembran und der mitochondrialen Innenmembran liegt der sogenannte Intermembranraum. Die Innenmembran weist Invaginationen, die Cristae, auf (Frey und Mannella, 2000). In der Cristae-Membran befindet sich die ATP-Synthase sowie die Bestandteile der Elektronentransportkette. Dort findet die oxidative Phosphorylierung statt (Wurm und Jakobs, 2006). Die mitochondriale Innenmembran umgibt die mitochondriale Matrix. Mitochondrien enthalten ein eigenes Genom, die mitochondriale DNA (mtDNA), welche in der Matrix zu finden ist (Nass und Nass, 1963; Schatz et al., 1964). Die meisten der ursprünglichen mitochondrialen Gene sind im Laufe der Zeit in das Kerngenom transferiert worden. Einige Gene für Komponenten der Atmungskette und der mitochondrialen Translationsmaschinerie sind jedoch noch immer mitochondrial kodiert (Chen und Butow, 2005). Mitochondrien können nicht *de novo* entstehen, sondern bilden sich durch Teilung bereits bestehender Mitochondrien. Da in den Mitochondrien wichtige Prozesse wie die ATP-Synthese, die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern und der Lipidmetabolismus stattfinden, sind sie für das

Überleben der Zelle essentiell und dürfen während der Zellteilung nicht verloren gehen (Lill und Mühlenhoff, 2005; Scheffler, 2001).

Dabei sind Mitochondrien keine vom Rest der Zelle isolierten Organellen, sondern stehen in Kontakt zu zahlreichen anderen Zellbestandteilen. Der sogenannte ERMES-Komplex (*ER mitochondria encounter structure*) verknüpft beispielsweise in der Bäckerhefe das endoplasmatische Retikulum (ER) mit der mitochondrialen Außenmembran und besteht aus den Komponenten Mmm1, Mdm10, Mdm12, Mdm34 sowie Gem1 (Kornmann et al., 2009, 2011). Bisher ist noch nicht vollständig erforscht, welche Funktionen diese Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER haben. Ein Vorgang, der an diesen Stellen beobachtet werden kann, ist der Austausch von Lipiden. Zudem sind diese Kontakte unter anderem wichtig für den Calcium-Austausch und die mitochondriale Teilung (Friedman et al., 2011; Kornmann und Walter, 2010; Mao und Klionsky, 2013; Rowland und Voeltz, 2012; Tatsuta et al., 2014). Auch Kontakte der Mitochondrien mit Vakuolen sind erkannt worden (Elbaz-Alon et al., 2014; Hönscher et al., 2014). Die sogenannten vCLAMPs (*vacuolar and mitochondrial patch*) spielen vermutlich ebenfalls eine zum ERMES redundante Rolle im Lipidaustausch und könnten darüber hinaus für den Austausch von Aminosäuren wichtig sein (zusammengefasst in Murley und Nunnari, 2016). Zudem wurden Kontakte der Mitochondrien mit Peroxisomen beobachtet (Cohen et al., 2014). Diese befinden sich in unmittelbarer Nähe des ERMES-Komplexes. Eine mögliche Funktion dieser Kontakte könnte der Transport von Acetyl-CoA aus den Peroxisomen in die Mitochondrien sein. Dieses wird für den Citratzyklus in den Mitochondrien benötigt und wird sowohl in den Mitochondrien als auch in Peroxisomen gebildet. Die Kontakte könnten wichtig sein, um unter stationären Bedingungen Mitochondrien zusätzliches Acetyl-CoA zuzuführen, oder um die Acetyl-CoA Konzentration in bestimmten Kompartimenten der Mitochondrien hochzuhalten (Cohen et al., 2014).

1.2 Fusion und Teilung der Mitochondrien

Mitochondrien sind hoch dynamisch. Während in Lehrbüchern der Eindruck vermittelt wird, es handele sich um Organellen, die vereinzelt und isoliert in der Zelle vorliegen, so stellt sich die Realität weitaus komplexer dar. Die Mitochondrien bilden ein Netzwerk in der Zelle, das ständig Fusion und Teilung durchläuft. Diese Prozesse sind unter anderem wichtig für die Vererbung und die Aufrechterhaltung funktioneller Mitochondrien sowie für Apoptose (zusammengefasst in Hermann und Shaw, 1998 sowie Westermann, 2010). Die Fusion der Mitochondrien wird in *Saccharomyces cerevisiae* durch die Proteine Fzo1, Mgm1 und Ugo1 vermittelt. Die GTPase Fzo1 vermittelt dabei die Fusion der Außenmembran (Hermann et al., 1998). Ugo1, das wie Fzo1 in der mitochondrialen Außenmembran verankert ist, wirkt als Mediator zur Dynamin-verwandten GTPase Mgm1, welche für die Fusion der Innenmembran verantwortlich ist (Sesaki und Jensen, 2004; Wong et al., 2003). Mgm1 liegt in zwei Isoformen vor, die beide für die Fusion der Mitochondrien benötigt werden (Herlan et al., 2003). Eine Isoform lokalisiert im Intermembranraum zwischen Außen- und Innenmembran, die andere in der Innenmembran. Ist eines der drei Gene deletiert, so resultiert dies in der Fragmentierung der Mitochondrien, da die Mitochondrien einerseits nicht mehr fusionieren können, während sie gleichzeitig stetig Teilung durchlaufen (Wong et al., 2000).

Die Teilung der Mitochondrien wird in der Bäckerhefe durch die Dynamin-verwandte GTPase Dnm1, sowie Mdv1 und das mitochondriale Außenmembranprotein Fis1 vermittelt (Tieu und Nunnari, 2000; Tieu et al., 2002). Dabei rekrutiert Fis1 die Proteine Dnm1 und Mdv1 zu punktuellen Strukturen auf den Mitochondrien (Mozdy et al., 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Dnm1-Moleküle lagern sich spiralförmig zusammen, wirken bei der Teilung der Mitochondrien als kontraktile Ring und schnüren diese ab (Ingelman et al., 2005). Diese Spiralen sind jedoch zu klein, um sich um die Mitochondrien legen zu können. Möglich wird dies jedoch, indem sich das ER um die Mitochondrien legt und diese einschnürt, bis sich der Dnm1-Ring um diese Einschnürungen legen kann (Friedman et al., 2011). In $\Delta dnm1$ Zellen liegt die mitochondriale Masse als verknüpftes Netzwerk vor (Bleazard et al., 1999). Fehlen sowohl Dnm1 als auch

Fzo1, so laufen in der Zelle weder Fusion noch Teilung ab. Die Mitochondrien liegen wildtypähnlich verzweigt vor, weisen jedoch keine Dynamik auf (Sesaki und Jensen, 1999). In $\Delta fzo1$ kann neben dem Fusionsdefekt der Verlust mitochondrialer DNA beobachtet werden (Hermann et al., 1998; Rapaport et al., 1998). Der Verlust der mtDNA wird verhindert, wenn neben *FZO1* auch *DNM1* deletiert ist (Bleazard et al., 1999).

1.3 Der mitochondriale Transport in *Saccharomyces cerevisiae*

Nicht nur ihre dynamische Natur ist wichtig, um in den Zellen stets funktionelle Mitochondrien vorliegen zu haben. Wie bereits erwähnt sind Mitochondrien essentielle Organellen. Daher muss während der Zellteilung sichergestellt sein, dass sowohl Mutter- als auch Tochterzelle Mitochondrien erhalten. Tatsächlich findet der Transport aktiv und kontrolliert statt. In vielen eukaryotischen Zellen werden Mitochondrien entlang der Mikrotubuli transportiert (Frederick und Shaw, 2007). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* findet der Transport hingegen entlang von Aktinfilamenten statt (Drubin et al., 1993; Lazzarino et al., 1994; Simon et al., 1995). Zeitweilig bestanden zwei Haupttheorien, wie der Transport der Mitochondrien erfolgt. Eine der Theorien besagt, dass die Mitochondrien mithilfe des sogenannten Arp2/3 Komplexes bewegt werden (Boldogh et al., 2001). Dieser Komplex besteht aus den beiden Aktin-verwandten Proteinen (*actin-related proteins*) Arp2 und Arp3 sowie fünf weiteren Proteinen. Der Arp2/3-Komplex initiiert die Entstehung von Aktin-Abzweigungen an bereits bestehenden Aktinfilamenten, wodurch sich in beweglichen Zellen an der Zellmembran Ausstülpungen (Pseudopodien) bilden, die zur Fortbewegung der Zellen führen (zusammengefasst in Pollard, 2007 sowie Pollard und Borisy, 2003). Pon und Kollegen beobachteten die Assoziation mehrerer Komponenten des Arp2/3-Komplexes mit Mitochondrien und postulierten, dass sich die Mitochondrien über Aktinpolymerisation fortbewegen. Jedoch erfolgt die Bewegung der Mitochondrien nicht frei, sondern entlang bereit bestehender Aktinfilamente (Fehrenbacher et al., 2004). Zudem ist der Transport der Mitochondrien stark eingeschränkt, wenn das Klasse V Myosin Myo2 mutiert ist (Altmann et al., 2008). Diese Beobachtungen führten zur zweiten Theorie, die mittlerweile als anerkannt

gilt. Diese besagt, dass Myo2 über einen bisher unbekannten Rezeptor an die Mitochondrien bindet und diese anterograd in die entstehende Tochterzelle, die sogenannte Knospe, transportiert (Altmann et al., 2008; Förtsch et al., 2011). Es findet auch ein, dem entgegengesetzter, retrograder Transport aus der Knospe in die Mutter statt. Vermutlich findet dieser Rücktransport der Mitochondrien passiv, durch den retrograden Aktinkabel-Fluss statt. Jedoch ist die Datenlage zu dieser Theorie noch nicht ausreichend. Als retrograder Aktinkabel-Fluss wird das Wachstum von Aktinkabeln von der Knospe in Richtung Mutter bezeichnet, das in Kapitel 1.5 näher erläutert wird (Higuchi et al., 2013; Yang und Pon, 2002).

Bei *MYO2* handelt es sich um ein essentielles Gen. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass das Motorprotein Myo2 auch für die korrekte Orientierung der Kernteilungsspindel mitverantwortlich ist (Hwang et al., 2003). Außerdem spielt Myo2 eine Rolle bei der Zytokinese, indem es sekretorische Vesikel an den Ort der Zellteilung transportiert (Wagner et al., 2002). Zudem werden z.B. auch Vakuolen und Peroxisomen von Myo2 transportiert (zusammengefasst in Fagarasanu et al., 2010). Neben Myo2 sind vermutlich auch Mmr1 und die kleine Rab GTPase Ypt11 am Transport der Mitochondrien beteiligt. Die Überexpression sowohl von *MMR1* als auch *YPT11* hat eine Akkumulation der Mitochondrien in der Knospe zur Folge (Chernyakov et al., 2013; Itoh et al., 2002, 2004). *MMR1* ist ein Faktor, der eine Rolle bei der Vererbung von Mitochondrien in die Knospe spielt. Mmr1 liegt unter anderem in distinkten Punkten in der Knospe vor. Dort scheint Mmr1 zusammen mit dem kortikalen ER eine Rolle bei der Verankerung von Mitochondrien in der Knospe zu spielen. Ist *MMR1* deletiert, so wird ein verstärkter Rücktransport der Mitochondrien von der Knospe zurück in die Mutter beobachtet (Swayne et al., 2011). Ursprünglich wurde vermutet, es könne sich bei Mmr1 um den Myo2-Rezeptor auf den Mitochondrien handeln, daher auch die Bezeichnung *Mitochondrial Myo2p Receptor-related* (Itoh et al., 2004). Bei Ypt11 handelt es sich um eine Rab GTPase, die nicht nur für die Vererbung von Mitochondrien, sondern auch für die des kortikalen ERs und des späten Golgis eine Rolle spielt (Arai et al., 2008; Buvelot Frei et al., 2006; Frederick et al., 2008). Es wurde

unter anderem vermutet, dass Ypt11 die Vererbung des ER bedingt und Mitochondrien nur passiv mittransportiert werden. Jedoch führt eine Verankerung von Ypt11 im ER zwar zu einer Akkumulation des ER in der Knospe, die Vererbung der Mitochondrien wird dadurch aber nicht gesteigert (Lewandowska et al., 2013). Ypt11 interagiert direkt mit Myo2 und fehlt Ypt11, so ist der Eintritt der Mitochondrien in die Knospe verzögert (Itoh et al., 2002). Da jedoch die Mutation von *MMR1* oder *YPT11* allein den Transport von Mitochondrien lediglich verzögert und keines dieser Gene essentiell ist, ist es unwahrscheinlich, dass eines dieser Proteine der Myo2-Rezeptor der Mitochondrien ist. Sind beide Gene deletiert, so sind die Zellen nicht lebensfähig (Itoh et al., 2004). Diese Doppelmutante kann durch einen forcierten Transport der Mitochondrien gerettet werden. Dies deutet darauf hin, dass beide Gene für die Vererbung der Mitochondrien wichtig sind, jedoch in voneinander unabhängigen Reaktionswegen aktiv sind (Chernyakov et al., 2013). Ein alleiniger mitochondrialer Myo2-Rezeptor wurde demnach noch nicht identifiziert. Bereits identifizierte Rezeptoren anderer Organellen erlauben Rückschlüsse darauf, welche Eigenschaften der mitochondriale Myo2-Rezeptor aufweisen könnte. Beispielsweise werden Vakuolen ebenfalls von Myo2 transportiert. Dabei bindet die Cargobindedomäne von Myo2 an Vac17, welches wiederum über seinen C-Terminus an das vakuoläre Membran-Protein Vac8 bindet (Ishikawa et al., 2003; Tang et al., 2003). Nach dem Transport in die Knospe wird Vac17 abgebaut. Wird dieser Abbau verhindert, so werden Vakuolen zunächst in die Knospe transportiert, wandern daraufhin jedoch in der Knospe zurück und akkumulieren am Mutter-Knospen-Hals. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der regulierte Abbau wichtig für die finale Lokalisierung der Vakuolen ist (Tang et al., 2003). Gleichzeitig steht so Myo2 wieder für andere Funktionen zur Verfügung. Im Falle der Peroxisomen geschieht dies über das peroxisomale Membranprotein Inp2, welches direkt mit Myo2 interagiert (Fagarasanu et al., 2006). Wird Inp2 überexprimiert, so akkumulieren Peroxisomen in der Knospe, während bei Deletion von *INP2* der Transport verhindert ist. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass auch der mitochondriale Myo2-Rezeptor direkt mit Myo2 interagieren sollte. Wie im Falle des vakuolären Rezeptors ist

jedoch nicht auszuschließen, dass mehrere Komponenten an der Verbindung von Myo2 zu den Mitochondrien beteiligt sind. Auf jeden Fall muss der Rezeptor an den Mitochondrien lokalisiert sein. Am naheliegendsten wären dabei Proteine, die mit der mitochondrialen Außenmembran assoziiert sind. In einem ersten Ansatz hatte Johannes König bereits versucht über ein *pulldown*-Experiment mitochondriale Proteine zu identifizieren, die mit der Cargobindedomäne von Myo2 physikalisch interagieren. Leider war dieser Ansatz nicht erfolgreich, da dabei vor allem ATPase Untereinheiten und Proteine der Mitochondrienmatrix bestimmt wurden (König, 2012).

Um sicherzustellen, dass bei dem Transport der Mitochondrien in die Knospe genug Mitochondrien in der Mutter zurückbleiben, sind diese über Mdm36 und Num1 an der Plasmamembran verankert (Kleckner et al., 2013; Lackner et al., 2013). Diese Verankerung spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Teilung der Mitochondrien. In $\Delta num1$ Zellen liegen die Mitochondrien als stark vernetztes Netzwerk vor, das dem von Teilungsmutanten ähnelt (Cervený et al., 2007). Werden die Mitochondrien durch künstliche Membrananker in der Plasmamembran verankert, so kann das wildtypische Netzwerk wiederhergestellt werden (Kleckner et al., 2013). Eine Übersicht der beschriebenen Komponenten der Mitochondrienvererbung ist in Abb. 1 dargestellt.

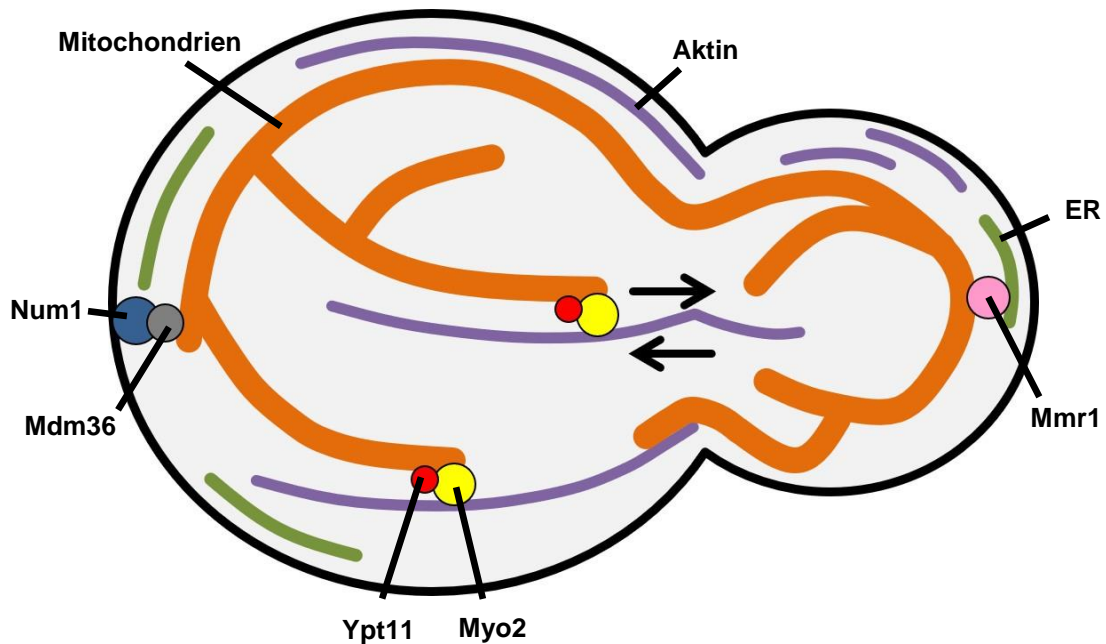


Abbildung 1: Mitochondrialer Transport in *S. cerevisiae*. Mitochondrien (orange) werden mithilfe von Myo2 (gelb) und Ypt11 (rot) entlang von Aktinfilamenten (lila) in die Knospe transportiert. Mmr1 (rosa) verbindet die Mitochondrien mit dem ER (grün) in der Knospe. Num1 (blau) und Mdm36 (grau) verankern die Mitochondrien in der Plasmamembran (schwarz) der Mutter.

Die Cargobindedomäne von Myo2 lässt sich in zwei Bereiche, Subdomäne I und II, einteilen (Pashkova et al., 2005). Beide Domänen sind nötig, um ein funktionelles Protein zu bilden. Sie unterscheiden sich in Struktur und Funktion. Während sich in Subdomäne I die Bindestellen für Vakuolen und Mitochondrien befinden, interagiert Subdomäne II mit sekretorischen Vesikeln und Peroxisomen (Altmann et al., 2008; Fagarasanu et al., 2006, 2010; Hill et al., 1996; Pashkova et al., 2006; Schott et al., 1999; Tang et al., 2003). In Subdomäne I konkurrieren dabei Vakuolen und Mitochondrien teilweise um die Bindestellen (Altmann et al., 2008; Taylor Eves et al., 2012).

Austausche der Aminosäuren Leucin 1301 (*L1301P*) und Glutamin 1233 (*Q1233R*) in Subdomäne I bewirken, dass der Transport von Mitochondrien und Vakuolen in die Knospe stark beeinträchtigt ist (Altmann et al., 2008; Catlett und Weisman, 1998; Catlett et al., 2000). Das entsprechende Allel, in dem beide Aminosäuren mutiert sind, wird als *myo2(LQ)*

bezeichnet (Förtsch et al., 2011). Dem entgegengesetzt resultiert die künstliche Verankerung von Myo2 in der mitochondrialen Außenmembran in verstärktem Transport in die Knospe. Das hierfür verwendete Fusionsprotein Myo2-Fis1 besteht aus der Transmembrandomäne von Fis1, welche in der mitochondrialen Außenmembran integriert (Mozdy et al., 2000) und der Aktinbindedomäne von Myo2 (Förtsch et al., 2011; Abb. 2). Fis1 ist nicht nur an der Teilung der Mitochondrien, sondern zusätzlich auch an der Teilung von Peroxisomen beteiligt und damit auch an diesen lokalisiert (Motley et al., 2008). Die Expression von Myo2-Fis1 hat daher zusätzlich einen Effekt auf die Verteilung der Peroxisomen, welcher jedoch relativ gering ist (Förtsch et al., 2011).

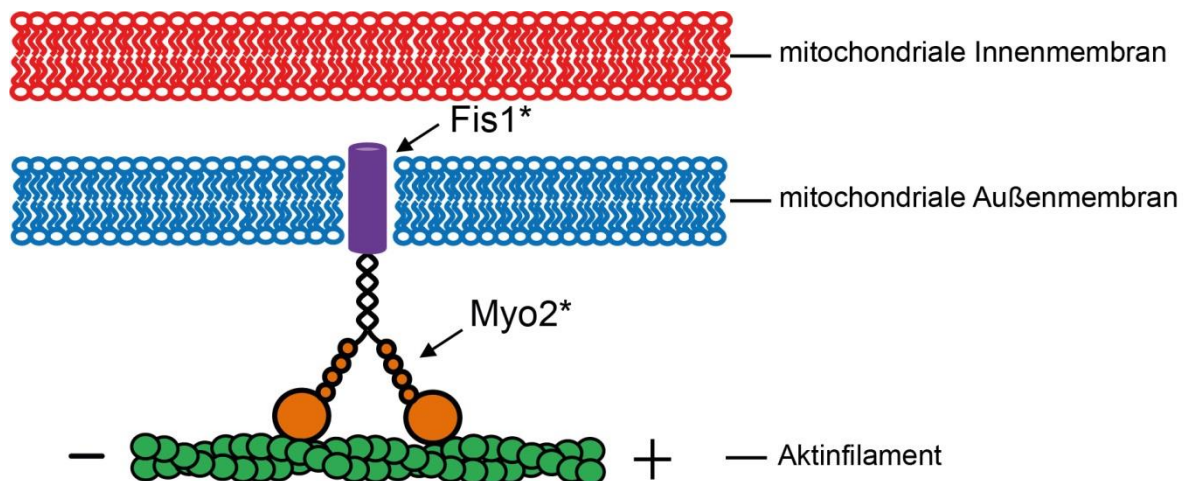


Abbildung 2: Myo2-Fis1 verankert Myo2 in den Mitochondrien. Fis1*: Transmembrandomäne von Fis1; Myo2*: Motor Domäne, IQ Wiederholungen und *coiled-coils* von Myo2.

Mithilfe von Myo2-Fis1 kann der Mitochondrien-Vererbungsdefekt in *myo2(LQ)*-Mutanten aufgehoben werden (Förtsch et al., 2011). Daher sollte es möglich sein, Myo2-Fis1 für genomweite Studien einzusetzen, um nach weiteren Genen zu suchen, die am Myo2-abhängigen Transport von Mitochondrien beteiligt sind und deren Vererbungsdefekte womöglich ebenfalls durch den von Myo2-Fis1 forcierten Transport gerettet werden.

1.4 Alterungsprozesse in Zellen

Die Vererbung ungeschädigter Mitochondrien hat nicht nur einen Einfluss auf die Fitness der Zellen, sondern wirkt sich auch auf die Lebensspanne der Tochterzellen aus (McFaline-Figueroa et al., 2011). Schon immer beschäftigt der Mensch sich mit der Frage, warum wir altern und ob dieser Prozess zu verlangsamen oder aufzuhalten ist. Auch *S. cerevisiae* dient bereits seit Langem als Modellorganismus zur Untersuchung von Alterungsprozessen. Mehrere Methoden sind mittlerweile bekannt, um die Auswirkung verschiedener Mutationen auf das Altern zu untersuchen. Zu unterscheiden ist hierbei zwischen der replikativen und der chronologischen Lebensspanne der Hefen. Die replikative Lebensspanne (RLS) wird bestimmt über die Teilungen, die eine einzelne Zelle durchlaufen kann, bis sie stirbt. Da mit der Zeit Schäden in den Zellen akkumulieren, ist die Lebensspanne der Zellen nicht unendlich. Die chronologische Lebensspanne ist die Zeitspanne, die eine Hefezelle ohne Teilung überlebt. Obwohl Bakterien keine asymmetrische Teilung wie Hefen durchlaufen, konnte auch in diesen Prokaryoten replikatives Altern festgestellt werden. Zellen, die nach der Teilung den älteren Pol eines Bakteriums enthalten, teilen sich mitunter langsamer als die Zellen, die am neu gebildeten Pol entstehen (zusammengefasst in Nyström, 2007).

Als Kontrolle für Alterungsanalysen wird mitunter die Mutante der Histon-Deacetylase *SIR2* herangezogen (Landry et al., 2000). $\Delta sir2$ weist eine deutlich verkürzte RLS im Vergleich zum Wildtyp auf. Ein Grund für die verkürzte RLS sind sogenannte ERCs (*extrachromosomal rDNA circles*). In $\Delta sir2$ akkumulieren diese ERCs in der Mutterzelle und führen dort zu Seneszenz (Kaeberlein et al., 1999; Sinclair und Guarente, 1997). Weitere bisher beschriebene Ursachen für das Altern der Hefezellen sind unter anderem die Akkumulation von Proteinaggregaten, sowie geschädigter Mitochondrien und anderer Organellen wie dem ER (Clay et al., 2014; Fabrizio und Longo, 2003; Hill et al., 2014; McFaline-Figueroa et al., 2011). Beschädigte Bestandteile werden mitunter durch selektive Autophagie entsorgt. Im Falle der Mitochondrien wird dieser Prozess als Mitophagie bezeichnet. Durch den Abbau von

Mitochondrien wird sichergestellt, dass die Menge und Qualität der Mitochondrien in der Zelle aufrechterhalten wird (Kanki et al., 2015).

Auch Proteinaggregate sind charakteristisch für die $\Delta sir2$ -Mutante und für Krankheiten wie Alzheimer oder Chorea Huntington (Aguilaniu et al., 2003; Arrasate und Finkbeiner, 2012; Erjavec et al., 2007; Gutekunst et al., 1999; Irvine et al., 2008). Während die Mutterzelle auf diese Weise mit jeder Teilung altert, werden schädliche Bestandteile nicht an die Töchter weitergegeben, sodass diese eine unverkürzte Lebensspanne aufweisen. Wie genau Proteinaggregate dabei zurückgehalten werden, ist bisher nicht eindeutig aufgeklärt. Es existieren dazu mehrere Theorien. Eine dieser Theorien besagt, dass Proteine in verschiedenen Kompartimenten in der Zelle aggregieren. Diese lokalisieren am Zellkern oder anderen Organellen, wie den Vakuolen. Diese Assoziation soll dazu beitragen, dass die Aggregate in der Mutter zurückgehalten werden. Bezeichnet wurden diese Einschlüsse als *juxtanuclear quality control compartment* (JUNQ) oder *insoluble protein deposit* (IPOD) (Spokoini et al., 2012). Eine andere Theorie beschreibt, dass Aggregate vom ER auf Mitochondrien übertragen werden. Die mit diesen Aggregaten beladenen Mitochondrien wiederum werden bei der Zellteilung in der Mutter zurückgehalten. Ist die Assoziation der Aggregate mit Mitochondrien reduziert, was in der Mutante $\Delta fis1$ der Fall ist, kann eine erhöhte Vererbung der Proteinaggregate an die Knospe festgestellt werden (Zhou et al., 2014).

Nähern sich die Mutterzellen jedoch dem Ende ihrer Lebensspanne, so können nicht mehr alle geschädigten Komponenten zurückgehalten werden. Tochterzellen, die zu diesem Zeitpunkt gebildet werden, weisen eine verkürzte Lebensspanne auf (zusammengefasst in Laun et al., 2007). Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. vermindertem Nährstoffangebot, durchlaufen diploiden Zellen zudem Meiose, aus der vier haploide Sporen (eine Tetrade) hervorgehen. Dieser Vorgang wird als Sporulation bezeichnet (Freese et al., 1982; Herskowitz, 1988). Dabei laufen zwei meiotische Teilungen im Zytoplasma der ursprünglichen Zelle ab.

Dort bilden sich Plasmamembranen um die vier entstehenden haploiden Zellkerne und formen die neuen Sporen. Die ursprüngliche Zelle bildet um diese Sporen den Ascus (zusammengefasst in Neiman, 2011). Durch die Sporulation wird der Alterungsprozess rückgängig gemacht, sodass Sporen, die von gealterten Zellen stammen, eine ähnliche Lebensspanne aufweisen wie Sporen, die von jungen Zellen abstammen. Dabei wurde beobachtet, dass sowohl Proteinaggregate als auch ERCs während der Sporulation verschwinden (Unal et al., 2011).

1959 beschrieben Mortimer und Johnston, wie Hefen mit einer feinen Nadel am Mikromanipulator ausgelegt und von den entstehenden Töchtern getrennt werden können. Nach jeder Teilung wird die Tochter von der beobachteten Zelle entfernt, bis diese schlussendlich abstirbt. Dies ermöglicht es, die RLS, d.h. die Anzahl der Teilungen bis zum Zelltod einzelner Zellen, zu bestimmen (Mortimer und Johnston, 1959). Eine weitere Methode zur Untersuchung replikativ gealterter Hefezellen ist das *Mother Enrichment Program* (MEP). Dieses wurde 2009 vorgestellt (Lindstrom und Gottschling, 2009). Mutterzellen sollen angereichert werden, ohne dass deren replikative Lebensspanne beeinträchtigt wird. Dazu konstruierten die Autoren einen Hefestamm, in dem Tochterzellen bei Estradiolzugabe teilungsunfähig werden, indem über ein Cre-loxP System in den Töchtern essentielle Gene inaktiviert werden. Dies wird durch ein Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 und dem Östrogenrezeptor aus der Maus erreicht. Diese Rekombinase ist nur unter Zugabe von Estradiol aktiv. Zusätzlich steht das Konstrukt unter der Kontrolle eines Tochter-spezifischen Promotors und wird daher nur in den Töchtern exprimiert. Als Zielgene, die ausgeschaltet werden sollen, wurden *UBC9* und *CDC20* gewählt. Diese sind für das Durchlaufen der Mitose essentiell. An den Genlokus der beiden Gene wurden daher jeweils zwei *loxP* Rekombinationsstellen integriert, wodurch jeweils ein Exon von *loxP*-Stellen flankiert wurde. Bei Estradiolzugabe wird die Cre-Rekombinase in den Töchtern aktiv und wandert in den Zellkern. Dort agiert sie an den *loxP*-Stellen und vermittelt an diesen ortsspezifische Rekombinationen, wodurch die *loxP*-flankierten Exons von *UBC9* und *CDC20*

entfernt werden. Wird jedoch kein Estradiol zugegeben, so können sich auch die Töchter normal teilen. Auf diese Weise ist es möglich, Mutterzellen in Flüssigmedium mit Estradiol anzureichern. Um zu bestimmten Zeitpunkten festzustellen, wie viele der Mütter noch lebens- bzw. teilungsfähig sind, kann eine definierte Zellzahl auf Agarplatten ohne Estradiol ausplattiert werden und anschließend die Kolonienzahl bestimmt werden. Auf den Platten können dabei nur die Zellen aus dem Flüssigmedium wachsen, bei denen es sich um ursprüngliche Mütter handelt. Denn alle Tochterzellen, die in der Flüssigkultur gebildet wurden, enthalten aufgrund der Rekombinase-Aktivität nicht die nötigen Mitosegene *UBC9* und *CDC20*, um sich zu teilen und Kolonien zu bilden.

Mit der MEP-Methode können mehrere Kulturen parallel und ohne großen Aufwand analysiert werden, da nach dem Start des Experiments lediglich einmal täglich Proben genommen und auf Platten appliziert werden. Jedoch teilen sich nicht immer alle Stämme im Flüssigmedium gleich schnell. Ein Nachteil der MEP-Methode besteht daher darin, dass man zu den verschiedenen Zeitpunkten nicht davon ausgehen kann, dass jeder Stamm sich genauso oft geteilt hat wie die anderen (Lindstrom und Gottschling, 2009). Die ältere Vorgehensweise der Bestimmung der RLS am Mikromanipulator ist im Vergleich deutlich aufwendiger, da jede einzelne Zelle in kurzen Abständen beobachtet werden muss. Zudem werden bei der älteren Methode die Zellen durch die verwendete Nadel mechanisch belastet, sodass eine Verfälschung der Ergebnisse auftreten kann. Jedoch wird bei dieser Methode jede Zelle einzeln betrachtet und phänotypische Auffälligkeiten können erfasst werden. Offensichtlich durch die Nadel beschädigte Zellen können aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Insgesamt lassen sich dadurch exaktere Beobachtungen aufstellen.

1.5 Die asymmetrische Zellteilung

S. cerevisiae vermehrt sich asymmetrisch durch Knospung (Hartwell und Unger, 1977). Dies bedeutet, dass aus dem Teilungsereignis zwei, sich voneinander unterscheidende, Zellen entstehen. Die wachsende Knospe erhält dabei alle notwendigen Zellbestandteile von der

Mutter, bevor sie abgetrennt wird. Die Verteilung der einzelnen Komponenten wird dabei streng reguliert. Einige Daten deuten darauf hin, dass so sichergestellt wird, dass die junge Knospe voll funktionsfähige, gesunde Mitochondrien erhält, während geschädigte Mitochondrien, welche z.B. ein niedrigeres Redoxpotential aufweisen, in der Mutter zurückgehalten werden (Klinger et al., 2010; McFaline-Figueroa et al., 2011). Auf diese Weise entstehen stets jungfräuliche, gesunde Tochterzellen, während Schäden in der Mutter akkumulieren. Ähnliches ist auch bei Stammzellen zu beobachten. Bei der Teilung werden hier jedoch die voll funktionsfähigen Mitochondrien in derjenigen Zelle zurückgehalten, die weiterhin Stammzeleigenschaften aufweist (Katajisto et al., 2015).

Bei der Zellteilung in *S. cerevisiae* beginnt sich zunächst eine Knospe zu formen. Dabei bilden sich punktartige, sogenannte Aktin-*Patches* sowie Aktin-Kabel aus. Zunächst werden endozytotische Proteine an die Stelle rekrutiert, an der die Knospe entsteht. Daraufhin erscheinen dort auch Proteine, die Aktin assemblieren, und führen zur Bildung der *Patches* (Engqvist-Goldstein und Drubin, 2003; Kaksonen et al., 2003, sowie zusammengefasst in Galletta und Cooper, 2009). Die *Patches* sind an der Spitze der sich bildenden Knospe zu finden, während sich die Kabel in Richtung der Mutter erstrecken. Für die Bildung der Aktinkabel in der Knospe und am Mutter-Knospenhals sind die Formine Bni1 und Bnr1 wichtig (Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002). Die Aktinkabel weisen ein *barbed-end* und ein *pointed-end* auf. Am *barbed-end*, welches an die Formine gebunden bleibt, werden die Kabel durch das Anfügen von globulärem Aktin polymerisiert, während sie am *pointed-end* depolymerisieren. Dadurch entsteht ein retrograder Aktinkabel-Fluss von der Knospe in Richtung der Mutterzelle (zusammengefasst in Campellone und Welch, 2010; Pruyne et al., 2002; Yang und Pon, 2002). Entlang der Aktinkabel werden dabei die für das Längenwachstum wichtigen Bestandteile transportiert. Hat die Knospe eine gewisse Größe erreicht, verändert sich die Verteilung der *Patches* und Kabel, woraufhin die Knospe sich in alle Dimensionen vergrößert. Enthält die Knospe alle wichtigen Bestandteile, wird sie durch einen Aktomyosinring abgeschnürt (zusammengefasst in Juanes und Piatti, 2016). Eine wichtige

Rolle bei der Zellteilung spielt zudem ein Septin-Ring. Bei diesem handelt es sich um einen Ring, der aus Hetero-Oktameren aus Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 und Shs1 (auch Sep7 genannt) zusammengesetzt ist (Bertin et al., 2008). Der Ring trägt nicht nur zur Zytokinese bei, sondern bildet auch eine Diffusionsbarriere und ist daran beteiligt, die Verteilung von Zellbestandteilen zu regulieren. Dies ist unter anderem für bestimmte mRNAs, sowie das ER bereits gezeigt worden (Barral et al., 2000; Clay et al., 2014; Luedeke et al., 2005; Takizawa et al., 2000). Septin-Mutanten weisen unter anderem einen vorzeitigen Austritt aus der Mitose auf. Normalerweise wird durch den Spindel-Kontrollpunkt sichergestellt, dass die Zellteilung erst erfolgt, wenn die entstehende Knospe ihren Zellkern erhalten hat (Bardin et al., 2000; Pereira et al., 2000). Eine wichtige Rolle spielen dabei u. a. die Proteine Tem1 und Lte1. Tem1 ist an der Regulation des Spindelkontrollpunkts beteiligt. Tem1 ist am Spindelpolkörper lokalisiert, welcher während der Zellteilung von der Mutter in die Knospe wandert. Lte1 wiederum ist nur in der Knospe zu finden. Erst nachdem der neue Zellkern und damit auch Tem1 in die Knospe gelangt sind, wird Tem1 durch Lte1 aktiviert und die Mitose abgeschlossen (Bardin et al., 2000). In den Septinmutanten $\Delta cdc10$ und $\Delta sep7$ konnte beispielsweise gezeigt werden, dass vermehrt Lte1 in der Mutter zu finden war. In beiden Mutanten fand ein frühzeitiger Austritt aus der Mitose statt. Dies war in den $\Delta sep7$ -Mutanten abhängig von Lte1. Im Falle von $\Delta cdc10$ wird hingegen vermutet, dass in diesen Mutanten ein Teil des Septinrings nicht gebildet werden kann, der als Mikrotubuli-Sensor fungiert, welcher überprüft, ob die mitotische Spindel bereits die Knospe erreicht hat, da eine Deletion von *LTE1* in diesen den frühen Austritt aus der Mitose nicht verhindert (Castillon et al., 2003).

1.6 *S. cerevisiae* als Modellorganismus

Wie bereits aus den vorangegangenen Abschnitten klar hervorgeht, handelt es sich bei *S. cerevisiae* aus verschiedenen Gründen um einen exzellenten Modellorganismus. Seit Jahrtausenden nutzt der Mensch die Bäckerhefe, um Brot, Wein und Bier herzustellen (McGovern et al., 2004; Meussdoerffer, 2009). Anfangs wurden unbewusst natürlich vorkommende Hefen genutzt. Heutzutage ist dieser Organismus gut erforscht. Im Jahr 1996

war *S. cerevisiae* der erste eukaryotische Organismus, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Goffeau et al., 1996). Obwohl es sich hierbei um einen mikroskopisch kleinen Pilz handelt, sind viele Vorgänge in der Zelle evolutionär konserviert und ähneln denen anderer Organismen bis hin zum Menschen (Botstein et al., 1997).

Durch gerichtete Mutationen im Genom war es möglich, Deletionsbibliotheken zu erstellen, in denen nahezu alle Gene deletiert, herunterreguliert oder zu temperatursensitiven Allelen abgeändert sind (Ben-Aroya et al., 2008; Breslow et al., 2008; Giaever et al., 2002). Dies ermöglicht es, auf einfache Art ein oder mehrere Gene zu analysieren. Von 6604 offenen Leserahmen konnten infolgedessen bereits 78 % verifiziert werden (<http://www.yeastgenome.org/genomesnapshot>; Stand 22.7.2018). Die Bibliotheken können käuflich erworben werden und sind bei richtiger Lagerung jahrelang haltbar. Darüber hinaus machen die geringe Größe, die schnelle Generationszeit und die kostengünstige Kultivierung die Bäckerhefe auch heute noch zu einem wichtigen Werkzeug für die Forschung.

1.7 Synthetic Genetic Array (SGA)

Ein weiterer Vorteil der Hefezellen besteht darin, dass sie vegetativ sowohl haploid als auch diploid vorliegen können. Haploide Zellen können in zwei Paarungstypen, *MATa* und *MAT α* , eingeteilt werden. Werden beide Paarungstypen in einer Kultur vereinigt, so fusionieren diese zu einer diploiden Zygote (*MATa/ α*). Wie bereits erörtert, sporulieren diploide Zellen unter den richtigen Bedingungen. Diese Eigenschaften werden schon lange genutzt, um zum Beispiel durch Kreuzung, anschließende Sporulation und Tetradendisektion Doppelmутanten zu generieren, die daraufhin weiter analysiert werden können (zusammengefasst in Sherman, 2002). Vor einigen Jahren wurde jedoch eine neue Methode für genomweite Screens, der sogenannte *Synthetic Genetic Array* (SGA) entwickelt (Tong und Boone, 2006). Ein haploider SGA-Stamm, der z.B. eine zu untersuchende Mutation enthält, wird mit der gesamten haploiden *S. cerevisiae* Deletionsbibliothek gekreuzt. Verschiedene Markergene erlauben es, nach der Kreuzung auf diploide Zellen zu selektieren. Durch

anschließende Sporulation und gezielte Selektion erhält man haploide Doppelmutanten. Die Analyse des Wachstums der Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten ermöglicht es, genetische Interaktionen aufzuklären (Baryshnikova et al., 2010). Generell wird vereinfacht davon ausgegangen, dass sich Wachstumsdefekte zweier unabhängiger Mutanten multiplizieren. Angenommen der Wildtyp wächst mit einem Wert 1 und zwei Mutanten jeweils mit einem Wert von 0,5. Die entsprechende Doppelmutante sollte in diesem Fall einen Wachstumswert von 0,25 aufweisen, wenn keinerlei Interaktion zwischen den Genen besteht. Wächst die Doppelmutante jedoch besser oder schlechter als erwartet, so weist dies auf eine positive bzw. negative Interaktion hin (Dixon et al., 2009). Der Vorteil der SGA besteht darin, dass sich diese für Hochdurchsatzverfahren mit Stempelrobotern eignet. So konnten mit dieser Methode bereits genomweite Screens genetischer Interaktionen durchgeführt werden (Costanzo et al., 2010; Kuzmin et al., 2016). Alternativ kann der SGA-Starterstamm mit einem Plasmid transformiert werden, auf dem z.B. Myo2-Fis1 kodiert ist. Dadurch kann man letztendlich eine haploide Deletionsbibliothek generieren, in der alle Stämme das Plasmid tragen.

1.8 Zielsetzung

Die korrekte Vererbung von Mitochondrien stellt einen wichtigen Prozess in der Zelle dar. Während mittlerweile viele Faktoren bekannt sind, die bei der Vererbung eine Rolle spielen, ist noch immer vieles nicht verstanden. So ist bis zum heutigen Tage nicht eindeutig geklärt, welches Protein der Myo2-Rezeptor auf den Mitochondrien ist. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit Kandidaten identifiziert werden, welche als Rezeptoren in Frage kommen könnten, bzw. die am Myo2-abhängigen Transport beteiligt sind. Dazu sollten zunächst heterozygot diploide Mutanten essentieller Gene unter *myo2-fis1* Expression untersucht werden, da der mitochondriale Myo2-Rezeptor vermutlich von einem essentiellen Gen kodiert wird. Deletionsmutanten, in denen der Myo2-abhängige Transport gestört ist, sollten dabei theoretisch durch den forcierten Mitochondrientransport gerettet werden und haploid lebensfähig sein. Mithilfe zweier SGAs nicht-essentieller Gene sollten zudem negative Interaktoren von *MMR1*, sowie die gesamte haploide Deletionsbibliothek auf Gene untersucht werden, die einen Einfluss auf den Myo2-abhängigen mitochondrialen Transport haben. Auch zu diesem Zweck wird das Fusionsprotein Myo2-Fis1 herangezogen. Da dieses Protein vor allem einen Effekt auf die mitochondriale Vererbung hat, stellt es ein nützliches Werkzeug für dieses Vorhaben dar. Positive und negative Interaktoren, die in diesen Screens identifiziert wurden, sollten daraufhin weiter untersucht werden, um festzustellen, ob sie eine direkte oder indirekte Rolle bei der Myo2-abhängigen Vererbung der Mitochondrien spielen. Da die Mitochondrien zudem eine wichtige Rolle bei der Alterung der Zellen spielen, sollte darüber hinaus untersucht werden, ob mit einer beeinträchtigten Vererbung der Mitochondrien in *myo2(LQ)*-Mutanten auch eine Änderung der Lebensspanne einhergeht.

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Plasmide und Primer

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Eigenschaften	Quelle
pGEM®-T	LacZ	Promega, Madison, Wisconsin
pGEM®-T-MFA1 _{Pr}	LacZ	diese Arbeit
pGEM®-T-NatNT2	LacZ	diese Arbeit
pGEM®-T-Sp_his5	LacZ	diese Arbeit
pRS316	CEN; URA3	(Sikorski und Hieter, 1989)
pRS415	CEN; LEU2	(Sikorski und Hieter, 1989)
pRS415-STE2 _{Pr} -NatNT2-MFA1 _{Pr} -Sp_his5	CEN; LEU2	diese Arbeit
pRS416-myo2-fis1	CEN; URA3	(Förtsch et al., 2011)
pRS426	2μ; URA3	(Christianson et al., 1992)
pRS426-myo2-fis1	2μ; URA3	(Förtsch et al., 2011)
pVT100U-mtGFP	2μ; URA3	(Westermann und Neupert, 2000)
pVT100U-mtRFP	2μ; URA3	Y. Brede, Zellbiologie, Bayreuth
pVV209	CEN	(Van Mullem et al., 2003)
pVV209-myo2-fis1	CEN	(Böckler et al., 2017)
pYM-N7	NatNT2	(Janke et al., 2004)
pYX142-mtGFP	CEN; LEU2	(Westermann und Neupert, 2000)

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Name	Sequenz (5'-3')
MFA1pr, rev, BamHI	GCG AAT GGA TCC CTA TTC GAT GGC TTT GTA C
MFA1pr, fwd, XhoI	GGC AAT CTC GAG GAT GTG GCT AAG ACC GAG
MMR1 NatNT2 fwd	CTC ATT GCA AAA TCA AAA AAA AAA AAC ACA ACT AAT AAA CTA AAC AAC TAA AAA AGT ACG CTG CAG GTC GAC G
MMR1 NatNT2 rev	TGA TGT ATT GTG AAT GTT TGT GTA AAA TAA GTT AAT TTA ATT TGA AGT TGA CGC TGA GCT CGA TTA CAA CAG GTG TTG TCC
NATR, fwd, EagI	CGG TAA CGG CCG ATG GGT ACC ACT CTT GAC G
NATR, rev, XbaI	TAT ATA TCT AGA ATT TCT TCG ATC CCG GCG AG
Sp_his5, fwd, BamHI	GCC ATT GGA TCC ATG AGG AGG GCT TTT GTA G
Sp_his5, rev, BamHI	GGC AAT GGA TCC TTA CAA CAC TCC CTT CGT G
STE2pr, fwd, SacII	GCG ATA CCG CGG TCC ACT GGT GTA ATG TAC TC
STE2pr, rev, EagI	GGC TTA CGG CCG TGG ATA TGG TTC TTA ACG G
URA3 NatNT2 fwd	CCG CCA AGT ACA ATT TTT TAC TCT TCG AAG ACA GAA AAT TTG CTG ACA TTG TAC GCT GCA GGT CGA CG
URA3 NatNT2 rev	GTC TCC CTT GTC ATC TAA ACC CAC ACC GGG TGT CAT AAT CAA CCA ATC GTG AGC TCG ATT ACA ACA GGT GTT GTC C

2.1.2 Klonierung Haploidenselektionsplasmid

Klonierungen wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Green und Sambrook, 2012). Es wurde ein Plasmid mit zwei Markern zur Selektion auf Hefezellen des *MATa* Paarungstyps generiert: pRS415-STE2_{pr}-NatNT2-MFA1_{pr}-Sp_his5. pRS415 diente als Ausgangsplasmid. Der *MATa*-spezifische Promotor des Gens *STE2* (*STE2_{pr}*) wurde zwischen der *SacII*- und der *EagI*-Schnittstelle der *multiple cloning site* (MCS) inseriert. Dahinter wurde eine Nourseothricin-Resistenz-Kassette (*NatNT2*) zwischen der *EagI*- und *XbaI*-Schnittstelle eingebracht. In entgegengesetzter Orientierung (zwischen der *BamHI*- und *XhoI*-Schnittstelle)

wurde der *MATa*-spezifische Promotor des Gens *MFA1* eingefügt (*MFA1_{Pr}*). Hinter diesem folgte an der *BamHI*-Schnittstelle die *his5*-Kassette aus *Schizosaccharomyces pombe* (*Sp_his5*). Amplifiziert wurden die jeweiligen Bereiche über PCR mit den Primern „*STE2pr, fwd, SacII*“ und „*STE2pr, rev, EagI*“ (*STE2_{Pr}*), „*MFA1pr, rev, BamHI*“ und „*MFA1pr, fwd, XhoI*“ (*MFA1_{Pr}*), „*Sp_his5, fwd, BamHI*“ und „*Sp_his5, rev, BamHI*“ (*Sp_his5*), sowie „*NATR, fwd, EagI*“ und „*NATR, rev, XbaI*“ (*NatNT2*). Verwendet wurden dafür die Pfu- oder die Phusion-Polymerase der Firma Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Als Templates diente aus Hefe isolierte genomische DNA (gDNA) (*STE2_{Pr}* und *MFA1_{Pr}*), das Plasmid pYM-N7 (*NatNT2*) und gDNA des SGA-Stammes Y7092 (*Sp_his5*). *MFA1_{Pr}*, *Sp_his5* und *NatNT2* wurden zunächst nach Herstellerangaben in den Vektor pGEM®-T (Promega, Madison, Wisconsin) eingebracht, anschließend mit den jeweils benötigten Restriktionsenzymen herausgeschnitten und in pRS415-*STE2_{Pr}* inseriert. Die Plasmidkarte in Abb. 3 A wurde mit der SnapGene Software erstellt (Version 4.2.1; GSL Biotech; verfügbar auf snapgene.com).

2.2 Methoden der Hefegenetik

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte wie von Sherman (2002) beschrieben in Vollmedium mit Hefeextrakt und Pepton oder in synthetischem Komplett- oder Minimalmedium mit YNB (*yeast nitrogen base*).

2.2.1 Hefestämme

Die in Tabelle 3 aufgeführten Stämme wurden mit den Plasmiden aus Tabelle 1 nach der LiAc/PEG-Methode transformiert (Gietz, 2014).

Für die Transformation im 96-*well*-Format wurden die zu transformierenden Stämme zunächst per Hand aus dem Glycerinstock auf YPD-Platten gestempelt. Nach ein bis zwei Tagen bei 30 °C wurden die Kolonien erneut auf YPD-Platten gestempelt und über Nacht bei 30 °C angezogen. Am folgenden Tag wurde pro 96-*well*-Platte ein Transformationsmix aus 12 ml 50 % PEG und 1,8 ml 1M LiAc pH 7,5 und 1,5 ml, bei 99 °C denaturierter, Lachsspermien DNA

vorbereitet. Dieser wurde mit 25-50 µg Plasmid-DNA in maximal 100 µl Wasser vermischt. Pro *well* wurden 150 µl dieses Transformationsmixes vorgelegt und die, auf der YPD-Platte gewachsenen, Kolonien mit einem Metallstempel eingerührt. Die Zellen wurden so für 1 h bis über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 min bei 300 rpm. Mit einer Multikanalpipette wurden daraufhin 10 µl aus jedem *well* auf geeignetes Selektionsmedium appliziert. Nach ca. zwei Tagen konnten die transformierten Stämme auf frisches Medium überstempelt werden.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Hefestämme.

Isogen	Name	Genotyp	Quelle
BY4742	WT	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
BY4741	WT	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
BY	Y7092	<i>MATα Δcan1::STE2pr-Sp_his5 Δlyp1 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i>	(Tong und Boone, 2007)
BY	Y7092 Δmmr1	<i>MATα Δcan1::STE2pr-Sp_his5 Δlyp1 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 Δmmr1::NatNT2</i>	diese Arbeit
BY4741	Δypt11	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δypt11::kanMX4</i>	(Giaever et al., 2002)
BY4741	Δnum1	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δnum1::kanMX4</i>	(Giaever et al., 2002)
BY4741	Δmip1	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δmip1::kanMX4</i>	(Giaever et al., 2002)
BY4741	Δfzo1 Δdnm1	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δfzo1::kanMX4 Δdnm1::kanMX4</i>	M. Dürr, Zellbiologie, Bayreuth
BY4741	Δfzo1	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δfzo1::kanMX4</i>	(Giaever et al., 2002)
BY4741	Δdnm1	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δdnm1::kanMX4</i>	(Giaever et al., 2002)
UCC5185 (S288C)	WT MEP	<i>MATα/MATα ade2::hisG/ade2::hisG his3/his3 leu2/leu2 LYS2/lys2 met15::ADE2/MET15 ura3/ura3 trp1/trp1 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX/hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX loxP-UBC6-loxP-LEU2/loxP-UBC6-loxP-LEU2</i>	(Lindstrom und Gottschling, 2009)

Isogen	Name	Genotyp	Quelle
UCC8836 (S288C)	Δsir2 MEP	<i>MATa/MATα ade2::hisG/ade2::hisG his3/his3 leu2/leu2 LYS2/lys2 met15::ADE2/MET15 ura3/ura3 trp1/trp1 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX/hoΔ::PSCW11-cre-EBD78- NATMX loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron- loxP-HPHMX loxP-UBC6-loxP-LEU2/loxP-UBC6-loxP-LEU2 sir2Δ::KANMX/sir2Δ::KANMX</i>	(Lindstrom und Gottschling, 2009)
UCC5179 (S288C)	Δdnm1 MEP	<i>MATa ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Δdnm1::kanMX4</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5181 (S288C)	Δdnm1 MEP	<i>MATα ade2::hisG his3 leu2 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ::ADE2 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Δdnm1::kanMX4</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5181 (S288C)	myo2(LQ) MEP	<i>MATα ade2::hisG his3 leu2 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ::ADE2 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX myo2(LQ)-URA3</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5179 (S288C)	Δdnm1 myo2(LQ) MEP	<i>MATa ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Δdnm1::kanMX4 myo2(LQ)- URA3</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5181 (S288C)	Δdnm1 myo2(LQ) MEP	<i>MATα ade2::hisG his3 leu2 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ::ADE2 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Δdnm1::kanMX4 myo2(LQ)- URA3</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5179 (S288C)	myo2(LQ) MEP	<i>MATa ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX myo2(LQ)-URA3</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5181 (S288C)	Δfzo1 MEP	<i>MATα ade2::hisG his3 leu2 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ::ADE2 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Δfzo1::HIS3MX6</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5179 (S288C)	Δdnm1 Δfzo1 MEP	<i>MATa ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Δdnm1::kanMX4 Δfzo1::HIS3MX6</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5181 (S288C)	Δdnm1 Δfzo1 MEP	<i>MATα ade2::hisG his3 leu2 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ::ADE2 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Δdnm1::kanMX4 Δfzo1::HIS3MX6</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5181 (S288C)	Δdnm1 myo2(LQ) Δfzo1 MEP	<i>MATα ade2::hisG his3 leu2 trp1Δ63 ura3Δ0 met15Δ::ADE2 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Δdnm1::kanMX4 myo2(LQ)- URA3 Δfzo1::HIS3MX6</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth

Isogen	Name	Genotyp	Quelle
UCC5179 (S288C)	$\Delta dnm1$ $myo2(LQ)$ $\Delta fzo1$ MEP	<i>MATa ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX $\Delta dnm1$::kanMX4 myo2(LQ)- URA3 $\Delta fzo1$::HIS3MX6</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5179 (S288C)	$\Delta fzo1$ MEP	<i>MATa ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX $\Delta fzo1$::HIS3MX6</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
UCC5185 (S288C)	WT MEP ρ^0	<i>MATa/MATα ade2::hisG/ade2::hisG his3/his3 leu2/leu2 LYS2/lys2 met15::ADE2/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78- NATMX/hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-CDC20- Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX loxP- UBC6-loxP-LEU2/loxP-UBC6-loxP-LEU2 ρ^0</i>	diese Arbeit
S288C	$\Delta dnm1$ MEP	<i>MATa/MATα ade2::hisG/ade2::hisG his3/his3 leu2/leu2 LYS2/lys2 met15::ADE2/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78- NATMX/hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-CDC20- Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX loxP- UBC6-loxP-LEU2/loxP-UBC6-loxP-LEU2 $\Delta dnm1$::KANMX4/$\Delta dnm1$::KANMX4</i>	diese Arbeit
S288C	$myo2(LQ)$ MEP	<i>MATa/MATα ade2::hisG/ade2::hisG his3/his3 leu2/leu2 LYS2/lys2 met15::ADE2/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78- NATMX/hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-CDC20- Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX loxP- UBC6-loxP-LEU2/loxP-UBC6-loxP-LEU2 myo2(LQ)- URA3/myo2(LQ)-URA3</i>	diese Arbeit
S288C	$\Delta dnm1$ $myo2(LQ)$ MEP	<i>MATa/MATα ade2::hisG/ade2::hisG his3/his3 leu2/leu2 LYS2/lys2 met15::ADE2/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78- NATMX/hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-CDC20- Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX loxP- UBC6-loxP-LEU2/loxP-UBC6-loxP-LEU2 $\Delta dnm1$::KANMX4/$\Delta dnm1$::KANMX4 myo2(LQ)- URA3/myo2(LQ)-URA3</i>	diese Arbeit

Isogen	Name	Genotyp	Quelle
S288C	$\Delta fzo1$ MEP	<i>MATa/MATα ade2::hisG/ade2::hisG his3/his3 leu2/leu2 LYS2/lys2 met15::ADE2/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78- NATMX/hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-CDC20- Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX loxP- UBC6-loxP-LEU2/loxP-UBC6-loxP-LEU2 $\Delta fzo1$::HIS3MX6/$\Delta fzo1$::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
S288C	$\Delta dnm1$ $\Delta fzo1$ MEP	<i>MATa/MATα ade2::hisG/ade2::hisG his3/his3 leu2/leu2 LYS2/lys2 met15::ADE2/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78- NATMX/hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-CDC20- Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX loxP- UBC6-loxP-LEU2/loxP-UBC6-loxP-LEU2 $\Delta dnm1$::KANMX4/$\Delta dnm1$::KANMX4 $\Delta fzo1$::HIS3MX6/$\Delta fzo1$::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
S288C	$\Delta dnm1$ <i>myo2(LQ)</i> $\Delta fzo1$ MEP	<i>MATa/MATα ade2::hisG/ade2::hisG his3/his3 leu2/leu2 LYS2/lys2 met15::ADE2/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 hoΔ::PSCW11-cre-EBD78- NATMX/hoΔ::PSCW11-cre-EBD78-NATMX loxP-CDC20- Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX loxP- UBC6-loxP-LEU2/loxP-UBC6-loxP-LEU2 $\Delta dnm1$::KANMX4/$\Delta dnm1$::KANMX4 $\Delta fzo1$::HIS3MX6/$\Delta fzo1$::HIS3MX6 <i>myo2(LQ)</i>- URA3/<i>myo2(LQ)</i>-URA3</i>	diese Arbeit
BY	<i>myo2(LQ)</i> $\Delta fzo1^*$, **	<i>MAT? ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 his3Δ1 <i>myo2(LQ)</i>-URA3 $\Delta fzo1$::kanMX4</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
BY	<i>myo2(LQ)</i> $\Delta fzo1^*$	<i>MAT? ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 his3Δ1 <i>myo2(LQ)</i>-NatNT2 $\Delta fzo1$::kanMX4</i>	diese Arbeit
BY4742	$\Delta sir2$	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 MET15 ura3Δ0 $\Delta sir2$::kanMX4</i>	(Giaever et al., 2002)
BY	WT**	<i>MAT? ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
BY	<i>myo2(LQ)**</i>	<i>MAT? ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 <i>myo2(LQ)</i>-URA3</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
BY	$\Delta fzo1$ $\Delta dnm1$ <i>myo2(LQ)**</i>	<i>MAT? ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 $\Delta fzo1$::kanMX4 $\Delta dnm1$::kanMX4 <i>myo2(LQ)</i>-URA3</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth

Isogen	Name	Genotyp	Quelle
BY	<i>Δfzo1</i> <i>Δdnm1</i>**	<i>MAT?</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 Δfzo1::kanMX4</i> <i>Δdnm1::kanMX4</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
BY	<i>Δfzo1</i> **	<i>MAT?</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 Δfzo1::kanMX4</i>	S. Böckler, Zellbiologie, Bayreuth
BY	<i>Δmyo2</i>***	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura2 Δmyo2::kanMX4</i>	(Altmann et al., 2008; Förtsch et al., 2011)

* komplementiert durch pRS313-FZO1 bzw. pRS416-FZO1

** aus Tetradendisektion

*** bereits mit Plasmiden pRS413-Myo2-D1297N, pRS413-MYO2 oder pRS413-Myo2(LQ) transformiert aus Glycerinstocks entnommen (Altmann et al., 2008; Förtsch et al., 2011)

2.2.2 Stammkonstruktion für den Überexpressionsscreen

Der Hefestamm *myo2(LQ) Δfzo1*, komplementiert mit dem Plasmid pRS313-FZO1, sowie transformiert mit pYX142-mtGFP, stammte aus einer Tetradendisektion und wurde von Stefan Böckler zur Verfügung gestellt. Durch Einzelkolonieausstrich auf Vollmedium und anschließende Überprüfung auf Selektionsmedium wurde gegen das *mtGFP*-Plasmid selektiert. Daraufhin wurde mithilfe der Primer „*URA3 NatNT2 fwd*“ und „*URA3 NatNT2 rev*“ die NTC-Resistenz-Kassette, flankiert von Abschnitten der *URA3*-Sequenz, vom Plasmid pYM-N7 amplifiziert und in *myo2(LQ) Δfzo1* transformiert. Über homologe Rekombination wurde so die *URA3*-Kassette, die in diesen Stamm hinter *myo2(LQ)* kloniert ist, unterbrochen und durch die NTC-Resistenz-Kassette ersetzt. Die Verifizierung der Rekombinanten erfolgte durch das Überstreichen auf Platten ohne Uracil und Platten mit NTC. Abschließend wurde der Stamm mit pRS416-FZO1 transformiert und durch Einzelkolonieausstriche auf Medium mit Histidin der Verlust von pRS313-FZO1 begünstigt und überprüft.

2.2.3 Alterungsanalysen

2.2.3.1 Mother Enrichment Program

Das *Mother Enrichment Program* dient der Anreicherung gealterter Hefezellen in Flüssigmedium durch selektiven Teilungsstopp der entstehenden Tochterzellen bei Estradiol-Zugabe. Die Ausführung erfolgte wie bei Lindstrom und Gottschling (2009) beschrieben. Die zu untersuchenden Stämme wurden in 1 ml YPD über Nacht bei 30 °C im Schüttler angezogen. Morgens wurden 500 µl der Übernachtskultur (ÜNK) zu 5 ml frischem YPD gegeben und die Stämme für weitere 3 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde mithilfe eines Beckman Coulter Counters die Zellzahl bestimmt und zu einer Konzentration von 2000 Zellen/ml in 25 ml YPD mit Estradiol (Endkonzentration 1 µM) angeimpft. Nach 3 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden je zweimal 250 µl (entspricht 500 Zellen) entnommen und auf YPD-Agar-Platten ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden nach drei Tagen Wachstum bei 30 °C ausgezählt. Die Kolonienanzahl des jeweiligen Stammes nach drei Stunden wurde als 100 %-Wert festgelegt und die Anzahl zu den weiteren Zeitpunkten an diesem bemessen.

2.2.3.2 Alterungsanalyse am Mikromanipulator

Die Alterungsanalyse am Mikromanipulator wurde wie von Park et al., 2002 beschrieben durchgeführt (Park et al., 2002). Die Stämme wurden aus dem Glycerinstock auf YPD-Platten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Stämme für einen Tag auf YPG-Agar-Platten überführt, um gegen Zellen zu selektieren, die das mitochondriale Genom verloren haben, oder Mutationen in Komponenten der Atmungskette aufweisen. Daraufhin wurden die Hefen auf YPD übertragen und nach ca. fünf Stunden bei 30 °C einzelne Zellen ausgelegt und in einem 30 °C (Tag) / 4 °C (Nacht) Wechsel inkubiert. Sobald die Zellen Knospen bildeten, wurden die ursprünglichen Zellen entfernt und stattdessen die Töchter weiter inkubiert. Bildeten diese Töchter daraufhin Knospen, so wurde dies notiert und die neuen Knospen entfernt, bis die Zellen sich nicht mehr teilten oder bis sie lysierten. Betrachtet wurden pro Stamm und Durchgang 20-36 Zellen. Verwendet wurde dazu

ein Mikromanipulator der Firma Singer (Singer MSM Series 300 mit Acer n30 pocket PC; Singer Instruments, Roadwater, UK). Für die Unterteilung in verschiedene Kategorien wurde die RLS jeder Zelle betrachtet und diese als sehr kurzlebig (0-4 Teilungen), kurzlebig (5-14 Teilungen), durchschnittlich (15-29 Teilungen), langlebig (30-39 Teilungen) und sehr langlebig (40-70 Teilungen) eingestuft.

2.2.4 Tüpfeltest

Die zu untersuchenden Stämme wurden über Nacht in Flüssigmedium angezogen, sodass sie sich in der stationären Phase befanden. Am folgenden Tag wurde die OD₆₀₀ für alle Stämme in einer Mikrotiterplatte auf 1 eingestellt und seriell 1:10 bis zu einer Verdünnung von 1:10000 verdünnt. 5 µl jeder Verdünnungsstufe wurden mit einer Multikanalpipette auf die entsprechenden Agarplatten aufgebracht und diese daraufhin für zwei bis drei Tage bei 30 °C oder 37 °C inkubiert.

2.2.5 Tetradendisektion

Die Tetradendisektion erfolgte am Mikromanipulator der Firma Singer (Singer MSM Series 300 mit Acer n30 pocket PC; Singer Instruments, Roadwater, UK). Die Sporulationseffizienz wurde am Mikroskop überprüft. Eine möglichst geringe Anzahl sporulierter Zellen wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in 50 µl ddH₂O resuspendiert und ggf. noch einmal verdünnt. Anschließend wurde Zymolyase zu einer Endkonzentration von 2 mg/ml hinzugegeben und die Suspension 10 min bei RT inkubiert. 50 µl der behandelten Zellen wurden auf den Rand einer Agar-Platte gegeben, bei geöffnetem Deckel an der Flamme getrocknet und anschließend dissektiert und nach einem definierten Schema auf der Platte ausgelegt. Die Kolonien wurden nach drei bis fünf Tagen bei 30 °C fotografiert.

2.2.6 *Synthetic genetic array (SGA)*

Die SGA-Analyse wurde mit dem ROTOR HDA Roboter der Firma Singer durchgeführt. Orientierung lieferte dabei die Anleitung von Baryshnikova et al. (2010). Der SGA-Starterstamm Y7092 (Tong und Boone, 2007) mit Haploidenselektionsmarkern wurde mit

Plasmiden von Interesse transformiert, oder in einem Gen von Interesse deletiert, und als Rasen auf einer ROTOR-Platte (PlusPlate) mit YPD angezogen. Für den SGA-Screen negativer Interaktoren von *MMR1* wurde mithilfe der Primer „*MMR1 NatNT2 fwd*“ und „*MMR1 NatNT2 rev*“ die NTC-Resistenz-Kassette, flankiert von Abschnitten der *MMR1*-Sequenz, vom Plasmid pYM-N7 amplifiziert und in den SGA-Starterstamm Y7092 transformiert. Über homologe Rekombination wurde *MMR1* unterbrochen und an dieser Stelle die NTC-Resistenz-Kassette eingebracht. Zwei Tage, nachdem der ausplattierte Rasen bei 30 °C inkubiert wurde, wurde mithilfe eines Stempels (RePad) Zellmaterial in einem geeigneten Format auf frische Selektionsplatten überführt und für weitere zwei Tage bei 30 °C angezogen. Die mit dem Starterstamm zu kreuzenden Stämme wurden aus den Glycerin-Stocks auf YPD+G418 (Endkonzentration 250 mg/l) gestempelt und einen Tag vor der Kreuzung im selben Format wie der Starterstamm auf YPD übertragen. Die Kreuzung erfolgte durch das Übereinanderstempeln von Starterstamm und den Stämmen, die untersucht werden sollten, auf YPD. Nach eintägiger Inkubation bei 30 °C erfolgte zweimalige Diploidenselektion auf geeignetem Selektionsmedium. Anschließend wurden die Stämme auf angereichertes Sporulationsmedium gestempelt (10 g/l Kaliumacetat, 1 g/l Hefeextrakt, 500 mg/l Glukose, 20 g/l Agar-Agar, 50 mg/l G418). Nach fünf- bis siebentägiger Sporulation bei 22 °C wurde durch Übertragen auf Selektionsmedium ohne Histidin, mit Canavanin (Endkonzentration 50 mg/l) und Thialysin (Endkonzentration 50 mg/l) auf haploide Zellen selektiert. Dafür wurde SCD/MSG-Medium verwendet. In diesem wird YNB ohne Ammoniumsulfat eingesetzt, da dieses die Wirkung von Antibiotika vermindern kann. Dem Medium wurde kein Histidin zugesetzt, um auf *MATa*-Zellen zu selektieren. Im Stamm Y7092 wird *his5* aus *Schizosaccharomyces pombe* unter der Kontrolle des *MATa*-spezifischen *STE2*-Promotors exprimiert. Nur *MATa*-Zellen können demnach auf Medium ohne Histidin wachsen. Mit dieser Selektion alleine wird jedoch nicht gegen Zellen selektiert, die im *MAT*-Lokus rekombiniert haben. Solche Zellen können diploid vorliegen und dabei den Genotyp *MATa/MATa* aufweisen. In einem solchen Fall liegt also kein *MATα*-Lokus vor, sodass auch diploide Zellen

Wachstum aufweisen, wenn lediglich auf *MATa*-Merkmale selektiert wird. Daher führten die Autoren zusätzlich Deletionen der Gene *CAN1* und *LYP1* ein. Die Gene *CAN1* und *LYP1* kodieren für die Arginin- und die Lysin-Permease. Diese sind, wie der Name jeweils sagt, für die Aufnahme der Aminosäuren Arginin und Lysin wichtig (Ahmad und Bussey, 1986; Sychrova und Chevallier, 1993). Sind diese Gene mutiert, können Arginin und Lysin nicht aufgenommen werden. Gleichzeitig werden jedoch auch die toxischen Analoga Canavanin und Thialysin nicht aufgenommen (Kitagawa und Tomiyama, 1929). Demnach können nur Stämme, in denen beide Gene deletiert sind, auf Medium mit Canavanin und Thialysin überleben. Dieser Umstand wurde genutzt, um eine Selektion auf haploide Zellen zu erlauben. Liegen nach der Kreuzung und Sporulation noch diploide Zellen vor, so sterben diese unter Zugabe von Canavanin und Thialysin ab, da neben den deletierten Genen jeweils eine wildtypische Kopie der Gene vorliegt und Canavanin und Thialysin aufgenommen werden. Durch Stempeln auf Medium mit Canavanin und Thialysin wurde daher auf haploide Zellen selektiert. Abschließend erfolgte zweimalige Mutantenselektion. Dazu wurde dem Medium neben Canavanin und Thialysin auch G418 (Endkonzentration 250 mg/l) zugegeben. 20 Stunden nach dem letzten Überstempeln wurden die Platten fotografiert.

2.2.7 Auswertung der SGA

Die Analyse der Koloniengröße erfolgte im Falle der SGA der negativen Interaktoren von *MMR1* mithilfe der Software „gitter“ und im Falle der SGA der *MATa*-Bibliothek mithilfe des online verfügbaren „SGAtools“, welches auf „gitter“ beruht (Wagih und Parts, 2014; Wagih et al., 2013). Dabei wurden die Bilder der finalen Mutantenselektion von den Programmen verwendet, um die Koloniengrößen zu bestimmen. Diese Rohdaten zur Koloniengröße wurden genutzt, um das durchschnittliche Wachstum jedes Stammes zu berechnen und Wachstumsunterschiede mit dem Expressionsplasmid im Vergleich zum Leervektor festzustellen. Verglichen wurden dabei jeweils nur die beiden zusammengehörigen Platten. Für jedes Platten-Paar wurde manuell eine eigene Verteilungskurve erstellt und positive bzw. negative Interaktoren ermittelt. Als positive oder negative Interaktoren wurden

im Falle der MATa-Bibliothek die Stämme angesehen, deren Quotient aus *myo2-fis1*-Plasmid und Leerplasmid 0,2 über bzw. unter dem durchschnittlichen Quotienten der jeweiligen Platte lag. Die Grenzwerte für den Screen negativer Interaktoren von *MMR1* wurden anhand der Verteilungskurve individuell festgelegt.

Alle positiven bzw. negativen Interaktoren, die in der Untersuchung der MATa-Bibliothek identifiziert wurden, wurden zudem auf eine Anreicherung bzgl. der Funktion, der beteiligten Prozesse und der Komponente der Zelle hin untersucht. Dazu wurde der „GO Term Finder“ der *Saccharomyces Genome Database* (SGD) herangezogen (Boyle et al., 2004). Die positiven oder negativen Interaktoren wurden als *query set* angegeben. Den Hintergrund bildet die gesamte verwendete Hefebibliothek. Es wurden je nach Datenlage Treffer mit einem p-Wert $< 0,1$; $< 0,05$ oder $< 0,01$ angezeigt. Weitere Voreinstellungen der Seite wurden unverändert übernommen. Um den Grad der Anreicherung zu berechnen, wurde der Quotient aus der Häufigkeit im *query set* und der Häufigkeit im verwendeten Hintergrund gebildet.

2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Mikroskopie wurden in der Regel logarithmisch wachsende Kulturen verwendet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen entstanden am Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena) mit der Evolution VF Mono Cooled Monochrome Kamera (Intas, Göttingen) und den Programmen Image ProPlus 5.0 und Scope Pro4.5 (Media Cybernetics, Rockville, USA) bzw. QCapture Pro 6.0 (QImaging, Surrey, Kanada) oder am Axiophot (Carl Zeiss, Jena) mit der Leica DCF360FX Kamera und der Leica LAF AF Version 2.2.1 Software (Leica Microsystems, Wetzlar). Beide Mikroskope waren mit einem Plan-Neofluar 100x/ 1.30 Ph3 Ölobjektiv (Carl Zeiss) ausgestattet.

2.3.1 Färbung von Zellstrukturen für die Mikroskopie

2.3.1.1 Rhodaminfärbung

Um Mitochondrien unter dem Mikroskop zu betrachten, wurden logarithmisch wachsende Kulturen mit Rhodaminlösung (Rhodamin-B-Hexylester; Endkonzentration 5 μM) versetzt und für 10 min am Drehrad inkubiert. Anschließend konnten die Zellen direkt mikroskopisch analysiert werden.

2.3.1.2 CMAC Färbung

Zur Analyse der Vakuolenvererbung wurden Hefezellen mit CMAC angefärbt. Dazu wurde CMAC (CellTracker Blue, Endkonzentration 100 μM) zu logarithmisch gewachsenen Kulturen gegeben und diese 30 min bei 30 °C im Tischschüttler inkubiert. Vor der Mikroskopie wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 19 mM Na_2HPO_4 ; 1,7 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) gewaschen.

2.4 Statistik

Statistiken wurden mit SigmaPlot V13 (Systat Software, Erkrath, Germany) erstellt. Zum Vergleich von mehr als zwei Datengruppen wurden einseitige Varianzanalysen (One Way ANOVA) mit *ad hoc* Normalitätstest (Shapiro-Wilk) und gleiche Varianztest (Brown-Forsythe), sowie *post hoc* Tests (Holm-Sidak) angewandt. Die Unterschiede gelten als signifikant, wenn der p-Wert < 0,05 (*), < 0,01 (**) oder < 0,001 (***) ist.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Methoden zur Selektion haploider Hefezellen

S. cerevisiae kann sich sowohl diploid als auch haploid vegetativ vermehren. Dies kann für verschiedene Anwendungen wie die SGA oder die Herstellung von Mehrfach-Mutanten durch Kreuzungen ausgenutzt werden. Je nach Anwendung kann es nötig sein, im Anschluss an eine Kreuzung und eine darauffolgende Sporulation, haploide Zellen eines bestimmten Paarungstyps, also *MATa* oder *MAT α* , vorliegen zu haben. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Plasmid konstruiert, welches die Selektion auf den Paarungstyp a erlaubt (Abb. 3 A). Das Grundgerüst bildet das Plasmid pRS415 (Sikorski und Hieter, 1989). Hierbei handelt es sich um ein *single-copy*-Plasmid mit *LEU2*-Marker. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind nicht in der Lage ohne Leucin im Medium zu überleben. Der Leucin-Marker auf dem Plasmid kodiert für ein Enzym, das an der Leucin-Biogenese beteiligt ist. Plasmide mit *LEU2*-Markern erlauben daher das Wachstum auf Platten ohne Leucin. In dieses Plasmid wurden zwei Reporterkonstrukte eingebracht, die unter der Kontrolle Paarungstyp a (*MATa*) – spezifischer Promotoren standen. Als spezifische Promotoren wurden die Promotoren der Gene *STE2* sowie *MFA1* gewählt. *STE2* kodiert in *MATa*-Zellen für den α -Faktor-Rezeptor (Jenness et al., 1983), *MFA1* für das Paarungspheromon a-Faktor (Michaelis und Herskowitz, 1988). Die entsprechenden Promotorsequenzen haben sich bereits zur Selektion auf den *MATa* Paarungstyp bewährt (Tong und Boone, 2007). Hinter dem *STE2*-Promotor folgt eine Nourseothricin (NTC oder NAT) -Resistenz-Kassette. In entgegengesetzter Richtung steht das *his5*-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe* (*Sp_his5*) unter der Kontrolle des *MFA1*-Promotors (Abb. 3 A). Bei Expression dieses Gens können *S. cerevisiae his3*-Mutanten auf Medium ohne Histidin wachsen. Die Konstrukte wurden nicht in Reihe kloniert, da Promotoren nicht immer vollständig reguliert werden können und in manchen Fällen unerwünschte Aktivität aufweisen (Huang et al., 2015). So kann verhindert werden, dass durch einen fälschlicherweise aktiven Promotor beide Reporterkonstrukte im falschen Paarungstyp-Hintergrund exprimiert werden.

Wird dieses Plasmid in Hefezellen eingebracht, so erfolgt in *MATa*-Zellen die Expression der NTC-Resistenzkassette sowie von *Sp_his5*. Dementsprechend können lediglich *MATa*-Zellen auf Medium mit NTC und ohne Histidin überleben.

Um die Funktionalität des Konstruktes zu überprüfen, wurde dieses in wildtypische Stämme unterschiedlichen Paarungstyps (*MATa*, *MATα*, *MATa/α*) transformiert. Anschließend wurden die Stämme auf Selektionsmedium ohne Histidin und/oder mit NTC getüpfelt und die Lebensfähigkeit analysiert. Wie zu erwarten wiesen *MATa* Zellen sowohl ohne Histidin als auch mit NTC Wachstum auf (Abb. 3 B). Während *MATα*-Zellen auf Medium ohne Histidin nicht wuchsen, waren auf Medium mit NTC Kolonien zu erkennen. Wurden diese wiederum auf Medium ohne Histidin gestrichen, so konnten sie dort nicht überleben. Über PCR wurde der Paarungstyp überprüft. Bei den gewachsenen Kolonien handelte es sich nachweislich um *MATα* Zellen. Dies bedeutet, dass die Selektion allein durch NTC nicht ausreicht, um alle *MATα*-Hefen abzutöten. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass der Promotor, unter dessen Kontrolle die NTC-Resistenzkassette steht, „leaky“ ist. D.h., dass dieser auch im *MATα*-Hintergrund eine Restaktivität aufweist. Dadurch sind auch einige Zellen des falschen Paarungstyps bei Zugabe von NTC lebensfähig. Eine weitere Beobachtung war, dass auch diploide Zellen auf allen Selektionsmedien leichtes Wachstum aufwiesen. Auch hier konnten mehr Kolonien beobachtet werden, wenn die Selektion rein durch NTC stattfand. Eine Überprüfung des Paarungstyps ergab hier, dass es sich bei den Hefen auf Selektionsmedium ohne Histidin um *MATa*-Zellen handelt. Dies lässt vermuten, dass einige anfangs diploide Zellen sporuliert sind. Wird nur durch NTC selektiert, so ist der Paarungstyp α nachzuweisen. Dies unterstreicht die Beobachtung, dass eine Selektion auf *MATa* Zellen durch NTC nicht ausreichend ist. Es kann jedoch festgestellt werden, dass die Selektion durch Histidin allein bereits ausreichend erscheint, um zuverlässig *MATa*-Zellen zu isolieren.

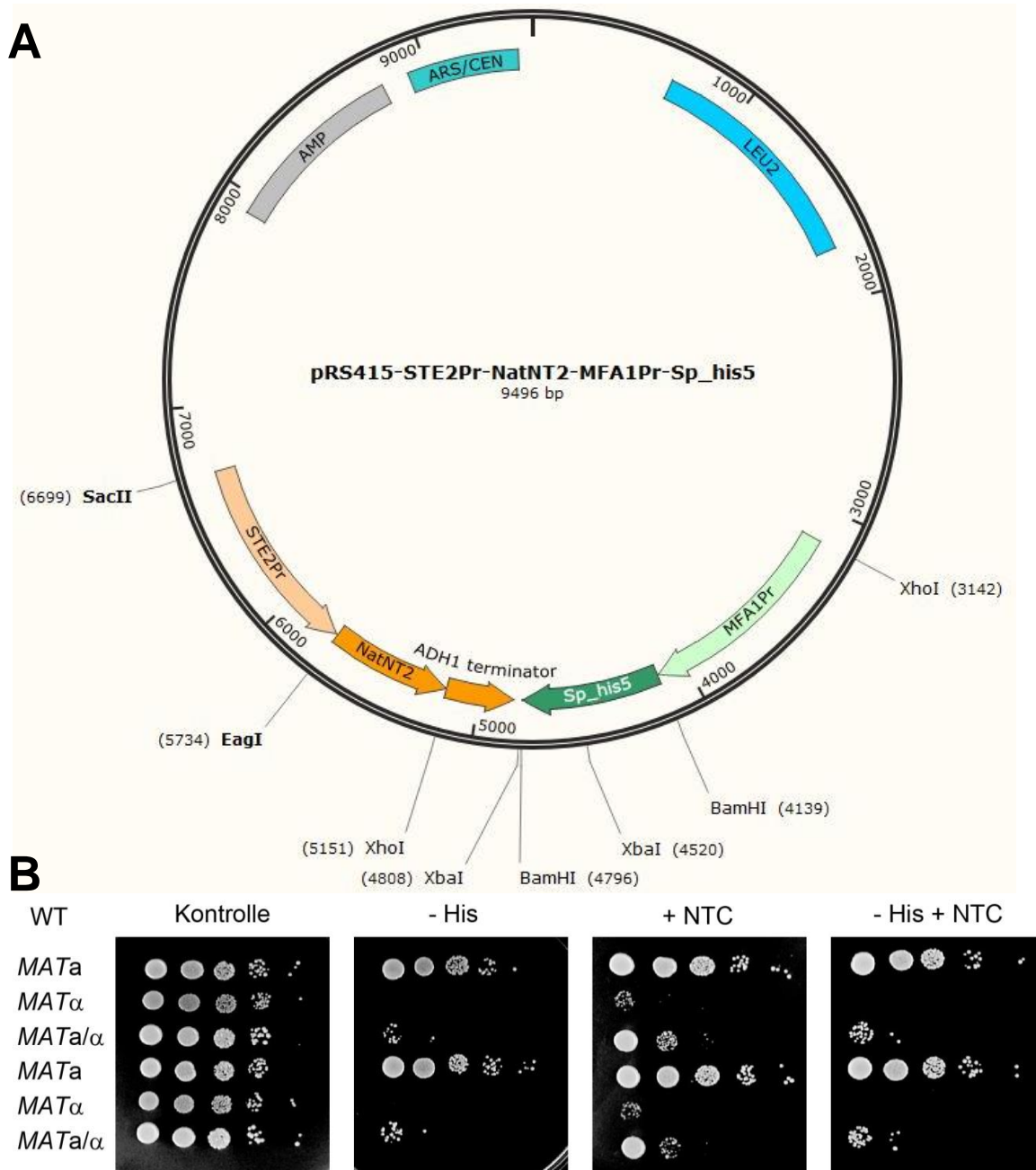


Abbildung 3: Plasmid zur Selektierung auf den Paarungstyp a. A) Plasmidkarte erstellt mit SnapGene Viewer 4.2.1. Eingezeichnet sind die *MATa*-spezifischen Promotoren *MFA1Pr* und *STE2Pr*, sowie die Reporterkonstrukte *NatNT2* und *Sp_his5*. Als Selektionsmarker dienen *AMP* und *LEU2*. Ebenfalls vermerkt sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsstellen B) Überprüfung der Funktionalität des Plasmids über einen Tüpfeltest. Getüpfelt wurden 5 μ l einer Hefesuspension mit einer OD_{600} von 1, sowie serieller Verdünnungen von 1:10. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 30 °C.

Getestet wurde das Plasmid auch im 96er-Format, bei dem 96 Hefe-Kolonien gleichzeitig mithilfe eines Stempels übertragen werden (nicht dargestellt). Bei allen getesteten Kolonien, die nach Selektion auf Platten ohne Histidin und mit NTC wuchsen, handelte es sich um Hefen des *MATa*-Paarungstyps. In diesem Format erwies sich das Konstrukt demnach als geeignet. In Zukunft könnte es genutzt werden, um in Hochdurchsatzverfahren diploide Zellen nach Sporulation auf einen bestimmten Paarungstyp zu selektieren und so auf weitere Kreuzungen vorzubereiten. Auch Breslow et al. verwenden in ihrer Publikation von 2008 ein Haploidenselektionsplasmid (Breslow et al., 2008). Dieses trägt ebenfalls das *Sp_his5*-Gen, jedoch unter Kontrolle des *STE2* Promotors. Als Selektionsmarker trägt es zudem das *URA3* Gen, welches Wachstum auf Medium ohne Uracil erlaubt. In den Untersuchungen mit dem hier in dieser Arbeit konstruierten Plasmid gibt es Hinweise darauf, dass der *STE2* Promotor auch im *MATα*-Hintergrund leicht aktiv sein könnte. Daraus kann jedoch nicht geschlossen werden, ob das von der Gruppe um Breslow verwendete Plasmid in *MATα*-Zellen leichtes Wachstum auf Medium ohne Histidin erlauben könnte. Leider wird in der Veröffentlichung von 2008 das Plasmid nicht näher beschrieben, sodass auch die Kopienzahl nicht bekannt ist. Daher lässt sich ohne einen direkten Vergleich nicht aussagen, ob eines der beiden Plasmide sich besser als das andere zur Selektion eignen könnte.

3.2 Versuch der Analyse essentieller Gene im Hochdurchsatz-Verfahren

Bei *MYO2* handelt es sich um ein essentielles Gen. Da der Transport der Mitochondrien für die Zelle überlebenswichtig ist, könnte auch der potentielle Myo2-Rezeptor auf den Mitochondrien von einem essentiellen Gen kodiert werden. Deletionen essentieller Gene liegen in heterozygot diploiden Bibliotheken vor (Giaever et al., 2002). In den entsprechenden Stämmen ist neben der Deletion eines essentiellen Gens auch das jeweilige wildtypische Allel vorhanden, wodurch die Zellen lebensfähig sind. In verschiedenen Ansätzen wurde zunächst versucht eine solche Bibliothek zu nutzen, um nach Interaktoren von *MYO2* zu suchen, die explizit an der Vererbung der Mitochondrien beteiligt sind. Per Hand wurde eine Bibliothek aus 1253 Stämmen zusammengestellt, in denen essentielle Gene durch *kanMX4* deletiert

waren (Giaever et al., 2002). *kanMX4* vermittelt Resistenz gegen Geneticin (G418). Die Auswahl der Stämme erfolgte durch die Suche nach Mutanten mit dem Phänotyp „*inviable*“ in der online verfügbaren *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (Cherry et al., 1998). Eine weitere Vorauswahl wurde nicht getroffen.

Die diploiden Stämme wurden zunächst von Hand mit einem *myo2-fis1*-Konstrukt (pRS426-*myo2-fis1*) bzw. dem entsprechenden Leerkonstrukt (pRS426) als Kontrolle transformiert und anschließend mit einem Replikatorstempel auf Sporulationsmedium übertragen. Nach einigen Tagen wurde die sporulierte Bibliothek mit einem Stamm verpaart, der gegen Nourseothricin (NTC) resistent ist. Nur Deletionsstämme, die durch Myo2-Fis1 gerettet werden konnten, sollten haploid lebensfähig und in der Lage sein, sich zu verpaaren. Denn theoretisch sollte nur in Stämmen, deren deletiertes Gen am Myo2-abhängigen Transport beteiligt ist, der letale Phänotyp gerettet werden. Ist das deletierte Gen nicht an diesem Prozess beteiligt, so sollte auch die Expression von Myo2-Fis1 den Stamm nicht retten. Gleichmaßen sollten Stämme, die kein Plasmid, bzw. das Leerplasmid enthalten weiterhin nicht haploid lebensfähig sein. Diese sollten daher nicht in der Lage sein, sich mit dem NTC-Stamm zu kreuzen. Diploide Stämme, die nicht sporuliert sind, können ebenfalls nicht mit dem NTC-resistenten Stamm paaren, sodass diese nur auf Platten mit G418, nicht aber auf solchen mit NTC wachsen können. Zur Überprüfung der erfolgreichen Verpaarung wurden die Stämme auf Platten mit G418 und NTC gestempelt. Hierbei wiesen jedoch die meisten Stämme Wachstum auf, selbst wenn sie nur mit dem Leerkonstrukt transformiert worden waren. Dieser Ansatz stellte sich demnach nicht als zielführend heraus. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Stämme nach der Sporulation nur kurze Zeit haploid vorliegen, bevor sie wieder mit einem Stamm verpaart werden, der das jeweilige wildtypische Allel trägt. Möglicherweise sind viele der Stämme noch in der Lage sich zu verpaaren, bevor sie sterben und die entstehenden heterozygot diploiden Stämme sind erwartungsgemäß lebensfähig.

Infolgedessen wurde eine andere Herangehensweise gewählt. Statt mit einem Stamm mit NTC-Resistenz wurden die Deletionsstämme dabei mit einem SGA-Stamm gekreuzt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, besitzt dieser Eigenschaften, die eine Selektion auf haploide Mutanten erlauben. Nach der Sporulation der heterozygot diploiden Bibliothek mit pRS426-*myo2-fis1* oder pRS426 erfolgte die Paarung mit dem SGA-Stamm Y7092. Anschließend wurde auf diploide Zellen selektiert, die daraufhin erneut zur Sporulation auf entsprechendes Medium übertragen wurden. Nach abschließender Selektion auf haploide Mutanten durch Canavanin, Thialysin und G418 wurde analysiert, welche Stämme lebensfähig waren. Hierbei zeigte sich jedoch erneut, dass fast alle untersuchten Stämme auch mit dem Leerkonstrukt überlebten. Möglicherweise ist es nach der Verpaarung mit dem SGA-Stamm in den Stämmen zu Rekombinationsereignissen gekommen, wodurch zum Schluss sowohl *kanMX4* als auch das wildtypische Allel des jeweiligen Gens in den haploiden Stämmen vorliegen. Dass jedoch in fast allen Stämmen Rekombination stattfand, ist unwahrscheinlich. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass viele Stämme mit der jeweiligen Mutation lebensfähig sind, auch wenn diese in der Datenbank als nicht lebensfähig markiert sind. Die dort aufgeführten Charakteristika stammen mitunter von einzelnen Screens und diese könnten z.B. in einem anderen Stammbhintergrund durchgeführt worden sein.

Um die Möglichkeit einer Rekombination des wildtypischen Gens bei der Verpaarung dennoch zu vermeiden, wurde daraufhin ein dritter Ansatz getestet. Hierbei wurde die heterozygot diploide Bibliothek neben dem *myo2-fis1*-Konstrukt bzw. dem Leervektor zusätzlich mit dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Haploidenselektionsplasmid transformiert. Die so transformierten Stämme konnten nach der Sporulation direkt auf haploide Mutanten untersucht werden. Doch auch hier erwiesen sich nahezu alle Stämme bereits mit dem Leervektor als lebensfähig. Auch weitere Vorversuche mit ausgewählten Mutanten essentieller Gene ($\Delta myo2$ und $\Delta act1$) ergaben, dass die Stämme nach der Sporulation stets lebensfähig waren, wobei in diesen die Mutation meist nicht nachzuweisen war. Dies könnte, wie bereits vermutet, auf Rekombinationsereignisse zurückzuführen sein.

Wurden die Stämme von Hand dissektiert, so ergab sich dieses Problem nicht und es konnten keine haploid lebensfähigen Mutanten beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass die heterozygot diploide Bibliothek nicht für das geplante Hochdurchsatz-Verfahren geeignet ist. Ebenfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bibliothek mit Deletionsmutanten nicht essentieller Gene kontaminiert ist. Bei der Tetradendisektion wird von Einzelkolonien der Stämme ausgegangen. Daher ist es hier weniger wahrscheinlich, Kontaminationen zu überführen. Wird jedoch die Bibliothek gestempelt, so reichen einzelne kontaminierende Zellen bereits aus, um Kolonien zu bilden und ein falsches Ergebnis zu liefern.

Eine weitere Möglichkeit essentielle Gene zu untersuchen bieten spezielle Bibliotheken, in denen die Translation essentieller Gene herunterreguliert ist. Eine dieser Bibliotheken ist die sogenannte DAmP-Bibliothek (*decreased abundance by mRNA perturbation*) (Breslow et al., 2008). In dieser Bibliothek ist im 3' untranslatierten Bereich eine Antibiotikum-Resistenz inseriert, wodurch das Transkript destabilisiert ist und die mRNA-Menge abnimmt (Schuldiner et al., 2005). Diese DAmP-Bibliothek wurde in der Zwischenzeit im Rahmen einer, u.a. von mir angeleiteten, Masterarbeit herangezogen, um Interaktionen mit *myo2-fis1* bzw. *myo2(LQ)* zu untersuchen (Wolter, 2015). Hier ergaben sich jedoch in drei Durchgängen mit *myo2-fis1* keine reproduzierbaren Ergebnisse. Lediglich neun von 842 Stämmen zeigten in mindestens zwei der Durchgänge eine positive Interaktion. Keine dieser Mutanten konnte letztlich als positiver Interaktor bestätigt werden, da sich die rettenden Effekte in der händischen Überprüfung der einzelnen Stämme nicht reproduzieren ließen. Im Gegensatz dazu konnten in einer SGA der DAmP-Bibliothek mit einem *myo2(LQ)*-Stamm, in dem der Mitochondrientransport vermindert ist, Interaktoren festgestellt werden (Wolter, 2015). Näher untersucht wurde dabei unter anderem die Mutante $\Delta bud6$. Es konnte bestätigt werden, dass das Wachstum der Doppelmutante $\Delta bud6 myo2(LQ)$ vermindert ist. Mikroskopische Analysen ergaben, dass in den Doppelmutanten die mitochondriale Vererbung stark reduziert ist und durch die Expression von Myo2-Fis1 gerettet werden kann. Auch der Wuchsdefekt wird durch Myo2-Fis1 rückgängig gemacht. Bud6 spielt eine Rolle in

der Bni1-abhängigen Bildung von Aktin-Kabeln (Graziano et al., 2011). Zudem ist es beteiligt an der Aufrechterhaltung der Septin-Diffusionsbarriere für ER und Plasmamembran am Mutter-Knospen-Hals (Luedeke et al., 2005; Shcheprova et al., 2008). Dies lässt vermuten, dass es sich nicht um den Myo2-Rezeptor handelt, sondern indirekt einen Einfluss auf die Vererbung der Mitochondrien hat. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass weniger Aktinkabel in die Zelle reichen, an denen die Mitochondrien in die Knospe transportiert werden können.

3.3 Identifizierung von Interaktoren des Myo2-abhängigen Mitochondrien-Transportes

Mithilfe der SGA-Methode ist es möglich, eine oder mehrere Mutationen oder Plasmide in eine Vielzahl zu untersuchender Stämme einzubringen. So können sowohl negative als auch positive Interaktionen im großen Maßstab festgestellt werden. Einen Vorteil bietet dabei die Tatsache, dass *S. cerevisiae*-Bibliotheken erworben werden können, in denen nahezu alle Gene deletiert oder herunterreguliert sind. Durch Kreuzung solcher Bibliotheken mit einem Ausgangsstamm, der nach Belieben Mutationen oder Plasmide trägt, entstehen vielfältige Kombinationen. Die erhaltenen Mehrfachmutanten werden mithilfe eines Stempel-Roboters in definierter Anordnung auf Agar-Platten gestempelt. Das Wuchsverhalten der sich daraufhin bildenden Kolonien erlaubt Rückschlüsse auf genetische Interaktionen der jeweiligen Deletionen. Wie in der Einleitung erklärt, wird davon ausgegangen, dass sich die Wuchsdefekte von Mutanten multiplizieren, wenn die betroffenen Gene nicht am selben Reaktionsweg beteiligt sind. Interagieren die deletierten, bzw. exprimierten Gene der Doppelmutanten, so wird ein besseres oder schlechteres Wachstum als erwartet beobachtet.

3.3.1 SGA-Screen ausgewählter *MMR1*-Doppelmutanten bei Expression von Myo2-Fis1

Bereits 2004 wurde publiziert, dass Mmr1 am Myo2-abhängigen Transport der Mitochondrien beteiligt ist. Mmr1 kolokalisiert mit Mitochondrien in der Knospe (Itoh *et al.*, 2004). Daher wurde zunächst angenommen, es könne sich bei Mmr1 um den mitochondrialen Myo2-Rezeptor handeln. Eine spätere Studie lässt jedoch vermuten, dass Mmr1 vielmehr

Mitochondrien in der Knospe verankert und dadurch deren Rücktransport in die Mutter verhindert (Swayne *et al.*, 2011). Die Funktion von Mmr1 könnte damit der von Num1 entgegengesetzt sein. Num1 verankert Mitochondrien in der Mutter und sorgt dafür, dass bei der Zellteilung genug Mitochondrien in der Mutter zurückbleiben (Klecker *et al.*, 2013). Um weitere Faktoren zu finden, die am Transport der Mitochondrien beteiligt sind, wurden bekannte negative Interaktoren von *MMR1* bei Expression von *myo2-fis1* untersucht. Diese Interaktoren sind hierbei Stämme, die schlechter als erwartet wuchsen, wenn neben dem im untersuchten Stamm deletierten Gen zusätzlich *MMR1* deletiert wurde. Ein verschlechtertes Wachstum kann ein Hinweis darauf sein, dass beide Gene am Transport von Mitochondrien beteiligt sind. Mithilfe der SGA-Methodik sollten Doppelmutanten generiert werden, in denen sowohl *MMR1* als auch jeweils ein interagierendes Gen deletiert waren. Zusätzlich enthielten diese Doppelmutanten ein *multi-copy*-Plasmid, auf dem *myo2-fis1* kodiert war. Als Kontrolle diente das entsprechende Leerplasmid. Anhand der Koloniegrößen mit *myo2-fis1* im Vergleich zum Leervektor konnte festgestellt werden, in welchen Doppelmutanten das Wachstum positiv oder negativ von Myo2-Fis1 beeinflusst wurde. In Doppelmutanten, die bei der Expression von Myo2-Fis1 besser wuchsen, könnte der Transport der Mitochondrien beeinträchtigt sein und durch den erzwungenen Transport in die Knospe durch das Fusionsprotein gerettet werden. Ist das Wachstum der Doppelmutanten durch die Expression vermindert, so könnte möglicherweise die Verankerung in der Mutter nicht mehr funktionieren und eine Überexpression von *myo2-fis1* zur Folge haben, dass die Mutter alle Mitochondrien verliert.

In der SGD-Datenbank sind negative Interaktoren von *MMR1* hinterlegt (Cherry *et al.*, 1998). Mithilfe dieser Liste wurde von Stefan Böckler (Zellbiologie, Uni Bayreuth) eine Glycerin-Stock-Bibliothek mit Deletionsmutanten des Paarungstyps a zusammengestellt. In dieser Bibliothek sind 113 Stämme enthalten (siehe Anhang; Tabelle A1) und sie besteht aus zwei Platten im 96-*well*-Format. Um eine SGA durchzuführen, wurde im SGA-Starterstamm Y7092 durch homologe Rekombination das Gen *MMR1* durch eine NTC-Resistenzkassette

unterbrochen. Doppelmutanten $\Delta mmr1 \Delta ypt11$ sind nicht lebensfähig (Itoh et al., 2004). Um den korrekten Phänotyp der neu erstellten $\Delta mmr1$ -Mutante zu bestätigen, wurde diese daher mit einem $\Delta ypt11$ -Stamm gekreuzt und nach Sporulation dissektiert (Abb. 4 A). Dabei konnte bestätigt werden, dass keine Doppelmutanten wuchsen. Lediglich eine Kolonie wuchs sowohl auf Medium mit G418 (Marker $\Delta ypt11$) als auch mit NTC (Marker $\Delta mmr1$). Dabei dürfte es sich jedoch um eine diploide Zelle gehandelt haben, da aus der entsprechenden Tetrade nur eine einzige weitere Kolonie gewachsen ist, die vom Genotyp $\Delta ypt11$ war und sich kein solches Aufspaltungsverhältnis innerhalb einer Tetrade ergeben kann.

Des Weiteren wurde in einer Blindauszählung die Vererbung der Mitochondrien im $\Delta mmr1$ Stamm im Vergleich zum unveränderten SGA-Starterstamm analysiert, der hier als WT angesehen wurde. Hierbei ergab sich wie zu erwarten, dass in $\Delta mmr1$ nur etwa 60 % der kleinen Knospen Mitochondrien enthielten (Abb. 4 B). Dies entspricht dem Wert, der auch bei Itoh et al. 2004 beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu wurden in 80 % des Wildtyps Mitochondrien in kleinen Knospen beobachtet.

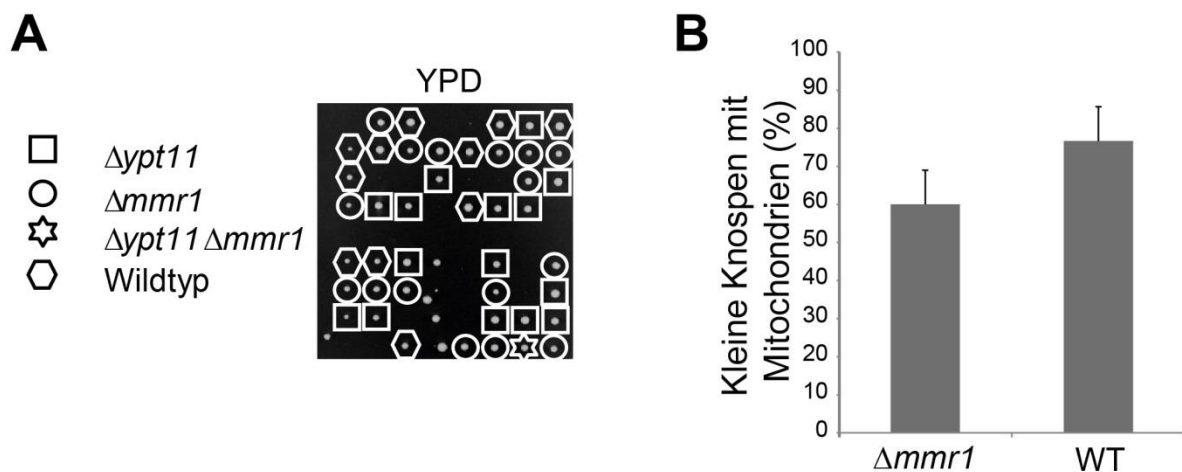


Abbildung 4: Bestätigung der MMR1-Deletion im SGA Stamm. A) Tetradendisektion der Kreuzung aus $\Delta ypt11$ und $\Delta mmr1$. Dissektierte Tetraden wurden für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Anhand der Überstreichung auf verschiedene Selektionsmedien wurde der Genotyp der einzelnen Kolonien bestimmt. **B)** Blindauszählung der Mitochondrienvererbung in $\Delta mmr1$ und dem SGA-Stamm (WT) in logarithmischer Phase. Die Stämme trugen ein mtGFP-Plasmid, um Mitochondrien sichtbar zu machen.

Nachdem der Phänotyp des *Δmmr1* Starterstammes bestätigt worden war, wurde dieser mit einem für *myo2-fis1* kodierenden *multi-copy*-Plasmid oder dem entsprechenden Leerplasmid transformiert. Anschließend wurde der Stamm in Flüssigkultur angezogen und auf, für den Stempelroboter geeignete, Agar-Platten als Rasen ausplattiert. Parallel dazu wurde die Bibliothek der negativen Interaktoren von *MMR1* mithilfe des Roboters im 96er-Format auf Agar-Platten gestempelt. Nach einem Tag wurden beide Bibliothek-Platten jeweils erneut überstempelt. Dabei wurde ein sogenanntes *Up-Array* auf ein 384er-Format durchgeführt, indem jeder Hefestamm viermal leicht versetzt auf die Zielplatte übertragen wurde, sodass danach jeder Stamm in vierfacher Kopie vorlag. Einen weiteren Tag später wurden die Stämme der Bibliothek sowie der SGA-Starterstamm auf YPD-Platten übereinander gestempelt und über Nacht bei 30 °C inkubiert, damit die Stämme sich verpaaren konnten. Anschließend erfolgte eine dreimalige Diploidenselektion auf geeigneten SCD-Platten. Die diploiden Stämme wurden daraufhin wie in Material und Methoden beschrieben sporuliert und durch Überstempeln auf entsprechende Selektionsmedien auf haploide Doppelmutanten mit Plasmid selektiert.

20 Stunden nach dem Überstempeln auf das finale Selektionsmedium wurden die Platten fotografiert (Abb. 5). Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. Dargestellt sind jeweils beide Plattenpaare der zwei Durchgänge.

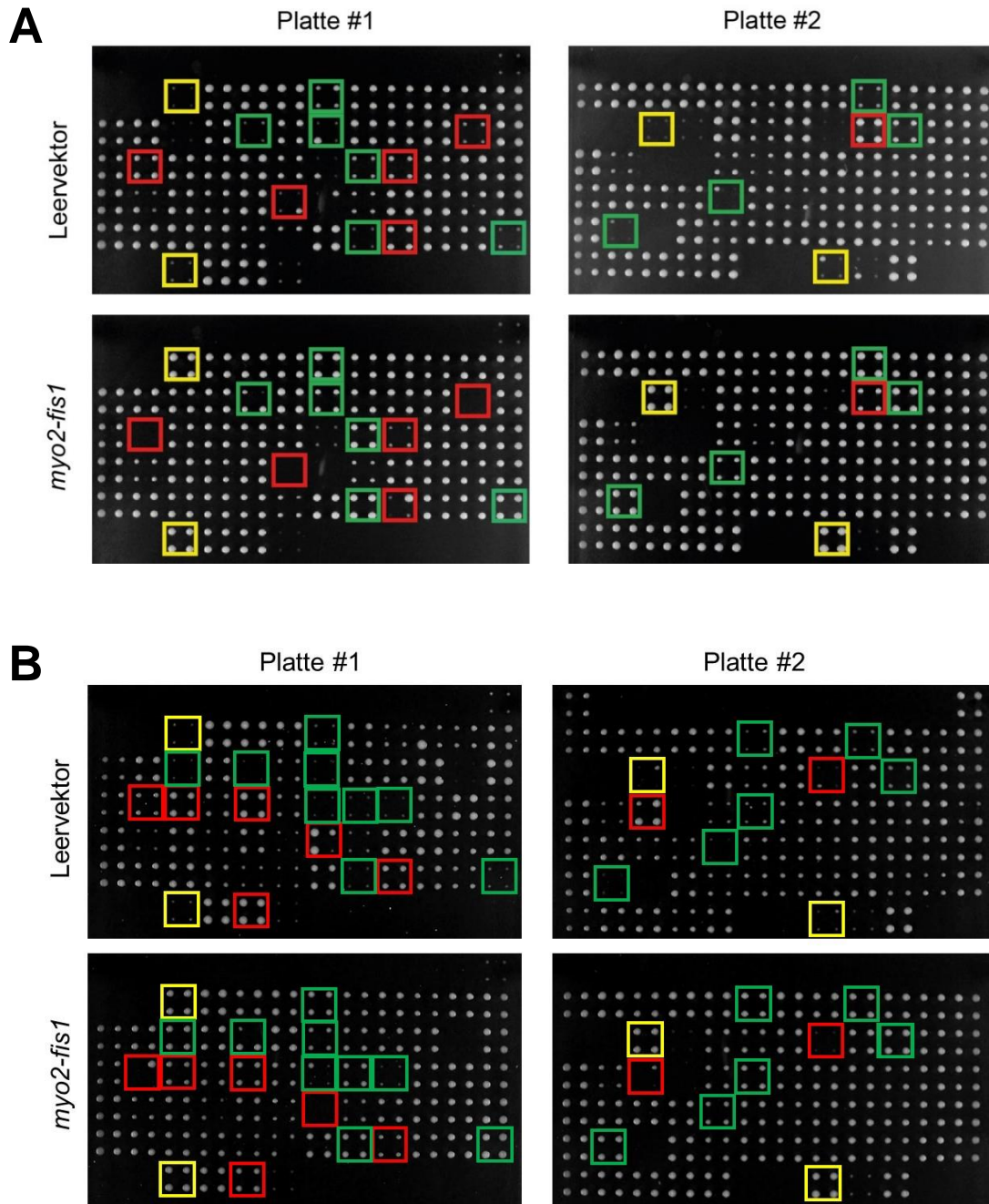


Abbildung 5: Finale Mutantenselektion der *MMR1*-Interaktoren-Doppelmutanten mit *myo2-fis1*-Expression. Grün: positive Interaktion mit *myo2-fis1*. Rot: negative Interaktion mit *myo2-fis1*. Gelb: Positivkontrolle $\Delta ypt11$. Dargestellt sind die Plattenpaare aus dem ersten (**A**) und zweiten (**B**) Durchgang nach 20 Stunden Inkubation bei 30 °C.

Der Vergleich des Wachstumsverhaltens der Doppelmutanten mit *myo2-fis1* oder dem Leerplasmid erfolgte mithilfe des Programms gitter (Wagih et al., 2014). Dort können Bilddateien der Platten hochgeladen werden, über die daraufhin die Koloniegröße ermittelt wird. Die durchschnittliche Größe der vier Einzelkolonien jedes Stammes mit *myo2-fis1* wurde durch die durchschnittliche Größe des entsprechenden Stammes mit Leervektor geteilt. War der Quotient größer 1,5 (1. Durchgang) bzw. 3 (2. Durchgang) oder kleiner 0,53 (1. Durchgang) bzw. 0,7 (2. Durchgang), so wurde der Stamm als positiver oder negativer Interaktor von *myo2-fis1* gewertet. Die Grenzwerte wurden dabei frei nach Betrachtung der einzelnen Graphen gesetzt. Die Grenzwerte der beiden Durchgänge unterscheiden sich hierbei, da das allgemeine Wachstum auf den Platten als Ganzes sich in den beiden Durchgängen etwas unterschied. Beispielhaft ist der Graph der Auswertung aus Durchgang 1 in Abb. 6 zu sehen. *Δypt11* diente in diesem Versuch als Positivkontrolle. Wie bereits beschrieben ist die Doppelmutante *Δmmr1 Δypt11* synthetisch letal. Durch die Expression von Myo2-Fis1 wird dieser Phänotyp jedoch gerettet (König, 2012). Wurde Myo2-Fis1 exprimiert, so wuchs die Doppelmutante, die mehrfach auf den Platten aufgebracht war, sieben bis 63-mal besser als die Doppelmutante, die lediglich den Leervektor enthielt. Dies ist dadurch bedingt, dass der Vererbungsdefekt der Mitochondrien durch den forcierten Transport der Mitochondrien in die Knospen kompensiert wird.

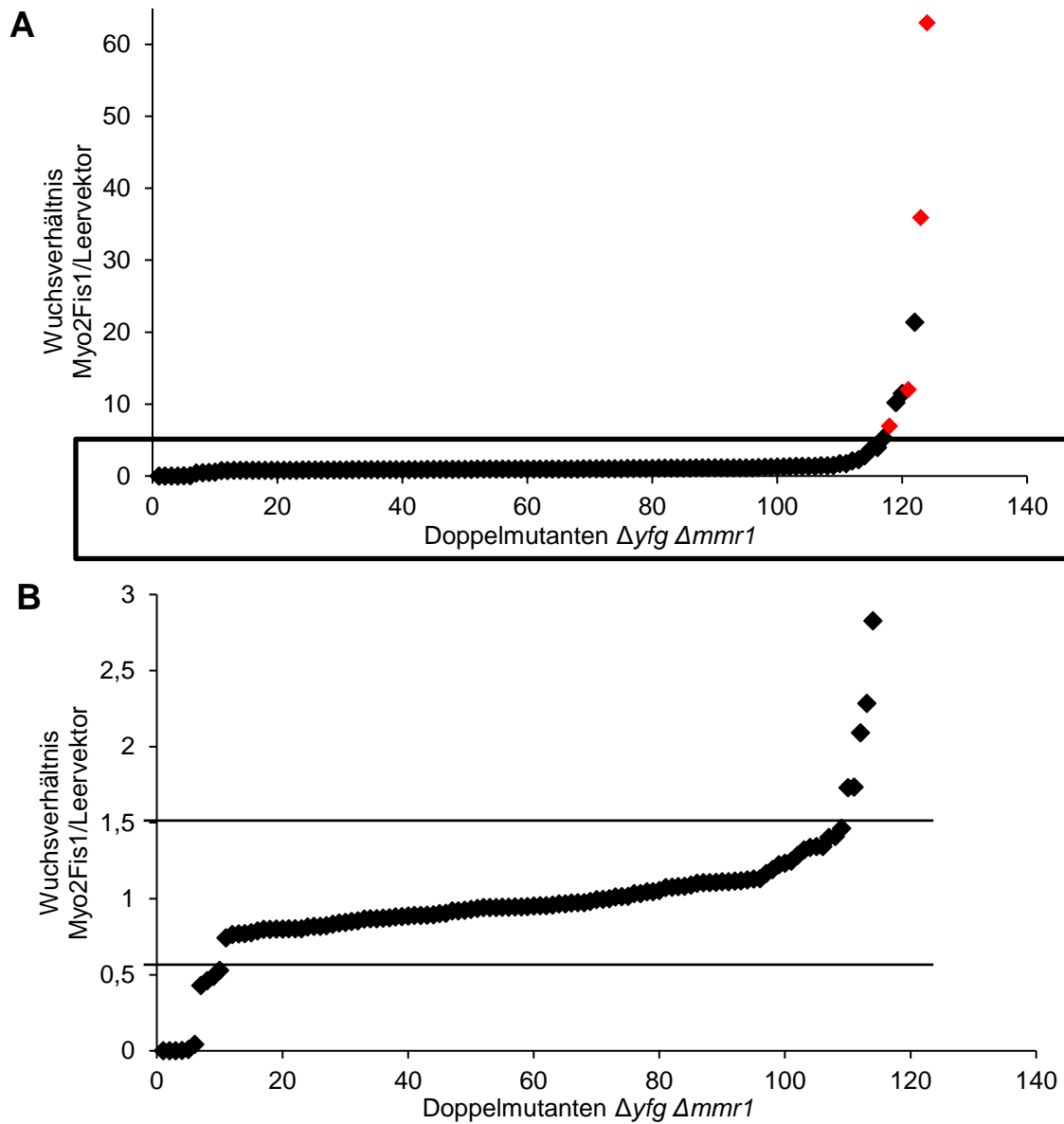


Abbildung 6: Graph der Auswertung des ersten Durchgangs der SGA. Aufgetragen ist das Wuchsverhältnis mit *myo2-fis1* im Vergleich zum Leervektor. **A)** Übersicht der Auswertung. Rot: $\Delta ypt11$, yfg: your favorite gene **B)** Teilausschnitt zur Bewertung positiver und negativer Interaktoren (entspricht dem schwarz umrandeten Bereich in A). Die Linien bei 1,5 bzw. 0,53 kennzeichnen die Grenzwerte positiver und negativer Interaktoren.

Die in diesem Screen identifizierten Kandidaten sind in Tabelle 4 aufgeführt. Insgesamt wuchsen elf der negativen Interaktoren von *MMR1* bei gleichzeitiger Expression von Myo2-Fis1 in beiden Durchgängen besser als erwartet. Zwei der Stämme wuchsen unter diesen Bedingungen schlechter als anzunehmen war. Wie zu erwarten befand sich *Δypt11* unter den Stämmen, die besser wachsen konnten.

Tabelle 4: Positive und negative Interaktoren von *myo2-fis1* in Kombination mit *Δmmr1*.

Positive genetische Interaktoren	Negative genetische Interaktoren
<i>PSD1, GEM1, MDM12, MDM34, SHE9, BNI1, NBP2, PTC1, YPT11, BTS1, MUB1</i>	<i>BEM1, NGG1</i>

Zur besseren Interpretation der Ergebnisse wurden die Interaktoren in Kategorien entsprechend ihrer Lokalisation oder Funktion aufgeteilt (Tabelle 5). Acht der 13 Interaktoren sind an Mitochondrien lokalisiert. Fünf spielen eine Rolle bei der Fusion oder Teilung der Mitochondrien. Vier Interaktoren sind für die Zellmorphologie wichtig und bei drei der Interaktoren handelt es sich um Komponenten des ERMES-Komplexes, der Mitochondrien und ER verbindet.

Tabelle 5: Positive und negative Interaktoren von *myo2-fis1 Δmmr1* nach Kategorien.

Vorgang/Komponente/Lokalisation	Gen
An Mitochondrien lokalisiert	<i>MDM12, GEM1, SHE9, PSD1, MDM34, BTS1, YPT11, BEM1</i>
Fusion/Teilung von Mitochondrien	<i>PSD1, GEM1, MDM12, MDM34, SHE9</i>
ERMES-Komponente	<i>GEM1, MDM12, MDM34</i>
Zellmorphologie	<i>BEM1, NGG1, BNI1, MUB1</i>

Der ERMES-Komplex spielt unter anderem eine wichtige Rolle für die Morphologie der Mitochondrien. Fehlen einzelne Komponenten des Komplexes, so liegen die Mitochondrien nicht mehr als verzweigtes Netzwerk, sondern globulär vor (Kornmann et al., 2009). Es wird vermutet, dass ERMES keine direkte Rolle bei der Vererbung der Mitochondrien spielt, sondern die Mitochondrien vielmehr in einer transportfähigen Form hält (Förtsch et al., 2011; Nguyen et al., 2012). In einer früheren Untersuchung der ERMES-Mutanten bei Expression von Myo2-Fis1 konnte keine Rettung des Vererbungsdefekts festgestellt werden (Förtsch et al., 2011). Dass im hier durchgeführten Screen dennoch ERMES-Komponenten als positive Interaktoren auftraten, könnte dadurch bedingt sein, dass die *Δermes Δmmr1* Doppelmutanten schlechter wachsen als die jeweiligen Einzelmутanten und positive Effekte so besser erkannt werden können. Umgekehrt ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass diese Beobachtung mit dem Umstand zusammenhängt, dass der *Δermes*-Phänotyp nach einiger Zeit weniger ausgeprägt ist. Im Laufe der SGA werden die Hefen mehrfach überstempelt. Daher ist es möglich, dass der mutante Phänotyp sich mit der Zeit abschwächt, wodurch die Mitochondrien weniger akkumuliert erscheinen. Dies kann z.B. durch Suppressoren bedingt sein (Lang et al., 2015). Auch dies könnte eine Rettung durch Myo2-Fis1 begünstigen.

Auch weitere hier gemachte Beobachtungen scheinen interessant - zum Beispiel in Bezug auf *Δgem1*. Gem1 ist ein Transmembranprotein der mitochondrialen Außenmembran (Frederick et al., 2004). In *Δgem1* Zellen ist der Transport von Mitochondrien in kleine Knospen leicht vermindert. Mittelgroße und große Knospen enthalten diese jedoch im selben Ausmaß wie der Wildtyp (Frederick et al., 2004). *GEM1* in *S. cerevisiae* ist ein Ortholog von *MIRO*, einer Familie von Proteinen, welche in höheren Eukaryoten, z.B. in *Drosophila melanogaster* und Säugern, vorkommt. Miro-Proteine spielen dort eine wichtige Rolle im Transport von Mitochondrien, sowohl intrazellulär in Nervenzellen als auch interzellulär durch sogenannte *tunneling nanotubes* zwischen benachbarten Zellen und bei der Vererbung von Mitochondrien bei der Teilung mesenchymaler Stammzellen (zusammengefasst in Tang, 2015). Dabei interagiert Miro in *Drosophila melanogaster* mit einem Protein namens Milton, welches

wiederum Kinesin bindet. Auch in Säugerzellen wurde diese Interaktion von Miro mit Milton-Homologen bestätigt. Diese Interaktion erlaubt den Transport von Mitochondrien entlang der Mikrotubuli (zusammengefasst in Rice und Gelfand, 2006 sowie Tang, 2015). In der Bäckerhefe, wo der Transport an Aktinkabeln erfolgt, ist eine solche Funktion von Gem1 nicht bekannt. Dort reguliert Gem1 die Verteilung des ERMES-Komplexes (Kornmann et al., 2011). Da nur in kleinen Zellen ein Vererbungsdefekt der Mitochondrien zu beobachten ist, scheint Gem1 in *S. cerevisiae* nicht unmittelbar an der Bindung von Myo2 an die Mitochondrien beteiligt zu sein. Ähnlich wie in anderen ERMES-Mutanten liegen die Mitochondrien in $\Delta gem1$ -Zellen globulär vor (Frederick et al., 2004). Es ist zu vermuten, dass die Mitochondrien in dieser Form schlechter zu transportieren sind und der Vererbungsdefekt in kleinen Knospen dadurch bedingt ist.

In diesem Screen konnten keine vielversprechenden neuen Kandidaten für den mitochondrialen Myo2-Rezeptor identifiziert werden, da die Funktion der gefundenen Gene überwiegend bekannt ist und von einigen Kandidaten bereits aufgeklärt war, dass diese eine Rolle im Zusammenhang mit Mitochondrien spielen. Dabei bedingen die Kandidatengene jedoch vor allem die Zusammensetzung und Morphologie der Mitochondrien und sind damit eher indirekt an deren Transport beteiligt. Auch die Zellmorphologie beeinflusst die Vererbung der Mitochondrien nur indirekt, indem die Grundlagen, z.B. die Organisation des Zytoskeletts, gelegt werden und nicht dadurch, dass die entsprechenden Gene den mitochondrialen Myo2-Rezeptor kodieren. Ein Beispiel hierfür ist das Formin Bni1. Zusammen mit Bnr1 reguliert Bni1 die Ausbildung von Aktinkabeln (Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002), an denen später der Mitochondrientransport erfolgt. Auch ohne neue Kandidaten für einen Myo2-Rezeptor geliefert zu haben, zeigt dieser Versuch aber, dass sich diese Herangehensweise generell dafür eignet, mögliche Interaktoren zu finden, die an der Vererbung der Mitochondrien beteiligt sind.

3.3.2 SGA-Screen der *MATa*-Bibliothek bei Expression von *Myo2-Fis1*

Der SGA-Screen negativer Interaktoren von *MMR1* zeigte, dass die Expression von *Myo2-Fis1* für Hochdurchsatzverfahren genutzt werden kann. Dabei wurde jedoch nur eine kleine Anzahl von Genen untersucht. Im weiteren Verlauf wurde daher die gesamte haploide *MATa*-Deletionsbibliothek mit mehr als 4000 Hefestämmen einem solchen Screen unterzogen. Dafür wurde der ursprüngliche SGA-Starterstamm Y7092 mit denselben *multi-copy*-Plasmiden transformiert, die bereits im *MMR1*-Screen verwendet worden waren und mit der Bibliothek gekreuzt. Dadurch sollten keine Doppelmutanten generiert werden, sondern in die gesamte *MATa*-Bibliothek die Plasmide eingebracht werden. Im Gegensatz zur Untersuchung an *MMR1* ergaben sich hierbei Probleme bei der Sporulation. Statt Tetraden waren unter dem Mikroskop fast ausschließlich Di- oder Triaden zu beobachten. D.h. statt der üblichen vier Sporen in einem Ascus waren lediglich zwei oder drei zu sehen. Zudem fand nur an vereinzelt Positionen Wachstum auf den Haploidenselektionsplatten statt. Eine mögliche Ursache dafür scheint zu sein, dass der *MMR1*-Screen im 384er-Format durchgeführt wurde, der Screen der gesamten haploiden *MATa*-Bibliothek jedoch im 1536er-Format. Dabei sind die Kolonien jedes Stammes kleiner und liegen zudem näher beieinander. Weswegen genau in diesem Format die Sporulation gestört war, ließ sich nicht feststellen. Es zeigte sich jedoch im weiteren Verlauf, dass sich unter Verwendung eines *low-copy*-Konstruktes keine Probleme bei der Sporulation ergaben. In Zellen mit *low-copy*-Plasmiden liegen nur wenige Kopien des Plasmids vor, während *high-copy*-Plasmide in größerer Zahl vorliegen. Dadurch sind die Zellen unterschiedlich, z.B. durch die Expression von Genen belastet (Karim et al., 2013). Im konkreten Fall wird demnach unter Verwendung von *high-copy*-Plasmiden mehr *Myo2-Fis1* in den Zellen produziert. Der zu beobachtende Phänotyp ist entsprechend stärker (Förtsch et al., 2011). Dies erklärt generell, weswegen sich die Zellen bei unterschiedlicher Kopienzahl unterschiedlich verhalten können. Abhängig vom Versuchsaufbau und der Fragestellung können sich daher *low*- oder *high-copy*-Konstrukte besser eignen.

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abb. 7 A dargestellt. Der SGA-Stamm, der das *myo2-fis1*-Konstrukt bzw. den Leervektor enthielt, wurde mit der *MATa*-Bibliothek gekreuzt und nach anschließender Sporulation auf geeignete Medien überstempelt, um auf haploide Mutanten mit *myo2-fis1* oder Leervektor zu selektieren. Um zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuchs die Mitochondrienmorphologie überprüfen zu können, wurde der Starterstamm zusätzlich mit einem Plasmid transformiert, das für mitochondrial lokalisiertes GFP kodiert. Als Negativkontrolle diente in diesem Versuch $\Delta num1$. Num1 verankert Mitochondrien in der Mutterzelle. Fehlt Num1, so führt eine Überexpression von Myo2-Fis1 dazu, dass nahezu alle Mitochondrien in die Knospe transportiert werden (Klecker et al., 2013). Die Mutter behält daraufhin nicht genug mitochondriale Masse zurück und stirbt. Wie zu erwarten konnte im SGA-Screen beobachtet werden, dass der $\Delta num1$ Stamm, der *myo2-fis1* enthielt, nicht lebensfähig war (Abb. 7 B).

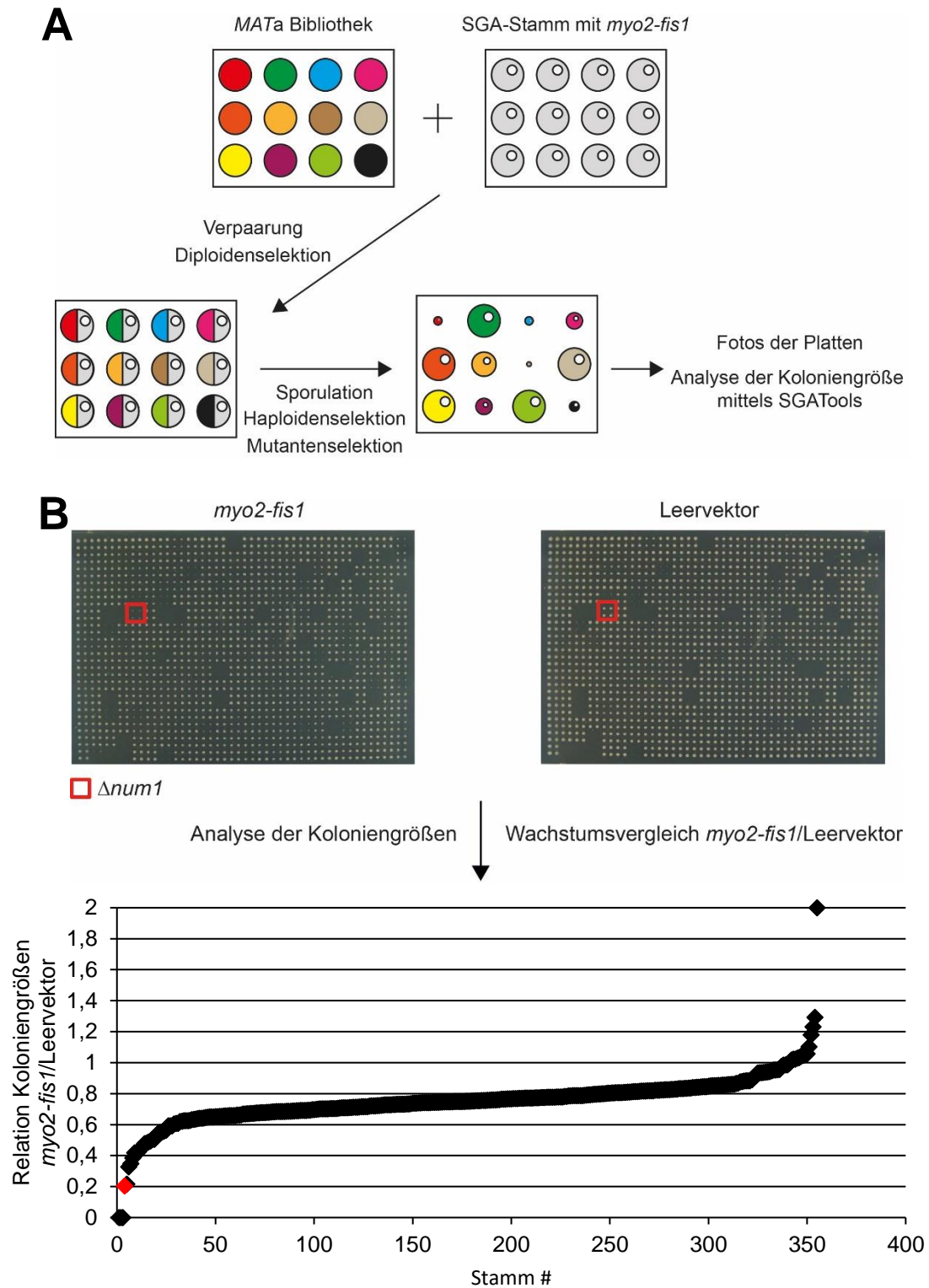


Abbildung 7: SGA-Screen der MATa-Bibliothek mit *myo2-fis1*. **A)** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. **B)** Beispiel der Auswertung eines Plattenpaares nach finaler Mutantenselektion mithilfe von SGATools. $\Delta num1$ (rot) diente hier als Negativkontrolle.

Die SGA wurde zweimal mit allen Stämmen der Deletionsbibliothek durchgeführt. In beiden Durchgängen wurden positive und negative Interaktoren festgestellt. 48 Stämme wuchsen beide Male deutlich besser als erwartet, sobald Myo2-Fis1 exprimiert wurde. 104 Stämme wiederum wiesen mit Myo2-Fis1 ein schlechteres Wachstum auf, als zu erwarten gewesen wäre. Die Listen der positiven bzw. negativen Interaktoren finden sich im Anhang (Tabellen A2 und A3). Um diese Interaktoren einzuordnen, wurden sogenannte *Gene Ontology* (GO)-Term Analysen durchgeführt. Solche Analysen werden herangezogen, um bei genetischen Screens den Satz potentieller Kandidaten in Anbetracht des gesamten Hintergrunds, der für den jeweiligen Screen eingesetzt wurde, zu bewerten. Dabei wird festgestellt, ob eine bestimmte zelluläre Funktion oder Lokalisation innerhalb der Liste der Kandidaten signifikant häufiger angereichert ist als im kompletten verwendeten Hintergrund, in diesem Fall in der MATa Bibliothek. Durchgeführt wurden die Analysen mithilfe des Webtools, welches auf der Internetseite der *Saccharomyces Genome Database* verfügbar ist (Boyle et al., 2004; <https://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>). Dort besteht die Möglichkeit die Anreicherung von Funktionen, Prozessen oder Komponenten zu ermitteln. Dabei kann eingestellt werden, welcher Signifikanzwert als Grenze angenommen werden soll, um Kandidaten einzugrenzen. Es kann zwischen p-Werten von 0,1; 0,05 und 0,01 gewählt werden.

Die negativen Interaktoren wiesen in der Kategorie „Prozesse“ und „Komponenten“ bereits bei einem p-Wert kleiner 0,01 Anreicherungen auf. Dabei wurden in der Kategorie „Prozesse“ Anreicherungen in Bereichen festgestellt, die unter anderem den Zellzyklus, das Zytoskelett und Organellenvererbung betreffen (Abb. 8). In der Kategorie „Funktionen“ wurden zur Auswertung p-Werte kleiner 0,1 zugelassen. Als einziger Treffer für $p < 0,05$ wurde „Motoraktivität“ ermittelt. Die Auswertung der Kategorien „Komponenten“ und „Funktionen“ findet sich im Anhang (Abb. A1 und A2). Die GO-Term-Analyse der negativen Interaktoren zeigte unter anderem eine Anreicherung von Genen des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Abb. 8). Eine mögliche Erklärung ist, dass Myo2 an der Ausrichtung der mitotischen Spindel beteiligt

ist (Hwang et al., 2003). Die IQ-Motive von Myo2 werden durch Calmodulin und die essentielle leichte Kette Mlc1 stabilisiert. Wird *MYO2* überexprimiert, so wirkt sich dies toxisch auf die Hefe aus. Wird jedoch gleichzeitig *MLC1* überexprimiert, so kann diesem Effekt entgegengewirkt werden. Eine Erklärung für den toxischen Effekt der *MYO2*-Überexpression ist daher vermutlich, dass bei der Überexpression von *MYO2* nicht genug Mlc1 vorliegt, um Myo2 zu stabilisieren (Stevens und Davis, 1998). Myo2-Fis1 beinhaltet die IQ-Motive von Myo2. Durch die Überexpression von Myo2-Fis1 ist es daher wahrscheinlich, dass Mlc1 in größerer Menge benötigt wird und daher für die Bindung an das endogen exprimierte Myo2 und für die anderen, von diesem vermittelten, Vorgänge in der Zelle nicht zur Verfügung steht. So könnte die Funktion des wildtypischen Myo2 bei der Orientierung der Kernteilungsspindel gestört sein. Darüber hinaus interagiert Mlc1 außer mit Myo2 noch mit Myo1 und Iqg1 und koordiniert mit diesen die Assemblierung und die Kontraktion des Aktomyosinringes (Luo et al., 2004). Dies könnte erklären, weswegen Zellen, in denen zusätzlich zur Expression von Myo2-Fis1 ein Gen des Zellzyklus oder des Zytoskeletts deletiert ist, schlechter wachsen.



Abbildung 8: GO-Term-Analyse negativer Interaktoren von *myo2-fis1* in der Kategorie „Prozesse“. Die Auswertung erfolgte mithilfe des „GO Term Finder“ der *Saccharomyces Genome Database* (Boyle et al., 2004). Angezeigt werden Anreicherungen mit einem p-Wert kleiner 0,01. Die angereicherten Prozesse wurden in Unterkategorien unterteilt. Schwarz: Vererbung des Zellkerns; Rot: Organellenteilung; Blau: Zellzyklus; Grün: Lokalisation und Transport von Zellbestandteilen; Gelb: Zytoskelett; Rosa: Zelluläre Prozesse und Organisation.

Auffällig war zudem, dass die Mutanten der mitochondrialen Fusionsmaschinerie *Δfzo1*, *Δmgm1* und *Δugo1* als negative Interaktoren auftraten. Besonders die Rolle von *FZO1* wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit eingehender untersucht. Viele weitere negative Interaktoren konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert werden. Jedoch könnten einige der Kandidaten in Zukunft noch einmal näher betrachtet werden, um direkte oder indirekte Auswirkungen ihrer Deletion auf die Vererbung der Mitochondrien zu analysieren.

Bei der Auswertung der positiven Interaktoren ergaben sich selbst bei einem p-Wert kleiner 0,1 keine Anreicherungen von Funktionen und Prozessen, sondern lediglich von Komponenten. Wie bereits beim *MMR1*-SGA-Screen tauchten auch hier *ERMES*-Komponenten als positive Interaktoren auf (Abb. 9). Die Analyse der positiven Interaktoren zeigte zudem eine Anreicherung von Komponenten des Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) - Komplexes. Zwei der fünf Untereinheiten wiesen in beiden Durchgängen eine positive Interaktion mit *Myo2-Fis1* auf. Diese Gene waren *LAT1* und *PDX1*. Der PDH-Komplex lokalisiert in der mitochondrialen Matrix in distinkten Punkten in der Nähe des *ERMES*-Komplexes und an Kontaktstellen von Mitochondrien und Peroxisomen (Cohen et al., 2014). In dieser Arbeit wurde der PDH-Komplex jedoch nicht weiter untersucht. Neben den Bestandteilen des PDH- und des *ERMES*-Komplexes waren auch cytosolische prä-ribosomale Komponenten angereichert. Doch hierbei handelt es sich vermutlich nur um mittelbare Effekte, weswegen auch diese nicht weiter analysiert wurden.

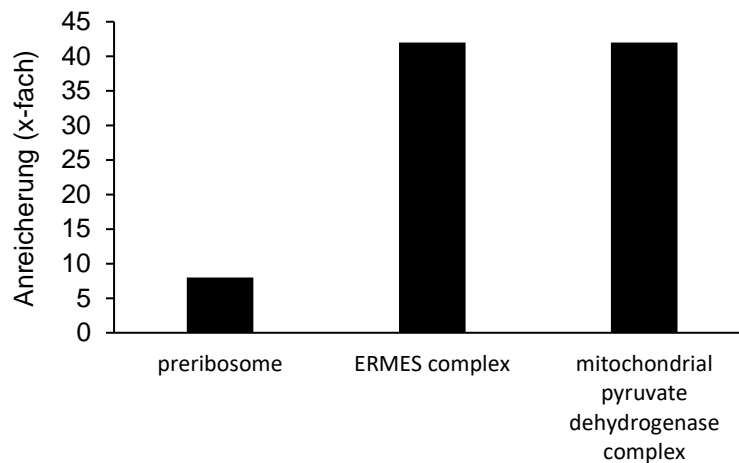


Abbildung 9: GO-Term-Analyse positiver Interaktoren von *myo2-fis1* in der Kategorie „Komponenten“. Die Auswertung erfolgte mithilfe des „GO Term Finder“ der *Saccharomyces Genome Database* (Boyle et al., 2004). Positive Interaktoren von *myo2-fis1* wurden auf Anreicherungen bestimmter Komponenten im Vergleich zur kompletten *MATa*-Bibliothek untersucht. Angezeigt werden Anreicherungen mit einem p-Wert kleiner 0,1.

3.3.2.1 Einfluss positiver Interaktoren von *Myo2-Fis1* auf die mitochondriale Vererbung

Um zu überprüfen, ob die verbesserte Lebensfähigkeit einiger Stämme unter Expression von *myo2-fis1* durch die veränderte Vererbung der Mitochondrien bedingt war, wurden die 48 positiven Interaktoren aus dem SGA-Screen mit Leervektor bzw. *myo2-fis1* mikroskopisch analysiert. Alle Stämme enthielten aus der SGA bereits mtGFP, konnten also ohne weitere Anfärbung analysiert werden. Um eine subjektive Fehlerquelle zu vermeiden, wurde eine Blindanalyse durchgeführt. Die Mikroskopie fand demnach ohne Kenntnis, welcher Stamm mikroskopiert wurde, statt. Von den mikroskopierten 48 Stämmen wiesen nur 14 Stämme mit Leervektor mit kleinen bis mittelgroßen Knospen in weniger als 90 % der Knospen Mitochondrien auf (Abb. 10). In den nicht dargestellten Stämmen enthielten zwischen 92-100 % der Knospen Mitochondrien. Im Durchschnitt aller 48 Stämme enthielten 92 % der Knospen Mitochondrien. In Abbildung 10 sind lediglich die Stämme aufgeführt, deren

Vererbungsdefekt über dem am Durchschnitt orientierten Schwellenwert von 10 % lag. Am stärksten war der Vererbungsdefekt in $\Delta mdm12$ und $\Delta mmr1$. In beiden Fällen erhielten mehr als 30 % der Knospen keine Mitochondrien. Wurde in den Stämmen *myo2-fis1* exprimiert, so konnten in fast allen Knospen Mitochondrien beobachtet werden. Der typische Vererbungsdefekt von $\Delta mmr1$ konnte ebenfalls wie zu erwarten gerettet werden. Lediglich der Vererbungsdefekt in $\Delta mdm34$ und $\Delta vps38$ konnte durch die Expression von *myo2-fis1* nur leicht vermindert werden. Im Fall derERMES-Mutante $\Delta mdm34$ wurde der Anteil von Knospen ohne Mitochondrien von 14 % mit Leervektor auf 6 % mit *myo2-fis1*, sowie im Fall von $\Delta vps38$ von 12 % mit Leervektor auf 8 % mit *myo2-fis1* verringert. Vps38 ist Bestandteil des Vps34 Phosphatidylinositol 3-Kinase Komplexes und ist an der korrekten Verteilung vakuolärer Proteine beteiligt (Kihara et al., 2001; Luo und Chang, 1997). Eine direkte Beteiligung am Mitochondrientransport ist unwahrscheinlich.

Unter den positiven Interaktoren, deren mitochondriale Vererbung verändert war, fanden sich unter anderem die Deletionsmutanten derERMES-Komponenten *MDM34* und *MDM12*. Der in $\Delta mdm34$ beobachtete Vererbungsdefekt sowie die nur leichte Rettung durch *Myo2-Fis1* ähneln den Beobachtungen, die von Förtsch et al. (2011) gemacht wurden. Die verminderte Vererbung in $\Delta mdm12$ war in der hier beschriebenen Untersuchung jedoch deutlich stärker zu beobachten, als dies bei Förtsch et al. (2011) der Fall war. Im Gegensatz dazu war die Verschiebung der Vererbung hin zu der Knospe bei Expression von *Myo2-Fis1* deutlich ausgeprägter. Der typischeERMES-Phänotyp mit aggregierten Mitochondrien war bei $\Delta mdm12$ mit Leervektor sehr viel besser zu erkennen als mit dem *myo2-fis1* Plasmid. Es ist möglich, dass sich im Stamm mit *myo2-fis1* Suppressoren gebildet haben, wodurch die Mitochondrien einen wildtypischen Phänotyp annahmen und durch *Myo2-Fis1* effektiv in die Knospen transportiert werden konnten.

Ein weiterer interessanter Kandidat war in diesem Screen $\Delta ppa2$. Ppa2 ist eine mitochondriale Pyrophosphatase. Deletionsmutanten verlieren das mitochondriale Genom

(Lundin et al., 1991). Eine Mutation dieses Gens führt in Säuglingen zu plötzlichem Herzstillstand (Guimier et al., 2016; Kennedy et al., 2016). Guimier et al. (2016) postulieren, dass *PPA2* für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials wichtig ist und ältere Hefen dieser Mutante keine Mitochondrien enthalten. Die Behauptung, dass diese Hefen keine Mitochondrien enthalten, stützt sich dabei auf Western-Blot-Untersuchungen mitochondrialer Proteine. *Δppa2* ist zudem 2002 als Mutante mit veränderter Mitochondrienmorphologie identifiziert worden (Dimmer et al., 2002). Die Vererbung der Mitochondrien in dieser Mutante wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Doch die bisher bekannten Eigenschaften von *Δppa2*-Mutanten könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Vererbung der Mitochondrien in dieser Mutante tatsächlich beeinflusst sein könnte. *PPA2* sollte daher für eine genauere Charakterisierung in Betracht gezogen werden.

Unter den positiven Kandidaten befand sich auch das Gen *YLR365W*, welches vermutlich ein Protein mit unbekannter Funktion kodiert und bisher kaum charakterisiert ist. Zudem fanden sich Gene, die eine Rolle bei der Vererbung der mtDNA spielen, wie *AIM4* und *MET7* (Hess et al., 2009; Zhang und Singh, 2014). Die Auszählung der mitochondrialen Vererbung der positiven Interaktoren wurde nur einmal durchgeführt, weswegen sie nur eingeschränkt aussagekräftig ist. Zudem wurde die Mikroskopie mit den aus der SGA gewonnenen Stämmen ausgeführt. Um die Beobachtungen zu verifizieren, sollten die identifizierten Stämme aus der *MATa* Bibliothek händisch noch einmal mit dem Leervektor bzw. dem *myo2-fis*-Konstrukt transformiert und mikroskopiert werden.

Insgesamt wurden ca. 150 potentielle Interaktoren von Myo2-Fis1 identifiziert, die am Myo2-abhängigen Transport beteiligt sein könnten. Die Mikroskopie der positiven Interaktoren bestätigte, dass in einigen dieser Stämme die Vererbung der Mitochondrien verändert war. Eine Vielzahl negativer Interaktoren wurde ebenfalls erkannt, jedoch bisher nicht im Detail analysiert. Diese stellen damit eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen dar.

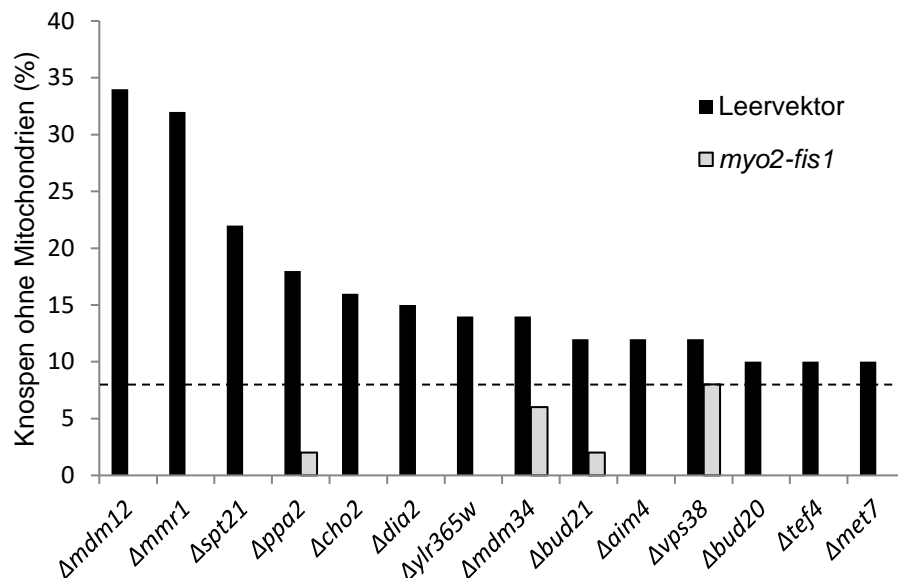


Abbildung 10: Vererbung der Mitochondrien in positiven Interaktoren von *myo2-fis1*.

Übernachtskulturen in 96-*deep-well* Platten wurden morgens 1:10 verdünnt und in denselben Platten mit geeignetem Selektionsmedium angezogen. Je 50 Zellen wurden in logarithmischer Wachstumsphase (nach drei bis vier Stunden bei 30 °C) mikroskopisch analysiert und Zellen gezählt, deren Knospen keine Mitochondrien enthielten. Ein Wildtyp wurde nicht parallel mitgezogen, da alle Stämme direkt aus der SGA stammen, in der nach der finalen Selektion kein Wildtyp enthalten ist. Gestrichelte Linie: Durchschnittlicher Wert von Knospen ohne Mitochondrien in allen 48 mikroskopierte Stämmen.

3.4 Untersuchung des Zusammenhangs von Fusion und Transport von Mitochondrien

3.4.1 *Δfzo1 myo2-fis1* ist letal

Bei der SGA hatten die mitochondrialen Fusionsmutanten *Δfzo1* und *Δmgm1* in beiden und *Δugo1* in einem der beiden Durchgänge eine negative Interaktion mit *myo2-fis1* aufgewiesen. Im weiteren Verlauf wurden die Auswirkungen von Myo2-Fis1 in *Δfzo1* weiter charakterisiert, um einen möglichen Zusammenhang mit der Vererbung der Mitochondrien in dieser Fusionsmutante aufzuklären. Die Transformation eines *myo2-fis1*-kodierenden

Plasmids in $\Delta fzo1$ erbrachte keine Transformanten. Dies deutete darauf hin, dass das Konstrukt in $\Delta fzo1$ -Zellen nicht toleriert wird. Um dieses Problem zu umgehen, wurden daher die Einzelmutante $\Delta fzo1$ sowie die Kontrollen $\Delta dnm1$ und die Doppelmutante $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ und der WT zunächst mit pRS416-FZO1 transformiert. Bei pRS416-FZO1 handelt es sich um ein *single-copy*-Plasmid mit Uracil-Marker, das eine wildtypische Kopie von *FZO1* enthält, welche konstitutiv exprimiert wird. *DNM1* ist für die Teilung der Mitochondrien essentiell. In der Doppelmutante $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ findet weder Teilung noch Fusion der Mitochondrien statt, wodurch ein nahezu wildtypisch verzweigtes, jedoch undynamisches Mitochondriennetzwerk entsteht (Sesaki und Jensen, 1999). Der mit pRS416-FZO1 komplementierte $\Delta fzo1$ -Stamm und die Kontrollen konnten daraufhin zusätzlich mit dem Plasmid pRS425-my02-fis1 bzw. dem entsprechenden Leervektor pRS425 transformiert werden. Dieses *multi-copy*-Plasmid kodiert für das Fusionsprotein Myo2-Fis1, welches konstitutiv exprimiert wird. Je zwei bis drei Einzelkolonien der so doppelt transformierten Stämme wurden anschließend zweimal auf SCD-Platten ohne Leucin, jedoch mit Uracil überstrichen. Dies sollte es den Zellen erlauben, das für *FZO1* kodierende Uracil-Plasmid zu verlieren. Zuletzt wurden die Ausstriche auf SCD-Leu mit zusätzlicher 5-Fluororotsäure (5-FOA) übertragen. 5-FOA wird in Zellen, die das Gen *URA3* - und damit eine funktionelle Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase enthalten - zum toxischen 5-Fluoruracil umgewandelt. 5-FOA ist demnach zur Selektion gegen Hefen mit *URA3*-enthaltenden Plasmiden geeignet (Boeke et al., 1984). In Abb. 11 ist ersichtlich, dass $\Delta fzo1$ nicht in der Lage war, pRS416-FZO1 zu verlieren, wenn zusätzlich *myo2-fis1* exprimiert wurde. Alle drei ausgestrichenen Klone zeigten kaum Wachstum. Dies lässt darauf schließen, dass die Expression von Myo2-Fis1 in $\Delta fzo1$ letale Auswirkungen hat. $\Delta dnm1$ und der WT hingegen konnten auch mit dem *myo2-fis1*-Plasmid normal wachsen. Lediglich die Doppelmutante $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ zeigte bei einem von drei Klonen ein vermindertes Wachstum mit *myo2-fis1*, wuchs ansonsten aber deutlich besser als $\Delta fzo1$.

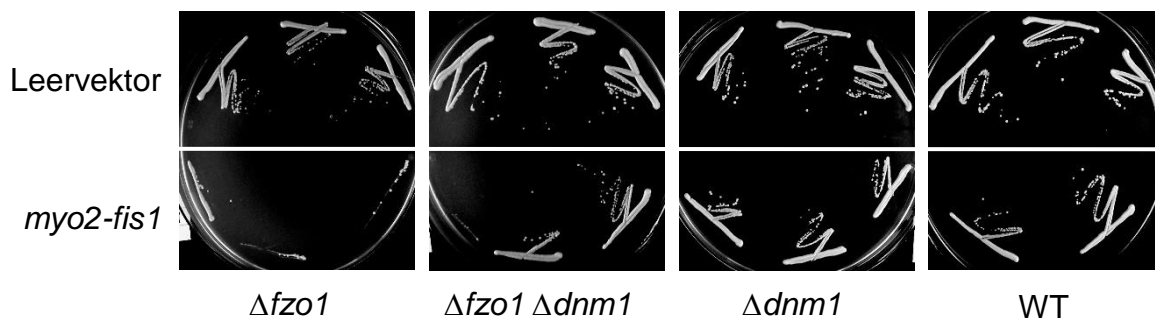


Abbildung 11: Verdünnungsausstrich zur Überprüfung des Wachstums von $\Delta fzo1$ bei Expression von *myo2-fis1*. Jeweils zwei bis drei Einzelkolonien der angegebenen Stämme wurden in einem Verdünnungsausstrich auf geeignetes Selektionsmedium mit 5-FOA appliziert. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 30 °C.

Diese Beobachtung sollte in einem Tüpfeltest bestätigt werden. Mit den hier beschriebenen Medien und Plasmiden konnte jedoch kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Daher wurden die Teilungs- und Fusionsmutanten sowie der WT mit pVV209-*myo2-fis1* (Böckler et al., 2017) oder dem Leerplasmid pVV209 (Van Mullem et al., 2003) als Kontrolle transformiert. Dabei handelt es sich um ein *single-copy* Plasmid mit *tetO-CYC1* Promotor. In Abwesenheit von Doxycyclin (DOX) ist dieser Promotor aktiv und *myo2-fis1* wird exprimiert. Durch Zugabe von DOX wird die Expression gestoppt (Garí et al., 1997). Dementsprechend wurden die Transformanten auf SCD-Medium mit DOX angezogen, sodass zunächst kein Myo2-Fis1 gebildet wurde und nach einer ÜNK auf Medium mit oder ohne DOX appliziert. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, waren alle Stämme gleichermaßen lebensfähig, solange keine Expression von *myo2-fis1* stattfand. War jedoch kein DOX enthalten und Myo2-Fis1 lag in den Zellen vor, so war $\Delta fzo1$ nahezu tot. Auch hier wuchsen der WT und $\Delta dnm1$ unbeeinträchtigt, während $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ einen deutlichen Wachstumsdefekt zeigte, der jedoch nicht so stark wie bei $\Delta fzo1$ ausfiel. In Abb. 11 war der Defekt in diesem Ausmaß nicht erkennbar. Jedoch sind Ausstriche dieser Art relativ ungenau und lassen daher keine detaillierten Schlüsse zu. In der Doppelmutante liegt ein nahezu wildtypisches, jedoch adynamisches Mitochondriennetzwerk vor (Sesaki und Jensen, 1999). Dass die Mutante jedoch mit Myo2-

Fis1 lebensfähig ist, lässt den Schluss zu, dass nicht die Unfähigkeit zur Fusion den letalen Phänotyp in $\Delta fzo1$ verursacht. Stattdessen liegt die Ursache vermutlich darin, dass die Mitochondrien in $\Delta fzo1$ fragmentiert vorliegen.

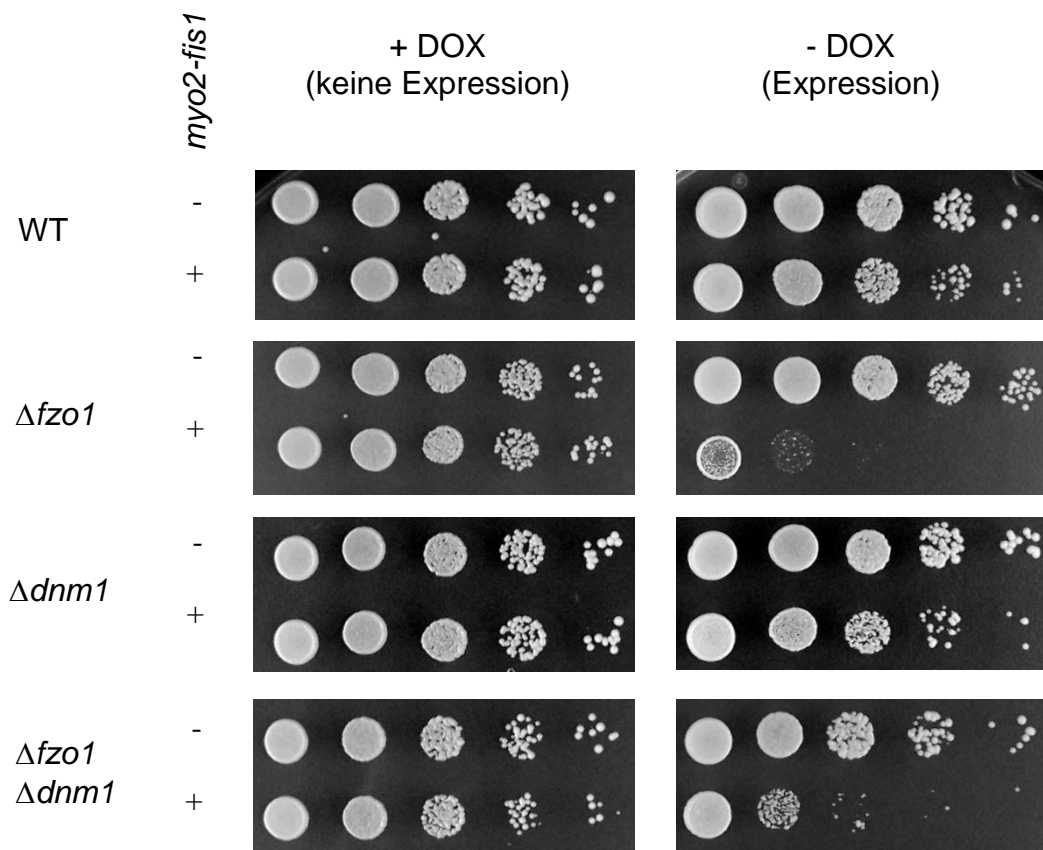


Abbildung 12: Die Expression von *myo2-fis1* wirkt in $\Delta fzo1$ toxisch. Die dargestellten Stämme enthielten ein DOX-reprimiertes *myo2-fis1*-Konstrukt (+) bzw. den entsprechenden Leervektor (-). Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 30 °C in 1 ml SCD-Ura+DOX (keine Expression). Nach ca. 16 h wurde die Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) aller Stämme auf 1 eingestellt die Stämme seriell 1:10 bis zu einem Faktor von 1:10000 verdünnt. Je 5 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf SCD-Ura mit DOX (keine Expression) bzw. SCD-Ura ohne DOX (Expression) appliziert. Die Inkubation erfolgte drei Tage lang bei 30 °C.

3.4.2 Der Verlust mitochondrialer DNA bedingt nicht die verringerte Lebensfähigkeit von *Δfzo1 myo2-fis1*

Bei einer weiteren Überprüfung durch Überstreichen auf YPG (nicht fermentatives Medium mit Glycerin statt Glucose) wurde festgestellt, dass die aufgetragenen Klone der Doppelmutante *Δfzo1 Δdnm1* und ebenso wie zu erwarten *Δfzo1* nicht wachsen konnten. Dies bedeutet vermutlich, dass in der Doppelmutante das mitochondriale Genom verloren gegangen ist. Dieser Aspekt war bei den Stämmen in den Testausstrichen in Abb. 11 nicht berücksichtigt worden. Um auszuschließen, dass der Verlust des mitochondrialen Genoms für den Wachstumsdefekt verantwortlich ist, wurde zur Kontrolle auch *Δmip1* mit pVV209-*myo2-fis1* oder pVV209 transformiert und zusammen mit dem WT und *Δfzo1* wie oben beschrieben getüpfelt. Mip1 ist die mitochondriale DNA-Polymerase. In *Δmip1* Mutanten enthalten Mitochondrien keine mtDNA (Genga et al., 1986). *Δmip1* zeigte bei *myo2-fis1*-Expression ein deutlich geringes Wachstumsdefizit als *Δfzo1* (Abb. 13). Dies lässt den Schluss zu, dass nicht der Verlust der mtDNA, sondern tatsächlich die Morphologie der Mitochondrien verantwortlich dafür ist, dass *myo2-fis1* mit *Δfzo1* negativ interagiert. Der Umstand, dass die Doppelmutante *Δfzo1 Δdnm1* deutlich schlechter als der Wildtyp wuchs, könnte damit zusammenhängen, dass die Mitochondrien keine Teilung durchlaufen. So werden unter forciertem Transport möglicherweise mit jedem Transportereignis mehr Mitochondrien als üblich in die Knospen transportiert, da diese nicht vom Mitochondrienanteil in der Mutter getrennt werden. Zudem könnte die Qualität der Mitochondrien in der Doppelmutante beeinträchtigt sein, da geschädigte Mitochondrien nicht durch Teilung vom Rest der mitochondrialen Masse getrennt und durch Mitophagie entfernt werden.

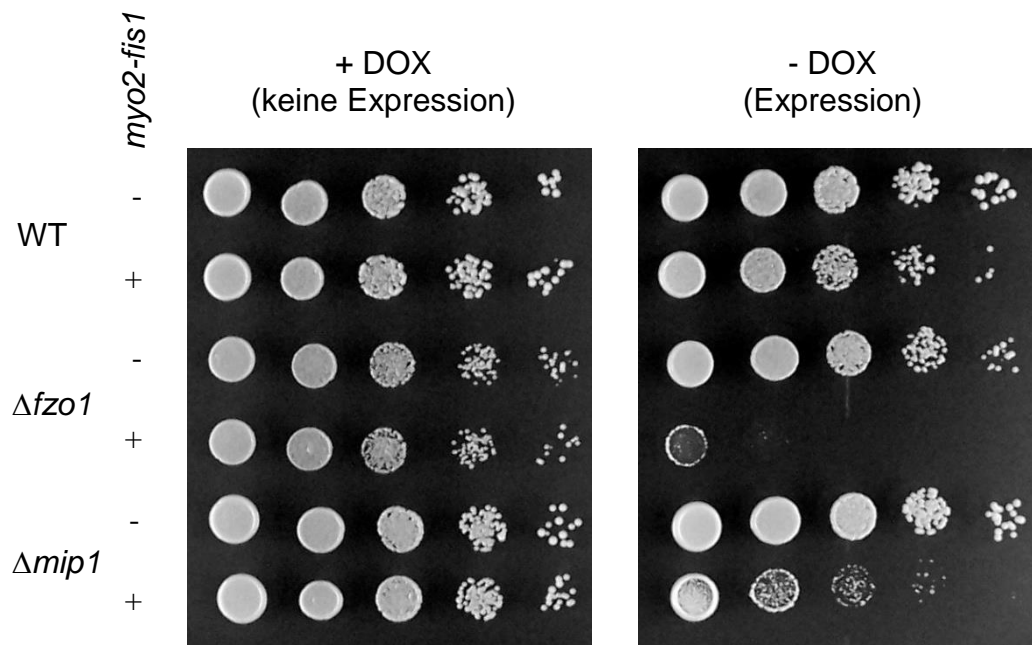


Abbildung 13: Der Verlust mitochondrialer DNA ist nicht für den Wuchsdefekt von $\Delta fzo1$ in Verbindung mit Myo2-Fis1 verantwortlich. Die dargestellten Stämme enthielten ein DOX-reprimiertes *myo2-fis1*-Konstrukt (+) bzw. den entsprechenden Leervektor (-). Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 30 °C in 1 ml SCD-Ura+DOX (keine Expression). Nach ca. 16 h wurde die Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) aller Stämme auf 1 eingestellt die Stämme seriell 1:10 bis zu einem Faktor von 1:10000 verdünnt. Je 5 μ l jeder Verdünnungsstufe wurden auf SCD-Ura mit DOX (keine Expression) bzw. SCD-Ura ohne DOX (Expression) appliziert. Die Inkubation erfolgte drei Tage lang bei 30 °C.

3.4.3 Mitochondrien werden in $\Delta fzo1$ nicht ausreichend in der Mutterzelle zurückgehalten

$\Delta fzo1$ Mutanten überleben eine Expression von *myo2-fis1* kaum. Der mitochondriale Phänotyp dieser Mutante wurde im Vergleich zum Wildtyp fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dazu wurden $\Delta fzo1$ und WT Zellen mit dem Plasmid pVV209-*myo2-fis1* oder dem entsprechenden Leervektor und pYX142mtGFP in einer Übertagkultur etwa acht Stunden lang in entsprechendem Selektionsmedium mit Doxycyclin, also ohne Expression, angezogen. Daraufhin erfolgte über Nacht eine Inkubation in Selektionsmedium ohne DOX, um die Expression von Myo2-Fis1 zu starten. Am nächsten Morgen wurden die ÜNK verdünnt und für

weitere drei Stunden im Schüttler belassen. Anschließend erfolgte die Mikroskopie. Dabei wurden je Stamm etwa 100 Zellen ausgewertet. Gezählt wurde die Anzahl knospender Zellen, die Mitochondrien entweder nur in der Mutter oder nur in der Tochter enthielten. Während im Wildtyp sowohl ohne als auch mit Myo2-Fis1 fast alle Zellen (98 % bzw. 99 %) Mitochondrien in Mutter und Tochter aufweisen, ist dies in $\Delta fzo1$ nicht der Fall (Abb. 14). Diese Mutante enthält fragmentierte Mitochondrien. Wird kein Myo2-Fis1 exprimiert, so finden sich in 37,4 % der Hefen mit kleinen bis mittelgroßen Knospen Mitochondrien nur in der Mutterzelle. Unter Expressionsbedingungen hingegen, wenn der Mitochondrientransport in die Knospe forciert wird, können offensichtlich nicht genug Mitochondrien in der Mutter zurückgehalten werden. In 9,8 % der Fälle blieben keine Mitochondrien in der Mutter zurück. Nur in 11,7 % der Zellen lagen ausschließlich in der Mutter Mitochondrien vor. Dies lässt darauf schließen, dass die Vererbung der Mitochondrien von deren Vernetzungsgrad abhängig ist. Liegen die Mitochondrien wildtypisch vernetzt vor, so steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Mitochondrien in die Knospe gelangen, während gleichzeitig Mitochondrien in der Mutter verankert bleiben. Sind die Mitochondrien jedoch fragmentiert, so ist der normalerweise stattfindende Transport nicht ausreichend, um genug Mitochondrien in die Knospe zu befördern. Gleichzeitig können bei verstärktem Transport fragmentierte Mitochondrien nicht ausreichend in der Mutter verankert werden.

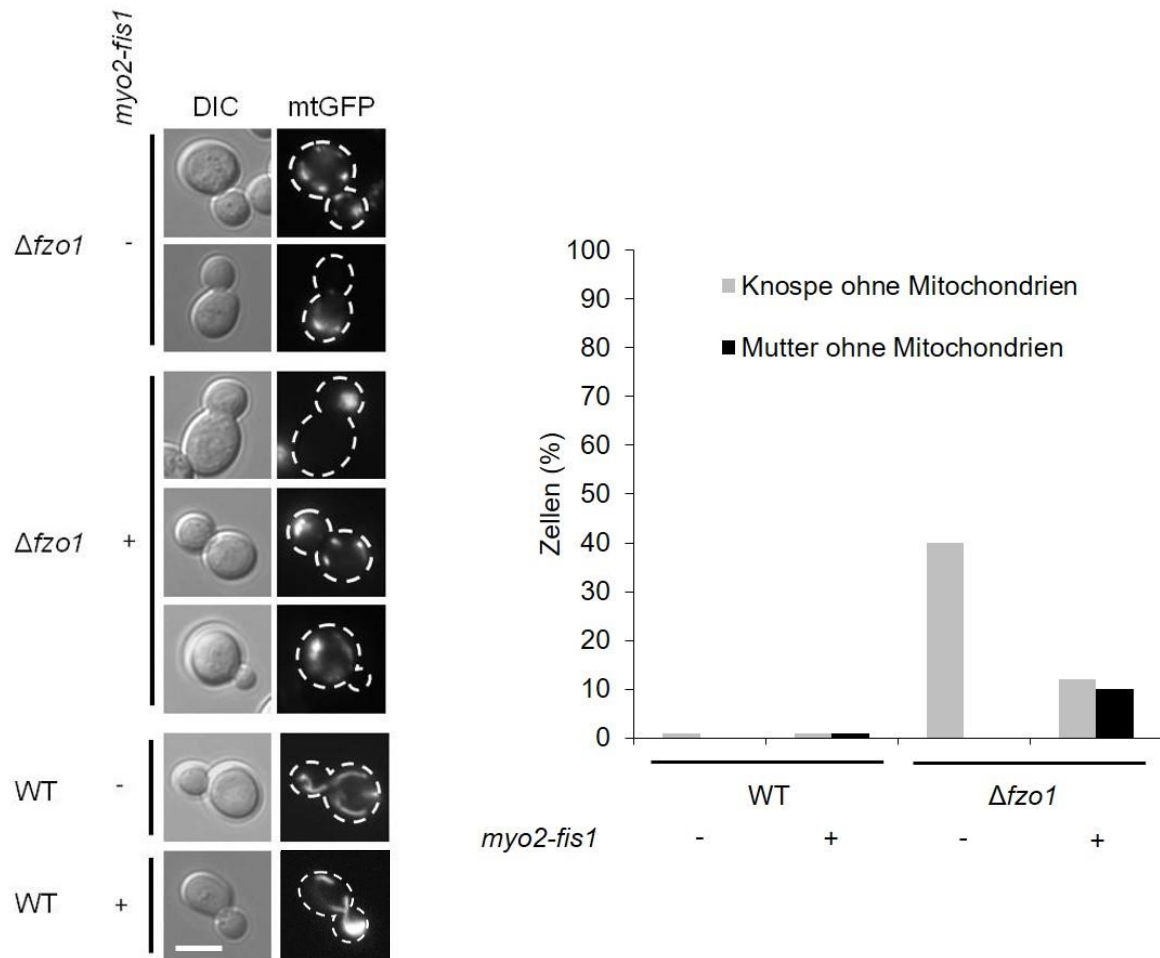


Abbildung 14: Überexpression von *myo2-fis1* in $\Delta fzo1$. $\Delta fzo1$ und der WT enthielten ein DOX-reprimiertes *myo2-fis1*-Konstrukt (+) oder den entsprechenden Leervektor (-). Die Stämme wurden über Tag in flüssigem Nichtexpressionsmedium (mit DOX) angezogen. Daraufhin erfolgte die Inkubation in Expressionsmedium (ohne DOX) über Nacht. Abschließend wurden die Stämme 1:10 verdünnt und für drei Stunden in Expressionsmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert und daraufhin mikroskopiert. Alle Inkubationen erfolgten bei 30 °C. Maßstab 5 μ m.

3.4.4 $\Delta fzo1$ *myo2(LQ)* ist letal

In einem parallel von Stefan Böckler durchgeführten SGA-Experiment wurde nach Interaktoren von *myo2(LQ)* gesucht (Böckler et al., 2017). In dieser Mutante ist der Transport der Mitochondrien in die Knospe vermindert. Dieser Versuch war demnach dem Screen mit *myo2-fis1* entgegengesetzt. Während in dem Screen mit *myo2-fis1* die Auswirkungen des forcierten Transports von Mitochondrien in der haploiden Deletionsbibliothek untersucht wurde, wurde in dem zweiten Ansatz in den Stämmen dieser Bibliothek der anterograde Transport in die Knospe reduziert. Interessanterweise traten auch in diesem Screen die Fusionsmutanten $\Delta fzo1$, $\Delta mgm1$ und $\Delta ugo1$ in mindestens einem der Durchgänge als negative Interaktoren auf und erwiesen sich als synthetisch letal mit *myo2(LQ)* (Böckler et al., 2017). Weitere Überschneidungen der Screens mit *myo2-fis1* bzw. *myo2(LQ)* finden sich in den Tabellen 6 und 7. Dort sind nur die Stämme aufgenommen, die jeweils in beiden Durchgängen beider Screens als Interaktoren aufgefallen sind. Die aufgeführten Stämme wurden jedoch bisher nicht weiter charakterisiert bzw. als Interaktoren bestätigt.

Tabelle 6: Überschneidung negativer Interaktoren der SGA mit *myo2-fis1* und des *myo2(LQ)*-Screens (Böckler et al., 2017) (in beiden Durchgängen der SGA mit *myo2(LQ)* negativ).

Systematischer Name	Standard-name	Effekt	Auszug der Beschreibung aus SGD (www.yeastgenome.org)
<i>YBR179C</i>	<i>FZO1</i>	In beiden Screens negativ	Integral membrane protein involved in mitochondrial outer membrane tethering and fusion
<i>YDR136C</i>	<i>VPS61</i>	In beiden Screens negativ	Dubious open reading frame; deletion causes a vacuolar protein sorting defect
<i>YDR150W</i>	<i>NUM1</i>	In beiden Screens negativ	Protein required for nuclear migration; required for the association of mitochondria with the cell cortex and for accurate distribution of mitochondrial network
<i>YEL036C</i>	<i>ANP1</i>	In beiden Screens negativ	Has a role in retention of glycosyltransferases in the Golgi

Systematischer Name	Standard-name	Effekt	Auszug der Beschreibung aus SGD (www.yeastgenome.org)
<i>YHR129C</i>	<i>ARP1</i>	In beiden Screens negativ	Required for spindle orientation and nuclear migration
<i>YIR023W</i>	<i>DAL81</i>	In beiden Screens negativ	Positive regulator of genes in multiple nitrogen degradation pathways
<i>YKL048C</i>	<i>ELM1</i>	In beiden Screens negativ	Regulates the orientation checkpoint, the morphogenesis checkpoint and the metabolic switch from fermentative to oxidative metabolism by phosphorylating the activation loop of Kin4p, Hsl1p and Snf4p respectively; forms part of the bud neck ring
<i>YKR054C</i>	<i>DYN1</i>	In beiden Screens negativ	Member of the AAA+ protein family, required for anaphase spindle elongation; involved in spindle assembly, chromosome movement, and spindle orientation during cell division, targeted to microtubule tips by Pac1p
<i>YLR320W</i>	<i>MMS22</i>	In beiden Screens negativ	Subunit of E3 ubiquitin ligase complex involved in replication repair
<i>YLR337C</i>	<i>VRP1</i>	In beiden Screens negativ	Involved in cytoskeletal organization and cytokinesis; promotes actin nucleation and endocytosis
<i>YMR294W</i>	<i>JNM1</i>	In beiden Screens negativ	Component of the yeast dynactin complex; consisting of Nip100p, Jnm1p, and Arp1p; required for proper nuclear migration and spindle partitioning during mitotic anaphase
<i>YNL298W</i>	<i>CLA4</i>	In beiden Screens negativ	Involved in septin ring assembly, vacuole inheritance, cytokinesis, sterol uptake regulation
<i>YNR010W</i>	<i>CSE2</i>	In beiden Screens negativ	Required for regulation of RNA polymerase II activity
<i>YOR139C</i>	<i>YOR139C</i>	In beiden Screens negativ	Dubious open reading frame; unlikely to encode a functional protein
<i>YOR269W</i>	<i>PAC1</i>	In beiden Screens negativ	Targets dynein to microtubule tips, which is necessary for sliding of microtubules along bud cortex

Systema- tischer Name	Standard- name	Effekt	Auszug der Beschreibung aus SGD (www.yeastgenome.org)
<i>YPL002C</i>	<i>SNF8</i>	In beiden Screens negativ	Component of the ESCRT-II complex; ESCRT-II is involved in ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome
<i>YPL155C</i>	<i>KIP2</i>	In beiden Screens negativ	Kinesin-related motor protein involved in mitotic spindle positioning; stabilizes microtubules by targeting Bik1p to the plus end
<i>YPL174C</i>	<i>NIP100</i>	In beiden Screens negativ	Large subunit of the dynactin complex; dynactin is involved in partitioning the mitotic spindle between mother and daughter cells

Tabelle 7: Gegenüberstellung positiver Interaktoren der SGA mit *myo2-fis1* im Vergleich zum *myo2(LQ)*-Screen (Böckler et al., 2017) (in beiden Durchgängen der SGA mit *myo2(LQ)* positiv).

Systema- tischer Name	Standard- name	Effekt	Auszug der Beschreibung aus SGD (www.yeastgenome.org)
<i>YOR078W</i>	<i>BUD21</i>	In beiden Screens positiv	Required at post-transcriptional step for efficient retrotransposition
<i>YGL066W</i>	<i>SGF73</i>	Entgegen- gesetzter Effekt	Has roles in anchoring deubiquitination module (DUBm) into SAGA and SLIK complexes, maintaining organization and ubiquitin-binding conformation of Ubp8p, thereby contributing to overall DUBm activity
<i>YOL072W</i>	<i>THP1</i>	Entgegen- gesetzter Effekt	Component of TREX-2 complex (Sac3p-Thp1p-Sus1p-Cdc31p) involved in transcription elongation and mRNA export from the nucleus
<i>YOR330C</i>	<i>MIP1</i>	Entgegen- gesetzter Effekt	Mitochondrial DNA polymerase gamma; single subunit of mitochondrial DNA polymerase in yeast, in contrast to metazoan complex of catalytic and accessory subunits

3.4.5 Multi-Copy-Suppressor-Screen mit $\Delta fzo1$ *myo2(LQ)*

Die Doppelmutante $\Delta fzo1$ *myo2(LQ)* ist nicht lebensfähig, da in dieser der Transport der Mitochondrien in die Tochterzelle stark beeinträchtigt ist und diese nicht die kritische Menge Mitochondrien erhält (Böckler et al., 2017). Den Umstand, dass die Doppelmutante letal ist, kann man sich zu Nutze machen, um nach Genen zu suchen, die im gleichen Reaktionsweg aktiv sind. Ein häufig verwendetes Werkzeug für solche Untersuchungen sind Überexpressionsversuche (*Multi-Copy-Suppressor-Screens*). Jones et al. (2008) haben eine Plasmidbibliothek hergestellt, die für diese Zwecke genutzt werden kann. Diese Bibliothek deckt über 97 % des *S. cerevisiae*-Genoms ab. Genomische DNA der Bäckerhefe wurde dafür von der Forschergruppe um Jones mit einem Restriktionsenzym verdaut und in ein Plasmid (pGP564) eingebracht. In jedem Plasmid findet sich die Sequenz von drei bis fünf Hefegenen inklusive der endogenen Promotorsequenzen. pGP564 ist ein *multi-copy*-Plasmid, wodurch die Gene in der Zelle relativ stark überexprimiert werden. Diese Bibliothek kann in die $\Delta fzo1$ *myo2(LQ)* Doppelmutante eingebracht werden. Diese ist zu Beginn des Versuchs durch wildtypisches *FZO1* auf einem Plasmid mit *URA3*-Marker gerettet. Ist der Stamm fähig, das wildtypische *FZO1* zu verlieren, ohne zu sterben, so ist das ein Hinweis darauf, dass auf dem in der Zelle befindlichen Plasmid der Bibliothek ein Gen kodiert ist, welches den letalen Phänotyp rettet. Die so gefundenen Gene können anschließend weiter analysiert werden, um zu erkunden, ob diese eine Rolle für die Vererbung der Mitochondrien spielen.

In einem Vorversuch wurde getestet, ob sich der Stamm $\Delta fzo1$ *myo2(LQ)* für ein solches Experiment eignet. Die Doppelmutante kann durch die Überexpression von *YPT11* gerettet werden (Böckler et al., 2017). Daher wurde neben der Plasmidbibliothek oder dem dazu gehörigen Leervektor ein *YPT11*-Überexpressionsplasmid in den Stamm transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen auf geeignetes Selektionsmedium mit Uracil plattiert und, nachdem sich Kolonien gebildet hatten, noch einmal auf dasselbe Medium überstempelt. Dies gibt den Zellen die Möglichkeit, das *URA3*-Plasmid zu verlieren, auf dem *FZO1* kodiert ist. Abschließend wurden die Kolonien auf Platten mit und ohne 5-FOA

überstempelt. Nur Hefen, die das *URA3*-Plasmid verloren haben, können auf Platten mit 5-FOA überleben. Wie erwartet waren Zellen, die mit dem Leervektor transformiert worden waren, nicht in der Lage, das *URA3*-Plasmid zu verlieren, ohne zu sterben. Waren die Hefen jedoch mit dem *YPT11*-Konstrukt transformiert worden, so waren alle Kolonien auch nach dem Überstempeln auf 5-FOA lebensfähig. Dies zeigt, dass eine Detektion von positiven Interaktoren mit diesem Stamm auf diese Art möglich ist. Was jedoch auffiel, war, dass auch mit dem Leervektor vereinzelt Kolonien nach mehreren Tagen wuchsen. Dabei schien es sich jedoch um spontane Suppressor-Mutationen zu handeln.

Leider konnten durch die Transformation der Plasmidbibliothek keine verifizierbaren Kandidaten gewonnen werden. Dies führte zu der Vermutung, dass etwas mit der Bibliothek nicht in Ordnung sein könnte. Nach Transformation mit dem Plasmidpool wurden daher fünf Einzelkolonien gepickt. Aus drei dieser Kolonien konnte Plasmid-DNA gewonnen werden. Ein Testverdau, bei dem der Leervektor als Kontrolle mitgeführt wurde, zeigte, dass alle gepickten Kolonien Leervektoren enthielten. Dies bekräftigte den Verdacht, dass die gelieferte Bibliothek fehlerhaft und ohne Insertionen war. Zudem lag insgesamt nur 1 µg Plasmid-DNA vor, was für einen Versuch dieser Art zu wenig ist, da Tausende Transformanten benötigt werden, um die gesamte Bibliothek statistisch gesehen mehrfach abzudecken. Daher wurde die Bibliothek als Bakterien-Glycerin-Stock geordert, um aus dieser große Mengen der Plasmidbibliothek zu isolieren. Die Isolation der Bibliothek konnte direkt nach der Lieferung durchgeführt werden. Jedoch war es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, diese zu überprüfen und den Versuch vorzunehmen. Der oben beschriebene Vorversuch mit *YPT11* war jedoch vielversprechend und kann als Grundlage dienen, um ein weiteres Vorgehen zu planen und nach der Überprüfung der neuen Bibliothek die Suche nach Interaktoren fortzusetzen. Ein Problem könnte dabei darstellen, dass auch mit dem Leervektor hin und wieder Wachstum zu beobachten war. Um mit der geringen Menge an Plasmidbibliothek genug Transformanten zu erhalten, wurden die Hefen per Elektroporation transformiert. Es ist nicht auszuschließen, dass durch die Elektroporation die Mutationsrate gesteigert wurde.

Ein leichter Einfluss von Elektroporation auf Rekombinationsereignisse konnte bereits 1991 festgestellt werden (Higgins und Strathern, 1991). Vergleichend könnte es daher sinnvoll sein, mit größeren Mengen der Plasmidbibliothek per Hitzeschock mit der Lithium-Acetat-Transformationsmethode zu transformieren. Auch hier können Mutationen auftreten. In einer Studie von 2017 wurde jedoch beobachtet, dass die Mutationsrate auch bei einem Hitzeschock von bis zu sechs Stunden nicht signifikant ansteigt (Liu et al., 2017). Der Hintergrund bei der Transformation mit dem Leervektor sollte möglichst gering sein, da sonst eine hohe Zahl falsch positiver Klone zu erwarten ist.

3.5. Rolle der Mitochondriendynamik bei Alterungsprozessen

Einen weiteren interessanten Aspekt bezüglich der Vererbung der Mitochondrien stellt sicherlich deren Auswirkung auf Alterungsprozesse dar. Wie bekannt ist, spielen die Mitochondrien eine Rolle für die Alterung der Zellen (Braun und Westermann, 2011; Breitenbach et al., 2012). Dabei ist wichtig, dass die Tochterzelle möglichst intakte Mitochondrien erhält. In den bisher beschriebenen Versuchen wurde festgestellt, dass die Doppelmutante *myo2(LQ) Δfzo1* letal ist (Böckler et al., 2017). Durch die zusätzliche Deletion von *DNM1* kann dieser Stamm gerettet werden (Böckler et al., 2017). Dies ist dadurch bedingt, dass in diesem Fall wieder genug Mitochondrien in die Knospe gelangen. Diese Beobachtung erlaubt jedoch noch keine Aussage darüber, ob die Fitness der Zellen in diesem Stamm möglicherweise beeinträchtigt ist. Eine Verkürzung der Lebensspanne kann ein Hinweis darauf sein, dass die Vererbung ungeschädigter Mitochondrien in diesen Zellen weniger reguliert werden kann. Daher wurde in verschiedenen Ansätzen versucht, diese Fragestellung anzugehen.

3.5.1 Mother Enrichment Program

Eine Methode zur Untersuchung gealterter Zellen stellt das *Mother Enrichment Program* (MEP) dar, das 2009 von Lindstrom und Gottschling vorgestellt wurde (Lindstrom und Gottschling, 2009). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden hierbei in neu

entstehenden Knospen durch die Zugabe von Estradiol Mitosegene inaktiviert, sodass sich die Tochterzellen nicht teilen können. Zu Beginn mussten daher Stämme konstruiert werden, die sich für dieses Verfahren eignen. Über homologe Rekombination wurden die Mutationen von $\Delta fzo1$, $\Delta dnm1$ und $myo2(LQ)$ in verschiedenen Kombinationen in geeignete haploide Stämme (UCC5179 bzw. UCC5181) (Lindstrom und Gottschling, 2009) eingebracht (teilweise durchgeführt von Stefan Böckler, Zellbiologie, Uni Bayreuth). Die Stämme wurden daraufhin durch Paarung in den diploiden Zustand überführt, da die Mutationsrate hin zu Estradiol-Resistenz in haploiden MEP-Stämmen hundert Mal höher ist als in diploiden (Lindstrom und Gottschling, 2009). Eine solche Mutation würde den Versuch verfälschen, da in diesem Fall auch die Tochterzellen bei Estradiolzugabe ungehindert wachsen könnten. Einzelkolonien der diploiden Stämme wurden auf YPD überstrichen und anschließend für die Durchführung des Experiments verwendet. Als Kontrolle diente die Mutante $\Delta sir2$, von der bekannt ist, dass sie eine verkürzte replikative Lebensspanne (RLS) aufweist (Kaeberlein et al., 1999). Die dargestellten Ergebnisse (Abb. 15) stammen aus der Analyse jeweils acht verschiedener Klone, jeweils aus zwei unabhängigen Paarungen. Alle Stämme wurden vor Beginn des Versuchs auf entsprechende Selektionsmedien überstrichen, um auf den jeweiligen Genotyp zu selektieren.

Eine definierte Anzahl Zellen wurde in Flüssigmedium mit Estradiol gegeben und über mehrere Tage inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde ein Volumen, das, basierend auf der ursprünglich angeimpften Zellzahl, 500 ursprüngliche Zellen enthält, entnommen und auf Medium ohne Estradiol ausplattiert. Nur die Zellen, die zu Beginn des Experiments bereits vorhanden waren, können sich teilen, da die Mitosegene in diesen nicht inaktiviert wurden. Daher lässt die Anzahl der Kolonien einen Schluss zu, wie viele dieser Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten noch in der Lage waren sich zu teilen. Die Auswertung ergab, dass nach 24 Stunden neben der Kontrolle $\Delta sir2$ auch die Mutanten $myo2(LQ)$ und $\Delta fzo1 \Delta dnm1 myo2(LQ)$ signifikant weniger Kolonien bildeten als der Wildtyp. Das heißt, dass entsprechend weniger der ursprünglichen Zellen teilungsfähig waren. Nach 48 Stunden war dieser Effekt jedoch nicht mehr zu beobachten. Hier wuchs lediglich $\Delta sir2$ deutlich schlechter als alle

anderen untersuchten Stämme. Nach 72 Stunden wiesen ebenfalls alle Stämme bis auf $\Delta sir2$ ein vergleichbares Wuchsverhalten auf (Abb. 15).

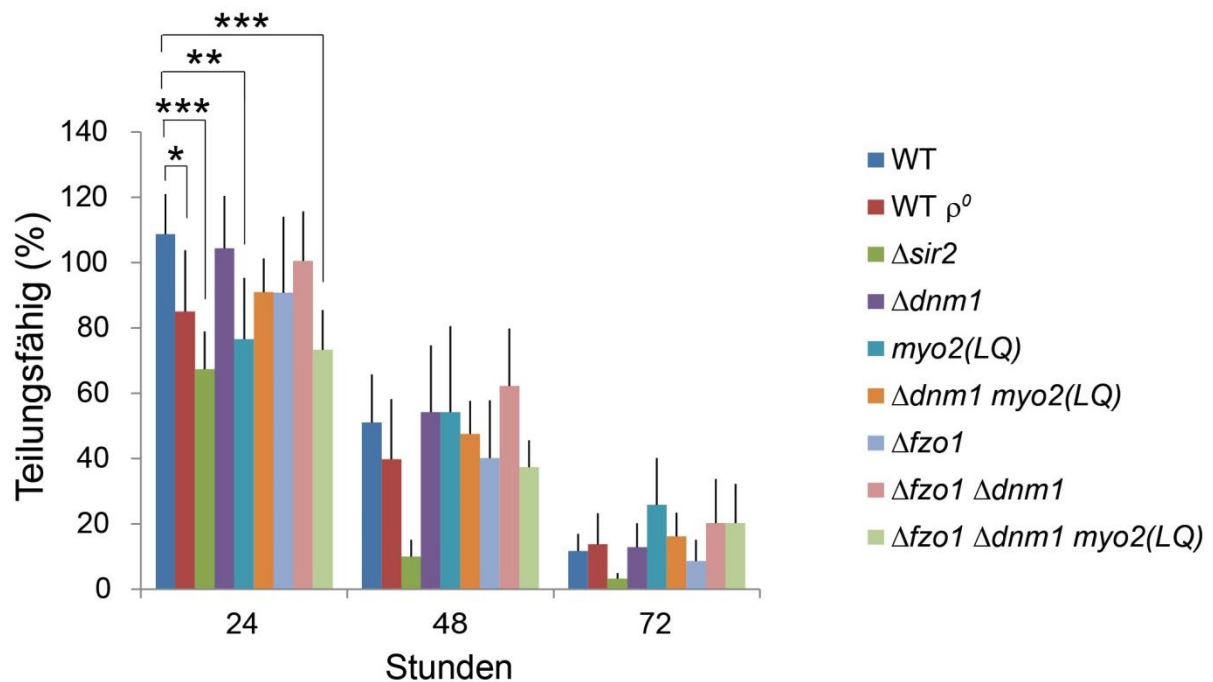


Abbildung 15: Replikative Lebensspanne von Teilungs-, Fusions- und Transportmutanten ermittelt durch das *Mother Enrichment Program*. Die Teilungsfähigkeit, bzw. Kolonienzahl, jedes Stammes nach drei Stunden wurde als 100 % definiert. Ausplattiert wurde jeweils ein Volumen, das 500 ursprünglichen Zellen entspricht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus acht unabhängigen Durchgängen mit je zwei Klonen pro Stamm (+ Standardabweichung). p-Wert < 0,05 (*), < 0,01 (**) oder < 0,001 (***).

Zusammengefasst lässt sich vermuten, dass Zellen des Genotyps *myo2(LQ)* und $\Delta fzo1$ $\Delta dnm1$ *myo2(LQ)* in der Anfangsphase schneller absterben als der Wildtyp, sich im weiteren Verlauf jedoch ähnlich wie der Wildtyp verhalten. Die Standardabweichung war jedoch bei allen Stämmen relativ groß, sodass die Datenlage nur bedingt Interpretation zulässt. Zudem wird hier außer Acht gelassen, dass nicht alle Mutanten dieselbe Generationszeit aufweisen. Das heißt, es kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie oft sich die Zellen jeweils geteilt haben, bevor sie abgestorben sind. Auf dieses Problem weisen auch Lindstrom und Gottschling in ihrem Artikel hin (Lindstrom und Gottschling, 2009). Die Ergebnisse, die mithilfe

des MEP erhalten wurden, sind damit kritisch zu betrachten und sollten in weiteren Alterungsexperimenten genauer untersucht werden.

3.5.2 Alterungsanalysen am Mikromanipulator

3.5.2.1 *myo2(LQ)* und $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ *myo2(LQ)* weisen eine signifikant verminderte durchschnittliche Lebensspanne auf

Die Untersuchungen mithilfe des *Mother Enrichment Program* ließen aufgrund der großen Abweichungen und möglicherweise unterschiedlichen Replikationszeiten keine eindeutigen Aussagen über die RLS der analysierten Stämme zu. Daher wurden die Mutanten, die mithilfe des MEP als besonders kurzlebig identifiziert wurden, nämlich *myo2(LQ)* und $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ *myo2(LQ)*, ausgewählt, um manuell am Mikromanipulator die RLS zu bestimmen. Auch hier diente neben dem WT mit normaler replikativer Lebensspanne $\Delta sir2$ als Kontrolle mit verkürzter RLS. Sich exponentiell teilende Zellen wurden zu Beginn des Experiments unter Zuhilfenahme eines Mikromanipulators auf YPD Platten verteilt. Sobald die Zellen Knospen ausbildeten, wurden sie von diesen getrennt und die Mutterzelle entfernt. Die zurückbleibende jungfräuliche Zelle wurde daraufhin als neue Mutter weiter beobachtet. Neu gebildete Tochterzellen wurden entfernt und gezählt, bis die Mutter lysierte oder sich über 20 h nicht geteilt hatte. Dabei wurde ersichtlich, dass *myo2(LQ)* und die Tripelmutante $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ *myo2(LQ)* sich deutlich vom Wildtyp unterscheiden (Abb. 16). Während im WT alle jungfräulichen Mütter zumindest eine Tochterzelle bildeten, war dies bei *myo2(LQ)* und $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ *myo2(LQ)* nicht der Fall. Lediglich 36 % (*myo2(LQ)*) bzw. 28 % ($\Delta fzo1 \Delta dnm1$ *myo2(LQ)*) der Zellen teilten sich, nachdem sie von der ursprünglich ausgelegten Zelle getrennt worden waren (Abb. 16). Die maximale Lebensspanne dieser Mutanten war jedoch nicht verändert. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Beobachtungen mit der Vererbung der Mitochondrien zusammenhängen.

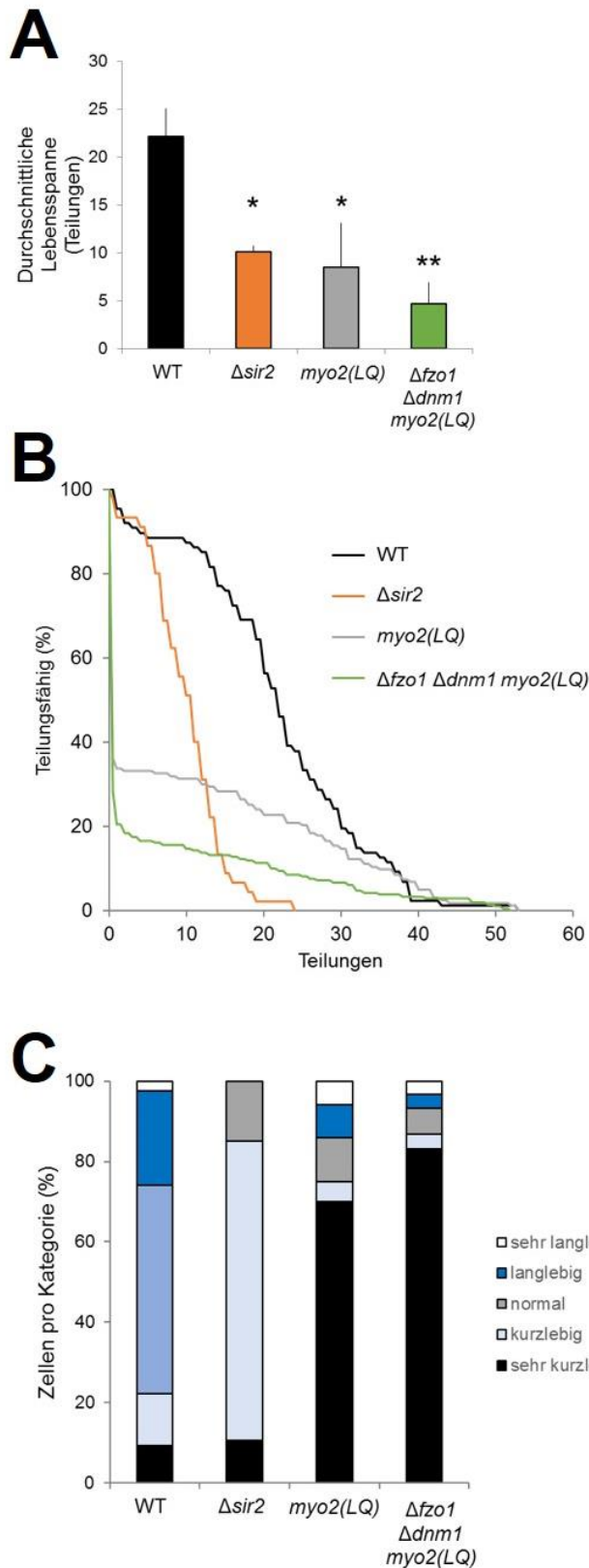


Abbildung 16: Alterungsanalysen am Mikromanipulator. Vergleich der replikativen Lebensspanne von WT ($n = 87$), $\Delta sir2$ ($n = 45$), $myo2(LQ)$ ($n = 163$) und $\Delta fzo1 \Delta dnm1 myo2(LQ)$ ($n = 211$). **A)** Vergleich der durchschnittlichen Lebensspannen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. $\Delta sir2$, $myo2(LQ)$ und $\Delta fzo1 \Delta dnm1 myo2(LQ)$ weisen eine signifikant reduzierte replikative Lebensspanne im Vergleich zum Wildtyp auf. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **B)** Graph der in A dargestellten Werte aus drei unabhängigen Durchgängen. **C)** Einteilung der Lebensspanne einzelner Zellen in die Kategorien sehr kurzlebig (0-4 Teilungen), kurzlebig (5-14 Teilungen), normal (15-29 Teilungen), langlebig (30-39 Teilungen) und sehr langlebig (40-70 Teilungen).

3.5.2.2 Die verkürzte Lebensspanne von *myo2(LQ)* ist unabhängig von der Vakuolenvererbung

Die Mutante *myo2(LQ)* weist jedoch nicht nur einen Vererbungsdefekt der Mitochondrien auf. Auch die Vakuolenvererbung ist gestört (Förtsch et al., 2011). Daher sollte zusätzlich untersucht werden, ob die Vakuolenvererbung für die beobachteten Veränderungen der Lebensfähigkeit verantwortlich ist. Dazu wurde die Alterungsanalyse am Mikromanipulator mit der Mutante *myo2-D1297N* wiederholt. Von der Mutante *myo2-D1297N* ist bekannt, dass sie einen Defekt in der Vakuolenvererbung trägt, jedoch Mitochondrien normal in die Knospe transportiert werden (Altmann et al., 2008; Catlett et al., 2000; Pashkova et al., 2006). Für den Versuch wurde ein $\Delta myo2$ Stamm verwendet, der *myo2-D1297N* auf einem Plasmid trägt (Altmann et al., 2008). Als Kontrollen dienten $\Delta myo2$ Stämme mit wildtypischem *MYO2* oder *myo2(LQ)* auf Plasmiden (Altmann et al., 2008; Förtsch et al., 2011). Der Defekt der Vakuolenvererbung wurde in *myo2-D1297N* fluoreszenzmikroskopisch bestätigt (Abb. 17). Zudem erfolgte eine Auszählung der Vererbung sowohl von Mitochondrien als auch von Vakuolen in den drei Stämmen (Abb. 18 A und B). Dabei wurde festgestellt, dass, wie zu erwarten, in *myo2(LQ)* und *myo2-D1297N* die Vakuolenvererbung im Vergleich zum WT vermindert ist. Während im WT 83 % der kleinen und mittelgroßen Knospen Vakuolen enthielten, war dies nur in 13,5 % der *myo2(LQ)*-Zellen und 28,5 % der *myo2-D1297N*-Zellen der Fall. Eine reduzierte Vererbung von Mitochondrien in die Knospe wurde hingegen nur bei *myo2(LQ)*-Zellen beobachtet. In 98 % der WT-Zellen enthielten die Knospen Mitochondrien. Dies war lediglich in 36 % der *myo2(LQ)*-Zellen der Fall. In *myo2-D1297N* wiederum konnten in 92 % der Fälle Mitochondrien in den Knospen gefunden werden.

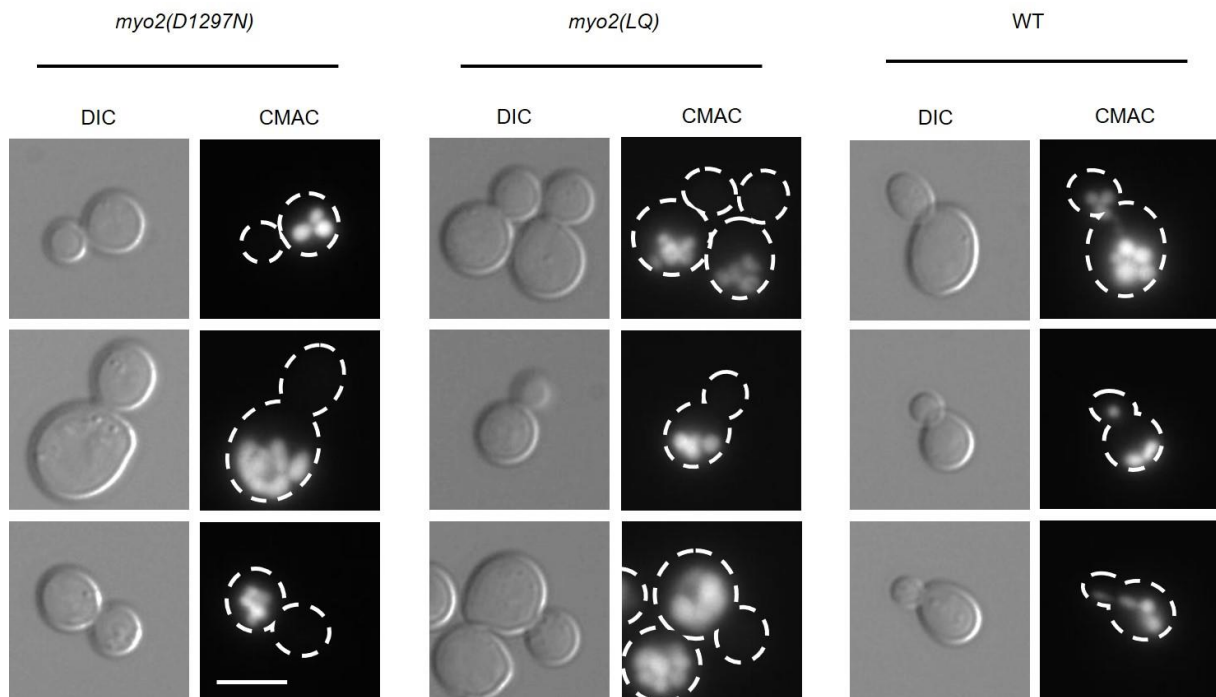


Abbildung 17: Untersuchung der Vakuolenvererbung in *myo2(D1297N)* und *myo2(LQ)* Zellen. Untersucht wurden drei $\Delta myo2$ -Stämme, die mit Plasmiden mit wildtypischem *MYO2* (WT), bzw. *myo2(LQ)* oder *myo2(D1297N)* komplementiert wurden. Die Hefekulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase mit CMAC inkubiert, um Vakuolen sichtbar zu machen. Pro Genotyp sind drei repräsentative Beispiele dargestellt. Maßstab 5 μm .

Die Alterungs-Analyse ergab, dass der Stamm *myo2-D1297N* mit Vakuolenvererbungsdefekt eine nahezu wildtypische RLS aufwies, während die *myo2(LQ)*-Mutante erneut eine stark verkürzte RLS hatte (Abb. 18 C). Dies weist stark darauf hin, dass die eingeschränkte Lebensfähigkeit des *myo2(LQ)* Stammes auf die beeinträchtigte Vererbung der Mitochondrien und nicht auf die Vererbung der Vakuolen zurückzuführen ist.

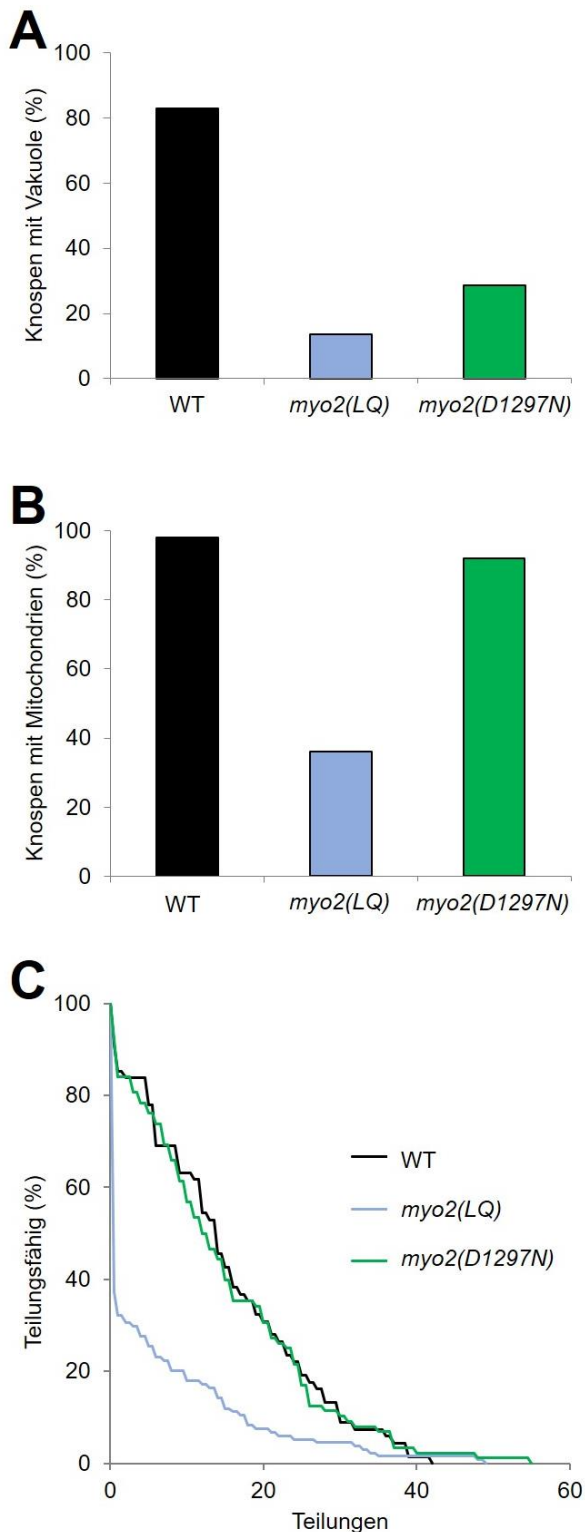


Abbildung 18: Abhängigkeit der replikativen Lebensspanne von Mitochondrien- und Vakuolenvererbung. Untersucht wurden drei $\Delta myo2$ -Stämme, die mit Plasmiden mit wildtypischem *MYO2* (WT), bzw. *myo2(LQ)* oder *myo2(D1297N)* komplementiert wurden. **A)** Auszählung der Vakuolenvererbung in kleine und mittelgroße Knospen; pro Stamm wurden 100 Zellen analysiert. **B)** Auszählung der Mitochondrienvererbung in kleine und mittelgroße Knospen; pro Stamm wurden 100 Zellen analysiert. **C)** Graph der Alterungsanalyse am Mikromanipulator aus zwei unabhängigen Durchgängen WT (n = 68), *myo2(LQ)* (n = 134), *myo2(D1297N)* (n = 87).

Die Mikroskopie der verschiedenen Fusions- und Teilungsmutanten mit fluoreszenzmarkierten Mitochondrien gab Aufschluss über die Vererbung der Organellen. In $\Delta fzo1$, $myo2(LQ)$ und $\Delta fzo1 \Delta dnm1 myo2(LQ)$ erhielten deutlich weniger Knospen Mitochondrien als in $\Delta dnm1$, $\Delta dnm1 myo2(LQ)$, $\Delta fzo1 \Delta dnm1$ und im Wildtyp (Böckler et al., 2017). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden geschädigte Organellen, aber auch Proteinaggregate bei der Zellteilung selektiv in der Mutter zurückgehalten. Unter anderem wird vermutet, dass solche Aggregate mit Mitochondrien assoziieren (Zhou et al., 2014). Um zu überprüfen, ob dies abhängig von der Dynamik und der Vererbung der Mitochondrien ist, wurden von Böckler et al. zusätzlich Untersuchungen zur Retention von Proteinaggregaten durchgeführt. Diese ergaben, dass in $myo2(LQ)$ und $\Delta fzo1 \Delta dnm1 myo2(LQ)$ Aggregate im Vergleich zu anderen Fusions- und Teilungsmutanten sowie dem Wildtyp schlechter in der Mutter zurückgehalten werden (Böckler et al., 2017). Die erhöhte Zahl an Aggregaten in Kombination mit verringerter mitochondrialer Masse in den Knospen erklärt vermutlich die reduzierte Fitness der Knospen in den $myo2(LQ)$ -Mutanten.

In $myo2(LQ)$ und $\Delta fzo1 \Delta dnm1 myo2(LQ)$ sterben viele junge Zellen schnell ab. Diejenigen Zellen, die nicht schnell absterben, haben im weiteren Verlauf jedoch eine leicht höhere Lebensspanne als der Wildtyp (Abb. 16 C). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits 2012 in der Mutante $\Delta ypt11$ gemacht (Rafelski et al., 2012). Auch in $\Delta ypt11$ ist der Mitochondrientransport eingeschränkt (Itoh et al., 2002). Rafelski et al. (2012) konnten zeigen, dass auch in dieser Mutante die meisten Zellen entweder kurz- oder langlebig waren. Sie beschrieben zudem, dass die Knospen bei der Trennung von der Mutter kleiner waren, als dies beim WT der Fall war. Dies ließ sie vermuten, dass die Größe der Zellen mit der Vererbungskinetik der Mitochondrien zusammenhängt. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei den hier durchgeführten Experimenten gemacht werden. Bei beiden Mutanten waren die Knospen zu dem Zeitpunkt, da sie sich von der Mutter trennen ließen, auffallend klein und teilten sich nicht oder erst mehrere Stunden, nachdem sie von der Mutter entfernt worden waren. Je älter jedoch die Mutter war, desto größer erschienen die Knospen und

begannen sich auch schneller zu teilen. All dies waren subjektive Beobachtungen, die nicht quantifiziert wurden. Auch hier liefert die Veröffentlichung zu $\Delta ypt11$ eine mögliche Erklärung: Es wurde festgestellt, dass alte Mütter schlechter in der Lage waren, Mitochondrien bei der Teilung zurückzuhalten (Rafelski et al., 2012). Auch im Falle von *myo2(LQ)* und der Tripelmutante könnte das die mögliche Erklärung sein. Während die Knospen junger Zellen zu wenige Mitochondrien erhalten und daher weniger lebensfähig sind, so sind die Abkömmlinge alter Zellen fitter, da sie sofort mehr Mitochondrien erhalten. Vermutlich waren daher im durchgeführten Versuch am Mikromanipulator nur wenige Zellen zu Beginn lebensfähig. Enthielten die jungfräulichen Zellen jedoch genug Mitochondrien von jungen Mutterzellen, so konnten sie sich relativ normal teilen. Einige hatten möglicherweise von der Mutterzelle jedoch viele Aggregate und wenige Mitochondrien erhalten und starben daher schnell ab. Diejenigen Zellen, die sich einige Male geteilt hatten, verloren womöglich viele der schädlichen Aggregate, da sie nicht zurückgehalten werden konnten und hatten zusätzlich genug Mitochondrien. Diese Kombination könnte zu einer leicht erhöhten replikativen Lebensspanne führen.

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit sollten Gene identifiziert werden, die am Myo2-abhängigen Transport der Mitochondrien beteiligt sind. Der erste Ansatz bestand darin, ein *myo2-fis1*-kodierendes Plasmid in eine heterozygot diploide Bibliothek einzubringen, in der essentielle Gene deletiert sind. Durch die Expression des Fusionsproteins sollten Mutanten gerettet werden, die eine Mutation in einem Gen tragen, das direkt am Transport der Mitochondrien beteiligt ist. Dieser Ansatz erwies sich jedoch als nicht zielführend. Auch das in der Zwischenzeit von Madita Wolter (Wolter, 2015) durchgeführte Experiment mit einer Bibliothek, in der essentielle Gene herunterreguliert sind, erbrachte keine vielversprechenden Ergebnisse. In diesem Versuch hatte sich, ähnlich wie bei der in dieser Arbeit beschriebenen SGA gezeigt, dass die Sporulation gestört ist, wenn das *myo2-fis1-multi-copy*-Plasmid verwendet wird. Daher war auch der von Madita Wolter vorgestellte Versuch nur mit dem *myo2-fis1-single-copy*-Plasmid durchgeführt worden. Es ist denkbar, dass mit einem *single-copy*-Plasmid mögliche synthetische Effekte zu gering ausfielen, um wirksam zu werden. Eine Möglichkeit, beide Probleme zu umgehen, könnte sein, ein induzierbares Konstrukt einzusetzen, bei dem Myo2-Fis1 erst zum Ende der Analyse exprimiert wird, wenn auf haploide Mutanten selektiert wird. Dies ist natürlich nicht nur auf die DAmP-Bibliothek anwendbar, sondern auch auf die MATa-Bibliothek, die für die hier beschriebene SGA eingesetzt wurde.

Erfolgreicher als die Untersuchung essentieller Gene gestaltete sich die der nicht essentiellen Mutanten der MATa-Bibliothek bzw. negativer Interaktoren von *MMR1*. Mithilfe der SGA-Screens konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die positiv oder negativ mit Myo2-Fis1 interagierten. Es konnten viele Kandidaten gefunden werden, die für weitere Arbeiten erfolgsversprechend sein könnten. Da bisher nur einzelne Stämme im Detail betrachtet wurden, sollten die weiteren Kandidaten über neue Transformationen mit *myo2*-

fis1-Konstrukten, wenn möglich, bestätigt werden und die Grundlage weiterführender Untersuchungen bilden.

Einen wichtigen Teil der dargestellten Ergebnisse stellt die Erkenntnis dar, dass die Fusion der Mitochondrien eng mit deren Vererbung, sowie der Alterung der Zellen zusammenhängt (Böckler et al., 2017). Die Expression von *myo2-fis1* in $\Delta fzo1$ erwies sich als letal. Dies ist nicht durch den Verlust mitochondrialer DNA bedingt. Vielmehr können in Zellen, in denen die Fusion der Mitochondrien gestört ist, nicht genug Mitochondrien in der Mutterzelle zurückgehalten werden. Wird zusätzlich *DNM1* deletiert, so liegen die Mitochondrien nicht mehr stark fragmentiert vor und die Zellen sind wieder lebensfähig. Dies zeigt, dass allein durch die fusionierte Form der Mitochondrien sichergestellt wird, dass genug mitochondriale Masse in der Mutter zurückgehalten werden kann. Die Fusions- und Teilungsereignisse *per se* spielen dabei offenbar keine Rolle, da in der Doppelmutante beides nicht stattfindet.

Die Suche nach dem mitochondrialen Myo2-Rezeptor erwies sich als schwieriger als anfangs vermutet. Vermutlich ist der Rezeptor von einem essentiellen Gen kodiert. Die hier beschriebenen Untersuchungen der Deletionsmutanten essentieller Gene waren leider nicht erfolgreich. Alternativ könnte man daher auf einen Ansatz zurückgreifen, der auf physikalischen Interaktionen beruht. In der *Saccharomyces Genome Database* sind physische Interaktoren von Myo2 aufgelistet, die in diversen Publikationen identifiziert wurden. Diese Liste umfasst bisher 103 verschiedene Gene (verfügbar unter <https://www.yeastgenome.org/locus/S000005853/interaction>, Stand 23.07.2018). Zum einen könnten diese Gene unter dem Gesichtspunkt näher betrachtet werden, ob sich potentielle Kandidaten unter diesen befinden. Andererseits gibt es weitere Systeme, um Protein-Protein-Interaktionen in der Bäckerhefe zu identifizieren. Eine Methode stellt dabei der *protein fragment complementation assay* unter Verwendung der Dihydrofolatreduktase (DHFR) dar. Bei diesem Ansatz werden Proteine an Teile der DHFR gekoppelt. Interagieren die Proteine,

so entsteht funktionsfähige DHFR (Tarassov et al., 2008). DHFR ist essentiell für die Thymin-Synthese. Durch die Zugabe von Methotrexat wird diese Aktivität inhibiert und die Zellen sterben ab. Im konkreten Fall trägt die DHFR Mutationen, die sie weniger sensitiv gegenüber Methotrexat machen, während das Enzym aktiv bleibt. Bei einer Protein-Protein-Interaktion wird also DHFR gebildet, die die Zellen bei der Zugabe von Methotrexat lebensfähig erhält (Tarassov et al., 2008). Hefebibliotheken, die das gesamte Genom abdecken und die entsprechenden Fusionsproteine in Hefen unterschiedlichen Paarungstyps enthalten, sind kommerziell erhältlich. Mithilfe dieser Bibliotheken könnten physikalische Interaktoren von Myo2 identifiziert werden.

Literaturverzeichnis

- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Nyström, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299, 1751–1753.
- Ahmad, M., and Bussey, H. (1986). Yeast arginine permease: nucleotide sequence of the *CAN1* gene. *Curr. Genet.* 10, 587–592.
- Altmann, K., Frank, M., Neumann, D., Jakobs, S., and Westermann, B. (2008). The class V myosin motor protein, Myo2, plays a major role in mitochondrial motility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 181, 119–130.
- Arai, S., Noda, Y., Kainuma, S., Wada, I., and Yoda, K. (2008). Ypt11 functions in bud-directed transport of the golgi by linking Myo2 to the coatamer subunit Ret2. *Curr. Biol.* 18, 987–991.
- Arrasate, M., and Finkbeiner, S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 238, 1–11.
- Bardin, A.J., Visintin, R., and Amon, A. (2000). A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell* 102, 21–31.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M.S., and Snyder, M. (2000). Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol. Cell* 5, 841–851.
- Baryshnikova, A., Costanzo, M., Dixon, S., Vizeacoumar, F.J., Myers, C.L., Andrews, B., and Boone, C. (2010). Synthetic genetic array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 470, 145–179.
- Ben-Aroya, S., Coombes, C., Kwok, T., O'Donnell, K.A., Boeke, J.D., and Hieter, P. (2008). Toward a comprehensive temperature-sensitive mutant repository of the essential genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 30, 248–258.
- Bertin, A., McMurray, M.A., Grob, P., Park, S.-S., Garcia, G., Patanwala, I., Ng, H.-L., Alber, T., Thorner, J., and Nogales, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 8274–8279.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1, 298–304.
- Böckler, S., Chelius, X., Hock, N., Klecker, T., Wolter, M., Weiss, M., Braun, R.J., and Westermann, B. (2017). Fusion, fission, and transport control asymmetric inheritance of mitochondria and protein aggregates. *J. Cell Biol.* 216, 2481–2498

- Boeke, J.D., Lacroute, F., and Fink, G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5' -phosphate decarboxylase activity in yeast : 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**, 345–346.
- Boldogh, I.R., Yang, H.C., Nowakowski, W.D., Karmon, S.L., Hays, L.G., Yates, J.R., and Pon, L.A. (2001). Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 3162–3167.
- Botstein, D., Chervitz, S. a, and Cherry, J.M. (1997). Yeast as a model organism. *Science* **277**, 1259–1260.
- Boyle, E.I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J.M., and Sherlock, G. (2004). GO::TermFinder - Open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics* **20**, 3710–3715.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (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.
- Braun, R.J., and Westermann, B. (2011). Mitochondrial dynamics in yeast cell death and aging. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1520–1526.
- Breitenbach, M., Laun, P., Dickinson, J.R., Klocker, A., Rinnerthaler, M., Dawes, I.W., Aung-Htut, M.T., Breitenbach-Koller, L., Caballero, A., Nyström, T., et al. (2012). The role of mitochondria in the aging processes of yeast. *Subcell. Biochem.* **57**, 55–78.
- Breslow, D.K., Cameron, D.M., Collins, S.R., Schuldiner, M., Stewart-Ornstein, J., Newman, H.W., Braun, S., Madhani, H.D., Krogan, N.J., and Weissman, J.S. (2008). A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nat Methods* **5**, 711–718.
- Buvelot Frei, S., Rahl, P.B., Nussbaum, M., Briggs, B.J., Calero, M., Janeczko, S., Regan, A.D., Chen, C.Z., Barral, Y., Whittaker, G.R., et al. (2006). Bioinformatic and comparative localization of Rab proteins reveals functional insights into the uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7299–7317.
- Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: Cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 237–251.
- Castillon, G.A., Adames, N.R., Rosello, C.H., Seidel, H.S., Longtine, M.S., Cooper, J.A., and Heil-Chapdelaine, R.A. (2003). Septins have a dual role in controlling mitotic exit in budding yeast. *Curr. Biol.* **13**, 654–658.

- Catlett, N.L., and Weisman, L.S. (1998). The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *95*, 14799–14804.
- Catlett, N.L., Duex, J.E., Tang, F., and Weisman, L.S. (2000). Two distinct regions in a yeast myosin-V tail domain are required for the movement of different cargoes. *J. Cell Biol.* *150*, 513–525.
- Cervený, K.L., Studer, S.L., Jensen, R.E., and Sesaki, H. (2007). Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical Num1 protein. *Dev. Cell* *12*, 363–375.
- Chen, X.J., and Butow, R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 815–825.
- Chernyakov, I., Santiago-Tirado, F., and Bretscher, A. (2013). Active segregation of yeast mitochondria by Myo2 is essential and mediated by Mmr1 and Ypt11. *Curr. Biol.* *23*, 1818–1824.
- Cherry, J.M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S.A., Dwight, S.S., Hester, E.T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., et al. (1998). SGD: *Saccharomyces* genome database. *Nucleic Acids Res.* *26*, 73–79.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., and Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* *110*, 119–122.
- Clay, L., Caudron, F., Denoth-Lippuner, A., Boettcher, B., Frei, S.B., Snapp, E.L., and Barral, Y. (2014). A sphingolipid-dependent diffusion barrier confines ER stress to the yeast mother cell. *Elife* *3*, e01883.
- Cohen, Y., Klug, Y.A., Dimitrov, L., Erez, Z., Chuartzman, S.G., Elinger, D., Yofe, I., Soliman, K., Gärtner, J., Thoms, S., et al. (2014). Peroxisomes are juxtaposed to strategic sites on mitochondria. *Mol. Biosyst.* *10*, 1742–1748.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L.Y., Toufighi, K., Mostafavi, S., et al. (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* *327*, 425–431.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., and Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *13*, 847–853.
- Dixon, S.J., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Andrews, B., and Boone, C. (2009). Systematic mapping of genetic interaction networks. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 601–625.
- Drubin, D.G., Jones, H.D., and Wertman, K.F. (1993). Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol. Biol. Cell* *4*, 1277–1294.

- Elbaz-Alon, Y., Rosenfeld-Gur, E., Shinder, V., Futerman, A.H., Geiger, T., Schuldiner, M. (2014). A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev. Cell* 30, 95-102
- Engqvist-Goldstein, Å.E.Y., and Drubin, D.G. (2003). Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 287–332.
- Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., and Nyström, T. (2007). Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev.* 21, 2410–2421.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C., and Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* 4, 32–41.
- Fabrizio, P., and Longo, V.D. (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 371, 89–95.
- Fagarasanu, A., Fagarasanu, M., Eitzen, G.A., Aitchison, J.D., and Rachubinski, R.A. (2006). The peroxisomal membrane protein Inp2p is the peroxisome-specific receptor for the myosin V motor Myo2p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Cell* 10, 587–600.
- Fagarasanu, A., Mast, F.D., Knoblach, B., and Rachubinski, R. a (2010). Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 644–654.
- Fehrenbacher, K.L., Yang, H.C., Gay, A.C., Huckaba, T.M., and Pon, L.A. (2004). Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. *Curr. Biol.* 14, 1996–2004.
- Förtsch, J., Hummel, E., Krist, M., and Westermann, B. (2011). The myosin-related motor protein Myo2 is an essential mediator of bud-directed mitochondrial movement in yeast. *J. Cell Biol.* 194, 473–488.
- Frederick, R.L., and Shaw, J.M. (2007). Moving mitochondria: Establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* 8, 1668–1675.
- Frederick, R.L., McCaffery, J.M., Cunningham, K.W., Okamoto, K., and Shaw, J.M. (2004). Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J. Cell Biol.* 167, 87–98.
- Frederick, R.L., Okamoto, K., and Shaw, J.M. (2008). Multiple pathways influence mitochondrial inheritance in budding yeast. *Genetics* 178, 825–837.
- Freese, E.B., Chu, M.I., and Freese, E. (1982). Initiation of yeast sporulation by partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *J. Bacteriol.* 149, 840–851.
- Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319–324.

- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358–362.
- Galletta, B.J., and Cooper, J.A. (2009). Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 20–27.
- Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 837–848.
- Genga, A., Bianchi, L., and Foury, F. (1986). A nuclear mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mitochondrial DNA replication and polymerase activity. 261, 9328–9332.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387–391.
- Gietz, R.D. (2014). Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Mol. Biol.* 1205, 1–12.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563–567.
- Graziano, B.R., DuPage, A.G., Michelot, A., Breitsprecher, D., Moseley, J.B., Sagot, I., Blanchoin, L., and Goode, B.L. (2011). Mechanism and cellular function of Bud6 as an actin nucleation-promoting factor. *Mol. Biol. Cell* 22, 4016–4028.
- Green, M.R., and Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*, fourth edition (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Guimier, A., Gordon, C.T.T., Godard, F., Ravenscroft, G., Oufadem, M., Vasnier, C., Rambaud, C., Nitschke, P., Bole-Feysot, C., Masson, C., et al. (2016). Biallelic *PPA2* mutations cause sudden unexpected cardiac arrest in infancy. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 666–673.
- Gutekunst, C.A., Li, S.H., Yi, H., Mulroy, J.S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R.J., Hersch, S.M., and Li, X.J. (1999). Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J. Neurosci.* 19, 2522–2534.
- Hartwell, L.H., and Unger, M.W. (1977). Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. *J. Cell Biol.* 75, 422–435.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., Reichert, A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem.* 278, 27781-27788

- Hermann, G.J., and Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 265–303.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* **143**, 359–373.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**, 536–553.
- Hess, D.C., Myers, C., Huttenhower, C., Hibbs, M.A., Hayes, A.P., Paw, J., Clore, J.J., Mendoza, R.M., Luis, B.S., Nislow, C., et al. (2009). Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS Genet.* **5**, e1000407
- Higgins, D.R., and Strathern, J.N. (1991). Electroporation-stimulated recombination in yeast. *Yeast* **7**, 823–831.
- Higuchi, R., Vevea, J.D., Swayne, T.C., Chojnowski, R., Hill, V., Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2013). Actin dynamics affect mitochondrial quality control and aging in budding yeast. *Curr. Biol.* **23**, 2417–2422.
- Hill, K.L., Catlett, N.L., and Weisman, L.S. (1996). Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **135**, 1535–1549.
- Hill, S.M., Hao, X., Liu, B., and Nyström, T. (2014). Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **344**, 1389–1392.
- Hönscher, C., Mari, M., Auffarth, K., Bohnert, M., Griffith, J., Geerts, W., van der Laan, M., Cabrera, M., Reggiori, F., Ungermann, C. (2014). Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev. Cell* **30**, 86–94
- Huang, L., Yuan, Z., Liu, P., and Zhou, T. (2015). Effects of promoter leakage on dynamics of gene expression. *BMC Syst. Biol.* **9**, 16.
- Hwang, E., Kusch, J., Barral, Y., and Huffaker, T.C. (2003). Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J. Cell Biol.* **161**, 483–488.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J. Cell Biol.* **170**, 1021–1027.
- Irvine, G.B., El-Agnaf, O.M., Shankar, G.M., and Walsh, D.M. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer’s and Parkinson’s diseases. *Mol. Med.* **14**, 451–464.

- Ishikawa, K., Catlett, N.L., Novak, J.L., Tang, F., Nau, J.J., and Weisman, L.S. (2003). Identification of an organelle-specific myosin V receptor. *J. Cell Biol.* **160**, 887–897.
- Itoh, T., Watabe, A., Toh-E, A., and Matsui, Y. (2002). Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7744–7757.
- Itoh, T., Toh-E, A., and Matsui, Y. (2004). Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast. *EMBO J.* **23**, 2520–2530.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–962.
- Jenness, D.D., Burkholder, a C., and Hartwell, L.H. (1983). Binding of alpha-factor pheromone to yeast a cells: chemical and genetic evidence for an alpha-factor receptor. *Cell* **35**, 521–529.
- Jones, G.M., Stalker, J., Humphray, S., West, A., Cox, T., Rogers, J., Dunham, I., and Prelich, G. (2008). A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Methods* **5**, 239–241.
- Juanes, M.A., and Piatti, S. (2016). The final cut: cell polarity meets cytokinesis at the bud neck in *S. cerevisiae*. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3115–3136.
- Kaeberlein, M., Mcvey, M., and Guarente, L. (1999). The *SIR2/3/4* complex and *SIR2* alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13**, 2570–2580.
- Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D.G. (2003). A Pathway for Association of Receptors, Adaptors, and Actin during Endocytic Internalization. *Cell* **115**, 475–487.
- Kanki, T., Furukawa, K., and Yamashita, S. ichi (2015). Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 2756–2765.
- Karim, A.S., Curran, K.A., and Alper, H.S. (2013). Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res.* **13**, 107–116.
- Katajisto, P., Dohla, J., Chaffer, C.L., Pentinmikko, N., Marjanovic, N., Iqbal, S., Zoncu, R., Chen, W., Weinberg, R.A., and Sabatini, D.M. (2015). Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* **348**, 340–343.

- Kennedy, H., Haack, T.B.B., Hartill, V., Mataković, L., Baumgartner, E.R., Potter, H., Mackay, R., Alston, C.L.L., O'Sullivan, S., McFarland, R., et al. (2016). Sudden cardiac death due to deficiency of the mitochondrial inorganic pyrophosphatase *PPA2*. *Am. J. Hum. Genet.* *99*, 674–682.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase γ sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *153*, 519–530.
- Kitagawa, M., and Tomiyama, T. (1929). A new amino-compound in the jack bean and a corresponding new ferment.(I). *J. Biochem.* *11*, 265–271.
- Klecker, T., Scholz, D., Förtsch, J., and Westermann, B. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J. Cell Sci.* *126*, 2924–2930.
- Klinger, H., Rinnerthaler, M., Lam, Y.T., Laun, P., Heeren, G., Klocker, A., Simon-Nobbe, B., Dickinson, J.R., Dawes, I.W., and Breitenbach, M. (2010). Quantitation of (a)symmetric inheritance of functional and of oxidatively damaged mitochondrial aconitase in the cell division of old yeast mother cells. *Exp. Gerontol.* *45*, 533–542.
- König, J. (2012). Untersuchungen zur anterograden Bewegung und Vererbung von Mitochondrien in *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorarbeit. Universität Bayreuth.
- Kornmann, B., and Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J. Cell Sci.* *123*, 1389–1393.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* *325*, 477–481.
- Kornmann, B., Osman, C., and Walter, P. (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *108*, 14151–14156.
- Kuzmin, E., Costanzo, M., Andrews, B., and Boone, C. (2016). Synthetic genetic arrays: Automation of yeast genetics. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2016*, 326–332.
- Lackner, L.L., Ping, H., Graef, M., Murley, A., and Nunnari, J. (2013). Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *110*, E458–E467.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *97*, 5807–5811.

- Lang, A.B., John Peter, A.T.A.T., Walter, P., and Kornmann, B. (2015). ER-mitochondrial junctions can be bypassed by dominant mutations in the endosomal protein Vps13. *J. Cell Biol.* *210*, 883–890.
- Laun, P., Bruschi, C. V., Dickinson, J.R., Rinnerthaler, M., Heeren, G., Schwimbersky, R., Rid, R., and Breitenbach, M. (2007). Yeast mother cell-specific ageing, genetic (in)stability, and the somatic mutation theory of ageing. *Nucleic Acids Res.* *35*, 7514–7526.
- Lazzarino, D.A., Boldogh, I., Smith, M.G., Rosand, J., and Pon, L.A. (1994). Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity. *Mol. Biol. Cell* *5*, 807–818.
- Lewandowska, A., Macfarlane, J., and Shaw, J.M. (2013). Mitochondrial association, protein phosphorylation, and degradation regulate the availability of the active Rab GTPase Ypt11 for mitochondrial inheritance. *Mol. Biol. Cell* *24*, 1185–1195.
- Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 133–141.
- Lindstrom, D.L., and Gottschling, D.E. (2009). The mother enrichment program: A genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *183*, 413–422.
- Liu, G., Lanham, C., Buchan, J.R., and Kaplan, M.E. (2017). High-throughput transformation of *Saccharomyces cerevisiae* using liquid handling robots. *PLoS One* *12*, e0174128
- Luedeke, C., Frei, S.B., Sbalzarini, I., Schwarz, H., Spang, A., and Barral, Y. (2005). Septin-dependent compartmentalization of the endoplasmic reticulum during yeast polarized growth. *J. Cell Biol.* *169*, 897–908.
- Lundin, M., Baltscheffsky, H., and Ronne, H. (1991). Yeast *PPA2* gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* *266*, 12168–12172.
- Luo, W.J., and Chang, A. (1997). Novel genes involved in endosomal traffic in yeast revealed by suppression of a targeting-defective plasma membrane ATPase mutant. *J. Cell Biol.* *138*, 731–746.
- Luo, J., Vallen, E.A., Dravis, C., Tcheperegine, S.E., Drees, B., and Bi, E. (2004). Identification and functional analysis of the essential and regulatory light chains of the only type II myosin Myo1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *165*, 843–855.
- Mao, K., and Klionsky, D.J. (2013). Participation of mitochondrial fission during mitophagy. *Cell Cycle* *12*, 3131–3132.
- Margulis, L. (1970). Origin of Eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the precambrian earth. Yale University Press.

- McFaline-Figueroa, J.R., Vevea, J., Swayne, T.C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2011). Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell* 10, 885–895.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C.-S., et al. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 17593–17598.
- Mereschkowsky, C. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Zent. Bl.* 25, 593–604.
- Meussdoerffer, F.G. (2009). A Comprehensive History of Beer Brewing. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Michaelis, S., and Herskowitz, I. (1988). The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1309–1318.
- Mortimer, R.K., and Johnston, J.R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature* 183, 1751–1752.
- Motley, A.M., Ward, G.P., and Hettema, E.H. (2008). Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p. *J. Cell Sci.* 121, 1633–1640.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., and Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* 151, 367–379.
- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X., and Vandenhaute, J. (2003). Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* 20, 739–746.
- Murley, A., and Nunnari, J. (2016). The emerging network of mitochondria-organelle contacts. *Mol. Cell* 61, 648–653.
- Nass, M.M., and Nass, S. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J. Cell Biol.* 19, 593–611.
- Neiman, A.M. (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 189, 737–765.
- Nguyen, T.T., Lewandowska, A., Choi, J.Y., Markgraf, D.F., Junker, M., Bilgin, M., Ejlsing, C.S., Voelker, D.R., Rapoport, T.A., and Shaw, J.M. (2012). Gem1 and ERMES do not directly affect phosphatidylserine transport from ER to mitochondria or mitochondrial inheritance. *Traffic* 13, 880–890.
- Nyström, T. (2007). A bacterial kind of aging. *PLoS Genet.* 3, 2355–2357.

- Park, P.U., McVey, M., and Guarente, L. (2002). Separation of mother and daughter cells. *Methods Enzymol.* **351**, 468–477.
- Pashkova, N., Catlett, N.L., Novak, J.L., Wu, G., Lu, R., Cohen, R.E., and Weisman, L.S. (2005). Myosin V attachment to cargo requires the tight association of two functional subdomains. *J. Cell Biol.* **168**, 359–364.
- Pashkova, N., Jin, Y., Ramaswamy, S., and Weisman, L.S. (2006). Structural basis for myosin V discrimination between distinct cargoes. *EMBO J.* **25**, 693–700.
- Pereira, G., Höfken, T., Grindlay, J., Manson, C., and Schiebel, E. (2000). The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol. Cell* **6**, 1–10.
- Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 451–477.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453–465.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: Nucleation and barbed-end association. *Science* **297**, 612–615.
- Rafelski, S.M., Viana, M.P., Zhang, Y., Chan, Y.-H.M.Y.-H.M.Y.-H.M., Thorn, K.S., Yam, P., Fung, J.C., Li, H., Costa, L.D.F., and Marshall, W.F. (2012). Mitochondrial network size scaling in budding yeast. *Science* **338**, 822–824.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., and Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 20150–20155.
- Rice, S.E., and Gelfand, V.I. (2006). Paradigm lost: mlt1 connects kinesin heavy chain to miro on mitochondria. *J. Cell Biol.* **173**, 459–461.
- Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: Function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 607–615.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* **14**, 255–274.
- Sagot, I., Klee, S.K., and Pellman, D. (2002). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* **4**, 42–50.
- Schatz, G., Haslbrunner, E., and Tuppy, H. (1964). Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 127–132.

- Scheffler, I.E. (2001). A century of mitochondrial research: Achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1, 3–31.
- Schimper, A.F.W. (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Zeitung* 41, 105–114.
- Schott, D., Ho, J., Pruyne, D., and Bretscher, A. (1999). The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J. Cell Biol.* 147, 791–807.
- Schuldiner, M., Collins, S.R., Thompson, N.J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J.F., et al. (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123, 507–519.
- Sesaki, H., and Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* 147, 699–706.
- Sesaki, H., and Jensen R.E. (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* 279, 28298-28303
- Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S.B., Gonnet, G., and Barral, Y. (2008). A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* 454, 728–734.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3–41.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19–27.
- Simon, V.R., Swayne, T.C., and Pon, L.A. (1995). Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: Identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J. Cell Biol.* 130, 345–354.
- Sinclair, D.A., and Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles - A cause of aging in yeast. *Cell* 91, 1033–1042.
- Spokoini, R., Moldavski, O., Nahmias, Y., England, J.L., Schuldiner, M., and Kaganovich, D. (2012). Confinement to organelle-associated inclusion structures mediates asymmetric inheritance of aggregated protein in budding yeast. *Cell Rep.* 2, 738–747.
- Stevens, R.C., and Davis, T.N. (1998). Mlc1p is a light chain for the unconventional myosin Myo2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 142, 711–722.

- Swayne, T.C., Zhou, C., Boldogh, I.R., Charalel, J.K., McFaline-Figueroa, J.R., Thoms, S., Yang, C., Leung, G., McInnes, J., Erdmann, R., et al. (2011). Role for cER and Mmr1p in anchorage of mitochondria at sites of polarized surface growth in budding yeast. *Curr. Biol.* 21, 1994–1999.
- Sychrova, H., and Chevallier, M.R. (1993). Cloning and sequencing of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *LYP1* coding for a lysine-specific permease. *Yeast* 9, 771–782.
- Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E., and Vale, R.D. (2000). Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* 290, 341–344.
- Tang, B. (2015). MIRO GTPases in mitochondrial transport, homeostasis and pathology. *Cells* 5, 1.
- Tang, F., Kauffman, E.J., Novak, J.L., Nau, J.J., Catlett, N.L., and Weisman, L.S. (2003). Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature* 422, 87–92.
- Tarassov, K., Messier, V., Landry, C.R., Radinovic, S., Serna Molina, M.M., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H., and Michnick, S.W. (2008). An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science* 320, 1465–1470.
- Tatsuta, T., Scharwey, M., and Langer, T. (2014). Mitochondrial lipid trafficking. *Trends Cell Biol.* 24, 44–52.
- Taylor Eves, P., Jin, Y., Brunner, M., and Weisman, L.S. (2012). Overlap of cargo binding sites on myosin V coordinates the inheritance of diverse cargoes. *J. Cell Biol.* 198, 69–85.
- Tieu, Q., and Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 151, 353–365.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K., and Nunnari, J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* 158, 445–452.
- Tong, A.H.Y., and Boone, C. (2007). High-throughput strain construction and systematic synthetic lethal screening in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 36, 1–19.
- Tong, A.H.Y., and Boone, C. (2006). Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 313, 171–192.
- Unal, E., Kinde, B., and Amon, A. (2011). Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast. *Science* 332, 1554–1557.

- von Kölliker, A. (1857). Einige Bemerkungen  ber die Endigungen der Hautnerven und den Bau der Muskeln. Zeitschrift Für Wissenschaftliche Zool. 8, 311–318.
- Wagih, O., Usaj, M., Baryshnikova, A., VanderSluis, B., Kuzmin, E., Costanzo, M., Myers, C.L., Andrews, B.J., Boone, C.M., and Parts, L. (2013). SGAtools: One-stop analysis and visualization of array-based genetic interaction screens. Nucleic Acids Res. 41, 591–596.
- Wagih, O., and Parts, L. (2014). gitter: A Robust and Accurate Method for Quantification of Colony Sizes From Plate Images. G3 (Bethesda) 4, 547–552.
- Wagner, W., Bielli, P., Wacha, S., and Ragnini-Wilson, A. (2002). Mlc1p promotes septum closure during cytokinesis via the IQ motifs of the vesicle motor Myo2p. EMBO J. 21, 6397–6408.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 872–884.
- Westermann, B., and Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 16, 1421–1427.
- Wolter, M. (2015). Identifizierung und Charakterisierung von potentiellen Interaktionspartnern des Motorproteins Myo2. Masterarbeit. Universität Bayreuth.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., and Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. J. Cell Biol. 151, 341–352.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S. V., Okreglak, V., Holewinske, T.J., Cassidy-Stone, A., and Nunnari, J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. J. Cell Biol. 160, 303–311.
- Wurm, C.A., and Jakobs, S. (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. FEBS Lett. 580, 5628–5634.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., and Woese, C.R. (1985). Mitochondrial origins. Proc Natl Acad Sci U S A 82, 4443–4447.
- Yang, H.-C., and Pon, L.A. (2002). Actin cable dynamics in budding yeast. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 751–756.
- Zhang, H., and Singh, K.K. (2014). Global genetic determinants of mitochondrial DNA copy number. PLoS One 9, e105242.

Zhou, C., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Guo, F., Yu, Z., Mickey, K., Narkar, A., Ross, R.T., McClain, M., and Li, R. (2014). Organelle-based aggregation and retention of damaged proteins in asymmetrically dividing cells. *Cell* 159, 530–542.

Anhang

Bibliothek negativer Interaktoren von *MMR1*

Tabelle A1: Bibliothek negativer Interaktoren von *MMR1* mit systematischen (Syst. Name) und Standardnamen (Std. Name).

Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name
YAL010C	MDM10	YGL115W	SNF4	YLR373C	VID22
YAL048C	GEM1	YGL124C	MON1	YLR418C	CDC73
YBL082C	ALG3	YGL163C	RAD54	YML001W	YPT7
YBR036C	CSG2	YGL167C	PMR1	YML013W	UBX2
YBR056W		YGL212W	VAM7	YML017W	PSP2
YBR103W	SIF2	YGL219C	MDM34	YML128C	MSC1
YBR131W	CCZ1	YGL237C	HAP2	YMR012W	CLU1
YBR171W	SEC66	YGR036C	CAX4	YMR060C	SAM37
YBR200W	BEM1	YGR056W	RSC1	YMR100W	MUB1
YBR231C	SWC5	YGR089W	NNF2	YNL008C	ASI3
YBR245C	ISW1	YGR101W	PCP1	YNL064C	YDJ1
YBR260C	RGD1	YGR122W		YNL079C	TPM1
YCR033W	SNT1	YGR135W	PRE9	YNL080C	EOS1
YDL006W	PTC1	YGR157W	CHO2	YNL141W	AAH1
YDL056W	MBP1	YGR240C	PFK1	YNL169C	PSD1
YDL077C	VAM6	YHR200W	RPN10	YNL219C	ALG9
YDL135C	RDI1	YIL034C	CAP2	YNL271C	BNI1
YDR080W	VPS41	YIL090W	ICE2	YNL304W	YPT11
YDR123C	INO2	YIR017C	MET28	YNL307C	MCK1
YDR159W	SAC3	YJL116C	NCA3	YNL322C	KRE1
YDR162C	NBP2	YJL183W	MNN11	YOL009C	MDM12
YDR176W	NGG1	YJR073C	OPI3	YOL012C	HTZ1
YDR245W	MNN10	YJR075W	HOC1	YOL108C	INO4
YDR289C	RTT103	YJR118C	ILM1	YOR035C	SHE4
YDR322C-A	TIM11	YJR120W		YOR106W	VAM3
YDR363W-A	SEM1	YKL007W	CAP1	YOR124C	UBP2
YDR393W	SHE9	YKL117W	SBA1	YOR127W	RGA1
YDR432W	NPL3	YKL139W	CTK1	YOR311C	DGK1
YDR435C	PPM1	YKL185W	ASH1	YPL024W	RMI1
YDR477W	SNF1	YKL213C	DOA1	YPL055C	LGE1
YEL003W	GIM4	YLL002W	RTT109	YPL069C	BTS1
YEL043W		YLR024C	UBR2	YPL103C	FMP30
YER016W	BIM1	YLR087C	CSF1	YPL106C	SSE1
YER116C	SLX8	YLR268W	SEC22	YPL240C	HSP82

Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name
YFR010W	UBP6	YLR319C	BUD6	YPL254W	HFI1
YFR019W	FAB1	YLR342W	FKS1	YPR009W	SUT2
YGL003C	CDH1	YLR346C	CIS1	YPR020W	ATP20
YGL058W	RAD6	YLR370C	ARC18		

Überlapp der Interaktoren der beiden SGA-Durchgänge der MATa-Bibliothek mit *myo2-fis1*

Tabelle A2: Überlapp positiver Interaktoren der beiden SGA-Durchgänge mit *myo2-fis1*.

Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name
YMR179W	SPT21	YOR141C	ARP8	YEL061C	CIN8	YNL197C	WHI3
YLR074C	BUD20	YKL081W	TEF4	YGR157W	CHO2	YKR024C	DBP7
YNL275W	BOR1	YLR190W	MMR1	YGR159C	NSR1	YHR064C	SSZ1
YMR267W	PPA2	YOR241W	MET7	YGR160W		YGL219C	MDM34
YOR078W	BUD21	YLR360W	VPS38	YER002W	NOP16	YNL071W	LAT1
YOR080W	DIA2	YJL212C	OPT1	YGR161C	RTS3	YBL107C	MIX23
YOR082C		YLR363C	NMD4	YHR203C	RPS4B	YDR450W	RPS18A
YNL283C	WSC2	YJL210W	PEX2	YGR193C	PDX1	YDR500C	RPL37B
YOL009C	MDM12	YJL211C		YLR164W	SHH4	YML129C	COX14
YPL097W	MSY1	YLR365W		YKL068W	NUP100	YER156C	
YPL193W	RSA1	YJL209W	CBP1	YKL069W	YKG9	YDL185W	VMA1
YBR194W	AIM4	YLR366W		YKL070W		YFL033C	RIM15

Tabelle A3: Überlapp negativer Interaktoren aus den beiden SGA-Durchgängen mit *myo2-fis1*.

Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name
YBR179C	FZO1	YMR293C	HER2	YHR013C	ARD1
YCL007C		YMR294W	JNM1	YHR091C	MSR1
YDL047W	SIT4	YMR299C	DYN3	YHR161C	YAP1801
YDL117W	CYK3	YNL298W	CLA4	YIR023W	DAL81
YDR108W	TRS85	YOR211C	MGM1	YJL006C	CTK2
YDR136C	VPS61	YOR269W	PAC1	YJL088W	ARG3
YDR150W	NUM1	YPL002C	SNF8	YJL129C	TRK1
YDR219C	MFB1	YPL174C	NIP100	YJL157C	FAR1
YDR245W	MNN10	YPR083W	MDM36	YJR043C	POL32
YDR260C	SWM1	YPR133W-A	TOM5	YJR060W	CBF1
YDR488C	PAC11	YAL024C	LTE1	YKL169C	
YDR507C	GIN4	YBL079W	NUP170	YKL170W	MRPL38
YEL036C	ANP1	YBR173C	UMP1	YKR082W	NUP133
YER083C	GET2	YBR231C	SWC5	YLR320W	MMS22
YER087W	AIM10	YBR251W	MRPS5	YLR358C	
YFL016C	MDJ1	YCR024C	SLM5	YLR381W	CTF3
YGL020C	GET1	YDL074C	BRE1	YLR396C	VPS33
YGR228W		YDR300C	PRO1	YLR403W	SFP1
YGR229C	SMI1	YDR318W	MCM21	YML041C	VPS71
YHR030C	SLT2	YDR334W	SWR1	YML071C	COG8
YHR129C	ARP1	YDR363W-A	SEM1	YMR098C	ATP25
YJL183W	MNN11	YDR417C		YMR272C	SCS7
YJR073C	OPI3	YDR455C		YMR287C	DSS1
YJR118C	ILM1	YDR456W	NHX1	YNL041C	COG6
YKL048C	ELM1	YDR485C	VPS72	YNL107W	YAF9
YKR054C	DYN1	YEL007W	MIT1	YNL147W	LSM7
YLR025W	SNF7	YEL037C	RAD23	YNL235C	
YLR337C	VRP1	YEL060C	PRB1	YNR010W	CSE2
YLR417W	VPS36	YGL033W	HOP2	YOL058W	ARG1
YMR032W	HOF1	YGL066W	SGF73	YOL072W	THP1
YMR089C	YTA12	YGL100W	SEH1	YOL086C	ADH1
YOR139C		YOR216C	RUD3	YPL155C	KIP2
YOR150W	MRPL23	YOR330C	MIP1	YPL249C-A	RPL36B

Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name	Syst. Name	Std. Name
<i>YOR158W</i>	<i>PET123</i>	<i>YPL017C</i>	<i>IRC15</i>	<i>YPR119W</i>	<i>CLB2</i>
<i>YOR200W</i>		<i>YPL018W</i>	<i>CTF19</i>		

GO-Term Analysen negativer Interaktoren der beiden SGA-Durchgänge der *MATa*-Bibliothek mit *myo2-fis1*

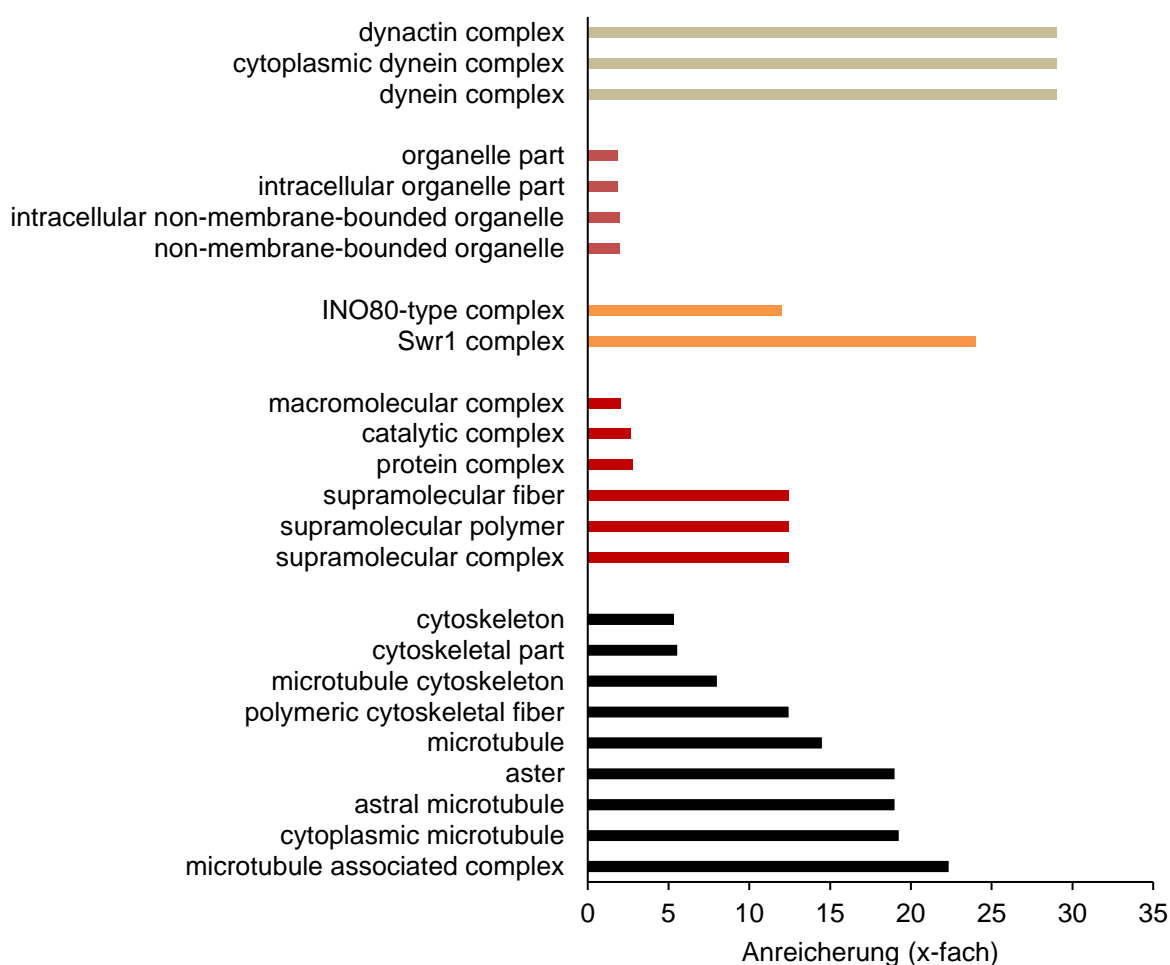


Abbildung A1: GO-Term-Analyse negativer Interaktoren von *myo2-fis1* in der Kategorie „Komponenten“. Die Auswertung erfolgte mithilfe des „GO Term Finder“ der *Saccharomyces Genome Database* (Boyle et al., 2004). Angezeigt werden Anreicherungen mit einem p-Wert kleiner 0,01. Die angereicherten Komponenten wurden in Unterkategorien unterteilt. Grau: Dynein/Dynactin; Rosa: Organellen; Orange: Chromatinorganisation; Rot: Macro- und Supramolekulare Komplexe; Schwarz: Zytoskelett

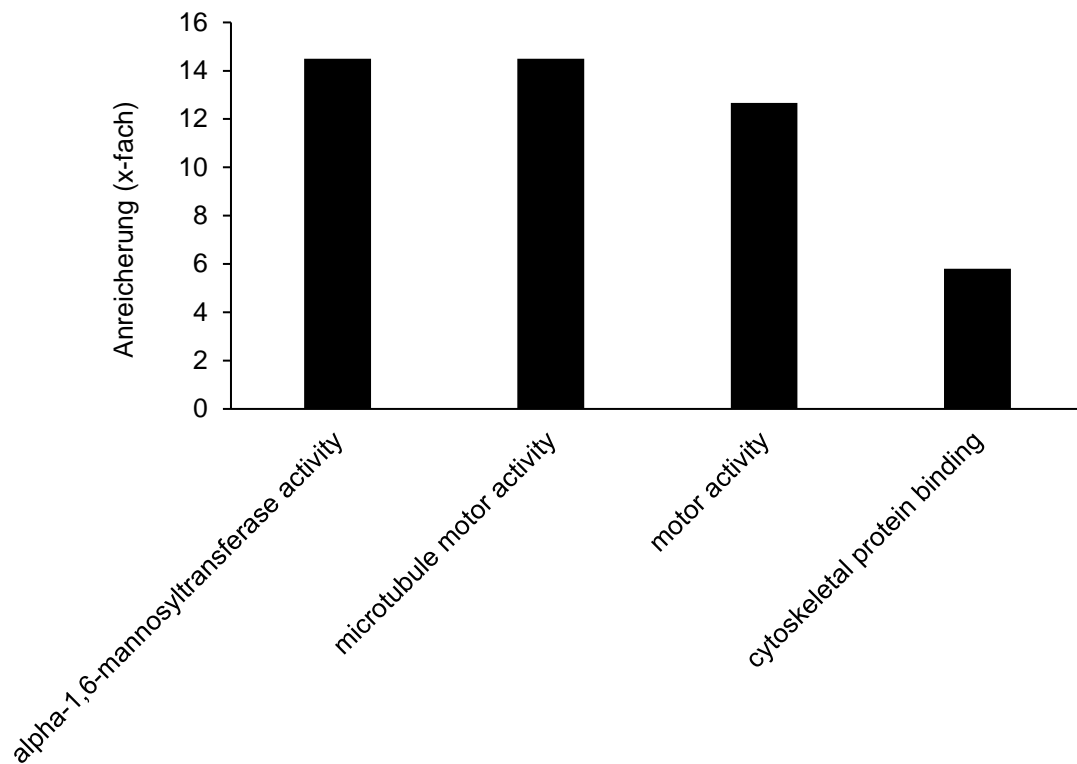


Abbildung A2: GO-Term-Analyse negativer Interaktoren von *myo2-fis1* in der Kategorie „Funktionen“. Die Auswertung erfolgte mithilfe des „GO Term Finder“ der *Saccharomyces Genome Database* (Boyle et al., 2004). Angezeigt werden Anreicherungen mit einem p-Wert kleiner 0,1.

Beiliegende CD

Inhalt der beiliegenden CD:

- PDF der Dissertation
- PDF der deutschen und englischen Zusammenfassung
- Ordner „Essentielle“ mit der Bibliothek essentieller Gene, die mithilfe von SGD erstellt wurde.
- Ordner „SGA *MMR1*“ mit der Bibliothek negativer Interaktoren von MMR1 im 96-*well* und 384-*well* Format.
- Ordner „SGA *MATa*“ mit den aus SGAtools erhaltenen Rohdaten, sowie die Auswertungen für die einzelnen Platten der beiden Durchgänge der SGA der *MATa*-Bibliothek mit *myo2-fis1* im Excel-Format

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....
Ort, Datum, Unterschrift