

**Untersuchungen zur Vererbung des
mitochondrialen Genoms in *Saccharomyces
cerevisiae***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und
Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Maria Theresia Stenger

aus Wasserburg a. Inn

Bayreuth, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2014 bis November 2017 in Bayreuth am Lehrstuhl 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: 03.12.2018

Zulassung durch das Leitungsgremium: 11.12.2018

Wissenschaftliches Kolloquium: 09.05.2019

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Dirk Schüler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Benedikt Westermann (Gutachter)

Prof. Dr. Klaus Ersfeld (Gutachter)

Prof. Dr. Angelika Mustroph (Vorsitz)

Dr. Claus-Dieter Kuhn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
Abstract	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Aufbau, Dynamik und Funktion der Mitochondrien	1
1.2. Atmungskette und oxidativer Stress	2
1.3. Proteinimport in Mitochondrien	4
1.4. Das mitochondriale Genom und hypersuppressive mtDNA	5
1.5. Vererbung des mitochondrialen Genoms	8
1.6. Cytoduktion und <i>Synthetic Genetic Array</i>	10
1.7. Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Molekularbiologische Methoden	17
2.1.1. Plasmide	17
2.1.2. Klonierung von MGR2-eGFP über Gateway	17
2.1.3. Primer	18
2.2. Hefegenetische Methoden	19
2.2.1. Hefestämme	19
2.2.2. Medien und Kultivierung	23
2.2.3. LiAc/PEG-Transformation der Hefezellen	24
2.2.4. Herstellung von Diploiden und Sporulation	25
2.2.5. Dissektion der Tetraden am Mikromanipulator	25
2.2.6. Herstellung von <i>rho</i> ⁰ Stämmen	26
2.2.6.1. In Flüssigkultur	26
2.2.6.2. Auf Platte mittels RoToR HDA	26
2.2.7. Cytoduktion	26
2.2.8. <i>Synthetic Genetic Array</i> (SGA)	27
2.2.9. Auswertung der Screens	28
2.3. Zellbiologische Methoden	28
2.3.1. Wachstumsanalyse mittels Tüpfeltest (<i>drop-dilution Assay</i>)	28
2.3.2. Erythromycin-Assay	28
2.3.3. Fluoreszenzmikroskopie	28
2.3.3.1. Mikroskopie der Mitochondrien-Morphologie	29

2.3.3.2. Färbung der mtDNA mittels DAPI.....	29
2.3.3.3. Färbung der Vakuolen mittels <i>CellTracker Blue</i> CMAC	30
2.4. Elektronenmikroskopie	30
2.4.1. Anzucht, Fixierung und Einbettung der Hefezellen nach Tokuyasu.....	30
2.4.2. Pinnen, Trimmen, Schneiden und Nachkontrastierung nach Tokuyasu	31
2.4.3. Mikroskopie.....	32
3. Ergebnisse und Diskussion	33
3.1. Screenergebnisse.....	33
3.1.1. Stempeln der <i>MATa</i> Deletionsbibliothek auf YPG.....	33
3.1.2. Screen nach Mutanten, die nach Ethidiumbromid-Behandlung nicht mehr auf YPD wachsen können.....	48
3.1.3. Screen nach Mutanten, die mit wildtypischer mtDNA nicht cytoduzierbar sind.....	51
3.1.4. mtDNA-Verlust über die Zeit (5 Mal YPD)	62
3.1.5. mtDNA-Verlust unabhängig von der Atmung (<i>ARG8^m</i>)	66
3.1.6. Einfluss von oxidativem Stress auf mtDNA-Verlust (Menadion).....	77
3.1.7. Screen nach Mutanten, die hypersuppressive mtDNA tolerieren (HS).....	81
3.2. Weiterführende Untersuchungen einzelner Stämme aus den Screens.....	85
3.2.1. Charakterisierung der Gene von dem Screen mtDNA-Verlust über die Zeit.....	86
3.2.2. Charakterisierung der Gene aus dem Screen mtDNA-Verlust unabhängig von der Atmung (<i>ARG8^m</i>)	91
3.2.3. Charakterisierung der Gene aus dem Screen Einfluss von oxidativem Stress auf mtDNA- Verlust (Menadion)	97
3.2.4. Charakterisierung der Gene aus dem Screen nach Mutanten, die hypersuppressive mtDNA tolerieren.....	100
4. Schlussfolgerung und Ausblick	106
4.1. Screens	106
4.2. Charakterisierung der interessanten Gene	106
5. Literatur	109
6. Anhang.....	131
Danksagung	136
(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen	137

Zusammenfassung

Mitochondrien sind Zellorganellen, die vermutlich durch die Endosymbiose eines α -Proteobakteriums in eine Archaea-Wirtszelle entstanden sind. Die meisten Gene des Endosymbionten wurden in den Nukleus transferiert, aber nichtsdestotrotz besitzen die heutigen Mitochondrien ein funktionelles Genom, welches in sogenannten Nucleoiden vorliegt. Die mitochondriale DNA (mtDNA) kodiert in der knospenden Hefe *Saccharomyces cerevisiae* acht Proteine, zwei rRNAs und einige tRNAs, welche für die Atmungsketten-Aktivität benötigt werden. Das mitochondriale Genom muss repliziert, positioniert und an die Tochterzellen vererbt werden. Einige Proteine, welche in diesen Vorgängen eine zentrale Rolle spielen, wie die DNA-Polymerase Mip1 und das DNA-Verpackungsprotein Abf2, sind bekannt und gut charakterisiert. Dessen ungeachtet existieren zahlreiche weitere, prozessrelevante Proteine, die noch nicht beschrieben wurden.

Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, Gene bzw. weitere Proteine zu identifizieren, die für die Vererbung und Aufrechterhaltung des mitochondrialen Genoms in *Saccharomyces cerevisiae* notwendig sind. Hierfür wurden mehrere genomweite Hochdurchsatz-Screens mit der *MATa* Deletionsbibliothek, welche ca. 4.800 Deletionsstämme nicht essentieller Gene enthält, durchgeführt. Die Bibliothek wurde nach Deletionsstämmen gescreent, die ihre mtDNA mit der Zeit bzw. unabhängig von der Atmung verlieren. Des Weiteren wurde nach Stämmen gesucht, welche die mitochondriale DNA nach oxidativem Stress verlieren. Außerdem wurde ein Screen so konzipiert, um Stämme zu erhalten, die ihre wildtypische mtDNA gegenüber der hypersuppressiven DNA behalten. Hypersuppressive DNA unterdrückt die Vererbung der wildtypischen mtDNA und wird in den meisten Fällen selbst vererbt.

Mit Hilfe zahlreicher Screens konnten viele Deletionsstämme gefunden werden, die mögliche Defekte in der Vererbung der mtDNA aufweisen. Von diesen Treffern wurden 16 näher charakterisiert, indem die Nucleoide und die Mitochondrien- bzw. Vakuolen-Morphologie analysiert wurden. Weiterhin wurde eine mögliche Funktion der Proteine vorgeschlagen und, sofern möglich, untersucht. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Ybr062c nicht bei der mtDNA-Reparatur involviert ist. Im Zuge der Analyse des Kandidatengens *RRG1* wurden Hinweise gefunden, dass es sich um eine tRNA-Synthetase handeln könnte. Der Deletionsstamm des TIM23-Komplex-Proteins Mgr2 zeigte eine wildtypische Ultrastruktur im Elektronenmikroskop und das Protein Mgr2 war homogen in den Mitochondrien verteilt.

Abstract

Mitochondria are organelles which derived from bacteria during endosymbiosis. It is assumed that an archaeobacterium absorbed an α -proteobacterium which developed to an essential and autonomous organelle of the host. Most of the genes were transferred to the nucleus, but nevertheless the mitochondria contain a functional genome, which is organized in so called nucleoids. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the mitochondrial DNA (mtDNA) encodes eight proteins, two rRNAs and several tRNAs, which are necessary for respiratory chain activity. The mitochondrial genome must be replicated, positioned and inherited to the daughter cells. Some proteins, which play a pivotal role in these processes like the DNA polymerase Mip1 or the DNA packaging protein Abf2, are known and well characterized. However, many proteins, which participate in these mechanisms, are still unknown.

Hence the main goal of this study was to identify additional genes and proteins, which are required for the inheritance and maintenance of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. For this purpose, several high-throughput, genome-wide screens were performed using the *MATa* yeast deletion library, which contains about 4,800 strains with deletions of non-essential genes. The library was screened for deletion strains which lose their mtDNA after a certain time or independently of respiration. In addition, strains losing the mitochondrial DNA after being exposed to oxidative stress and strains retaining their wildtype mtDNA in presence of hypersuppressive mtDNA were searched for. The hypersuppressive mtDNA suppresses the wildtype mtDNA in most cases and gets inherited.

Several candidates were identified in the different screens. For a further characterization of 16 of the identified deletion strains the nucleoids and mitochondrial as well as the vacuolar morphology were analyzed. Moreover, a possible function of the deletion genes and their proteins was suggested and analyzed wherever applicable. For instance, it was shown in this work that Ybr062c is not involved in the repair of mtDNA. Moreover, the protein Rrg1 is potentially a tRNA synthetase. The deletion strain of the TIM23 complex protein Mgr2 showed a wildtype ultrastructure in the electron microscope and Mgr2 was distributed evenly all over the mitochondrial network.

Abkürzungsverzeichnis

5'-FOA	<i>5-fluoroorotic acid</i>
5'-FU	<i>5-fluorouracil</i>
ADE	Adenin
Amp	Ampicillin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ARG	Arginin
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
Can	Canavanin
CMAC	7-Amino-4-chloromethylcoumarin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DIC	<i>differential interference contrast</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ERMES	<i>endoplasmatic reticulum mitochondria encounter structure</i>
Ery	Erythromycin
EtBr	Ethidiumbromid
G418	Geneticin
GA	Glutaraldehyd
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPD	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HIS	Histidin
HMG	<i>high mobility group</i>
HS	hypersuppressiv
Kan	Kanamycin
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LB	<i>lysogeny broth</i>
LEU	Leucin
LHON	<i>Leber Hereditary Optic Neuropathy</i>
LiAc	Lithiumacetat
LYS	Lysin
Men	Menadion

MET	Methionin
MIA	<i>mitochondrial intermembrane space import and assembly</i>
MIM	<i>mitochondrial import protein</i>
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
mt	mitochondrial
MTC	<i>mitochondrial translation control</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
mtRFP	<i>mitochondria targeted red fluorescent protein</i>
NTC	Nourseothricin
OD	Optische Dichte
ODCase	Oritidin-5'-Phosphat-Decarboxylase
ORF	<i>open reading frame</i>
OXA	<i>oxidase assembly translocase</i>
PAM	<i>presequence translocase-associated motor</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCC	<i>pearson correlation coefficient</i>
pet	<i>petite</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PHEM	Pipes + Hepes + EGTA + MgSO ₄
PPR	<i>pentatricopeptide repeat</i>
Raf	Raffinose
<i>rho</i>	<i>rho</i> -Faktor
RING	<i>really interesting new genes</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
SAM	<i>sorting and assembly machinery</i>
SCD	Synthetisches Vollmedium mit Glukose
SCIPHER	<i>Supervised clustering-based iterative phylogenetic hidden Markov model algorithm for the evaluation of tandem repeat motif families</i>
SD	Synthetisches Medium mit Glukose

SGA	<i>synthetic genetic array</i>
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
SM	Selektivmedium
SOC	<i>super optimized broth with catabolite repression</i>
SOD	Superoxiddismutase
SPELL	<i>serial pattern of expression levels locator</i>
TE	Tris + EDTA
Thia	Thialysin
TIM	<i>translocase of the inner membrane</i>
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
tRNA	Transfer-RNA
TRP	Tryptophan
URA	Uracil
üN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
vCLAMP	<i>vacuole and mitochondria patch</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
YFG	<i>your favorite gene</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast extract + peptone + dextrose</i>
YPG	<i>yeast extract + peptone + glycerol</i>

1. Einleitung

1.1. Aufbau, Dynamik und Funktion der Mitochondrien

Im Laufe der eukaryotischen Evolution entwickelten sich in der Zelle verschiedene Organellen. Dadurch kam es zur Begrenzung verschiedener Diffusionsräume, zur Vergrößerung von Membranoberflächen und zur Bildung mehrerer Reaktionsräume, wodurch unterschiedliche und mehr Reaktionen gleichzeitig ablaufen können. Eines dieser Zellorganellen ist das Mitochondrion, dessen Name aus dem Griechischen stammt und mit Faden (*mitos*) und Körnchen (*chondrion*) übersetzt wird. Die Bezeichnung Mitochondrion erfolgte Ende des 19. Jahrhunderts auf Grundlage von lichtmikroskopischen Untersuchungen. Hierbei erschienen die Zellorganellen als kleine, auf einem Faden aufgefädelt Körnchen (Benda, 1898).

Mitochondrien besitzen eine Doppelmembran. Die mitochondriale (mt) Außenmembran stellt die äußere Grenze zum Cytosol dar und umschließt die Innenmembran. Diese hingegen bildet durch ihre starke Faltung Strukturen aus, welche Cristae genannt werden. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der Intermembranraum. Ein weiteres Subkompartiment ist die Matrix, die von der Innenmembran umgeben ist (Frey und Mannella, 2000).

Um die Mitochondrien zu vermehren, müssen sie sich teilen, da sie nicht *de novo* gebildet werden können. Dabei ist in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) das Protein Dnm1 für die Teilung der mitochondrialen Außenmembran zuständig. Zusätzlich spielen Mdv1/Caf4 und Fis1 als Adaptorproteine bei diesem Prozess eine wichtige Rolle (Lackner und Nunnari, 2009). Die Proteine Fzo1 und Ugo1 sind Bestandteile der Fusionsmaschinerie und bewirken in einem entgegengesetzten Prozess die Verschmelzung der Außenmembran zweier Mitochondrien, welche zuerst miteinander fusionieren müssen. Anschließend erfolgt die Verschmelzung der mitochondrialen Innenmembranen, wofür Mgm1 zuständig ist. Die Proteine sind an den jeweiligen Membranen, welche sie teilen oder verbinden, lokalisiert (Westermann, 2002; Westermann, 2010).

Die Mitochondrien fusionieren und teilen sich nicht nur, sie müssen auch vor Abschluss der Zellteilung auf die zwei Zellen verteilt werden. Dies geschieht in Hefe mit Hilfe des Myo2 Motorproteins über Aktinfilamente (Drubin *et al.*, 1993; Altmann *et al.*, 2008; Förtsch *et al.*, 2011). Weitere Proteine, die daran beteiligt sind, sind Ypt11 und Mmr1, welche vermutlich bei

der Myo2-Rekrutierung eine Rolle spielen (Chernyakov *et al.*, 2013). Das Rezeptorprotein, über welches Myo2 an die Mitochondrien bindet, ist jedoch noch unbekannt. Num1 und Mdm36 verankern die Mitochondrien in der Mutterzelle und verhindern, dass das komplette Mitochondriennetzwerk in die Tochterzelle transportiert wird (Klecker *et al.*, 2013).

Mitochondrien sind essentielle Zellorganellen, da sie in allen Organismen für die Bildung und Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern verantwortlich sind, welche als Kofaktoren in verschiedenen Enzymreaktionen benötigt werden (Lill und Kispal, 2000). Ferner sind sie an der Apoptose, der Lipid-Biosynthese, dem Fettsäureabbau, der Häm-Synthese und einigen Schritten des Harnstoffzykluses beteiligt (Dennis und Kennedy, 1972; Kerr *et al.*, 1972; Mannaerts *et al.*, 1979; Ferreira und Gong, 1995; Nissim *et al.*, 2005). Die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung ist die prominenteste Funktion der Mitochondrien. Daher werden sie oft auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet (Hatefi, 1985).

1.2. Atmungskette und oxidativer Stress

Den Beinamen „Kraftwerke der Zelle“ haben Mitochondrien erhalten, da sie für die Generierung von ATP zuständig sind. Dieser Prozess beginnt mit der oxidativen Phosphorylierung, bei der Elektronen von FADH₂ und NADH auf Sauerstoff als Endakzeptor übertragen werden (Saraste, 1999). Der Sauerstoff wird dabei zu Wasser reduziert, indem die Elektronen über die Elektronentransportkette transferiert werden. Vier Proteinkomplexe (Komplex I bis IV) der Elektronentransportkette befinden sich in eukaryotischen Zellen in der mitochondrialen Innenmembran. In *S. cerevisiae* fehlt jedoch Komplex I, die NADH-Dehydrogenase. Stattdessen besitzt die Bäckerhefe eine alternative und externe NADH-Dehydrogenase (Small und McAlister-Henn, 1998). Durch die verschiedenen Proteinkomplexe der Elektronentransportkette werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt, wodurch an der mitochondrialen Innenmembran ein Protonengradient entsteht. Diesen Gradienten versuchen die Protonen wieder auszugleichen, indem sie zurück in die Matrix wandern. Dadurch ergibt sich die sogenannte protonenmotorische Kraft. Die Protonen können jedoch nur über ATP-Synthasen (F₁F₀-ATPase) in den Matrixraum transportiert werden, weil die Innenmembran nicht permeabel für Protonen ist (Walker *et al.*, 1987). Dabei wird aus ADP und Orthophosphat ATP gebildet (Mitchell, 1967). Dieser Vorgang wird auch

chemiosmotische Kopplung genannt (Mitchell, 1967). Durch die Reduzierung des Sauerstoffs werden als Nebenprodukt einige für die Zelle schädliche Verbindungen gebildet und freigelassen. Diese reaktiven Sauerstoffspezies werden auch als ROS (*reactive oxygen species*) bezeichnet (Boveris *et al.*, 1972; Turrens und Boveris, 1980).

Zu den ROS zählen unter anderem das Superoxid-Radikal ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Halliwell, 1987). Diese werden sowohl bei der ATP-Generierung als auch durch weitere schädliche Prozesse und Stoffe wie UV-Strahlung, Herbizide, Schwermetalle und Krebs-Medikamente freigesetzt (Das *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2011). Ein weiterer Verursacher von ROS ist der aromatische Wirkstoff Menadion, welcher als Vorstufe in der Vitamin-K-Synthese dienen kann (Loor *et al.*, 2010). Der Mechanismus ist hierbei, dass Menadion in einer Ein-Elektronen-Reduktion zu einem Semichinonradikalanion umgewandelt wird. Dieses reagiert mit Sauerstoff, wodurch ein Superoxid-Radikal gebildet wird. Diese Reaktion wird *Redox-Cycling* genannt (Iyanagi und Yamazaki, 1970).

Die reaktiven Sauerstoffspezies können oxidativen Stress verursachen, der wiederum als Grund für zelluläre Schädigung angesehen wird. Daher müssen ROS in nicht schädliche Verbindungen umgesetzt werden. Zwei dafür verantwortliche Enzyme sind die Katalase und die Superoxiddismutase (SOD). Letztere bildet als Zwischenprodukt H_2O_2 aus $O_2^{\cdot-}$ und $\cdot OH$. Zwei Moleküle Wasserstoffperoxid werden von der Katalase letztendlich zu O_2 und H_2O umgesetzt (McCord und Fridovich, 1969).

Einige humane Krankheiten treten in Verbindung mit ROS und dem daraus resultierenden oxidativen Stress auf. Dazu gehören unter anderem die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), die Alzheimer-Krankheit, die Parkinson-Erkrankung sowie der Diabetes mellitus (Typ 2) (Hirsch, 1993; Giugliano *et al.*, 1996; Andrus *et al.*, 1998; Behl, 1999). Des Weiteren sind die reaktiven Sauerstoffspezies an der Apoptose, dem Zellalterungsprozess und der Entstehung von Krebs beteiligt (Pierce *et al.*, 1991; Orr und Sohal, 1994; Ames *et al.*, 1995). Ursache hierfür ist die Schädigung von Lipiden und DNA durch oxidativen Stress (Bilinski *et al.*, 1989). Da die mitochondriale DNA besonders nahe am Entstehungsort von ROS lokalisiert ist, wird diese sehr stark beschädigt, was sich in Basenmodifikationen und Strangbrüchen äußert (Henle und Linn, 1997). Aber auch mitochondriale Proteine, welche überwiegend importiert werden müssen, werden sehr stark durch ROS in Mitleidenschaft gezogen (Cabiscol *et al.*, 2000).

1.3. Proteinimport in Mitochondrien

Das mitochondriale Proteom umfasst ca. 1.000 Proteine, welche in den verschiedenen Subkompartimenten vorliegen (Sickmann *et al.*, 2003; Vögtle *et al.*, 2017). Bis auf wenige Proteine, welche selbst in den Mitochondrien synthetisiert und gleichzeitig über den Komplex OXA (*oxidase assembly translocase*) in die Membran inseriert werden, müssen in der Hefe mitochondriale Proteine aus dem Cytosol in die Mitochondrien transportiert werden (Ott und Herrmann, 2010). Hierzu existieren verschiedene Mechanismen, um die Proteine zu importieren und in die unterschiedlichen Kompartimente zu verteilen. Die meisten Proteine passieren die mitochondriale Außenmembran über den TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*) (Pfanner *et al.*, 1996).

Proteine, deren Bestimmungsort die Matrix oder die Innenmembran der Mitochondrien ist, besitzen eine sogenannte Präsequenz, die sie als mitochondriales Protein ausweist. Diese Aminosäuren-Abfolge befindet sich am N-Terminus und enthält positiv geladene amphipatische α -Helices. Auf Grund der Präsequenz gelangen die mitochondrialen Proteine über den TOM-Komplex zum TIM23-Komplex (*translocase of the inner membrane*), der in der Innenmembran lokalisiert ist (Habib *et al.*, 2007; van der Laan *et al.*, 2010). Von dort werden die Proteine entweder in die Innenmembran inseriert oder über den PAM-Komplex (*presequence translocase-associated motor*) in die Matrix transloziert (D'Silva *et al.*, 2003; Truscott *et al.*, 2003). Das Enzym MPP (*mitochondrial processing peptidase*) entfernt dabei die Präsequenz (Hawlitshchek *et al.*, 1988). Ein Bestandteil des TIM23-Komplexes ist Mgr2 (Gebert *et al.*, 2012). Das Protein ist mit dafür verantwortlich, dass die zu importierenden Proteine lateral in die Innenmembran freigelassen werden (Ieva *et al.*, 2014).

Innenmembranproteine, die anders geartete Zielsteuerungssequenzen besitzen, gelangen ebenfalls über den TOM-Komplex durch die Außenmembran (de Marcos-Lousa *et al.*, 2006). Über lösliche Tim-Proteine werden sie zum TIM22-Komplex geleitet (Koehler, 2004). Dort erfolgt abhängig vom Membranpotential der Einbau in die mitochondriale Innenmembran (Rehling *et al.*, 2004).

Des Weiteren müssen lösliche Proteine in den Intermembranraum importiert werden. Dafür ist der MIA-Komplex (*mitochondrial intermembrane space import and assembly*) verantwortlich (Stojanovski *et al.*, 2008). Die Proteine gelangen durch den TOM-Komplex zur

Außenmembran und werden vom MIA-Komplex prozessiert. Dieser erkennt die Cysteinreichen Domänen der Zielsequenzen und führt Disulfidbrücken ein (Hell, 2008).

Die Inserierung der Außenmembranproteine erfolgt ausgehend vom TOM-Komplex entweder über den MIM- (*mitochondrial import protein*) oder über den SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*) in ihre Zielmembran (Paschen *et al.*, 2005). MIM übernimmt dabei den Einbau von α -helikalen Proteinen und auch die Assemblierung des TOM-Komplexes (Becker *et al.*, 2008; Hulett *et al.*, 2008; Popov-Celeketic *et al.*, 2008). β -Barrel Proteine hingegen werden von Tim-Chaperonen durch den Intermembranraum zu den SAM-Komplexen transportiert, welche den Einbau der Proteine übernehmen (Wiedemann *et al.*, 2004).

1.4. Das mitochondriale Genom und hypersuppressive mtDNA

Die mtDNA ist ein Relikt des bakteriellen Genoms. In eine Archaea-Wirtszelle ist vermutlich durch Endosymbiose ein α -Proteobakterium eingedrungen (Gray, 1992). Aus diesem Vorgang resultiert das für Mitochondrien charakteristische Zwei-Membranen-System, dessen äußere Membran sowohl Eigenschaften vom Wirt als auch vom Endosymbiont aufweist (Gray *et al.*, 2001; Zeth, 2010). Ein weiteres Relikt des α -Proteobakteriums ist dessen DNA. Deswegen besitzen die Mitochondrien ein eigenes Genom. Aus diesem Grund werden die Mitochondrien auch semiautonom bezeichnet, wobei der DNA Code des Mitochondrions nicht mit dem des Zellkerns übereinstimmt (Anderson *et al.*, 1981; Gualberto *et al.*, 1989). Mit der Zeit wurden die meisten Gene bakteriellen Ursprungs über horizontalen Gentransfer in den Nukleus eingebracht (Keeling und Palmer, 2008). Einige wenige Gene verblieben jedoch in den Mitochondrien. Während im Menschen 13 proteinkodierende Gene vorhanden sind, sind es in der Hefe *S. cerevisiae* acht (Anderson *et al.*, 1981; Gray *et al.*, 1999). Hinzu kommen zwei rRNA- und 24 tRNA-Gene (Foury *et al.*, 1998).

Sieben der acht proteinkodierenden Gene dienen in der Hefe als Translationsvorlage für Proteine der ATP-Synthase oder der verschiedenen Atmungskettenkomplex-Untereinheiten. Das Gen *VAR1* hingegen kodiert für ein mitochondriales ribosomales Protein (Hudspeth *et al.*, 1982). Zur ATP-Synthase gehören Atp6, Atp8 und Atp9 (Nagley *et al.*, 1986; Pelissier *et al.*, 1992; Tzagoloff *et al.*, 2004). Zu den Atmungskettenkomplex-Untereinheiten zählen Cob, Cox1, Cox2, und Cox3 (Alexander *et al.*, 1979; Hensgens *et al.* 1984; Kloeckener-Gruissem *et al.*, 1987). Ist eines dieser acht Gene mutiert oder deletiert, können Hefen nicht mehr auf

Medium mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wie Glycerin (zum Beispiel YPG: *yeast extract peptose glycerol*) wachsen. Jedoch sind sie fähig, im Gegensatz zu vielen anderen Organismen, auf Medium mit fermentierbaren Kohlenstoffquellen, wie z.B. Glukose, Kolonien auszubilden. Möglich wird dies durch die Bildung von ATP mittels Fermentation in einem fakultativ anaeroben Stoffwechselprozess (Tzagoloff und Dieckmann, 1990). Des Weiteren kann die ATP-Synthase unter ATP-Verbrauch den Protonen-Gradienten und das mitochondriale Membranpotential aufrechterhalten. Das Membranpotential wird für den Import von Proteinen und somit für das Überleben der Zelle benötigt (Traba *et al.*, 2008). Dies macht Hefe zu einem geeigneten Organismus, um die Vererbung des mitochondrialen Genoms zu untersuchen.

Enthält das Wachstumsmedium neben Glycerin auch einen geringen Anteil an Glukose, dann weisen die Hefekolonien nur ein geringes Wachstum auf. Dieses Phänomen wurde erstmals von Ephrussi *et al.* beschrieben und als *petite* (*pet*; französisch: „klein“) deklariert (Ephrussi *et al.*, 1949). Dabei können die *petite* Stämme Deletionen oder Mutationen in der mtDNA aufweisen (*rho*⁻) oder diese fehlt ihnen vollständig (*rho*⁰). Die *pet* Mutanten können nicht auf Medium mit Glycerin wachsen, weil ihnen die in der mtDNA kodierten Atmungskettenkomplex-Proteine fehlen. Es kann aber auch einen anderen Grund geben, warum diese Stämme nicht auf Glycerin haltigem Medium wachsen können. Zum Beispiel kann eine Mutation in einem Gen im Zellkern oder ein sekundärer Effekt vorliegen, welcher zu einem Respirationsdefekt führt. Weisen Mitochondrien jedoch ein funktionsfähiges und wildtypisches mtGenom auf, dann werden sie als *rho*⁺ bezeichnet. Die Konsequenzen der *petite*-positiven Stämme sind ein Defekt in der respiratorischen Atmung bzw. der mitochondrialen Proteinsynthese. Dies führt zu Veränderungen im Metabolismus und zum Fehlen wichtiger Proteinkomplexe (Fekete *et al.*, 2007).

Können Deletionsstämme auf Grund eines mtGenom-Verlusts nicht mehr auf fermentierbarem Medium wachsen, so werden sie als *petite*-negativ bezeichnet (Bulder, 1964). Das heißt, diese Stämme verlieren normalerweise ihre mtDNA nicht, da sie sonst nicht überleben können. Eine Möglichkeit, damit Hefen ihre mtDNA verlieren, ist die Behandlung mit Ethidiumbromid (EtBr) (Fox *et al.*, 1991). So führten 2006 Dunn und Kollegen einen genomweiten Screen auf Medium mit EtBr mit dem Ziel durch, möglichst viele *petite*-negative Mutanten zu erhalten (Dunn *et al.*, 2006). In diesem Screen fanden sie 70 Mutanten mit einem

leicht verminderten Wachstum auf EtBr-Platten und 34 Mutanten mit einem starken Wachstumsdefekt auf EtBr-Platten (Dunn *et al.*, 2006). Zwei auffällige Kandidaten, mit einer besonders hohen Wuchsreduktion, waren *MGR1* und *MGR2* (Dunn *et al.*, 2006). Ein weiterer Screen wurde von Steinmetz *et al.* 2002 beschrieben. Ziel der Autoren war es mitochondriale Proteine bzw. Deletionsstämme zu identifizieren (Steinmetz *et al.*, 2002). Dabei untersuchten sie über 5.700 heterozygot diploide und mehr als 4.700 homozygot diploide Deletionsstämme. Deren Wachstum wurde auf neun verschiedenen Medien, darunter auch nicht-fermentierbare Substrate wie Glycerin, gemessen. Die Gruppe konnte 466 Mutanten finden, deren mitochondriale Respiration beeinträchtigt war. Davon waren 265 noch nicht beschrieben (Steinmetz *et al.*, 2002).

Es existiert eine weitere spezielle *rho*⁻ Variante der mtDNA, die hypersuppressive (HS) mtDNA. Sie verdankt ihren Namen der Tatsache, dass sie sich bei einer Paarung von haploiden Hefezellen entgegengesetzten Paarungstyps in den diploiden Tochterzellen der Zygote in über 95% der Fälle gegenüber der wildtypischen (WT) *rho*⁺ mtDNA durchsetzt (Ephrussi *et al.*, 1955; Blanc und Dujon, 1980; MacAlpine *et al.*, 2001). Die Größe der hypersuppressiven mtDNA kann variieren, ist jedoch immer sehr klein (ca. 300 bp). Die HS mtDNA weist viele *rep* bzw. *ori* Sequenzen auf, welche den Ursprungsort der mitochondrialen Replikation darstellen. Sie besitzen einen intakten Promotor und bestehen aus drei GC-reichen Boxen (Lorimer *et al.*, 1995). Die wildtypische mtDNA enthält sieben bis acht *ori* Sequenzen (de Zamaroczy *et al.*, 1984). Jedoch sind nur die *oris* 1, 2, 3 und 5 aktiv, welche in HS mtDNA gefunden wurden (de Zamaroczy *et al.*, 1981). Durch die zahlreichen *ori* Sequenzen wird in der HS mtDNA die Replikation deutlich häufiger gestartet als in der wildtypischen mtDNA und liegt somit in einer größeren Anzahl vor. Des Weiteren ist das hypersuppressive Genom deutlich kleiner als das wildtypische mitochondriale Genom, weswegen die Replikation schneller abläuft und das Genom öfter repliziert werden kann. Durch diesen Replikationsvorsprung hat die HS mtDNA vermutlich einen Vorteil bei der Verteilung innerhalb der Mitochondrien. Nach einigen Zellteilungen bleibt nur die HS mtDNA zurück. Ausnahmen bilden hierbei z.B. die Deletionsmutanten Δ *cce1*, Δ *mhr1* und Δ *mgm101*, deren mutierte Gene in der wildtypischen Form wichtig sind für die homologe Rekombination und DNA-Reparatur (Zweifel und Fangman, 1991; Kleff *et al.*, 1992; Zuo *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2007). Bei diesen Mutanten setzt sich die WT mtDNA gegenüber der HS mtDNA durch.

1.5. Vererbung des mitochondrialen Genoms

Um zu verhindern, dass Hefen ihr mitochondriales Genom verlieren, muss die Vererbungsmaschinerie präzise funktionieren. Viele Faktoren spielen dabei eine wichtige Rolle. Als erstes muss die Replikation bzw. Rekombination der DNA korrekt vonstattengehen. Im nächsten Schritt werden die Kopien der mtDNA getrennt und anschließend so positioniert, dass bei der Teilung der Mitochondrien beide Teile mtDNA enthalten (Westermann, 2014).

Für die Replikation der DNA in Mitochondrien ist in Hefe das Protein Mip1 (*mitochondrial DNA polymerase*) verantwortlich (Genga *et al.*, 1986). Damit Mip1 die Replikation starten kann, transkribiert die RNA-Polymerase Rpo41 RNAs, an welche Mip1 weitere Nukleotide anhängt, um die DNA zu replizieren (Sanchez-Sandoval *et al.*, 2015). Fehlen die Proteine Mip1 oder Rpo41, so verlieren die Hefen ihre mitochondriale DNA (Genga *et al.*, 1986; Greenleaf *et al.*, 1986). Weitere Gene, die an der mitochondrialen Replikation oder Transkription beteiligt sind und deren Fehlen zum mtDNA-Verlust führt, sind die Helikasen Hmi1 und Pif1 sowie das DNA-Bindeprotein Rim1 (Lahaye *et al.*, 1991; Van Dyck *et al.*, 1992; Sedman *et al.*, 2000). Die DNA-Moleküle können linear, zirkulär oder *supercoiled* vorliegen (Chen und Butow, 2005). Es wird vermutet, dass sogenannte zirkuläre Konkatemere durch den *rolling-circle*-Mechanismus entstehen (Bendich, 1996; Preiser *et al.*, 1996). Ein Hinweis für einen mitochondrial-spezifischen Replikationsmechanismus ist die Tatsache, dass weder eine Topoisomerase, Ribonuklease H oder mitochondriale Primasen, welche für eine konventionelle Replikation benötigt werden, in Mitochondrien gefunden wurden (Chen und Clark-Walker, 2018). Es gibt mehrere Modelle, wie die *rolling-circle*-Replikation abläuft, wobei sowohl doppelsträngige als auch einzelsträngige DNA repliziert wird (Chen und Clark-Walker, 2018). Vermutlich ist das Nucleoid-Protein Mgm101 an der Rekrutierung des DNA-Bindeproteins Rim1 involviert (Mbantenkhu *et al.*, 2011). Mgm101 kann aber auch direkt mit Mip1 interagieren, denn auch die Replikation bei dem *rolling-circle*-Mechanismus läuft durch die DNA-Polymerase Mip1 ab (Meeusen und Nunnari, 2003). Außerdem können auch Rekombinationsereignisse bei der *rolling-circle*-Replikation beteiligt sein (Ling *et al.*, 2007). Wichtige Proteine für die homologe Rekombination sind hierbei die Proteine Cce1 und Mhr1 (Lockshon *et al.*, 1995; Ling und Shibata, 2002).

Die mitochondriale DNA liegt nicht offen vor, sondern ist in Proteinkomplexen verpackt. Diese DNA-Proteinkomplexe werden Nucleoide genannt, welche an der mitochondrialen

Innenmembran befestigt sind (Kucej *et al.*, 2008). Die Anzahl der mtDNA-Kopien, wie auch die Nucleoid-Menge, kann je nach Art und physiologischer Kondition der Zelle variieren. So liegen zum Beispiel in der Bäckerhefe ca. 50 mitochondriale Nucleoide vor (Piskur, 1994). Nicht nur die Menge kann variieren, auch verschiedene mtDNA-Subpopulationen können vorliegen. So definiert der heteroplasmische Zustand das gleichzeitige Vorkommen von wildtypischer und mutierter mtDNA. Eine Entmischung der mtDNA erfolgt nach 10-20 mitotischen Zellzyklen, sodass in den Mitochondrien nur noch eine Population vorzufinden ist (Ling und Shibata, 2004). Dieser Prozess wird als Homoplasmie bezeichnet (Birky, 1978). Das wichtigste Strukturprotein der Nucleoide ist Abf2 (Diffley und Stillman, 1988). Es enthält zwei tandem HMG-Boxen (*high mobility group*), welche eine unspezifische Bindung von Abf2 an die kleine Furche der mtDNA vermitteln (Visacka *et al.*, 2009). Außerdem liegt das Protein Abf2 in hoher Abundanz vor (Diffley und Stillman, 1991). Fehlt Abf2, verlieren die Zellen sehr schnell ihr mtGenom. Dieses kann jedoch erhalten bleiben, solange die Hefen unter Selektionsdruck auf Medium mit Glycerin kultiviert werden (Diffley und Stillman, 1991). Weiterhin sind die Aconitase Aco1 und Ilv5, welches ein Enzym der Aminosäuren-Biosynthese ist, wichtige Bestandteile der Nucleoide und tragen zur Stabilität der mtDNA bei (Zelenaya-Troitskaya *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2005).

Die Nucleoide müssen bei der Segregation der Mitochondrien so verteilt und positioniert werden, dass beide entstehenden Mitochondrien Nucleoide und somit mtDNA erhalten. Dabei spielt der ERMES-Komplex (*endoplasmatic reticulum mitochondria encounter structure*) eine wichtige Rolle. Der Komplex setzt sich aus den Untereinheiten Mmm1, Mdm10, Mdm12, Mdm34 und der GTPase Gem1 zusammen und ist unter anderem an dem Kontakt von ER und Mitochondrien beteiligt (Kornmann *et al.*, 2009; Kornmann *et al.*, 2011). Des Weiteren sind die Nucleoide an den Enden der Mitochondrien positioniert und haben einen gleichmäßigen Abstand von durchschnittlich 800 nm zueinander (Osman *et al.*, 2015). Somit wird gewährleistet, dass bei der mitochondrialen Teilung die DNA an beide Mitochondrien weitergegeben und schlussendlich an die Tochterzellen vererbt wird.

Ist die mitochondriale DNA durch Punktmutationen, Deletionen oder Duplikationen verändert, so kann dies dramatische Folgen für die Zelle oder den Organismus haben. So konnte im Menschen ein fehlerhaftes mitochondriales Genom mit verschiedenen Krankheiten assoziiert werden. Beispiele hierfür sind unter anderem das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) und

die Lebersche-Optikusatrophie (engl. *Leber Hereditary Optic Neuropathy*; LHON). KSS wurde erstmals 1958 von Thomas Kearns und George Sayre beschrieben und ist eine durch Deletionen in der mtDNA verursachte Krankheit. Die am häufigsten auftretenden Symptome sind Lähmung der äußeren Augenmuskulatur, herabhängende Augenlider, Erblindung und Herzrhythmusstörungen. Es können aber noch viele weitere Symptome ausgebildet sein (Kearns und Sayre, 1958). Im Gegensatz zu KSS entsteht LHON durch Punktmutationen im mitochondrialen Genom. Infolge der Degeneration der retinalen Ganglienzellen kommt es zu Sehschäden, die bis zur Erblindung führen können (Manickam *et al.*, 2017). Die mitochondrialen Krankheiten können verschiedene Ausprägungen aufweisen, da sich durch die zufällige Entmischung von wildtypischer und mutierter mtDNA in den Geweben oder Organen ein genetisches Mosaik bildet.

Da einige humane Krankheiten mit der mtDNA assoziiert sind, ist es sehr wichtig die genaue Funktionsweise der mtDNA, ihren Erhalt und auch deren Vererbung zu kennen. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist hierfür ein ausgezeichnete Modellorganismus, da sie ohne ein mtGenom auf fermentierbarem Medium wachsen und durch verschiedene Techniken, wie zum Beispiel mittels Cytofusion, sehr leicht manipuliert werden kann.

1.6. Cytofusion und *Synthetic Genetic Array*

Eine Methode, um frisches oder verändertes mitochondriales Genmaterial in die Mitochondrien einzubringen, ist die Cytofusion. Dabei wird sich der einfache Lebenszyklus von *S. cerevisiae* zu Nutzen gemacht. Hefen können haploid, das heißt mit nur einem Paarungstyp (*MATa* oder *MAT α*), vorliegen. Sind sie diploid, dann weisen sie beide Paarungstypen auf. Eine haploide Zelle kann sich asexuell durch Knospung vermehren, wodurch zwei haploide Zellen mit demselben Paarungstyp entstehen. Hefen können sich auch sexuell vermehren. Dafür müssen zwei haploide Zellen jeweils einen unterschiedlichen Paarungstyp aufweisen. Ist dies der Fall, dann können sie sich paaren und miteinander verschmelzen. Dadurch entsteht eine diploide Zelle (*MATa/MAT α*). Diese kann nun Knospen bilden, welche auch diploid sind. Oder sie kann vor allem bei schlechten Bedingungen Tetraden ausbilden, welche vier haploide Sporen (zwei *MATa* und zwei *MAT α*) enthalten. Diese haploiden Zellen können sich nun wieder durch Paarung mit unterschiedlichem Paarungstyp oder durch Knospung vermehren (siehe Abb. 1).

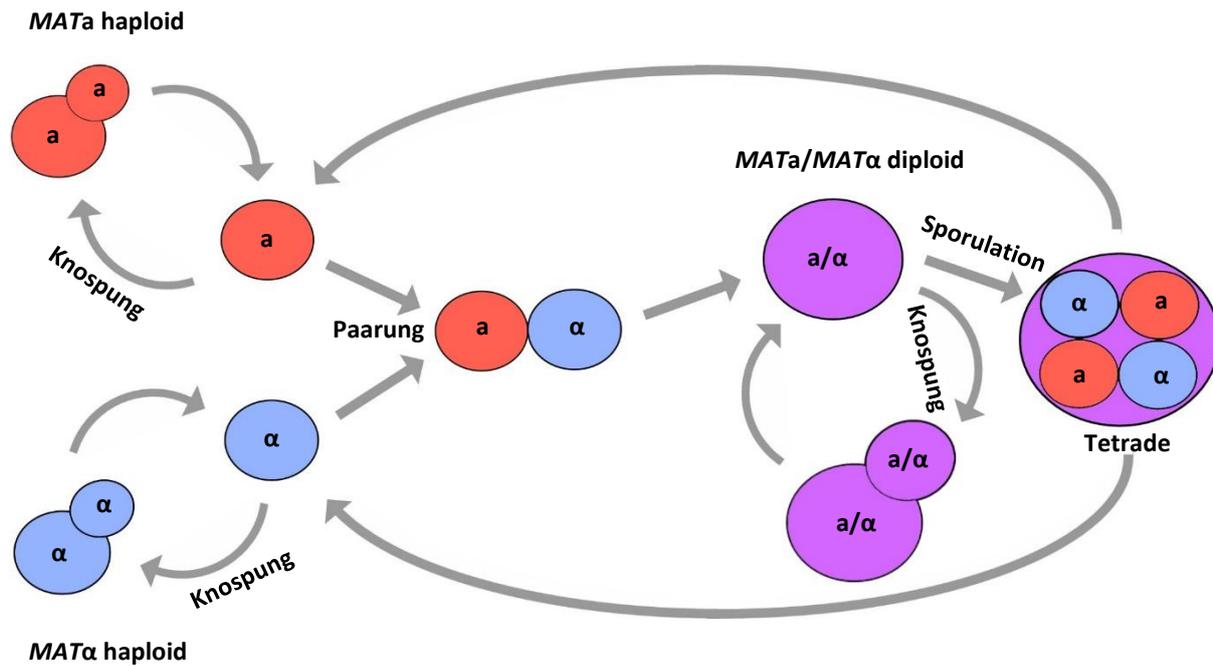


Abbildung 1: Schematischer Lebenszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*. Eine haploide Zelle (a oder α) kann sich asexuell durch Knospung oder durch Paarung mit einer weiteren haploiden Zelle des anderen Paarungstyps vermehren. Dadurch entstehen diploide Zellen (a/α), welche sich durch Knospung vermehren können. Alternativ bilden sie durch Sporulation eine Tetrade mit vier haploiden Sporen (je zweimal a und zweimal α).

Um mtDNA in eine Zelle einzubringen, wird eine Cytoduktion durchgeführt. Dafür wird ein sogenannter Donorstamm benötigt. Dieser enthält die einzubringende mitochondriale DNA und das wildtypische *URA3* Gen, welches im Kern kodiert ist (Lettier *et al.*, 2006). Ferner weist der Stamm einen Kernfusionsdefekt (*kar1Δ15*) auf (Lettier *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Mutation können die Zellkerne nicht miteinander verschmelzen. Zellen, in welche die neue DNA eingebracht werden soll, werden Rezipienten oder Empfängerstamm genannt. Diese müssen *rho⁰* sein und den Selektionsmarker *Δura3* aufweisen. Diesen Stämmen ist es nicht möglich auf Medium ohne Uracil zu wachsen. Werden der Donorstamm und die Rezipienten gepaart, entsteht ein Heterokaryon. Während sich das Cytoplasma vermischt und die Rezipienten nach der Mitochondrienfusion mtDNA erhalten, können die beiden Kerne wegen des Karyogamie-Defekts nicht fusionieren. Nach mehreren Zellteilungen verlieren einige Zellen zufällig einen der Kerne. Anschließend wird das Zellmaterial auf Medium mit 5'-FOA (5-fluoroorotic acid) übertragen. Die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase (ODCase), welche durch *URA3* kodiert wird, setzt 5'-FOA zu dem giftigen 5'-FU (5-fluorouracil) um (Boeke *et al.*, 1984). Dadurch ist gewährleistet, dass nur Zellen überleben, welche ausschließlich *Δura3*, aber nicht *URA3* enthalten und nur der gewünschte Kernhintergrund des Rezipienten erhalten

wird. Diese Zellen werden dann Cytoduktanten genannt (siehe Abb. 2) (Zakharov und Yaravoy, 1977; Spencer und Spencer, 1996).

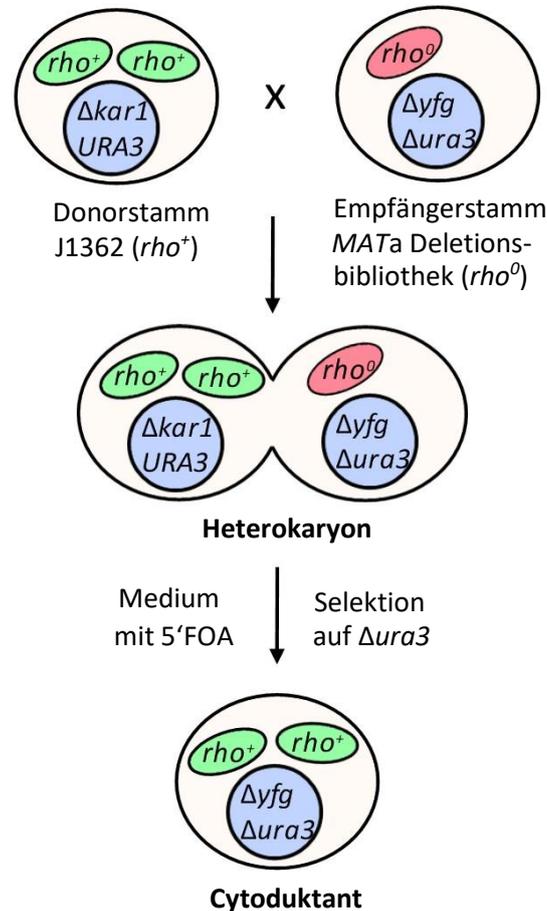


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Cytoduktion mit dem Donorstamm J1362 (ρ^+) in die MATa Deletionsbibliothek (ρ^0). Der Donorstamm und der Empfängerstamm werden gepaart, wodurch ein Heterokaryon mit zwei Kernen entsteht. Das Cytoplasma der beiden Partner vermischt sich. Nach Selektion mit dem Medium 5'FOA bleiben die Cytoduktanten mit dem gewünschten Kerngenom und der ρ^+ mtDNA übrig. 5'-FOA: 5-fluoroorotic acid; *yfg*: your favorite gene. Für weitere Details siehe Text.

Eine Methode, welche in Hefe häufig für Untersuchungen funktioneller Genetik verwendet wird, ist die SGA (*synthetic genetic array*) (Tong und Boone, 2006). Dabei wird in eine Bibliothek bestehend aus Deletionsstämmen eine zusätzliche Mutation eingebracht, sodass Doppelmutanten entstehen. Dazu muss die einzubringende Deletion in einen sogenannten Starterstamm, welcher einen Nourseothricin- (NTC) und mehrere Haploidenmarker aufweist, eingebracht werden. Als erstes wird die Bibliothek, bei welcher die Deletionen an einen Kanamycinmarker gekoppelt sind, mit dem Starterstamm gepaart. Anschließend wird auf Diploide selektiert. Danach werden die Diploiden auf Sporulationsmedium transferiert. Nach

der Sporulation, bei welcher aus einer diploiden Zelle vier haploide Sporen entstehen, wird zunächst auf Haploide selektiert, indem auf Medium mit 5'-FOA und Thialysin gestempelt wird. Nach Zugabe dieser Chemikalien können nur haploide Zellen mit einem bestimmten Resistenzmarker überleben. Diploide Zellen hingegen weisen das wildtypische Marker-Allel auf. Dadurch können die Chemikalien in die Zelle gelangen und diese abtöten. Im nächsten Schritt erfolgt die Selektion auf die anfängliche Mutation der Bibliothek, indem dem Medium zusätzlich noch Geneticin (G418) hinzugefügt wurde. Die Gene in der Deletionsbibliothek sind nämlich so konstruiert, dass das ursprüngliche Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt worden ist, welche Resistenz gegenüber G418 verleiht (Winzeler *et al.*, 1999). Zum Schluss werden die Hefen auf Medium mit 5'-FOA, Thialysin, G418 und NTC transferiert. Durch die Selektion mit mehreren Antibiotika bleiben nur noch Zellen übrig, welche haploid sind und die ursprüngliche Mutation sowie die neu eingebrachte Mutation aufweisen. Mit dieser Methode kann zum Beispiel das Gen *ARG8* im Kern deletiert werden, sodass eine Doppelmutation $\Delta arg8\Delta yfg$ (*your favorite gene*, steht für eins der 4.800 Deletionsgene) entsteht (siehe Abb. 3) (Baryshnikova *et al.*, 2010).

Die SGA stellt eine schnelle und praktikable Methode dar, um Doppelmutanten mit einer kompletten Bibliothek herzustellen. Auch die Cytoduktion von mtDNA in die Mitochondrien ist schnell realisierbar und zuverlässig. Mit diesen Werkzeugen können diverse Screens geplant und realisiert werden. Um diese genomweiten Screens auf dem schnellsten Weg und zuverlässig durchzuführen, wurde der Roboter RoToR HDA (Singer, UK) genutzt. Mit diesem Roboter kann die *MATa* Deletionsbibliothek sehr schnell und präzise auf die nächsten Selektionsplatten prozessiert werden.

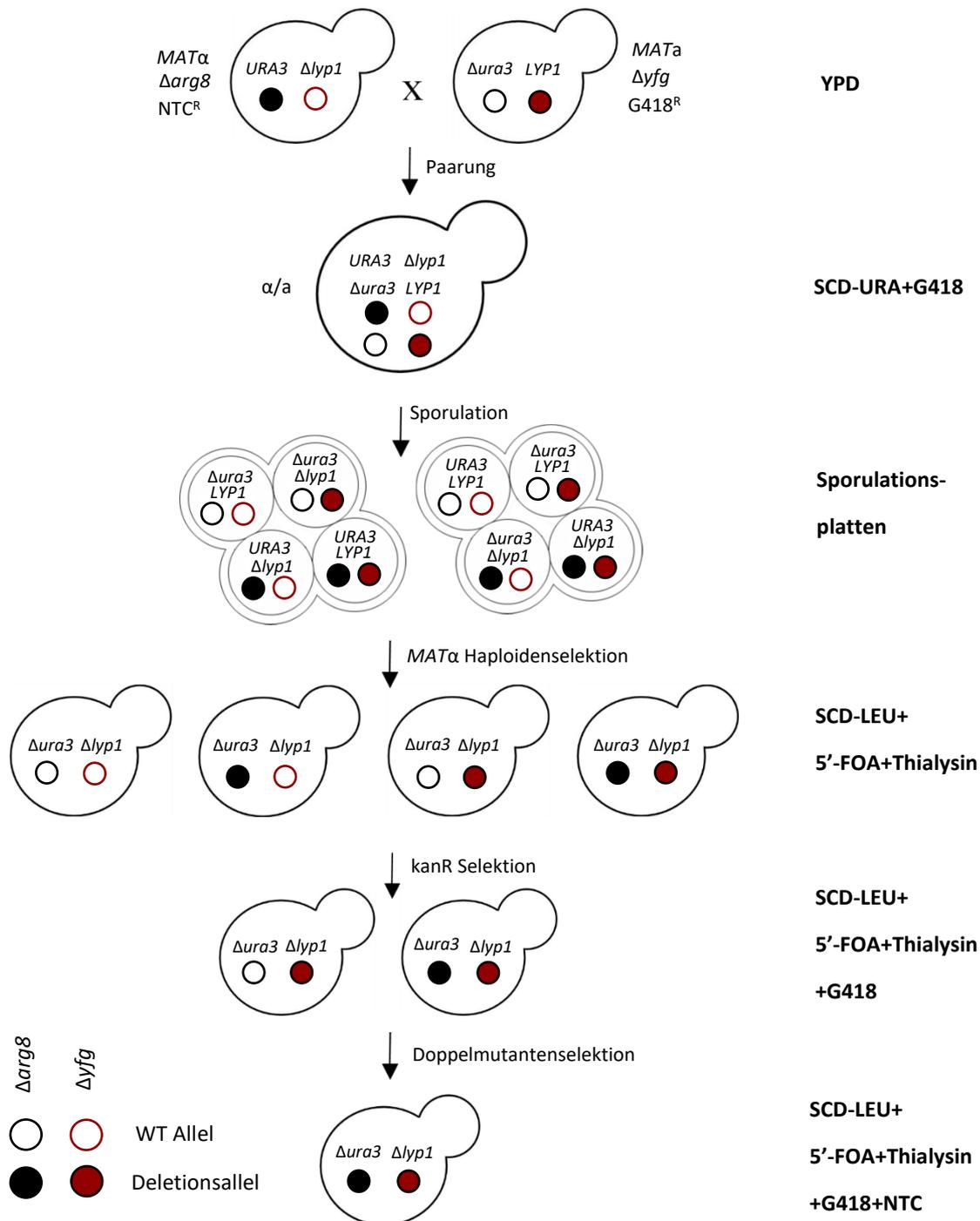


Abbildung 3: Schematische Darstellung der SGA mit dem Starterstamm $\Delta arg8$ und der MAT α Bibliothek. Der Starter- und der Empfängerstamm werden auf YPD gepaart. Auf SD-URA+G418 findet eine Diploidenselektion statt. Anschließend erfolgt die Sporulation. Nach der Sporulation werden nacheinander die Selektionen auf Haploide, auf die Deletionsmutanten der Deletionsbibliothek und Doppelmutanten durchgeführt. Dazu werden die Hefen jeweils auf SD-LEU+5'-FOA+Thialysin prozessiert, wobei beim zweiten Schritt zusätzlich G418 und im dritten Schritt zusätzlich G418 und NTC im Medium sind. Durch den letzten Schritt bleiben nur Doppelmutanten übrig. G418: Geneticin; 5'-FOA: 5-fluoroorotic acid; NTC: Nourseothricin; *yfg*: your favorite gene; *ura3*: Marker für 5'-FOA; *lyp1*: Marker für Thialysin; Schwarze Kreise symbolisieren $\Delta arg8$, rote Kreise Δyfg , sind sie ausgefüllt, dann ist die jeweilige Deletion vorhanden, sind die Kreise nicht ausgefüllt, dann liegt das Wildtypallel vor. Für weitere Details siehe Text. Entnommen aus Baryshnikova *et al.*, (2010), leicht modifiziert.

1.7. Zielsetzung

Es sind noch viele Proteine, welche an der Vererbung und Aufrechterhaltung des mitochondrialen Genoms beteiligt sind unbekannt. Daher war das Ziel dieser Arbeit, Screens durchzuführen, um weitere Proteine zu finden, welche in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in diesem Prozess involviert sind. Um dieses Ziel zu erreichen, sollte die *MATa* Deletionsbibliothek verwendet werden, welche ca. 4.800 nicht essentielle Deletionsstämme beinhaltet (Winzeler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002).

Als Ausgangspunkt für drei weitere Screens erfolgte zunächst die Behandlung der Deletionsstämme mit Ethidiumbromid. Dadurch wurde der Verlust der mtDNA forciert. Anschließend erfolgte das Einbringen frischer *rho*⁺ mtDNA in die Mutanten via Cyto duktion, um Deletionsstämme zu finden, welche nicht cytoduzierbar sind und somit an der mitochondrialen Replikation, Transkription oder Translation beteiligt sein könnten. Des Weiteren sollte mit dieser *rho*⁺ Bibliothek der mtDNA-Verlust über die Zeit beobachtet und der Einfluss von oxidativem Stress auf den Erhalt des mtGenoms untersucht werden. Des Weiteren erfolgte die Identifikation der Mutationsstämme, deren *rho*⁺ mtDNA sich gegenüber der HS mtDNA durchgesetzt hat, nachdem in die *rho*⁺ Deletionsbibliothek *via* Cyto duktion hypersuppressive mitochondriale DNA eingeführt worden ist. In einem weiteren Screen sollte in die *MATa* Deletionsbibliothek zuerst mittels SGA die $\Delta arg8$ Mutation eingeführt werden. Danach sollte auch diese Kollektion *rho*⁰ gemacht werden und über Cyto duktion die *ARG8^m* mtDNA eingebracht werden, um den mtDNA-Verlust unabhängig von der Atmung feststellen zu können. Des Weiteren sollte die *MATa* Deletionsbibliothek aus dem Glycerinstock auf YPG gestempelt werden, um festzustellen, welche Stämme in dieser verwendeten Bibliothek *pet* sind und damit diese mit den Ergebnissen der anderen Screens verglichen werden können.

Um diese Screens zu etablieren, mussten zuerst die Cyto duktionsdonorstämme J1361/*ARG8^m* und J1362/HSS34/pRS415 sowie der SGA Starterstamm Y8205 $\Delta arg8$ *URA3* hergestellt werden. Nach erfolgreichen Vorversuchen sollten die Screens durchgeführt und wiederholt werden. Interessante Treffer sollten per Hand bestätigt und weiter untersucht werden.

So wurde zum Beispiel die Mutante $\Delta mgr2$ weiter charakterisiert. Dazu zählt eine fluoreszenzmikroskopische Analyse von mit GFP markiertem Mgr2, um zu untersuchen, wie Mgr2 in den Mitochondrien verteilt ist. Des Weiteren sollte die $\Delta mgr2$ Ultrastruktur im Elektronenmikroskop (EM) analysiert werden, um herauszufinden, ob Mgr2 eine Rolle bei dem

Aufbau der Cristae-Struktur spielt. Außerdem sollte in der Literatur Informationen für die weiteren interessanten Treffer zusammengetragen werden, um so Hinweise auf deren Funktion beim mtDNA-Erhalt zu erlangen und weitere Experimente durchzuführen.

2. Material und Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. Plasmide

Alle verwendeten Plasmide wurden mit Hilfe der LiAc/PEG-Transformation in Hefe transformiert (siehe Tab. 1; 2.2.3; Gietz, 2014). Die in dieser Arbeit selbst generierten Plasmide wurden dabei über Gateway kloniert (siehe 2.1.2.).

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Merkmale	Referenz
MitoLoc	Amp; natNT2	Vowinckel <i>et al.</i> , 2015
pAG413GPD-eGFP-ccdB	<i>CEN; HIS3</i>	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG413GPD-eGFP-MGR2	<i>CEN; HIS3</i>	diese Arbeit
pDONR221	<i>Gateway cloning vector</i>	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pENTR221-MGR2	Kan	diese Arbeit
pRS415	<i>CEN; LEU2</i>	Sikorski und Hieter, 1989
pRS415-Ste2_{pr}-NAT^R-Mfa1_{pr}-sp_his5	<i>CEN; LEU2</i>	N. Hock, Zellbiologie, Bayreuth
pRS416	<i>CEN; URA3</i>	Sikorski und Hieter, 1989
pVT100U-mtRFP	<i>2μ; URA3</i>	Y. Brede, Zellbiologie, Bayreuth
pYM-N7	<i>natNT2</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004

2.1.2. Klonierung von MGR2-eGFP über Gateway

Das Plasmid pAG413-eGFP-MGR2 wurde mit Hilfe der Gateway-Klonierung hergestellt. Dazu wurde zuerst über PCR ein Fragment mit dem Gen *MGR2* und flankierenden attB- und attP-Sequenzen amplifiziert. Dann erfolgte die BP-Reaktion des pDONR221 mit dem erhaltenen *MGR2*-PCR-Produkt. Dazu wurde 25 fmol des PCR-Produkts und 0,5 μl pDONR221 (150 ng/μl) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und auf 4 μl mit TE-Puffer (pH 8,0) aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 μl Gateway BP Clonase II Enzym Mix (2 μg/μl) und Inkubation des Ansatzes über Nacht bei 25°C. Danach wurde die Reaktion mit der Zugabe von 0,5 μl Proteinase K (2 μg/μl) und 10-minütiger Inkubation bei 37°C gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz in kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Dazu wurden 2 μl des BP-Ansatzes in ein Reaktionsgefäß mit auf Eis aufgetauten TOP10 Zellen pipettiert, 30 min auf Eis inkubiert und dann ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden durchgeführt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 2 min auf Eis inkubiert und 250 μl SOC-Medium dazugegeben. Der Transformationsansatz wurde für 1 h bei 37°C (300 rpm) geschüttelt und danach 30 μl

bzw. 270 μl auf LB+Kan-Platten ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Kolonien, die auf den LB+Kan-Platten wuchsen, wurden mit geeigneten Primern via PCR auf das Vorhandensein des Plasmids pENTR221-MGR2 überprüft. Die Plasmide von passenden *E. coli* Kolonien wurden über Midi-Präparation isoliert und zum Sequenzieren (Macrogen, Amsterdam, Niederlande) geschickt.

Der so erhaltene *Entry clone* pENTR221-MGR2 wurde für die LR-Reaktion mit dem Destinationsvektor pAG413GPD-eGFP-ccdB verwendet. Dazu wurden 0,5 μl pENTR221-MGR2 (150 ng/ μl), 0,5 μl pAG413GPD-eGFP-ccdB (150 ng/ μl), 3 μl TE-Puffer und 1 μl Gateway LR Clonase Enzym Mix (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und über Nacht bei 25°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Reaktion gestoppt, indem 0,5 μl Proteinase K (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dazu pipettiert wurde und 10 min bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurden von dem Reaktionsansatz 2 μl in TOP10 *E. coli* Zellen transformiert mit dem Unterschied, dass diesmal auf LB+Amp-Platten ausplattiert wurde (siehe oben). Die Kolonien der LB+Amp-Platte wurden mittels PCR und Sequenzierung verifiziert. Somit konnte das Plasmid pAG413GPD-eGFP-MGR2 hergestellt werden.

2.1.3. Primer

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms ApE (*A plasmid Editor*, M. Wayne Davis) designt und bei metabion (metabion international AG, Planegg, Deutschland) oder Microsynth (Microsynth, Balgach, Schweiz) bestellt (siehe Tab. 2). Die Primer wurden in lyophilisierter Form verschickt und vor dem Gebrauch in geeignetem Volumen ddH₂O gelöst.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Name	Sequenz (5'-3')
ARG8 natMX4 fwd	GTGACTGCGAACATTTTTTCGTTTGTAGAATAATTCAAGAATCGCTACCAATC GTACGCTGCAGGTCGACG
ARG8 natMX4 rev	ATATAAAGATGAAAAAAAAAAAAACAATCTATACATGACAATTTACAAAGTATA TGAGCTCGATTACAACAGGTGTTGTCC
LYP1 natMX4 fwd	AAAGAAATTGCATTGTCTATAACGATAACAAAAGACATCGTATATATATATATA TGTACGCTGCAGGTCGACG
LYP1 natMX4 rev	ATGAAACGTCTATTTTTTATTTTTTCTATTTTGAAGGCATGCAAGAGGT TCTG GAGCTCGATTACAACAGGTGTTGTCC
Mat 1	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG
Mat 2	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
Mat 3	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG
MGR2 hom fwd	ACAAGATCATATAGCACAAATAGCGCAACAGCTTCAAGTCCAATATTAAGATAT AGTACGCTGCAGGTCGACG
MGR2 hom rev	GTAACAATGTTTAAGAAAACGATGGGGAAGCGTAAATATATGCAAATTTCCCC CGAGCTCGATTACAACAGGTGTTGTCC
WT URA3+ fwd	TTGATAAGAAGAGTATTGAGAAGGGCAACG
WT URA3+ rev	TATATATACGCCAGTACACCTTATCGGCC

2.2. Hefegenetische Methoden

2.2.1. Hefestämme

Die Konstruktion des *ARG8* Starterstammes für die SGA konnte nicht über die etablierte Methode erfolgen. Ein Einsatz des Antibiotikums Canavanin (Arginin-Homolog) für die Haploidenselektion war nicht möglich, da der Stamm selbst nicht die Aminosäure Arginin synthetisieren konnte. Aus diesem Grund wurde der Stamm Y8205 verwendet. Bei diesem ist die $\Delta lyp1$ Deletion an den *MATa* spezifischen *STE3* Promotor gekoppelt (Tong und Boone, 2007). Somit konnte Thialysin für die Haploidenselektion eingesetzt werden. Der $\Delta can1::STE2$ Promotor, welcher ebenfalls in Y8205 aufzufinden ist, wurde durch Paarung mit dem WT BY4741/pRS416 eliminiert. Das Plasmid pRS416, welches einen *URA3* Marker aufweist, wurde zuvor in den WT transformiert, um einen weiteren Marker für die Diploidenselektion (SD-MET-URA) zu erhalten (siehe 2.2.4.). Nach zweimaliger Diploidenselektion wurde der Ansatz auf eine Sporulationsplatte übertragen. Nach zweiwöchiger Inkubation bei 22°C wurden die Tetraden am Mikromanipulator (Singer MSM Serie 300 acer n30 Bedienungs-PC; Singer Instruments, Roadwater, UK) auf YPD dissektiert (siehe 2.2.5.). Die aus den Sporen entstandenen Zellen wurden auf SD+Thia+HIS+URA+MET, SD+HIS+URA+MET+Can und SD-MET+HIS+URA überstrichen. Kolonien, welche nur auf Medium mit Thialysin, aber nicht auf Canavanin und ohne Methionin wachsen konnten, wurden mittels *Mating Type* PCR (Primer

Mat 1, Mat 2 und Mat 3) auf ihren Paarungstyp überprüft. Um als Starterstamm geeignet zu sein, muss der Stamm *MAT α* sein und wurde „Ausgangsstamm Y8205“ genannt. Als nächstes erfolgte die Deletion des *ARG8* Gens durch Einbringen einer Nourseothricin (NTC) Resistenzkassette ($\Delta arg8::natNT2$). Dazu wurde mittels PCR mit den Primern „*ARG8 natMX4 fwd*“ und „*ARG8 natMX4 rev*“ das NTC-Gen flankiert von *ARG8* Sequenzen anhand pYM-N7 als *template* amplifiziert und über homologe Rekombination in den Ausgangsstamm Y8205 transformiert. Des Weiteren wurde das wildtypische *URA3* Gen eingebracht, damit 5'-FOA als weiteres Mittel für die Haploidenselektion genutzt werden konnte. Dazu wurden Primer vor und nach dem *URA3* Gen designt, um das Gen zu amplifizieren (*WT URA3+ fwd*; *WT URA3+ rev*). Aus dem WT-Stamm D273-10B, welcher das *URA3* Gen aufweist, wurde die genomische DNA isoliert und als *template* für die PCR genutzt. Das Amplifikat wurde ebenfalls über homologe Rekombination an den ursprünglichen *URA3* Locus in den Ausgangsstamm Y8205, welcher bereits $\Delta arg8$ und $\Delta ura3$ ist, eingebracht. Somit wurde das deletierte *URA3* Gen wiederhergestellt und der Starterstamm $\Delta arg8$ war hergestellt und konnte für die SGA mit der *MAT α* Deletionsbibliothek genutzt werden.

Als nächstes wurde der Donorstamm J1361/*ARG8^m* (*rho⁺*) für die Cytoduktion konstruiert. Der Ausgangsstamm JC8 ist *rho⁺* und enthält *ARG8* kodierende mtDNA (Steele *et al.*, 1996). Dieser Stamm ist jedoch *MAT α* . Damit JC8 mit J1361 gepaart werden konnte, um die *ARG8^m* mtDNA von JC8 in den Donorstamm J1361 transferieren zu können, musste zuvor der Paarungstyp von JC8 zu *MAT α* gewechselt werden (Lettier *et al.*, 2006). Dies geschah, indem JC8 mit dem WT BY4742/pRS415 (*rho⁰*), welcher zuvor durch Ethidiumbromid-Behandlung von der mtDNA befreit worden ist (siehe 2.2.6.) und *MAT α* ist, gepaart wurde. Nach der Sporulation wurden Tetraden dissektiert und die aus den Sporen entstandenen Kolonien auf YPG überstrichen. Zellen, welche noch die mtDNA besitzen, wurden mittels *Mating Type* PCR auf ihren Paarungstyp getestet. Der erhaltene BY4742/pRS415/*ARG8^m* (*MAT α*) Stamm wurde anschließend mit J1361 *rho⁰* (*MAT α*) in flüssigem YPD gepaart und auf YPG+Can ausplattiert, da J1361 eine Canavanin-Resistenz aufweist und mtDNA erhalten soll. Die daraus resultierenden Kolonien wurden auf ihren Paarungstyp untersucht. Der endgültige Donorstamm J1361/*ARG8^m* weist den benötigten Paarungstyp *MAT α* auf, weil die Empfängerstämme nach der SGA *MAT α* sind, und besitzt die *ARG8^m* mtDNA.

Des Weiteren musste der Donorstamm für den Screen nach Mutanten, welche die hypersuppressive mtDNA tolerieren, generiert werden. Dieser sollte *MAT α* sein. Daher wurde der Stamm BS127/HS3324 (*MAT α*), welcher die hypersuppressive mitochondriale DNA enthält und einen *ADE2* Marker besitzt, mit dem Donorstamm J1362 *rho*⁺ in flüssigem YPD gepaart (Lorimer *et al.*, 1995). Der Ansatz wurde auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert und die gewachsenen Kolonien auf YPD und YPG überstrichen. In den Stämmen, welche nicht mehr auf YPG wachsen konnten, musste sich die HS mtDNA (*rho*⁻) durchgesetzt haben. Diese wurden auf ihren Ploidiegrad mittels *Mating Type* PCR überprüft. Die Stämme, welche nur *MAT α* waren, wurden mit DAPI gefärbt, um deren mtDNA zu visualisieren (siehe 2.3.3.). Einer der untersuchten Stämme wies die HS mtDNA auf und war *MAT α* . Da für die Cytoduktion des HS Genoms in Zellen mit wildtypischer mtDNA ein weiterer Marker (*LEU2*) erforderlich war, wurde der Stamm J1362/HS3324 mit dem Plasmid *pRS415-Ste2_{pr}-NAT^R-Mfa1_{pr}-sp_{his5}*, welches den *LEU* Marker besitzt und von Nadine Hock zur Verfügung gestellt worden ist, transformiert (Nadine Hock, Zellbiologie, Uni Bayreuth). Somit entstand der Donorstamm J1362/HS3324/*pRS415-Ste2_{pr}-NAT^R-Mfa1_{pr}-sp_{his5}*, welcher ab sofort zur Vereinfachung J1362/HS3324 genannt wird.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Hefestämme. In mit einem Stern markierten Stämmen wurde das Plasmid pVT100U-mtRFP transformiert, um die Mitochondrien im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen zu können (siehe Tab. 1). Eine Liste der untersuchten *MAT α* Deletionsbibliothek befindet sich im Anhang (siehe Tab. 13).

Isogen	Name	Genotyp	Referenz
BY4741	WT	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4742	WT	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
D273-10B	WT	<i>MATα mal Δmet</i>	Sherman, 1963
BY4741	WT <i>rho</i> ⁰	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rho⁰</i>	diese Arbeit
BY4742	WT <i>rho</i> ⁰	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 rho⁰</i>	diese Arbeit
BY4741	WT/pRS416	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 URA3+</i>	diese Arbeit
BY4742	WT/pRS415 <i>rho</i> ⁰	<i>MATα his3Δ1 LEU2+ lys2Δ0 ura3Δ0 rho⁰</i>	diese Arbeit
	J1361	<i>MATα CEN1-16:pGal-K-lactis-URA3 kar1Δ15 MET15 lys2Δ ADE2 rad5-535 rho⁺ leu2-3.112 can1-100 his3-11,15 trp1-1</i>	Lettier <i>et al.</i> , 2006
	J1362	<i>MATα CEN1-16:pGal-K-lactis-URA3 kar1Δ15 MET15 lys2Δ ADE2 rad5-535 rho⁺ leu2-3.112 can1-100 his3-11,15 trp1-1</i>	Lettier <i>et al.</i> , 2006

Isogen	Name	Genotyp	Referenz
	J1361 ρ^0	<i>MATα CEN1-16:pGal-K-lactis-URA3 kar1Δ15 MET15 lys2Δ ADE2 rad5-535 ρ^0 leu2-3.112 can1-100 his3-11,15 trp1-1</i>	diese Arbeit
	J1362 ρ^0	<i>MATα CEN1-16:pGal-K-lactis-URA3 kar1Δ15 MET15 lys2Δ ADE2 rad5-535 ρ^0 leu2-3.112 can1-100 his3-11,15 trp1-1</i>	diese Arbeit
JC8	JC8/ARG8 ^m	<i>MATα kar1-1 leu1 ARG8^m ρ^+</i>	Steele et al., 1996
BY	WT/pRS415 + JC8	<i>MATα his3Δ1 LEU2+ lys2Δ0 ura3Δ0 ARG8^m</i>	diese Arbeit
BY	WT/pRS415 + JC8 + J1361 ρ^0	<i>MATα his3Δ1 LEU2+ lys2Δ0 ura3Δ0 + MATα CEN1-16:pGal-K-lactis-URA3 kar1Δ15 MET15 lys2Δ ADE2 rad5-535 leu2-3.112 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ARG8^m</i>	diese Arbeit
	J1361/ARG8 ^m	<i>MATα CEN1-16:pGal-K-lactis-URA3 kar1Δ15 MET15 lys2Δ ADE2 rad5-535 leu2-3.112 can1-100 his3-11,15 trp1-1 ARG8^m</i>	diese Arbeit
BY	Y8205	<i>MATα can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>	Tong und Boone, 2007
BY	Ausgangsstamm Y8205	<i>MATα CAN1 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i>	diese Arbeit
BY	Y8205 Δ arg8	<i>MATα CAN1 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 Δarg8::natNT2</i>	diese Arbeit
BY	Starterstamm Y8205 Δ arg8 URA3	<i>MATα CAN1 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 URA3 met15Δ0 Δarg8::natNT2</i>	diese Arbeit
BS127	BS127/HS3324	<i>MATα ade1 ade2 leu2 trp1 ura3 cyh^f can^f sap^f sup^f gal^f</i>	Lorimer et al., 1995
	HS3324xJ1362 ρ^0	<i>MATα CEN1-16:pGal-K-lactis-URA3 kar1Δ15 MET15 lys2Δ ADE2 rad5-535 ρ^0 leu2-3.112 can1-100 his3-11,15 trp1-1 + MATα ade1 ade2 leu2 trp1 ura3 cyh^f can^f sap^f sup^f gal^f HS</i>	diese Arbeit
	J1362/HS3324/pRS415-Ste2Pr-NATR-Mfa1Pr-sp_his5	<i>MATα CEN1-16:pGal-K-lactis-URA3 kar1Δ15 MET15 lys2Δ ADE2 rad5-535 leu2-3.112 can1-100 his3-11,15 trp1-1 HS pRS415-Ste2Pr-NATR-Mfa1Pr-sp_his5</i>	diese Arbeit
BY4741	Δ yfg	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δyfg</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	Δ yfg ρ^0	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δyfg ρ^0</i>	diese Arbeit
BY4741	Δ yfg ρ^+ (J1362)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δyfg ρ^+</i>	diese Arbeit
BY	Δ yfg Δ arg8	<i>MATα his3Δ1 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δyfg Δarg8::natNT2</i>	diese Arbeit
BY	Δ yfg Δ arg8 ρ^0	<i>MATα his3Δ1 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δyfg Δarg8::natNT2 ρ^0</i>	diese Arbeit
BY	Δ yfg Δ arg8 ARG8 ^m	<i>MATα his3Δ1 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δyfg Δarg8::natNT2 ρ^+ ARG8^m</i>	diese Arbeit
BY4741	Δ yfg ρ^+ J1362/HS3324	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δyfg ρ^+ HS</i>	diese Arbeit
BY4741	Δ yfg ρ^- HS3324	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δyfg HS</i>	diese Arbeit

Isogen	Name	Genotyp	Referenz
BY4741	$\Delta emi1^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta emi1$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta mgr2^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta mgr2$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta pet130^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta pet130$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta rrg1^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta rrg1$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta rrg7^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta rrg7$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta rrg8^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta rrg8$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta rrg9^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta rrg9$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta sov1^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta sov1$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta ybr056w-a^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta ybr056w-a$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta ybr062c^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta ybr062c$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta ygl118c^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta ygl118c$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta yjr120w^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta yjr120w$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta yjr098c^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta yjr098c$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta ykl063c^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta ykl063c$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta ykr023w^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta ykr023w$</i>	Giaever et al., 2002
BY4741	$\Delta ynl184c^*$	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 $\Delta ynl184c$</i>	Giaever et al., 2002

2.2.2. Medien und Kultivierung

Zur Anzucht wurden die Hefen wie in Sherman (2002) beschrieben in Vollmedium wie YPD (1% [w/v] Hefeextrakt; 2% [w/v] Pepton; 2% Glukose), YPG (1% [w/v] Difco; 2% [w/v] Pepton; 3% Glycerin) oder YPGal (wie YPD mit 2% Galaktose) kultiviert. Des Weiteren wurden die Stämme in dem Selektivmedium (SM; 0,67% Yeast Nitrogen Base (YNB) mit Ammoniumsulfat ohne Aminosäuren; entsprechender Kohlenstoffquelle) oder Komplett Selektivmedium (SCD, wie SM mit 2% Glukose; 2% synthetischer Komplett-Mix bestehend aus: Adenin Sulfat [20 mg/l], L-Tryptophan [20 mg/l], L-Arginin-HCl [20 mg/l], L-Tyrosin [30 mg/l] L-Isoleucin [30 mg/l], L-Phenylalanin [50 mg/l], L-Glutaminsäure [100 mg/l], L-Valin [150 mg/l], L-Serin [400 mg/l], L-Asparaginsäure [100 mg/l] und L-Threonin [200 mg/l]) mit den entsprechenden

Supplementen angezogen. Die Zusammensetzung der dazugehörigen Platten ist die gleiche wie in den jeweiligen Flüssigmedien mit dem Zusatz von 2% (w/v) Agar. Für die Sporulation wurden Sporulationsplatten (1% [w/v] Kaliumacetat; 0,005% [w/v] Zinkacetat; supplementiert mit einem Viertel der benötigten Aminosäuren bzw. Nukleinbasen) hergestellt. Zur Sporulation bei der SGA wurde zusätzlich Glukose als Kohlenstoffquelle und Hefeextrakt dazugegeben (siehe Sporulationsplatten, mit zusätzlich 0,1% Hefeextrakt; 0,05% Glukose). Zur Eliminierung der mtDNA wurden YPD+EtBr-Platten verwendet (1% [w/v] Hefeextrakt; 0,5% [w/v] Pepton; 2% Agar; 2% Glukose; 50 µg/ml EtBr). Bei Flüssigmedium wurde EtBr (50 µg/ml) zu YPD gegeben. Für den Menadion-Screen wurde in die YPD-Platten zusätzlich Menadion (0,3 mM) beigefügt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das gelöste Menadion aus einem zuvor hergestellten Stock kommt und bei der gleichen Temperatur des YPD-Mediums hinzupipettiert wurde. Für den Erythromycin-Versuch, der als Nachweis für mtDNA-Reparatur gilt, wurde Erythromycin (2 mg/ml) zu den YPG-Platten gegeben. Zur Selektion gegen *URA3* wurden 5'-FOA-Platten (0,67% *Yeast Nitrogen Base* (YNB) mit Ammoniumsulfat ohne Aminosäuren; 2% Agar; 2% Glukose oder Galaktose; wenn benötigt 2% synthetischer Komplett-Mix; supplementiert mit den benötigten Aminosäuren bzw. Nukleinbasen, Uracil [50 mg/l]; 5'-FOA [1 g/l]) verwendet.

Wenn nicht anders angegeben, wurden Kulturen auf festem Medium bei 30°C im Inkubationsschrank und Flüssigkulturen im 30°C Schüttler bei 150 rpm inkubiert. Bei mehreren Versuchen wurden die Stämme in *deep well* Platten bei 30°C und 280 rpm angezogen. Die Lagerung der Platten erfolgte für mehrere Wochen bei 4°C. Für eine längere Lagerung wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurde in jedes *well* von Mikrotiterplatten 200 µl 15%-iges Glycerin vorgelegt und Hefematerial eingerührt. Alternativ erfolgte die Lagerung in Einzelstocks im Schraubröhrchen. Auch hier wurden die Hefezellen in 15%-igem Glycerin resuspendiert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten bzw. Röhrchen bei -80°C gelagert.

2.2.3. LiAc/PEG-Transformation der Hefezellen

Die Stämme wurden in 1 ml YPD über Nacht angeimpft, am nächsten Tag 1:10 mit YPD verdünnt und für 3-4 h weiter inkubiert. Von den logarithmischen Kulturen wurde 1 ml entnommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert (Sigma 1-15, Rotor 12124; alle weiteren Zentrifugationsschritte wurden mit dieser Zentrifuge

durchgeführt). Das Pellet wurde mit 1 ml H₂O gewaschen und nochmals 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Auf das Pellet wurde der Transformationsmix pipettiert. Dieser besteht aus 240 µl 50% PEG, 36 µl 1 M LiAc (pH 7,5), 50 µl ssCarrier-DNA (2 mg/ml Lachsspermien), 33 µl H₂O und 1 µl einzubringendes Plasmid (1 µg/ml). Der Ansatz wurde 1 h bei 42°C und 800 rpm inkubiert. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (5 min; 6.000 rpm), das Pellet in 100 µl H₂O resuspendiert und auf entsprechende Selektionsplatten verteilt (Gietz, 2014). Die Platten wurden 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.4. Herstellung von Diploiden und Sporulation

Von den beiden zu kreuzenden Stämmen wurde von Agar-Platten Zellmaterial abgenommen und in 1 ml flüssigem YPD eingerührt. Der Ansatz wurde mindestens 4 h bei 30°C (150 rpm) inkubiert und dann 50-100 µl auf geeignete Selektionsplatte gegeben. Die Inkubation erfolgte für einen Tag bei 30°C. Anschließend wurde auf eine frische Selektionsplatte überstrichen und erneut einen Tag bei 30°C kultiviert.

Von der zweiten Selektionsplatte wurde sehr viel Material abgenommen und dick auf eine frisch hergestellte Sporulationsplatte überstrichen. Die Sporulationsplatte wurde mindestens 3 Tage bei 22°C inkubiert, bevor die Tetraden am Mikromanipulator dissektiert wurden.

2.2.5. Dissektion der Tetraden am Mikromanipulator

Für die Dissektion der Tetraden wurden 50 µl ddH₂O in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit einer Pipettenspitze Material von der Sporulationsplatte eingerührt. Danach erfolgte die Zugabe von 1,25 µl Zymolyase (10 mg/ml; Seigaku Corporation, Tokio, Japan) und die Inkubation für 10 min bei RT. Anschließend wurden erneut 50 µl ddH₂O hinzugegeben. Vom Ansatz wurden 50 µl entnommen und an den Rand einer YPD- oder geeigneten Selektionsplatte pipettiert. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig am Rand verteilt und an der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurde die Platte in den Mikromanipulator (Singer MSM Serie 300 acer n30 Bedienungs-PC; Singer Instruments, Roadwater, UK) eingelegt. Die Tetraden wurden mit Hilfe einer Nadel aufgenommen und auf ein Gitternetz in einer Reihe abgelegt. Die Tetraden wurden vereinzelt und jede Spore auf eines der vier Koordinatenpunkte gesetzt, sodass jede Spore einzeln wachsen kann. Anschließend erfolgte die Inkubation der Platten bei 30°C.

2.2.6. Herstellung von *rho*⁰ Stämmen

2.2.6.1. In Flüssigkultur

Es wurde 1 ml YPD mit 5 µl EtBr (10 mg/ml ~ 50 µg/ml) versetzt und mit den entsprechenden Hefestämmen angeimpft. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 30°C. Am darauffolgenden Tag wurde 1 µl der ÜNK zu 10 ml H₂O pipettiert und durch Invertieren gemischt. Von dieser Verdünnung wurden 5 µl, 50 µl und 250 µl auf YPD-Platten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien wurden auf YPD und YPG überstrichen. Kolonien, welche nicht auf YPG wachsen konnten, wurden von der YPD-Platte für eine DAPI-Färbung angeimpft und auf Vorhandensein von mtDNA kontrolliert. Wenn nur wenige Zellen mtDNA enthielten, dann wurde von der Probe ein Einzelkolonieausstrich durchgeführt und diese Einzelkolonien ebenfalls per DAPI-Färbung überprüft, um sicherzugehen, dass der Stamm tatsächlich *rho*⁰ geworden ist.

2.2.6.2. Auf Platte mittels RoToR HDA

Die zu behandelnden Stämme wurden von einer YPD-Platte dreimal auf YPD+EtBr (50 µg/ml; 0,5% Bacteriological Pepton) gestempelt. Die Inkubation der Platten erfolgte jedes Mal für vier Tage bei 30°C. Anschließend wurden die Stämme auf YPD und YPG passagiert. Von der YPD-Platte wurden die Stämme mit Hilfe eines sterilen Stempels in einen Glycerinstock (50 µl 15%-iges Glycerin pro *well* im 384er Format) eingerührt und bei -80°C gelagert.

2.2.7. Cytoduktion

Für die Einbringung von mtDNA in die Zellen wurden die Cytoduktionsdonorstämme J1362, J1361/*ARG8^m* oder J1362/HS3324 verwendet (siehe Tab. 3). Um die Cytoduktion mit dem RoToR HDA (ROTOR, Singer Instruments, Somerset, UK) durchzuführen, wurden die Donorstämme über Nacht in 2 ml YPD (J1362 oder J1361/*ARG8^m*) oder SCD-LEU (J1362/HS3324) angeimpft und bei 30°C inkubiert. Die ÜNK wurde am nächsten Tag auf eine YPD- oder SCD-LEU-Platte überführt und auf der ganzen Platte verteilt, sodass ein Rasen wachsen konnte (Rasenplatte). Nach ein bis zwei Tagen Inkubation bei 30°C wurde der Donorstamm auf die entsprechende Selektionsplatte im 1536er Format passagiert. Gleichzeitig wurde die jeweilige Bibliothek, in welche mtDNA eingebracht werden sollte, aus dem Glycerinstock auf YPD gestempelt (384er Format) und zwei Tage bei 30°C wachsen gelassen. Es erfolgte ein *Up-Array* ins 1536er Format auf YPD. Am nächsten Tag wurde der

Donorstamm und die Deletionsbibliothek auf YPD durch Übereinanderstempeln gekreuzt und einen Tag lang bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal auf YPGal (J1362 oder J1361/*ARG8^m*) oder SCGal-LEU+1%Raf (J1362/HS3324) gestempelt, um den GAL-Promotor zu aktivieren, an welchen *URA3* gekoppelt ist. Dadurch wird in den Donorzellen das Enzym Oritidin-5'-Phosphat-Decarboxylase gebildet. Werden nun die Zellen mit 5'-FOA behandelt, so wandelt das Enzym ODCase 5'-FOA in 5'-FU um, welches für die Zellen toxisch ist. Somit erfolgte eine Selektion durch 5'-FOA (Boeke *et al.*, 1984). Die Kultivierung erfolgte ein bis zwei Tage bei 30°C. Die Stämme wurden zweimal auf SCGal+5'-FOA-LYS oder SCGal+5'-FOA-LEU+1%Raf überstempelt, um gegen das Kerngenom des Cytoduktionsdonorstamms zu selektieren. Zum Schluss wurden die Cytoduktanten auf YPD und YPG oder zusätzlich auf SD-ARG (J1362/*ARG8^m*) passagiert und das Wachstum auf diesen Platten analysiert. Einige Stämme, welche als Treffer in den Screens auftraten, wurden anschließend manuell bestätigt. Dazu wurde die Cytoduktion wie oben beschrieben durchgeführt und die Stämme auf die jeweiligen Platten per Hand überstrichen.

2.2.8. Synthetic Genetic Array (SGA)

Die SGA wurde am Roboter RoToR HDA (ROTOR, Singer Instruments, Somerset, UK) durchgeführt. Dafür wurde der Starterstamm Y8205 $\Delta arg8$ (siehe Tab. 3) in 2 ml flüssigem YPD angeimpft und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde auf YPD die Rasenplatte mit dem Starterstamm hergestellt und einen weiteren Tag inkubiert. Die *MATa* Deletionsbibliothek wurde von dem Glycerinstock auf YPD gestempelt (384er Format) und nach zwei Tagen Inkubation auf YPD auf das 1536er Format gebracht. Nach einem Tag Inkubation wurden die Deletionsbibliothek und der Starterstamm auf YPD gepaart und einen Tag bei 30°C inkubiert. Es folgten zwei Diploidenselektionsschritte auf SD-URA+G418, welche jeweils zwei Tage bei 30°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Stämme auf eine Sporulationsplatte passagiert und zehn Tage lang bei 22°C inkubiert. Dann wurde auf Haploiden selektiert, indem auf SCD-LEU+5'-FOA+Thia gestempelt wurde und drei Tage bei 30°C inkubiert wurde. Im nächsten Schritt wurde zusätzlich darauf selektiert, dass sich die ursprüngliche Deletion der Bibliothek (*Δyfg*) in den Mutanten befindet. Dazu wurde auf SCD-LEU+5'-FOA+Thia+G418 gestempelt und vier Tage bei 30°C inkubiert. Um Doppelmutanten zu erhalten, wurden die Stämme dreimal auf SCD-LEU+5'-FOA+Thia+G418+NTC überführt, wobei die Inkubationszeit drei bis vier Tage betrug. Zum Überprüfen, ob die $\Delta arg8$ Deletion eingebracht worden ist,

wurde auf SD-ARG, SD-URA und YPD gestempelt. Von den Stämmen von der YPD-Platte wurde ein Glycerinstock angelegt und bei -80°C gelagert.

2.2.9. Auswertung der Screens

Die RoToR-Platten der Screens wurden fotografiert und entweder manuell verglichen und ausgewertet oder in das Internet Programm *SGAtools* hochgeladen (Wagih *et al.*, 2013). Mit diesem Hilfsmittel wurden die Koloniegrößen der Stämme berechnet und verglichen.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Wachstumsanalyse mittels Tüpfeltest (*drop-dilution Assay*)

Die Hefestämme wurden in 1 ml YPD angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Es erfolgte die Generierung einer seriellen Verdünnungsreihe mit insgesamt vier Verdünnungsstufen in 10er Schritten. Somit lag die höchste Verdünnung bei 1:1000. Mit Hilfe einer Multikanalpipette wurde von jeder Verdünnungsstufe 5 µl auf eine YPD- und YPG-Platte pipettiert. Die Inkubationszeit der Platten betrug drei bis vier Tage bei 30°C, bevor sie fotografiert wurden.

2.3.2. Erythromycin-Assay

Der Erythromycin-Assay wird verwendet, um zu testen, ob ein Stamm an der Reparatur der mtDNA beteiligt ist. Dazu wurden die Stämme in 2 ml YPG+Amp angeimpft und bei 30°C inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Kulturen zu einem Kölbchen mit 10 ml frischem YPG+Amp versetzt und einen weiteren Tag 30°C inkubiert. Danach wurde die OD₆₀₀ gemessen. Von jeder Probe wurden Zellen entsprechend einer OD₆₀₀ von 5 auf YPG+Erythromycin [2 mg/ml] plattiert.

2.3.3. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Übernachtskulturen 1:10 verdünnt und nach 3-4 h Inkubationszeit gefärbt oder direkt mikroskopiert. Dazu wurden folgende Mikroskope verwendet:

Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) mit Plan-Neofluar 100x /1.30 PH3 Öobjektiv, Filtersatz 10 (Anregung 450-490 nm; Emission 515-565 nm) für GFP, Filtersatz 15 (Anregung 546 +/- 12 nm; Emission >590 nm) für RFP und Rhodamin; Evolution VF Mono Cooled Monochrom-Kamera (Intas, Göttingen), Image-Pro Plus 5.0 und Scope-Pro4.5 Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) mit Plan-Neofluar 100x /1.30 PH3 Öobjektiv, Leica DCF360FX Kamera, Leica LAF AF Version 2.1.0 Software (Leica Microsystems, Wetzlar).

2.3.3.1. Mikroskopie der Mitochondrien-Morphologie

Die zu untersuchenden Stämme, in welche vorher das Plasmid pVT100U-mtRFP mittels Transformation eingebracht worden war (siehe Tab 1 und 2.2.3.), wurden in 1 ml SCD-URA angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die ÜNK 1:10 verdünnt und nach ca. 3-4 h Inkubationszeit am Axioplan Fluoreszenzmikroskop im RFP-Kanal mikroskopiert.

2.3.3.2. Färbung der mtDNA mittels DAPI

Die Stämme, deren mtDNA mittels DAPI mikroskopisch untersucht werden sollten, wurden zunächst in 1 ml YPD angeimpft und ün bei 30°C kultiviert. Die ÜNK wurde am nächsten Tag mit YPD 1:10 verdünnt und nach 3-4 h für die Färbung geerntet (Zentrifugation 1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124; für weitere Zentrifugationsschritte wurden die gleichen Einstellungen verwendet). Die Zellen wurden mit 700 µl 100%-igem Methanol fixiert (5 min; RT) und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 1 x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCL; 19 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄; pH 7,4) gewaschen und danach erfolgte die Färbung mit DAPI. Dazu wurde 1 µl DAPI-Stammlösung (1 mg/ml in ddH₂O) zu 1 ml 1 x PBS pipettiert und 5 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation wurde das Pellet viermal in 1 x PBS gewaschen und dann je nach Pelletgröße in 10-50 µl 1 x PBS aufgenommen. Die Proben wurden entweder sofort am Axioplan mikroskopiert oder bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.3.3.3. Färbung der Vakuolen mittels *CellTracker Blue CMAC*

Für die Vakuolen-Färbung wurden die Stämme über Nacht in YPD angeimpft und am nächsten Tag 1:10 verdünnt. Nach 3-4 h Inkubation bei 30°C wurden 100 µl der logarithmischen Kultur mit 1 µl *CellTracker Blue* versetzt (Stammkonzentration 10 mM). Die Proben wurden 30 min bei 30°C (RT; 650 rpm) inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124; für weitere Zentrifugationsschritte wurden die gleichen Einstellungen verwendet). Das Pellet wurde in 1 ml YPD gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl YPD aufgenommen und am Axiophot mikroskopiert.

2.4. Elektronenmikroskopie

2.4.1. Anzucht, Fixierung und Einbettung der Hefezellen nach Tokuyasu

Das Protokoll wurde nach Tokuyasu durchgeführt (Tokuyasu, 1986). Dazu wurden 25 ml YPG (Kölbchen) mit Zellmaterial angeimpft und 9 h bei 30°C inkubiert. Die Übertagkulturen wurden mit YPG auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt (Endvolumen 25 ml) und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen, deren OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1 liegen sollte, mittels Zentrifugation geerntet (5 min; RT; 3.000 rpm; *ependorf centrifuge* 5804R, Rotor F45-30-11).

Das Pellet wurde in 10 ml 2-fach konzentriertem Fixativ (4% PFA + 0,4% GA in 0,1 M PHEM Puffer) resuspendiert. Die Inkubation erfolgte 20 min bei RT auf dem Rollschüttler. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min; RT; 3.000 rpm; *ependorf centrifuge* 5804R, Rotor F45-30-11). Daraufhin wurde das Pellet in 10 ml 1-fach konzentriertem Fixativ (2% PFA + 0,2% GA in 0,1 M PHEM) resuspendiert und 3 h bei RT auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml PHEM (0,1 M) resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden dreimal in 1 ml PHEM Puffer (0,1 M) gewaschen (Zentrifugation in der Horizontalzentrifuge: 30 s; RT; *full speed*; alle weiteren Zentrifugationsschritte fanden in dieser Zentrifuge statt).

Anschließend wurden das Zellmaterial in 1 ml frischer 1% Periodsäure (in 0,1 M PHEM) resuspendiert und 1 h bei RT auf dem Rollschüttler inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (30 s; RT; 3.000 rpm) und dann dreimal in 1 ml PHEM (0,1 M) gewaschen (30 s; RT; *full speed*). Als nächstes wurde 12% Gelatine (in 0,1 M PHEM) dazugegeben, gut resuspendiert und bei 37°C unter gelegentlichem Invertieren 10 min inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert

(2 min 30 s; RT; *full speed*) und die Proben bei 4°C gelagert. Nach dem Erhärten der Gelatine wurde das Zellmaterial mit einer Rasierklinge in ca. 1 mm³ große Würfel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß mit 2,3 M Saccharose (in 0,1 M PHEM-Puffer) überführt. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert.

2.4.2. Pinnen, Trimmen, Schneiden und Nachkontrastierung nach Tokuyasu

Als nächstes wurden die Blöckchen auf kleine Schrauben aufgebracht (Pinnen). Dazu wurde mit einer Pinzette ein mittelgroßes Blöckchen aus dem Reaktionsgefäß entnommen und unter einem Binokular auf die Schraube abgelegt. Mit einem Filterpapier wurde überschüssige Saccharose abgesaugt. Die nun fertig bestückte Schraube wurde sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Ab diesem Schritt erfolgte die Bearbeitung der Probe unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff.

Das Trimmen und Schneiden der Blöckchen wurde am Leica EM UC6i Mikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland), welches eine FC6 Kryo-Kammer besitzt, durchgeführt. Der Stickstofftank wurde zuerst mit flüssigem Stickstoff befüllt und die Kammer des Mikrotoms auf -120°C gekühlt. Anschließend wurde die Schraube mit der Probe eingespannt. Als erstes wurde das ganze Blöckchen von oben so lange mit dem Glasmesser (selbst gebrochen) getrimmt bis die gesamte Oberfläche glatt war. Als nächstes wurde das Blöckchen an vier Seiten im rechten Winkel so getrimmt, dass ein Rechteck entstand. Dabei wurde ca. 150 µm in das Blöckchen getrimmt.

Zum Schneiden der Probe wurde vom Glasmesser auf das Diamantmesser (DiATOME, Biel, Schweiz) gewechselt. Es wurden 60 nm dünne Schnitte von dem Blöckchen (Rechteck aufrechtstehend eingespannt) geschnitten. Durch mehrmaliges Schneiden entstand ein Band von mehreren Schnitten. War das Band mindestens 4 Schnitte lang, wurde das Mikrotom angehalten und das Band mit einer Art Impföse, welche zuvor in eine Flüssigkeit (50% Methylcellulose und 50% Saccharose, auf Eis gekühlt) getaucht worden war, aufgenommen. Der Tropfen von der Impföse mit der Probe wurde auf ein mit Eis gekühltes Netzchen *grid* (Plano, Wetzlar, Deutschland), welches tags zuvor mit 1% Chloroform befilmt worden war, abgesetzt. Die *grids* wurden bei 4°C gelagert.

Zum Nachkontrastieren wurden die *grids* mit der Seite, auf der der Film lag, auf einen Tropfen 1 x PBS gelegt und 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die *grids* auf einen H₂O

Tropfen überführt und erneut 20 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die *grids* sechsmal auf H₂O für je 2 min bei RT inkubiert, bevor sie auf einen Uranylacetat (pH 7) Tropfen gelegt wurden. Dort wurden sie 10 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurden die *grids* an einem Tropfen H₂O mehrmals gewaschen und durch zwei Tropfen Methylcellulose-Uranylacetat (pH 4; 2 ml 2%-iges Uranylacetat + 8 ml Methylcellulose) gezogen. Die *grids* wurden auf einen dritten Tropfen Methylcellulose-Uranylacetat abgelegt und 10 min auf Eis inkubiert. Mit einer speziellen Drahtöse wurden die *grids* aufgenommen, auf ein Filterpapier aufgesetzt und überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Die *grids* wurden über Nacht getrocknet und dann vorsichtig aus der Drahtöse herausgelöst.

2.4.3. Mikroskopie

Die *grids* wurden in das Transmissionselektronenmikroskop Zeiss CEM 902A (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland) eingeschleust und mikroskopiert. Es wurden Bilder mit der Erlangenshen ES500W CCD-Kamera (1350x1050 Pixel; Gatan, Pleasanton, CA) aufgenommen und mit der Gatan Digital Micrograph Software Version 1.70.16 analysiert.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Screenergebnisse

3.1.1. Stempeln der *MATa* Deletionsbibliothek auf YPG

Um in Erfahrung zu bringen, wie der Ursprungszustand der *MATa* Deletionsbibliothek ist, also ob die Stämme bereits vor den in dieser Arbeit durchgeführten Screens als *pet* vorliegen oder nicht, wurde die Deletionsbibliothek auf YPG gestempelt. Dazu wurde diese ohne irgendeine Behandlung aus dem Glycerinstock zuerst auf YPD und anschließend auf YPG und YPD gestempelt, wobei dieser Versuch nur einmal durchgeführt wurde (siehe Abb. 4).

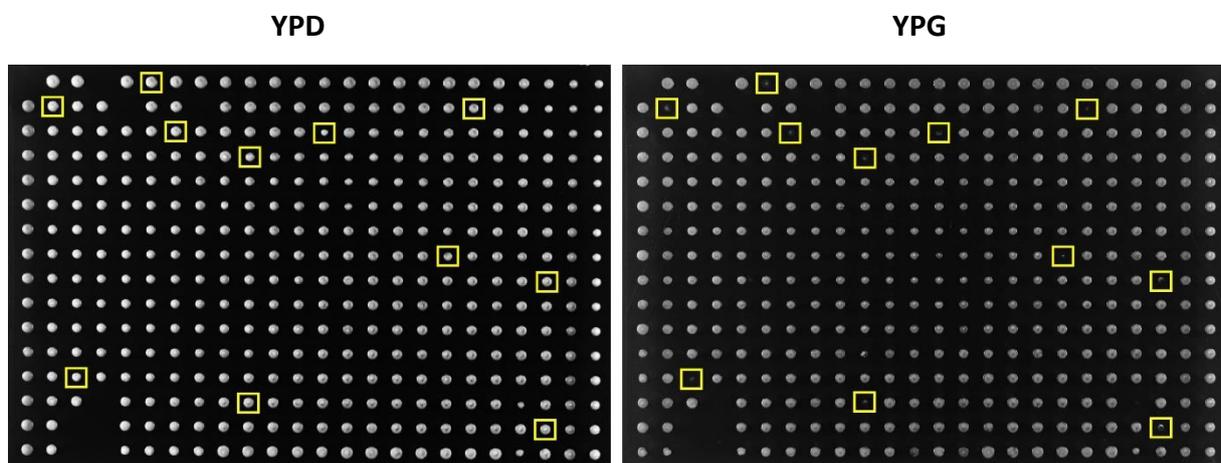


Abbildung 4: Darstellung der Platte 1 der *MATa* Deletionsbibliothek aus dem Glycerinstock auf YPG und YPD. Zuerst wurde aus dem Glycerinstock auf YPD gestempelt und von dort auf YPG und YPD. Die Inkubationszeit der YPD-Platten betrug einen Tag und der YPG-Platten zwei Tage bei 30°C. Die Stämme mit gelb markierten Kästchen sind *pet*.

Durch den Vergleich der YPG- und YPD-Platten konnte festgestellt werden, welche Stämme bereits als *rho*⁰ oder *rho*⁻ im Glycerinstock vorliegen und welche von Anfang an *rho*⁺ waren (siehe Abb. 4). Es gibt 267 Deletionsstämme, welche in der *t*₀ *MATa* Bibliothek bereits *pet* sind (siehe Tab. 4).

Tabelle 4: Auflistung der Deletionsstämme aus der MATa Deletionsbibliothek, welche ohne vorheriger Behandlung nicht auf YPG wachsen können. Angegeben sind der systematische Name, der Standardname und die Funktion des entsprechenden Proteins. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002; yeastgenome.org).

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YAL012W	CYS3	Cystathionin gamma-Lyase
YAL016W	TPD3	Regulatorische Untereinheit A des heterotrimeren PP2A-Komplexes
YAL044C	GCV3	Untereinheit H des mt Glycin-Decarboxylase-Komplexes
YAL048C	GEM1	Äußere Mitochondrienmembran GTPase; Untereinheit des ERMES-Komplexes
YBL002W	HTB2	Histon H2B; wird benötigt für Chromatin-Assemblierung
YBL022C	PIM1	ATP-abhängige Lon-Protease
YBL038W	MRPL16	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YBL044W	YBL044W	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion; nicht essentiell
YBL045C	COR1	Kern-Untereinheit des Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase-Komplexes
YBL080C	PET112	Untereinheit des trimeren GatFAB Amidotransferase-Komplexes (AdT)
YBL090W	MRP21	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YBR003W	COQ1	Hexaprenyl-Pyrophosphat-Synthetase
YBR026C	ETR1	2-Enoyl-Thioester-Reduktase
YBR037C	SCO1	Kupfer-Bindeprotein der mt Innenmembran
YBR120C	CBP6	mt Protein; benötigt für Translation der COB mRNA
YBR122C	MRPL36	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YBR179C	FZO1	Mitofusin; integrales Membranprotein; involviert in mt Außenmembran-Binden und -Fusion
YBR251W	MRPS5	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YBR268W	MRPL37	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YBR282W	MRPL27	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YCL005W-A	VMA9	Vakuoläre H ⁺ -ATPase-Untereinheit e des V-ATPase-V0-Subkomplexes
YCL007C	YCL007C	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YCR003W	MRPL32	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YCR004C	YCP4	Protein unbekannter Funktion; Ähnlichkeit mit Flavodoxinen
YCR024C	SLM5	Mitochondriale AsparaginyI-tRNA-Synthetase
YCR028C-A	RIM1	ssDNA-Bindeprotein; essentiell für mtGenom-Aufrechterhaltung
YCR046C	IMG1	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YCR071C	IMG2	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDL032W	YDL032W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i> ; überlappt teilweise mit SLM3/YDL033C
YDL040C	NAT1	Untereinheit der N-terminalen Acetyltransferase NatA
YDL063C	SYO1	Transport-Adaptor oder Symportin
YDL067C	COX9	Untereinheit VIIa der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)
YDL069C	CBS1	mt translatorischer Aktivator der COB mRNA
YDL072C	YET3	Protein unbekannter Funktion

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YDL107W	MSS2	Peripheres Innenmembranprotein der mt Matrix
YDL133C-A	RPL41B	Ribosomale 60S Untereinheit L41B
YDL146W	LDB17	Involviert in Regulierung der Endocytose
YDL167C	NRP1	Mutmaßliches RNA-Bindeprotein unbekannter Funktion
YDL185W	VMA1	Untereinheit A der V1 peripheren Membrandomäne der V-ATPase
YDL198C	GGC1	mt GTP/GDP-Transporter; essentiell für mt Genomaufrechterhaltung
YDL202W	MRPL11	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDL206W	YDL206W	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion; nicht essentiell
YDR042C	YDR042C	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YDR065W	RRG1	Funktion unbekannt; Ansäuerung der Vakuole; mtDNA-Erhalt
YDR078C	SHU2	Komponente des Shu-Komplexes (aka PCSS Komplex)
YDR079C-A	TFB5	Komponente der RNA-Polymerase-II Transkriptionsfaktor TFIIH
YDR079W	PET100	Chaperon, zuständig für Assemblierung der Cytochrom-c-Oxidase
YDR114C	YDR114C	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YDR116C	MRPL1	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR138W	HPR1	Untereinheit des THO/TREX-Komplexes
YDR148C	KGD2	Dihydrolipoyl-Transsuccinylase
YDR175C	RSM24	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YDR178W	SDH4	Membrananker-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase
YDR230W	YDR230W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YDR231C	COX20	mt Innenmembranprotein; benötigt für proteolytische Prozessierung von Cox2 und dessen Assemblierung in die Cytochrom-c-Oxidase
YDR268W	MSW1	Mitochondriale Tryptophanyl-tRNA-Synthetase
YDR300C	PRO1	Gamma-Glutamyl-Kinase; 1. Schritt in der Prolin-Synthese
YDR322W	MRPL35	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR347W	MRP1	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YDR350C	ATP22	Spezifischer translatorischer Aktivator der mt ATP6 mRNA
YDR375C	BCS1	Proteintranslokase und Chaperon, benötigt für Komplex-III-Assemblierung
YDR377W	ATP17	Untereinheit f des F ₀ -Sektors der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YDR405W	MRP20	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR470C	UGO1	Außenmembrankomponente der mt Fusionsmaschinerie
YDR477W	SNF1	AMP-aktivierte S/T Proteinkinase
YDR493W	MZM1	Benötigt für Assemblierung des Cytochrom-bc(1)-Komplexes
YDR507C	GIN4	Proteinkinase; involviert in Knospenwachstum und Assemblierung des Septin-Rings
YDR512C	EMI1	Funktion unbekannt; Induktion von Transkriptionsfaktor <i>IME1</i>
YDR518W	EUG1	Disulfid-Isomerase des ER-Lumens; Paralog <i>PDI1</i>
YDR521W	YDR521W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i> ; überlappt mit <i>YDR520C</i>
YDR523C	SPS1	Vermutlich Serin-/Threonin-Kinase; im Nukleus und Cytoplasma
YDR529C	QCR7	Untereinheit 7 der Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase (III)
YEL024W	RIP1	Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
<i>YEL036C</i>	<i>ANP1</i>	Untereinheit des alpha-1,6-Mannosyltransferase-Komplexes
<i>YEL050C</i>	<i>RML2</i>	mt ribosomales Protein der großen Untereinheit (L2)
<i>YEL059C-A</i>	<i>SOM1</i>	Untereinheit der mt Innenmembran-Peptidase (IMP)
<i>YER014W</i>	<i>HEM14</i>	Protoporphyrinogen-Oxidase; Enzym in der Häm-Synthese
<i>YER050C</i>	<i>RSM18</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
<i>YER058W</i>	<i>PET117</i>	Assemblierungsfaktor, verbindet Häm-a-Synthese mit Komplex-IV-Assemblierung
<i>YER087W</i>	<i>AIM10</i>	Protein mit Ähnlichkeit zu tRNA-Synthetasen
<i>YER103W</i>	<i>SSA4</i>	Hitzeschock-Protein; stark induziert durch Stress
<i>YER110C</i>	<i>KAP123</i>	Karyopherin beta; vermittelt nukleären Import ribosomaler Proteine vor der Assemblierung zu Ribosomen und Import von H3 und H4
<i>YER122C</i>	<i>GLO3</i>	ADP-ribosylierungsfaktor GTPase-Aktivierungsprotein (ARF GAP)
<i>YER153C</i>	<i>PET122</i>	Spezifischer mt translatorischer Aktivator der COX3 mRNA
<i>YER154W</i>	<i>OXA1</i>	Mitochondriale Innenmembran-Insertase
<i>YER169W</i>	<i>RPH1</i>	JmjC-Domäne enthaltene Histon-Demethylase
<i>YFL016C</i>	<i>MDJ1</i>	Co-Chaperon; stimuliert HSP70 Protein Ssc1-ATPase-Aktivität
<i>YFL018C</i>	<i>LPD1</i>	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase
<i>YFL036W</i>	<i>RPO41</i>	Mitochondriale RNA-Polymerase; synthetisiert Primer für mtDNA-Replikation
<i>YFR048W</i>	<i>RMD8</i>	Cytosolisches Protein; benötigt für Sporulation
<i>YGL071W</i>	<i>AFT1</i>	Transkriptionsfaktor; involviert in der Eisen-Nutzung und -Homöostase
<i>YGL095C</i>	<i>VPS45</i>	Protein der Sec1/Munc-18 Familie; essentiell für vakuoläre Proteinsortierung
<i>YGL107C</i>	<i>RMD9</i>	mt Protein; benötigt für respiratorisches Wachstum
<i>YGL115W</i>	<i>SNF4</i>	Aktivierende gamma-Untereinheit des AMP-aktivierten Snf1 Kinase-Komplexes
<i>YGL119W</i>	<i>COQ8</i>	ATPase; benötigt für Ubiquinon-Biosynthese und respiratorisches Wachstum
<i>YGL129C</i>	<i>RSM23</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
<i>YGL143C</i>	<i>MRF1</i>	Mitochondrialer Translations-Release-Faktor
<i>YGL198W</i>	<i>YIP4</i>	Interagiert mit Rab GTPasen; in späten Golgi-Vesikeln
<i>YGL220W</i>	<i>BOL2</i>	Cytosolisches Protein; involviert in Repression der Eisen-Regulon-Transkription
<i>YGL240W</i>	<i>DOC1</i>	Prozessivitätsfaktor
<i>YGR062C</i>	<i>COX18</i>	Benötigt für Membran-Insertierung des C-Terminus von Cox2
<i>YGR101W</i>	<i>PCP1</i>	Mitochondriale Serin-Protease
<i>YGR105W</i>	<i>VMA21</i>	Integrales Membranprotein; benötigt für V-ATPase-Funktion
<i>YGR112W</i>	<i>SHY1</i>	Mitochondriales Innenmembranprotein; benötigt für Komplex-IV-Assemblierung
<i>YGR150C</i>	<i>CCM1</i>	Mitochondriales 15S rRNA-Bindeprotein
<i>YGR157W</i>	<i>CHO2</i>	Phosphatidylethanolamin-Methyltransferase (PEMT)
<i>YGR165W</i>	<i>MRPS35</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
<i>YGR183C</i>	<i>QCR9</i>	Untereinheit 9 der Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YGR215W	RSM27	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YGR219W	YGR219W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YGR220C	MRPL9	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YGR222W	PET54	mt Innenmembranprotein; bindet an 5'UTR der COX3 mRNA
YGR255C	COQ6	Flavin-abhängige Monoxygenase; involviert in Ubiquinon-Biosynthese
YGR257C	MTM1	mt Protein der mt Carrier-Familie
YHL004W	MRP4	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YHL038C	CBP2	Benötigt für Spleißen des bI5 Introns aus der COB prä-mRNA
YHR011W	DIA4	Vermutlich mitochondriale Seryl-tRNA-Synthetase
YHR026W	VMA16	Untereinheit c'' der vakuolären ATPase
YHR050W-A	YHR050W-A	Protein unbekannter Funktion
YHR051W	COX6	Untereinheit VI der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)
YHR067W	HTD2	Mitochondriale 3-Hydroxylacyl-Thioester-Dehydratase
YHR091C	MSR1	Mitochondriale Arginyl-tRNA-Synthetase
YHR116W	COX23	Benötigt in Kupfer-Homöostase
YHR120W	MSH1	DNA-Bindeprotein der Mitochondrien
YHR147C	MRPL6	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YHR175W-A	YHR175W-A	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YIL012W	YIL012W	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YIL041W	GVP36	BAR-Domäne-Protein; ist in frühe und späte Golgi-Vesikel
YJL023C	PET130	Funktion unbekannt; benötigt für respiratorisches Wachstum
YJL027C	YJL027C	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YJL046W	AIM22	Vermutlich Lipoatprotein-Ligase
YJL096W	MRPL49	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YJL166W	QCR8	Untereinheit 8 der Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase
YJL176C	SWI3	Untereinheit des SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplexes
YJL180C	ATP12	Assemblierungsfaktor des F ₁ -Sektors der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YJL184W	GON7	Komponente des EKC/KEOPS-Protein-Komplexes
YJL209W	CBP1	mt Protein; Regulator der COB mRNA-Stabilität und -Translation
YJR004C	SAG1	Alpha-Agglutinin von alpha Zellen
YJR060W	CBF1	Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Protein
YJR090C	GRR1	F-Box-Protein; Komponente eines SCF Ubiquitin-Ligase-Komplex
YJR113C	RSM7	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YJR114W	YJR114W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YJR120W	YJR120W	Funktion unbekannt
YJR122W	IBA57	Involviert beim Einbau von Eisen-Schwefel-Cluster in Proteine
YJR144W	MGM101	Rolle in mtDNA-Reparatur (<i>recombinational</i>)
YJR150C	DAN1	Zellwand-Mannoprotein
YKL002W	DID4	Klasse E Vps Protein des ESCRT-III-Komplexes
YKL003C	MRP17	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YKL016C	ATP7	Untereinheit d des Stators der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YKL054C	DEF1	RNAPII Degradationsfaktor
YKL087C	CYT2	Cytochrom-c1-Häm-Lyase

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YKL109W	HAP4	Transkriptionsfaktor
YKL134C	OCT1	Mitochondriale Intermediat-Peptidase
YKL137W	CMC1	Kupfer-Bindeprotein des mt Innenmembranraums
YKL148C	SDH1	Flavoprotein; Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase
YKL155C	RSM22	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YKL169C	YKL169C	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YKL170W	MRPL38	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YKL194C	MST1	Mitochondriale Threonyl-tRNA-Synthetase
YKL208W	CBT1	Protein bei 5'RNA-Ende Prozessierung beteiligt
YKR006C	MRPL13	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YLL006W	MMM1	ER integrales Membranprotein; ERMES-Komplex-Untereinheit
YLL018C-A	COX19	Benötigt für Cytochrom-c-Oxidase-Assemblierung
YLL027W	ISA1	Benötigt für die Reifung der mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteine
YLL041C	SDH2	Eisen-Schwefel-Protein-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase
YLR038C	COX12	Untereinheit VIb der Cytochrom-c-Oxidase
YLR067C	PET309	Spezifischer translatorischer Aktivator der mt COX1 mRNA
YLR114C	AVL9	Involviert in exocytischem Transport aus dem Golgi
YLR139C	SLS1	mt Membranprotein; koordiniert Expression mt kodierter Gene
YLR200W	YKE2	Untereinheit des heterohexameren Gim/ <i>prefoldin</i> -Protein-Komplexes
YLR201C	COQ9	Benötigt für Ubiquinon-Biosynthese und respiratorisches Wachstum
YLR202C	YLR202C	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YLR203C	MSS51	Spezifischer translatorischer Aktivator der mt COX1 mRNA
YLR204W	QRI5	Mitochondriales Innenmembranprotein; wird benötigt für die Akkumulierung von gespleißter COX1 mRNA;
YLR239C	LIP2	Lipoyl-Ligase; involviert in Modifikation mt Proteine
YLR240W	VPS34	Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase; synthetisiert PI-3-Phosphat
YLR288C	MEC3	DNA-Schaden und meiotisches Pachytän-Checkpoint-Protein
YLR312W-A	MRPL15	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YLR368W	MDM30	F-Box-Komponente eines SCF Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplex
YLR369W	SSQ1	Mitochondriales hsp70-Typ molekulares Chaperon
YLR377C	FBP1	Fruktose-1,6-Biphosphatase; Enzym in der Glukoneogenese
YLR393W	ATP10	Assemblierungsfaktor für den F ₀ -Sektor der mitochondrialen F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YLR396C	VPS33	ATP-Bindeprotein; Untereinheit der HOPS- und CORVET-Komplexe
YLR447C	VMA6	Untereinheit d der V ₀ integralen Membrandomäne der V-ATPase
YML088W	UFO1	F-Box-Rezeptorprotein
YML110C	COQ5	2-Hexaprenyl-6-Methoxy-1,4-Benzoquinon-Methyltransferase
YMR021C	MAC1	Kupfer-wahnehmender Transkriptionsfaktor
YMR035W	IMP2	Katalytische Untereinheit des mt Innenmembran-Peptidase-Kopplexes
YMR063W	RIM9	Plasmamembranprotein unbekannter Funktion

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YMR064W	AEP1	Benötigt für die Expression des mitochondrialen <i>OLI1</i> Gens
YMR066W	SOV1	Mitochondriales Protein unbekannter Funktion
YMR067C	UBX4	UBX Domäne-enthaltendes Protein, interagiert mit Cdc48
YMR071C	TVP18	Integrales Membranprotein; lokalisiert in späten Golgi-Vesikeln
YMR072W	ABF2	Mitochondriales DNA-Bindeprotein
YMR084W	YMR084W	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YMR098C	ATP25	mt Protein; benötigt für Stabilität der <i>OLI1</i> mRNA
YMR150C	IMP1	Katalytische Untereinheit des mt Innenmembran-Peptidase-Komplexes
YMR184W	ADD37	Protein unbekannter Funktion; involviert in Protein-Abbau
YMR207C	HFA1	Mitochondriale Acetyl-Coenzym-A-Carboxylase
YMR228W	MTF1	Mitochondriale RNA-Polymerase-Spezifitätsfaktor
YMR256C	COX7	Untereinheit VII der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)
YMR257C	PET111	mt translatorischer Aktivator spezifisch für die <i>COX2</i> mRNA
YMR267W	PPA2	mt inorganische Pyrophosphatase
YMR286W	MRPL33	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YMR293C	HER2	Untereinheit des trimeren GatFAB Amido-Transferase-Komplexes (AdT)
YNL005C	MRP7	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNL052W	COX5A	Untereinheit Va der Cytochrom-c-Oxidase
YNL073W	MSK1	Mitochondriale Lysin-tRNA-Synthetase
YNL081C	SWS2	Vermutliches mt ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YNL133C	FYV6	Protein unbekannter Funktion
YNL160W	YGP1	Zellwand-verwandtes sekretorisches Glykoprotein
YNL162W	RPL42A	Ribosomale 60S Untereinheit L42A
YNL170W	YNL170W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YNL177C	MRPL22	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNL184C	YNL184C	Protein unbekannter Funktion
YNL213C	RRG9	Protein unbekannter Funktion
YNL225C	CNM67	Komponente des Spindelpolkkörpers
YNL284C	MRPL10	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNL315C	ATP11	Molekulares Chaperon; für Assemblierung der alpha und beta Untereinheit in den F ₁ -Sektor der ATP-Synthase verantwortlich
YNR020C	ATP23	Mutmaßliche Metalloprotease der mt Innenmembran
YNR036C	MRPS12	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YNR037C	RSM19	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YNR041C	COQ2	Para-Hydroxybenzoat-Polyprenyl-Transferase
YNR045W	PET494	mt translatorischer Aktivator spezifisch für <i>COX3</i> mRNA
YOL008W	COQ10	Coenzyme-Q (Ubiquinon) Bindeprotein
YOL023W	IFM1	Mitochondrialer Translationsinitiations-Faktor 2
YOL033W	MSE1	Mitochondriale Glutamyl-tRNA-Synthetase
YOL071W	SDH5	Benötigt für Flavinylierung von Sdh1
YOL096C	COQ3	O-Methyltransferase; benötigt in der Ubiquinon-Biosynthese
YOL100W	PKH2	Serin/Threonin-Proteinkinase
YOR026W	BUB3	Kinetochor-Checkpoint WD40 Repeat-Protein

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YOR037W	CYC2	Mitochondriales peripheres Innenmembranprotein
YOR065W	CYT1	Cytochrom-c1; Komponente der mt Atmungskette
YOR125C	CAT5	Benötigt für Ubiquinon-Biosynthese (Coenzyme-Q)
YOR150W	MRPL23	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YOR158W	PET123	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YOR187W	TUF1	Mitochondrialer Translationselongationsfaktor Tu (EF-Tu)
YOR199W	YOR199W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YOR200W	YOR200W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YOR201C	MRM1	Ribose-Methyltransferase; modifiziert konservierte Nukleotide in mt 21S rRNA
YOR205C	GEP3	Benötigt für Biogenese der mt kleinen Untereinheit des Ribosoms
YOR211C	MGM1	mt GTPase; in einem Komplex mit Ugo1 und Fzo1
YOR241W	MET7	Folylpolyglutamat-Synthetase; Benötigt für Methionin-Synthese
YOR295W	UAF30	Untereinheit des UAF-Komplexes (<i>upstream activation factor</i>)
YOR305W	RRG7	Funktion unbekannt
YOR330C	MIP1	Mitochondriale DNA-Polymerase-gamma
YOR331C	YOR331C	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YOR350C	MNE1	Involviert in Spleißen des Gruppe-I-a15-beta-Introns aus COX1 mRNA
YOR358W	HAP5	Untereinheit des Hap2/3/4/5 CCAAT-Binde-Komplexes
YPL005W	AEP3	Peripheres mitochondriales Innenmembranprotein
YPL013C	MRPS16	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YPL029W	SUV3	ATP-abhängige RNA-Helikase
YPL059W	GRX5	Glutathion-abhängige Oxidoreduktase
YPL078C	ATP4	Untereinheit b des Stators der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YPL097W	MSY1	Mitochondriale Tyrosyl-tRNA-Synthetase
YPL118W	MRP51	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YPL159C	PET20	Benötigt für respiratorisches Wachstum und Stabilität des mitochondrialen Genoms
YPL172C	COX10	Häm-A:Farnesyltransferase
YPL173W	MRPL40	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YPL262W	FUM1	Fumarase; wandelt Fumarsäure zu L-Apfelsäure im TCA-Zyklus
YPL271W	ATP15	Epsilon Untereinheit des F ₁ -Sektors der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YPR047W	MSF1	Mitochondriale Phenylalanyl-tRNA-Synthetase
YPR066W	UBA3	Aktiviert Rub1 (NEDD8)
YPR067W	ISA2	Benötigt für Reifung des mt [4Fe-4S]-Proteins
YPR100W	MRPL51	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YPR116W	RRG8	Funktion unbekannt; benötigt für mtGenom-Erhalt
YPR124W	CTR1	Kupfer-Transporter der Plasmamembran

Diese 267 *to pet* Gene wurden mit drei Screens, in welchen auch nach *pet* Genen gesucht worden ist, verglichen (siehe Abb. 5) (Dimmer *et al.*, 2002; Luban *et al.*, 2005; Merz und

Westermann, 2009). In dem Screen von Merz und Westermann wurde die *MAT α* Deletionsbibliothek gescreent (Merz und Westermann, 2009). Bei Luban *et al.*, wurde die *MAT α* Deletionsbibliothek und bei Dimmer *et al.* wurde eine homozygot diploide Deletionsbibliothek verwendet (Dimmer *et al.*, 2002; Luban *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die *MAT α* Deletionsbibliothek genutzt, um nochmal genomweit die nicht essentiellen Gene abzudecken. Um die Ergebnisse der vier Screens besser vergleichen zu können, wurde ein Venn-Diagramm mit allen Treffern angefertigt (siehe Abb. 5).

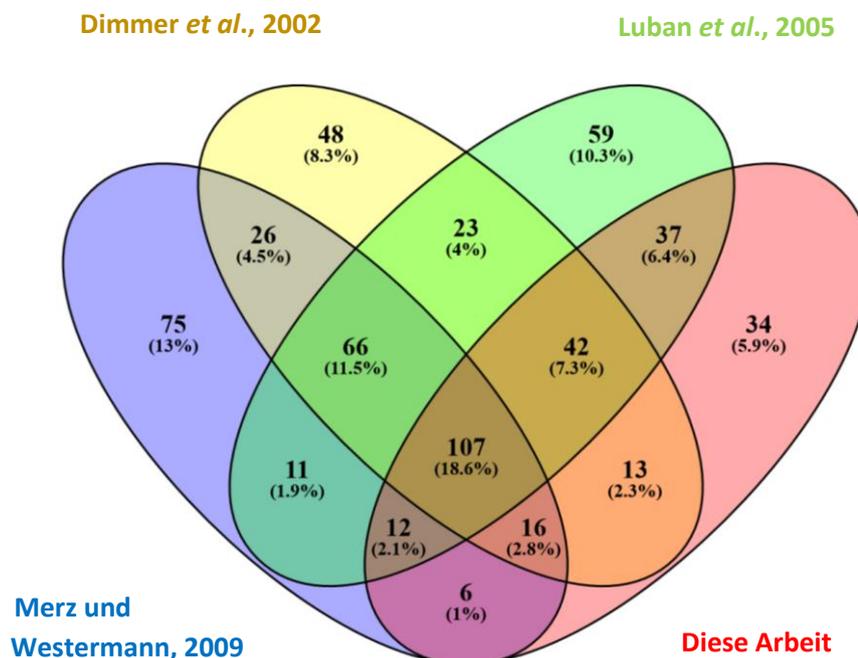


Abbildung 5: Venn-Diagramm von der Verteilung der *pet* Gene in den vier verschiedenen Screens (Dimmer *et al.*, 2002; Luban *et al.*, 2005; Merz und Westermann, 2009; diese Arbeit). Insgesamt wurden 575 Gene gefunden, von denen 107 in allen vier Screens auftreten. Angegeben sind die absoluten Zahlen und in Klammern die jeweilige Prozentzahl ausgehend von 575 als 100%. Das Venn-Diagramm wurde mit dem Online-Programm Venny erstellt (Oliveros, 2007-2015).

Ein Vergleich der Screens ergibt 107 Gene, welche in allen vier Screens auftauchen (siehe Abb. 5). Diese 107 Mutanten sind bei allen Bedingungen *pet* geworden und werden ab jetzt super *pet* genannt. 136 bzw. 116 Gene treten bei insgesamt drei bzw. zwei Screens auf und 216 Gene sind exklusiv bei nur einem der vier Screens vertreten. In dieser Arbeit konnten 34 neue *pet* Gene gefunden werden, wobei sich die Frage stellt, wie zuverlässig diese Stämme *pet* werden, denn sonst wären sie vielleicht in einem der anderen Screens auch aufgetreten. Werden alle Gene der vier Screens zusammengezählt, so wurden insgesamt 575

Deletionsgene gefunden, welche *pet* sind. Dies ist ein hoher Wert, wenn bedacht wird, dass die Hefe *S. cerevisiae* nur ca. 6.000 Gene aufweist und das mitochondriale Proteom ca. 1.000 Proteine umfasst (Winzler *et al.*, 1999; Sickmann *et al.*, 2003). Das unterstreicht, dass viele Proteine und Prozesse an der Vererbung und Aufrechterhaltung des mitochondrialen Genoms beteiligt sind. Auch wenn nicht nur auf den mitochondrialen Genomerhalt, sondern auch auf metabolische Eigenschaften gescreened wird. Dies kann jedoch wieder relativiert werden, da 216 Gene nur einmal als *pet* aufgetaucht sind und daher nicht so glaubhaft sind wie diejenigen, die mindestens zweimal unter den Treffer waren.

Je häufiger ein Gen bei den Screens gefunden wird, desto wahrscheinlicher ist es auch, dass dieses tatsächlich immer *pet* ist. Ein Grund, warum manche Gene nicht bei allen Screens auftreten, ist, dass nicht bei allen vier Screens die gleichen Gene vorhanden sind. Auch kann ein Stamm bei einem Screen durch äußere Einflüsse während des Screens verlorengehen, obwohl er in mehreren Bibliotheken vorhanden wäre und kann daher auch nicht als Treffer gezählt werden. Des Weiteren können die Zusammensetzung der Medien, Arbeitsweisen oder Inkubationszeiten voneinander abweichen und so bedingen, dass sich die Deletionsstämme in zwei Screens unterschiedlich verhalten. Der Screen aus dieser Arbeit wurde beispielsweise mittels eines leistungsfähigen Roboters durchgeführt, welcher Platten mit bis zu 1536 Stämmen schnell und präzise auf die nächste Platte passagiert. Bei Merz und Westermann erfolgten die Stempelschritte mit einem Stempel per Hand, womit auch die Gefahr größer ist, dass ein Deletionsstamm durch eine andere Mutante kontaminiert wird (Merz und Westermann, 2009). Ein weiterer Faktor ist, dass sich manchmal Deletionsmutanten in verschiedenen Hefehintergründen unterschiedlich verhalten. Zwei Screens wurden mit der *MATa* Deletionsbibliothek (Luban *et al.*, 2005; diese Arbeit), ein Screen mit der *MAT α* Deletionsbibliothek (Merz und Westermann, 2009) und ein Screen mit der homozygot diploiden Deletionsbibliothek durchgeführt (Dimmer *et al.*, 2002).

Um einen besseren Überblick über die *pet* Stämme zu erhalten, wurde ein Diagramm mit den Lokalisationen der 575 entsprechenden Proteinen erstellt. Des Weiteren wurde eine Graphik von den Funktionen der 107 super *pet* Stämmen angefertigt (siehe Abb. 6).

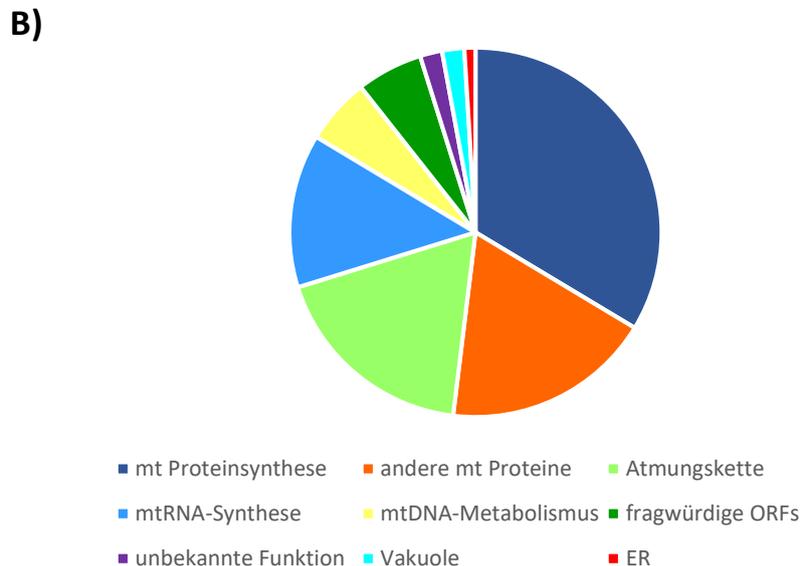
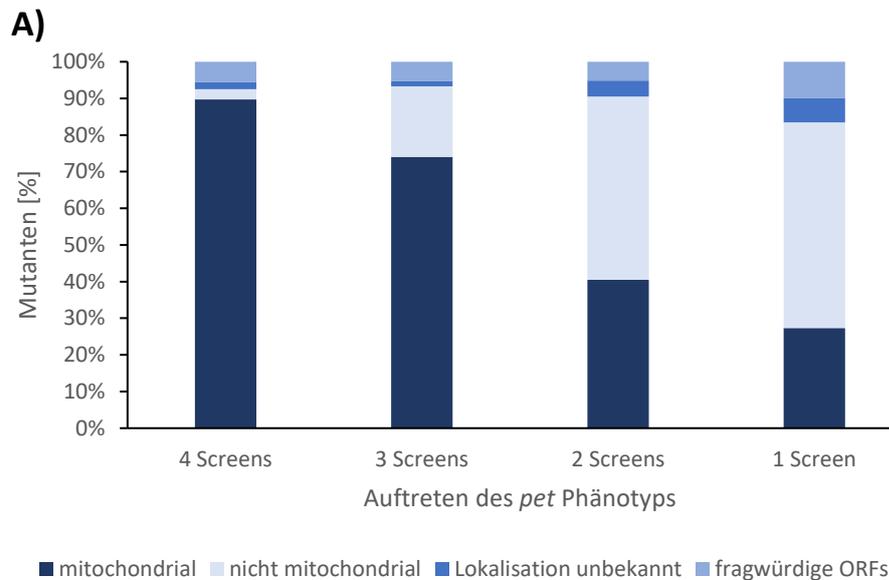


Abbildung 6: Verteilung der *pet* Mutanten. A) Auftragung der Lokalisation der entsprechenden Proteine der *pet* Gene nach Häufigkeit des Vorkommens in den verschiedenen Screens (Dimmer *et al.*, 2002; Luban *et al.*, 2005; Merz und Westermann, 2009; diese Arbeit). Für jede der vier Kategorien (Anzahl der Screens) wurden die absoluten Zahlen in Prozent umgerechnet. Die Lokalisation ist mitochondrial, nicht mitochondrial oder unbekannt. Des Weiteren gibt es noch fragwürdige ORFs, die wahrscheinlich für kein Protein kodieren. **B)** Verteilung der 107 super *pet* Gene nach deren Funktion oder Lokalisation. Angegeben sind mitochondriale Proteinsynthese, andere mitochondriale Proteine, Atmungskette, mtRNA-Synthese, mtDNA-Metabolismus, fragwürdige ORFs, unbekannte Funktion und lokalisiert in Vakuole oder ER. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002).

Es ist anhand der Abbildung zu erkennen, dass fast 90% der Proteine der 107 super *pet* Stämme, welche in allen vier Screens vorkommen, mitochondrial lokalisiert sind (siehe Abb. 6A), wohingegen der nicht mitochondriale Anteil mit 2% sehr gering ist. Bei den Stämmen, die in weniger Screens *pet* werden, wandelt sich dieses Bild. Während bei den Mutanten aus drei Screens noch fast 75% der deletierten Gene mitochondriale Proteine

kodieren, sind es bei den *pet* Stämmen aus nur einem Screen nur noch 27%. Im Gegenzug wird der Anteil der Gene, deren Proteine sich nicht in den Mitochondrien befinden, immer größer. So sind das bei Stämmen, die nur in einem Screen auftreten, 56%. Der Anteil der Proteine mit unbekannter Funktion und fragwürdiger ORFs bleibt in etwa gleich. Dies ist ein gutes Indiz dafür, dass die 107 Stämme wirklich immer *pet* werden. Wenn die Mutationen etwas mit der Vererbung des mitochondrialen Genoms zu tun haben, ergibt es Sinn, dass sich deren Proteine vorwiegend in den Mitochondrien befinden. Trotzdem gibt es auch Beispiele für Proteine außerhalb der Mitochondrien, die eine Rolle bei der Vererbung der mitochondrialen DNA spielen. Eines dieser Proteine ist Mmm1, welches sich im Endoplasmatischen Retikulum befindet. Fehlt dieses, dann ist die Vererbung der mtDNA gestört, weil Mmm1 eine Komponente des ERMES-Komplex ist, welcher an der mtDNA-Vererbung beteiligt ist (Hobbs *et al.*, 2001; Kornman *et al.*, 2009).

Ein weiterer Hinweis bietet die Einteilung der 107 in allen vier Screens vorkommenden *pet* Gene (siehe Abb. 6B). 34% von ihnen haben mit der mitochondrialen Proteinsynthese zu tun, 13% mit der Synthese von mitochondrialer RNA (mtRNA) und 6% mit dem mtDNA-Metabolismus. Nur ein geringer Teil hat seine Funktionen in der Vakuole oder ER.

Somit konnte in Abbildung 6A veranschaulicht werden, dass ein Zusammenhang zwischen Häufigkeit der Treffer und mitochondrialer Lokalisation besteht. Des Weiteren sind auch die Funktionen überwiegend in den Mitochondrien aufzufinden, was erneut ein gutes Zeichen für die Zuverlässigkeit der Screens ist (Abb. 6B). Interessant ist hierbei, wie die nicht mitochondrialen Proteine mit der Vererbung des mitochondrialen Genoms in Verbindung stehen. Vorstellbar wären indirekte Interaktionen. So könnte zum Beispiel ein cytosolisches Protein dabei helfen, dass mitochondriale Proteine in die Mitochondrien gelangen. Fehlt dieses, so kommen die Proteine, welche wichtig für die mtDNA-Vererbung sind, auch nicht mehr in die Mitochondrien, woraufhin diese Stämme *pet* werden.

Aus den vier Screens von Merz und Westermann, Dimmer *et al.*, Luban *et al.* und dieser Arbeit kann auch gefolgert werden, ob manche Proteinkomplexe komplett oder in Teilen an der Atmung beteiligt sind. Daher wurden zwei Proteinkomplexe, die F₁F₀-ATP-Synthase und die Cytochrom-c-Oxidase, genauer analysiert und mit den Screens verglichen (siehe Abb.7).

Tabelle 5: Auflistung der Gene der F₁F₀-ATP-Synthase und Cytochrom-c-Oxidase aus Abbildung 7. Angegeben sind die verschiedenen mit den beiden Komplexen assoziierten Funktionen und deren daran beteiligten Gene. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002; yeastgenome.org).

Funktion	Gene
F₁F₀-ATP-Synthase	
F ₁ F ₀ -ATP-Synthase Untereinheiten	<i>ATP1, ATP2, ATP3, ATP4, ATP5, ATP6, ATP7, ATP8, ATP14, ATP15, ATP16, ATP17, ATP18, ATP19, ATP20, OLI1, TIM11</i>
Assemblierungsfaktor der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase	<i>ATP10, ATP11, ATP12, ATP23, FMC1, INA17, INA22, OXA1</i>
Expression und Stabilität von <i>OLI1</i>	<i>AEP1, AEP2, ATP25</i>
Expression von <i>ATP6</i> und <i>ATP8</i>	<i>NCA2, NCA3</i>
Translationsaktivator von <i>ATP6</i>	<i>AEP3, ATP22</i>
Cytochrom-c-Oxidase	
Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase	<i>COX1, COX2, COX3, COX4, COX5A, COX5B, COX6, COX7, COX8, COX9, COX12, COX13</i>
Assemblierungsfaktor des Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes	<i>COA1, COA2, COA3, COA4, COA6, COX14, COX16, COX19, COX20, FMP32, PET117, PET191, RCF1, RCF2, SHY1</i>
In Kupfer Homöostase involviert	<i>COX10, COX15, COX17, COX23</i>
Translationsaktivator für <i>COX3</i>	<i>PET54, PET122, PET494</i>
Translationsaktivator für <i>COX1</i>	<i>MSS51, PET309</i>
Stabilität des Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes	<i>COX26</i>
Translationsaktivator für <i>COX2</i>	<i>PET111</i>
Inserierung des C-Terminus von <i>Cox2</i>	<i>COX18</i>

In der Abbildung 7 ist zu erkennen, dass die Mutanten, denen die Gene *ATP4*, *ATP7*, *ATP15* und *ATP17* fehlen, bei allen vier Screens *pet* werden (siehe Abb. 7A). Dabei sind die Proteine Atp3 (einmal *pet*), Atp15 (viermal) und Atp16 (nie) Komponenten des zentralen Schafts. Dieser hat die Aufgabe die Drehbewegungen des F₀-Teils in eine Konformationsänderung der Untereinheiten des F₁-Kopfes zu übertragen. Der Stator besteht aus den Proteinen Atp4 (viermal *pet*), Atp5 (dreimal) und Atp7 (viermal) und verhindert, dass sich der F₁-Kopf mit dreht (Walker und Dickson, 2006). Die löslichen F₁-Untereinheiten Atp1 und Atp2 wurden mit je dreimal häufig *pet*. Die in der Membran inserierten F₀-Bestandteile wurden bis auf Atp17 (viermal) nur zweimal oder gar nicht *pet*. Somit sind vor allem der Stator und die F₁-Komponente wichtig für die Atmung. Die Gene *ATP6*, *ATP8* und *OLI1* sind mitochondrial kodiert. Bei den weiteren Faktoren, welche für die Assemblierung und Stabilisierung benötigt werden, sind vor allem die Expression und Stabilität von *OLI1* und Translationsaktivatoren von *ATP6* wichtig. Bei den Assemblierungsfaktoren sind einige wie *ATP11*, *ATP12*, *ATP10* und *OXA1* häufig *pet* geworden, andere wie *FMC1*, *INA17* und *INA22* wurden in keinem Screen *pet* und

sind wahrscheinlich weniger wichtig für die Atmung. Auch *NCA2* und *NCA3*, deren Proteine bei der Expression von *ATP6* und *ATP8* beteiligt sind, sind in den Screens nicht aufgetaucht und spielen somit keine Rolle bei der Atmung.

Auch die Cytochrom-c-Oxidase, Komplex IV der Atmungskette, ist wichtig für die Atmung. Dieser Komplex befindet sich in der mitochondrialen Innenmembran und katalysiert den Transfer der Elektronen vom reduzierten Cytochrom-c auf O₂ als finalen Elektronenakzeptor (Hill, 1994). Der Komplex besteht aus zwölf Untereinheiten und mehr als 25 weiteren Faktoren (Soto *et al.*, 2012). Fehlen die Untereinheiten Cox5a, Cox6, Cox7, Cox9 und Cox12 der Cytochrom-c-Oxidase so werden die Stämme in allen vier Screens *pet* (siehe Abb. 7B). Die restlichen Untereinheiten Cox4, Cox5b, Cox8 und Cox13 scheinen nicht so wichtig für die Atmung zu sein, da deren Deletionsstämme in keinem der vier Screens *pet* werden. Die Gene *COX1*, *COX2* und *COX3* sind mitochondrial kodiert und können deshalb nicht in den vier Screens auftauchen. Auch die Assemblierungsfaktoren werden außer bei *COX19* und *SHY1* (je viermal) und *PET117* (dreimal) nur ein- oder zweimal oder gar nicht *pet*. Daher scheinen sie keine so wichtige Rolle bei der Atmung zu spielen wie auch die Gene, welche in der Kupfer-Homöostase involviert sind. Hier ist nur *COX10*, welches viermal *pet* wird, auffällig. Und auch das Gen *COX26*, das für die Stabilität der Cytochrom-c-Oxidase wichtig ist, wird nie *pet*. Auf der anderen Seite sind die Translationsaktivatoren für *COX1*, *COX2* und *COX3* sehr wichtig für die Atmung, da diese ausnahmslos viermal oder dreimal *pet* werden. Und auch *COX18*, dessen Protein für die Inserierung des C-Terminus von Cox2 in die Membran zuständig ist, wird in allen vier Screens *pet*. Dies bestätigt, dass die drei Komponenten Cox1, Cox2 und Cox3 für die Atmung essentiell sind.

Die vier Screens und die Analyse deren Ergebnisse ist somit ein wertvolles und gutes Hilfsmittel, um herauszufinden welche Komponenten eines Komplexes für die Atmung oder eventuell Aufrechterhaltung des mitochondrialen Genoms essentiell sind und welche weniger wichtig sind. Durch diese Erkenntnisse können wieder gezielt Versuche konzipiert werden, um die gefundenen Gene weiter zu charakterisieren.

3.1.2. Screen nach Mutanten, die nach Ethidiumbromid-Behandlung nicht mehr auf YPD wachsen können

Um weitere Proteine zu finden, welche an der Vererbung des mitochondrialen Genoms beteiligt sind, sollten mehrere Screens durchgeführt werden. Damit diese genomweiten Screens miteinander vergleichbar sind, wurde die *MATa* Deletionsbibliothek zuerst mit Hilfe von Ethidiumbromid von deren mtDNA befreit (*rho*⁰), weil die Hefestämme in dieser Bibliothek entweder als *rho*⁺, *rho*⁻ oder *rho*⁰ vorliegen können (Fox *et al.*, 1991). Dazu wurden die Hefen dreimal auf YPD+EtBr (50 µg/ml) gestempelt (siehe Abb. 8). Dadurch haben die Stämme ihr mtGenom verloren und wurden *rho*⁰ (Fox *et al.*, 1991). Somit sollten alle Hefestämme in der *MATa* Deletionsbibliothek *rho*⁰ vorliegen und alle gleich sein. Ausnahmen könnten jedoch *petite*-negative Stämme bilden, die ihre mtDNA nicht verlieren können und entweder sterben oder noch *rho*⁺ sind.

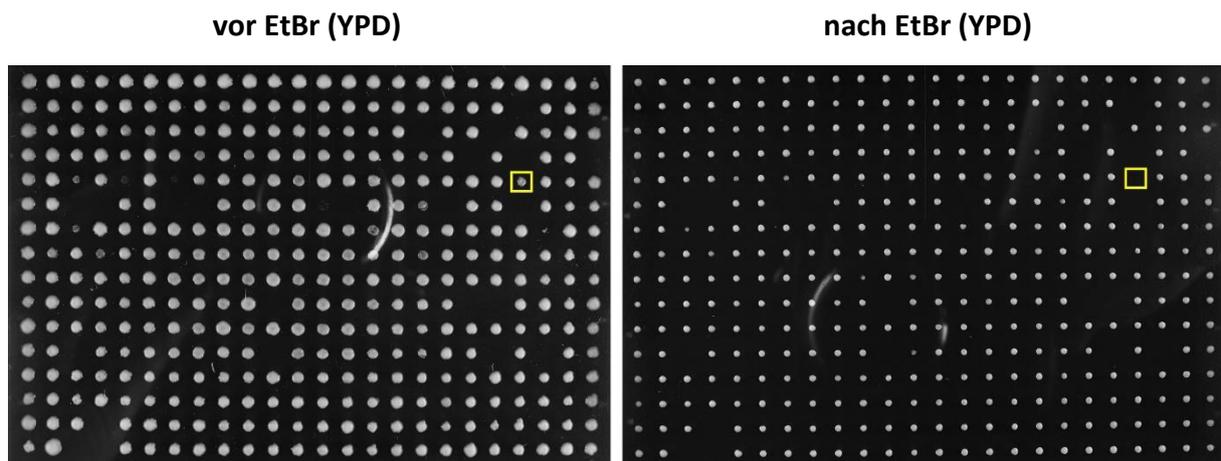


Abbildung 8: Die Stämme werden *pet*. Darstellung der Platte 6 (384er Format) der *MATa* Deletionsbibliothek als Beispiel vor und nach der Ethidiumbromid-Behandlung jeweils auf YPD. Die Stämme wurden dreimal auf EtBr (50 µg/ml) passagiert. Die Inkubationszeit betrug vor der Behandlung zwei Tage und einen Tag bei 30°C nach der EtBr-Behandlung. Stämme, die mit einem gelben Kästchen markiert sind, konnten vor der EtBr-Behandlung auf YPD wachsen, nach der Behandlung jedoch nicht mehr (*petite*-negativ).

Die Stempelschritte erfolgten im 1536er Format, um möglichst viele Stämme auf einer Platte zu haben und somit Medien und Material zu sparen. Für den letzten Stempelschritt auf YPD wurde auf das 384er Format gewechselt, um eine aussagekräftigere und einfachere Auswertung zu erhalten (siehe Abb. 8). Es wurden zwölf Mutanten gefunden, welche nach der EtBr-Behandlung nicht mehr auf YPD wachsen konnten (siehe Tab. 6). Normalerweise zeigen Hefen auch ohne ihr mitochondriales Genom Wachstum auf Medium mit Glukose. Dies liegt

daran, dass die Hefen durch Fermentation ohne das mitochondriale Genom ATP produzieren können (Tzagoloff und Dieckmann, 1990). Des Weiteren kann die rückwärts gerichtete ATPase das Membranpotential, welches für den Import der Proteine gebraucht wird, aufrechterhalten (Traba *et al.*, 2008). Diese Stämme jedoch sind nicht mehr in der Lage ohne ihre mtDNA zu wachsen, auch nicht auf glukosehaltigem Medium. Sie sind somit *petite*-negativ (Bulder, 1964). Dies bedeutet, dass diese Stämme entweder einen Defekt im Zusammenhang mit dem Membranpotential oder der rückwärts gerichteten ATPase haben. Des Weiteren gab es 24 Stämme, die nach dreimaligem Passagieren auf EtBr nur noch einen leichten Wuchs auf YPD aufwiesen (siehe Tab. 6). Darunter befindet sich zum Beispiel auch $\Delta mgr2$, von dem bereits bekannt ist, dass diese Deletionsmutante *petite*-negativ ist (Dunn *et al.*, 2006). Dieses Ergebnis wurde im Screen von Dunn *et al.*, in welchem sie einen genomweiten Screen auf Ethidiumbromid-Medium durchgeführt haben, erzielt (Dunn *et al.*, 2006). Weitere Stämme, welche in dieser Arbeit und bei Dunn *et al.* als *petite*-negativ identifiziert wurden, sind $\Delta tim18$, $\Delta tps2$ und $\Delta yjr120w$ (siehe Abb. 8) (Dunn *et al.*, 2006).

Tabelle 6: Stämme, die nach Ethidiumbromid-Behandlung nicht mehr auf YPD wachsen konnten. Angegeben sind der systematische Name, der Standardname und die Funktion des entsprechenden Proteins. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002; yeastgenome.org).

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
Kein Wachstum auf YPD		
<i>YBL093C</i>	<i>ROX3</i>	Untereinheit des RNA-Polymerase-II-Mediator-Komplexes
<i>YBL099W</i>	<i>ATP1</i>	Alpha-Untereinheit des F ₁ -Sektors der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
<i>YBR151W</i>	<i>APD1</i>	Funktion unbekannt
<i>YDR293C</i>	<i>SSD1</i>	Translationsrepressor
<i>YGL038C</i>	<i>OCH1</i>	Mannosyltransferase des cis-Golgi-Apparates
<i>YGL070C</i>	<i>RPB9</i>	RNA-Polymerase-II-Untereinheit B12.6
<i>YGR167W</i>	<i>CLC1</i>	Intrazellulärer Proteintransport und Endozytose (Clathrin)
<i>YJL180C</i>	<i>ATP12</i>	Assemblierungsfaktor des F ₁ -Sektors der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
<i>YLR182W</i>	<i>SWI6</i>	Transkriptionsfaktor
<i>YNL315C</i>	<i>ATP11</i>	Molekulares Chaperon; für Assemblierung der alpha- und beta-Untereinheit in den F ₁ -Sektor der ATP-Synthase verantwortlich
<i>YOR297C</i>	<i>TIM18</i>	Komponente des mitochondrialen TIM22-Komplexes
<i>YPR131C</i>	<i>NAT3</i>	Katalytische Untereinheit der NatB N-terminalen Acetyltransferase
Schlechtes Wachstum auf YPD		
<i>YCR007C</i>	<i>YCR007C</i>	Mutmaßliches integrales Membranprotein
<i>YDL122W</i>	<i>UBP1</i>	Ubiquitin-spezifische Protease

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YDR074W	TPS2	Phosphatase-Untereinheit des Trehalose-6-P Synthase/Phosphatase-Komplexes
YER080W	AIM9	Funktion unbekannt
YFR035C	YFR035C	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YGL235W	YGL235W	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YGR016W	YGR016W	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YJL006C	CTK2	Beta-Untereinheit der C-terminalen Domänen-Kinase I (CTDK-I)
YJR120W	YJR120W	Funktion unbekannt
YKR048C	NAP1	Histon-Chaperon
YLR234W	TOP3	DNA-Topoisomerase-III
YLR423C	ATG17	Gerüstprotein verantwortlich für die Organisation der Phagophor-Assemblierungsseite
YML032C	RAD52	Stimuliert Strang-Austausch der DNA
YMR224C	MRE11	Nuklease-Untereinheit des MRX-Komplexes mit Rad50 und Xrs2
YNL003C	PET8	S-Adenosylmethionin-Transporter der mt Innenmembran
YNL199C	GCR2	Transkriptionsaktivator von Glykolyse assoziierten Proteinen
YNL250W	RAD50	Untereinheit des MRX-Komplexes mit Mre11 und Xrs2
YNL255C	GIS2	Translationsaktivator von mRNAs mit interner Ribosom-Eintrittsseite
YOL013W-B	YOL013W-B	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YOL076W	MDM20	Nicht-katalytische Untereinheit der NatB N-terminalen Acetyltransferase
YOL145C	CTR9	Komponent des Paf1 Komplexes, in Transkriptionselongation involviert
YOR186W	YOR186W	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YPL098C	MGR2	Untereinheit des TIM23-Translokase-Komplexes
YPL188W	POS5	Mitochondriale NADH-Kinase

Der Überlapp von vier Genen ist zwischen beiden Screens nur sehr gering, während 30 (Dunn *et al.*, 2006) bzw. 32 Gene (diese Arbeit) jeweils exklusiv als *petite*-negative gefunden wurden (siehe Abb. 9). Dies könnte möglicherweise damit zu erklären sein, dass bei dieser Arbeit die *MATa* Deletionsbibliothek mit ca. 4.800 Deletionsstämmen auf Platten mit EtBr (50 µg/ml) gestempelt wurden, während bei Dunn *et al.* ungefähr 3.800 Mutanten in mit EtBr (25 µg/ml) versetzter Flüssigkultur angezogen wurden (Dunn *et al.*, 2006). Zum einen könnte es sein, dass einige der Gene, welche nur in einem Screen gefunden worden sind, tatsächlich nur in einer der beiden Deletionsbibliotheken vorhanden waren und deshalb nicht im Überlapp auftauchen konnten. Zum anderen können unterschiedliche Vorgehensweisen bzw. andere Anzuchtbedingungen ein anderes Wuchsverhalten der Stämme bedingen. So kann es zum Beispiel sein, dass durch eine der beiden Bedingungen ein weiterer Stressfaktor auftaucht, mit

dem die Stämme unterschiedlich gut zurechtkommen, oder eine Bedingung eine stärkere EtBr-Wirkung entfaltet. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass unterschiedlich starke EtBr-Konzentrationen eine andere Wirkweise aufweisen. So werden bei einer geringeren EtBr-Konzentration von ca. 10 µg/ml die Stämme *rho*⁻ (Fox *et al.*, 1991).

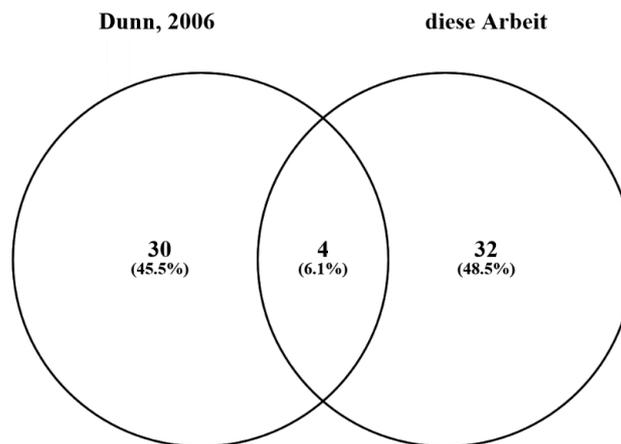


Abbildung 9: Vergleich der Stämme, welche nach Ethidiumbromid-Behandlung nicht mehr auf YPD wachsen können (*petite*-negativ, Dunn *et al.*, 2006) und Stämmen, welche nicht oder nur schwach auf YPD wachsen können (diese Arbeit). Die Stämme im Überlapp sind $\Delta mgr2$, $\Delta tim18$, $\Delta tps2$ und $\Delta yjr120w$. Das Venn-Diagramm wurde mit dem Online-Programm Venny erstellt (Oliveros, 2007-2015).

Die Stämme wurden nach der EtBr-Behandlung als Kontrolle auch auf YPG gestempelt, worauf sie nicht wachsen konnten (nicht gezeigt). Somit sind die Zellen *rho*⁰ oder *rho*⁻. Um einige Stämme auf Vorhandensein von mtDNA zu testen, wurden zufällig pro Platte ein paar Stämme mit DAPI gefärbt, welches die mtDNA sichtbar macht, und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Keine der untersuchten Stämme besaß mtDNA.

Somit wurden die Hefestämme der *MATa* Deletionsbibliothek mittels Ethidiumbromid-Behandlung *rho*⁰. Von dieser *rho*⁰ Bibliothek wurde ein Glycerinstock angefertigt und diente als Ausgangspunkt für alle nachfolgenden Screens.

3.1.3. Screen nach Mutanten, die mit wildtypischer mtDNA nicht cytoduzierbar sind

Um mit der *rho*⁰ *MATa* Deletionsbibliothek drei weitere Screens durchzuführen, wurde als nächstes in die zuvor von mtDNA befreite Bibliothek wieder ein wildtypisches mitochondriales Genom eingebracht. Dies geschah via Cytoduktion mit dem Donorstamm J1362 (Lettier *et al.*,

2006). Bei der Cytoduktion wird sich zu Nutzen gemacht, dass der Donorstamm, welcher die einzubringende mtDNA enthält, einen Kernfusionsdefekt und das intakte *URA3* Gen besitzt. Wenn dieser Stamm mit einem *rho*⁰ Empfängerstamm verpaart wird (auf YPD), dann vermischt sich nur das Cytoplasma, aber die Kerne fusionieren nicht. Durch Selektion mit 5'-FOA werden Zellen mit dem Zellkern des Donors eliminiert, weil diese das *URA3* Gen aufweisen und somit das 5'-FOA in das schädliche 5'FU umgewandelt wird. Es bleiben nur die Zellen mit dem gewünschten Kerngenom zurück, welche nun die neue mtDNA besitzen. Dazu muss zuvor auf YPGal gestempelt werden, um den GAL-Promotor zu aktivieren, welcher an das *URA3* Gen gekoppelt ist (für eine ausführliche Erklärung siehe 1.6; siehe Abb. 10) (Spencer und Spencer, 1996).

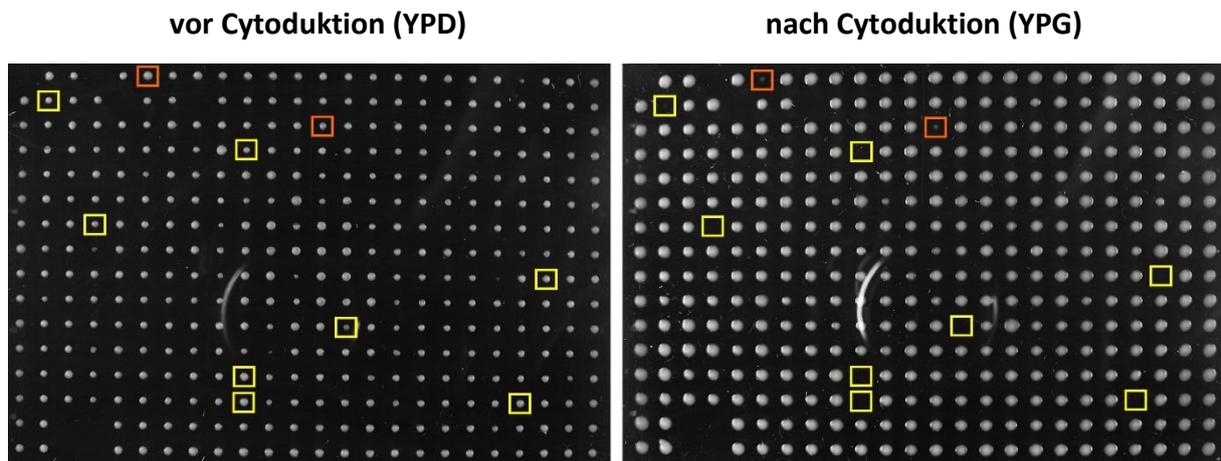


Abbildung 10: Darstellung der Platte 1 der *MATa* Deletionsbibliothek (*rho*⁰; YPD) vom 2. Durchgang als Beispiel vor und nach der Cytoduktion mit J1362 (*rho*⁺; YPG). Die Stämme wurden je zweimal auf YPGal und 5'-FOA passagiert. Die Inkubationszeit der YPD-Platte vor der Cytoduktion betrug einen Tag und die der YPG-Platte nach der Cytoduktion zwei Tage bei 30°C. Stämme, die mit einem gelben Kästchen markiert sind, konnten vor der Cytoduktion auf YPD wachsen, nach der Cytoduktion mit der wildtypischen mtDNA jedoch nicht auf YPG (*pet*). Die mit orangefarbenen Kästchen markierten Stämme können nach der Cytoduktion auf YPG nur schlecht wachsen.

Der Großteil der Stämme konnte nach der Cytoduktion wieder auf YPG wachsen (siehe Abb. 10). Dies bedeutet, dass diese wieder voll funktionsfähige mitochondriale DNA aufweisen (*rho*⁺) und die Cytoduktion somit funktioniert hat. Es gab jedoch auch Stämme, welche trotz Cytoduktion nicht oder nur sehr schlecht auf Medium mit Glycerin wachsen konnten. Diese Stämme sind auch nach der Cytoduktion *pet*. Entweder können sie die mitochondriale DNA nicht aufnehmen oder sie verlieren die soeben eingebrachte mtDNA sofort wieder. Diese Stämme sind nicht cytoduzierbar. Gründe hierfür können Defekte in der

Replikation, Transkription oder Translation der mtDNA sein. Beispielsweise konnten die Deletionsstämme der mitochondrialen DNA- und RNA-Polymerase $\Delta mip1$ bzw. $\Delta rpo41$ nicht cytoduziert werden (siehe Tab. 7). Beide Polymerasen sind an der Replikation der mtDNA beteiligt und wenn sie fehlen, verlieren die Stämme ihre mtDNA (Genga *et al.*, 1986; Sanchez-Sandoval *et al.*, 2015). Diese beiden Treffer sind somit eine gute Positivkontrolle für die Cytoduktion. Weitere Funktionen, die wichtig sind für ein Wachstum auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle, sind neben Komponenten des mtDNA-Metabolismus, die mitochondriale Fusion, mitochondriale ribosomale Proteine, kerncodierte Untereinheiten der Atmungskette, die Enzyme des Citratzykluses und weitere Proteine. So sind auch die Mutanten der Fusionsmaschinerie $\Delta fzo1$, $\Delta mgm1$ und $\Delta ugo1$ sofort nach der Cytoduktion *pet*. Die Mitochondrien in diesen Mutanten liegen fragmentiert vor, da sie nicht mehr fusionieren können, sich aber trotzdem weiter teilen (Rapaport *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 2001; Sesaki *et al.*, 2003). Die mtDNA kann vermutlich nicht so positioniert werden, dass alle Fragmente ein mitochondriales Genom erhalten und somit verlieren diese Stämme ebenfalls ihre mtDNA. Des Weiteren tauchen viele Deletionsstämme auf, deren Proteine für mitochondriale ribosomale Untereinheiten kodieren und somit die Translation der acht mitochondrialen Gene ausfällt. Diese Stämme können zum einen nicht mehr auf YPG wachsen, weil durch fehlende Proteine der Atmungskette keine ATP-Synthese mehr möglich ist. Und zum anderen konnte festgestellt werden, dass Hefen ihre mtDNA verlieren, wenn die mitochondriale Proteinsynthese inhibiert ist (Myers *et al.*, 1985).

Es folgte ein zweiter Durchgang der Cytoduktion, welcher auf die gleiche Weise wie der erste Durchgang durchgeführt wurde. Im Überlapp der beiden Durchgänge befinden sich 213 Stämme (siehe Tab. 7).

Tabelle 7: Auflistung der Deletionsstämme aus der Cytoduktion mit *rho+* mtDNA (J1362) von dem Überlapp der beiden Durchgänge, welche auch nach der Cytoduktion *pet* sind. Angegeben sind der systematische Name, der Standardname und die Funktion des entsprechenden Proteins. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002; yeastgenome.org).

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
<i>YBL021C</i>	<i>HAP3</i>	Untereinheit des Hap2/3/4/5 CCAAT-Binde-Komplexes
<i>YBL022C</i>	<i>PIM1</i>	ATP-abhängige Lon-Protease
<i>YBL038W</i>	<i>MRPL16</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
<i>YBL045C</i>	<i>COR1</i>	Kern-Untereinheit des Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase-Komplexes

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YBL090W	MRP21	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YBR003W	COQ1	Hexaprenyl-Pyrophosphat-Synthetase
YBR018C	GAL7	Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase
YBR019C	GAL10	UDP-Glukose-4-Epimerase
YBR020W	GAL1	Galaktokinase; phosphoryliert alpha-D-Galaktose zu alpha-D-Galaktose-1-Phosphat
YBR037C	SCO1	Kupfer-Bindeprotein der mt Innenmembran
YBR081C	SPT7	Untereinheit des SAGA-Komplexes
YBR097W	VPS15	Serin/Threonin-Proteinkinase
YBR120C	CBP6	mt Protein; benötigt für Translation der COB mRNA
YBR179C	FZO1	Mitofusin; integrales Membranprotein; involviert in mt Außenmembran-Binden und -Fusion
YBR251W	MRPS5	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YBR268W	MRPL37	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YBR282W	MRPL27	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YCL005W-A	VMA9	Vakuoläre H ⁺ -ATPase Untereinheit e des V-ATPase V0 Subkomplexes
YCL007C	YCL007C	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YCR003W	MRPL32	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YCR024C	SLM5	Mitochondriale AsparaginyI-tRNA-Synthetase
YCR028C-A	RIM1	ssDNA-Bindeprotein; essentiell für mtGenom-Aufrechterhaltung
YCR053W	THR4	Threonin-Synthase
YCR071C	IMG2	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDL041W	YDL041W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YDL042C	SIR2	NAD ⁺ -abhängige Histon-Deacetylase der Sirtuin-Familie
YDL067C	COX9	Untereinheit VIIa der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)
YDL069C	CBS1	mt translatorischer Aktivator der COB mRNA
YDL090C	RAM1	Beta-Untereinheit der CAAX-Farnesyltransferase (FTase)
YDL107W	MSS2	Peripheres Innenmembranprotein der mt Matrix
YDL160C-A	MHF2	Komponente des heterotetrameren MHF-Histon-Komplexes
YDL167C	NRP1	Mutmaßliches RNA-Bindeprotein unbekannter Funktion
YDL185W	VMA1	Untereinheit A der V1 peripheren Membrandomäne der V-ATPase
YDL198C	GGC1	mt GTP/GDP Transporter; essentiell für mtGenom-Aufrechterhaltung
YDL202W	MRPL11	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR065W	RRG1	Funktion unbekannt; Ansäuerung der Vakuole; mtDNA-Erhalt
YDR079W	PET100	Chaperon, zuständig für Assemblierung der Cytochrom-c-Oxidase
YDR103W	STE5	MAPK-Gerüstprotein
YDR114C	YDR114C	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YDR138W	HPR1	Untereinheit des THO/TREX-Komplexes
YDR148C	KGD2	Dihydrolipoyl-Transsuccinylase
YDR175C	RSM24	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YDR227W	SIR4	SIR-Protein; involviert in Assemblierung stillgelegter Chromatin-Domänen
YDR230W	YDR230W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YDR231C	COX20	mt Innenmembranprotein; benötigt für proteolytische Prozessierung von Cox2 und dessen Assemblierung in die Cytochrom-c-Oxidase
YDR268W	MSW1	Mitochondriale Tryptophanyl-tRNA-Synthetase
YDR270W	CCC2	Cu(+2)-transportierende P-Typ-ATPase
YDR296W	MHR1	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR298C	ATP5	Untereinheit 5 des Stators der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YDR300C	PRO1	Gamma-Glutamyl-Kinase; 1. Schritt in der Prolin-Synthese
YDR322W	MRPL35	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR347W	MRP1	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YDR350C	ATP22	Spezifischer translatorischer Aktivator der mt ATP6 mRNA
YDR375C	BCS1	Proteintranslokase und Chaperon, benötigt für Komplex-III-Assemblierung
YDR377W	ATP17	Untereinheit f des F ₀ -Sektors der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YDR405W	MRP20	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR461W	MFA1	Paarungspheromon a-Faktor
YDR470C	UGO1	Außenmembrankomponente der mt Fusionsmaschinerie
YDR529C	QCR7	Untereinheit 7 der Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase (III)
YEL004W	YEA4	Uridin-Diphosphat-N-Acetylglucosamin-Transporter (UDP-GlcNAc)
YEL024W	RIP1	Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase
YEL029C	BUD16	Vermutlich Pyridoxal-Kinase
YEL050C	RML2	mt ribosomales Protein der großen Untereinheit (L2)
YEL051W	VMA8	Untereinheit D der peripheren V1-Domäne der V-ATPase
YEL059C-A	SOM1	Untereinheit der mt Innenmembran-Peptidase (IMP)
YER014W	HEM14	Protoporphyrinogen-Oxidase; Enzym in der Häm-Synthese
YER050C	RSM18	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YER058W	PET117	Assemblierungsfaktor, verbindet Häm-a-Synthese mit Komplex-IV-Assemblierung
YER087W	AIM10	Protein mit Ähnlichkeit zu tRNA-Synthetasen
YER153C	PET122	Spezifischer mt translatorischer Aktivator der COX3 mRNA
YER154W	OXA1	Mitochondriale Innenmembran-Insertase
YFL016C	MDJ1	Co-Chaperon; stimuliert HSP70-Protein Ssc1-ATPase-Aktivität
YFL026W	STE2	Rezeptor für alpha-Faktor-Pheromone
YFL036W	RPO41	Mitochondriale RNA-Polymerase; synthetisiert Primer für mtDNA-Replikation
YGL119W	COQ8	ATPase; benötigt für Ubiquinon-Biosynthese und respiratorisches Wachstum
YGL129C	RSM23	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YGL143C	MRF1	Mitochondrialer Translations-Release-Faktor
YGL156W	AMS1	Vakuoläre alpha-Mannosidase
YGL206C	CHC1	Clathrin (schwere Kette)
YGL232W	TAN1	Vermutlich tRNA-Acetyltransferasae

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YGR062C	COX18	Benötigt für Membran-Insertierung des C-Terminus von Cox2
YGR101W	PCP1	Mitochondriale Serin-Protease
YGR105W	VMA21	Integrales Membranprotein; benötigt für V-ATPase-Funktion
YGR112W	SHY1	Mitochondriales Innenmembranprotein; benötigt für Komplex-IV-Assemblierung
YGR150C	CCM1	Mitochondriales 15S rRNA-Bindeprotein
YGR165W	MRPS35	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YGR215W	RSM27	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YGR219W	YGR219W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YGR220C	MRPL9	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YGR222W	PET54	mt Innenmembranprotein; bindet an 5'UTR der COX3 mRNA
YGR255C	COQ6	Flavin-abhängige Monooxygenase; involviert in Ubiquinon-Biosynthese
YGR257C	MTM1	mt Protein der mt Carrier-Familie
YHL038C	CBP2	Benötigt für Spleißen des bI5 Introns aus der COB prä-mRNA
YHR005C	GPA1	Untereinheit des G-Proteins; involviert in Pheromon-Antwort
YHR011W	DIA4	Vermutlich mitochondriale Seryl-tRNA-Synthetase
YHR026W	VMA16	Untereinheit c'' der vakuolären ATPase
YHR030C	SLT2	Serin/Threonin-MAP-Kinase
YHR051W	COX6	Untereinheit VI der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)
YHR091C	MSR1	Mitochondriale Arginyl-tRNA-Synthetase
YHR116W	COX23	Benötigt in Kupfer-Homöostase
YHR147C	MRPL6	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YHR177W	YHR177W	Vermutlicher Transkriptionsfaktor; enthält eine WOPR-Domäne
YIL084C	SDS3	Komponente des Rpd3L-Histon-Deacetylase-Komplexes
YJL023C	PET130	Funktion unbekannt; benötigt für respiratorisches Wachstum
YJL046W	AIM22	Vermutlich Lipoatprotein-Ligase
YJL095W	BCK1	Involviert In Proteinkinase-C-Signalweg (MAPKKK)
YJL096W	MRPL49	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YJL166W	QCR8	Untereinheit 8 der Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase
YJL176C	SWI3	Untereinheit des SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplexes
YJL209W	CBP1	mt Protein; Regulator der COB mRNA-Stabilität und -Translation
YJR005C-A	YJR005C-A	Vermutlich in der Antwort auf Eisenmangel beteiligt
YJR086W	STE18	Untereinheit gamma des G-Proteins
YJR090C	GRR1	F-Box-Protein; Komponente eines SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex
YJR113C	RSM7	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YJR114W	YJR114W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YJR120W	YJR120W	Funktion unbekannt
YJR122W	IBA57	Involviert beim Einbau von Eisen-Schwefel-Cluster in Proteine
YJR144W	MGM101	Rolle in mtDNA-Reparatur (<i>recombinational</i>)
YKL002W	DID4	Klasse E Vps Protein des ESCRT-III-Komplexes
YKL003C	MRP17	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YKL016C	ATP7	Untereinheit d des Stators der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YKL080W	VMA5	Untereinheit C der peripheren V1-Membrandomäne der V-ATPase
YKL134C	OCT1	Mitochondriale Intermediat-Peptidase
YKL135C	APL2	Beta-Adaptin-Untereinheit des Clathrin-assoziierten Protein-Komplexes
YKL155C	RSM22	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YKL169C	YKL169C	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YKL170W	MRPL38	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YKL194C	MST1	Mitochondriale Threonyl-tRNA-Synthetase
YKR006C	MRPL13	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YLL018C-A	COX19	Benötigt für Cytochrom-c-Oxidase-Assemblierung
YLL027W	ISA1	Benötigt für die Reifung der mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteine
YLR027C	AAT2	Cytosolische Aspartat-Aminotransferase
YLR038C	COX12	Untereinheit VIIb der Cytochrom-c-Oxidase
YLR067C	PET309	Spezifischer translatorischer Aktivator der mt COX1 mRNA
YLR079W	SIC1	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor (CKI)
YLR091W	GEP5	Protein unbekannter Funktion; wichtig für mtDNA-Erhalt
YLR139C	SLS1	mt Membranprotein; koordiniert Expression mt kodierter Gene
YLR201C	COQ9	Benötigt für Ubiquinon-Biosynthese und respiratorisches Wachstum
YLR202C	YLR202C	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YLR203C	MSS51	Spezifischer translatorischer Aktivator der mt COX1 mRNA
YLR239C	LIP2	Lipoyl-Ligase; involviert in Modifikation mt Proteine
YLR240W	VPS34	Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase; synthetisiert PI-3-Phosphat
YLR308W	CDA2	Chitin-Deacetylase
YLR312W-A	MRPL15	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YLR362W	STE11	Signal transduzierende MEK-Kinase
YLR368W	MDM30	F-Box-Komponente eines SCF-Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplex
YLR396C	VPS33	ATP-Bindeprotein; Untereinheit der HOPS- und CORVET-Komplexe
YLR418C	CDC73	Komponente des Paf1-Komplexes
YLR442C	SIR3	<i>Silencing</i> -Protein
YLR447C	VMA6	Untereinheit d der V0 integralen Membrandomäne der V-ATPase
YML110C	COQ5	2-Hexaprenyl-6-Methoxy-1,4-Benzoquinon-Methyltransferase
YMR021C	MAC1	Kupfer-wahrnehmender Transkriptionsfaktor
YMR035W	IMP2	Katalytische Untereinheit des mt Innenmembran-Peptidase-Komplexes
YMR064W	AEP1	Benötigt für die Expression des mitochondrialen OLI1 Gens
YMR066W	SOV1	Mitochondriales Protein unbekannter Funktion
YMR097C	MTG1	Mutmaßliche GTPase; essentiell für respiratorische Kompetenz
YMR098C	ATP25	mt Protein; benötigt für Stabilität der OLI1 mRNA
YMR150C	IMP1	Katalytische Untereinheit des mt Innenmembran-Peptidase-Komplexes
YMR158W	MRPS8	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YMR228W	MTF1	Mitochondriale RNA-Polymerase-Spezifitätsfaktor

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YMR256C	COX7	Untereinheit VII der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)
YMR257C	PET111	mt translatorischer Aktivator spezifisch für die COX2 mRNA
YMR267W	PPA2	mt inorganische Pyrophosphatase
YMR286W	MRPL33	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YMR287C	DSS1	3'-5' Exoribonuklease; Komponente des mt Degradosoms
YMR293C	HER2	Untereinheit des trimeren GatFAB Amido-Transferase-Komplexes (AdT)
YNL005C	MRP7	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNL052W	COX5A	Untereinheit Va der Cytochrom-c-Oxidase
YNL073W	MSK1	Mitochondriale Lysin-tRNA-Synthetase
YNL080C	EOS1	Involviert in N-Glykosylierung; nicht essentiell
YNL081C	SWS2	Vermutliches mt ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YNL177C	MRPL22	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNL184C	YNL184C	Protein unbekannter Funktion
YNL213C	RRG9	Protein unbekannter Funktion
YNL284C	MRPL10	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNR036C	MRPS12	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YNR037C	RSM19	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YNR041C	COQ2	Para-Hydroxybenzoat-Polyprenyl-Transferase
YNR045W	PET494	mt translatorischer Aktivator spezifisch für COX3 mRNA
YNR048W	YNR048W	Potentielle nicht-katalytische Untereinheit der Phospholipid-Translokase Dnf3
YOL033W	MSE1	Mitochondriale Glutamyl-tRNA-Synthetase
YOL071W	SDH5	Benötigt für Flavinylierung von Sdh1
YOL096C	COQ3	O-Methyltransferase; benötigt in der Ubiquinon-Biosynthese
YOR033C	EXO1	5'-3' Exonuklease- und Flap-Endonuklease
YOR065W	CYT1	Cytochrom-c1; Komponente der mt Atmungskette
YOR125C	CAT5	Benötigt für Ubiquinon-Biosynthese (Coenzyme-Q)
YOR150W	MRPL23	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YOR158W	PET123	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YOR187W	TUF1	Mitochondrialer Translationselongationsfaktor Tu (EF-Tu)
YOR200W	YOR200W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YOR201C	MRM1	Ribose-Methyltransferase; modifiziert konservierte Nukleotide in mt 21S rRNA
YOR205C	GEP3	Benötigt für Biogenese der mt kleinen Untereinheit des Ribosoms
YOR211C	MGM1	mt GTPase; in einem Komplex mit Ugo1 und Fzo1
YOR212W	STE4	Untereinheit beta des G-Proteins
YOR330C	MIP1	Mitochondriale DNA-Polymerase-gamma
YOR331C	YOR331C	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YOR350C	MNE1	Involviert in Spleißen des Gruppe I aI5-beta Introns aus COX1 mRNA
YOR358W	HAP5	Untereinheit des Hap2/3/4/5 CCAAT-Binde-Komplexes
YOR371C	GPB1	Mehrstufiger Regulator des cAMP-PKA-Signalwegs
YPL005W	AEP3	Peripheres mitochondriales Innenmembranprotein

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YPL006W	NCR1	Vakuoläres Membranprotein
YPL013C	MRPS16	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YPL029W	SUV3	ATP-abhängige RNA-Helikase
YPL049C	DIG1	MAP-Kinase-abhängiger Inhibitor des Ste12 Transkriptionsfaktors
YPL059W	GRX5	Glutathion-abhängige Oxidoreduktase
YPL078C	ATP4	Untereinheit b des Stators der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YPL097W	MSY1	Mitochondriale Tyrosyl-tRNA-Synthetase
YPL118W	MRP51	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YPL172C	COX10	Häm-A:Farnesyltransferase
YPL173W	MRPL40	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YPL254W	HFI1	Adaptorprotein; benötigt für Stabilität des SAGA-Komplexes
YPL262W	FUM1	Fumarase; wandelt Fumarsäure zu L-Apfelsäure im TCA-Zyklus
YPL271W	ATP15	Epsilon-Untereinheit des F ₁ -Sektors der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YPR047W	MSF1	Mitochondriale Phenylalanyl-tRNA-Synthetase
YPR067W	ISA2	Benötigt für Reifung des mt [4Fe-4S]-Proteins
YPR100W	MRPL51	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YPR116W	RRG8	Funktion unbekannt; benötigt für mt Genom-Erhalt
YPR124W	CTR1	Kupfer-Transporter der Plasmamembran

Mit den 213 Genen des Überlapps wurde eine *GO (Gene Ontology) Enrichment* Suche in der *Saccharomyces Genome Databank (SGD)* durchgeführt, um zu sehen, bei welchen Prozessen diese Gene vermehrt auftauchen (siehe Abb. 11) (Costanzo *et al.*, 2014). Dazu werden auf der SGD Seite alle Treffer des Screens angegeben und des Weiteren alle Gene, die im jeweiligen Screen verwendet wurden, als Hintergrund. Dies sind die nicht essentiellen Gene der *MATa* Deletionsbibliothek ohne die Stämme, welche bereits vor den Screens nicht mehr wachsen konnten (siehe Anhang, Tab. 13). Ein Grund dafür war, dass diese Hefestämme ein sehr langsames Wachstum aufweisen und deshalb mit der Zeit verloren gegangen sind. Eine weitere Möglichkeit waren unebene Platten, die durch Ungenauigkeiten beim Gießen entstanden sind. Des Weiteren könnten die Ecken der Platten durch eine zu trockene Luft bei der Inkubation leicht abgefallen sein. Dadurch kam der Pin bei diversen Passageschritten nicht mehr an alle Stämme, wodurch es zu Verlusten einiger Deletionsstämme kam. Bei der *GO Enrichment* Analyse wird berechnet, ob bei den Treffern prozentual mehr Gene einer Funktion gefunden wurden als prozentual im Hintergrund vorliegen. Ist dies der Fall, dann liegt eine Anreicherung vor. Somit kann anhand dieses Hilfsmittels erkannt werden, ob viele Gene aus einem Prozess, einer Funktion oder einer Komponente auftauchen und mögliche Funktionen

des unbekanntes Proteins davon ableiten. Wenn zum Beispiel vier von fünf Komponenten eines Komplexes auftauchen, dann ist es wahrscheinlich, dass dieser Komplex bei der untersuchten Funktion involviert ist. Des Weiteren dient es auch als Kontrolle. Wenn ein Prozess, welcher in einem Screen erwartet wird, angereichert vorliegt, dann verleiht dies dem Screen Glaubwürdigkeit.

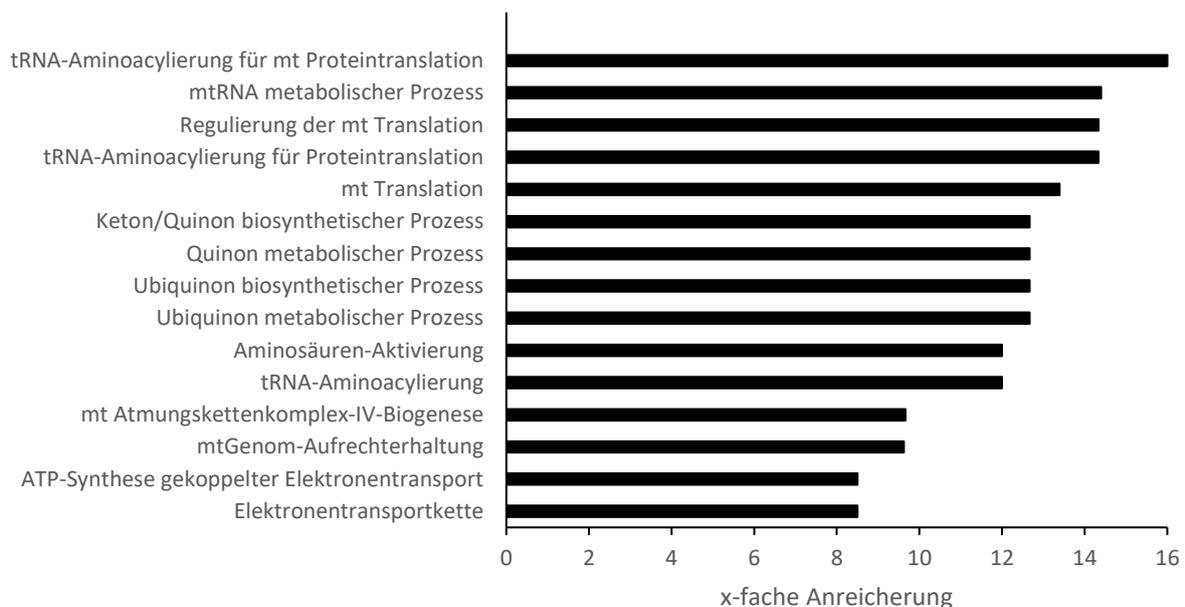


Abbildung 11: Darstellung der *GO Enrichment* Analyse in der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002). Gesucht wurde nach Prozessen der Zelle, bei welchen die Gene beteiligt sind, bei einem p-Wert von 0,01. Angegeben ist die x-fache Anreicherung in diesen Genen im Gegensatz zu den gescreenten nicht essentiellen Genen der *MATa* Deletionsbibliothek im Hintergrund.

Bei der *GO Enrichment* Analyse sind vor allem Prozesse der mitochondrialen Translation wie tRNA-Aminoacylierung oder Regulierung der Translation angereichert (siehe Abb. 11). Auch bei dem mtGenom-Erhalt und Prozessen in der Atmungskette gibt es eine Anreicherung. Dies passt zu der Hypothese, dass diese Stämme ihre mtDNA nach der Cytoduktion sofort wieder verlieren auf Grund von Defekten in der Replikation, Transkription und Translation. Dadurch wird der Cytoduktionsscreen vertrauenswürdig. Des Weiteren ist der Überlapp zwischen den beiden Durchgängen mit 213 Stämmen sehr groß (siehe Tab. 7). Im ersten Durchgang sind 56 Stämme aufgetaucht, die im zweiten Durchgang nicht mehr dabei waren und beim zweiten Durchgang konnten 18 Stämme zusätzlich zum ersten Durchgang gefunden werden (siehe Anhang, Tab. 14).

Die Cyto duktion von wildtypischer mtDNA wurde bereits zuvor in der Zellbiologie der Universität Bayreuth manuell mit einem Stempel mit ausgewählten Stämmen der *MAT α* Deletionsbibliothek durchgeführt (Merz und Westermann, 2009). Dabei wurden 252 Deletionsmutanten gefunden, welche nicht cytoduzierbar waren. Im Überlapp zwischen dieser Arbeit und der Arbeit von Merz und Westermann, 2009, befinden sich 119 Stämme (34,4%) (siehe Abb. 12).

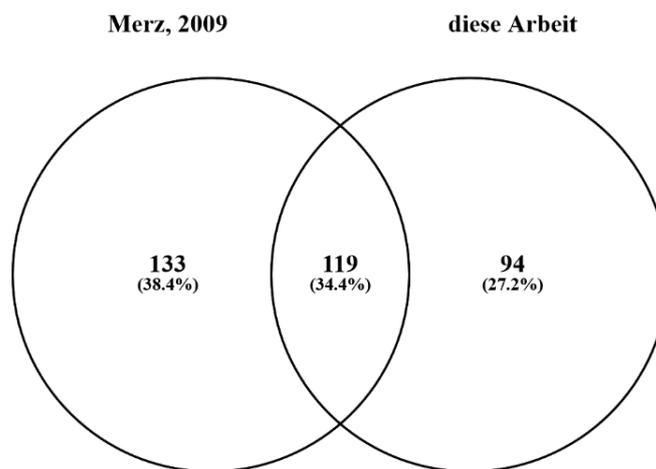


Abbildung 12: Vergleich aller Stämme, welche nach Cyto duktion von *rho⁺* mtDNA *pet* sind bei Merz und Westermann 2009 (Klasse I und III) und in dieser Arbeit (Überlapp der Cyto duktion). Das Venn-Diagramm wurde mit dem Online-Programm Venny erstellt (Oliveros, 2007-2015).

In der Arbeit von Merz und Westermann wurden alle untersuchten *pet* Stämme in vier Klassen eingeteilt (Merz und Westermann, 2009). Zu Klasse I zählen alle Stämme, welche nicht cytoduzierbar sind und auch nicht durch Paarung mit $\Delta mip1$ gerettet werden konnten. Das Gen *MIP1* kodiert für die mitochondriale DNA-Polymerase (Genga *et al.*, 1986). Fehlt dieses Gen, dann kann das mitochondriale Genom nicht mehr repliziert werden und geht mit der Zeit verloren. Daher kann $\Delta mip1$ nicht auf YPG wachsen. Wird nun $\Delta mip1$ mit einem weiteren Deletionsstamm gekreuzt, dann werden im Zellkern beide Deletionen komplementiert und wieder funktionsfähiges Mip1 und das entsprechende Protein gebildet. Sind sekundäre Effekte wie durch Kerngenom erworbener Atmungsdefekt dafür verantwortlich, dass die Hefen, die eigentlich mtDNA besitzen, nicht mehr wachsen können, dann werden diese aufgehoben und die Stämme können wieder auf YPG wachsen.

Auch Klasse III Mutanten sind nicht durch Cyto duktion *rho*⁺ geworden. Diese wurden jedoch durch die *Δmip1* Komplementation gerettet. Klasse II Deletionsstä mme wurden sowohl durch Cyto duktion als auch durch *Δmip1* Paarung gerettet. Die Klasse IV Stämme konnten cytoduziert werden, wurden aber nicht *rho*⁺ durch Komplementation mit dem Testerstamm *Δmip1* (Merz und Westermann, 2009). Es wird vermutet, dass die Mutanten der Klasse I für den mtDNA-Erhalt oder für die respiratorische Atmung wichtig sind. In den Klasse II Mutanten haben sich vermutlich über die Zeit Schäden an den Mitochondrien angehäuft. In der Klasse III sind Gene, welche für die Atmung, aber nicht für den mtGenom-Erhalt wichtig sind, und die Klasse IV beinhaltet Deletionsstä mme, welche für die Atmung entbehrlich sind, aber zum Teil die mtDNA verlieren (Merz und Westermann, 2009).

Von der neu erhaltenen *MATa rho*⁺ Deletionsbibliothek wurde ein Glycerinstock angelegt, denn diese Bibliothek war Ausgangspunkt für drei nachfolgende Screens (siehe 3.1.4., 3.1.6. und 3.1.7.).

3.1.4. mtDNA-Verlust über die Zeit (5 Mal YPD)

Nachdem die *MATa* Deletionsbibliothek erst *rho*⁰ und anschließend via Cyto duktion wieder *rho*⁺ gemacht worden war, sollte der mtDNA-Verlust auf Zeit beobachtet werden, um Stämme zu finden, welche auf Dauer ihre mtDNA verlieren. Dazu wurden die Platten nach der *rho*⁺ Cyto duktion von der YPG-Ausgangsplatte fünf Mal auf YPD gestempelt, um den Hefen die Zeit zu geben ihre mtDNA zu verlieren. Von den YPD-Platten wurde nach jeder Passage auch auf YPG gestempelt, um zu analysieren, ob die Stämme noch ihr mtGenom besitzen oder ob sie bereits *pet* sind (siehe Abb. 13).

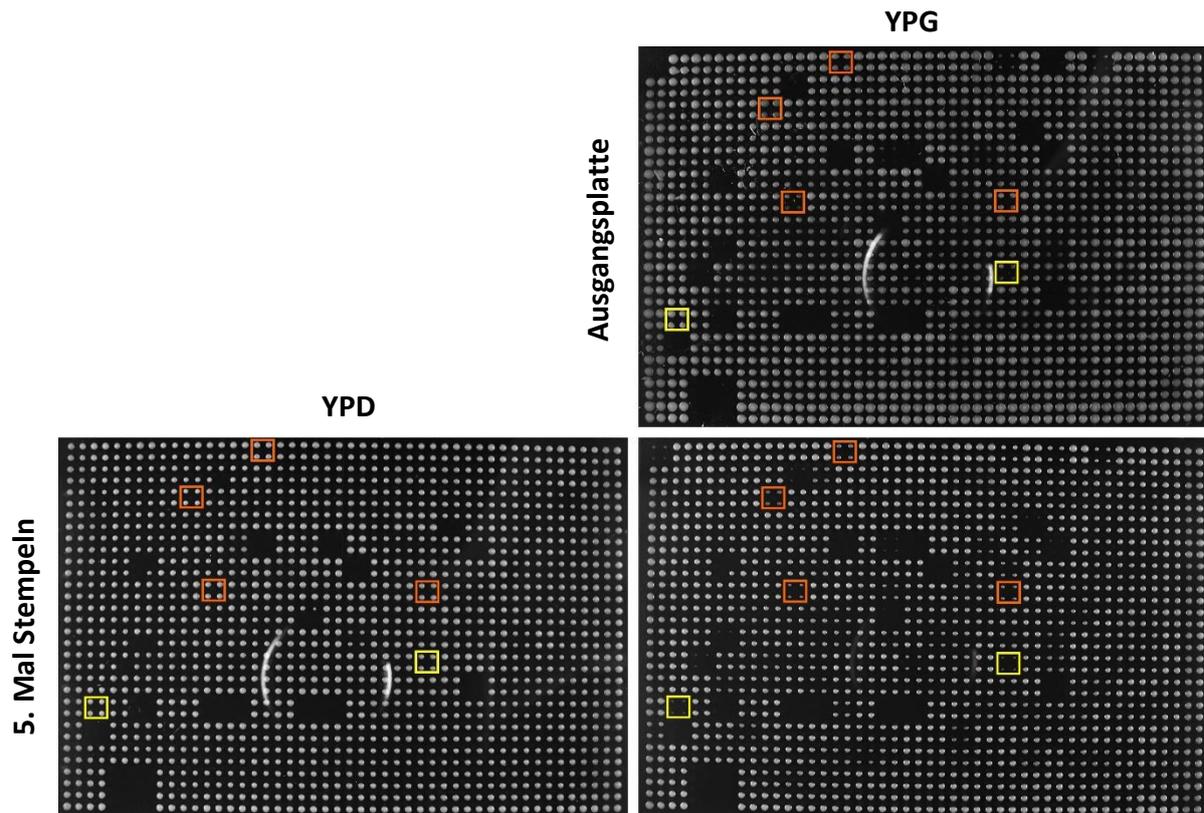


Abbildung 13: Darstellung der Platte 8 vom 2. Durchgang des Screens mtDNA-Verlust über die Zeit. Die Stämme (*rho*⁺) wurden aus dem Glycerinstock auf YPG gestempelt (= Ausgangsplatte). Von der Ausgangsplatte wurde fünf Mal auf YPD gestempelt und von da jeweils auf YPG. Die Inkubationszeit der YPG-Platten betrug jeweils zwei Tage und die der YPD-Platten einen Tag. Ausgewertet wurde nach dem 5. Mal Stempeln auf YPD. Mit gelben Kästchen sind Stämme markiert, die auf der Ausgangsplatte und nach dem 5. Mal Stempeln auf YPD gewachsen sind, aber nicht auf YPG. Bei den mit Orange markierten Kästchen zeigten die Stämme nach dem 5. Mal Stempeln auf YPG einen schlechten Wuchs.

Der Screen wurde zweimal durchgeführt, wobei beim ersten Durchgang nur acht Stämme gefunden wurden, welche nach fünfmaligem Stempeln gar nicht mehr oder nur schlecht auf YPG gewachsen sind (siehe Abb. 13; Tab. 8). Beim zweiten Durchgang konnten 27 Deletionsstämme beobachtet werden, welche nach fünf Mal Passagieren auf YPD *pet* geworden sind. Die Stämme $\Delta emi1$ und $\Delta rrg7$ sind dabei als einzige in beiden Durchgängen vertreten. Bei der Mutante $\Delta emi1$ ist auch noch anzumerken, dass der Stamm nicht nur einmal, sondern zweimal in der *MATa* Deletionsbibliothek vertreten ist und jeweils beide Replikate, die auf zwei verschiedenen Platten lokalisiert sind, *pet* werden. Somit ist *EMI1* ein glaubwürdiger Treffer und wurde später zusammen mit *RRG7* noch weiter untersucht (siehe 3.2.1). Der Deletionsstamm $\Delta rrg7$ ist auch bei dem Screen von Merz und Westermann aufgetaucht und befand sich dort in der Klasse II (Merz und Westermann, 2009). Das bedeutet $\Delta rrg7$ konnte sowohl nach der Cytoduktion als auch nach der Paarung mit $\Delta mip1$ wieder auf

YPG wachsen. Auch in dieser Arbeit wurde $\Delta rrg7$ durch Cytoduktion gerettet und ist erst mit der Zeit *pet* geworden.

Tabelle 8: Auflistung der Deletionsstämme aus dem 1. Durchgang, 2. Durchgang und dem Überlapp, die mit der Zeit (5-maliges Stempeln auf YPD und von dort auf YPG) *pet* wurden. Angegeben sind der systematische Name, der Standardname und die Funktion des entsprechenden Proteins. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002; yeastgenome.org).

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
1. Durchgang		
<i>YBL013W</i>	<i>FMT1</i>	Methionyl-tRNA-Formyltransferase
<i>YDL160C</i>	<i>DHH1</i>	Zytoplasmatische DEAD-box-Helikase
<i>YDR512C</i>	<i>EMI1</i>	Funktion unbekannt; Induktion von Transkriptionsfaktor <i>IME1</i>
<i>YFL001W</i>	<i>DEG1</i>	tRNA:Pseudouridin-Synthase
<i>YGL191W</i>	<i>COX13</i>	Untereinheit VIa der Cytochrom-c-Oxidase
<i>YGL218W</i>	<i>YGL218W</i>	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
<i>YNR018W</i>	<i>RCF2</i>	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit
<i>YOR305W</i>	<i>RRG7</i>	Funktion unbekannt
2. Durchgang		
<i>YBL042C</i>	<i>FU1</i>	Uridin-Permease
<i>YBR026C</i>	<i>ETR1</i>	2-Enoyl-Thioester-Reduktase
<i>YDL032W</i>	<i>YDL032W</i>	Fragwürdiger <i>open reading frame</i> ; überlappt teilweise mit <i>SLM3/YDL033C</i>
<i>YDR008C</i>	<i>YDR008C</i>	Fragwürdiger <i>open reading frame</i> ; überlappt teilweise mit <i>TRP1/YDR007W</i>
<i>YDR116C</i>	<i>MRPL1</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
<i>YDR512C</i>	<i>EMI1</i>	Funktion unbekannt; Induktion von Transkriptionsfaktor <i>IME1</i>
<i>YGL231C</i>	<i>EMC4</i>	Mitglied des konservierten ER-Transmembran-Komplex
<i>YGR174C</i>	<i>CBP4</i>	Mitochondriales Protein, wichtig für die Assemblierung des Cytochrom-bc1-Komplex
<i>YHR120W</i>	<i>MSH1</i>	DNA-Bindeprotein der Mitochondrien
<i>YKL087C</i>	<i>CYT2</i>	Cytochrom-c1-Häm-Lyase
<i>YKL167C</i>	<i>MRP49</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
<i>YLR023C</i>	<i>IZH3</i>	Membranprotein, beteiligt an Zink-Ion-Homöostase
<i>YLR204W</i>	<i>QRI5</i>	Mitochondriales Innenmembranprotein; wird benötigt für die Akkumulierung von gespleißter <i>COX1</i> mRNA;
<i>YLR393W</i>	<i>ATP10</i>	Assemblierungsfaktor für den F_0 -Sektor der mitochondrialen F_1F_0 -ATP-Synthase
<i>YML030W</i>	<i>RCF1</i>	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit
<i>YML055W</i>	<i>SPC2</i>	Untereinheit des Signal-Peptidase-Komplexes
<i>YML081C-A</i>	<i>ATP18</i>	Untereinheit der mitochondrialen F_1F_0 -ATP-Synthase
<i>YML120C</i>	<i>NDI1</i>	NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase
<i>YMR072W</i>	<i>ABF2</i>	Mitochondriales DNA-Bindeprotein
<i>YMR067C</i>	<i>UBX4</i>	UBX-Domäne-enthaltendes Protein, interagiert mit Cdc48
<i>YNL117W</i>	<i>MLS1</i>	Malat-Synthase, Enzym des Glyoxylat-Zyklus
<i>YNL139C</i>	<i>THO2</i>	Untereinheit des THO-Komplex

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
<i>YNR020C</i>	<i>ATP23</i>	Mutmaßliche Metalloprotease der mt Innenmembran
<i>YOL023W</i>	<i>IFM1</i>	Mitochondrialer Translationsinitiations-Faktor 2
<i>YOR305W</i>	<i>RRG7</i>	Funktion unbekannt
<i>YOR354C</i>	<i>MSC6</i>	<i>Multicopy</i> Suppressor von <i>HER2</i> , involviert in mitochondrialer Translation
<i>YPL056C</i>	<i>LCL1</i>	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
Überlapp		
<i>YDR512C</i>	<i>EMI1</i>	Funktion unbekannt; Induktion von Transkriptionsfaktor <i>IME1</i>
<i>YOR305W</i>	<i>RRG7</i>	Funktion unbekannt

Der Überlapp der beiden Durchgänge ist mit den zwei Stämmen $\Delta emi1$ und $\Delta rrg7$ sehr gering (siehe Tab. 8). Auch unterscheidet sich die Anzahl der Treffer beträchtlich. Die Durchführung beider Durchgänge erfolgte ohne Änderungen. Somit war es überraschend, eine derart große Variation zwischen den Durchgängen zu beobachten.

Proteine von Deletionsstämmen, welche mit der Zeit ihr mtGenom verlieren, haben sehr wahrscheinlich keine Funktion bei Transkription, Translation oder Replikation der mtDNA. Sonst wäre der Effekt unmittelbar vorzufinden. Diese Stämme erwerben möglicherweise nach mehreren Generationen Fehlfunktionen in den Mitochondrien und insbesondere der mitochondrialen DNA. In Tabelle 8 werden auch Stämme aufgeführt, welche direkt nach dem ersten Stempeln auf YPD *pet* sind. So wurden auch Stämme, deren Proteine an der Translation beteiligt sind, wie *IFM1* oder *MSC6*, gefunden (siehe Tab. 8) (Garofalo *et al.*, 2003; Moda *et al.*, 2016). Es folgte eine *GO Enrichment* Analyse aller Gene aus Tabelle 8 in SGD (siehe Tab. 8; siehe Abb. 14).

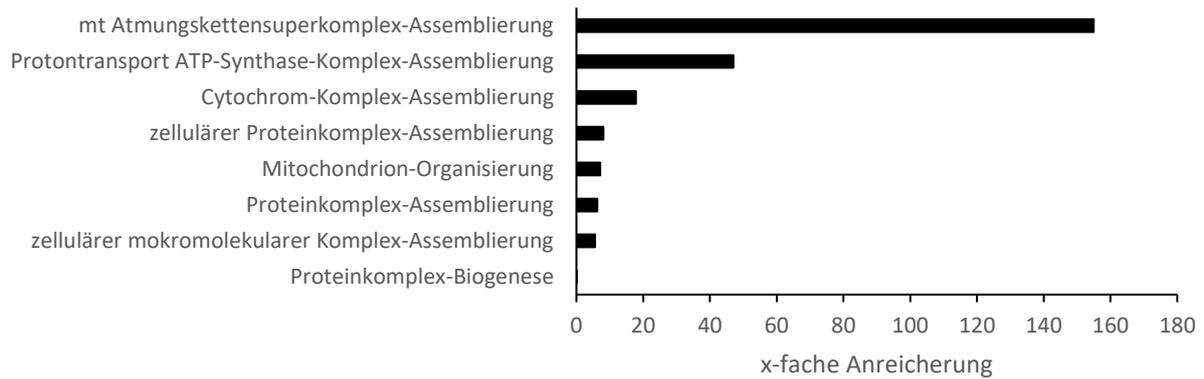


Abbildung 14: Darstellung der *GO Enrichment* Analyse in der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002). Gesucht wurde nach Prozessen der Zelle, bei welchen die Gene beteiligt sind, bei einem p-Wert von 0,01. Angegeben ist die x-fache Anreicherung in diesen Genen im Gegensatz zu den gescreenten nicht essentiellen Genen der *MATa* Deletionsbibliothek im Hintergrund.

Die mitochondriale Atmungskettensuperkomplex-Assemblierung ist 155-fach bei dem Suchbegriff „Prozesse“ angereichert (siehe Abb. 14). Die einzigen beiden Deletionsstämme, die zu diesem Prozess zählen, Δcox13 und Δrcf1 (Vukotic *et al.*, 2012), wurden beide in dem Screen mtDNA-Verlust über die Zeit gefunden. Des Weiteren wurden Prozesse als angereichert vorgefunden, die mit der Atmungskette im Zusammenhang stehen, wie Cytochrom-Komplex-Assemblierung. Es war zu erwarten, dass wenn die mtDNA erst nach einiger Zeit verloren geht, Prozesse wie Translation oder Replikation nicht vordergründig darin involviert sind.

3.1.5. mtDNA-Verlust unabhängig von der Atmung (*ARG8^m*)

Als nächstes wurde ein Screen durchgeführt, um den mitochondrialen Genomverlust unabhängig von der Atmung zu analysieren und so vorwiegend Proteine zu erhalten, die an der Replikation, Transkription oder Translation der mtDNA beteiligt sind. Die Atmung ist abhängig von der mtDNA. Wenn die Hefen nicht mehr auf YPG wachsen können, dann kann das daran liegen, dass sie keine oder fehlerhafte mtDNA besitzen, was zu einem Defekt der Atmung führt. Es kann aber auch sein, dass *pet* Stämme zwar wildtypische mtDNA besitzen, aber einen Respirationsdefekt haben, weil kern-kodierte Atmungsketten-Proteine fehlerhaft sind. Um den Aspekt der Atmung nicht berücksichtigen zu müssen, wurde mit der mitochondrialen *ARG8^m* DNA gearbeitet (Steele *et al.*, 1996).

Das Protein Arg8 ist eine Acetylornithin-Aminotransferase und katalysiert den 4. Schritt in der Arginin-Biosynthese (Jauniaux *et al.*, 1978). Fehlt dieses Enzym, dann können die Hefen nicht mehr auf Medium ohne Arginin wachsen und sind für dieses auxotroph. Wird nun in die Zellen mittels Cytofusion mitochondriale DNA eingebracht, welche das Gen *ARG8* trägt, dann können die Hefen wieder ohne Arginin Wachstum zeigen. Verlieren die Stämme ihr mtGenom, dann werden sie wieder Arginin auxotroph, weil sie somit auch das mitochondrial kodierte *ARG8* Gen, welches in der Matrix lokalisiert, verlieren. Mit dieser Methode können die Nebenwirkungen der Respiration außer Acht gelassen werden. Damit das jedoch funktioniert, musste zuerst das im Nukleus kodierte Gen *ARG8* deletiert werden. Dazu wurde eine SGA durchgeführt, um in die *MATa* Deletionsbibliothek eine Doppeldeletion $\Delta yfg\Delta arg8$ einzuführen.

Bei der SGA wird normalerweise die einzuführende Deletion an den Nourseothricin-Marker gekoppelt. Der Starterstamm besitzt außerdem noch Haploidenselektionsmarker. Zusammen mit dem Kanamycinmarker, welcher an *Δyfg* gekoppelt ist, kann nach der Paarung, Diploidenselektion und Sporulation, auf Haploide und anschließend auf die Doppelmutanten selektiert werden (Tong *et al.*, 2001; Baryshnikova *et al.*, 2010;). Dies ist hier aber nicht möglich, da die Chemikalie Canavanin, welche sonst zur Haploidenselektion genutzt wird, ein Struktur analogon zu Arginin ist (Rosenthal und Harper, 1996). Deswegen kann Canavanin statt Arginin bei der Proteinsynthese eingebaut werden, was zu ungefalteten und funktionslosen Proteinen führt (Schwartz und Maas, 1960). Ist aber *CAN1*, welches für die Arginin-Permease der Plasmamembran kodiert, deletiert, so kann weder Canavanin noch Arginin von der Hefezelle aufgenommen werden (Ahmad und Bussey, 1986). Somit sind die Zellen resistent gegenüber Canavanin. Da die Hefen wegen der fehlenden Arginin-Permease kein Arginin aus dem Medium aufnehmen können und selbst wegen der *ARG8* Deletion im Kern kein Arginin produzieren können, konnte Canavanin nicht als Haploidenselektionsmarker verwendet werden. Deswegen wurde ein anderer Haploidenmarker verwendet. Das funktionsfähige *URA3* Gen wurde an die Stelle des deletierten *Δura3* über homologe Rekombination eingebracht und 5'-FOA zur Selektion auf Haploide verwendet und so der Starterstamm Y8205 $\Delta arg8 URA3$ hergestellt (für ausführliche Erklärung der SGA bzw. der Konstruktion des Starterstammes siehe 1.6. bzw. 2.2.1.).

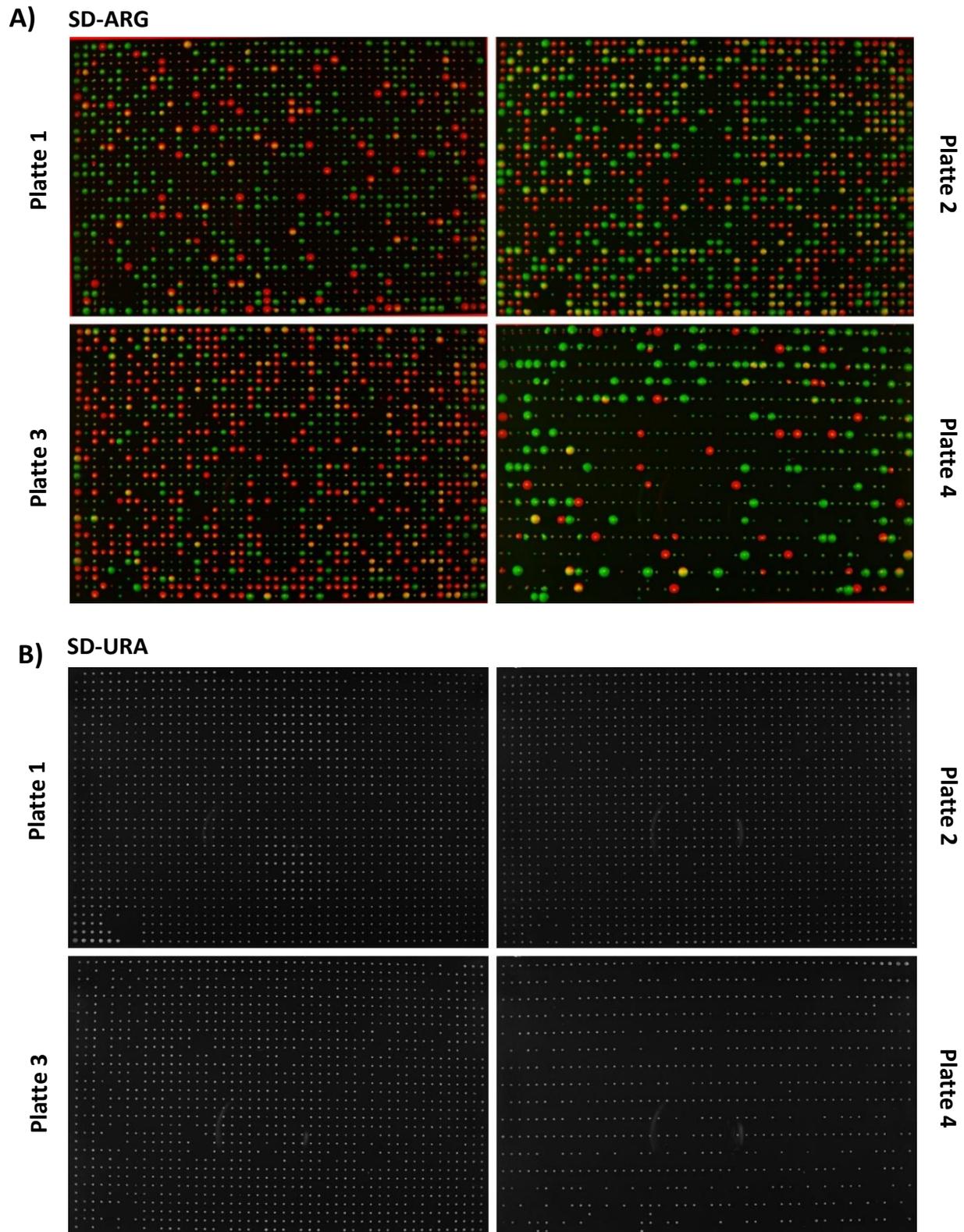


Abbildung 15: Umwandlung der Stämme in $\Delta arg8$ mittels SGA. A) Darstellung der vier SD-ARG-Platten (1536er Format, jedes Replikat entspricht einem Stamm) nach beiden Durchgängen der SGA. Es sind Stämme dargestellt, die nach dem ersten SGA Durchgang (grüne Punkte), nach dem zweiten SGA Durchgang (rote Punkte) oder nach beiden Durchgängen (gelbe Punkte) noch auf SD-ARG wachsen können. Die Bilder der SD-ARG-Platten wurden mit Photoshop eingefärbt und übereinandergelegt. **B)** Darstellung der vier SD-URA-Platten nach dem ersten Durchgang der SGA (1536er Format, jedes Replikat entspricht einem Stamm). Es ist kein Wachstum der Stämme auf SD-URA ersichtlich. Bei den Punkten handelt es sich um Zellmaterial, welches beim Stempeln übertragen worden ist. Die Platten von **A)** und **B)** wurden jeweils zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Mit diesem Starterstamm wurde die SGA mit der *MATa* Deletionsbibliothek durchgeführt, um die Deletionsbibliothek $\Delta arg8$ zu machen. Dazu wurde der Starterstamm mit der Deletionsbibliothek auf YPD gepaart. Es folgten zwei Diploidenselektionsrunden auf SCD-URA+G418. Anschließend wurden die Stämme auf Sporulationsplatten überführt und zehn Tage inkubiert. Danach folgten die Haploidenselektion auf SCD-LEU+5'-FOA+Thia, die Selektion auf die ursprüngliche Deletion auf SCD-LEU+5'-FOA+Thia+G418 und schließlich auf die Doppelmutanten auf SCD-LEU+5'-FOA+Thia+G418+NTC.

Nach der SGA wurden die Platten auf Medium ohne Arginin (SD-ARG) passagiert (siehe Abb. 15A; grüne Punkte). Es konnten jedoch noch 1.071 Deletionsstämme, was 21,8% der gescreenten *MATa* Bibliothek entspricht, auf SD-ARG wachsen, obwohl sie eigentlich $\Delta arg8$ sein sollten. Daher wurde die SGA wiederholt, wobei die Medien und Passagierschritte gleichblieben. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass bei der Paarung genau 24 h inkubiert wurde, während bei dem ersten Durchgang die Platten ein paar Stunden weniger inkubiert worden waren. Auch diese Stämme wurden zum Schluss auf SD-ARG gestempelt (siehe Abb. 15A; rote Punkte). Es konnte beobachtet werden, dass diesmal 1.053 Stämme, entsprechend 21,4% der gesamten Bibliothek, auf Medium ohne Arginin Wachstum zeigen. Werden beide Durchgänge zusammengenommen, so konnte bei 277 Stämmen weder beim ersten noch beim zweiten Durchgang das *ARG8* Gen deletiert werden. Dies entspricht 5,6% der gescreenten nicht essentiellen Gene, was für das weitere Vorgehen vertretbar war. Interessant ist auch die Verteilung der Wachstumszeigenden Stämme auf den SD-ARG-Platten. So befinden sich auf der ersten Platte beim ersten Durchgang 376 Stämme und beim zweiten Durchgang 127 Stämme, die noch wachsen können. Somit scheint der zweite Durchgang bei der ersten Platte besser funktioniert zu haben. Bei der zweiten Platte jedoch sind es beim zweiten Durchgang 476 Stämme, wohingegen es beim ersten Durchgang 357 Stämme sind. Dies bedeutet, dass der zweite Durchgang nicht auf allen Platten ein besseres Ergebnis geliefert hat. Der Unterschied zwischen den Durchgängen kann möglicherweise mit den angepassten Inkubationszeiten erklärt werden, aber der unterschiedliche Erfolg auf den beiden Platten des gleichen Durchgangs nicht.

Das Mittel 5'-FOA wirkte sehr gut, denn keiner der Deletionsstämme konnte nach den beiden SGA Durchgängen auf Medium ohne Uracil wachsen (siehe Abb. 15B). Erstaunlich ist die große Anzahl an Stämmen, welche das funktionsfähige *ARG8* Gen behalten haben. Dies könnte

bedeuten, dass bei jeder SGA ein nicht zu unterschätzender Anteil an Stämmen auftritt, bei welchen die SGA nicht funktioniert hat und die Stämme noch das funktionsfähige Gen tragen. Vor allem positive Treffer bei SGA-Screens sind oft nicht so gut reproduzierbar wie negative Treffer. Vielleicht hat auch bei diesen die SGA nicht funktioniert. Um einen Eindruck zu bekommen, wie groß der Effekt der homologen Rekombination wirklich ist, müssten mehrere SGAs mit weiteren Genen wie $\Delta arg1$ oder $\Delta arg2$, deren Proteine auch in der Synthese von Arginin eine Rolle spielen (Jauniaux *et al.*, 1978), durchgeführt werden so wie in dieser Arbeit mit $\Delta arg8$. Durch das Stempeln auf Medium ohne Arginin kann direkt überprüft werden, bei wie viel Prozent der Stämme die neue Mutation erfolgreich eingebracht worden ist. Dadurch kann abgeschätzt werden, wie groß die Fehlerquote bei einer SGA durchschnittlich sein müsste.

Insgesamt sind es 277 Mutanten, welche weder beim ersten noch beim zweiten Durchgang der SGA $\Delta arg8$ geworden sind. Nichtsdestotrotz wurden beide Durchgänge der SGA durch mehrmaliges Stempeln auf EtBr rho^0 gemacht und ein Glycerinstock angelegt (siehe 3.1.2.) (Fox *et al.*, 1991). Beide Durchgänge wurden anschließend auf einer Platte vereint (1536er Format; Replikat 1 und 2 sind vom ersten SGA-Durchgang und Replikat 3 und 4 sind vom zweiten SGA-Durchgang). Parallel wurde der Cytoduktionsdonorstamm J1361/ $ARG8^m$, welcher rho^+ ist und das $ARG8$ Gen enthält, hergestellt (für ausführliche Erklärung zur Konstruktion des $ARG8^m$ Donorstamms siehe 2.2.1.). Schließlich wurde mit Hilfe der Cytoduktion des Donorstammes J1361/ $ARG8^m$ die $ARG8^m$ mtDNA in die $rho^0 \Delta arg8$ Deletionsbibliothek eingebracht, wobei es zwei Durchgänge der Cytoduktion mit $ARG8^m$ gab (siehe Abb. 16).

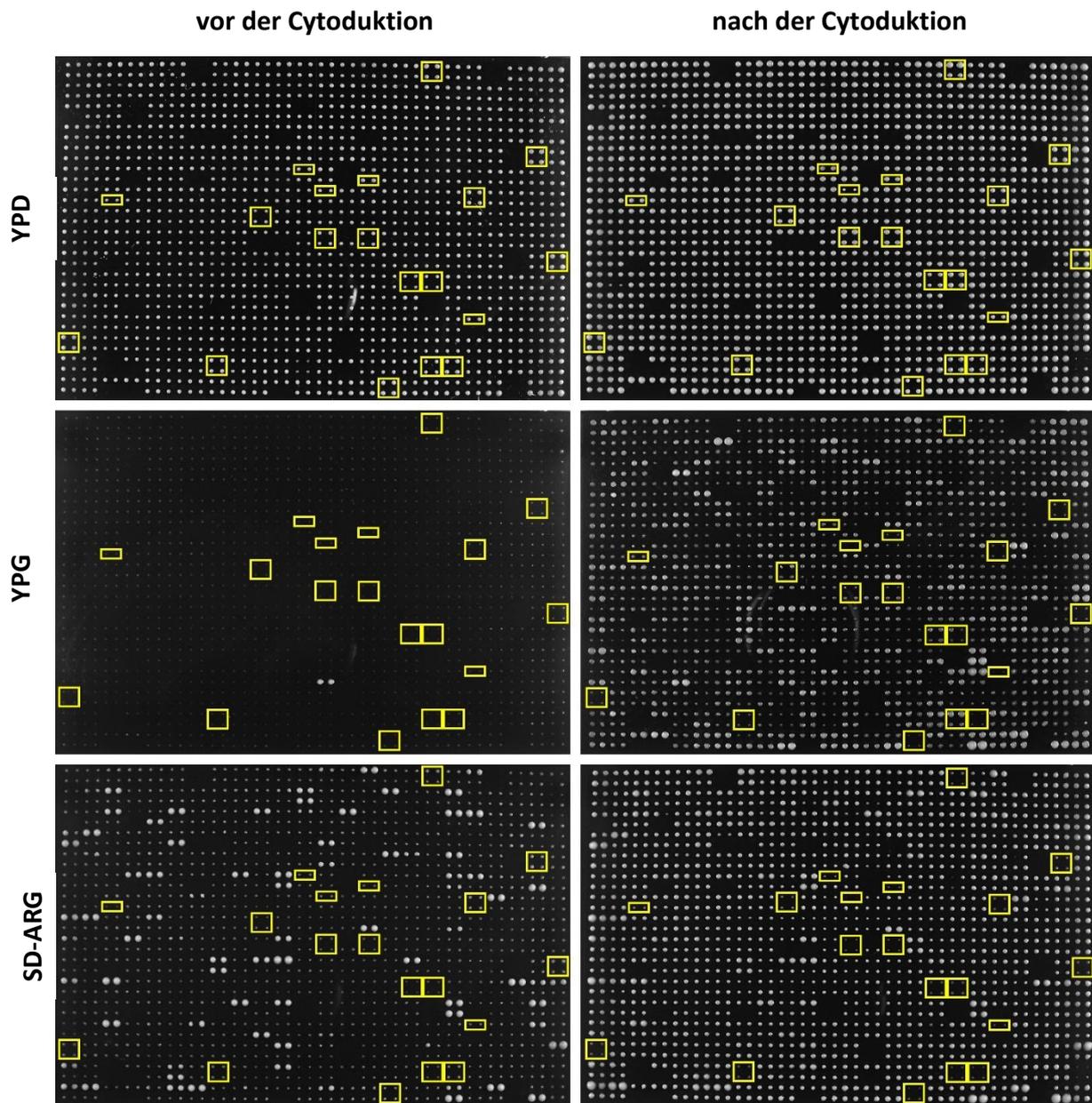


Abbildung 16: Darstellung der Platte 4 vom 1. Durchgang der Cyto duktion mit J1361/ARG8^m (*rho*⁺). Die *rho*⁰ Δ *arg8* Deletionsbibliothek wurde aus dem Glycerinstock auf YPD gestempelt und die Cyto duktion mit J1361/ARG8^m durchgeführt. Die Inkubationszeit der YPD-Platten betrug einen Tag und der YPG und SD-ARG-Platten zwei Tage. Dargestellt sind die Stämme vor und nach der Cyto duktion auf YPD, YPG und SD-ARG. Die Stämme mit gelb markierten Kästchen konnten vor der Cyto duktion auf YPD wachsen, aber nicht auf Medium ohne Arginin oder YPG. Nach der Cyto duktion können diese Stämme auf YPD wachsen, jedoch nicht auf SD-ARG. Manche Stämme zeigen Wachstum auf YPG.

Es konnten nach beiden Cyto duktionsdurchgängen mit ARG8^m 115 Stämme im Überlapp gefunden werden, welche sowohl vor als auch nach der Cyto duktion nicht auf Medium ohne Arginin wachsen konnten (siehe Abb. 16; siehe Tab. 9; siehe Anhang, Tab. 15). Gleichzeitig zeigten diese Stämme auch kein Wachstum auf YPG. Somit könnten diese Mutanten einen Defekt im Erhalt der mtDNA haben. Einige von diesen Genen, von denen die Funktion noch

nicht bekannt ist, wurden später weiter analysiert (siehe 3.2.2.). Diese Gene sind *PET130*, *RRG1*, *RRG8*, *RRG9*, *SOV1*, *YNL184C*, *YJR120W* und *YKRO23W*.

Es sind jedoch auch 14 Stämme vorhanden, welche zwar nicht auf SD-ARG wachsen konnten, dafür aber auf YPG. Dies ist im ersten Moment verwunderlich, weil sie keine mtDNA haben sollten, wenn sie nicht auf SD-ARG wachsen können. Somit sollten sie auch nicht fähig sein, auf YPG wachsen zu können. Diese Gene sind mit z.B. *ARG1*, *ARG2*, *ARG3*, *ARG4* oder auch *ADE4* vor allem Gene der Aminosäurebiosynthese (Hinnebusch, 1992). Daher ergibt es Sinn, dass, wenn bei diesen die Arginin-Produktion gestört ist, diese auch nicht mehr auf Medium ohne Arginin wachsen können, auch wenn sie ihr mitochondriales Genom noch besitzen. Des Weiteren wurden sieben Stämme ausfindig gemacht, bei denen einige Replikate auf YPG wachsen konnten und die anderen nicht und folglich das YPG-Wachstum nicht eindeutig ist. Diese Stämme wie auch die Stämme, die auf YPG wachsen konnten, wurden nicht weiter untersucht.

Tabelle 9: Auflistung der Deletionsstämme, welche nach der Cytoduktion mit J1361/*ARG8^m* (*rho⁺*) nicht auf Medium ohne Arginin wachsen können, auf YPD hingegen schon. Die Stämme sind in Gruppen zusammengefasst, welche nach der Cytoduktion nicht auf YPG wachsen können, welche auf YPG wachsen können und bei welchen es nicht eindeutig ist, ob Wachstum auf YPG besteht, da z.B. nur zwei von vier Replikaten auf YPG wachsen können. Angegeben sind der systematische Name, der Standardname und die Funktion des entsprechenden Proteins. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002; yeastgenome.org).

Systematischer Name	Standardname	Funktion des entsprechenden Proteins
Kein Wachstum auf YPG		
<i>YBL013W</i>	<i>FMT1</i>	Methionyl-tRNA-Formyltransferase
<i>YBL022C</i>	<i>PIM1</i>	ATP-abhängige Lon-Protease
<i>YBL080C</i>	<i>PET112</i>	Untereinheit des trimeren GatFAB-Amidotransferase-Komplexes (AdT)
<i>YBL090W</i>	<i>MRP21</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
<i>YBR084W</i>	<i>MIS1</i>	Mitochondriale C1-Tetrahydrofolat-Synthase
<i>YBR179C</i>	<i>FZO1</i>	Mitofusin; integrales Membranprotein; involviert in mt Außenmembran-Binden und -Fusion
<i>YBR251W</i>	<i>MRPS5</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
<i>YBR268W</i>	<i>MRPL37</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
<i>YBR282W</i>	<i>MRPL27</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
<i>YCL007C</i>	<i>YCL007C</i>	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
<i>YCR003W</i>	<i>MRPL32</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
<i>YCR024C</i>	<i>SLM5</i>	Mitochondriale Asparaginyl-tRNA-Synthetase
<i>YCR028C-A</i>	<i>RIM1</i>	ssDNA-Bindeprotein; essentiell für mtGenom-Aufrechterhaltung

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YCR046C	IMG1	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YCR071C	IMG2	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDL198C	GGC1	mt GTP/GDP-Transporter; essentiell für mt Genomaufrechterhaltung
YDL202W	MRPL11	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR065W	RRG1	Funktion unbekannt; Ansäuerung der Vakuole; mtDNA-Erhalt
YDR138W	HPR1	Untereinheit des THO/TREX-Komplexes
YDR175C	RSM24	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YDR268W	MSW1	Mitochondriale Tryptophanyl-tRNA-Synthetase
YDR296W	MHR1	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR322W	MRPL35	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR347W	MRP1	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YDR377W	ATP17	Untereinheit f des F ₀ -Sektors der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YDR405W	MRP20	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR470C	UGO1	Außenmembrankomponente der mt Fusionsmaschinerie
YEL027W	VMA3	Proteolipid-Untereinheit c der V ₀ -Domäne der H(+)-ATPase
YEL044W	IES6	Komponente des INO80-Chromatin-Remodeling-Komplexes
YEL050C	RML2	mt ribosomales Protein der großen Untereinheit (L2)
YER050C	RSM18	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YER070W	RNR1	Isosform der großen Untereinheit der Ribonukleotid-Diphosphat-Reduktase
YER087W	AIM10	Protein mit Ähnlichkeit zu tRNA-Synthetasen
YER154W	OXA1	Mitochondriale Innenmembran-Insertase
YFL016C	MDJ1	Co-Chaperon; stimuliert HSP70-Protein Ssc1-ATPase-Aktivität
YFL036W	RPO41	Mitochondriale RNA-Polymerase; synthetisiert Primer für mtDNA-Replikation
YGL107C	RMD9	mt Protein; benötigt für respiratorisches Wachstum
YGL129C	RSM23	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YGL143C	MRF1	Mitochondrialer Translations-Release-Faktor
YGR101W	PCP1	Mitochondriale Serin-Protease
YGR150C	CCM1	Mitochondriales 15S rRNA-Bindeprotein
YGR165W	MRPS35	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YGR215W	RSM27	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YGR219W	YGR219W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YGR220C	MRPL9	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YGR257C	MTM1	mt Protein der mt Carrier-Familie
YHL004W	MRP4	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YHR011W	DIA4	Vermutlich mitochondriale Seryl-tRNA-Synthetase
YHR091C	MSR1	Mitochondriale Arginyl-tRNA-Synthetase
YHR147C	MRPL6	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YJL023C	PET130	Funktion unbekannt; benötigt für respiratorisches Wachstum
YJL088W	ARG3	Ornithin-Carbamoyltransferase
YJL096W	MRPL49	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YJL157C	FAR1	CDK-Inhibitor und nukleärer Anker
YJR113C	RSM7	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YJR114W	YJR114W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YJR139C	HOM6	Homoserin-Dehydrogenase (L-Homoserin:NADP-Oxidoreduktase)
YJR144W	MGM101	Rolle in mtDNA-Reparatur (<i>recombinational</i>)
YKL002W	DID4	Klasse E Vps Protein des ESCRT-III-Komplexes
YKL003C	MRP17	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YKL016C	ATP7	Untereinheit d des Stators der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
YKL134C	OCT1	Mitochondriale Intermediat-Peptidase
YKL155C	RSM22	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YKL169C	YKL169C	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YKL170W	MRPL38	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YKL194C	MST1	Mitochondriale Threonyl-tRNA-Synthetase
YKR006C	MRPL13	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YKR055W	RHO4	Nicht-essentielle kleine GTPase
YKR085C	MRPL20	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YLR139C	SLS1	mt Membranprotein; koordiniert Expression mt kodierter Gene
YLR204W	QRI5	Mitochondriales Innenmembranprotein; wird benötigt für die Akkumulierung von gespleißter COX1 mRNA;
YLR312W-A	MRPL15	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YLR396C	VPS33	ATP-Bindeprotein; Untereinheit der HOPS- und CORVET-Komplexe
YLR410W	VIP1	Inositol-Hexakisphosphat- und Inositol-Heptakisphosphat-Kinase
YMR066W	SOV1	Mitochondriales Protein unbekannter Funktion
YMR097C	MTG1	Mutmaßliche GTPase; essentiell für respiratorische Kompetenz
YMR228W	MTF1	Mitochondriale RNA-Polymerase-Spezifitätsfaktor
YMR257C	PET111	mt translatorischer Aktivator spezifisch für die COX2 mRNA
YMR267W	PPA2	mt inorganische Pyrophosphatase
YMR286W	MRPL33	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YMR293C	HER2	Untereinheit des trimeren GatFAB-Amido-Transferase-Komplexes (AdT)
YNL005C	MRP7	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNL037C	IDH1	Untereinheit der mt NAD(+)-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase
YNL073W	MSK1	Mitochondriale Lysin-tRNA-Synthetase
YNL081C	SWS2	Vermutliches mt ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YNL177C	MRPL22	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNL184C	YNL184C	Protein unbekannter Funktion
YNL213C	RRG9	Protein unbekannter Funktion
YNL252C	MRPL17	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNL284C	MRPL10	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YNR036C	MRPS12	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YNR037C	RSM19	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YOL023W	IFM1	Mitochondrialer Translationsinitiations-Faktor 2
YOL033W	MSE1	Mitochondriale Glutamyl-tRNA-Synthetase

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
YOL039W	RPP2A	Ribosomales Protein-P2-alpha
YOR150W	MRPL23	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YOR158W	PET123	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YOR187W	TUF1	Mitochondrialer Translationselongationsfaktor Tu (EF-Tu)
YOR201C	MRM1	Ribose-Methyltransferase; modifiziert konservierte Nukleotide in mt 21S rRNA
YOR205C	GEP3	Benötigt für Biogenese der mt kleinen Untereinheit des Ribosoms
YOR219C	STE13	Dipeptidyl-Aminopeptidase; integrales Golgi-Membranprotein
YOR295W	UAF30	Untereinheit des UAF-Komplexes (<i>upstream activation factor</i>)
YOR307C	SLY41	Involviert im Transport vom ER zum Golgi
YOR330C	MIP1	Mitochondriale DNA-Polymerase-gamma
YPL005W	AEP3	Peripheres mitochondriales Innenmembranprotein
YPL013C	MRPS16	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YPL029W	SUV3	ATP-abhängige RNA-Helikase
YPL097W	MSY1	Mitochondriale Tyrosyl-tRNA-Synthetase
YPL118W	MRP51	Mitochondriales ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
YPL173W	MRPL40	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YPL180W	TCO89	Untereinheit des TORC1 (Tor1 oder Tor2-Kog1-Lst8-Tco89)
YPL183W	YPL183W	Involviert in Translation
YPR047W	MSF1	Mitochondriale Phenylalanyl-tRNA-Synthetase
YPR100W	MRPL51	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YPR116W	RRG8	Funktion unbekannt; benötigt für mt Genom-Erhalt
Wachstum auf YPG		
YBL038W	MRPL16	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
YDR114C	YDR114C	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
YDR408C	ADE8	Phosphoribosyl-Glycinamid-Transformylase
YGL218W	YGL218W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YGR061C	ADE6	Formylglycinamid-Ribonukleotid-Synthetase (FGAM)
YHR018C	ARG4	Argininosuccinat-Lyase; letzter Schritt in Arginin-Biosynthese
YIL141W	YIL141W	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YIR021W	MRS1	Spleißprotein; benötigt für Spleißen zweier mt Introns
YJL071W	ARG2	Acetylglutamat-Synthase (Glutamat-N-Acetyltransferase)
YJL088W	ARG3	Ornithin-Carbamoyltransferase
YMR300C	ADE4	Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (PRPPAT)
YNL220W	ADE12	Adenylosuccinat-Synthase; erster Schritt in der Adenosin-Monophosphat-Synthese
YOL058W	ARG1	Argininosuccinat-Synthetase; beteiligt in Arginin-Biosynthese
YOR184W	SER1	3-Phosphoserin-Aminotransferase
Wachstum auf YPG nicht eindeutig		
YER068C-A	YER068C-A	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
YER069W	ARG5,6	Acetylglutamat-Kinase und N-Acetyl-gamma-Glutamyl-Phosphat-Reduktase
YGL234W	ADE5,7	Enzym der <i>de novo</i> Purin-Nukleotid-Biosynthese
YHL023C	NPR3	Untereinheit des Iml1/SEACIT-Komplexes

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
<i>YJR109C</i>	<i>CPA2</i>	Große Untereinheit der Karbamoyl-Phosphat-Synthetase
<i>YOR211C</i>	<i>MGM1</i>	mt GTPase; in einem Komplex mit Ugo1 und Fzo1
<i>YPR060C</i>	<i>ARO7</i>	Chorismat-Mutase

In dem Screen sind viele mitochondriale Proteine, die an der Replikation oder Translation beteiligt sind, wie Mip1 oder die ribosomalen Proteine, aufgetreten (siehe Tab. 9). Dies bedeutet, dass der Screen funktioniert hat, weil er so konzipiert ist, Proteine der mitochondrialen Translation und Replikation zu finden. Dies bestätigt wiederum die Vertrauenswürdigkeit der neu gefundenen Proteine. Um einen weiteren Eindruck zu erhalten, wie gut die Treffer der *ARG8^m* Cytoduktion sind, wurde bei SGD eine *GO Enrichment* Suche durchgeführt (siehe Abb.17).

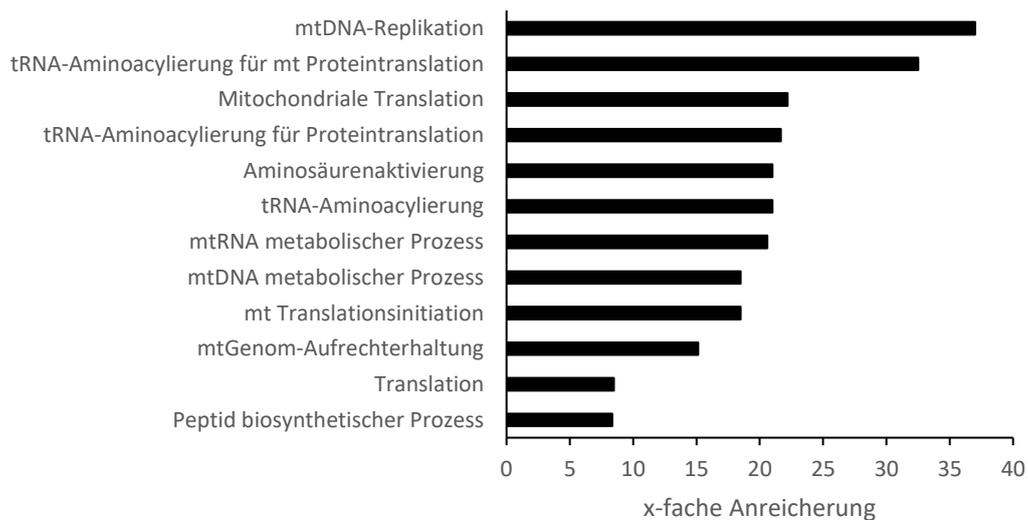


Abbildung 17: Darstellung der *GO Enrichment* Analyse in der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002). Gesucht wurde nach Prozessen der Zelle, bei welchen die Gene beteiligt sind, bei einem p-Wert von 0,01. Angegeben ist die x-fache Anreicherung in diesen Genen im Gegensatz zu allen nicht essentiellen Genen der *MATa* Deletionsbibliothek im Hintergrund.

Die *GO Enrichment* Suche ergab, dass die mtDNA-Replikation bei diesen Treffern des *ARG8^m* Screens 37-fach angereichert vorliegt im Vergleich zu allen nicht essentiellen Genen der *MATa* Deletionsbibliothek (siehe Abb. 17). Auch Mutanten, in welchen die mitochondriale Translation, deren Initiation und tRNA-Aminoacylierung für die mitochondriale

Proteinsynthese gestört sind, liegen angereichert vor. Dies ist ein weiteres positives Zeichen, dass der Screen vertrauenswürdig und erfolgreich ist, da dieser Screen vor allem Proteine der mitochondrialen Replikation, Transkription und Translation unabhängig von der Atmung finden soll. Daher ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass viele der in diesem Screen neu gefundenen Treffer für den Erhalt der mitochondrialen DNA wichtig sind.

Das *ARG8^m* Reporterkonstrukt wurde bereits zuvor mehrfach verwendet. Hergestellt wurde es 1996 von Steele *et al.*, um das Problem zu beheben, dass die nukleäre und mitochondriale DNA einen unterschiedlichen genetischen Code aufweisen und Gene des Kerns nicht in den Mitochondrien exprimiert werden können (Anderson *et al.*, 1981; Steele *et al.*, 1996). Dazu haben sie das *ARG8^m* Konstrukt an das *COX3* Gen fusioniert und so ins mitochondriale Genom inseriert (Steele *et al.*, 1996). Kürzlich konnte mit Hilfe des *ARG8^m* Systems festgestellt werden, dass das Protein Aep3 für die Translation von *ATP8* wichtig ist (Barros und Tzagoloff, 2017). Folglich ist auch das Reporterkonstrukt, mit welchem der Screen durchgeführt wurde, des Öfteren erfolgreich in der Forschung eingesetzt worden.

Somit sind die in diesem Screen neu gefundenen Gene vertrauenswürdige Treffer, welche im Zusammenhang mit der mitochondrialen DNA und Proteinsynthese stehen. Um herauszufinden, in welchen Bereichen diese Proteine eine Rolle spielen, müssen weiterführende Experimente durchgeführt werden.

3.1.6. Einfluss von oxidativem Stress auf mtDNA-Verlust (Menadion)

Um herauszufinden wie sich der oxidative Stress, der vor allem in den Mitochondrien auftritt, auf das mitochondriale Genom auswirkt, wurde ein Screen mit der Chemikalie Menadion (Men) durchgeführt. Menadion löst oxidativen Stress aus, indem es zu einem Semichinonradikalanion umgesetzt wird. Das gebildete Radikalanion reagiert mit Sauerstoff unter Bildung von Superoxid-Radikalen (Iyanagi und Yamazaki, 1970). Der Screen wurde wie in 3.1.4. beschrieben durchgeführt, nur dass zusätzlich zu der Kontrollgruppe ohne Menadion (YPD) die Stämme in einem parallelen Ansatz fünf Mal auf YPD+Men (0,3 mM) und anschließend auf YPG gestempelt wurden (siehe Abb. 18).

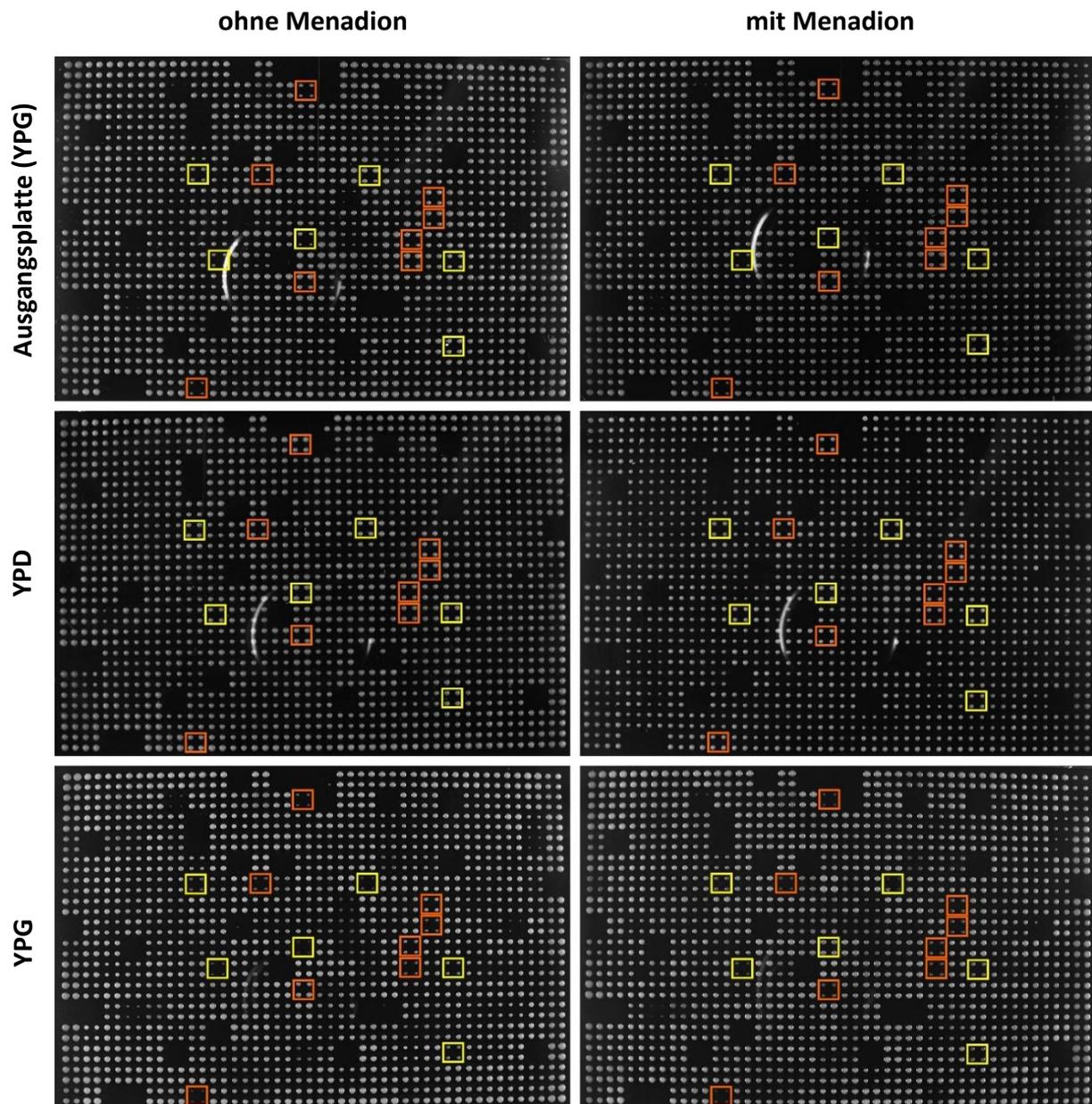


Abbildung 18: Darstellung der Platte 2 der Cytoduktion mit J1362 (ρ^+) auf YPD und YPD+Men (0,3 mM). Die ρ^0 Deletionsbibliothek wurde aus dem Glycerinstock auf YPG gestempelt und die Cytoduktion mit J1362 durchgeführt. Die Inkubationszeit der YPD und YPD+Men-Platten betrug einen Tag und der YPG-Platten zwei Tage. Die mit einem gelben Kästchen markierten Stämme wachsen auf den YPG-Platten aus der Kontrolle ohne Menadion schlechter als auf den YPG-Platten mit Menadion. Die mit orangen Kästchen markierten Stämme wachsen auf den YPG-Platten von den YPD+Men-Platten schlechter als auf den YPG-Platten ohne Menadion. Gleichzeitig wachsen alle markierten Stämme auf YPD und auf der YPG-Ausgangsplatte.

Der Menadion-Screen ergab sechs bzw. zwölf Hefestämme, welche mit Menadion *pet* wurden, ohne Menadion im Parallelansatz normal bzw. schwächer gewachsen sind (siehe Abb. 18; siehe Tab. 10). Unter diesen Stämmen sind bei *YBR062C* und *RFS1* die Funktion noch unbekannt. Wenn diese Proteine fehlen, dann ist es wahrscheinlich, dass sie bei oxidativem Stress ihr mtGenom verlieren, bei normalen Bedingungen aber nicht. Das heißt, diese Proteine

besitzen möglicherweise eine Schutzfunktion der mtDNA vor oxidativem Stress. Liegen keine Bedingungen mit oxidativem Stress vor, so wird die Schutzfunktion der Proteine nicht gebraucht und die Hefen können ihre mtDNA auch ohne diese Proteine aufrechterhalten. Weitere Ursachen, dass die Hefestämme nicht mehr auf nicht-fermentierbares Medium wachsen können, sind unter anderem Deletionen oder Punktmutationen an der mtDNA. Das Gen *YBR062C* wurde im Folgenden noch näher analysiert (siehe 3.2.3).

Es konnten auch drei Deletionsmutanten gefunden werden, welche nur ohne Menadion *pet* wurden, nicht jedoch, wenn sie mit dem Stressor behandelt worden sind. Diese sind also „robuster“ gegenüber ROS und oxidativem Stress, verlieren ihre mtDNA aber leichter, wenn kein oxidativer Stress vorliegt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sie bei oxidativem Stress möglicherweise hochreguliert werden und dort helfen. Fehlt dieser Stress, liegen sie vermutlich trotzdem sehr abundant vor und behindern so den normalen mtDNA-Vererbungsmechanismus.

Weiterhin waren zwölf Mutanten dabei, welche bei beiden Konditionen *pet* wurden. Unter diesen ist wieder $\Delta emi1$, welches schon im mtDNA-Verlust-Screen auf Zeit aufgetreten ist (siehe 3.1.4.). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass das Protein Emi1 eine Rolle bei der mtDNA-Vererbung spielt. Für diese Proteine ist es unerheblich, ob vermehrt ROS vorliegt oder nicht, sie sind in jedem Fall wichtig für den Erhalt der mtDNA.

Tabelle 10: Auflistung der Deletionsstämme, welche durch oxidativen Stress *pet* werden. Angegeben sind Stämme, die nach der Menadion-Behandlung *pet* sind, ohne Menadion normal oder schwächer wachsen; die nach Menadion normal wachsen, aber ohne Menadion *pet* sind; Stämme die sowohl mit als auch ohne Menadion *pet* werden. Angegeben sind der systematische Name, der Standardname und die Funktion des entsprechenden Proteins. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002; yeastgenome.org).

Systematischer Name	Standardname	Funktion des entsprechenden Proteins
Menadion <i>pet</i>; ohne Menadion normal		
<i>YBR062C</i>	<i>YBR062C</i>	Funktion unbekannt
<i>YKL167C</i>	<i>MRP49</i>	Mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit
<i>YLR015W</i>	<i>BRE2</i>	Untereinheit des COMPASS-(Set1C)-Komplexes
<i>YML120C</i>	<i>NDI1</i>	NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase
<i>YPL057C</i>	<i>SUR1</i>	Mannosylinositol-Phosphorylceramid-(MIPC)-Synthase, katalytische Untereinheit
<i>YPL189C-A</i>	<i>COA2</i>	Cytochrom-Oxidase-Assemblierungsfaktor

Systematischer Name	Standard-name	Funktion des entsprechenden Proteins
Menadion <i>pet</i>; ohne Menadion schwächer		
<i>YBR052C</i>	<i>RFS1</i>	Funktion unbekannt
<i>YBR065C</i>	<i>ECM2</i>	Prä-mRNA-Spleißfaktor
<i>YDR333C</i>	<i>RQC1</i>	Komponent des Ribosom-Qualitätskontroll-Komplexes (RQC)
<i>YHR043C</i>	<i>DOG2</i>	2-Deoxyglukose-6-Phosphat-Phosphatase
<i>YKL054C</i>	<i>DEF1</i>	RNAPII-Degradationsfaktor
<i>YLR252W</i>	<i>YLR252W</i>	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
<i>YMR067C</i>	<i>UBX4</i>	UBX-Domäne enthaltenes Protein, interagiert mit Cdc48
<i>YNL071W</i>	<i>LAT1</i>	Dihydrolipoamid-Acetyltransferase-Komponent (E2) des PDC
<i>YNL139C</i>	<i>THO2</i>	Untereinheit des THO-Komplexes
<i>YNL170W</i>	<i>YNL170W</i>	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
<i>YNR024W</i>	<i>MPP6</i>	Nucleäres Exosom assoziiertes RNA-Bindeprotein
<i>YOL027C</i>	<i>MDM38</i>	Bildet Komplex mit Mba1, um mRNA-spezifische Translations-aktivatoren zu den Ribosomen zu rekrutieren
Menadion normal; ohne Menadion <i>pet</i>		
<i>YEL031W</i>	<i>SPF1</i>	P-Typ-ATPase, Ion-Transporter der ER-Membran
<i>YML055W</i>	<i>SPC2</i>	Untereinheit des Signal-Peptidase-Komplexes
<i>YOR037W</i>	<i>CYC2</i>	Mitochondriales peripheres Innenmembranprotein
Menadion <i>pet</i>; ohne Menadion <i>pet</i>		
<i>YBR044C</i>	<i>TCM62</i>	In Assemblierung des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes beteiligt
<i>YDR512C</i>	<i>EMI1</i>	Funktion unbekannt; Induktion von Transkriptionsfaktor <i>IME1</i>
<i>YER083C</i>	<i>GET2</i>	Untereinheit des GET-Komplexes
<i>YIL155C</i>	<i>GUT2</i>	Mitochondriale Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
<i>YKL208W</i>	<i>CBT1</i>	Protein bei 5'RNA-Ende-Prozessierung beteiligt
<i>YLR393W</i>	<i>ATP10</i>	Assemblierungsfaktor für F ₀ -Sektor der mt F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
<i>YML081C-A</i>	<i>ATP18</i>	Untereinheit der mitochondrialen F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
<i>YMR072W</i>	<i>ABF2</i>	Mitochondriales DNA-Bindeprotein
<i>YMR089C</i>	<i>YTA12</i>	Mitochondriale Innenmembran m-AAA-Protease-Komponente
<i>YNL117W</i>	<i>MLS1</i>	Malatsynthase, Enzym des Glyoxylat-Zykluses
<i>YNR020C</i>	<i>ATP23</i>	Mutmaßliche Metalloprotease der mt Innenmembran
<i>YOL008W</i>	<i>COQ10</i>	Coenzyme-Q-(Ubiquinon)-Bindeprotein

Um zu sehen, ob Prozesse bei den Treffern des Menadion-Screens angereichert vorliegen, wurde mit allen 33 Genen eine *GO Enrichment* Analyse durchgeführt (siehe Abb. 19).

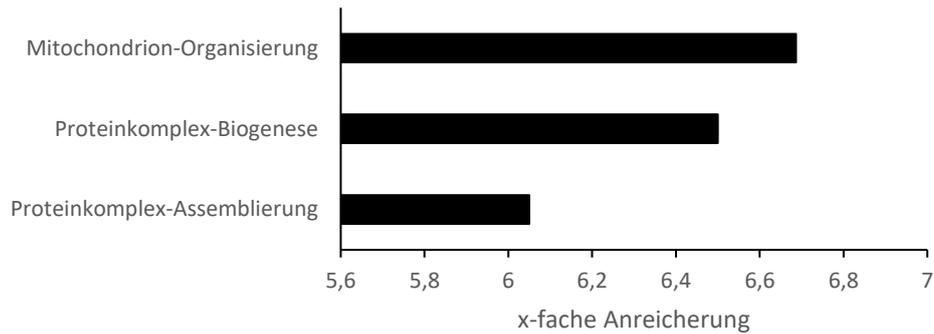


Abbildung 19: Darstellung der *GO Enrichment* Analyse in der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002). Gesucht wurde nach Prozessen der Zelle, bei welchen die Gene beteiligt sind, bei einem p-Wert von 0,01. Angegeben ist die x-fache Anreicherung in diesen 33 Genen im Vergleich zu den gescreenten nicht essentiellen Genen der *MATa* Deletionsbibliothek im Hintergrund.

Es liegt eine geringe Anreicherung bei den Prozessen Mitochondrion-Organisation, Proteinkomplex-Biogenese und -Assemblierung vor (siehe Abb. 19). Hierzu zählt neben weiteren der Zusammenbau der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe. Unter Mitochondrion-Organisation werden katabolische und anabolische Prozesse in und an den Mitochondrien zusammengefasst. Dazu zählen unter anderem die Verschmelzung und Teilung der Mitochondrien, die Replikation der mtDNA und die mitochondriale Proteinsynthese. Dies sind vorwiegend allgemeine Begriffe. Somit konnte für den Menadion-Screen keine Anreicherung in einem spezifischen Prozess gefunden werden. Dies liegt möglicherweise daran, dass nur sehr wenige Treffer pro Kategorie auftraten. Möglich ist auch, dass nur einige wenige Gene verantwortlich sind, die keinem spezifischen Prozess zugeordnet werden können.

Auch hier konnten Gene gefunden werden, deren Proteine möglicherweise mit mtDNA und insbesondere mit deren Schutz zu tun haben. Somit konnten weitere wertvolle Daten gewonnen werden. Die gefundenen Proteine sollten weiter charakterisiert werden, um diesen Aspekt zu bestätigen.

3.1.7. Screen nach Mutanten, die hypersuppressive mtDNA tolerieren (HS)

Hypersuppressive mtDNA unterdrückt die wildtypische mitochondriale DNA und wird in den meisten Fällen vererbt (siehe 1.4.) (MacAlpine *et al.*, 2001). Es gibt jedoch auch Ausnahmen, wo sich die wildtypische mtDNA gegenüber der HS mtDNA durchsetzt, wie beispielsweise bei *Δcce1* (*cruciform cutting endonuclease*) (Zweifel und Fangman, 1991). Dies ist eine

mitochondriale Endonuklease, welche kreuzförmige *Holliday Junctions* schneidet (Kleff *et al.*, 1992). Um weitere Deletionsmutanten ausfindig zu machen, welche sich auch gegenüber HS mtDNA durchsetzen können, wurde ein hypersuppressiver Screen durchgeführt. Es wird vermutet, dass die HS mtDNA wegen der großen Anzahl an *ori* Sequenzen einen replikativen Vorteil gegenüber der WT mtDNA hat. Wenn sich die wildtypische mtDNA bei einer Mutante durchsetzt, dann ist dies ein Hinweis darauf, dass das fehlende Protein z.B. bei der Initiation der mitochondrialen Replikation involviert sein könnte.

Um diesen Screen durchzuführen, wird zuerst eine Bibliothek benötigt, welche bereits wildtypische *rho*⁺ mtDNA besitzt. Dazu wurde aus dem Glycerinstock die *MATa* Deletionsbibliothek auf YPG gestempelt. Diese ist zuvor via Ethidiumbromid-Behandlung erst *rho*⁰ gemacht worden (siehe 3.1.2.) und danach ist über Cytoduktion frische wildtypische mtDNA eingebracht worden (J1362) (siehe 3.1.3.). In diese *rho*⁺ Bibliothek wurde die HS mtDNA ebenfalls mit Hilfe der Cytoduktion in die Zellen eingeführt. Dazu musste zuerst der Donorstamm J1362/HS3324 für die Cytoduktion mit HS mtDNA hergestellt werden (für ausführliche Erklärung zur Konstruktion des J1362/HS3324 Donorstamms siehe 2.2.1.). Anschließend wurde auf YPG und YPD passagiert und das Wachstum auf YPG analysiert (siehe Abb. 20).

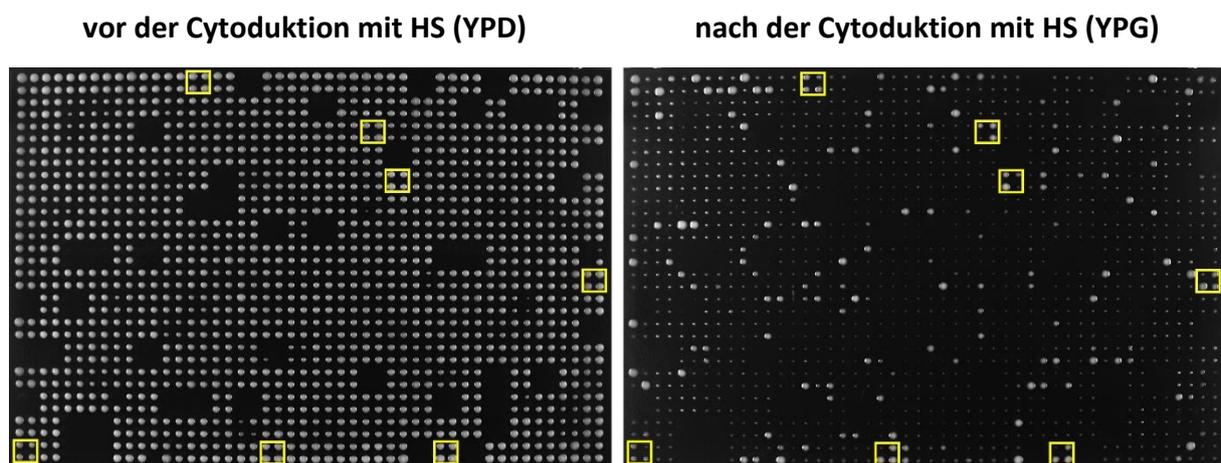


Abbildung 20: Darstellung der Platte 3 vom 2. Durchgang nach der Cytoduktion mit J1362/HS3324 in *rho*⁺ *MATa* Deletionsbibliothek. Diese wurde aus dem Glycerinstock auf YPG gestempelt und dann wurde die Cytoduktion mit dem HS mtGenom durchgeführt. Die Inkubationszeit der YPD-Platten betrug einen Tag und der YPG-Platten zwei Tage. Die Stämme mit gelb markierten Kästchen können nach der Cytoduktion mit der HS mtDNA mit 3 oder 4 Replikaten auf YPG wachsen, denn deren wildtypische mtDNA hat sich durchgesetzt.

Wenn sich die wildtypische mtDNA gegenüber der HS mtDNA durchsetzt, dann können diese Stämme noch auf YPG wachsen, während Hefen mit HS mtDNA nicht mehr befähigt sind auf YPG zu wachsen. Deletionsstämme, von denen mindestens drei Replikate auf YPG Wachstum zeigten, wurden als Treffer definiert (siehe Abb. 20; siehe Tab. 11). Es wurden drei CytoDUktionsdurchgänge mit der HS mtDNA durchgeführt, wobei insgesamt 19 Deletionsmutanten als Treffer deklariert werden, da sie in mindestens zwei Durchgängen mit mindestens drei Replikaten auf YPG auftauchen. Diese drei CytoDUktionsrunden wurden durchgeführt, um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erhalten. Der zweite und dritte Durchgang funktionierte wie der erste, aber mit Platten ohne Leucin und dafür mit zusätzlicher Raffinose, um auf das *LEU2* Plasmid in dem hypersuppressiven Donorstamm zu selektieren bzw., um den allgemein schlechteren Wuchs der Stämme abzumildern.

Als Treffer tauchte auch die Mutante $\Delta cce1$ auf, welches als Positivkontrolle dient und dem Screen eine Glaubwürdigkeit verleiht. In $\Delta cce1$ Stämmen setzt sich überwiegend die wildtypische mtDNA durch, wodurch vermutet wurde, dass Cce1 bei der Initiation der mtDNA-Replikation eine Rolle spielt (Zweifel und Fangman, 1991). Die Endonuklease Cce1 ist bei der Vererbung des *rho*⁻ HS Genoms beteiligt. Fehlt diese, so kommt es zu Aggregationen der mtDNA-Moleküle, weil die Rekombinationsintermediate nicht mehr aufgelöst werden (Lockshon *et al.*, 1995). Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass die HS mtDNA vererbt wird. Weitere Mutanten, die eine Rolle bei der HS mtDNA-Vererbung spielen und durch Paarung mit HS mtDNA gefunden worden sind, sind z.B. $\Delta mhr1$, $\Delta ntg1$ und $\Delta din7$ (Ling *et al.*, 1995; Ling *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2013).

Kürzlich konnte festgestellt werden, dass die Abundanz von dNTPs auch eine wichtige Rolle bei der Vererbung des HS mtGenoms spielt (Bradshaw *et al.*, 2017). Die im Cytosol befindliche Ribonukleotid-Reduktase katalysiert den limitierenden Schritt bei der Biosynthese der dNTPs (Zhang *et al.*, 2006). Dieses Enzym wird durch das Protein Slm1 inhibiert, wodurch die Abundanz der dNTPs abnimmt (Chabes *et al.*, 1999). Liegen weniger dNTPs vor, so wird die Vererbung des wildtypischen mtGenoms präferiert. Deswegen wird in der Mutante $\Delta slm1$ die wildtypische mtDNA vererbt (Bradshaw *et al.*, 2017). Dieser Deletionsstamm wurde in dieser Arbeit jedoch nicht gefunden, nur $\Delta slm2$, dessen Protein ein Paralog zu Slm1 ist, zeigte in einem der drei Durchgänge Wachstum auf YPG. Auch weitere Mutanten, von denen bereits

bekannt ist, dass sich deren wildtypischen mtDNA gegenüber hypersuppressiver mtDNA durchsetzt, konnten in diesem Screen nicht gefunden werden.

Nichtsdestotrotz konnten weitere Deletionsmutanten gefunden werden, in welchen sich die wildtypische mtDNA gegenüber der hypersuppressiven DNA durchsetzt (siehe Tab. 11; siehe Anhang, Tab. 16). So tauchte $\Delta mgr2$ bei allen drei Durchgängen jedes Mal mit 4 Replikaten auf. Das Gen *MGR2*, dessen Protein im mitochondrialen Importkomplex TIM23 assoziiert ist, ist somit ein zuverlässiger Treffer und wurde deswegen im weiteren Verlauf der Arbeit näher untersucht (siehe 3.2.4.) (Gebert *et al.*, 2012). Die Funktion der weiteren Treffer *MNC1*, *YGL118C*, *YJR098C*, *YKL063C* sind noch nicht bekannt und wurden ebenfalls weiter charakterisiert.

Tabelle 11: Auflistung der Deletionsstämme, bei welchen sich das wildtypische mitochondriale Genom gegenüber dem hypersuppressiven Genom durchsetzt und nach der Cyto duktion von HS mtDNA auf YPG wachsen können. Angegeben sind der systematische Name, der Standardname und die Funktion des entsprechenden Proteins. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002; yeastgenome.org).

Systematischer Name	Standardname	Funktion des entsprechenden Proteins
<i>YBR056W-A</i>	<i>MNC1</i>	Funktion unbekannt
<i>YBR105C</i>	<i>VID24</i>	GID-Komplex regulatorische Untereinheit
<i>YBR204C</i>	<i>LDH1</i>	Serin-Hydrolase
<i>YDR112W</i>	<i>IRC2</i>	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
<i>YEL063C</i>	<i>CAN1</i>	Plasmamembran-Arginin-Permease
<i>YGL070C</i>	<i>RPB9</i>	RNA-Polymerase-II-Untereinheit B12.6
<i>YGL118C</i>	<i>YGL118C</i>	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
<i>YHR162W</i>	<i>MPC2</i>	Untereinheit des mt Pyruvat-Carrier (MPC)
<i>YJL170C</i>	<i>ASG7</i>	Regulation des Signalwegs von G-Protein-Beta-Untereinheit Ste4
<i>YJR098C</i>	<i>YJR098C</i>	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
<i>YKL011C</i>	<i>CCE1</i>	mitochondriale <i>cruciform cutting</i> Endonuklease
<i>YKL063C</i>	<i>YKL063C</i>	Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
<i>YKL074C</i>	<i>MUD2</i>	Involviert in prä-mRNA-Spleißen
<i>YKL090W</i>	<i>CUE2</i>	Funktion unbekannt
<i>YMR023C</i>	<i>MSS1</i>	Mitochondrial; Heterodimer-Komplex mit Mto1
<i>YOR061W</i>	<i>CKA2</i>	Alpha katalytische Untereinheit von Casein-Kinase 2
<i>YOR248W</i>	<i>YOR248W</i>	Fragwürdiger <i>open reading frame</i>
<i>YOR285W</i>	<i>RDL1</i>	Thiosulfat-Sulfurtransferase
<i>YPL098C</i>	<i>MGR2</i>	Untereinheit des TIM23-Translokase-Komplexes

Von diesen 19 Genen wurde eine *GO Enrichment* Analyse durchgeführt. Weder bei den Prozessen noch bei den Funktionen lag eine Anreicherung vor. Nur bei den Komponenten ist

die mitochondriale Membran 5,26-fach angereichert bei einem p-Wert von 0,1. Somit lässt sich durch dieses Hilfsmittel keine Hypothese ableiten, bei welchen Prozessen die Treffer beteiligt sein könnten. Dies liegt auch daran, dass 19 Treffer für eine Anreicherung wenig sind.

Das Protein Mud2 ist beim Spleiß-Prozess im Kern beteiligt (Liao *et al.*, 1993). Es ist durchaus vorstellbar, dass Proteine, die beim Spleiß-Vorgang eine Rolle spielen, auch in irgendeiner Weise mit der mtDNA interagieren und möglicherweise bei der Replikation der HS mtDNA involviert sind. Zumindest konnte das Spleißen nicht nur für den Nukleus, sondern auch für die Mitochondrien nachgewiesen werden (Banroques *et al.*, 1987).

3.2. Weiterführende Untersuchungen einzelner Stämme aus den Screens

Einige der Treffer aus den fünf vorher beschriebenen Screens wurden weiter analysiert (siehe 3.1.). Kriterien hierbei waren, dass die Gene in zwei oder mehr Durchgängen, falls vorhanden, auftauchten und somit reproduzierbar waren. Diese wurden dann teilweise noch per Hand bestätigt (nicht gezeigt). Des Weiteren wurden vor allem Gene weiterverfolgt, welche noch eine unbekannte Funktion haben und deren Proteine in den Mitochondrien lokalisiert sind bzw. deren Lokalisation noch unbekannt ist (siehe Tab. 12). Fragwürdige ORFs wurden nicht weiter beachtet.

Tabelle 12: Zusammenfassung einiger weiter untersuchten Gene aus den verschiedenen Screens. Angegeben ist der Screen, in welchem der Stamm als Treffer auftaucht, der Name des Gens, die Abkürzung und deren Funktion. Die Informationen stammen aus der *Saccharomyces* Datenbank SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002; yeastgenome.org). 5 YPD: Gene aus dem Screen mtDNA-Verlust über die Zeit (5 Mal YPD); ARG8: Gene aus dem Screen mtDNA-Verlust unabhängig von der Atmung (*ARG8^m*); Men: Gene aus dem Screen Einfluss von oxidativem Stress auf mtDNA-Verlust (Menadion); HS: Gene aus dem Screen nach Mutanten, die hypersuppressive mtDNA tolerieren.

Screen	Name	Abkürzung	Funktion
5 YPD	<i>EMI1</i>	<i>early meiotic induction</i>	Induktion von Transkriptionsfaktor IME1
5 YPD	<i>RRG7</i>	<i>required for respiratory growth</i>	Funktion unbekannt
ARG8	<i>PET130</i>	<i>petite colonies</i>	Funktion unbekannt
ARG8	<i>RRG1</i>	<i>required for respiratory growth</i>	Funktion unbekannt; Ansäuerung der Vakuole; mtDNA-Erhalt
ARG8	<i>RRG8</i>	<i>required for respiratory growth</i>	Funktion unbekannt; mtDNA-Erhalt
ARG8	<i>RRG9</i>	<i>required for respiratory growth</i>	Funktion unbekannt
ARG8	<i>SOV1</i>	<i>synthesis of var</i>	Funktion unbekannt
ARG8	<i>YNL184C</i>		Funktion unbekannt
ARG8	<i>YJR120W</i>		Funktion unbekannt

Screen	Name	Abkürzung	Funktion
ARG8	<i>YKR023W</i>		Funktion unbekannt
Men	<i>YBR062C</i>		Funktion unbekannt
HS	<i>MGR2</i>	<i>mitochondrial genome required</i>	Untereinheit des TIM23 Translokase Komplexes
HS	<i>MNC1</i>	<i>manganese chelating protein 1</i>	Funktion unbekannt
HS	<i>YGL118C</i>		Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
HS	<i>YJR098C</i>		Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion
HS	<i>YKL063C</i>		Mutmaßliches Protein unbekannter Funktion

Im Folgenden werden die interessanten Gene aus Tabelle 12 geordnet nach den Screens, in welchen sie gefunden wurden, analysiert und besprochen.

3.2.1. Charakterisierung der Gene von dem Screen mtDNA-Verlust über die Zeit

Bei dem Screen auf mtDNA-Verlust über die Zeit befanden sich zwei Gene im Überlapp: *EMI1* und *RRG7* (siehe 3.1.4; siehe Tab. 12). Bei beiden ist die molekulare Funktion laut SGD noch unbekannt, auch wenn Emi1 bei der Induktion von Transkriptionsfaktor *IME1* beteiligt ist (Enyenihi und Saunders, 2003). Während sich das Protein Rrg7 in den Mitochondrien befindet, ist die Lokalisation von Emi1 noch nicht bekannt (Huh *et al.*, 2003). Somit könnte Emi1 auch in den Mitochondrien vorhanden sein. Dies kann untersucht werden, indem eine translationale Fusion zwischen *EMI1* und GFP hergestellt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert wird. Da die Expression bei einem Plasmid meistens viel höher ist, als wenn es endogen exprimiert wird, wurde eine Methode verwendet, um über homologe Rekombination ein PCR-Produkt in das Chromosom zu inserieren (Longtine *et al.*, 1998). So sollte das endogene *EMI1* Gen mit GFP zu einem Reporterkonstrukt fusioniert werden. Es konnte jedoch nach mehrmaligen Versuchen kein Signal im GFP-Kanal entdeckt werden (nicht gezeigt). Deshalb konnte Emi1 mittels chromosomalen GFP-Taggings nicht lokalisiert werden.

Um die Mutanten umfassender zu charakterisieren, wurde die mtDNA mittels DAPI-Färbung gezählt. Des Weiteren wurde die Mitochondrien- und Vakuolen-Morphologie mit Hilfe eines transformierten mtRFP-Plasmids bzw. der CMAC-Färbung, wodurch Vakuolen gefärbt werden, analysiert. Zusätzlich wurden die Stämme auf YPD und YGP getüpfelt, um ihr Wachstumsverhalten zu analysieren (siehe Abb. 21). Dabei wurden die Stämme aus dem unbehandelten Glycerinstock verwendet und nicht aus dem Screen direkt.

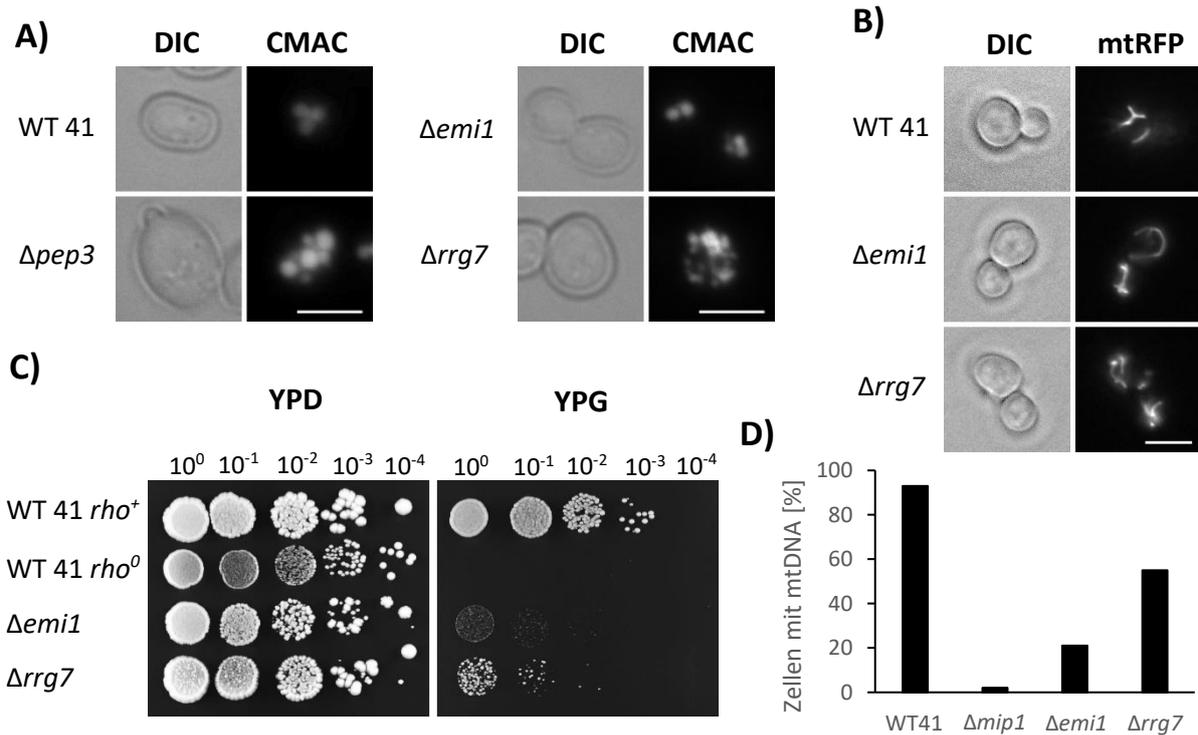


Abbildung 21: Charakterisierung morphologischer Eigenschaften und des Wachstums von Wildtyp BY4741 (WT 41), $\Delta emi1$ und $\Delta rrg7$. **A)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vakuolen-Morphologie mit Hilfe der CMAC-Färbung. Die Zellen wurden über Nacht in YPD angezogen, am nächsten Tag in YPD verdünnt, mit CMAC gefärbt und bei logarithmischem Wachstum mikroskopiert. Der Maßstab beträgt 5 μ m. **B)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Mitochondrien-Morphologie mit Hilfe des mtRFP-Markers. Die Zellen wurden über Nacht in SD-URA angezogen, am nächsten Tag in SD-URA verdünnt und bei logarithmischem Wachstum mikroskopiert. Der Maßstab beträgt 5 μ m. **C)** Tüpfeltest der Stämme auf YPD und YPG. Es wurden fünf Verdünnungsstufen (jeweils 1:10) getüpfelt und die Platten nach vier Tagen Wachstum bei 30°C fotografiert. **D)** Auszählung einer DAPI-Färbung der mtDNA. Die Zellen wurden über Nacht in YPD angezogen, am nächsten Tag in YPD verdünnt, mit DAPI gefärbt und mikroskopiert. Es wurden pro Stamm insgesamt 100 Zellen auf das Vorhandensein von mtDNA ausgezählt.

Beide Deletionsstämme $\Delta emi1$ und $\Delta rrg7$ enthalten mtDNA, wobei im Stamm $\Delta rrg7$ über 50% der Zellen mtDNA enthalten und $\Delta emi1$ ca. 20% (siehe Abb. 21D). Im Glycerinstock liegen beide Stämme demnach noch ρ^{+} vor. In dem Screen haben sie mit der Zeit ihr mitochondriales Genom verloren. Werden sie aus dem Glycerinstock ausgestrichen und mehrmals auf YPD transferiert, dann sollten sie mit der Zeit die mtDNA verlieren. Bei $\Delta mip1$ ist keine mtDNA vorhanden. Dies ist auch die Negativkontrolle, von der bekannt ist, dass sie die mtDNA verliert (Genga *et al.*, 1986). Des Weiteren können $\Delta emi1$ und $\Delta rrg7$ noch auf YPG wachsen, auch wenn sie schlechter wachsen als der Wildtyp (ρ^{+}) und $\Delta emi1$ nur sehr schwaches Wachstum zeigt (siehe Abb. 21C).

Sowohl $\Delta emi1$ als auch $\Delta rrg7$ besitzen eine normale wildtypische Mitochondrien-Morphologie (siehe Abb. 21B). Auch der Wildtyp als Kontrolle besitzt die typischen schlauchförmigen

Mitochondrien. Während $\Delta emi1$ wie auch der Wildtyp zwei bis drei Vakuolen besitzt, weist $\Delta rrg7$ viele Vakuolen auf. Dies wurde bei $\Delta rrg7$ bereits festgestellt und konnte hier bestätigt werden (Michaillat und Mayer, 2013) (siehe Abb. 21A). Auch der Kontrollstamm $\Delta pep3$ hat viele kleinere Vakuolen. Von diesem ist bekannt, dass er eine abnormale Vakuolen-Morphologie hat. Der Grund hierfür ist, dass Pep3 ein vakuoläres Protein ist, welches für die Fusion der Vakuolen eine wichtige Rolle spielt (Preston *et al.*, 1991).

In dem Screen von Merz und Westermann (2009) tauchte $\Delta rrg7$ bereits auf. Dabei wurde $\Delta rrg7$ zu den Klasse II *pet* Mutanten gezählt, welche durch Cyto duktion mit WT mtDNA und Komplementation mit $\Delta mip1$ gerettet werden. Die Translationsaktivität wurde für $\Delta rrg7$ aber nicht untersucht. Die Autoren vermuten, dass vielleicht sekundäre Effekte für den mtGenom-Verlust verantwortlich sind, da der Stamm durch Cyto duktion und $\Delta mip1$ Paarung gerettet wird (Merz und Westermann, 2009).

Bei SGD kann das Expressionsmuster von *RRG7* mit dem anderer Gene bei unterschiedlichen Bedingungen verglichen werden. Dies geschieht mittels des Programms SPELL (*serial pattern of expression levels locator*). Dabei vergleicht ein Such-Algorithmus Expressionsmuster aus über 2.400 *Microarray* Experimenten, gewichtet die Ähnlichkeit und zeigt die 20 besten Kandidaten an (Hibbs *et al.*, 2007). Außerdem wird automatisch eine *GO Term Enrichment* Analyse der 20 besten Kandidaten erstellt und angezeigt (siehe Abb. 22).

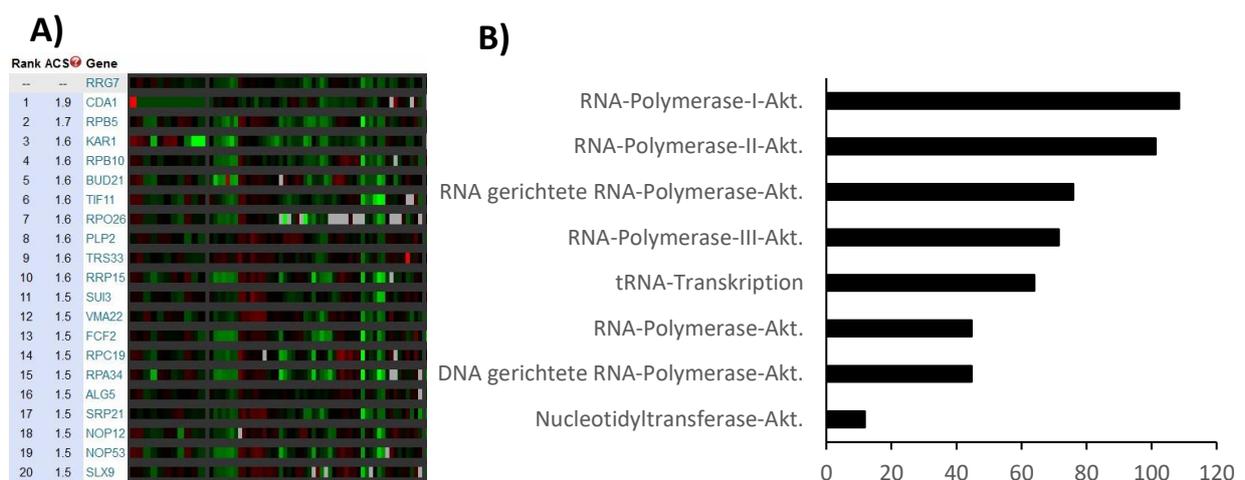


Abbildung 22: A) Darstellung des Expressionsvergleichs von *RRG7* durch den SPELL Algorithmus. Die Abbildung wurde aus SGD entnommen und bearbeitet (<https://spell.yeastgenome.org/>; 08.03.2018). **B)** *GO Term Enrichment* Analyse für das Gen *RRG7* basierend auf den Ergebnissen von A) (<https://spell.yeastgenome.org/>; 08.03.2018).

Anhand der *GO Term Enrichment* Analyse lässt sich feststellen, dass Gene, welche bei den gleichen Konditionen wie *RRG7* ähnlich exprimiert werden, vor allem mit der Aktivität der RNA-Polymerase-I im Nukleus zu tun haben (siehe Abb. 22). Diese Gene sind vorwiegend die Untereinheiten der RNA-Polymerase, nämlich *RPB5*, *RPB10*, *RPO26*, *RPC19* und *RPA34* (Werner *et al.*, 2009). Es könnte sein, dass Rrg7 in den Mitochondrien eine ähnliche Funktion übernimmt, wie die RNA-Polymerase-Proteine und deswegen *RRG7* zusammen mit diesen exprimiert wird. Vielleicht ist Rrg7 bei der mitochondrialen Transkription beteiligt. Ein weiterer Hinweis, der das mitochondriale Protein Rrg7 mit dem Kerngenom in Verbindung bringt, ist in der Literatur zu finden. Das Gen *RRG7* übt eine *antisilencing* Funktion aus und inaktiviert die Histon-Deacetylase Sir2 (Rine und Herskowitz, 1987; Raisner *et al.*, 2008). Daraus könnte gefolgert werden, dass Rrg7 vielleicht auch an der Kommunikation zwischen dem Kerngenom und dem mitochondrialen Genom beteiligt ist.

Das Gen *EMI1* ist im Gegensatz zu *RRG7* nicht bei Merz und Westermann aufgetreten (Merz und Westermann, 2009). Dafür wurde es in einem Screen gefunden, welcher nach Cystein Motiven gesucht hat, wobei ermittelt werden konnte, dass Emi1 zu den C_{X(9)}C-Proteinen zählt (Longen *et al.*, 2009). Um einen Anhaltspunkt zu finden, woran Emi1 beteiligt sein könnte, wurde in dem Online-Tool TheCellMap.org danach gesucht. Bei TheCellMap.org werden quantitative genetische Interaktionen, deren Daten aus SGA-Analysen stammen, gesammelt, ausgewertet und visualisiert (Usaj *et al.*, 2017). Dabei kann bei den genetischen Interaktionen zu einem Profilähnlichkeitsnetzwerk navigiert werden, welches Deletionsallele mit ähnlichen genetischen Interaktionen anzeigt (siehe Abb. 23).

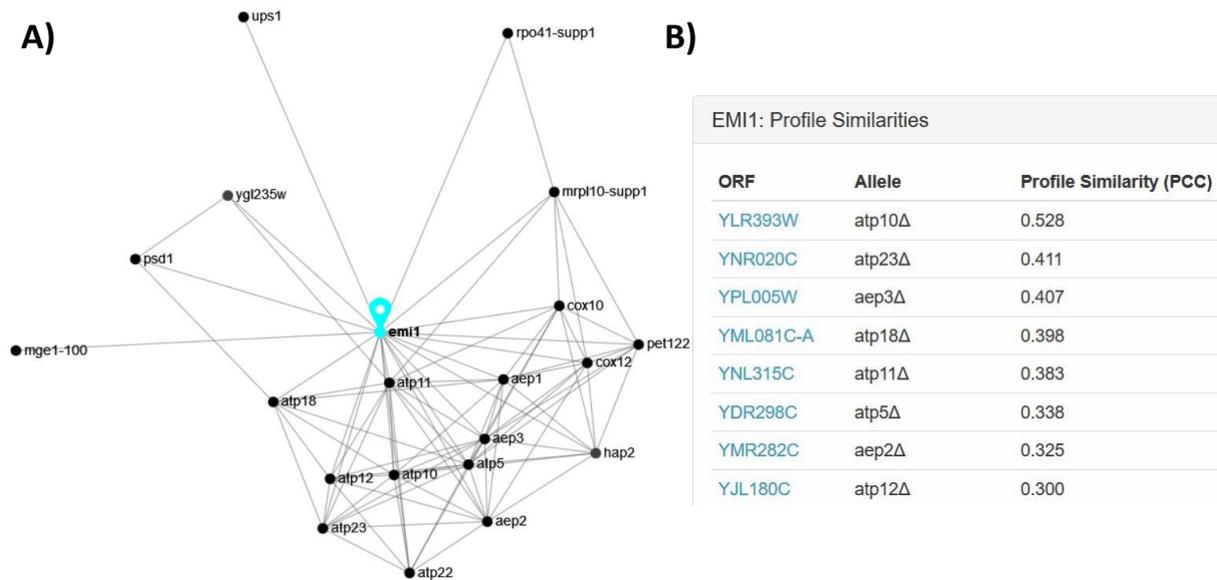


Abbildung 23: A) Darstellung des Profilähnlichkeitsnetzwerkes von $\Delta emi1$ (türkis markiert) mit weiteren Mutanten, welche eine ähnliche genetische Interaktion aufweisen. **B)** Auflistung von Deletionsgenen, welche den höchsten Pearson-Korrelations-Koeffizient (PCC) aufweisen. Beide Abbildungen wurden aus TheCellMap.org entnommen und bearbeitet (www.thecellmap.org (05.03.2018); Costanzo *et al.*, 2016; Usaj *et al.*, 2017).

Die Knotenpunkte bei dem Profilähnlichkeitsnetzwerk repräsentieren Deletionsallele oder bei essentiellen Genen temperatursensitive Mutanten. Je näher sich zwei Knotenpunkte sind, desto ähnlicher sollten sich deren genetischen Interaktionen sein. Dies wird über den Pearson-Korrelations-Koeffizient (*Pearson Correlation Coefficient*; PCC) errechnet und alle Werte über 0,2 angezeigt (siehe Abb. 23B) (Kobourov, 2012). So ist für $\Delta emi1$ ersichtlich, dass $\Delta atp10$ mit einem PCC von 0,528 die ähnlichste genetische Interaktion aufweist (siehe Abb. 23A und 23B). Jedoch ist $\Delta atp11$ graphisch näher an $\Delta emi1$ als $\Delta atp10$, was dem PCC widerspricht. Trotzdem ist auffällig, dass viele Mutanten, die eine Rolle bei der F_1F_0 -ATP-Synthase wie $\Delta atp10$, $\Delta atp23$, $\Delta aep2$ und $\Delta aep3$ etc. spielen, eine ähnliche genetische Interaktion wie $\Delta emi1$ aufweisen. Die beiden mitochondrialen Proteine Aep2 und Aep3 sind an der Translation von den F_0 -ATP-Synthase-Untereinheiten Oli1 bzw. Atp6 beteiligt, genau wie Aep1, welches im Netzwerk auch auftaucht (siehe Abb. 23A) (Payne *et al.*, 1991; Ellis *et al.*, 2004). Die Proteine Atp10 und Atp23 bzw. Atp11 und Atp12 sind für die Assemblierung der F_0 - bzw. F_1 -Untereinheit der F_1F_0 -ATP-Synthase verantwortlich (Ackerman und Tzagoloff, 1990a; Ackerman und Tzagoloff, 1990b; Zeng *et al.*, 2007). Da gleich vier Deletionsgene mit einer ähnlichen genetischen Interaktion wie $\Delta emi1$ bei der Assemblierung von F_1F_0 -Synthase-Untereinheiten beteiligt sind und grundsätzlich viele Gene mit der F_1F_0 -ATP-Synthase zu tun haben, kann deshalb vermutet werden, dass das Protein Emi1 auch eine Funktion bei der Assemblierung der F_1F_0 -ATP-

Synthase ausübt. Es könnte zum Beispiel direkt bei der ATP-Synthase-Assemblierung involviert sein oder als Transkriptionsfaktor für ein Assemblierungsprotein dienen. Des Weiteren wurde *EMI1* auch in einem Screen gefunden, bei dem der Transkriptionsfaktor für frühe Gene der Meiose *IME1* induziert wurde (Kassir *et al.*, 1988; Enyenihi und Saunders, 2003).

3.2.2. Charakterisierung der Gene aus dem Screen mtDNA-Verlust unabhängig von der Atmung (*ARG8^m*)

Aus dem *ARG8^m* Screen sind die Gene *PET130*, *RRG1*, *RRG8*, *RRG9*, *SOV1*, *YNL184C*, *YJR120W* und *YKR023W* besonders interessant, weil deren molekularen Funktionen noch unbekannt sind (siehe 3.1.5; siehe Tab. 12). Dabei sind *Pet130*, *Rrg1*, *Rrg8*, *Rrg9* und *Sov1* in den Mitochondrien lokalisiert und von *Ynl184c*, *Yjr120w* und *Ykr023w* ist die Lokalisation unbekannt (Huh *et al.*, 2003).

Für weitere Studien der Deletionsmutanten wurde eine DAPI- und CMAC-Färbung durchgeführt. Des Weiteren wurde die Mitochondrien-Morphologie angeschaut, indem die mit einem mtRFP-Marker transformierten Mutanten mikroskopiert wurden. Darüber hinaus wurden die Deletionsmutanten auf YPG und YPD getüpfelt, um das Wachstumsverhalten zu beobachten (siehe Abb. 24). Dabei wurden die Stämme aus dem unbehandelten Glycerinstock verwendet und nicht aus dem Screen direkt.

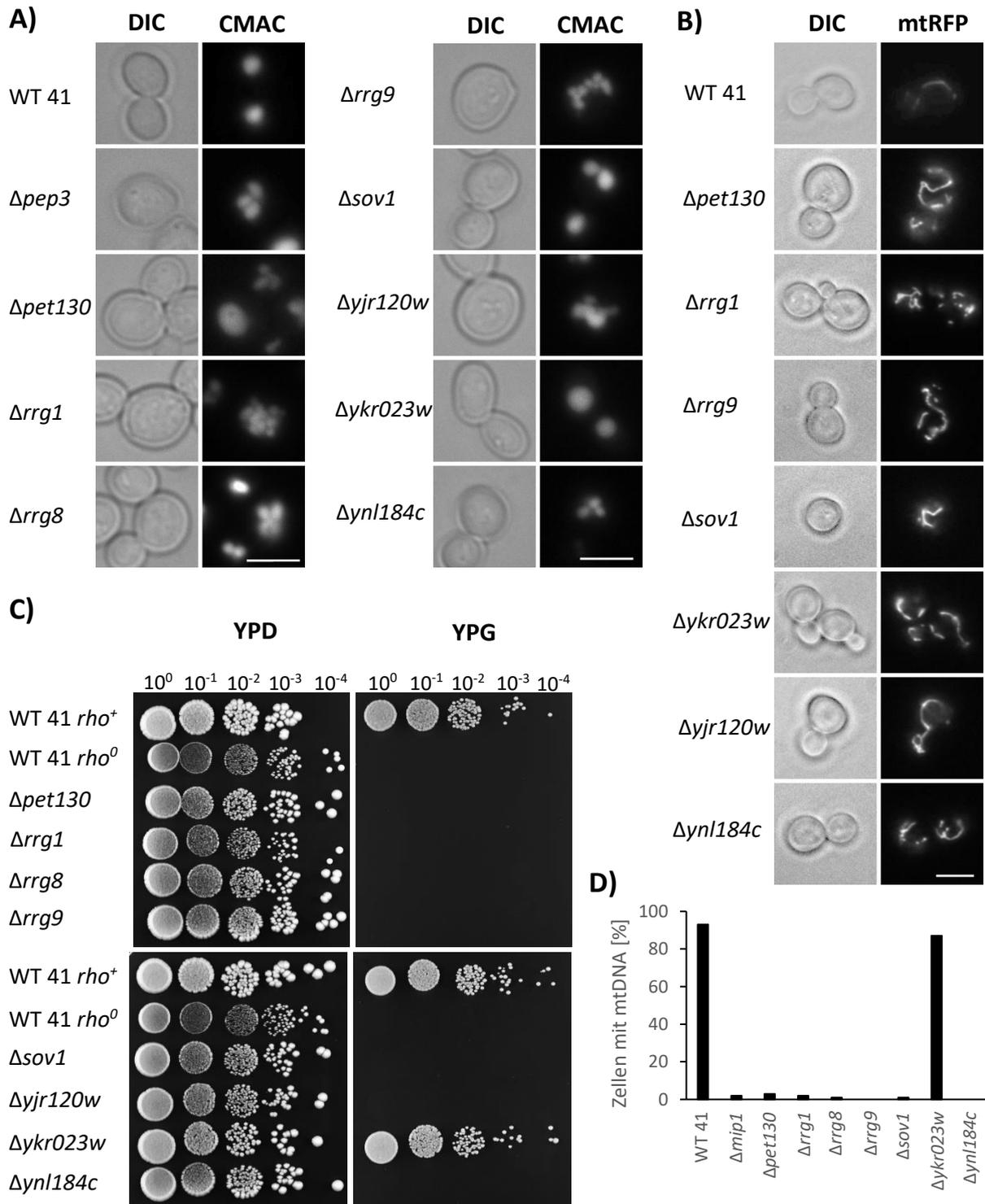


Abbildung 24: Charakterisierung morphologischer Eigenschaften und des Wachstums von Wildtyp BY4741 (WT 41), $\Delta pet130$, $\Delta rrg1$, $\Delta rrg8$, $\Delta rrg9$, $\Delta sov1$, $\Delta yjr120w$, $\Delta ykr023w$ und $\Delta ynl184c$. **A)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vakuolen-Morphologie mit Hilfe der CMAC-Färbung. Die Zellen wurden über Nacht in YPD angezogen, am nächsten Tag in YPD verdünnt, mit CMAC gefärbt und bei logarithmischem Wachstum mikroskopiert. Der Maßstab beträgt 5 μ m. **B)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Mitochondrien-Morphologie mit Hilfe des mtRFP-Markers. Die Zellen wurden über Nacht in SD-URA angezogen, am nächsten Tag in SD-URA verdünnt und bei logarithmischem Wachstum mikroskopiert. Der Maßstab beträgt 5 μ m. **C)** Tüpfeltest der Stämme auf YPD und YPG. Es wurden fünf Verdünnungsstufen (jeweils 1:10) getüpfelt und die Platten nach vier Tagen Wachstum bei 30°C fotografiert. **D)** Auszählung einer DAPI-Färbung der mtDNA. Die Zellen wurden über Nacht in YPD angezogen, am nächsten Tag in YPD verdünnt, mit DAPI gefärbt und mikroskopiert. Es wurden pro Stamm insgesamt 100 Zellen auf das Vorhandensein von mtDNA ausgezählt.

Anhand der DAPI-Färbung konnte festgestellt werden, dass die Mutanten $\Delta pet130$, $\Delta rrg1$, $\Delta rrg8$, $\Delta rrg9$, $\Delta sov1$ und $\Delta ynl184c$ keine bzw. kaum (unter 5% der Zellen) mtDNA besitzen (siehe Abb. 24D). Nur bei $\Delta ykr023w$ hat ein sehr großer Teil der Zellen, ca. 90%, mtDNA. Dies wird auch beim Tüpfeltest deutlich, bei welchem $\Delta ykr023w$ als einziger Stamm neben dem Wildtyp (rho^+) auf YPG Wachstum zeigt (siehe Abb. 24C). Während $\Delta ykr023w$ mtDNA besitzt, haben die anderen Stämme diese bereits verloren und verlieren sie vermutlich grundsätzlich sehr schnell. Wohingegen $\Delta ykr023w$ die mtDNA nicht unmittelbar verliert. Vielleicht ist $\Delta ykr023w$ ein falsch-positives Ergebnis des Screens und würde bei einem erneuten Durchgang nicht mehr *pet* werden. Die Mitochondrien ähneln bei fast allen untersuchten Stämmen morphologisch dem Wildtyp, nur $\Delta rrg1$ hat teils wildtypische und teils fragmentierte Strukturen (siehe Abb. 24B). Dies wurde auch schon 2002 beschrieben (Dimmer *et al.*, 2002). Die Vakuolen bei den Stämmen $\Delta pet130$, $\Delta rrg1$ und $\Delta rrg9$ zeigen Auffälligkeiten, welche bereits in der Literatur für diese Stämme beschrieben sind (siehe Abb. 24A). Der Defekt dieser Mutanten besteht darin, dass die Vakuole fragmentiert (Michaillat und Mayer, 2013).

Die Gene *RRG1*, *RRG8*, *RRG9* und *YNL184C* sind alle bei Merz und Westermann in der Klasse I gefunden worden (Merz und Westermann, 2009). Das heißt, sie sind weder durch Cytoduktion noch durch $\Delta mip1$ Komplementation gerettet worden. Die restlichen Gene *PET130*, *SOV1*, *YJR120W* und *YKR023W* sind nicht in den Screens aufgetaucht (Merz und Westermann, 2009).

Auch wenn festgestellt werden konnte, dass das Gen *YNL184C* für ein Protein kodiert, wurde es nach den ersten charakterisierenden Experimenten nicht weiter analysiert (Zhang und Wang, 2000). Dies liegt daran, dass der Leserahmen von *YNL184C* teilweise mit dem Gen *MRPL19* überlappt, welches für ein mitochondriales ribosomales Protein der großen Untereinheit kodiert (Kitakawa *et al.*, 1997). Dies wird auch durch die SPELL-Suche bestätigt, bei welcher *MRPL19* den ersten Rang belegt (nicht gezeigt). Weiterhin werden dort von den 20 angegebenen Genen nur drei Gene aufgelistet, welche nicht für eine ribosomale Untereinheit der Mitochondrien kodieren. Dies zeigt sich auch in der *GO Enrichment* Analyse wieder, wobei bei diesen 20 Genen die mitochondrialen Ribosomen im Vergleich zu allen Genen des Genoms 56,9-fach angereichert vorliegen (nicht gezeigt). Dies ist somit auch eine Bestätigung, dass die SPELL-Suche in der Tat nützliche und wichtige Hinweise für die Suche nach der Funktion eines Proteins liefern kann.

Mittels eines Algorithmus (SCIPHER) wurde vorausgesagt, dass das Protein Sov1 wahrscheinlich mehrere Pentatricopeptid-Repeat-Domänen (PPR) enthält (Lipinski *et al.*, 2011). Dieses Motiv bildet antiparallele α -Helices aus (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Durch mehrere hintereinanderliegende Helix-Turn-Helix-Motive formt sich eine Superhelix, durch welche die Proteine vorwiegend RNA binden können (Small und Peeters, 2000; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Durch diese Eigenschaft werden den Proteinen der PPR-Familie Aufgaben in der Transkription, RNA-Prozessierung, Spleißen, Editing und Translation zugeschrieben (Delannoy und Stanley, 2007; Manna, 2015). Somit könnte Sov1 auch eine Rolle bei einem der eben genannten Prozesse spielen. Des Weiteren zählen Caballero *et al.* Sov1 als Mitglied des MTC (mitochondrialen Translationskontrolle) und haben festgestellt, dass bei Fehlen von Sov1 abhängig von Sir2 *Silencing* im Kern stattfindet (Caballero *et al.*, 2011). Daher vermuten sie auch eine Verbindung von Sov1 zum Kerngenom. Es ist bekannt, dass Sov1 in den Mitochondrien lokalisiert ist (Huh *et al.*, 2003).

Des Weiteren ist auch das Protein Rrg1 in den Mitochondrien lokalisiert (Huh *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006). Es konnte festgestellt werden, dass dessen Deletionsmutante keine Translationsaktivität nach der Cytoduktion mit frischer mtDNA hat (Merz und Westermann, 2009). Daraus kann gefolgert werden, dass Rrg1 bei der Proteinsynthese mitwirkt. Bei einer Suche in SGD nach Genen mit ähnlichen Phänotypen hat sich $\Delta rrg1$ jeweils 20 Phänotypen mit $\Delta slm5$ und $\Delta dia4$ geteilt (SGD; 19.05.2017). Diese Phänotypen beinhalten unter anderem die Lebensfähigkeit, die Mitochondrien-Morphologie und die Stress-Resistenz. Wenn zwei Deletionsgene in sehr vielen Phänotypen übereinstimmen, so kann dies darauf hindeuten, dass diese möglicherweise auch eine ähnliche Funktion ausführen. Sowohl die Deletionsmutanten von Dia4 (nur 1. Durchgang) als auch von Slm5 sind auch in dem ARG8^m Screen als nicht cytoduzierbare Treffer vertreten und werden beide zu den mitochondrialen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen gezählt, das heißt sie sind bei der Beladung der tRNAs mit Aminosäuren beteiligt (Delarue, 1995). Dabei ist Dia4 wahrscheinlich die mitochondriale Seryl-tRNA-Synthetase und Slm5 die Asparaginyl-tRNA-Synthetase (Landrieu *et al.*, 1997; Palecek *et al.*, 2000). Es gibt zwei verschiedene Klassen der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Klasse I besitzt 2 konservierte Motive, nämlich HIGH und KMSKS. In der Klasse II lassen sich drei konservierte Motive auffinden (Eriani *et al.*, 1990). In der Proteinsequenz von Rrg1 konnte zwar kein HIGH-, aber jedoch das KMSK-Motiv gefunden werden, allerdings ohne das Serin am Ende des Motivs. Es wäre denkbar, dass Rrg1 ebenfalls eine mitochondriale Aminoacyl-tRNA-

Synthetase ist. Dies würde auch mit der Vermutung zusammenpassen, dass Rrg1 an der mitochondrialen Translation beteiligt ist, weil ohne die beladenen tRNAs auch keine Proteinsynthese stattfinden kann.

Von dem Protein Yjr120w ist noch nicht viel bekannt. So ist weder die Lokalisierung in der Zelle noch die molekulare Funktion bekannt. Jedoch ein Prozess, woran das Protein beteiligt ist, ist der Sterol-Transport (Reiner *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte in dem Ethidiumbromid-Screen von Dunn *et al.* auch gemessen werden, dass das Gen *ATP2* in $\Delta yjr120w$ schwach exprimiert wird (Dunn *et al.*, 2006). Es gibt noch eine weitere Verbindung mit einer F_1F_0 -ATP-Synthase-Untereinheit, nämlich mit dem Protein Atp1. Auf der SGD-Seite ist $\Delta atp1$ mit neun geteilten Phänotypen mit $\Delta yjr120w$ und bei SPELL sind sieben F_1F_0 -ATP-Synthase-Gene aufgeführt, die ein ähnliches Expressionsmuster haben (SGD (19.05.2017); SPELL (07.03.2018)). Dies spiegelt sich auch bei der *GO Enrichment* Analyse wieder, wo die ATP-Synthase-Aktivität im Gegensatz zum restlichen Genom 158-fach erhöht ist. Somit könnte Yjr120w an der F_1F_0 -ATP-Synthase eine Rolle spielen. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise, dass es ein Chaperon ist, welches bei der Assemblierung der einzelnen Untereinheiten eine Rolle spielt. Auf der anderen Seite beschreiben Takeda und Kollegen, dass das *ATP2* Gen, welches neben *YJR120W* auf Chromosom X liegt, zwei weitere Kopien hat und Wiederholungen davon teilweise in dem Gen von *YJR120W* liegen (Takeda *et al.*, 2005). Möglicherweise ist dies der Grund, warum bei SPELL und den ähnlichen Phänotypen *ATP* Gene zu finden sind, was aber auch wieder eine gute Kontrolle für dieses Such-Tool ist, denn das macht dieses vertrauenswürdiger. Des Weiteren konnte $\Delta yjr120w$ im Ethidiumbromid-Screen nur noch ganz schwach auf YPD wachsen (siehe Tab. 6) (Dunn *et al.*, 2006). Vielleicht kann $\Delta yjr120w$ grundsätzlich nicht auf Medien, welche die Chemikalie EtBr enthalten, wachsen, während es den mtDNA-Verlust aber verkraftet und sich dann bei weiterem Passagieren auf YPD erholt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass $\Delta yjr120w$ seine mtDNA gar nicht verliert und deswegen immer noch, wenn auch schwach, auf YPD wachsen kann. Bei der Paarung mit dem Testerstamm $\Delta mip1$ wurde der Stamm $\Delta yjr120w$ jedoch nicht komplementiert (nicht gezeigt). Denkbar wäre auch, dass $\Delta yjr120w$ *petite*-negativ ist und nicht mehr auf YPD wachsen konnte, aber im Laufe der Screens mit einem anderen Stamm kontaminiert wurde. Der Stamm $\Delta yjr120w$ wurde wie auch die anderen interessanten Treffer nach den Screens mit Hilfe von PCR auf deren Genotyp untersucht. Dieser war, wie die anderen, nicht mit einem Wildtypallel kontaminiert (nicht gezeigt). Da Wiederholungen von dem *ATP2* Gen in der *YJR120W*-Sequenz

liegen, ist es auch möglich, dass das der Grund ist, warum $\Delta yjr120w$ nur schwach auf YPD nach der EtBr-Behandlung wächst (Takeda *et al.*, 2005).

Auch über das Protein Ykr023w ist noch nicht viel bekannt. Es ist in Hochdurchsatz-Analysen sowohl in den Mitochondrien als auch im Cytosol gefunden worden (Huh *et al.*, 2003; Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006). Bei der SPELL-Analyse korreliert *YKR023W* vor allem mit einigen Genen, die bei der Transkription und Transkriptionselongation beteiligt sind (SPELL; 10.03.2018). Dies zeigt sich auch in der *GO Enrichment* Analyse: Transkriptionselongation vom RNA-Polymerase-II-Promotor ist 19-fach angereichert. Daher könnte es sein, dass Ykr023w ein Transkriptionsfaktor ist.

Auch das Protein Rrg9 ist mitochondrial lokalisiert (Reinders *et al.*, 2006). Das mitochondriale Translationsmuster konnte als wildtypisch bestätigt werden, was darauf schließen lässt, dass das Protein keine Rolle bei der Proteinsynthese spielt (Merz und Westermann, 2009). Des Weiteren wurde ausgeschlossen, dass Rrg9 direkt an der mtDNA-Replikation beteiligt ist (Wysocki *et al.*, 1999). Bei der SPELL-Analyse wurden aber sehr viele mitochondriale ribosomale Proteine gefunden (SPELL; 10.03.2018). Auch bei der *GO Enrichment* Analyse sind sowohl mitochondriale Translation als auch mitochondriale Ribosomen um 21,6-fach bzw. 36,6-fach angereichert. Eine Möglichkeit für diesen Widerspruch ist, dass Rrg9 nicht direkt an der Translation beteiligt ist, aber trotzdem währenddessen eine Funktion ausübt. Zum Beispiel könnte Rrg9 die Ribosomen an die mitochondriale mRNA rekrutieren oder prozessieren, was das ähnliche Expressionsmuster mit einigen Ribosomen-Untereinheiten erklären würde.

Von Rrg8 und Pet130 ist ebenfalls noch nicht viel bekannt. Beide sind in den Mitochondrien lokalisiert (Huh *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006). Auch bei der SPELL-Analyse wird nicht sofort ein *GO Enrichment* Resultat angezeigt, dazu muss bei dem Suchfeld von 20 Gene auf 50 bzw. 100 Gene erhöht werden. Dann wird für *RRG8* zum einen mRNA-Spleißen und DNA-Rekombination mit 5,7-facher bzw. 23,6-facher Anreicherung angezeigt. Und bei *PET130* werden Proteine, welche an die Vakuole rekrutiert werden, sowie DNA-Reparatur mit 7-facher und 3,4-facher Anreicherung, angezeigt. Möglicherweise spielen die Proteine in einem dieser Bereiche eine Rolle. Auffällig ist, dass bei *PET130* die vakuolären Proteine angereichert vorliegen. Nicht nur $\Delta pet130$, auch $\Delta rrg8$ und $\Delta rrg1$ sind bei einem Screen aufgetaucht, der im Zusammenhang mit vakuolären Prozessen steht und haben einen Defekt bei der Vakuolen-Fragmentierung (Shima *et al.*, 2008; Michailat und Mayer, 2013). Zusätzlich wird Rrg1 für die

vakuoläre Ansäuerung benötigt (Eide *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die drei Proteine im Zusammenhang stehen. So interagiert Rrg8 sowohl mit Rrg1 als auch mit Pet130 (Krogan *et al.*, 2008). Dies ließe vermuten, dass die drei Proteine zusammen vielleicht eine Aufgabe bei dem Kontakt der Mitochondrien mit den Vakuolen erfüllen. Der Protein-Komplex, welcher die Mitochondrien mit den Vakuolen verbindet, wird als vCLAMP (*vacuole and mitochondria patch*) bezeichnet (Elbaz-Alon *et al.*, 2014; Hönscher *et al.*, 2014). Vielleicht spielen die drei Proteine Pet130, Rrg1 und Rrg8 bei dem Kontakt der Mitochondrien mit vCLAMP eine Rolle.

3.2.3. Charakterisierung der Gene aus dem Screen Einfluss von oxidativem Stress auf mtDNA-Verlust (Menadion)

Bei dem Menadion-Screen auf Mutanten, die bei oxidativem Stress ein verändertes Wachstum zeigen, wurde ein Gen gefunden, welches weiter charakterisiert werden sollte, nämlich *YBR062C* (siehe 3.1.6.; siehe Tab. 12). Von dem Protein Ybr062c ist weder die molekulare Funktion noch die Lokalisation bekannt (Huh *et al.*, 2003).

Für eine Charakterisierung wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt und die Zellen auf Vorhandensein von mtDNA untersucht und gezählt. Weiterhin wurden die Vakuolen- und Mitochondrien-Morphologie mittels CMAC-Färbung und transformierten mtRFP-Plasmids angeschaut. Das Wachstumsverhalten auf YPD und YPG wurde ebenfalls via Tüpfeltest beobachtet (siehe Abb. 25). Dabei wurden die Stämme aus dem unbehandelten Glycerinstock verwendet und nicht aus dem Screen direkt.

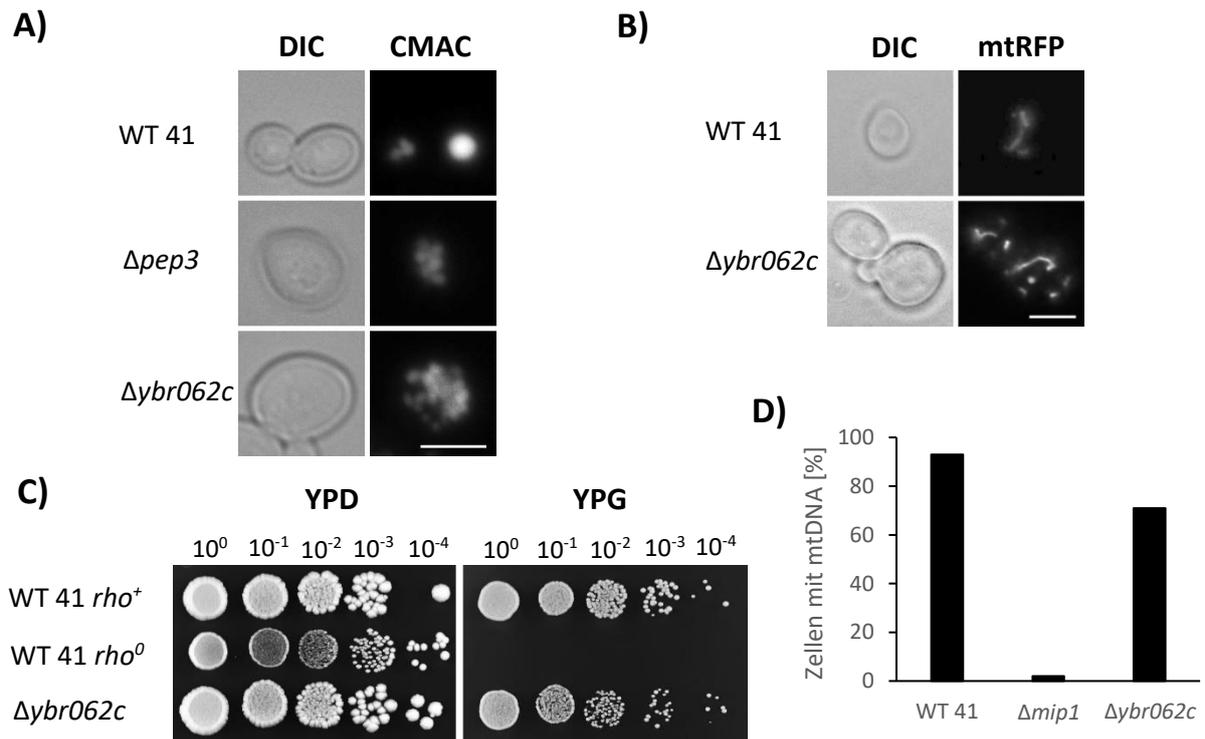


Abbildung 25: Charakterisierung morphologischer Eigenschaften und des Wachstums von Wildtyp BY4741 (WT 41) und $\Delta ybr062c$. **A)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vakuolen-Morphologie mit Hilfe der CMAC-Färbung. Die Zellen wurden über Nacht in YPD angezogen, am nächsten Tag in YPD verdünnt, mit CMAC gefärbt und bei logarithmischem Wachstum mikroskopiert. Der Maßstab beträgt 5 μ m. **B)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Mitochondrien-Morphologie mit Hilfe des mtRFP-Markers. Die Zellen wurden über Nacht in SD-URA angezogen, am nächsten Tag in SD-URA verdünnt und bei logarithmischem Wachstum mikroskopiert. Der Maßstab beträgt 5 μ m. **C)** Tüpfeltest der Stämme auf YPD und YPG. Es wurden fünf Verdünnungsstufen (jeweils 1:10) getüpfelt und die Platten nach vier Tagen Wachstum bei 30°C fotografiert. **D)** Auszählung einer DAPI-Färbung der mtDNA. Die Zellen wurden über Nacht in YPD angezogen, am nächsten Tag in YPD verdünnt, mit DAPI gefärbt und mikroskopiert. Es wurden pro Stamm insgesamt 100 Zellen auf das Vorhandensein von mtDNA ausgezählt.

Bei der DAPI-Färbung konnte festgestellt werden, dass $\Delta ybr062c$ mtDNA besitzt und zwar ca. 70% der Zellen (siehe Abb. 25D). Daher konnte der Stamm auch auf YPG wachsen und das nur leicht schwächer als der rho^+ Wildtyp (siehe Abb. 25C). Dies passt auch zu dem Screen Ergebnis, dass $\Delta ybr062c$ seine mtDNA nur bei oxidativem Stress verliert, aber nicht unter normalen Bedingungen (siehe 3.1.6). Der $\Delta ybr062c$ Deletionsstamm weist eine wildtypische Mitochondrien-Morphologie auf, die Vakuolen-Morphologie ist jedoch verändert im Gegensatz zum Wildtyp (siehe Abb. 25A und 25B). Diese aberrante Morphologie der Vakuolen ist für diesen Stamm in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden. Das Fehlen des Proteins Ybr062c hat somit Auswirkungen auf die Vakuole. Möglicherweise ist es auch an den Vakuolen lokalisiert und ändert bei oxidativem Stress seinen Ort und wandert zu den

Mitochondrien. Die Lokalisation von Ybr062c in der Zelle ist noch nicht bekannt. Um diese zu ermitteln, könnte Ybr062c mit GFP fusioniert werden.

Ansonsten ist noch nicht viel über das Protein Ybr062c bekannt, dessen Gen ein Intron enthält, welches 82 bp groß ist (Cliften *et al.*, 2003). Des Weiteren besitzt es eine RING-Finger-Domäne (*really interesting new genes*), welche typisch ist für Ubiquitin-Ligasen (Devit *et al.*, 2005). Bei der SPELL-Suche nach *YBR062C* wurde bei der *GO Enrichment* Analyse vor allem der Proteasom-Komplex 47,6-fach und die Ubiquitin-abhängigen katabolischen Prozesse 10,7-fach angereichert (SPELL, 11.03.2018). Da $\Delta ybr062c$ im Menadion-Screen aufgetreten ist und bei oxidativem Stress sein mtGenom verliert, könnte Ybr062c eine Ubiquitin-Ligase sein, welche bei oxidativem Stress durch Ubiquitinierung andere Proteine aktiviert oder deaktiviert, um Mechanismen auszulösen, welche die mtDNA schützen.

Da aber zum Ende dieser Arbeit der zeitliche Aufwand, dies zu testen, nicht realisierbar war, wurden noch weitere Überlegungen zu dem Protein angestellt. Bei SGD waren für Ybr062c Proteine aufgeführt, welche viele Übereinstimmungen bei den geteilten Domänen haben (SGD, *Shared Domains*, 19.05.2017). Unter diesen waren mit Rad5, Rad16, Rad18 und Irc20 Ubiquitin-Ligasen, welche bei der mtDNA-Reparatur eine Rolle spielen (Prakash, 1981; Guzder *et al.*, 1997; Kiakos *et al.*, 2002; Torres-Ramos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2012). Deshalb wurde ein Erythromycin-Assay durchgeführt, um festzustellen, ob Ybr062c eine Ubiquitin-Ligase mit Beteiligung an der mtDNA-Reparatur ist. Das Antibiotikum Erythromycin (Ery) bindet an die mitochondriale 21S rRNA und führt so zum Ablösen der tRNAs vom Ribosom (Tenson *et al.*, 2003). Somit inhibiert Erythromycin auch die mitochondriale Proteinsynthese. Dadurch werden die Gene des mtGenoms nicht exprimiert und einige Untereinheiten der Atmungskette fehlen. Aus diesem Grund können die Zellen nicht mehr auf YPG wachsen. Es gibt zwei Basenaustausch-Mutationen (A zu G Transition) an den Positionen 221 und 514, durch welche die 21S rRNA trotz des Antibiotikums wieder funktionsfähig ist (Sor und Fukuhara, 1982). Diese Mutationen verleihen den Zellen daher Resistenz gegenüber Erythromycin. Da die Mitochondrien verschiedenen Reparatur-Mechanismen besitzen, werden Mutationen normalerweise wieder rückgängig gemacht. Ist bei einem Deletionsstamm das dazugehörige Protein an der mtDNA-Reparatur beteiligt, so fehlt der Kontrollmechanismus und die Mutationen können auftreten. Daher wachsen Deletionsstämme, deren Proteine für die Reparatur wichtig sind, mit einer im Vergleich zum

Wildtyp erhöhte Anzahl an Kolonien auf YPG+Ery. Dies ist zum Beispiel bei $\Delta rad27$, dessen Protein eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt und an der Basenexzisionsreparatur beteiligt ist, der Fall (Harrington und Lieber, 1994; Reagan *et al.*, 1995). Deshalb wurde $\Delta rad27$ als Positivkontrolle verwendet (siehe Abb. 26).

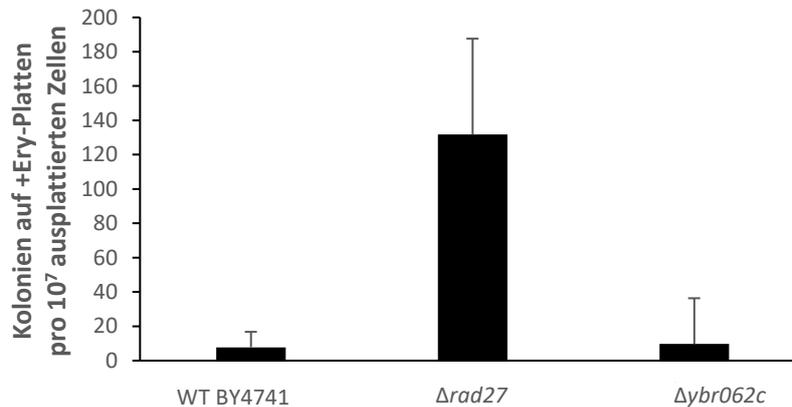


Abbildung 26: $\Delta ybr062c$ ist nicht an der mtDNA-Reparatur beteiligt. Die Zellen wurden in YPG+Amp angeimpft und nach zwei Tagen Inkubation zu frischem YPG+Amp geschüttet. Nach weiteren zwei Tagen wurden verschiedene ODs auf YPG+Erythromycin [2mg/ml] plattiert und die Kolonien nach über einer Woche gezählt. Aufgetragen ist die Zahl der Kolonien auf den YPG+Ery-Platten pro 10⁷ ausplattierter Zellen. Es wurden jeweils drei parallele Ansätze verfolgt, die Kolonien Zahl zusammengezählt und daraus die Standardabweichung berechnet.

Es ist zu erkennen, dass der Deletionsstamm $\Delta rad27$ mit über 120 Kolonien pro ausplattierter 10⁷ Zellen deutlich besser auf YPG+Ery wachsen konnte, als der Wildtyp und $\Delta ybr062c$ (siehe Abb. 26). Bei diesen beiden Stämmen zeigten nur 10-20 Kolonien Wachstum. Dies bedeutet, dass das Protein Ybr062c nicht in der mitochondrialen DNA-Reparatur involviert ist.

3.2.4. Charakterisierung der Gene aus dem Screen nach Mutanten, die hypersuppressive mtDNA tolerieren

In dem Screen nach Deletionsmutanten, deren wildtypische mtDNA sich gegenüber der hypersuppressiven DNA durchsetzt, sind fünf Gene besonders aufgefallen. Diese sind *MGR2*, *MNC1*, *YGL118C*, *YKL063C* und *YJR098C* (siehe 3.1.7.; siehe Tab. 12). Bei Mnc1 und Ygl118c ist sowohl die molekulare Funktion als auch die Lokalisierung nicht bekannt. Auch von den Proteinen Ykl063c und Yjr098c ist die Funktion unbekannt, die Lokalisation allerdings bereits belegt. Ykl063c befindet sich im Golgi-Apparat und Yjr098c in den Mitochondrien und im Cytosol (Huh *et al.*, 2003; Sickmann *et al.*, 2003). Das mitochondriale Protein Mgr2 ist mit dem

TIM23-Komplex der mitochondrialen Proteinimportmaschinerie assoziiert (Gebert *et al.*, 2012). Die Mutante $\Delta mgr2$ wurde weiter analysiert, weil es bei jedem der drei Durchgänge mit jeweils vier Replikaten der glaubwürdigste Treffer war (siehe 3.1.7.).

Als erstes wurden die Deletionsstämme auf deren mtDNA und Mitochondrien- und Vakuolen-Morphologie analysiert. Dies geschah mittels DAPI-Färbung, Mitochondrien-Markierung durch mtRFP Plasmid und CMAC-Färbung. Außerdem wurde das Wachstum der Hefen untersucht, indem ein Tüpfeltest auf YPD und YPG durchgeführt wurde (siehe Abb. 27).

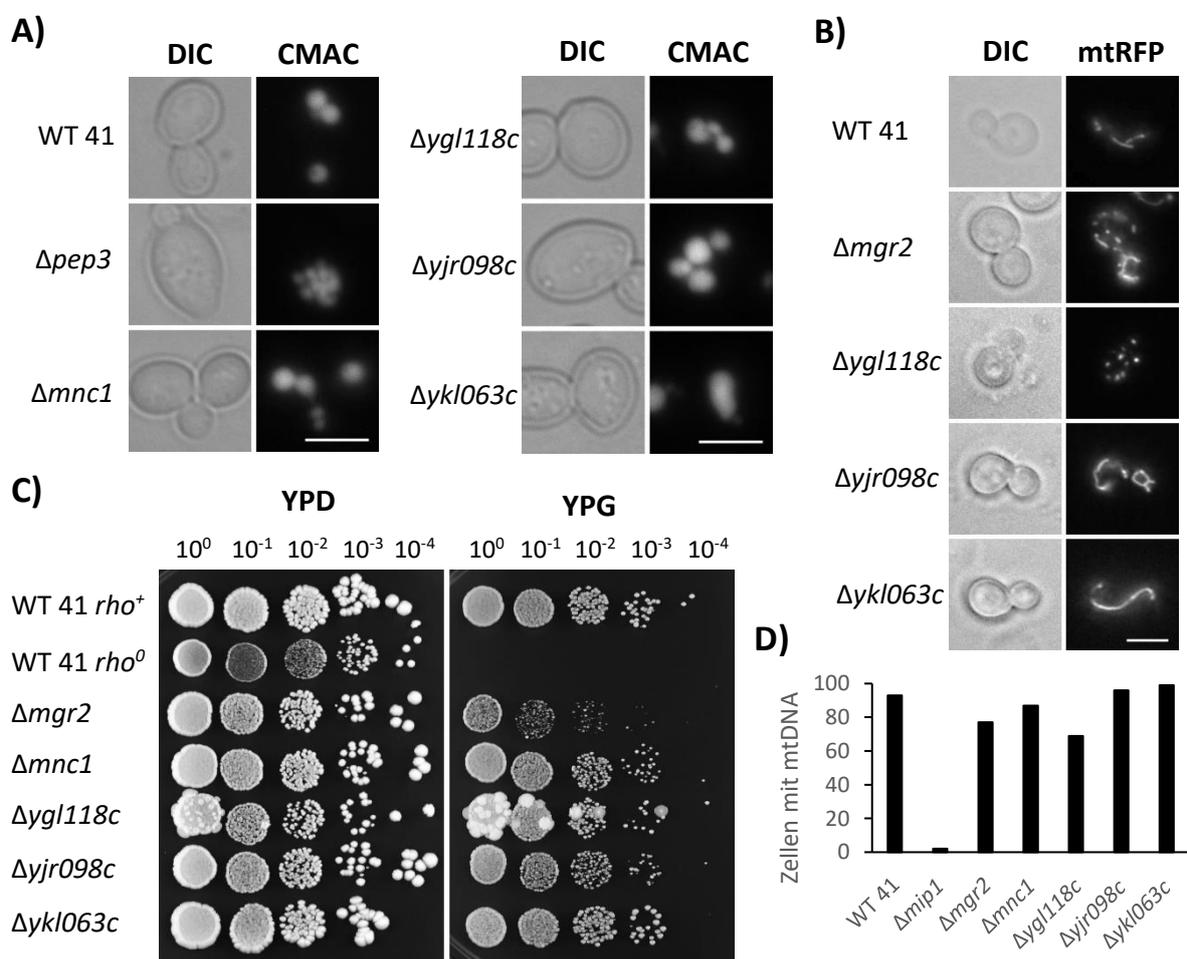


Abbildung 27: Charakterisierung morphologischer Eigenschaften und des Wachstums von Wildtyp BY4741 (WT 41), $\Delta mgr2$, $\Delta mnc1$, $\Delta ygl118c$, $\Delta yjr098c$ und $\Delta ykl063c$. **A)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Vakuolen-Morphologie mit Hilfe der CMAC-Färbung. Die Zellen wurden über Nacht in YPD angezogen, am nächsten Tag in YPD verdünnt, mit CMAC gefärbt und bei logarithmischem Wachstum mikroskopiert. Der Maßstab beträgt 5 μ m. **B)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Mitochondrien-Morphologie mit Hilfe des mtRFP Markers. Die Zellen wurden über Nacht in SD-URA angezogen, am nächsten Tag in SD-URA verdünnt und bei logarithmischem Wachstum mikroskopiert. Der Maßstab beträgt 5 μ m. **C)** Tüpfeltest der Stämme auf YPD und YPG. Es wurden fünf Verdünnungsstufen (jeweils 1:10) getüpfelt und die Platten nach vier Tagen Wachstum bei 30°C fotografiert. **D)** Auszählung einer DAPI-Färbung der mtDNA. Die Zellen wurden über Nacht in YPD angezogen, am nächsten Tag in YPD verdünnt, mit DAPI gefärbt und mikroskopiert. Es wurden pro Stamm insgesamt 100 Zellen auf das Vorhandensein von mtDNA ausgezählt.

Alle fünf Deletionsstämme *Δmgr2*, *Δmnc1*, *Δygl118c*, *Δyjr098c* und *Δykl063c* weisen ein mitochondriales Genom auf (siehe Abb. 27D). Es konnte außerdem bei der DAPI-Färbung festgestellt werden, dass in diesen Stämmen der Anteil an Zellen mit mtDNA mit mindestens 60% sehr hoch ist (siehe Abb. 27D). Daher haben auch alle die Fähigkeit, auf YPG zu wachsen, wobei die Mutante *Δmgr2* deutlich schwächer auf YPG wächst als die anderen und der *rho*⁺ Wildtyp (siehe Abb. 27C). Dass die Stämme mtDNA besitzen ergibt Sinn, da sich diese gegenüber hypersuppressiver mtDNA behaupten und ihre eigene mtDNA behalten (siehe 3.1.7.). Im Gegensatz zu *Δygl118c* besitzen die Stämme *Δmgr2*, *Δyjr098c* und *Δykl063c* wildtypische Mitochondrien (siehe Abb. 27B). Bei dem Stamm *Δmnc1* gab es bei der Transformation des mtRFP-Plasmids selbst nach mehrmaligem Wiederholen keine Kolonien. Deswegen kann über diese Mutante diesbezüglich keine Aussage getroffen werden. Die Stämme *Δmnc1*, *Δygl118c*, *Δyjr098c* und *Δykl063c* weisen in den meisten Fällen eine wildtypische Vakuolen-Morphologie auf (siehe Abb. 27A).

Über die Proteine Mnc1, Ygl118c, Yjr098c und Ykl063c ist noch nicht viel bekannt. Es wird aber vermutet, dass Mnc1 an der Plasmamembran sitzt und als Chelator Mangan bindet, um die Zelle vor toxischen Mangan-Konzentrationen zu schützen (Andreeva *et al.*, 2017). Dies würde auch zu dem *GO Enrichment* Ergebnis der SPELL-Analyse passen (SPELL; 14.03.2018). Hier sind Zellwand-Biogenese und verankerte Bestandteile der Plasmamembran 9,2-fach und 476,7-fach angereichert. Es gibt bei den über 6.000 Genen vier bekannte Komponenten der Plasmamembran, die verankert sind und zwei davon haben ein ähnliches Expressionsmuster wie *MNC1*. Dies ist ein weiteres Indiz, dass Mnc1 tatsächlich in der Plasmamembran verankert ist. Es bleibt aber die Frage, wie dieses Protein mit der mitochondrialen DNA in Verbindung steht und warum sich die mtDNA bei dem Fehlen von Mnc1 gegenüber der HS mtDNA durchsetzt. Da in *Δmnc1* Hefen die Mangan-Konzentration in der Zelle erhöht ist, könnte es sein, dass der replikative Vorteil des hypersuppressiven Genoms egalisiert wird (Andreeva *et al.*, 2017). Mangan bindet an Nukleotide und verändert so die Basenpaar-Eigenschaften (Eichhorn und Shin, 1968). Des Weiteren könnte Mangan auch mit der DNA-Polymerase interagieren (Beckman *et al.*, 1985). Es konnte auch festgestellt werden, dass Mangan vor allem in den Mitochondrien als Mutagen wirkt und weniger im Kern (Putrament *et al.*, 1975). Möglicherweise verhindert Mangan, welches durch die Abwesenheit von Mnc1 in gesteigertem Maß vorliegt, das Binden von Mip1 an die *ori* Sequenzen, welche vermehrt im hypersuppressiven Genom vorliegen. So wäre der replikative Vorteil des HS Stammes hinfällig.

Für die anderen drei Stämme *Δygl118c*, *Δyjr098c* und *Δykl063c* gab es bei der SPELL-Analyse kein *GO Enrichment* Resultat. Das Protein Yjr098c ist vermutlich eine Acyltransferase, weil es Acyltransferase-Motive in der Proteinsequenz aufweist (Stalberg *et al.*, 2008). Acyltransferasen kommen in allen Membranen vor, um die Phospholipide zu acylieren oder deacylieren. Die Acyltransferasen können in allen möglichen Organellmembranen vorliegen. Sollte Yjr098c wirklich eine Acyltransferase sein, so könnte das Protein in den Mitochondrien Membranen vorkommen und dort einen Einfluss auf die Vererbung der mtDNA haben.

Über Mgr2 ist schon relativ viel bekannt. So ist Mgr2 eine Untereinheit des TIM23-Komplexes und verantwortlich für die laterale Freisetzung und Inserierung von Proteinen in die mitochondriale Innenmembran (Gebert *et al.*, 2012; Ieva *et al.*, 2014). Da der Deletionsstamm bei jedem Durchgang mit jeweils vier Replikaten auf YPG vorkam und somit der zuverlässigste und glaubwürdigste Treffer war, wurde *MGR2* (*mitochondrial genome required*), weiter analysiert (siehe 3.1.7.). Den Namen erhielt *MGR2* von Dunn *et al.* aus dem Ethidiumbromid-Screen nach *petite*-negativen Mutanten (Dunn *et al.*, 2006). Dabei sind ihnen zwei unbekannte Mutanten aufgefallen, welche nach Ethidiumbromid-Behandlung nicht mehr auf YPD wachsen konnten und deren Gene sie *MGR1* und *MGR2* nannten (Dunn *et al.*, 2006).

Auch bei einem Hochdurchsatz-Screen wurde Mgr2 in den Mitochondrien gefunden (Yofe *et al.*, 2016). Huh und Kollegen, welche alle Proteine mit GFP markiert haben, konnten für das mit GFP gekoppelte Mgr2 kein Ergebnis erzielen (Huh *et al.*, 2003). So ist zwar bekannt, dass Mgr2 in den Mitochondrien vorliegt, aber nicht dessen Verteilung. Um herauszufinden, ob sich Mgr2 homogen über die Mitochondrienschläuche verteilt oder in distinkten Foci vorliegt, wurde an *MGR2* eGFP kloniert. Bei Huh *et al.*, wurde das GFP an die C-Termini der Proteine kloniert. Die mitochondriale Präsequenz, welche für die Lokalisation in die Mitochondrien verantwortlich ist, befindet sich bei Mgr2 am C-Terminus und nicht wie bei anderen Proteinen am N-Terminus (Vögtle *et al.*, 2009; Ieva *et al.*, 2013). Aus diesem Grund hat vermutlich das GFP die mitochondriale Präsequenz gestört, wodurch es zu einer Fehllokalisierung bzw. inkorrekten Bildung von Mgr2 kam. Deshalb wurde in dieser Arbeit das eGFP an den N-Terminus von Mgr2 kloniert und zusammen mit einem mtRFP Plasmid (pVT100U-mtRFP), welches die Mitochondrien markiert, in den Wildtyp transformiert. Es folgte die Analyse im Fluoreszenzmikroskop (siehe Abb. 28A).

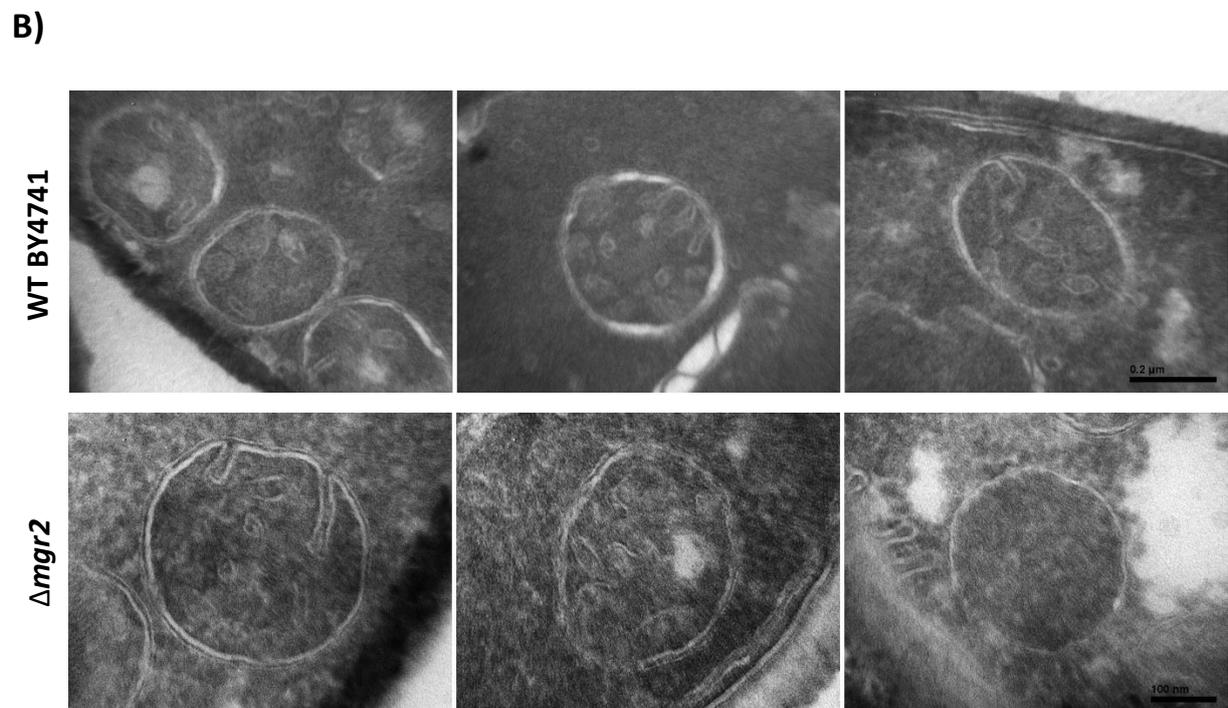
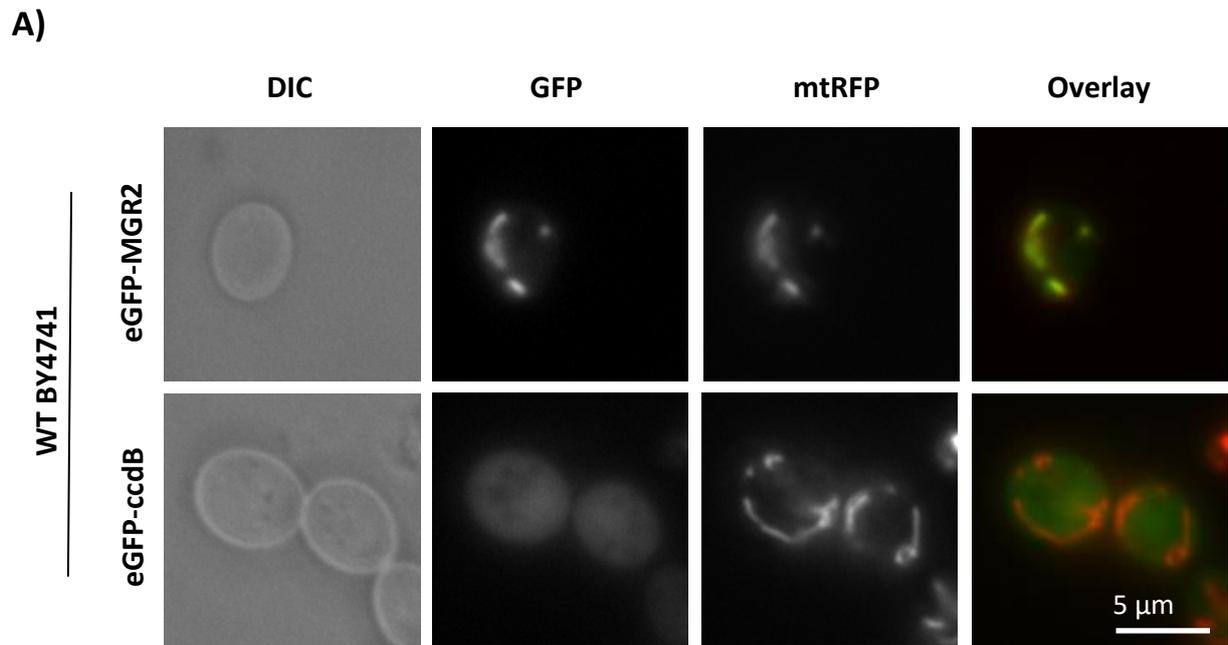


Abbildung 28: Verteilung von Mgr2 und Ultrastruktur von $\Delta mgr2$. **A)** eGFP-Mgr2 ist homogen in den Mitochondrien verteilt. Die Plasmide pAG413-eGFP-MGR2 bzw. pAG413GPD-eGFP-ccdB als Leerkontrolle wurden zusammen mit pVT100U-mtRFP in den WT BY4741 transformiert. Die Transformanten wurden in SCD-HIS-URA über Nacht angeimpft, am nächsten Tag verdünnt und nach 3-4 h im logarithmischen Zustand am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Der Maßstab beträgt 5 μm . **B)** Der Hefestamm $\Delta mgr2$ weist eine wildtypische Ultrastruktur der Mitochondrien auf. Der WT BY4741 und $\Delta mgr2$ wurden in Periodsäure nach der Tokuyasu-Methode fixiert, in Gelatine eingebettet und mit Uranylacetat nachkontrastiert (Tokuyasu, 1986). Die Schnitte wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Der Maßstab beträgt beim WT 200 nm und bei $\Delta mgr2$ 100 nm.

Es konnte festgestellt werden, dass das mitochondriale RFP- und das GFP-Signal überlappen (siehe Abb. 28A). Somit ist Mgr2 homogen in den Mitochondrien verteilt. Zusätzlich wurde ein Leerplasmid (pAG413GPD-eGFP-ccdB) ohne Mgr2 als Kontrolle in Wildtyp-Zellen transformiert. Wie zu erwarten, ist im RFP-Kanal die Mitochondrien-Struktur sichtbar, während das eGFP im Cytosol verteilt vorliegt.

Es gibt auch ein humanes Ortholog von Mgr2: Romo1 (*ROS modulator protein 1*) (Chung *et al.*, 2006). Beide Proteine gehören zur Tim17 Familie, weisen aber nur die ersten beiden für diese Gruppe typischen Transmembrandomänen auf (Zarsky und Dolezal, 2016). Romo1, welches ebenfalls wie Mgr2 ein mitochondriales Membranprotein ist, ist im Krebswachstum involviert (Yu *et al.*, 2015). Außerdem konnte herausgefunden werden, dass es durch oxidativen Stress die induzierte Zellproliferation, Apoptose und Seneszenz beeinflusst (Chung *et al.*, 2008; Na *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2013). Romo1 wird weiterhin für die Oligomerisierung von OPA1 benötigt, einer mitochondrialen Innenmembran-GTPase (Swarnabala *et al.*, 2015). Diese ist unter anderem dafür verantwortlich, dass die Cristae-Junctions intakt sind (Patten *et al.*, 2014). Zellen ohne Romo1 weisen weniger oder gar keine Cristae auf (Norton *et al.*, 2014). Dies wirft die Frage auf, ob Mgr2 in Hefe auch eine Rolle bei dem Aufbau der Cristae-Struktur spielt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Wildtyp und $\Delta mgr2$ elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurde eine Elektronenmikroskopie nach Tokuyasu durchgeführt und am Elektronenmikroskop analysiert (siehe Abb. 28B) (Tokuyasu, 1986). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Cristae wie auch die Cristae-Junctions sowohl im Wildtyp als auch in $\Delta mgr2$ wildtypisch sind. Auch die Anzahl der Cristae ist bei $\Delta mgr2$ mit dem Wildtyp vergleichbar. Somit spielt Mgr2 keine Rolle bei der Cristae-Morphologie.

4. Schlussfolgerung und Ausblick

4.1. Screens

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Proteine zu finden, welche am Erhalt der mitochondrialen DNA beteiligt sind. Die durchgeführten Screens liefern zusammen mit den Ergebnissen der Screens der anderen hier besprochenen Gruppen neue Einblicke in den mtGenom-Erhalt und die Atmung (Dimmer *et al.*, 2002; Luban *et al.*, 2005; Merz und Westermann, 2009). Jeder Screen für sich birgt eine Fülle an Daten und durch den Vergleich mit anderen Screens können physiologische Zusammenhänge aufgedeckt werden.

Des Weiteren könnten mit den in dieser Arbeit erstellten Ausgangsbibliotheken noch zusätzliche Screens, welche essentielle Gene für die Aufrechterhaltung und Vererbung des mitochondrialen Genoms aufdecken, konzipiert werden. Zum Beispiel könnte zusätzlich in die *MATa* Deletionsbibliothek, welche bereits das *rho*⁺ mtGenom enthält, eine *rho*⁻ Variante der mtDNA durch Cytoduktion eingebracht werden. Nach dieser Cytoduktion könnte durch Stempeln auf YPG überprüft werden, ob sich die wildtypische oder die deletierte mitochondriale DNA durchgesetzt hat und weitervererbt wurde. Denn in der Hefe entmischen sich verschiedene Populationen der mtDNA innerhalb von 10-20 Generationen und es bleibt ein homoplasmischer Zustand zurück (Ling und Shibata, 2004). Können die Hefen auf YPG wachsen, so hat sich das wildtypische Genom durchgesetzt. Auf der anderen Seite ist das *rho*⁻ Genom erhalten geblieben, wenn die Zellen nicht mehr auf YPG wachsen können. Dadurch kann nach Genen gescreent werden, deren Proteine für die Vererbung einer wildtypischen mitochondrialen DNA wichtig sind bzw. deren Proteine eine Rolle bei der mtDNA-Reparatur spielen.

4.2. Charakterisierung der interessanten Gene

Die interessanten Treffer aus den diversen Screens müssen weiter charakterisiert werden. Durch die Literaturrecherche gibt es bei einigen der Proteine Anhaltspunkte, in welchem Prozess sie beteiligt sein könnten. Als erstes ist es wichtig, die Lokalisation der Proteine zu erfahren, bei welchen es noch nicht bekannt ist. Dazu sollten die Gene am besten chromosomal mit GFP oder RFP getagged werden, damit keine Überexpressionseffekte der

Plasmide erhalten werden, welche das Ergebnis verfälschen. Dies könnte zum Beispiel durch Insertion eines PCR-Produkts über homologe Rekombination erfolgen (Longtine *et al.*, 1998).

Als nächstes müssen die Hypothesen verifiziert werden. Das Protein Emi1 könnte beispielsweise aufgrund von einem ähnlichen Profil mit einigen F_1F_0 -ATP-Synthasen-Assemblierungsfaktoren selbst diese Aufgabe erfüllen oder zumindest *upstream* bei einem dieser Proteine wirken. Um dies zu überprüfen, könnte in einem ersten Ansatz die ATPase-Aktivität von $\Delta emi1$, weiteren Stämmen mit Assemblierungsdefekten und dem Wildtyp gemessen werden. Ist die ATPase-Aktivität erniedrigt, so könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Emi1 tatsächlich bei der Assemblierung der F_1F_0 -ATP-Synthase beteiligt ist. Des Weiteren könnte versucht werden nachzuweisen, dass Emi1 in räumlicher Nähe zu der F_1F_0 -ATP-Synthase liegt. Dies könnte durch Fluoreszenzmikroskopie nach Koppeln von Emi1 mit GFP und zum Beispiel Atp1 mit RFP geschehen. Oder auch der bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsassay (BiFC) könnte dabei zum Einsatz kommen. Dabei wird ein Teil von YFP an *EMI1* und der andere Teil von YFP an *ATP1* kloniert. Liegen beide Proteine in räumlicher Nähe, dann wird das YFP wieder funktionsfähig und es gibt ein Signal im Fluoreszenzmikroskop (Skarp *et al.*, 2008). Dabei muss allerdings erwähnt werden, dass das Auflösungsvermögen eines konventionellen Lichtmikroskops für ein solches Experiment nicht ausreicht und *super resolution microscopy* zum Einsatz kommen müsste, um eindeutig zu erkennen, ob die Proteine in räumlicher Nähe zueinander liegen (Fornasiero und Opazo, 2015).

Das Protein Rrg1 könnte möglicherweise eine mitochondriale Aminoacyl-t-RNA-Synthetase sein, welche für das Beladen der tRNAs mit Aminosäuren verantwortlich sind (Delarue, 1995). Um das zu verifizieren, könnte in einem ersten Experiment überprüft werden, ob die Translationsaktivität in den Mitochondrien in $\Delta rrg1$ noch vorhanden ist. Läuft die Translation fehlerfrei ab, so ist Rrg1 keine tRNA-Synthetase. Ist jedoch Rrg1 eine mitochondriale Aminoacyl-tRNA-Synthetase, dann kann durch fehlendes Beladen der jeweiligen tRNA keine oder nur fehlerhafte Proteintranslation vonstattengehen. Wenn dem so ist, dann besteht auch immer noch die Möglichkeit, dass Rrg1 in einem anderen Prozess der mitochondrialen Translation involviert ist. Daher müssen weitere Versuche folgen.

Auch die anderen Proteine, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, sollten weiter analysiert werden. Alles in allem konnten mittels der diversen Screens genomweit wertvolle

Informationen über den mtDNA-Erhalt in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen werden, welche wiederum für das weitere Konzipieren von Experimenten genutzt werden können.

5. Literatur

Ackerman, S.H., und Tzagoloff, A. (1990a). *ATP10*, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F₁-F₀ complex. *Journal of Biological Chemistry* 265:9952-9959.

Ackerman, S.H., und Tzagoloff, A. (1990b). Identification of two nuclear genes (*ATP11*, *ATP12*) required for assembly of the yeast F₁-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:4986-4990.

Ahmad, M., und Bussey, H. (1986). Yeast arginine permease: nucleotide sequence of the *CAN1* gene. *Current Genetics* 10:587-592.

Alberti, S., Gitler, A.D., und Lindquist, S. (2007). A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24:913-919.

Alexander, N.J., Vincent, R.D., Perlman, P.S., Miller, D.H., Hanson, D.K., und Mahler, H.R. (1979). Regulatory interactions between mitochondrial genes. I. genetic and biochemical characterization of some mutant types affecting apocytochrome b and cytochrome oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 254:2471-2479.

Altmann, K., Frank, M., Neumann, D., Jakobs, S., und Westermann, B. (2008). The class V myosin motor protein, *Myo2*, plays a major role in mitochondrial motility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 181:119-130.

Ames, B.N., Gold, L.S., und Willet, W.C. (1995). The cause and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:5258-5265.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., und Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.

Andreeva, N., Kulakovskaya, E., Zvonarev, A., Penin, A., Eliseeva, I., Teterina, A., Lando, A., Kulakovskiy, I.V., und Kulakovskaya, T. (2017). Transcriptome profile of yeast reveals the essential role of *PMA2* and uncharacterized gene *YBR056W-A (MNC1)* in adaptation to toxic concentration. *Metallomics* 9:175-182.

Andrus, P.K., Fleck, T.J., Gurney, M.E., und Hall, E.D. (1998). Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry* 71:2041-2048.

Banroques, J., Perea, J., und Jacq, C. (1987). Efficient splicing of two yeast mitochondrial introns controlled by a nuclear-encoded maturase. *The EMBO Journal* 6:1085-1091.

Barros, M.H., und Tzagoloff, A. (2017). Aep3p-dependent translation of yeast mitochondrial *ATP8*. *Molecular Biology of the Cell* 28:1426-1434.

Baryshnikova, A., Costanzo, M., Dixon, S., Vizeaecoumar, F.J., Myers, C.L., Andrews, B., und Boone, C. (2010). Synthetic genetic array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology* 470:145-179.

Becker, T., Wenz, L.S., Krüger, V., Lehmann, W., Müller, J.M., Goroncy, L., Zufall, N., Lithgow, T., Guiard, B., Chacinska, A., Wagner, R., Meisinger, C., und Pfanner, N. (2008). The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispinning outer membrane proteins. *Journal of Cell Biology* 194:387-395.

Beckman, R.A., Mildvan, A.S., und Loeb, L.A. (1985). On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis *in vitro*. *Biochemistry* 24:5810-5817.

Behl, C. (1999). Alzheimer's disease and oxidative stress implications for novel therapeutic approaches. *Progress in Neurobiology* 57:301-323.

Benda, C. (1898). Über die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertrebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. *Archiv für Anatomie und Physiologie* 73:393-398.

Bendich, A.J. (1996). Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 255:564-588.

Bilinski, T., Litwinska, J., Blaszczyński, M., und Bajus, A. (1989). Superoxide dismutase deficiency and the toxicity of the products of autooxidation of polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1001:102-106.

Birky, C.W., Jr. (1978). Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Annual Review of Genetics* 12:471-512.

Blanc, H., und Dujon, B. (1980). Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:3942-3946.

Boeke, J.D., LaCroute, F., und Fink, G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular Genetics and Genomics* 197:345-346.

Boveris, A., Oshino, N., und Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal* 128:617-630.

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., und 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.

Bradshaw, E., Yoshida, M., und Ling, F. (2017). Regulation of small mitochondrial DNA replicative advantage by ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3* 7:3083-3090.

Bulder, C.J. (1964). Induction of *petite* mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 30:1-9.

Caballero, A., Ugidos, A., Liu, B., Öling, D., Kvint, K., Hao, X., Mignat, C., Nachin, L., Molin M., und Nyström, T. (2011). Absence of mitochondrial translation control proteins extends life span by activating sirtuin-dependent silencing. *Molecular Cell* 42: 390-400.

Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., und Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 35:27393-27398.

Chabes, A., Domkin, V., und Thelander, L. (1999). Yeast Sml1, a protein inhibitor of ribonucleotide reductase. *Journal of Biology Chemistry* 274:36679-36683.

Chen, X.J., und Butow, R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Reviews Genetics* 6:815-825.

Chen, X.J., und Clark-Walker, G.D. (2018). Unveiling the mystery of mitochondrial DNA replication in yeasts. *Mitochondrion* 38:17-22.

Chen, X.J., Wang, X., Kaufman, B.A., und Butow, R.A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307:714-717.

Chernyakov, I., Santiago-Tirado, F., und Bretscher, A. (2013). Active segregation of yeast mitochondria by Myo2 is essential and mediated by Mmr1 and Ypt11. *Current Biology* 23:1818-1824.

Chung, Y.M., Kim, J.S., und Yoo, Y.D. (2006). A novel protein, Romo1, induces ROS production in the mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347:649-655.

Chung, Y.M., Lee, S.B., Kim, H.J., Park, S.H., Kim, J.J., Chung, J.S., und Yoo, Y.D. (2008). Replicative senescence induced by Romo1-derived reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283:33763-33771.

Cliften, P., Sudarsanam, P., Desikan, A., Fulton, L., Fulton, B., Majors, J., Waterson, R., Cohen, B.A., und Johnston, M. (2003). Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science* 301:71-76.

Costanzo, M.C., Engel, S.R., Wong, E.D., Lloyd, P., Karra, K., Chan, E.T., Weng, S., Paskov, K.M., Roe, G.R., Binkley, G., Hitz, B.C., und Cherry, J.M. (2014). *Saccharomyces* genome database provides new regulation data. *Nucleic Acids Research* 42:D717-725.

Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E.N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., Wang, W., Usaj, M., Hanchard, J., Lee, S.D., Pelechano, V., Styles, E.B., Billmann, M., van Leeuwen, J., van Dyk, N., Lin, Z.Y., Kuzmin, E., Nelson, J., Piotrowski, J.S., Srikumar, T., Bahr, S., Chen, Y., Deshpande, R., Kurat, C.F., Li, S.C., Li, Z., Usaj, M.M., Okada, H., Pascoe, N., San Luis, B.J., Sharifpoor, S., Shuterigi, E., Simpkins, S.W., Snider, J., Suresh, H.G., Tan, Y., Zhu, H., Malod-Dognin, N., Janjic, V., Przulj, N., Troyanskaya, O.G., Stagljar, I., Xia, T., Ohya, Y., Gingras, A.C., Raught, B., Boutros, M., Steinmetz, L.M., Moore, C.L., Rosebrock, A.P., Caudy, A.A., Myers, C.L., Andrews, B., und Boone, C. (2016). A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science* 353:1-34.

Das, J. Ghosh, J., Manna, P., Sinha, M., und Sil, P.C. (2009). Arsenic-induced oxidative cerebral disorders: Protein by taurine. *Drug and Chemical Toxicology* 32:93-102.

Das, J., Ghosh, J., Manna, P., und Sil, P.C. (2011). Taurine suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiac apoptosis in rat via up-regulation of PI3-K/Akt and inhibition of p53, p38-JNK. *Biochemical Pharmacology* 81:891-909.

D'Silva, P.D., Schilke, B., Walter, W., Andrew, A., und Craig, E.A. (2003). J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:13839-13844.

de Zamaroczy, M., Marotta, R., Faugeron-Fonty, G., Goursot, R., Mangin, M., Baldacci, G., und Bernardi, G. (1981). The origins of replication of the yeast mitochondrial genome and the phenomenon of suppressivity. *Nature* 292:75-78.

de Zamaroczy, M., Faugeron-Fonty, G., Baldacci, G., Goursot, R., und Bernardi, G. (1984). The *ori* sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene* 32:439-457.

Delannoy, E., Stanley, W.A., Bond, C.S., und Small, I.D. (2007). Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochemical Society Transactions* 35:1643-1647.

Delarue, M. (1995). Aminoacyl-tRNA synthetases. *Current Opinion in Structural Biology* 5:48-55.

Dennis, E.A, und Kennedy, E.P. (1972). Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *The Journal of Lipid Research* 13:263-267.

Devit, M., Cullen, P.J., Branson, M., Sprague, G.F., und Fields, S. (2005). Forcing interactions as a genetic screen to identify proteins that exert a defined activity. *Genome Research* 15:560-565.

Diffley, J.F., und Stillman, B. (1988). Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:2120-2124.

Diffley, J.F., und Stillman, B. (1991). A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:7864-7868.

Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., und Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 13:847-853.

Drubin, D.G., Jones, H.D., und Wertman, K.F. (1993). Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Molecular Biology of the Cell* 4:1277-1294.

Dunn, C.D., Lee, M.S., Spencer, F.A., und Jensen, R.E. (2006). A genomewide screen for *petite*-negative yeast strains yields a new subunit of the i-AAA protease complex. *Molecular Biology of the Cell* 17:213-226.

Eichhorn, G.L., und Shin, Y.A. (1968). Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *Journal of the American Chemical Society* 90:7323-7328.

Eide, D.J., Clark, S., Nair, T.M., Gehl, M., Gribskov, M., Guerinet, M.L., und Harper, J.F. (2005). Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology* 6:R77.1-R77.13.

Elbaz-Alon, Y., Rosenfeld-Gur, E., Shinder, V., Futerman, A.H., Geiger, T., und Schuldiner, M. (2014). A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Developmental Cell* 30:95-102.

Ellis, T.P., Helfenbein, K.G., Tzagoloff, A., und Dieckmann, C.L. (2004). Aep3p stabilizes the mitochondrial bicistronic mRNA encoding subunits 6 and 8 of the H⁺-translocating ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 279:15728-15733.

Enyenihi, A.H., und Saunders, W.S. (2003). Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163:47-54.

Ephrussi, B., Hottinguer, H., und Tavlitzki, J. (1949). Action de l'acriflavine sur les levures II. Etude génétique du mutant "petite colonie". *Annales de l'Institut Pasteur* 76:419-442.

Ephrussi, B., de Margerie-Hottinguer, H., und Roman, H. (1955). Suppressiveness: a new factor in the genetic determinism of the synthesis of respiratory enzymes in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 41:1065-1071.

Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., und Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347:203-206.

Fekete, V., Cierna, M., Poláková, S., Piskur, J., und Sulo, P. (2007). Transition of the ability to generate *petites* in the *Saccharomyces/Kluyveromyces* complex. *FEMS Yeast Research* 7:1237-1247.

Ferreira, G.C., und Gong, J. (1995). 5-aminolevulinic acid synthase and the first step of heme biosynthesis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27:151-159.

Fornasiero, E.F., und Opazo, F. (2015). Super-resolution imaging for cell biologists: concepts, applications, current challenges and developments. *Bioessays* 37:436-451.

Förtsch, J., Hummel, E., Krist, M., und Westermann, B. (2011). The myosin-related motor protein Myo2 is an essential mediator of bud-directed mitochondrial movement in yeast. *Journal of Cell Biology* 194:473-488.

Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., und Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 440:325-331.

Fox, T.D., Folley, L.S., Mulero, J.J., McMullin, T.W., Thorsness, P.E., Hedin, L.O., und Costanzo, M.C., (1991). Analysis and manipulation of yeast mitochondrial genes. *Methods in Enzymology* 194:149-165.

Frey, T.G., und Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* 25:319-324.

Garofalo, C., Trinko, R., Kramer, G., Appling, D.R., und Hardesty, B. (2003). Purification and characterization of yeast mitochondrial initiation factor 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 413:243-252.

Gebert, M., Schrempp, S.G., Mehnert, C.S., Heißwolf, A.K., Oeljeklaus, S., Ieva, R., Bohnert, M., von der Malsburg, K., Wiese, S., Kleinschroth, T., Hunte, C., Meyer, H.E., Haferkamp, I., Guiard, B., Warscheid, B., Pfanner, N., und van der Laan, M. (2012). Mgr2 promotes coupling of the mitochondrial presequence translocase to partner complexes. *Journal of Cell Biology* 197:595-604.

Genga, A., Bianchi, L., und Foury, F. (1986). A nuclear mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mitochondrial DNA replication and polymerase activity. *Journal of Biological Chemistry* 261:9328-9332.

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, 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 in Molecular Biology* 1205:1-12.

Giugliano, D., Ceriello, A., und Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267.

Gray, M.W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *International Review of Cytology* 141:233-357.

Gray, M.W., Burger, G., und Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476-1481.

Gray, M.W., Burger, G., und Lang, F.B. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology* 2:1081.1-1018.5.

Greenleaf, A.L., Kelly, J.L., und Lehman, I.R. (1986). Yeast *RPO41* gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:3391-3394.

Gualberto, J.M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J.H., und Grienemberger, J.M. (1989). RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* 341:660-662.

Guzder, S.N., Sung, P., Prakash, L., und Prakash, S. (1998). The DNA-dependent ATPase activity of yeast nucleotide excision repair factor 4 and its role in DNA damage recognition. *Journal of Biological Chemistry* 273:6292-6296.

Habib, S.J., Neupert, W., und Rapaport, D. (2007). Analysis and prediction of mitochondrial targeting signals. *Methods in Cell Biology* 80:761-781.

Halliwell, B. (1987). Free radicals and metal ions in health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 46:13-26.

Harrington, J.J., und Lieber, M.R. (1994). The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease. *The EMBO Journal* 13:1235-1245.

Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry* 54:1015-1069.

Hawlitshchek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.U., und Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* 53:795-806.

Hell, K. (2008). The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783:601-609.

Henle, E.S., und Linn, S. (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry* 272:19095-19088.

Hensgens, L.A., van der Horst, G., Vos, H.L., und Grivell, L.A. (1984). RNA processing in yeast mitochondria: characterization of mit(-) mutants disturbed in the synthesis of subunit I of cytochrome c oxidase. *Current Genetics* 8:457-465.

Hibbs, M.A., Hess, D.C., Myers, C.L., Huttenhower, C., Li, K., und Troyanskaya, O.G. (2007). Exploring the functional landscape of gene expression: directed search of large microarray compendia. *Bioinformatics* 23:2692-2699.

Hill, B.C. (1994). Modeling the sequence of electron transfer reactions in the single turnover of reduced, mammalian cytochrome c oxidase with oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 269:2419-2425.

Hinnebusch, A. (1992). *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Gene expression*. Cold Spring Harbor.

Hirsch, E.C. (1993). Does oxidative stress participate in nerve cell death in Parkinson's disease? *European Neurology* 33:52-59.

Hobbs, A.E.A., Srinivasan, M., McCaffery, J.M., und Jensen, R.E. (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *The Journal of Cell Biology* 152:401-410.

Hönscher, C., Mari, M., Auffarth, K., Bohnert, M., Griffith, J., Geerts, W., van der Laan, M., Cabrera, M., Reggiori, F., und Ungermann, C. (2014). Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Developmental Cell* 30:86-94.

Hudspeth, M.E., Ainley, W.M., Shumard, D.S., Butow, R.A., und Grossman, L.I. (1982). Location and structure of the *var1* gene on yeast mitochondrial DNA: nucleotide sequence of the 40.0 allele. *Cell* 30:617-626.

Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., und O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425:686-691.

Hulett, J.M., Lueder, F., Chan, N.C., Perry, A.J., Wolyneć, P., Likic, V.A., Gooley, P.R., und Lithgow, T. (2008). The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex. *Journal of Molecular Biology* 376:694-704.

Ieva, R., Heißwolf, A.K., Gebert, M., Vögtle, F.N., Wollweber, F., Mehnert, C.S., Oeljeklaus, S., Warscheid, B., Meisinger, C., van der Laan, M., und Pfanner, N. (2013). Mitochondrial inner membrane protease promotes assembly of presequence translocase by removing a carboxy-terminal targeting sequence. *Nature Communications* 4:2853.

Ieva, R., Schrempp, S.G., Opalinski, L., Wollweber, F., Höß, P., Heißwolf, A.K., Gebert, M., Zhang, Y., Guiard, B., Rospert, S., Becker, T., Chacinska, A., Pfanner, N., und van der Laan, M. (2014). Mgr2 functions as lateral gatekeeper for preprotein sorting in the mitochondrial inner membrane. *Molecular Cell* 56:641-652.

Issel-Tarver, L., Christie, K.R., Dolinski, K., Andrada, R., Balakrishnan, R., Ball, C.A., Binkley, G., Dong, S., Dwight, S.S., Fisk, D.G., et al., (2002). *Saccharomyces* Genome Database. *Methods in Enzymology* 350:329-346.

Iyanagi, T., und Yamazaki, I. (1970). One-electron-transfer reactions in biochemical systems. V. Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase). *Biochimica et Biophysica Acta* 216:282-294.

Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., und Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21:947-962.

Jauniaux, J.C., Urrestarazu, L.A., und Wiame, J.M. (1978). Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes. *Journal of Bacteriology* 133:1096-1107.

Kassir, Y., Granot, D., und Simchen, G. (1988). *IME1*, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 52:853-862.

Kearns, T.P., und Sayre, G.P. (1958). Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *Archives of Ophthalmology* 60:280-289.

Keeling, P.J., und Palmer, J.D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics* 9:605-618.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., und Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26:239-257.

Kiakos, K., Howard, T.T., Lee, M., Hartley, J.A., und McHugh, P.J. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* *RAD5* influences the excision repair of DNA minor groove adducts. *Journal of Biological Chemistry* 277:44576-44581.

Kitakawa, M., Graack, H.R., Grohmann, L., Goldschmidt-Reisin, S., Herfurth, E., Wittmann-Liebold, B., Nishimura, T., und Isono, K. (1997). Identification and characterization of the genes for mitochondrial ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 245:449-456.

Klecker, T., Scholz, D., Förtsch, J., und Westermann, B. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *Journal of Cell Science* 126:2924-2930.

Kleff, S., Kemper, B., und Sternglanz, R. (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *The EMBO Journal* 11:699-704.

Kloeckener, Gruissem, B., McEwen, J.E., und Poyton, R.O. (1987). Nuclear functions required for cytochrome c oxidase biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: multiple trans-acting nuclear genes exert specific effects on expression of each of the cytochrome c oxidase subunits encoded on mitochondrial DNA. *Current Genetics* 12:311-322.

Kobourov, S.G. (2012). Spring embedders and force directed graph drawing algorithms. arXiv:1201.3011. (08.03.2018)

Koehler, C.M. (2004). The small Tim proteins and the twin C₃C motif. Trends in Biochemical Sciences 29:1-4.

Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., und Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. Science 325:477-481.

Kornmann, B., Osman, C., und Walter, P. (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. Proceedings of the National Academy of Sciences 108:14151-14156.

Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregín-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A., und Greenblatt, J.F. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 440:637-643.

Kucej, M., Kucejova, B., Subramanian, R., Chen, X.J., und Butow, R.A. (2008). Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues. Journal of Cell Science 121:1861-1868.

Lackner, L.L., und Nunnari, J.M. (2009). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. Biochimica et Biophysica Acta 1792:1138-1144.

Lahaye, A., Stahl, H., Thines-Sempoux, D., und Foury, F. (1991). Pif1: a DNA helicase in yeast mitochondria. The EMBO Journal 10:997-1007.

Landrieu, I., Vandenbol, M., Härtlein, M., und Portetelle, D. (1997). Mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase is encoded by the yeast nuclear gene *YCR24c*. European Journal of Biochemistry 243:268-273.

Lettier, G., Feng, Q., de Mayolo, A.A., Erdeniz, N., Reid, R.J.D., Lisby, M., Mortensen, U.H., und Rothstein, R. (2006). The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*. PLoS Genetics 2:1773-1786.

Liao, X.C., Tang, J., und Rosbach, M. (1993). An enhancer screen identifies a gene that encodes the yeast U1 snRNP A protein: implications for snRNP protein function in pre-mRNA splicing. *Genes & Development* 7:419-428.

Lill, R. und Kispal, G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* 25:352-356.

Ling, F., und Shibata, T. (2002). Recombination-dependent mtDNA partitioning: *in vivo* role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *The EMBO Journal* 21:4730-4740.

Ling, F., und Shibata, T. (2004). Mhr1p-dependent concatemeric mitochondrial DNA formation for generating yeast mitochondrial homoplasmic cells. *Molecular Biology of the Cell* 15:310-322.

Ling, F., Hori, A., und Shibata, T. (2007). DNA recombination-initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast [*rho*⁻] mitochondrial DNA that contains the replication origin *ori5*. *Molecular and Cellular Biology* 27:1133-1145.

Lipinski, K.A., Puchta, O., Surendranath, V., Kudla, M., und Golik, P. (2011). Revisiting the yeast PPR proteins – application of an iterative hidden Markov model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. *Molecular Biology and Evolution* 28:2935-2948.

Lockshon, D., Zweifel, S.G., Freeman-Cook, L.L., Lorimer, H.E., Brewer, B.J., und Fangman, W.L. (1995). A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast. *Cell* 81:947-955.

Longen, S., Bien, M., Bihlmaier, K., Kloeppel, C., Kauff, F., Hammermeister, M., Westermann, B., Herrmann, J.M., und Riemer, J. (2009). Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family. *Journal of Molecular Biology* 393:356-368.

Longtine, M.S., McKenzie, A. 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., und Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:953-961.

Loor, G., Kondapalli, J., Schriewer, J.M., Chandel, N.S., Vanden Hoek, T.L., und Schumacker, P.T. (2010). Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 49:1925-1936.

Lorimer, H.E., Brewer, B.J., und Fangman, W.L. (1995). A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Molecular Cell Biology* 15:4803-4809.

Luban, C., Beutel, M., Stahl, U., und Schmidt, U. (2005). Systematic screening of nuclear encoded proteins involved in the splicing metabolism of group II introns in yeast mitochondria. *Gene* 354:72-79.

MacAlpine, D.M., Kolesar, J., Okamoto, K., Butow, R.A., und Perlman, P.S. (2001). Replication and preferential inheritance of hypersuppressive *petite* mitochondrial DNA. *The EMBO Journal* 20:1807-1817.

Manickam, A.H., Michael, M.J., und Ramasamy, S. (2017). Mitochondrial genetics and therapeutic overview of Leber's hereditary optic neuropathy. *Indian Journal of Ophthalmology* 65:1087-1092.

Manna, S. (2015). An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie* 113:93-99.

Mannaerts, G.P., Debeer, L.J., Thomas, J., und De Schepper, P.J. (1979). Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats. *The Journal of Biological Chemistry* 254:4585-4595.

de Marcos-Lousa, C., Sideris, D.P., und Tokatlidis, K. (2006). Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends in Biochemical Sciences* 31:259-267.

Mbantenkhu, M., Wang, X., Nardozi, J.D., Wilkens, S., Hoffman, E., Patel, A., Cosgrove, M.S., und Chen, X.J. (2011). Mgm101 is a Rad52-related protein required for mitochondrial DNA recombination. *Journal of Biological Chemistry* 286:42360-42370.

McCord, J.M., und Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244:6049-6055.

Meeusen, S., und Nunnari, J. (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *Journal of Cell Biology* 163:503-510.

Merz, S., und Westermann, B. (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology* 10:R95.1-R95.18.

Michaillat, L., und Mayer, A. (2013). Identification of genes affecting vacuole membrane fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS One* 8:e54160.

Mitchell, P. (1967). Proton current flow in mitochondrial systems. *Nature* 214:1327-1328.

Miura, T., Yamana, Y., Usui, T., Ogawa, H.I., Yamamoto, M.T., und Kusano, K. (2012). Homologous recombination via synthesis-dependent strand annealing in yeast requires the Irc20 and Srs2 DNA helicases. *Genetics* 191:65-78.

Moda, B.S., Ferreira-Junior, J.R., und Barros, M.H. (2016). Partial suppression of the respiratory defect of *qrs1/her2* glutamyl-tRNA amidotransferase mutants by overexpression of the mitochondrial pentatricopeptide Msc6p. *Current Genetics* 62:607-617.

Myers, A.M., Pape, L.K., und Tzagoloff, A. (1985). Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 4:2087-2092.

Na, A.R., Chung, Y.M., Lee, S.B., Park, S.H., Lee, M.S., und Yoo, Y.D. (2008). A critical role for Romo1-derived ROS in cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 369:672-678.

Nagley, P., Hall, R.M., und Ooi, B.G. (1986). Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 9 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin or venturicidin resistance. *FEBS Letters* 195:159-163.

Nissim, I., Luhovyy, B., Horyn, O., Daikhin, Y., Nissim, I., und Yudkoff, M. (2005). The role of mitochondrially bound arginase in the regulation of urea synthesis: studies with [U-15N4]arginine, isolated mitochondria, and perfused rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 280:17715-17724.

Norton, M., Ng, A.C., Baird, S., Dumoulin, A., Shutt, T., Mah, N., Andrade-Navarro, M.A., McBride, H.M., und Screatton, R.A. (2014). ROMO1 is an essential redox-dependent regulator of mitochondrial dynamics. *Science Signaling* 7:ra10.

Oliveros, J.C. (2007-2015). Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

Orr, W.C., und Sohal, R.S. (1994). Extension of life-span by over expression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263:1128-1130.

Osman, C., Noriega, T.R., Okreglak, V., Fung, J.C., und Walter, P. (2015). Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:E947-E956.

Ott, M., und Herrmann, J.M. (2010). Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803:767-775.

Palecek, S.P., Parikh, A.S., und Kron, S.J. (2000). Genetic analysis reveals that *FLO11* upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156:1005-1023.

Paschen, S.A., Neupert, W., und Rapaport, D. (2005). Biogenesis of β -barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* 30:575-582.

Patten, D.A., Wong, J., Khacho, M., Soubannier, V., Mailloux, R.J., Pilon-Larose, K., MacLaurin, J.G., Park, D.S., McBride, H.M., Trinkle-Mulcahy, L., Harper, M.E., Germain, M., und Slack, R.S. (2014). OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *The EMBO Journal* 33:2676-2691.

Payne, M.J., Schweizer, E., und Lukins, H.B. (1991). Properties of two nuclear *pet* mutants affecting expression of the mitochondrial *oli1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 19:343-351.

Pelissier, P.P., Camougrand, N.M., Manon, S.T., Velours, G.M., und Guerin, M.G. (1992). Regulation by nuclear genes of the mitochondrial synthesis of subunit 6 and 8 of the ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 267:2467-2473.

Pfanner, N., Douglas, M.G., Endo, T., Hoogenraad, N.J., Jensen, R.E., Meijer, M., Neupert, W., Schatz, G., Schmitz, U.K., und Shore, G.C. (1996). Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends in Biochemical Sciences* 21:51-52.

Pierce G.B., Parchment, R.E., und Lewellyn, A.L. (1991). Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation* 46:181-186.

Piskur, J. (1994). Inheritance of the yeast mitochondrial genome. *Plasmid* 31:229-241.

Popov-Celeketic, J., Weizenegger, T., und Rapaport, D. (2008). Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *Journal of Molecular Biology* 376:671-680.

Prakash, L. (1981). Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of *rad6*, *rad18*, *rev3* and *rad52* mutations. *Molecular Genetics and Genomics* 184:471-478.

Preiser, P.R., Wilson, R.J., Moore, P.W., McCready, S., Hajibagheri, M.A., Blight, K.J., Strath, M., und Williamson, D.H. (1996). Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA. *The EMBO Journal* 15:684-693.

Preston, R.A., Manolson, M.F., Becherer, K., Weidenhammer, E., Kirkpatrick, D., Wright, R., und Jones, E.W. (1991). Isolation and characterization of *PEP3*, a gene required for vacuolar biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 11:5801-5812.

Putrament, A., Branowska, H., Ejchart, A., und Prazmo, W. (1975). Manganese mutagenesis in yeast. A practical application of manganese for the induction of mitochondrial antibiotic-resistant mutations. *Journal of General Microbiology* 90:265-270.

Raisner, R.M., und Madhani, H.D. (2008). Genomewide screen for negative regulators of sirtuin activity in *Saccharomyces cerevisiae* reveals 40 loci and links to metabolism. *Genetics* 179:1933-1944.

Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., und Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 273:20150-20155.

Reagan, M.S., Pittenger, C., Siede, W., und Friedberg, E.C. (1995). Characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* with a deletion of the *RAD27* gene, a structural homolog of the *RAD2* nucleotide excision repair gene. *Journal of Bacteriology* 177:364-371.

Rehling, P., Brandner, K., und Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5:519-530.

Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C., und Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of Proteome Research* 5:1543-1554.

Reiner, S., Micolod, D., Zellnig, G., und Schneiter, R. (2006). A genomewide screen reveals a role of mitochondria in anaerobic uptake of sterols in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 17:90-103.

Rine, J., und Herskowitz, I. (1987). Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 116:9-22.

Rosenthal, G.A., und Harper, L. (1996). L-homoarginine studies provide insight into the antimetabolic properties of L-canavanine. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26:389-394.

Sanchez-Sandoval, E., Diaz-Quezada, C., Velazquez, G., Arroyo-Navarro, L.F., Almanza-Martinez, N., Trasvina-Arenas, C.H., und Briebe, L.G. (2015). Yeast mitochondrial RNA polymerase primes mitochondrial DNA polymerase at origins of replication and promoter sequences. *Mitochondrion* 24:22-31.

- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science* 283:1488-1493.
- Schmitz-Linneweber, C., und Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in Plant Science* 13:663-670.
- Schwartz, J.H., und Maas, W.K. (1960). Analysis of the inhibition of growth produced by canavanine in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 79:794-799.
- Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., und Sedman, J. (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* 20:1816-1824.
- Sesaki, H., und Jensen, R.E. (2001). *UGO1* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *Journal of Cell Biology* 152:1123-1134.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P., und Jensen, R.E. (2003). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Molecular Biology of the Cell* 14:2342-2356.
- Sherman, F. (1963). Respiration-deficient mutants of yeast. I. *Genetics*. *Genetics* 48:375-385.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods in Enzymology* 350:3-41.
- Shima, J., Ando, A., und Takagi, H. (2008). Possible roles of vacuolar H⁺-ATPase and mitochondrial function in tolerance to air-drying stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *Yeast* 25:179-190.
- Shin, J.A., Chung, J.S., Cho, S.H., Kim, H.J., und Yoo, Y.D. (2013). Romo1 expression contributes to oxidative stress-induced death of lung epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 439:315-320.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:13207-13212.
- Sikorski, R.S., und 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.

Skarp, K.P., Zhao, X., Weber, M., und Jantti, J. (2008). Use of bimolecular fluorescence complementation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology* 457:165-175.

Small, I.D., und Peeters, N. (2000). The PPR motif – a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 25:46-47.

Small, W.C., und McAlister-Henn, L. (1998). Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 180:4051-4055.

Sor, F., und Fukuhara, H. (1982). Identification of two erythromycin resistance mutations in the mitochondrial gene coding for the large ribosomal RNA in yeast. *Nucleic Acids Research* 10:6571-6577.

Soto, I.C., Fontanesi, F., Liu, J., und Barrientos, A. (2012). Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817:883-897.

Spencer, J.F.T., und Spencer, D.M. (1996). Rare-mating and cytoduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology* 53:39-44.

Stalberg, K., Neal, A.C., Ronne, H., und Stahl, U. (2008). Identification of a novel GPCAT activity and a new pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *S. cerevisiae*. *Journal of Lipid Research* 49:1794-1806.

Steele, D.F., Butler, C.A., und Fox, T.D. (1996). Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:5253-5257.

Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J., und Davis, R.W. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nature Genetics* 31:400-404.

Stojanovski, D., Müller, J.M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., und Chacinska, A. (2008). The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783:610-617.

Swarnabala, S., Gattu, M., Perry, B., Cho, Y., Lockey, R.F., und Kolliputi, N. (2015). ROMO1 links oxidative stress to mitochondrial integrity. *Journal of Cell Communication and Signaling* 9:73-75.

Takeda, M., Katayama, H., Satoh, T., und Mabuchi, T. (2005). Three copies of the *ATP2* gene are arranged in tandem on chromosome X in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 47:265-272.

Tenson, T., Lovmar, M., und Ehrenberg, M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology* 330:1005-1014.

Tokuyasu, K.T. (1986). Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *Journal of Microscopy* 143:139-149.

Tong, A.H.Y., und Boone, C. (2006). Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology* 313:171-192.

Tong, A.H.Y., und Boone, C. (2007). High-throughput strain construction and systematic synthetic lethal screening in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Microbiology* 36:369-386.

Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Pagé, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M., und Boone, C. (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294:2364-2368.

Torres-Ramos, C.A., Prakash, S., und Prakash, L. (2002). requirement of *RAD5* and *MMS2* for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* 22:2419-2426.

Traba, J., Froschauer E.M., Wiesenberger, G., Satrústegui, J., und Del Arco, A. (2008). Yeast mitochondria import ATP through the calcium-dependent ATP-Mg/Pi carrier Sal1p, and are ATP consumers during aerobic growth in glucose. *Molecular Microbiology* 69:570-585.

Truscott, K.N., Voos, W., Frazier, A.E., Lind, M., Li, Y., Geissler, A., Dudek, J., Müller, H., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Guiard, B., Rehling, P., und Pfanner, N. (2003). A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *Journal of Cell Biology* 24:707-713.

Turrens, J.F., und Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal* 191:421-427.

Tzagoloff, A., und Dieckmann, C.L., (1990). *PET* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 54:211-225.

Tzagoloff, A., Barrientos, A., Neupert, W., und Herrmann, J.M. (2004). Atp10p assists assembly of Atp6p into the F₀ unit of the yeast mitochondrial ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 279:19775-19780.

Usaj, M., Tan, Y., Wang, W., VanderSluis, B., Zou, A., Myers, C.L., Costanzo, M., Andrews, B., und Boone, C. (2017). TheCellMap.org: A web-accessible database for visualizing and mining the global yeast genetic interaction network. *G3* 7:1539-1549.

van der Laan, M., Hutu, D.P., und Rehling, P. (2010). On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803:732-739.

Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B., und Brill, S.J. (1992). A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *The EMBO Journal* 11:3421-3430.

Visacka, K., Gerhold, J.M., Petrovicova, Kinsky, S., Joers, P., Nosek, J., Sedman, J., und Tomaska, L. (1998). Novel subfamily of mitochondrial HMG box-containing proteins: functional analysis of Gcf1p from *Candida albicans*. *Microbiology* 155:1226-1240.

Vögtle, F.-N., Burkhart, J.M., Gonczarowska-Jorge, H., Kücükköse, C., Taskin, A.A., Kopczynski, D., Ahrends, R., Mossmann, D., Sickmann, A., Zahedi, R.P., und Meisinger, C. (2017). Landscape of submitochondrial protein distribution. *Nature Communications* 8:1-10.

Vögtle, F.N., Wortelkamp, S., Zahedi, R.P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., Voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2009). Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139:428-439.

Vowinckel, J., Hartl, J., Butler, R., und Ralser M. (2015). MitoLoc: A method for the simultaneous quantification of mitochondrial network morphology and membrane potential in single cells. *Mitochondrion* 24:77-86.

Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Vögtle, F.N., Meisinger, C., Meyer, H.E., Zieseniss, A., Katschinski, D.M., Jans, D.C., Jakobs, S., Warscheid, B., Rehling, P., und Deckers, M. (2012). Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metabolism* 15:336-347.

Wagih, O., Usaj, M., Baryshnikova, A., VanderSluis, B., Kuzmin, E., Costanzo, M., Myers, C.L., Andrews, B.J., Boone, C.M., und Parts, L. (2013). SGAtools: One-stop analysis and visualization of array-based genetic interaction screens. *Nucleic Acids Research* 41:591-596.

Walker, J.E., und Dickson, V.K. (2006). The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757:286-296.

Walker, J.E., Gay, N.J., Powell, S.J., Kostina, M., und Dyer, M.R. (1987). ATP synthase from bovine mitochondria: sequences of imported precursors of oligomycin sensitivity conferral protein, factor 6, and adenosinetriphosphate inhibitor protein. *Biochemistry* 26:8613-8619.

Werner, M., Thuriaux, P., und Soutourina, J. (2009). Structure-function analysis of RNA polymerase I and III. *Current Opinion in Structural Biology* 19:740-745.

Westermann, B. (2002). Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Reports* 3:527-531.

Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11:872-884.

Westermann, B. (2014). Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837:1039-1046.

Wiedemann, N., Truscott, K.N. Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C., und Pfanner, N. (2004). Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279:18188-18194.

Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., et al., (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285:901-906.

Wysocki, R., Roganti, T., Van Dyck, E., de Kerchove, D'Exaerde, A., und Foury, F. (1999). Disruption and basic phenotypic analysis of 18 novel genes from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:165-171.

Yofe, I., Weill, U., Meurer, M., Chuartzman, S., Zalckvar, E., Goldman, O., Ben-Dor, S., Schütze, C., Wiedemann, N., Knop, M., Khmelinskii, A., und Shuldiner, M. (2016). One library to make them all: Streamlining yeast library creation by a SWAp-Tag (SWAT) strategy. *Nature Methods* 13:371-378.

Yu, M.O., Song, N.H., Park, K.J., Park, D.H., Kim, S.H., Chae, Y.S., Chung, Y.G., Chi, S.G., und Kang, S.H. (2015). Romo1 is associated with ROS production and cellular growth in human gliomas. *Journal of Onco-Neurology* 121:73-81.

Zakharov, I.A., und Yaravoy, B.P. (1977). Cytoduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast. *Molecular and Cellular Biochemistry* 14:15-18.

Zarsky, V., und Dolezal, P. (2016). Evolution of the Tim17 protein family. *Biology Direct* 11:54.

Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P.S., und Butow, R.A. (1995). An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *The EMBO Journal* 14:3268-3276.

Zeng, X., Neupert, W., und Tzagoloff, A. (2007). The metalloprotease encoded by *ATP23* has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase. *Molecular Biology of the Cell* 18:617-626.

Zeth, K. (2010). Structure and evolution of mitochondrial outer membrane proteins of beta-barrel topology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797:1292-1299.

Zhang, Z., An, X., Yang, K., Perlstein, D.L., Hicks, L., Kelleher, N., Stubbe, J., und Huang, M. (2006). Nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit requires a karyopherin and a WD40 repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1422-1427.

Zhang, C.T., und Wang, J. (2000). Recognition of protein coding genes in the yeast genome at better than 95% accuracy based on the Z curve. *Nucleic Acids Research* 28:2804-2814.

Zuo, X.M., Clark-Walker, G.D., und Chen, X.J. (2002). The mitochondrial nucleoid protein, Mgm101p, of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the maintenance of *rho*(⁺) and *ori/rep*-devoid *petite* genomes but is not required for hypersuppressive *rho*(⁻) mtDNA. *Genetics* 160:1389-1400.

Zweifel, S.G., und Fangman, W.L. (1991). A nuclear mutation reversing a biased transmission of yeast mitochondrial DNA. *Genetics* 128:241-249.

6. Anhang

Tabelle 13: Alle Stämme, die normalerweise in der MATa Deletionsbibliothek vorkommen, aber in dieser Arbeit nicht gewachsen sind (Giaever *et al.*, 2002).

ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name
YAR050W	FLO1	YDL034W	YDL034W	YDR519W	FPR2	YJR105W	ADO1
YBL025W	RRN10	YDL037C	BSC1	YDR525W	API2	YJR110W	YMR1
YBR046C	ZTA1	YDL041W	YDL041W	YDR537C	YDR537C	YJR115W	YJR115W
YBR054W	YRO2	YDL044C	MTF2	YEL027W	VMA3	YJR127C	RSF2
YBR082C	UBC4	YDL045W-A	MRP10	YER010C	YER010C	YKL098W	MTC2
YBR085W	AAC3	YDL046W	NPC2	YER155C	BEM2	YKL101W	HSL1
YBR090C-A	NHP6B	YDL048C	STP4	YFL055W	AGP3	YKL118W	YKL118W
YBR106W	SND3	YDL049C	KNH1	YFR001W	LOC1	YKL137W	CMC1
YBR112C	CYC8	YDL050C	YDL050C	YFR025C	HIS2	YKL148C	SDH1
YBR122C	MRPL36	YDL051W	LHP1	YFR030W	MET10	YKR027W	BCH2
YBR126C	TPS1	YDL052C	SLC1	YFR049W	YMR31	YKR034W	DAL80
YBR127C	VMA2	YDL053C	PBP4	YFR055W	IRC7	YKR094C	RPL40B
YBR129C	OPY1	YDL056W	MBP1	YGL109W	YGL109W	YKR095W	MPL1
YBR132C	AGP2	YDL057W	YDL057W	YGL223C	COG1	YLR144C	ACF2
YBR133C	HSL7	YDL059C	RAD59	YGL229C	SAP4	YLR171W	YLR171W
YBR134W	YBR134W	YDL061C	RPS29B	YGL231C	EMC4	YLR226W	BUR2
YBR137W	YBR137W	YDL062W	YDL062W	YGL235W	YGL235W	YLR307W	CDA1
YBR144C	YBR144C	YDL065C	PEX19	YGR006W	PRP18	YLR322W	VPS65
YBR146W	MRPS9	YDL066W	IDP1	YGR020C	VMA7	YLR382C	NAM2
YBR147W	RTC2	YDL068W	YDL068W	YGR021W	DPC29	YLR418C	CDC73
YBR157C	ICS2	YDL069C	CBS1	YGR033C	TIM21	YLR420W	URA4
YBR163W	EXO5	YDL073W	AHK1	YGR064W	YGR064W	YLR422W	DCK1
YBR164C	ARL1	YDL076C	RXT3	YGR069W	YGR069W	YLR447C	VMA6
YBR165W	UBS1	YDL077C	VAM6	YGR079W	YGR079W	YML010C-B	YML010C-B
YBR166C	TYR1	YDL078C	MDH3	YGR080W	TWF1	YML076C	WAR1
YBR170C	NPL4	YDL079C	MRK1	YGR110W	CLD1	YML086C	ALO1
YBR172C	SMY2	YDL080C	THI3	YGR180C	RNR4	YMR037C	MSN2
YBR294W	SUL1	YDL081C	RPP1A	YGR200C	ELP2	YMR073C	IRC21
YBR301W	PAU24	YDL082W	RPL13A	YHL042W	YHL042W	YMR075W	RCO1
YCL024W	KCC4	YDL083C	RPS16B	YHR003C	TCD1	YMR078C	CTF18
YCL029C	BIK1	YDL088C	ASM4	YHR008C	SOD2	YMR104C	YPK2
YCL058C	FYV5	YDL089W	NUR1	YHR026W	VMA16	YMR107W	SPG4
YCL076W	YCL076W	YDL113C	ATG20	YHR060W	VMA22	YMR115W	MGR3
YCR005C	CIT2	YDL116W	NUP84	YHR132W-A	IGO2	YMR135C	GID8
YCR009C	RVS161	YDL154W	MSH5	YHR168W	MTG2	YNL135C	FPR1
YCR014C	POL4	YDL159W	STE7	YHR171W	ATG7	YNR031C	SSK2
YCR062W	YCR062W	YDL237W	AIM6	YIL017C	VID28	YNR047W	FPK1
YCR067C	SED4	YDR019C	GCV1	YIL069C	RPS24B	YOL143C	RIB4
YCR073W-A	SOL2	YDR149C	YDR149C	YIL092W	YIL092W	YOL148C	SPT20
YCR077C	PAT1	YDR151C	CTH1	YIL125W	KGD1	YOR105W	YOR105W
YCR081W	SRB8	YDR158W	HOM2	YIL156W	UBP7	YOR153W	PDR5
YCR084C	TUP1	YDR191W	HST4	YIR031C	DAL7	YOR183W	FYV12
YCR087W	YCR087W	YDR195W	REF2	YIR043C	YIR043C	YOR221C	MCT1
YCR101C	YCR101C	YDR200C	VPS64	YJL013C	MAD3	YOR274W	MOD5
YDL001W	RMD1	YDR207C	UME6	YJL016W	TPH3	YOR275C	RIM20

ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name
YDL010W	GRX6	YDR392W	SPT3	YJL028W	YJL028W	YOR323C	PRO2
YDL011C	YDL011C	YDR443C	SSN2	YJL044C	GYP6	YPL032C	SVL3
YDL013W	SLX5	YDR459C	PFA5	YJL055W	YJL055W	YPL129W	TAF14
YDL019C	OSH2	YDR462W	MRPL28	YJL101C	GSH1	YPL137C	GIP3
YDL020C	RPN4	YDR479C	PEX29	YJL140W	RPB4	YPL254W	HFI1
YDL021W	GPM2	YDR494W	RSM28	YJR030C	RBH2	YPL268W	PLC1
YDL024C	DIA3	YDR495C	VPS3	YJR077C	MIR1	YPR031W	NTO1
YDL025C	RTK1	YDR500C	RPL37B	YJR095W	SFC1	YPR043W	RPL43A
YDL026W	YDL026W	YDR509W	YDR509W	YJR099W	YUH1	YPR078C	YPR078C
YDL027C	MRX9	YDR511W	SDH7	YJR102C	VPS25	YPR141C	KAR3
YDL033C	SLM3	YDR516C	EMI2	YJR104C	SOD1	YPR159C-A	YPR159C-A

Tabelle 14: Auflistung der Stämme aus dem Cyto duktionsscreen, welche nur im 1. oder im 2. Durchgang *pet* wurden. Angegeben sind der systematische Name (ORF) und der Standardname.

ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name
1. Durchgang							
YAL016W	TPD3	YFL018C	LPD1	YHR130C	YHR130C	YML022W	APT1
YAL047C	SPC72	YGL012W	ERG4	YIR009W	MSL1	YMR001C-A	YMR001C-A
YBL080C	PET112	YGL038C	OCH1	YIRO34C	LYS1	YMR058W	FET3
YBR036C	CSG2	YGL071W	AFT1	YJL088W	ARG3	YNR068C	YNR068C
YCR095W-A	YCR095W-A	YGL095C	VPS45	YJL094C	KHA1	YOL058W	ARG1
YDL072C	YET3	YGL168W	HUR1	YJL184W	GON7	YOL093W	TRM10
YDR005C	MAF1	YGR180C	RNR4	YJR040W	GEF1	YOL162W	YOL162W
YDR076W	RAD55	YGR262C	BUD32	YKL109W	HAP4	YOR199W	YOR199W
YDR079C-A	TFB5	YHL004W	MRP4	YKL148C	SDH1	YPL031C	PHO85
YDR126W	SWF1	YHL007C	STE20	YLR023C	IZH3	YPL045W	VPS16
YDR269C	YDR269C	YHR010W	RPL27A	YLR244C	MAP1	YPL248C	GAL4
YDR477W	SNF1	YHR013C	ARD1	YLR320W	MMS22	YPL270W	MDL2
YEL072W	RMD6	YHR018C	ARG4	YLR439W	MRPL4	YPR021C	AGC1
YER052C	HOM3	YHR067W	HTD2	YML008C	ERG6	YPR066W	UBA3
2. Durchgang							
YBL067C	UBP13	YGL107C	RMD9	YKL002W	DID4	YNL052W	COX5A
YBR081C	SPT7	YGL232W	TAN1	YKL037W	AIM26	YNL252C	MRPL17
YBR138C	YBR138C	YHL019C	APM2	YKL208W	CBT1	YOL141W	PPM2
YCRO46C	IMG1	YIL047C	SYG1	YKR085C	MRPL20		
YDR135C	YCF1	YJL157C	FAR1	YLR079W	SIC1		

Tabelle 15: Auflistung der Stämme aus dem ARG8^m Screen, welche nur im 1. oder im 2. Durchgang *pet* wurden. Angegeben sind der systematische Name (ORF) und der Standardname.

ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name
1. Durchgang							
YAR015W	ADE1	YDR482C	CWC21	YJR120W	YJR120W	YNL147W	LSM7
YBL091C-A	SCS22	YDR484W	VPS52	YKL010C	UFD4	YNL215W	IES2
YBR200W	BEM1	YDR501W	PLM2	YKL053C-A	MDM35	YNL225C	CNM67
YBR226C	YBR226C	YDR512C	EMI1	YKL109W	HAP4	YNL298W	CLA4
YBR230C	OM14	YDR514C	YDR514C	YKL116C	PRR1	YNL316C	PHA2
YBR242W	YBR242W	YEL062W	NPR2	YKL176C	LST4	YNR006W	VPS27
YBR290W	BSD2	YER024W	YAT2	YKL177W	YKL177W	YNR009W	NRM1
YCL028W	RNQ1	YER052C	HOM3	YKL178C	STE3	YNR022C	MRPL50
YCL044C	MGR1	YER055C	HIS1	YKR023W	YKR023W	YNR032C-A	HUB1
YCR026C	NPP1	YER057C	HMF1	YKR102W	FLO10	YNR055C	HOL1
YCR043C	YCR043C	YER086W	ILV1	YLL007C	LMO1	YNR069C	BSC5
YCR053W	THR4	YER091C-A	YER091C-A	YLR025W	SNF7	YOL070C	NBA1
YCR061W	YCR061W	YER117W	RPL23B	YLR042C	YLR042C	YOL099C	YOL099C
YCR089W	FIG2	YFL013C	IES1	YLR146C	SPE4	YOL108C	INO4
YDL032W	YDL032W	YGL021W	ALK1	YLR178C	TFS1	YOL163W	YOL163W
YDL109C	YDL109C	YGL070C	RPB9	YLR214W	FRE1	YOR136W	IDH2
YDL110C	TMA17	YGL078C	DBP3	YLR286C	CTS1	YOR171C	LCB4
YDL112W	TRM3	YGL084C	GUP1	YLR350W	ORM2	YOR186W	YOR186W
YDL127W	PCL2	YGL250W	RMR1	YLR425W	TUS1	YOR199W	YOR199W
YDL201W	TRM8	YGR003W	CUL3	YML012W	ERV25	YOR225W	YOR225W
YDR011W	SNQ2	YGR031W	IMO32	YML052W	SUR7	YOR304W	ISW2
YDR069C	DOA4	YGR112W	SHY1	YMR015C	ERG5	YOR339C	UBC11
YDR117C	TMA64	YGR208W	SER2	YMR062C	ARG7	YPL014W	CIP1
YDR119W	VBA4	YGR291C	YGR291C	YMR077C	VPS20	YPL060W	MFM1
YDR123C	INO2	YGR295C	COS6	YMR090W	YMR090W	YPL090C	RPS6A
YDR289C	RTT103	YHL007C	STE20	YMR098C	ATP25	YPL156C	PRM4
YDR290W	YDR290W	YHL011C	PRS3	YMR137C	PSO2	YPL222W	FMP40
YDR300C	PRO1	YHR026W	VMA16	YMR138W	CIN4	YPL270W	MDL2
YDR350C	ATP22	YHR039C	MSC7	YMR178W	YMR178W	YPL271W	ATP15
YDR385W	EFT2	YHR086W-A	YHR086W-A	YMR180C	CTL1	YPL274W	SAM3
YDR395W	SXM1	YHR204W	MNL1	YMR202W	ERG2	YPR037C	ERV2
YDR411C	DFM1	YIL116W	HIS5	YNL094W	APP1	YPR069C	SPE3
YDR431W	YDR431W	YJL163C	YJL163C	YNL134C	YNL134C		
YDR435C	PPM1	YJR058C	APS2	YNL146C-A	YNL146C-A		
2. Durchgang							
YAL012W	CYS3	YGL252C	RTG2	YNL052W	COX5A	YOR303W	CPA1
DR017C	KCS1	YHR030C	SLT2	YOL093W	TRM10		
YDR024W	FYV1	YJR073C	OPI3	YOR128C	ADE2		
YGL020C	GET1	YML012C-A	YML012C-A	YOR302W	YOR302W		

Tabelle 16: Auflistung der Stämme aus dem Hypersuppressiven Screen, welche im 1., 2. oder 3. Durchgang *pet* wurden, ohne die 19 Treffer im Überlapp (siehe Tab. 11). Angegeben sind der systematische Name (ORF) und der Standardname.

ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name
1. Durchgang							
YCL026C-A	FRM2	YJL059W	YHC3	YNL176C	TDA7	YOR279C	RFM1
YCR060W	TAH1	YJR044C	VPS55	YNR024W	MPP6	YOR283W	YOR283W
YDR374C	PHO92	YMR074C	SDD2	YOR167C	RPS28A	YOR284W	HUA2
YGL017W	ATE1	YNL125C	ESBP6	YOR238W	YOR238W	YPL004C	LSP1
YIL093C	RSM25	YNL173C	MDG1	YOR263C	YOR263C		
2. Durchgang							
YBL071C-B	YBL071C-B	YGL178W	MPT5	YLR151C	PCD1	YOR026W	BUB3
YBR048W	RPS11B	YGR041W	BUD9	YLR185W	RPL37A	YOR070C	GYP1
YBR119W	MUD1	YGR118W	RPS23A	YLR207W	HRD3	YOR118W	RTC5
YBR133C	HSL7	YGR159C	NSR1	YLR286C	CTS1	YOR126C	IAH1
YBR235W	VHC1	YGR173W	RBG2	YML095C	RAD10	YOR131C	YOR131C
YCR106W	RDS1	YGR279C	SCW4	YML121W	GTR1	YOR138C	RUP1
YDL190C	UFD2	YHR161C	YAP1801	YMR160W	YMR160W	YOR161C-C	YOR161C-C
YDL229W	SSB1	YIL041W	GVP36	YMR241W	YHM2	YOR175C	ALE1
YDL232W	OST4	YIL155C	GUT2	YNL008C	ASI3	YOR191W	ULS1
YDR306C	YDR306C	YKL064W	MNR2	YNL099C	OCA1	YOR208W	PTP2
YDR364C	CDC40	YKL070W	YKL070W	YNL193W	YNL193W	YOR239W	ABP140
YDR371W	CTS2	YKL179C	COY1	YNL252C	MRPL17	YOR258W	HNT3
YDR450W	RPS18A	YKL183W	LOT5	YNL270C	ALP1	YOR288C	MPD1
YER001W	MNN1	YKL198C	PTK1	YNR014W	YNR014W	YOR295W	UAF30
YER038W-A	YER038W-A	YKR055W	RHO4	YNR042W	YNR042W	YPL061W	ALD6
YER180C	ISC10	YLR148W	PEP3	YNR060W	FRE4	YPL066W	RGL1
YER184C	TOG1	YLR149C	YLR149C	YOL145C	CTR9	YPL198W	RPL7B
YGL019W	CKB1	YLR150W	STM1	YOR001W	RRP6	YPR167C	MET16
3. Durchgang							
YBL072C	RPS8A	YER169W	RPH1	YMR262W	YMR262W	YOR045W	TOM6
YBR156C	SLI15	YFLO01W	DEG1	YMR264W	CUE1	YOR072W	YOR072W
YBR184W	YBR184W	YFLO13C	IES1	YMR265C	YMR265C	YOR073W	SGO1
YBR185C	MBA1	YFLO33C	RIM15	YMR278W	PRM15	YOR088W	YOR088W
YBR249C	ARO4	YGL028C	SCW11	YMR297W	PRC1	YOR291W	YPK9
YBR266C	SLM6	YGL029W	CGR1	YNL047C	SLM2	YOR324C	FRT1
YBR280C	SAF1	YGL114W	YGL114W	YNL053W	MSG5	YOR348C	PUT4
YCL056C	PEX34	YGL131C	SNT2	YNL055C	POR1	YOR359W	VTS1
YDL040C	NAT1	YGL180W	ATG1	YNL070W	TOM7	YOR360C	PDE2
YDL133C-A	RPL41B	YGR011W	YGR011W	YNL153C	GIM3	YOR378W	AMF1
YDR050C	TPI1	YIL100W	YIL100W	YNL266W	YNL266W	YPL099C	INA17
YDR074W	TPS2	YIL111W	COX5B	YNL274C	GOR1	YPL109C	YPL109C
YDR272W	GLO2	YIL157C	COA1	YNL276C	YNL276C	YPL112C	PEX25
YDR295C	HDA2	YIR030C	DCG1	YNL283C	WSC2	YPL141C	FRK1
YDR368W	YPR1	YJL066C	MPM1	YNL286W	CUS2	YPL195W	APL5
YDR372C	VPS74	YJR047C	ANB1	YNL304W	YPT11	YPL201C	YIG1
YDR378C	LSM6	YLL054C	YLL054C	YNL324W	YNL324W	YPL214C	THI6
YDR502C	SAM2	YLR152C	YLR152C	YNL325C	FIG4	YPL229W	YPL229W
YEL025C	YEL025C	YML017W	PSP2	YOL006C	TOP1	YPL230W	USV1
YEL061C	CIN8	YML111W	BUL2	YOL007C	CSI2	YPL234C	VMA11
YER071C	TDA2	YMR010W	YMR010W	YOL009C	MDM12	YPL257W	YPL257W

ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name	ORF	Name
<i>YER137C</i>	<i>YER137C</i>	<i>YMR244W</i>	<i>YMR244 W</i>	<i>YOL030W</i>	<i>GAS5</i>	<i>YPL272C</i>	<i>PBI1</i>
<i>YER163C</i>	<i>GCG1</i>	<i>YMR258C</i>	<i>ROY1</i>	<i>YOL049W</i>	<i>GSH2</i>		
<i>YER167W</i>	<i>BCK2</i>	<i>YMR259C</i>	<i>TRM732</i>	<i>YOR019W</i>	<i>YOR019W</i>		

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Benedikt Westermann für das herausfordernde aber sehr interessante Thema bedanken. Vielen Dank für die jederzeit offene Tür für Fragen, Hilfestellungen und Probleme aller Art, die immer sehr schnell und unkompliziert gelöst worden sind!

Ein weiterer Dank geht an mein Mentorat Prof. Dr. Stephan Clemens und Prof. Dr. Klaus Ersfeld, für die anregenden Vorschläge und Diskussionen. Des Weiteren möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Forschungsgelder bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an alle Kollegen, HiWis und Studenten für die tolle Arbeitsatmosphäre, und im Besonderen allen, die mit mir zusammen im Labor gearbeitet haben: Xenia Chelius, Stefan Böckler, Nadine Hock und Till Klecker, sowie Martina Culková, Christine Leibiger und Jana Schramm. Es gab viel Spaß und lustige Momente und es war schön, dass jeder jedem geholfen hat. Danke auch für das Korrekturlesen der Dissertation! Danke an Ann-Katrin Unger für das Einarbeiten und Anlernen in die Elektronenmikroskopie und den schönen Stunden in der EM! Danke auch an meinen Studenten Johannes König für deine Begeisterung, Eifer und unsere Gespräche!

Ein herzliches Dankeschön auch an Annette Suske, Petra Helies und Rita Grotjahn für die große und zuverlässige Hilfe bei allen Problemen und Störungen, für den reibungslosen Laborablauf, für saubere Materialien, für alle Bestellungen und schönen und interessanten Gesprächen!

Danke auch an meine Studienkollegen Judith Bieberich, Sibylle Jungmann, Jonas Jungmann, Hanna Kaiser, Thomas Liebenstein und Brigitte Neumann. Für unseren lustigen Stammtisch, unseren großen Zusammenhalt und für das Korrekturlesen der Doktorarbeit. Ein weiterer Dank für das Korrekturlesen geht an Sr. Maria Nadiya, Christine Nothof, Karina Nothof, Juergen Schwab, Daniel Sfet und Pfr. Michael Seifert. Letzterem möchte ich auch für die große Unterstützung während der Promotion und der „Fernseelsorge via Whatsapp“ danken!

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlichst bei meiner Familie bedanken. Bei meinen Eltern für die bedingungslose Liebe, den Rückhalt und Unterstützung des Studiums und der Promotion! Bei meinen Brüdern Stefan Stenger, Josef Stenger, Andreas Stenger und Martin Stenger für die unvergessliche Kindheit, Hilfe bei Problemen aller Art, während des Studiums und der Promotion! Ohne euch und Gottes Hilfe hätte ich die Promotion nicht geschafft! Vergelt's Gott!

(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