

**Untersuchungen zur anterograden Bewegung und
Vererbung von Mitochondrien in *Saccharomyces
cerevisiae***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und

Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Johannes Ferdinand König geb. Förtsch

aus Forchheim in Oberfranken

Bayreuth, 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2008 bis März 2012 an der Universität Bayreuth am Institut für Zellbiologie unter der Betreuung von Prof. 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 eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 30.3.2012

Zulassung durch die Prüfungskommission: 3.5.2012

Wissenschaftliches Kolloquium: 13.7.2012

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz Schmid

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Benedikt Westermann (Erstgutachter)

PD Dr. Stefan Heidmann (Zweitgutachter)

PD Dr. Stefan Geimer (Vorsitz)

Prof. Dr. Matthias Weiss

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Johannes König

Bayreuth, den 30. 3. 2012

Danksagung

Ich danke...

...meinem Doktorvater **Prof. Dr. Benedikt Westermann** für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende fachliche und persönliche Betreuung und Unterstützung.

...den Mitgliedern meines Mentorats, **Prof. Dr. Benedikt Westermann, PD Dr. Stefan Geimer** und **PD Dr. Stefan Heidmann** für die wissenschaftlichen Hilfestellungen.

...der Deutschen Forschungsgemeinschaft, deren finanzielle Unterstützung diese Arbeit ermöglichte.

...ganz besonders für die hervorragende Zusammenarbeit:

- **Eric Hummel** für die Einbettung und das Schneiden der Stämme für die Immuno EM und die Zusammenarbeit bei der Immundekoration und Mikroskopie der einzelnen Proben von Abb. 24.
- **Evelin Urban**, die im Rahmen ihres Projektpraktikums die mitochondrialen Transportdefekte von Abb. 13C, Abb. 26 sowie Teile von Abb. 22B und Morphologiedefekte von Tab. 7, Tab. 9 sowie Teile von Tab. 22C quantifiziert und zu den Mikroskopieaufnahmen von Abb. 13B und Abb. 22A beigetragen hat.
- **Melanie Krist**, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit zahlreiche neue *myo2* Allele hergestellt, deren Wachstumsverhalten (Abb.9) untersucht und mitochondriale und vakuoläre Transportdefekte, sowie mitochondriale Morphologiedefekte von Abb. 10B und Tab. 6 quantifiziert hat.
- **Phillip Schmid**, der im Rahmen seiner Bachelorarbeit die Doppelmutanten *mnr1Δ/myo2Δ* sowie *ypt11Δ/myo2Δ* hergestellt hat.
- **Sabrina Schmid**, die im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die Doppelmutante *arc40^{ts}/myo2Δ* hergestellt hat.

...**Annette Suske, Rita Grotjahn** und **Petra Helies** für ihren Einsatz und ihre Hilfsbereitschaft bei den Herausforderungen des Laboralltags.

...dem gesamten Labor mit allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern für die tolle Arbeitsatmosphäre und die fachliche Unterstützung. Besonderer Dank gilt dabei **Till Klecker** und **Stefan Böckler** für die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen und den Spaß im Labor.

...meinen Eltern **Monika** und **Philipp Förtsch** für ihre Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen und das Ermöglichen meines Studiums.

...meiner Frau **Anna** für ihre Liebe, ihre Geduld und ihr Verständnis.

Abkürzungsverzeichnis

5-FOA	5-Fluororotische Säure
AS	Aminosäure
CBD	Cargo-Bindedomäne
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DOX	Doxycyclin
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERMES	<i>ER mitochondria encounter structure</i>
FH-Domäne	Formin-Homologiedomäne
G418	Geneticin-Disulfat
GST	Glutathion S-Transferase
mtDNA	mitochondriale DNA
mtGFP	GFP mit mitochondrialer Präsequenz
mtCherry	Cherry mit mitochondrialer Präsequenz
mtRFP	RFP mit mitochondrialer Präsequenz
NPF	<i>nucleation promoting factor</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte einer Zellsuspension bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTS	<i>peroxisomal targeting sequence</i>
RBD	Rho-Bindedomäne
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>sorting and assembly machinery</i>

SD	synthetisches Medium mit Glukose als Kohlenstoff-Quelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGA	<i>synthetic genetic array</i>
WT	Wildtyp
YPD	<i>yeast extract + peptone + dextrose</i>
YPG	<i>yeast extract + peptone + glycerol</i>

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	III
Danksagung	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
Summary	XII
1. Einleitung	1
1.1 Ursprung und Struktur von Mitochondrien	1
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	3
1.3 Dynamik von Mitochondrien in <i>S. cerevisiae</i>	4
1.4 Das Aktinzytoskelett von <i>S. cerevisiae</i>	6
1.4.1 Der Aktomyosinring	8
1.4.2 Aktinfilamente	8
1.4.3 Aktinpatches	9
1.4.4 Transport von Mitochondrien entlang des Aktinzytoskeletts	9
1.5 Myosine in <i>S. cerevisiae</i>	10
1.6 Modelle zur Vererbung von Mitochondrien in <i>S. cerevisiae</i>	12
1.6.1 Transport durch Arp2/3-Komplex-abhängige Aktinpolymerisation	13
1.6.2 Transport durch das Motorprotein Myo2	14
1.7 Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.2 Mikroskope und Zubehör	18

2.1.3 Dekonvolution	19
2.1.4 Bildbearbeitung	19
2.1.5 Bearbeitung von Strukturdaten mittels PyMOL	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Methoden der Molekularbiologie	20
2.2.2 Methoden der Zellbiologie	23
2.2.3 Mikroskopie	28
2.2.4 Methoden der Biochemie	31
3. Ergebnisse	36
3.1 Einfluss der Arp2/3-Komplex-abhängigen Aktinpolymerisation auf den Transport von Mitochondrien	36
3.2 Mutationen in der Cargo-Bindedomäne von Myo2 beeinflussen den Transport und die Morphologie von Mitochondrien	41
3.3 Verankerung von Myo2 in der mitochondrialen Außenmembran	48
3.4 Organellespezifität der <i>myo2(LQ)</i> und <i>myo2-fis1</i> Allele	54
3.4.1 Vesikel	54
3.4.2 Peroxisomen	55
3.4.3 Golgi Apparat	56
3.4.4 Vakuolen	57
3.4.5 Endoplasmatisches Retikulum	58
3.5 In <i>myo2</i> Mutanten ist die Passage von Mitochondrien durch den Knospenhals erschwert	60
3.6 Keine Rettung der mitochondrialen Transport- und Morphologiedefekte in ERMES-Komplex Mutanten durch <i>myo2-fis1</i>	63
3.7 Lokalisation von Myo2 auf der mitochondrialen Oberfläche	66
3.8 Untersuchungen zur Rolle von <i>MMR1</i> und <i>YPT11</i> bei der Vererbung von Mitochondrien	69
3.8.1 <i>ypt11Δ</i> interagiert genetisch mit den Allelen <i>myo2(Q1233R)</i> , <i>myo2(L1301P)</i> und <i>myo2(LQ)</i>	69

3.8.2 <i>mmr1Δ</i> zeigt keine negative genetische Interaktion mit dem <i>myo2(LQ)</i> Allel.....	74
3.8.3 Rettung der negativen synthetischen Interaktion von <i>mmr1Δ</i> und <i>ypt11Δ</i> durch das <i>myo2-fis1(2μ)</i> Konstrukt	75
3.8.4 Verankerung von Mitochondrien am Zellcortex	77
3.9 Suche nach dem mitochondrialen Myo2 Rezeptor.....	80
3.9.1 <i>In vitro</i> Bindeassay von isolierten Mitochondrien und heterolog aufgereinigter Cargo-Bindedomäne von Myo2	81
3.9.2 GST- <i>pulldown</i> mit GST-Myo2(CBD) und isolierten Mitochondrien.....	82
4. Diskussion.....	85
4.1 Arp2/3-Komplex-abhängiger, anterograder Transport von Mitochondrien.....	85
4.2 Rolle des ERMES-Komplexes bei der mitochondrialen Vererbung	86
4.3 Myo2-abhängiger Transport von Mitochondrien.....	87
4.3.1 Geschwindigkeit der mitochondrialen Bewegungen	88
4.3.2 Die Rolle von <i>YPT11</i> bei der Vererbung von Mitochondrien.....	89
4.4 Verankerung von Mitochondrien am Zellcortex	90
4.5 Neues Modell zum Myo2-abhängigen Transport in <i>S. cerevisiae</i>	92
4.6 Suche nach dem mitochondrialen Myo2-Rezeptor.....	94
Literaturverzeichnis.....	95
Anhang	107

Zusammenfassung

Mitochondrien können nicht *de novo* synthetisiert werden und müssen daher aktiv in die Tochterzelle vererbt werden. In *Saccharomyces cerevisiae* bewegen sich die Mitochondrien entlang des Aktinzytoskeletts. Dabei werden zwei mögliche Mechanismen für den anterograden Transport diskutiert. In einem Modell wird die anterograde Bewegung von Mitochondrien durch das Myo2 Motorprotein vermittelt. Im Gegensatz dazu wird in einem zweiten Modell vorgeschlagen, dass Aktinpolymerisation durch den Arp2/3-Komplex an der mitochondrialen Oberfläche die Mitochondrien in die Knospe transportiert.

Durch Analyse einer temperatursensitiven Mutante von *ARC40*, das für einen essentiellen Bestandteil des Arp2/3-Komplex kodiert, konnte die Rolle der Arp2/3-abhängigen Aktinpolymerisation bei der Bewegung von Mitochondrien überprüft werden. Die Ergebnisse der Versuche bei nichtpermissiver Temperatur deuten jedoch nicht auf eine direkte Rolle von Arc40 beim mitochondrialen Transport hin. Desweiteren wurde die Beteiligung von Myo2 bei der mitochondrialen Vererbung genauer untersucht. Der Austausch bestimmter Aminosäuren in der Cargo-Bindedomäne von Myo2 führt zu einer Veränderung der Morphologie und des Transportes von Mitochondrien. In dieser Arbeit konnte der Bereich der Myo2 Cargo-Bindedomäne näher charakterisiert werden, der für die Vererbung von Mitochondrien von Bedeutung ist. So führen Aminosäureaustausche in dieser Region von Myo2 zu einem Transport- und Morphologiedefekt von Mitochondrien, der durch artifizielle Verankerung des Myo2 Motorproteins in der mitochondrialen Außenmembran gerettet werden konnte. Auch die negativ synthetischen Effekte von Mutationen in der Cargo-Bindedomäne von Myo2 mit der Deletion des Gens für die am Transport der Mitochondrien beteiligte Rab-GTPase Ypt11 konnten durch Expression dieser Mitochondrien-spezifischen Variante von Myo2 aufgehoben werden. Mittels Immuno-Elektronenmikroskopie gelang es, Myo2 auf der Oberfläche von isolierten Mitochondrien nachzuweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Myo2 entscheidend und direkt an der Vererbung von Mitochondrien in *S. cerevisiae* beteiligt ist.

Um einen Rücktransport in die Mutterzelle zu verhindern, müssen Mitochondrien nach ihrem Transport in die Knospe dort verankert werden. Die genetischen Daten dieser Arbeit sprechen dabei für eine Rolle von Mmr1, einem mitochondrialen Außenmembranprotein, das die Vererbung von Mitochondrien beeinflusst. Mit Hilfe von *pull-down*-Experimenten wurde in dieser Arbeit versucht, weitere Kandidaten für ein mitochondriales Myo2 Adapterprotein zu finden.

Ausgehend von den genetischen Daten zum Transport von Mitochondrien wurde ein Modell entwickelt, bei dem die mitochondriale Morphologie, Ypt11 sowie eine Retention von Mitochondrien in der Knospe zum anterograden Transport durch Myo2 beitragen.

Summary

Mitochondria can not be synthesized *de novo* and therefore have to be inherited by active transport into daughter cells. In *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria move along the actin cytoskeleton. Two possible mechanisms for the movement during anterograde transport are discussed. In the first model the anterograde movement of mitochondria is mediated by the Myosin V motor protein Myo2. Another hypothesis suggests that Arp2/3 complex mediated actin polymerization on the mitochondrial surface transports mitochondria into the bud.

The role of the Arp2/3 complex dependent actin polymerisation in mitochondrial movement could be analyzed via a temperature sensitive mutant of *ARC40*, which is an essential part of the Arp2/3 complex. The results at nonpermissive temperature do not support a direct role of Arc40 in mitochondrial transport. Therefore, the involvement of Myo2 in mitochondrial inheritance was examined in more detail. An exchange of certain amino acid residues in the cargo binding domain of Myo2 leads to a change of the morphology and the transport of mitochondria. In the following, the region of the Myo2 cargo binding domain important for mitochondrial inheritance could be characterized more precisely. Mutations in this region of Myo2 cause a defect of mitochondrial transport and morphology, which could be rescued by artificially anchoring the Myo2 motor protein to the mitochondrial outer membrane. Mutant alleles in the Myo2 cargo binding domain show a negative synthetic interaction with deletion of the gene coding for the Rab-GTPase Ypt11, which is involved in mitochondrial transport. This negative interaction could also be compensated by expression of the mitochondria-specific variant of Myo2. Furthermore, Myo2 could be detected on the surface of isolated mitochondria via immunoelectron microscopy. These results indicate that Myo2 is a direct mediator of mitochondrial inheritance in *S. cerevisiae*.

In order to prevent the transport of mitochondria back into the mother cell, there has to be a retention mechanism for mitochondria in the bud. The genetic data of this work suggest a role of Mmr1, a mitochondrial outer membrane protein, which influences mitochondrial inheritance. In order to reveal new candidates for the mitochondrial Myo2 receptor protein, pulldown experiments were performed.

Based on the genetic data concerning the transport of mitochondria a new model was developed in which mitochondrial morphology, Ypt11 as well as a retention of mitochondria contribute to the anterograde Myo2 dependent transport of these organelles.

1. Einleitung

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurden Mitochondrien erstmals beschrieben, als Albert von Kölliker 1857 körnerartige Strukturen in Muskelzellen beobachten konnte. Der Zytologe Richard Altmann entwickelte 1886 eine Färbetechnik, mit der er die Zellorganellen sichtbar machen konnte und nannte sie „Bioplasten“. Von Carl Benda wurde schließlich 1898 der bis heute gültige Begriff des Mitochondriums geprägt, wobei er die mikroskopischen Beobachtungen durch die griechischen Begriffe für in Fäden („*mitos*“) aneinandergereihte Körner („*chondros*“) versinnbildlichte. Doch erst etwa 50 Jahre später konnte das Mitochondrium als Ort des oxidativen Energiemetabolismus identifiziert werden (Kennedy und Lehninger, 1949). Bis heute wurden neben der Produktion von ATP in der Atmungskette mit beispielsweise dem Harnstoffzyklus, Citratzyklus und der β -Oxidation von Fettsäuren weitere Stoffwechselwege beschrieben, die auf Mitochondrien angewiesen sind. In den letzten Jahren rückten Mitochondrien wieder verstärkt in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, als ein Zusammenhang zwischen mitochondrialen Fehlfunktionen und neurodegenerativen Krankheiten erkannt wurde, wie zum Beispiel Parkinson, Alzheimer und Chorea Huntington (Schon und Przedborski, 2011), oder Diabetes (Leem und Koh, 2012) und grünem Star (Lascaratos et al., 2011). Mitochondrien sind zudem essentiell für die Assemblierung von Fe/S-Gruppen, die Synthese einiger Aminosäuren sowie die Lipidbiosynthese (Scheffler, 2001; Lill und Muhlenhoff, 2005). Darüber hinaus wurde die physiologische Rolle von Mitochondrien unter anderem für die Ca^{2+} Speicherung sowie apoptotische Prozesse und die Zellalterung beschrieben (Westermann, 2002, 2008).

1.1 Ursprung und Struktur von Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die von zwei Membranen umschlossen sind. Der Grund dafür liegt im Ursprung des Organells, den nach der Endosymbiontentheorie ein α -Proteobakterium darstellt. Dafür spricht unter anderem die Lipidzusammensetzung der Innenmembran, die typisch für Eubakterien ist und somit aus der Cytoplasmamembran des ehemaligen Symbionten entstanden sein dürfte. Das Bakterium wurde durch einen Mechanismus ähnlich der Phagozytose vom Wirt aufgenommen. Der Ursprung der äußeren mitochondrialen Membran ist aufgrund von prokaryotischen und eukaryotischen Eigenschaften nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass es sich um die frühere Außenmembran des α -Proteobakteriums handelt und nicht etwa um eine phagosomale Membran des Wirtes (Cavalier-Smith, 1987; Gray et al., 1999). Insgesamt

lässt sich das Mitochondrium in fünf Subkompartimente unterteilen. So wird der Intermembranraum von der mitochondrialen Außen- und Innenmembran begrenzt, die an sogenannten Kontaktstellen aufeinandertreffen. Dies erleichtert den effizienten Transport über beide Membranen hinweg (Reichert und Neupert, 2002). Die Innenmembran wiederum umschließt die proteinreiche Matrix und bildet zahlreiche in das Lumen der Mitochondrien reichende Einstülpungen, die Cristae. Bei diesen Strukturen handelt es sich um kleine Subkompartimente mit morphologischen Unterschieden je nach Zelltyp (Munn, 1974). Kleine Öffnungen mit 10-15 nm Durchmesser, die sogenannten *cristae junctions*, verbinden das Lumen der Cristae mit dem Teil des Intermembranraums, der von der Innen- und Außenmembran umschlossen ist (Perkins et al., 1997; Frey und Mannella, 2000; Frey et al., 2002). Die innere Grenzmembran stellt den zur Außenmembran gerichteten Teil der Innenmembran dar und unterscheidet sich von der Cristae-Membran durch die Protein- und vermutlich auch die Lipidzusammensetzung (Vogel et al., 2006; Wurm und Jakobs, 2006).

Für den Ursprung aus eigenständigen Lebewesen spricht bei Mitochondrien auch das Vorhandensein eines eigenen Genoms. Das sogenannte Chondriom liegt dabei in *S. cerevisiae* in Form von etwa 10-15 Nukleoiden pro Zelle vor, wobei diese neben ein bis zwei Kopien der mitochondrialen DNA (mtDNA) auch mehrere Proteine enthalten (Nass und Nass, 1963; Williamson und Fennell, 1979; Gray und Doolittle, 1982; Lipinski et al., 2010). Dennoch können die Organellen nicht außerhalb der Zelle existieren, sind gewissermaßen semi-autonom, da sich weniger als 1% der Gene, die für mitochondrial lokalisierte Proteine kodieren, noch auf der mtDNA befinden (Gabaldon und Huynen, 2007; Sickmann et al., 2003). Die Sequenzen der übrigen Gene, die im Laufe der Evolution in den Zellkern abgewandert sind, weisen jedoch noch große Homologie zu ihren prokaryotischen Verwandten auf. Neben Genen für tRNAs und rRNAs gibt es nur wenige Gene, die sich noch auf der mtDNA befinden (13 beim Menschen und acht bei der Bäckerhefe). Exprimiert werden diese Gene über eine eigenständige Transkriptions- und Translationsmaschinerie, die dem Proteinsyntheseapparat von Prokaryoten ähnelt (Gray und Doolittle, 1982; Gray et al., 1999). Der Rest der mittlerweile über 1100 bekannten mitochondrialen Polypeptide (*Saccharomyces Genome Database* <http://www.yeastgenome.org>) wird somit im Zytosol synthetisiert und muss posttranslational in die Mitochondrien transportiert werden. Die dafür notwendige, konservierte Importmaschinerie, die an den Kontaktstellen der Innen- und Außenmembran lokalisiert ist, konnte weitestgehend in *S. cerevisiae* aufgeklärt werden (Attardi und Schatz, 1988; Pfanner et al., 2004; Reichert und Neupert, 2004).

1.2 *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* handelt es sich um einen einzelligen, eukaryotischen Pilz aus der Abteilung der Ascomyceten, der sich durch mehrere Eigenschaften zur Erforschung zellulärer Prozesse eignet. Zum einen wurde das 12 Mbp umfassende Genom bereits 1996 als erstes eukaryotisches Genom sequenziert und umfasst 16 lineare Chromosomen mit über 6000 offenen Leserahmen (ORF) (Goffeau et al., 1996). Aufgrund einer Sequenzhomologie von 46% zum humanen Genom im Bezug auf die offenen Leserahmen lassen sich Ergebnisse zur Wirkungsweise und zum Zusammenspiel bestimmter Genprodukte zum Teil auch auf höhere Eukaryonten übertragen (Lander et al., 2001; Foury und Kucej, 2002). Außerdem können etwa 1000 Hefegene (circa 17% des Genoms) orthologen Genfamilien zugerechnet werden, die in Verbindung zu humanen Krankheiten stehen (Heinicke et al., 2007). Zudem kann die Bäckerhefe leicht kultiviert werden, verfügt über eine kurze Generationszeit von unter zwei Stunden unter optimalen Bedingungen und kann über Jahre hinweg bei -80 °C gelagert werden (Sherman, 2002). Im Gegensatz zu vielen höheren Eukaryonten gibt es zahlreiche einfache Möglichkeiten, genetische Veränderungen in der Hefe durchzuführen. So können Plasmide mittels Hitzeschocktransformation eingebracht werden (Gietz und Schiestl, 2007). Zur Analyse rezessiver Mutationen können Veränderungen auf chromosomaler Ebene wie zum Beispiel Gendeletionen, Substitutionen oder Fusionen mit Reporter genen einfach durch homologe Rekombination in einen haploiden Hefestamm eingeführt werden (Sherman, 2002). *S. cerevisiae* verfügt über einen haploiden und diploiden vegetativen Zyklus, wobei sich die Zellen mittels Knospung vermehren. Haploide Hefestämme kommen mit $MATa$ und $MAT\alpha$ in zwei unterschiedlichen Paarungstypen vor und fusionieren in Cokultur im sexuellen Zyklus zu einer diploiden Zygote (Herskovitz et al., 1988). Verschlechtern sich die Wachstumsbedingungen für diploide Hefezellen, so können über Meiose haploide Sporen gebildet werden, die sich als Tetrade in einem Ascus befinden und zu haploiden Tochterzellen keimen können (Herskovitz et al., 1988; Kassir et al., 2003). Ein weiterer Vorteil des Modellorganismus Hefe ist, dass Kollektionen von Deletionsstämmen zur Verfügung stehen, in denen fast jeder ORF des Genoms deletiert ist (Winzeler et al., 1999; Giaever et al., 2002; Kastenmayer et al., 2006). Zudem gibt es Bibliotheken essentieller Gene mit konditionalen Allelen, wodurch die Analyse dieser nicht deletierbaren Gene stark vereinfacht wird (Mnaimneh et al., 2004; Ben-Aroya et al., 2008), und die Ergebnisse einer genomweiten Analyse der Proteinlokalisierung und -expression durch Fusion des entsprechenden Gens mit GFP können auf <http://yeastgfp.yeastgenome.org> eingesehen werden (Ghaemmaghami et al., 2003; Huh et al., 2003). Als große Entwicklung der letzten Jahre in der Untersuchung von

genetischen Wechselwirkungen ist die Methode des *synthetic genetic array* (SGA) hervorzuheben (Tong et al., 2001; Tong und Boone, 2006). Die Grundlage dieser Methode ist die Analyse des Wachstums einer Doppelmutante im Vergleich zum theoretisch errechneten Produkt des Wachstums der jeweiligen Einzelmutanten. Falls das Wachstum der Doppelmutante schlechter ist als erwartet, so handelt es sich um eine negative und falls es besser ist um eine positive genetische Interaktion. Ausgehend davon wurde eine genomweite Analyse durchgeführt (Costanzo et al., 2010) und vor kurzem konnte eine genetische Interaktionskarte mit Fokus auf mitochondriale Gen-Produkte erstellt werden (Hoppins et al., 2011).

Der vielleicht größte Vorzug von *S. cerevisiae* bei der Erforschung von Mitochondrien ist wohl, dass Hefe als fakultativ anaerober Organismus die benötigte Energie durch Glykolyse und Fermentation herstellen kann und somit nicht zwangsläufig auf oxidative Phosphorylierung sowie den Erhalt der mtDNA angewiesen ist (Tzagoloff und Dieckmann, 1990). Erst wenn keine fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie etwa Glukose oder Fruktose mehr zur Verfügung stehen, so wird die Katabolitrepression von Genen für die Atmung aufgehoben (Gancedo, 1998). Aus oben genannten Gründen wurde Hefe zum Modellorganismus für die Erforschung der mitochondrialen Dynamik ausgewählt (Westermann, 2008).

1.3 Dynamik von Mitochondrien in *S. cerevisiae*

In der Vergangenheit wurden Mitochondrien durch ihr Erscheinungsbild bei Aufnahmen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie häufig als bohnenförmige Strukturen dargestellt. Mittlerweile weiß man jedoch, dass es sich vielmehr um hochdynamische Organellen handelt, die sich in Form und Größe bedingt durch den Transport entlang des Cytoskeletts, Fusion und Teilung unterscheiden (Bereiter-Hahn, 1990; Nunnari et al., 1997). Dies ermöglicht die Anpassung der Mitochondrien in verschiedenen Wachstumsphasen und auch an unterschiedliche physiologische Bedingungen, sodass stets eine optimale Funktionalität der Mitochondrien gewährleistet werden kann (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994). In wildtypischen Zellen bilden Mitochondrien abhängig vom physiologischen Zustand und den Wachstumsbedingungen ein Netzwerk direkt unterhalb des Zellkortex, wobei die Tubuli eine Dicke von etwa 300-400 nm aufweisen (Stevens und White, 1979). Treten die Zellen in die stationäre Phase ein, so ändert sich die Morphologie der Mitochondrien und das zusammenhängende Netzwerk fragmentiert zu stark verkürzten Tubuli. Werden die Zellen jedoch durch Zugabe von frischem Medium wieder in die logarithmische Wachstumsphase gebracht, so kehrt sich diese Entwicklung um, und die Tubuli fusionieren wieder zu einem zusammenhängenden Netzwerk (Stevens, 1981).

Neben der Wachstumsphase hat auch die Kohlenstoffquelle Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien. Sind die Zellen ohne bereitgestellte fermentierbare Kohlenstoffquelle auf die Atmung angewiesen, so bildet sich ein stärker verzweigtes Netzwerk mit mehr mitochondrialer Masse aus (Egner et al., 2002). Für eine Aufrechterhaltung des tubulären Netzwerkes trotz der hohen Dynamik ist es notwendig, dass Fusion und Teilung sich die Waage halten. Etwa 2,5 Teilungs- und Fusionsereignisse pro Minute lassen sich in der Zelle beobachten, und wird das Gleichgewicht zu einer Seite hin verschoben, so hat dies gravierende Auswirkungen auf die Morphologie der Mitochondrien (Nunnari et al., 1997; Jakobs et al., 2003; Abb. 1). Die antagonistischen Prozesse von Fusion und Teilung sind dabei auf eine Reihe von Proteinen angewiesen, die hochkonserviert sind (zusammengefasst: Westermann, 2008, 2010).

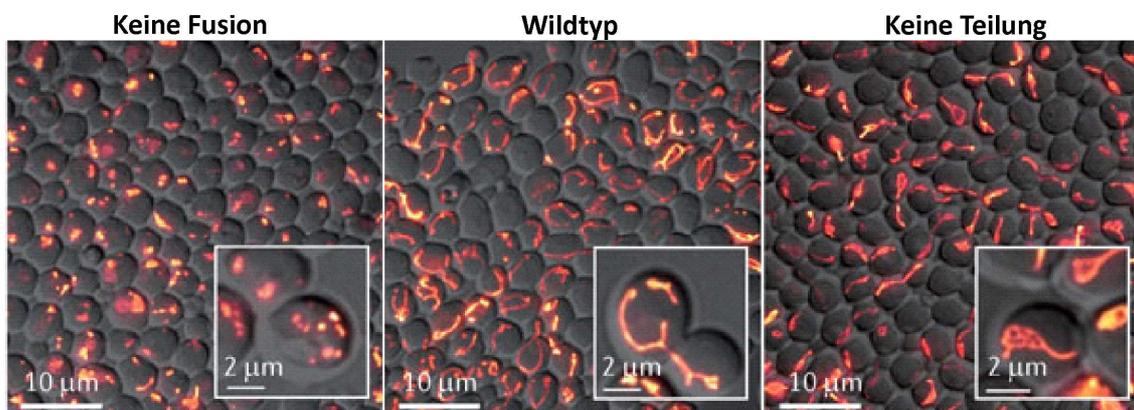


Abbildung 1) Fusion und Teilung regulieren die mitochondriale Morphologie (verändert nach: Westermann, 2010). In *S. cerevisiae* sind Mitochondrien verzweigte, tubuläre Organellen (Mitte). Wird jedoch das Gen für die Fusionskomponente Fzo1 deletiert, so enthalten die Zellen zahlreiche, kleine mitochondriale Fragmente. Diese entstehen durch Teilungsereignisse bei gleichzeitigem Fehlen von mitochondrialer Fusion (links). Im Gegensatz dazu führt eine Blockierung der mitochondrialen Teilung durch Deletion des Gens für Dnm1 zu stark verzweigten, netzartigen Mitochondrien (rechts).

Die Fusion von Mitochondrien ist ausschlaggebend für den Erhalt der mtDNA und die Komplementation mitochondrialer Genome in heteroplasmischen Zellen. Bewerkstelligt wird dies durch ein Zusammenspiel von Dynamin-verwandten Proteinen (zusammengefasst: Merz et al., 2007). Die beiden Proteine der Außenmembran Fzo1 und Ugo1, sowie das integrale Protein der Innenmembran Mgm1 stellen die Hauptkomponenten der Fusionsmaschinerie dar (zusammengefasst: Westermann, 2002, 2010). Durch Deletion von *FZO1* kann die Fusion unterbunden werden, was zur Fragmentierung von Mitochondrien führt und mit dem Verlust der mtDNA und damit der respiratorischen Kompetenz einhergeht (Hermann et al., 1998; Rapaport et al.,

1998; Abb.1). In Säugetieren stellen Mfn1, Mfn2 und OPA1 die Homologe von Fzo1 und Mgm1 dar, wohingegen bisher kein Homolog zu Ugo1 gefunden wurde (Westermann, 2008).

Die Teilung von Mitochondrien hingegen ist wichtig für die Vererbung von Mitochondrien und zudem können auf diese Weise beschädigte Organellen abgebaut werden. Dabei fungiert Fis1 als Außenmembrananker und interagiert über Mdv1 mit Dnm1, dessen Homolog in Säugetieren DRP1 heißt (Lackner und Nunnari, 2009). Für die Teilung der Mitochondrien ist die Ausbildung eines kontraktiven Ringes bestehend aus homo-oligomerem Dnm1 um den mitochondrialen Tubulus notwendig (Ingerman et al., 2005). Wird nun die Teilung durch Deletion von *DNM1* unterbunden, so führt dies zu einer stark verzweigten, fischernetzartigen Mitochondrienmorphologie. Durch simultane Deletion von *FZO1* und *DNM1* hingegen werden beide Prozesse blockiert und es bildet sich ein mitochondriales Netzwerk ähnlich dem des Wildtyps aus (Bleazard et al., 1999; Sesaki und Jensen, 1999).

Daneben beeinflusst auch der gerichtete Transport von Mitochondrien entlang des Aktinzytoskeletts maßgeblich die Morphologie von Mitochondrien (Pruyne et al., 2004). Erforderlich macht dies die Tatsache, dass Mitochondrien nicht *de novo* entstehen können und somit in die Tochterzelle transportiert werden müssen (Warren und Wickner, 1996). Der Vorgang der Vererbung von Mitochondrien in *S. cerevisiae* ist jedoch noch unzureichend aufgeklärt und daher Gegenstand dieser Arbeit.

1.4 Das Aktinzytoskelett von *S. cerevisiae*

Das Zytoskelett von Eukaryoten besteht mit Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und dem Aktinzytoskelett aus drei Strukturen. Gemeinsam bilden sie das Gerüst der Zelle und sind für deren strukturelle Formgebung verantwortlich. Zudem stellt das Zytoskelett die Bahnen für zelluläre Transportprozesse bereit. Entscheidend für die Vererbung von etlichen Zellorganellen und den Transport von zahlreichen mRNAs ist in *S. cerevisiae* das Aktinzytoskelett. Mikrotubuli hingegen spielen nur eine Rolle im Zellzyklus (Pruyne et al., 2004) und Intermediärfilamente sorgen für mechanische Stabilität innerhalb der Zelle (Herrmann und Aebi, 1998).

Das 42 kDa große, globuläre Aktin wird in *Saccharomyces cerevisiae* von *ACT1* kodiert. In der Zelle steht die monomere Form des G-Aktin im Gleichgewicht mit doppel-helikalem, filamentösem F-Aktin, welches eine interne Polarität aufweist. Dabei werden nach dem Mechanismus einer Treitmühle am sogenannten *barbed-end* Aktinmonomere angefügt, wohingegen das Filament am sogenannten

pointed-end depolymerisiert wird. Bevor sich filamentöses Aktin ausbilden kann, muss sich zunächst ein stabiler Polymerisationskeim aus vier Aktineinheiten ausbilden. Der limitierende Schritt bei dieser *de novo* Aktinpolymerisation ist die Ausbildung von kurzlebigen Aktin Di- und Trimeren. Beschleunigt wird dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt *in vivo* durch Aktinnukleatoren wie den Forminen oder dem Arp2/3-Komplex. Steigt der Bedarf der Zelle an monomerem Aktin etwa im Verlauf der Zytokinese oder bei aktinabhängigen Prozessen wie der Endozytose, so kann Cofilin den Abbau von Aktinfilamenten unterstützen, sowie die Depolymerisation am *pointed-end* beschleunigen. Dies führt zu einem hoch dynamischen Aktinnetzwerk, was bei Behandlung von Hefezellen mit Latrunkulin-A beobachtet werden kann. Dabei stoppt Latrunkulin-A das Wachstum von neuen Aktinfilamenten, führt jedoch nicht zum Abbau von bestehendem polymerem Aktin, und schon nach einer Minute kann kein F-Aktin mehr angefärbt werden (Welch et al., 1994; Pruyne et al., 2004; Moseley und Goode, 2006; Chesarone et al., 2010).

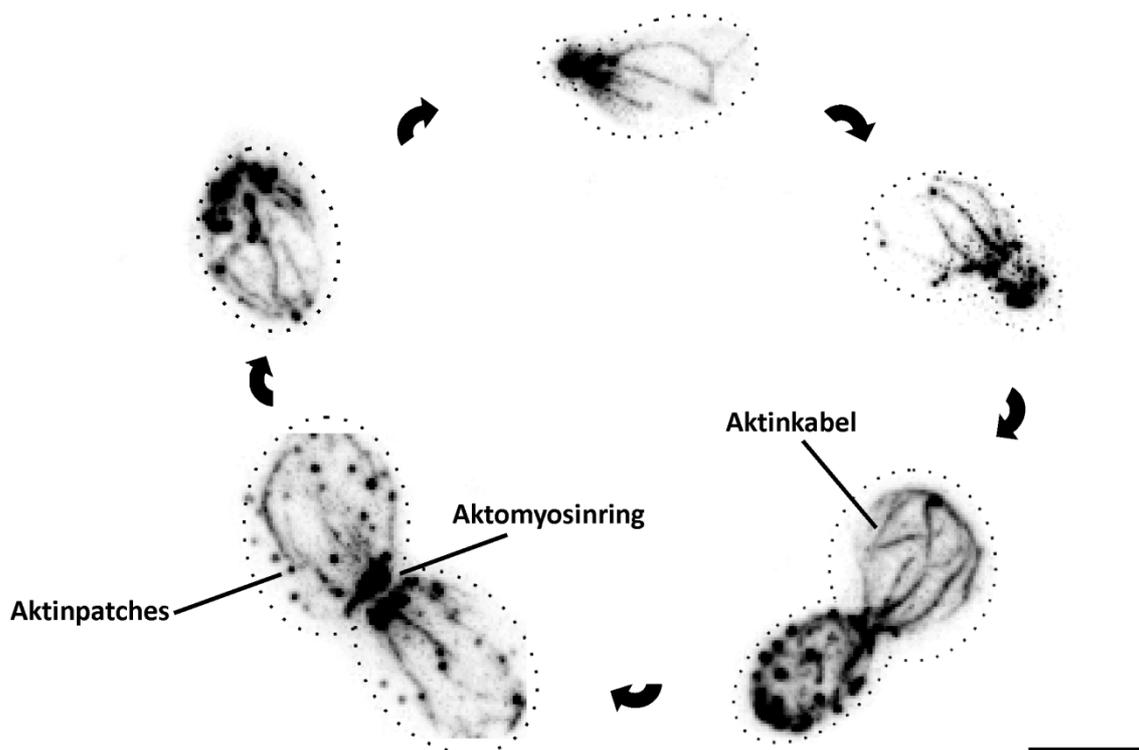


Abbildung 2) Das Aktinzytoskelett von *S. cerevisiae* im Verlauf des Zellzyklus. Wildtypische Zellen des Stammes BY4742 wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium angezogen. Anschließend wurden die Zellen der nichtsynchronisierten Kultur fixiert und es wurde das Aktinzytoskelett mittels Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Die Fluoreszenzbilder sind Projektionen der maximalen Intensität von z-Stapeln bestehend aus 20 Ebenen. Zudem wurden die Bilder mittels Dekonvolution bearbeitet. Der Zellumriss ist durch eine gepunktete Linie angedeutet. Größenstandard: 5 µm.

Das Aktinzytoskelett kann in den verschiedenen Wachstumsphasen von *S. cerevisiae* in drei Strukturen unterteilt werden. Neben Kabeln lassen sich auch sogenannte Patches und ein Aktomyosinring beobachten (Abb.2).

1.4.1 Der Aktomyosinring

Über einen kurzen Zeitraum vor und während der Zytokinese bildet sich ein Ring aus F-Aktin (Abb. 2) und Myosin 1, dem einzigen Klasse II Myosin in *S. cerevisiae*, aus. Noch bevor die Knospe sichtbar wird, entsteht an der späteren Knospungsstelle ein Ring aus Myosin 1, der nicht auf die Anwesenheit von F-Aktin angewiesen ist. Dort verbleibt der Myosin 1 Ring, der für seine Ausbildung auf eine Interaktion mit Septinen angewiesen ist, bis zum Ende der Anaphase und führt dann mit Hilfe von F-Aktin zur Kontraktion der Halsregion zwischen Mutter- und Tochterzelle (Bi et al., 1998; Lippincott und Li, 1998).

1.4.2 Aktinfilamente

Neben strukturellen Aufgaben sind Filamente aus F-Aktin, die zu Aktinkabeln zusammengebündelt werden (Abb.2), auch als Schienen für den Transport von Organellen, Vesikeln und zahlreichen anderen Cargos durch Motorproteine in der Zelle von entscheidender Bedeutung. Sie richten sich entlang der Mutter-Tochter-Achse aus und die Nukleation dieser unverzweigten Aktinkabel wird durch Beteiligung von Forminen unterstützt. In *S. cerevisiae* gibt es zwei Formine, die von *BNI1* und *BNR1* kodiert werden. Eine Deletion eines der beiden Gene hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum, eine Doppeldeletion ist jedoch letal und spricht für überlappende Aufgaben beider Gene. Auch im Aufbau weisen die beiden Formine, die von Hefe bis zu Säugetieren konserviert sind, große Parallelen auf. So verfügen sie über eine regulatorische Rho-Bindedomäne (RBD) sowie über drei Formin-Homologiedomänen (FH1-3). Die FH1-Domäne interagiert dabei mit Profilin, welches G-Aktin mit hoher Affinität bindet und die Polymerisation von F-Aktin beschleunigt. Die FH2-Domäne führt zur Nukleation eines Aktinfilaments durch Stabilisierung der kurzlebigen Aktindi- und -trimere. Mit Hilfe der FH3-Domäne wird die Lokalisation innerhalb der Zelle festgelegt, wobei sich Bni1 in der S/G₂ Phase an der Knospenspitze befindet und die Polymerisation von kurzen Kabeln in der Knospe initiiert. Während der Zytokinese relokalisiert Bni1 an den Knospenhals. Bnr1 hingegen ist während des gesamten Zellzyklus durch Septine am Knospenhals immobilisiert und sorgt für Nukleation von Aktinkabeln, die in die Mutterzelle ragen. Somit besteht ein konstanter, retrograder Aktinfluss, der bei Transport von Cargos entlang des Aktinzytoskeletts unter Energieaufwand überwunden werden

muss (Imamura et al., 1997; Evangelista et al., 2002; Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002b; Sagot et al., 2002a; Yang und Pon, 2002; Buttery et al., 2007).

1.4.3 Aktinpatches

Als dritte Aktinstruktur lassen sich kortikale Aktinpatches beobachten (Abb.2), die eine wichtige Rolle bei der Endozytose spielen und hauptsächlich in den Wachstumszonen in der Knospe und am Knospenhals lokalisiert sind. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch hohe Dynamik aus mit einer Lebensdauer von etwa 5-20 Sekunden. Im Gegensatz zu den Aktinkabeln wird die Polymerisation des F-Aktin jedoch nicht durch Formine sondern durch den Arp2/3-Komplex initiiert und bewirkt langsame, ungerichtete Bewegung der endosomalen Struktur entlang des Zellcortex. Nach Invagination der endozytotischen Vesikel werden diese passiv durch Kopplung an den retrograden Aktinfluss transportiert, ehe sie mit einem Endosom fusionieren und sich die Aktinhülle löst (Doyle und Botstein, 1996; Waddle et al., 1996; Smith et al., 2001; Carlsson et al., 2002; Kaksonen et al., 2003; Huckaba et al., 2004). Im Gegensatz zu den linearen Aktinfilamenten, die mit Hilfe der Formine gebildet werden, polymerisiert F-Aktin nach Nukleation durch den Arp2/3-Komplex in einem Winkel von 70° an bereits bestehenden Aktinkabeln. Der Komplex selbst besteht aus sieben Untereinheiten mit den beiden aktinähnlichen Proteinen (actin-related protein) Arp2 und Arp3, die eine Homologie von 47% beziehungsweise 33% mit *ACT1* aufweisen. Die dadurch bedingte strukturelle Ähnlichkeit mit Aktin ermöglicht es, dass Arp2 und Arp3 als Polymerisationskeim die ersten beiden Untereinheiten an der Seite des neu gebildeten Filaments darstellen. Darüber hinaus sind auch Arc15, Arc18, Arc19, Arc35 und Arc40 entscheidende Bestandteile des Komplexes. Für die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes sind die NPF-Proteine (nucleation promoting factor) notwendig, zu denen Las17, Myosin I, Pan1 und Abp1 zählen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sich durch Interaktion mit einem NPF die Konformation des Arp2/3-Komplexes ändert. Dadurch werden Arp2 und Arp3 zueinander in eine räumliche Anordnung gebracht, die der eines Aktindimers gleicht (Mullins et al., 1997; Volkman et al., 2001; Moseley und Goode, 2006). Coronin, kodiert durch *CRN1*, auf der anderen Seite wirkt als Inhibitor der Arp2/3-Aktivität durch direkte Interaktion mit dem Komplex. Coronin scheint jedoch nicht mit den NPF-Proteinen zu kompetieren oder diese zu dislozieren, sondern vielmehr mit der Arc35 Untereinheit zu interagieren (Humphries et al., 2002).

1.4.4 Transport von Mitochondrien entlang des Aktinzytoskeletts

In höheren Eukaryonten werden Mitochondrien über lange Strecken anterograd mit Hilfe von Kinesin und retrograd mittels Dynein entlang von Mikrotubuli transportiert (Hollenbeck und Saxton, 2005).

Im Gegensatz zu anderen Pilzen wie zum Beispiel *Schizosaccharomyces pombe* (Yaffe et al., 1996) und *Neurospora crassa* (Steinberg und Schliwa, 1993; Fuchs et al., 2002) werden in *S. cerevisiae* Mitochondrien jedoch nicht über Mikrotubuli, sondern entlang des Aktinzytoskeletts bewegt. Erste Hinweise für den aktinabhängigen Transport wurden gesammelt, als beobachtet wurde, dass Mutationen in *ACT1* oder Genen, die für die Aktindynamik wichtig sind, sowie Behandlung der Zellen mit Latrunkulin A zu einer Veränderung der Transportgeschwindigkeit und der Verteilung von Mitochondrien führten. Bei *in vitro* Versuchen konnte eine ATP abhängige Bindung von isolierten Mitochondrien an polymerisierte Aktinfilamente beobachtet werden, und auch mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine Kollokalisierung sowie Transport entlang von bestehenden Aktinkabeln beobachtet werden (Drubin et al., 1993; Lazzarino et al., 1994; Simon et al., 1995; Smith et al., 1995; Simon et al., 1997; Hermann et al., 1998; Boldogh et al., 1998; Boldogh et al., 2001a; Fehrenbacher et al., 2004; Altmann und Westermann, 2005).

1.5 Myosine in *S. cerevisiae*

In der Bäckerhefe gibt es fünf Myosine aus drei unterschiedlichen Klassen. Das einzige Klasse II Myosin, Myo1, spielt eine Rolle bei der Zellteilung. Dabei bildet es in Wechselwirkung mit Septinen sowie dem Aktinzytoskelett den Aktomyosinring aus und fungiert damit eher als strukturelles Myosin, denn als Motor (Bi et al., 1998; Brown, 1997).

Desweiteren gibt es mit Myo3 und Myo5 zwei Klasse I Myosine, die aufgrund ihrer vergleichsweise kurzen C-terminalen Domäne auch Minimiosine genannt werden. Die beiden hoch konservierten Myosine sind an den kortikalen Aktinpatches lokalisiert und spielen eine Rolle beim Internalisationsschritt während der Endozytose. Wird eines der beiden Klasse I Myosine deletiert, so hat dies kaum Auswirkungen. Somit kann das jeweils andere Myosin die Deletion des ersten ausgleichen, was sich durch die große Homologie der Aminosäuresequenz von 86% in der Motordomäne und 62% im gesamten Molekül erklären lässt. In der *myo3Δ/myo5Δ* Doppelmutante ist jedoch sowohl das Wachstum als auch die Organisation des Aktinzytoskeletts sehr stark in Mitleidenschaft gezogen (Mooseker und Cheney, 1995; Geli und Riezman, 1996; Goodson et al., 1996; Brown, 1997; Pruyne und Bretscher, 2000; Tanaka und Matsui, 2001; Giblin et al., 2011).

Bei Myo2 und Myo4 handelt es sich um zwei Klasse V Myosine, die zum wachsenden Ende der Aktinfilamente wandern und einen gemeinsamen Ursprung besitzen. So führte vor etwa 100 Millionen Jahren die Ausbildung einer tetraploiden Hefe durch Endo-Reduplikation einer diploiden Zelle oder Fusion zweier diploider Zellen zu einer Verdopplung des Genoms auf zweimal etwa 5000

Gene. Im weiteren Verlauf gingen etwa 85% der verdoppelten Gene wieder verloren, sodass heute noch etwa 1000 Gene dupliziert vorliegen (Scannell et al., 2007; Botstein und Fink, 2011). Zwei dieser Gene sind wohl *MYO2* und *MYO4*, deren Genprodukte sich im Aufbau gleichen.

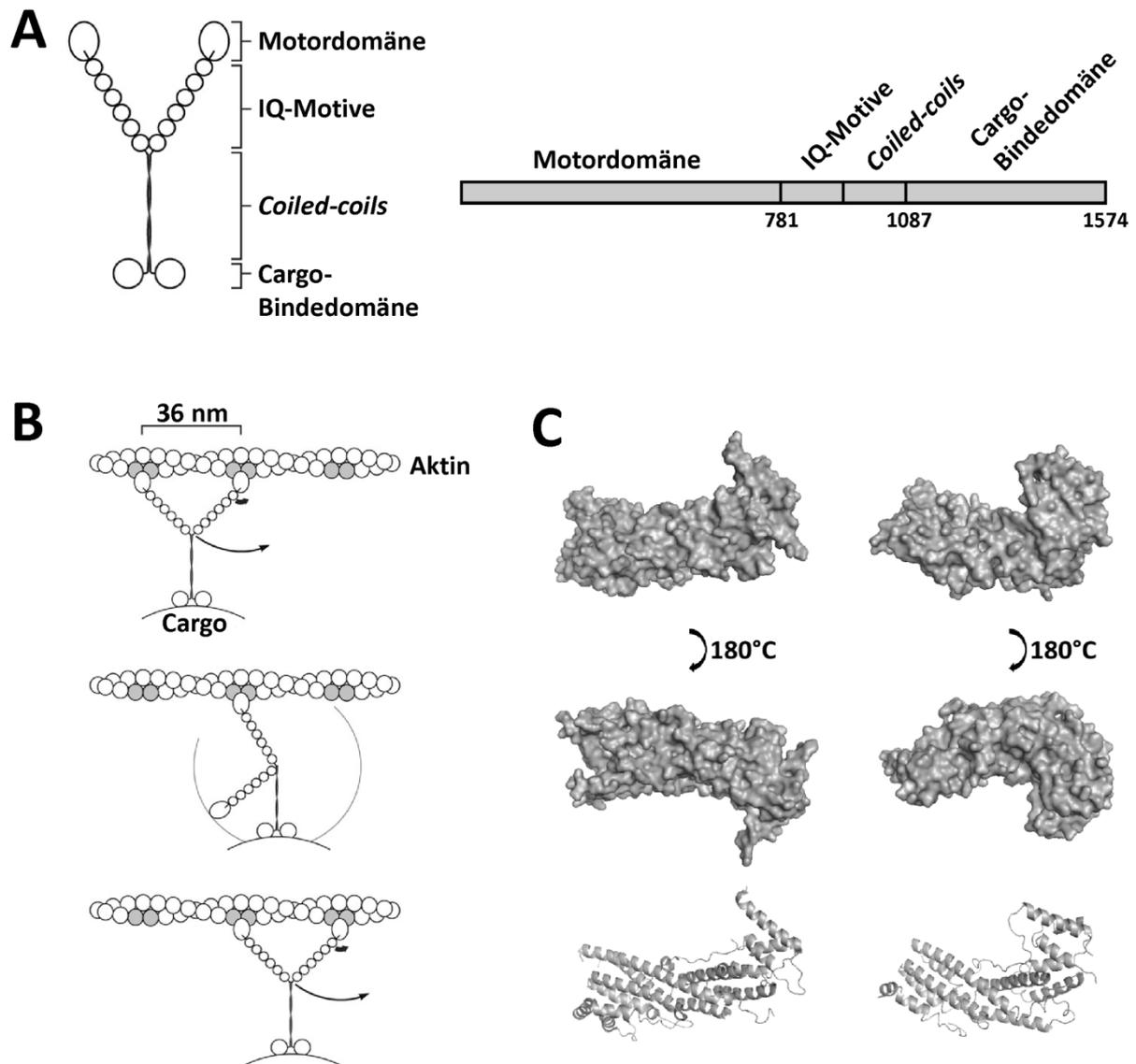


Abbildung 3) Das Klasse V Myosin Motorprotein Myo2 von *S. cerevisiae*. **A)** Schema des Myo2 Dimers (links) und Domänenstruktur des Myo2 Monomers (rechts). Die Zahlen stehen für Aminosäurereste (verändert nach: Schott et al., 2002). **B)** Im Modell schwingt der Hebelarm eines dimerisierten Klasse V Myosins und führt somit zur Bewegung des Motors. Konformationsänderungen in der Motordomäne während des ATPase Zyklus (dicker Pfeil) bedingen eine Rotation des Hebelarmes, was die Fortbewegung entlang des Aktinfilaments nach sich zieht (dünner Pfeil; verändert nach: Schott et al., 2002). **C)** Oberflächen (oben und Mitte) und Bänder (unten) Diagramme der Cargo-Bindedomäne von Myo2 (links; PDB-ID: 2f6h) und Myo4 (rechts; PDB-ID: 3MMI) wurden mit der PyMOL Software (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3; Schrödinger) hergestellt.

So lassen sich die beiden Transportproteine in 4 Hauptdomänen untergliedern. Die N-terminale Motordomäne enthält die Bindestellen für Aktin sowie ATP. Daran schließt sich ein 24 nm langer α -helikaler Hebelarm an, der aus sechs IQ-Motiven besteht und durch Bindung von Calmodulin oder leichten Myosin-Ketten, wie etwa der essentiellen Mlc1, stabilisiert wird. Die Anzahl der IQ-Motive mit einer IQXXRGXXR-Konsensussequenz bestimmt die Länge des Hebelarms und damit die Schrittweite des Motorproteins, welche 36 nm beträgt. Dabei verstärkt der Hebelarm kleine Veränderungen der Tertiärstruktur der Motordomäne hervorgerufen durch ATP Hydrolyse im aktiven Zentrum, was in einem Arbeitshub entlang des Aktinfilaments resultiert. Klasse V Myosine sind prozessiv, wobei das Motorprotein in einem sogenannten *hand-over-hand* Mechanismus viele Schritte zurücklegt, ehe es von Aktin dissoziiert. In Analogie zu einem Motor schließt sich an die Motordomäne die Kurbelstange an. Diese Region aus α -helikalen *coiled-coils* ist für die Dimerisierung des Proteins zuständig. Die globuläre C-terminale Domäne wiederum ist für die Bindung von Cargos durch Interaktion mit Adaptermolekülen verantwortlich. Neben der Cargo-Bindung wird die C-terminale Domäne durch Interaktion mit der Motordomäne auch für die Stabilisierung der gefalteten, inhibierten Konformation von Myo2 benötigt. Selbst wenn die Aminosäuresequenzen der Cargo-Bindedomäne von Myo2 und Myo4 nur wenig konserviert sind, so lassen sich bei der Kristallstruktur große Übereinstimmungen finden (Abb. 3C; Pashkova et al., 2006; Heuck et al., 2010). Zu den Cargos von Myo4 zählen mRNAs und Röhren des kortikalen Endoplasmatischen Retikulums (ER). Myo2 transportiert unter anderem sekretorische Vesikel, Vakuolen, Peroxisomen, und Elemente des *trans*-Golgi. Dabei lassen sich in der Cargo-Bindedomäne von Myo2, welche durch das essentielle Gen *MYO2* kodiert wird, unterschiedliche Bindestellen für die Frachtmoleküle finden. Die globuläre Domäne kann in zwei Subdomänen unterteilt werden, wobei die Bindestellen für Vakuolen und Mitochondrien in Subdomäne I und für Vesikel und Peroxisomen in Subdomäne II zu finden sind (Reck-Peterson et al., 2000; Trybus, 2008; Matsui, 2003; Pruyne et al., 2004; Weisman, 2006; Fagarasanu et al., 2010).

1.6 Modelle zur Vererbung von Mitochondrien in *S. cerevisiae*

Zellorganellen, die von Membranen umhüllt sind, können nicht *de novo* entstehen und müssen somit in die Nachkommenszelle transportiert werden. Dies geschieht in *S. cerevisiae* entlang des Aktinzytoskeletts. Jedoch wird der Mechanismus des mitochondrialen Transportes weiterhin kontrovers diskutiert. Dabei steht die Frage nach dem Mechanismus für den anterograden Transport im Mittelpunkt, wobei der retrograde Aktinfluss überwunden werden muss.

1.6.1 Transport durch Arp2/3-Komplex-abhängige Aktinpolymerisation

Von Liza Pon und ihren Mitarbeitern wurde ein Modell für den anterograden mitochondrialen Transport entworfen, bei dem die Mitochondrien durch Kopplung an Arp2/3-abhängige Aktinpolymerisation zum Pol der Knospe transportiert werden (Abb. 4). Dieser Hypothese liegt die Beobachtung zugrunde, dass sich *Listeria monocytogenes*, *Rickettsia conorii* und weitere intrazelluläre Pathogene des wirtseigenen Arp2/3-Komplexes bemächtigen und durch Polymerisation von Schweifen aus Aktinbündeln bewegen (Welch et al., 1997; Welch et al., 1998; Gouin et al., 2005). So sollen sich Mitochondrien eines ähnlichen Mechanismus zur Fortbewegung bedienen. Als Hinweis für dieses Modell wird eine Kollokalisierung von Arp2 mit Mitochondrien via Immunfluoreszenz und Coimmunopräzipitation von Arc15 und Arp2 aus Extrakten isolierter Mitochondrien angesehen. Daraus wurde geschlossen, dass ein vollständig assemblierter Arp2/3-Komplex auch *in vivo* mit Mitochondrien direkt interagiert (Boldogh et al., 2001a). Auch konnte auf isolierten Mitochondrien Nukleation von F-Aktin gemessen werden. Nach Natriumazid Behandlung und Fixierung konnte in den Zellen eine diffuse F-Aktin Färbung beobachtet werden, die mit Mitochondrien kollokalisiert. Dieses diffuse Signal wurde mit Aktinwolken verglichen, die bei der intrazellulären Fortbewegung von *Listeria monocytogenes* beobachtet werden können (Boldogh et al., 2001a). Darüber hinaus wurde die Bildung von F-Aktin bei Inkubation von isolierten Mitochondrien mit G-Aktin auf die Nukleationsaktivität des Arp2/3-Komplexes zurückgeführt (Boldogh et al., 2005). Daneben wurde in Mutanten des Arp2/3-Komplexes eine Beeinflussung des anterograden, aber nicht retrograden Transportes von Mitochondrien beobachtet (Fehrenbacher et al., 2004).

Der Arp2/3-Komplex ist in diesem Modell jedoch nicht für die Bindung der Mitochondrien an das Aktinzytoskelett verantwortlich (Boldogh et al., 2001a). Diese sollte vielmehr durch einen Komplex aus drei mitochondrialen Proteinen (Mmm1, Mdm10 und Mdm12) vermittelt werden, der beide mitochondriale Membranen durchspannt und die mtDNA bindet. So sah man Parallelen zum Kinetochor als Struktur, welche eine Interaktion von DNA mit dem Zytoskelett herstellt, und benannte den Komplex *Mitochore* (Boldogh et al., 2003). Der retrograde Transport erfolgt gemäß dem Modell passiv über Kopplung von Mitochondrien an wachsende Aktinfilamente durch den *Mitochore*-Komplex. Anterograd müssen die Mitochondrien jedoch aktiv transportiert werden, was durch Aktinpolymerisation durch den Arp2/3-Komplex bewerkstelligt werden soll. Für eine reversible, ATP-abhängige Bindung von Mitochondrien an das Aktinzytoskelett wäre wiederum der *Mitochore*-Komplex verantwortlich. Dabei sollen Jsn1 und Puf3, zwei Mitglieder der Puf-Familie von RNA bindenden Proteinen, den Arp2/3-Komplex an die Mitochondrien und den Komplex aus Mmm1,

Mdm10 und Mdm12 rekrutieren (Boldogh et al., 2003; Boldogh et al., 2005; Fehrenbacher et al., 2005; Boldogh und Pon, 2007; Garcia-Rodriguez et al., 2007; Peraza-Reyes et al., 2010). Allerdings konnte in späteren Publikationen gezeigt werden, dass Mmm1 falsch lokalisiert wurde und sich nicht vom Cytosol bis in die Matrix erstreckt, sondern sich vielmehr in der Membran des ER befindet. Gemeinsam mit Mdm10, Mdm12 und Mdm34 bildet es den sogenannten **ERMES-Komplex** (*ER mitochondria encounter structure*) aus, der Kontakte zwischen dem ER und Mitochondrien herstellt. Diese sind unter anderem notwendig, da Mitochondrien nicht an den sekretorischen Weg angeschlossen sind und somit nicht durch Vesikel mit Membranbestandteilen versorgt werden können. Zudem scheint der Komplex auch eine Rolle bei der Ca^{2+} -Homöostase und beim Erhalt der mtDNA zu spielen (Kornmann et al., 2009; Kornmann und Walter, 2010).

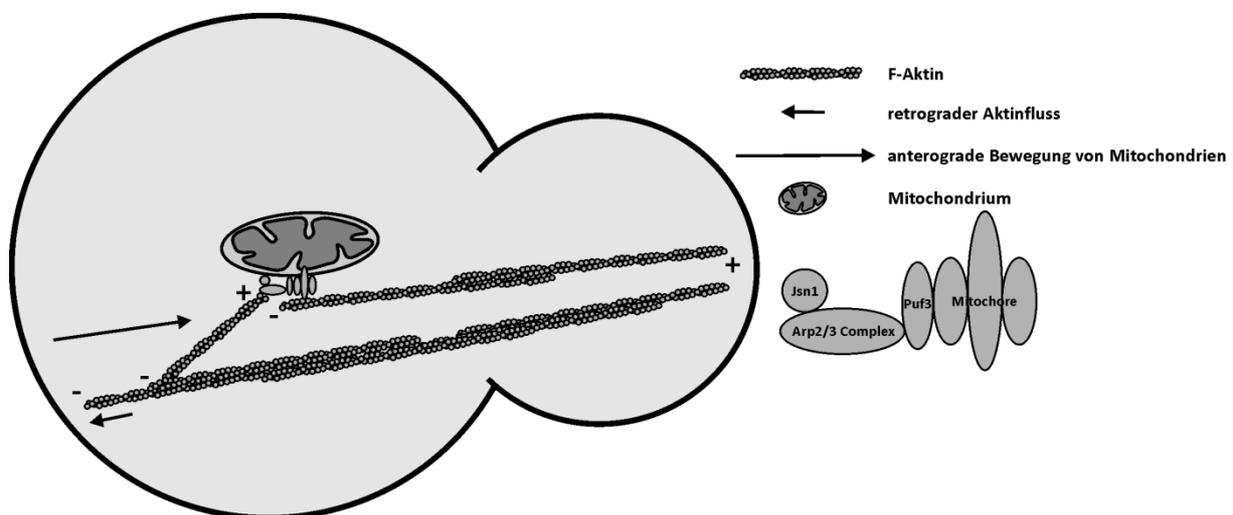


Abbildung 4) Modell für den anterograden Transport von Mitochondrien durch Arp2/3-abhängige Aktinpolymerisation. Nach diesem Modell wird der Arp2/3-Komplex mittels Jsn1 an Mitochondrien rekrutiert. Dort sorgt die Aktinpolymerisation für die Bewegung der Mitochondrien zur Knospe. Puf3 vermittelt dabei die Interaktion des Arp2/3-Komplexes mit dem *Mitochore*-Komplex. Dieser besteht aus den Proteinen Mmm1, Mdm10 und Mdm12 und soll die Interaktion von Mitochondrien mit dem Aktinzytoskelett vermitteln. Die Größenverhältnisse in der Abbildung sind nicht maßstabsgetreu (angelehnt an: Valiathan und Weisman, 2008).

1.6.2 Transport durch das Motorprotein Myo2

Das alternative Modell schlägt vor, dass die Mitochondrien über Motorproteine entlang des Aktinzytoskeletts transportiert werden (Abb.5). Eine Beteiligung von Myo1, Myo3, Myo4 und Myo5 konnte jedoch ausgeschlossen werden (Simon et al., 1995; Goodson et al., 1996; Dimmer et al., 2002; Boldogh et al., 2004). Da *MYO2* ein essentielles Gen darstellt, kann eine Deletionsmutante nicht

untersucht werden. Allerdings gibt es mittlerweile zahlreiche temperatursensitive (ts) Allele von *MYO2*. Jedoch hatten das Allel *myo2-66^{ts}*, welches einen Aminosäureaustausch in der Motordomäne verursacht, die Doppelmutante *myo2-66^{ts} myo4Δ*, sowie die Allele *myo2-338^{ts}* und *myo2-6IQ*, bei dem die IQ-Motive deletiert sind und somit der Hebelarm verkürzt ist, keinen großen Einfluss auf die mitochondriale Verteilung und Morphologie (Simon et al., 1995; Itoh et al., 2002; Boldogh et al., 2004). Dies führte zur Annahme, dass Myosine keine Rolle beim Transport von Mitochondrien spielen (Boldogh et al., 2001b; Pruyne et al., 2004; Boldogh und Pon, 2006). Allerdings wurden beim *myo2-573^{ts}* Allel Defekte beim anterograden mitochondrialen Transport beobachtet (Itoh et al., 2002; Itoh et al., 2004). Und auch in der Mutante *myo2-66^{ts}* führt eine Inkubation bei nichtpermissiver Temperatur zu einer Akkumulation von Mitochondrien in der Mutterzelle (Boldogh et al., 2004). Darüber hinaus soll Myo2 mit Ypt11, einem Protein aus der Familie der Rab-GTPasen, und Mmr1 (mitochondrial Myo2 receptor related protein 1), einem mitochondrialen Außenmembranprotein, bei der Vererbung von Mitochondrien zusammenwirken. Bei Deletion von *YPT11* oder *MMR1* kann eine Verzögerung der Vererbung von Mitochondrien beobachtet werden, wohingegen eine Überexpression eines dieser beiden Gene zur Akkumulation von Mitochondrien in der Knospe führt (Itoh et al., 2002; Itoh et al., 2004; Frederick et al., 2008). So scheinen diese beiden Proteine durch Wechselwirkung mit Myo2 zur mitochondrialen Vererbung beizutragen. Eine Depletion von Myo2 und dessen essentieller leichter Kette Mlc1, exprimiert von titrierbaren Promotorallelen, wiederum führten zu veränderter mitochondrialer Morphologie und einem Verlust von mtDNA. Darüber hinaus zeigten isolierte Mitochondrien bei Zugabe eines Antikörpers gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2 *in vitro* keine Interaktion mehr mit Aktinkabeln (Altmann und Westermann, 2005; Altmann et al., 2008).

Die Rolle von Myo2 bei der mitochondrialen Vererbung wird jedoch noch kontrovers diskutiert. Insofern wurden die Transportdefekte in den Deletionsstämmen von *MMR1* und *YPT11* sowie der *myo2* Mutanten so interpretiert, dass Myo2 einen Retentionsfaktor in die Knospe transportiert, der den Rücktransport der Mitochondrien in die Mutterzelle verhindert. Somit wäre Myo2 lediglich indirekt an der mitochondrialen Vererbung beteiligt. Nach diesem Modell wurde Ypt11 als Retentionsfaktor vorgeschlagen (Boldogh et al., 2004; Boldogh und Pon, 2006, 2007; Pon, 2008; Peraza-Reyes et al., 2010).

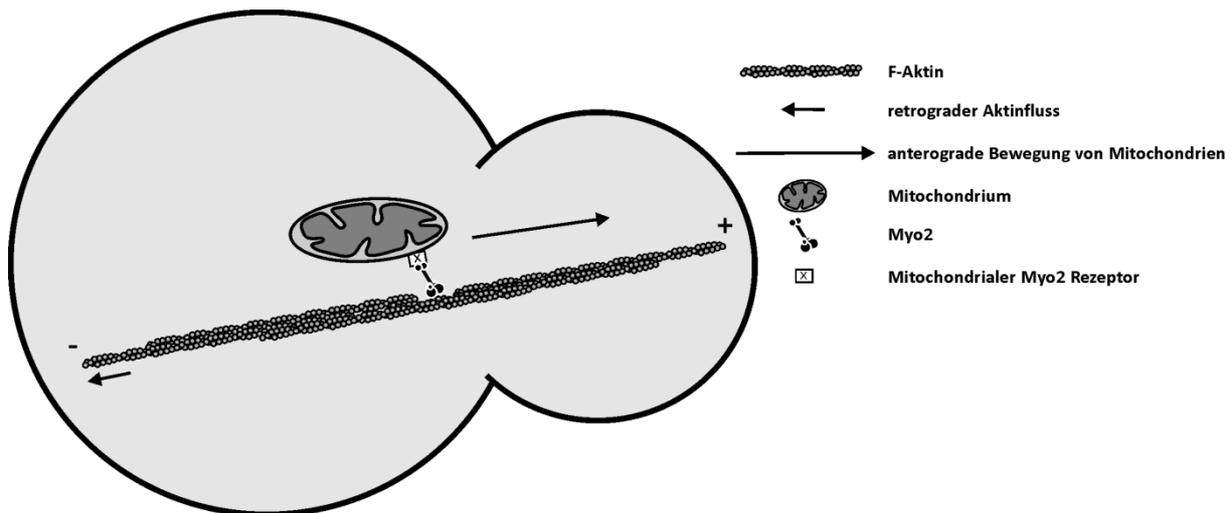


Abbildung 5) Modell für den anterograden Transport von Mitochondrien durch das Motorprotein Myo2. Nach diesem Modell werden Mitochondrien mit Hilfe des Klasse V Motorproteins Myo2 anterograd transportiert. Dabei bindet Myo2 über einen bislang unbekanntem Adapter an Mitochondrien. Die Größenverhältnisse in der Abbildung sind nicht maßstabsgetreu (angelehnt an: Valiathan und Weisman, 2008).

1.7 Zielsetzung

In *S. cerevisiae* werden Mitochondrien aktiv entlang des Aktinzytoskeletts in die Knospe transportiert. Für den Mechanismus der Bewegung gibt es zwei unterschiedliche Modelle. Ziel dieser Arbeit war es, Hinweise dafür zu finden, welches der beiden Modelle wahrscheinlicher ist.

Daher sollte der Einfluss der Aktinpolymerisation durch den Arp2/3-Komplex auf den Transport von Mitochondrien untersucht werden. Auf der anderen Seite konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass Myo2 eine Rolle bei der Bewegung von Mitochondrien spielt. Jedoch konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob Myo2 direkt oder indirekt an der mitochondrialen Vererbung beteiligt ist. Durch Mutationen in der Cargo-Bindedomäne von Myo2 sollte die mitochondriale Bindestelle charakterisiert werden. Bisher gab es indirekte Hinweise dafür, dass Myo2 auf der mitochondrialen Oberfläche lokalisiert ist. Myo2 interagiert jedoch mit zahlreichen Cargos in der Zelle und befindet sich *in vivo* größtenteils an der Knospenspitze oder am Knospenhals. Dadurch und durch ein schwaches Fluoreszenzsignal einer Fusion von Myo2 mit GFP wurde eine mikroskopische Analyse der Bindung von Myo2 an Mitochondrien erschwert. Aus diesem Grund sollte durch die größere Sensitivität der Immuno-Elektronenmikroskopie eine Lokalisierung von Myo2 auf der mitochondrialen Oberfläche untersucht werden. Zudem sollte der Effekt einer Verankerung des Myo2 Motorproteins in der mitochondrialen Außenmembran untersucht werden. Darüber hinaus

stand die Frage im Zentrum dieser Arbeit, mit welchen Faktoren Myo2 interagiert. Dabei sollten zum einen bereits bekannte Interaktionspartner mit einer Rolle für die mitochondriale Vererbung bedacht werden. Auf der anderen Seite sollte mittels *pull-down*-Experimenten nach bislang unbekanntem Interaktionspartnern von Myo2 gesucht werden.

2. Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben wurden Standardmethoden der Molekularbiologie (Sambrook und Russell, 2000) und der Hefegenetik (Burke *et al.*, 2000) angewendet.

2.1 Material

Chemikalien wurden - sofern nicht anders angegeben - von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim) und Roth (Karlsruhe) im Reinheitsgrad p.a. oder „für Molekularbiologie“ bezogen. Die verwendeten Enzyme stammten, sofern nicht anders angegeben, von Fermentas (St. Leon-Rot).

2.1.1 Antikörper

Primäre Antikörper

Es wurden affinitätsgereinigte Kaninchen Antikörper gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2 (α -Myo2(CBD)) sowie gegen Tom40 (α -TOM40) verwendet. Dabei wurde α -Myo2(CBD) (s.u.) in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:400 und α -TOM40 in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST-Puffer (6,05 g/l Tris, 8,76 g/l NaCl, 0,5 ml/l Tween 20) mit 5% Magermilchpulver eingesetzt.

Sekundäre Antikörper

Für die Immunmarkierung von Proteinen im Western-Blot wurde ein sekundärer Ziege-anti-Kaninchen Antikörper verwendet, an den Meerrettich Peroxidase gekoppelt ist (Ziege-anti-Kaninchen, HRP Conjugate; Promega, Madison, USA). Der sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10000 in TBST-Puffer mit 5% Magermilchpulver eingesetzt.

Für die Immunmarkierung von Proteinen in Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie wurde ein sekundärer Ziege-anti-Kaninchen Antikörper verwendet, an den 10 nm Goldpartikel gekoppelt waren (BBInternational, UK).

2.1.2 Mikroskope und Zubehör

Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop mit Plan-Neofluar 100x/ 1.30 Ph3 Öbektiv (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) mit Evolution VF Mono Cooled Monochrom-Kamera (Intas, Göttingen) und Image-Pro Plus 5.0 sowie Scope-Pro 4.5 Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Für *CellTracker Blue CMAC* wurde Filtersatz 01 (Anregung 365 +/- 6 nm, Emission >397 nm), für GFP

Filtersatz 10 (Anregung 450-490 nm, Emission 515-565 nm) und für RFP, Cherry oder Rhodamin B-Hexylester Filtersatz 15 (Anregung 546 +/- 6 nm, Emission >590 nm) verwendet.

Inverses Leica DMI 6000 Fluoreszenzmikroskop mit Trinokulartubulus mit HCX PL APO 100x /1.40-0.70 Ölobjektiv (Leica Microsystems, Wetzlar); Leica DFC360FX Kamera (*high speed kit*), Inkubator BL (PeCon GmbH), Leica LAS AF Software, Version 2.1.0. Für RFP und Cherry wurde Filtersatz N3 (Anregung 546 ± 6 nm; Dichromatischer Spiegel bei 585 nm; Emission bei 600 ± 20 nm), für GFP Filtersatz L5 (Anregung 480 ± 20 nm; Dichromatischer Spiegel bei 505 nm; Emission bei 527 ± 15 nm) und für *CellTracker Blue CMAC* Filtersatz A4 (Anregung 360 ± 20 nm; Dichromatischer Spiegel bei 400 nm; Emission 470 ± 20 nm) verwendet.

Transmissionselektronenmikroskop JEM-2100 (JEOL Ltd.); $4,080 \times 4,080$ -pixel *charge-coupled device camera* (UltraScan 4000; Gatan, Inc); Digitale Mikroskopiesoftware version 1.70.16 (Gatan, Inc).

CellASIC Onix Microfluidic Perfusion System, Y2 Microfluidic Plate (CellASIC, USA).

2.1.3 Dekonvolution

Bei dekonvulierten z-Stapel Aufnahmen mit dem Leica DMI 6000 Fluoreszenzmikroskop wurde eine softwarebasierte Rechenoperation durchgeführt, wodurch Linsenfehler aus dem Bild gerechnet wurden. Die *blind deconvolution* Methode der Leica Software (Patent DE10250775A1; Leica Microsystems; Wetzlar) wurde dabei mit 10 Durchläufen verwendet. Mittels *cropping* wurden Bildteile ohne relevante Information aus dem Stapel entfernt, ehe eine Projektion der maximalen Intensität angefertigt wurde.

2.1.4 Bildbearbeitung

Alle Schritte der digitalen Bildbearbeitung wurden mit der CorelDRAW® X4 Software (Version 14.0.0.567, Corel Corporation) oder der ImageJ Software (Version 1.43, National Institutes of Health; Abramoff et al., 2004) durchgeführt. Manuell wurde jeweils eine Tonwertspreizung und Kontrastoptimierung durchgeführt.

2.1.5 Bearbeitung von Strukturdaten mittels PyMOL

Die Strukturdaten der Cargo-Bindedomäne von Myo2 (Datenbankeintrag: 2f6h; (Pashkova et al., 2006)) und Myo4 (Datenbankeintrag: 3MMI, Heuck et al., 2010) wurden von der *protein data bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>) heruntergeladen und mittels PyMOL Software (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3; Schrödinger) bearbeitet.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Molekularbiologie

Plasmide

Die Klonierungen und die Amplifikation von Plasmiden wurden nach Standardmethoden und mit dem *E. coli* Stamm XL1Blue (Stratagene, LaJolla, USA) durchgeführt. Die DNA Abschnitte wurden über PCR mittels *Pfu* Polymerase (Stratagene, LaJolla, USA) nach den Anweisungen des Herstellers amplifiziert. Eine Liste der verwendeten Plasmide findet sich in Tab 1. Um das *MYO2* Gen unter Kontrolle der endogenen regulatorischen Elemente zu exprimieren, wurden die Plasmide pRS413-*MYO2* (Catlett und Weisman, 1998) und pRS416-*MYO2* (Catlett et al., 2000) verwendet. Neue, mutante Allele von *MYO2* auf pRS413-*MYO2* wurden durch Melanie Krist (Universität Bayreuth, Zellbiologie) im Rahmen ihrer Diplomarbeit angefertigt.

Für die Expression von *myo2-fis1* wurden folgende Plasmide kloniert. Zuerst wurde in pRS416-*MYO2* mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) nach den Angaben des Herstellers eine *NheI* Schnittstelle mit den Primern *Nhelmutfwd* und *Nhelmutrev* entfernt. Daraufhin wurde ebenso eine *NheI* Schnittstelle in der Region, die für *Myo2* kodiert, mit den Primern *Nhelfwd* und *Nhelrev* eingefügt. Die Region des *FIS1* Gens, die für den Membrananker kodiert, wurde mit den Primern *FIS1TMDfwd* und *FIS1TMDrev* durch PCR über genomische DNA amplifiziert und in die *NheI* und *SacI* Schnittstelle des modifizierten pRS416-*MYO2* kloniert. Das neu entstandene Plasmid heißt pRS416-*myo2-fis1*. Um pRS413-*myo2-fis1* und pRS426-*myo2-fis1* zu erhalten wurde das *myo2-fis1* Allel mit seinem endogenen Promotor aus pRS416-*myo2-fis1* mit Hilfe von *Clal* und *SacI* ausgeschnitten und in pRS413 und pRS426 kloniert. Zur Herstellung von pRS425-*myo2-fis1* wurde das *myo2-fis1* Allel mit *XhoI* und *SacI* aus pRS416-*myo2-fis1* ausgeschnitten und in pRS425 kloniert. Für die Herstellung des Plasmids pRS426-*myo2-GFP-fis1* wurde die Region einer *mtGFP*-Kassette, die für GFP kodiert, welches über die mitochondriale Präsequenz der ATPase-Untereinheit 9 aus *Neurospora crassa* verfügt und in die mitochondriale Matrix transportiert wird (*mtGFP*), über PCR mit den Primern *Myo2GFPfis1fwd* und *Myo2GFPfis1rev* amplifiziert und in die *NheI* Schnittstelle von pRS426-*myo2-fis1* kloniert. Um Vesikel oder Elemente des späten Golgi zu färben, wurden die Plasmide pYX142-*GFP-SEC4* und pYX142-*GFP-SFT2* kloniert. Hierzu wurde die kodierende Region von *SEC4* und *SFT2* durch PCR über chromosomale DNA mit den Primern *GFPSEC4fwd* und *GFPSEC4rev*

beziehungsweise *GFPSFT2fwd* und *GFPSFT2rev* amplifiziert und in die *XhoI* und *BamHI* Schnittstellen des Vektors pYX142-*GFP-FIS1* kloniert.

Tabelle 1) Verwendete Plasmide. Angegeben sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit Replikationsursprung, dem Hefe-Auxotrophiemarker und der Quelle. Es handelt sich dabei mit Ausnahme von pGEX-4T-1*MYO2(CBD)* um Shuttle Vektoren, die in *E. coli* XL1-Blue vermehrt wurden.

Plasmid	Replikation	Auxotrophiemarker	Quelle
pGEX-4T-1 <i>Myo2(CBD)</i>			(Pashkova et al., 2006)
pYX142- <i>mtGFP</i>	<i>ARS/CEN</i>	<i>LEU2</i>	(Westermann und Neupert, 2000)
pYX142- <i>mtCherry</i>	<i>ARS/CEN</i>	<i>LEU2</i>	Dirk Scholz, Uni Bayreuth
pYX142- <i>GFP-FIS1</i>	<i>ARS/CEN</i>	<i>LEU2</i>	Doron Rapaport, Uni Tübingen
pYX142- <i>GFP-SFT2</i>	<i>ARS/CEN</i>	<i>LEU2</i>	Diese Arbeit
pYX142- <i>GFP-SEC4</i>	<i>ARS/CEN</i>	<i>LEU2</i>	Diese Arbeit
pVT100U- <i>mtGFP</i>	2 μ	<i>URA3</i>	(Westermann und Neupert, 2000)
pVT100U- <i>mtRFP</i>	2 μ	<i>URA3</i>	Mark Dürr, Uni Bayreuth
pRS413	<i>ARS/CEN</i>	<i>HIS3</i>	(Sikorski und Hieter, 1989)
pRS425	2 μ	<i>LEU2</i>	(Christianson et al., 1992)
pRS426	2 μ	<i>URA3</i>	(Christianson et al., 1992)
pRS413- <i>MYO2</i>	<i>ARS/CEN</i>	<i>HIS3</i>	(Catlett und Weisman, 1998)
pRS413- <i>myo2</i> ¹	<i>ARS/CEN</i>	<i>HIS3</i>	Siehe 1)
pRS416- <i>MYO2</i>	<i>ARS/CEN</i>	<i>URA3</i>	(Catlett et al., 2000)
pRS413- <i>myo2-fis1</i>	<i>ARS/CEN</i>	<i>HIS3</i>	Diese Arbeit
pRS416- <i>myo2-fis1</i>	<i>ARS/CEN</i>	<i>URA3</i>	Diese Arbeit
pRS425- <i>myo2-fis1</i>	2 μ	<i>LEU2</i>	Diese Arbeit
pRS426- <i>myo2-fis1</i>	2 μ	<i>URA3</i>	Diese Arbeit
pRS426- <i>myo2-GFP-fis1</i>	2 μ	<i>URA3</i>	Diese Arbeit
pDsRed-PTS1	<i>ARS/CEN</i>	<i>LEU2</i>	(Smith et al., 2002)
pWP1055	<i>ARS/CEN</i>	<i>URA3</i>	(Prinz et al., 2000)
1) pRS413 <i>myo2</i> ¹ : <i>myo2(L1229A)</i> , <i>myo2(T1230A)</i> , <i>myo2(K1234A)</i> , <i>myo2(V1235A)</i> , <i>myo2(V1236A)</i> , <i>myo2(T1237A)</i> , <i>myo2(E1293A)</i> , <i>myo2(Y1303A)</i> , <i>myo2(I1308A)</i> , <i>myo2(P1529S)</i> , <i>myo2(K1538A)</i> , <i>myo2(F1542A)</i> , <i>myo2(LQ)</i> (hergestellt durch Melanie Krist im Rahmen ihrer Diplomarbeit); <i>myo2(G1248D)</i> , <i>myo2(D1297N)</i> , <i>myo2(D1297G)</i> , <i>myo2(N1304S)</i> , <i>myo2(N1304D)</i> (Catlett und Weisman, 1998; Catlett et al., 2000)			

Tabelle 2) Verwendete Klonierungsprimer.

Primer	Sequenz (5' → 3')
<i>L1229Afw</i>	GCTTTCTTGCCCAAGTAGCGACTACAATTCAAAAAGTTGTCAC
<i>L1229Arev</i>	GTGACAACCTTTTTGAATTGTAGTCGCTACTTGGGCAAGAAAAGC
<i>T1230Afw</i>	GCTTTCTTGCCCAAGTATTGGCTACAATTCAAAAAGTTGCTACTC
<i>T1230Arev</i>	GAGTGACAACCTTTTTGAATTGTAGCCAATACTTGGGCAAGAAAAGC
<i>Q1233Rfw</i>	GCCCAAGTATTGACTACAATTAGAAAAGTTGCTACTCAATTGAAGGG
<i>Q1233Rrev</i>	CCCTTCAATTGAGTGACAACCTTTTCTAATTGTAGTCAATACTTGGGC
<i>K1234Afw</i>	CCCAAGTATTGACTACAATTCAAGCAGTTGCTACTCAATTGAAGG
<i>K1234Arev</i>	CCTTCAATTGAGTGACAACCTGTTGAATTGTAGTCAATACTTGGG
<i>V1235Afw</i>	GCCCAAGTATTGACTACAATTCAAAAAGCGGTCACTCAATTGAAG
<i>V1235Arev</i>	CTTCAATTGAGTGACCGCTTTTTGAATTGTAGTCAATACTTGGGC
<i>V1236Afw</i>	GCCCAAGTATTGACTACAATTCAAAAAGTTGCCACTCAATTGAAGGG
<i>V1236Arev</i>	CCCTTCAATTGAGTGGAACCTTTTTGAATTGTAGTCAATACTTGGGC
<i>T1237Afw</i>	GACTACAATTCAAAAAGTTGTCGCTCAATTGAAGGGTAACG
<i>T1237Arev</i>	CGTTACCCTTCAATTGAGCGACAACCTTTTTGAATTGTAGTC
<i>E1293Afw</i>	GGAGTATGTTTCATTGGTCACAGCACTAAAGGATGATTTCGAAGC
<i>E1293Arev</i>	GCTTCGAAATCATCTTTAGTGCTGTGACCAATGAAACATACTCC
<i>Y1303Afw</i>	GGATGATTTCGAAGCTCTAAGTGCTAATATATATAACATTTGGCTGAAG
<i>Y1303Arev</i>	CTTCAGCCAAATGTTATATATATTAGCACTTAGAGCTTCGAAATCATCC
<i>I1308Afw</i>	GCTCTAAGTTATAATATATATAACGCTTGGCTGAAGAAATTGCAGAAGC
<i>I1308Arev</i>	GCTTCTGCAATTTCTTCAGCCAAGCGTTATATATATTATAACTTAGAGC
<i>P1529Sfw</i>	CACTCCAGAAACAGGTTCACTTACTGACCCATTCAG
<i>P1529Srev</i>	CTGAATGGGTCAGTAAATGAACCTGTTTCTGGAGTG
<i>K1538Afw</i>	CCATTCAGTTTGATAGCGACAAGAAAATTTGACCAAGTAGAAGCC
<i>K1538Arev</i>	GGCTTCTACTTGGTCAAATTTTCTGTGCTATCAAACCTGAATGG
<i>F1542Afw</i>	GATAAAGACAAGAAAAGCTGACCAAGTAGAAGCCTATATACCAGC
<i>F1542Arev</i>	GCTGGTATATAGGCTTCTACTTGGTCAGCTTTTCTGTCTTTATC
<i>FIS1TMDfw</i>	ATATATGCTAGCCTCAAGGGTGTGTCGTCGC
<i>FIS1TMDrev</i>	ATATATGAGCTCTTACCTTCTTGTCTTCTTAAGAAGAAAC
<i>Nhelfwd</i>	GAATCTAAAGTCTAGAGCTAGCACTCCATCGTCCGG
<i>Nhelrev</i>	CCGGACGATGGAGTGCTAGCTCTAGACTTTAGATTC
<i>Nhelmutfw</i>	CACTATGGCGTGCTGCGAGCGCTATATGCGTTG

Primer	Sequenz (5`-> 3`)
<i>Nhelmutrev</i>	CAACGCATATAGCGCTCGCAGCACGCCATAGTG
<i>GFPSFT2fwd</i>	AATTTAGGATCCCATGAGCGAGGAACACCT
<i>GFPSFT2rev</i>	ATATATCTCGAGTCAGATGCGCAGAACACC
<i>GFPSEC4fwd</i>	AATTTAGGATCCCATGTCAGGCTTGAGAACTGTTTC
<i>GFPSEC4rev</i>	ATATATCTCGAGTCAACAGCAATTTGATTTAGAACTGTTTCC
<i>Myo2GFPfis1fwd</i>	AGGAGGGCTAGCATGGCCTCCACTCGTGTC
<i>Myo2GFPfis1rev</i>	AGGAGGGCTAGCTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG

2.2.2 Methoden der Zellbiologie

Hefestämme

In Tab. 3 sind die Hefestämme aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet oder hergestellt worden sind. Varianten dieser Stämme, die mit Plasmiden transformiert wurden, die in Tab.1 aufgelistet sind, wurden nicht mit erfasst. Die Plasmide wurden nach Standardmethoden (Gietz und Schiestl, 2007) in die Stämme transformiert.

Tabelle 3) Liste der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme

Stamm	Genotyp	Plasmid	Isogen	Referenz
D273-10B	<i>MATα, mal</i>			(Sherman, 1963)
<i>arc40^{ts}</i>	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, can1Δ::LEU2-MFA1pr::HIS3, ARC40^{ts}::URA3</i>			(Ben-Aroya et al., 2008)
<i>arc40^{ts}/MYO2</i>	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ARC40^{ts}::URA3, YOR326W::kanMX4, [HIS3]</i>	pRS413-MYO2		Sabrina Schmid, Uni Bayreuth
<i>arc40DOX</i>	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, pARC40::kanR-tetO7 –TATA, URA3::CMV-tTA</i>		R1158 (BY4741)	Open Biosystems
BY4741 WT	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3</i>			Open Biosystems
BY4742 WT	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3</i>			Open Biosystems
<i>MYO2</i>	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura2, YOR326W::kanMX4, [URA3]</i>	pRS416-MYO2	BY474x	Melanie Krist, Uni Bayreuth
<i>MYO2</i>	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura2, YOR326W::kanMX4, [HIS3]</i>	pRS413-MYO2	BY474x	Diese Arbeit
<i>myo2¹</i>	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura2, YOR326W::kanMX4, [HIS3]</i>	pRS413- <i>myo2¹</i>	BY474x	Melanie Krist, Uni Bayreuth
<i>mmr1Δ</i>	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3, YLR190W::kanMX4</i>		BY4741	Open Biosystems

Stamm	Genotyp	Plasmid	Isogen	Referenz
<i>mmr1Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YLR190W:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>mmr1Δ</i> / <i>MYO2</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , YLR190W:: <i>kanMX4</i> , YOR326W:: <i>kanMX4</i> , [HIS3]	pRS413-MYO2	BY474x	Philipp Schmid, Uni Bayreuth
<i>mmr1Δ</i> / <i>myo2</i> ²	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , YLR190W:: <i>kanMX4</i> , YOR326W:: <i>kanMX4</i> , [HIS3]	pRS413- <i>myo2</i> ²	BY474x	Philipp Schmid, Uni Bayreuth
<i>ypt11Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , YNL304W:: <i>kanMX4</i>		BY4741	Open Biosystems
<i>ypt11Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YNL304W:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>ypt11Δ</i> / <i>MYO2</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , YLR190W:: <i>kanMX4</i> , YOR326W:: <i>kanMX4</i> , [URA3]	pRS416-MYO2	BY474x	Philipp Schmid, Uni Bayreuth
<i>ypt11Δ</i> / <i>MYO2</i> ; <i>myo2</i> ³	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , YLR190W:: <i>kanMX4</i> , YOR326W:: <i>kanMX4</i> , [URA3], [HIS3]	pRS416-MYO2, pRS413- <i>myo2</i> ³	BY474x	Philipp Schmid, Uni Bayreuth
<i>ypt11Δ</i> / <i>myo2</i> ⁴	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , YLR190W:: <i>kanMX4</i> , YOR326W:: <i>kanMX4</i> , [HIS3]	pRS413- <i>myo2</i> ⁴	BY474x	Philipp Schmid, Uni Bayreuth
<i>mmr1Δ</i> / <i>ypt11Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , YLR190W:: <i>kanMX4</i> , YNL304W:: <i>kanMX4</i> , [URA3]	pRS426- <i>myo2</i> - <i>fis1</i>	BY474x	Diese Arbeit
<i>mmr1Δ</i> / <i>ypt11Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , YLR190W:: <i>kanMX4</i> , YNL304W:: <i>kanMX4</i> , [URA3]	pRS426- <i>myo2</i> - <i>fis1</i> , pRS425 ⁵	BY474x	Diese Arbeit
<i>caf4Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YKR036C:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>dnm1Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YLL001W:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>fis1Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YIL065C:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>mdm10Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YAL010C:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>mdm12Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YOL009C:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>mdm34Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YGL219C:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>mdm36Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YPR083W:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>mmm1Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YLL006W:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems
<i>num1Δ</i>	MAT α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , YDR150W:: <i>kanMX4</i>		BY4742	Open Biosystems

- 1) pRS413-*myo2(L1229A)*, pRS413-*myo2(T1230A)*, pRS413-*myo2(K1234A)*, pRS413-*myo2(V1235A)*, pRS413-*myo2(V1236A)*, pRS413-*myo2(T1237A)*, pRS413-*myo2(G1248D)*, pRS413-*myo2(E1293A)*, pRS413-*myo2(D1297N)*, pRS413-*myo2(D1297G)*, pRS413-*myo2(Y1303A)*, pRS413-*myo2(N1304S)*, pRS413-*myo2(N1304D)*, pRS413-*myo2(I1308A)*, pRS413-*myo2(P1529S)*, pRS413-*myo2(K1538A)*, pRS413-*myo2(F1542A)*, pRS413-*myo2(LQ)*
- 2) pRS413-*myo2(Q1233R)*, pRS413-*myo2(L1301P)*, pRS413-*myo2(LQ)*
- 3) pRS413-*MYO2*, pRS413-*myo2(Q1233R)*, pRS413-*myo2(L1301P)*, pRS413-*myo2(LQ)*
- 4) pRS413-*MYO2*, pRS413-*myo2(Q1233R)*, pRS413-*myo2(L1301P)*
- 5) pRS425, pRS425-*myo2-fis1*

Kultivierung von *S. cerevisiae*

Als Standardmedium bei der Anzucht von Hefezellen diente YPD-Medium (1% (w/v) Hefe Extrakt (Serva, Heidelberg); 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA); 2% Glukose). Musste mit speziellen Auxotrophiemarkern zum Beispiel auf Zellen mit Plasmiden oder auf Diploide bei der Paarung selektiert werden, so wurde synthetisches Medium mit 2% Glukose (SD: 0,7% (w/v) Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Formedium, Norwich, UK) verwendet, das mit wässrigen Stammlösungen an 10 mg/l Amino- und 2 g/l Nukleinbasen entsprechend der erforderlichen Selektionswirkung supplementiert war. Medienplatten wurden durch Zugabe von 2% (w/v) Agar-Agar zu oben angegebenen Medien hergestellt. Durch Zugabe von G418 (Geneticin, 250 µg/ml) beziehungsweise Doxycyclin (10 µg/ml) zu den Medien konnte auf Kanamycinresistenz selektiert oder die Promotoren Tetracyclin-regulierter Gene reprimiert werden. Zur Sporulation wurden diploide Hefestämme in Sporulationsmedium (1% (w/v) Kaliumacetat, 0,005% (w/v) Zinkacetat; essentielle Aminosäuren) inkubiert. Vor der Isolierung von Mitochondrien wurden die Zellen in halbsynthetischem Laktat-Medium (3 g Hefeextrakt, 0,5 g Glukose, 0,5 g CaCl₂, 0,5 g NaCl, 1,2 g MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 22 ml 90% D,L- Milchsäure, pH 5,5 mit NaOH, ad 1l mit H₂O) angezogen. Reagenzgläser und Kolben wurden unter Schütteln (150 rpm) bei einer Standardtemperatur von 30°C inkubiert. Die Induktion von temperatursensitiven Allelen erfolgte bei 37°C. Die Stämme mit einem temperatursensitiven Allel des essentiellen *ARC40* Gens wurde standardmäßig bei 25°C angezogen. Auf Medienplatten wurden die Zellen bis zu zwei Monate bei 4°C gelagert und für längere Lagerung wurden frische Kulturen von Medienplatten in Stocks mit 15% Glyzerin (v/v) bei -80°C weggefroren. Dazu wurde das Zellmaterial von Platte (etwa 1 cm² an Zellen) in einem Schraubröhrchen mit 1,5 ml 15% Glyzerin resuspendiert, bei -20°C vorgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Herstellung von Doppelmutanten

Nach Standardmethoden wurden diploide Stämme aus den haploiden Stämmen unterschiedlichen Paarungstyps mit den gewünschten Allelen hergestellt (Sherman, 2002). Nach Inkubation in Sporulationsmedium wurden die Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators (Singer MSM Series 300 mit acer n30 Bedien-PC; Singer Instruments, Roadwater, UK) dissektiert. Über entsprechende Selektionsplatten wurde die Identität der Tetraden überprüft. Mittels Kolonie PCR wurde bei möglichen Doppelmutanten die Deletion der entsprechenden Gene nachgewiesen. In Tab. 4 finden sich die Primer für den Deletionsnachweis mittels PCR unter Verwendung der GOTaq®-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim).

Tabelle 4) Verwendete Primer zur Bestimmung des Paarungstyps und Nachweis einer Gendeletion.

Primer	Sequenz (5' → 3')
Primer zur Bestimmung des Paarungstyps	
<i>MAT1</i>	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG
<i>MAT2</i>	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
<i>MAT3</i>	ACTCCAATTCAAGTAAGAGTTTG
Primer für Deletionsnachweise	
<i>kan Kasette fwd</i>	CCGGATTCAGTCGTCACTCAT
<i>MYO2 fwd</i>	GATTAGAGGAATGGTGCAAGAC
<i>MYO2 rev</i>	GATGACACGGTGGGAATAATGAGAG
<i>ARC40DOX fwd</i>	CTAACCATTAATCCTACAAGAAAGGCCTAT
<i>ARC40DOX rev</i>	TTATCATGATCTTTCAACGTTGCG
<i>ARC40 fwd2</i>	CTCTTCTGTGGGTTAGACGG
<i>ARC40 rev2</i>	CAACGGCCTTTCAACCGAAC
<i>MMR1 fwd</i>	CAGGCTCAAAGATCCCAAAGAG
<i>MMR1 rev</i>	CAGATGCGTAACTCGATAGCC
<i>NUM1 fwd</i>	CTTGTCCTACAAGGCAAAGACAC
<i>NUM1 rev</i>	GTCGGTCAACAACAAGCCC
<i>YPT11 fwd</i>	GTCCAGGGACATGAGCAAG
<i>YPT11 rev</i>	TGGAAGAAGACGAATAAGCGAG

Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *S. cerevisiae* mittels Tüpfeltest

Um den Wachstumsphänotyp von Hefestämmen zu untersuchen, wurden gleiche Zellmengen logarithmischer Kulturen seriell in 1 x PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 19 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄; pH 7,4) verdünnt. Daraufhin wurden je 5 µl der Verdünnungsstufen (1; 10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴) auf SD- oder YPD-Platten aufgetragen und bei 25°C, 30°C oder 37°C inkubiert.

Herstellung eines Zellextraktes von *S. cerevisiae*

Sphäroblasten wurden wie in Altmann et al. (2007) hergestellt. Diese wurden für die Herstellung von Gesamtzellextrakt mit SDS-Probenpuffer (0,15 mM Tris pH 6,8; 1,2% SDS; 30% Glycerin; 15% β-Mercaptoethanol; Bromphenolblau) versetzt. Alternativ wurden die Zellen für den Gesamtzellextrakt mittels NaOH aufgeschlossen (Kushnirov, 2000).

Isolierung und weitere Handhabung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Der Stamm D273-10B wurde angezogen wie oben beschrieben. Beim Stamm mit reprimierbarem Promotor von *MYO2* wurde vor der Isolierung von Mitochondrien das *TetO7-myo2* Promotorallel induziert oder reprimiert wie bereits beschrieben (Altmann et al., 2008). Nach der Herstellung von Sphäroblasten wurden die Mitochondrien über differentielle Zentrifugation und Aufreinigung über einen Saccharosedichtegradienten isoliert nach Altmann et al. (2007). Die Extraktion von peripher an die Außenmembran der Mitochondrien gebundenen Proteinen erfolgte mit hoher Salzkonzentration. Dazu wurden die Mitochondrien in SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, und 10 mM MOPS/KOH, pH 7.4) mit 1 M KCl resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 18000 x g und 4°C wurden die Mitochondrien mit SEM-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Proteasebehandlung wurde durch Zugabe von 50 µg/ml Trypsin (Sigma, Taufkirchen) zu den in SEM-Puffer resuspendierten Mitochondrien gestartet. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurde der Verdau durch Zugabe von 200 µg/ml Trypsininhibitor aus Soja (Sigma, Taufkirchen) während einer Inkubation von 5 min auf Eis abgestoppt. Anschließend wurden die Mitochondrien für 3 min bei 18000 x g und 4°C zentrifugiert, mit SEM-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die mitochondrialen Pellets wurden daraufhin in der Immuno-Elektronenmikroskopie eingesetzt.

2.2.3 Mikroskopie

Färbung der Mitochondrien mit Rhodamin-B Hexylester

Sollte die Morphologie der Mitochondrien eines Stammes rasch bewertet werden, ohne diesen mit einem Plasmid zur Färbung von Mitochondrien transformieren zu müssen, wurde eine Färbung mit Rhodamin-B Hexylester durchgeführt. Verfügen die Mitochondrien von lebenden Zellen über ein ausreichend hohes Membranpotential $\Delta\Psi$, so wird dieser Fluoreszenzfarbstoff selektiv in die Mitochondrien aufgenommen. Nach Zugabe von 2-4 μl Rhodamin-B Hexylester (1 mM) zu 1 ml einer logarithmischen Kultur und Inkubation für 10 min im Dunkeln wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Färbung des Aktinzytoskeletts mittels Rhodamin-Phalloidin

Das Aktinzytoskelett einer Hefezelle kann mittels Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht werden. Dazu wurden Zellen in YPD-Medium bis zur logarithmischen Phase (OD_{600} 0,2-0,4) angezogen. Ein Aliquot dieser Kultur wurde mit 10% (v/v) einer 37% Formaldehydlösung für 10 min bei RT fixiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 5000 x g und 4°C wurde das Zellpellet in PBS mit 10% (v/v) einer 37% Formaldehydlösung resuspendiert und für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde je nach Größe in 100-200 μl PBS resuspendiert. 20 μl der Zellsuspension wurden nun mit 2 μl Rhodamin-Phalloidin (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, USA) nach den Angaben des Herstellers versetzt und für 1 h bei RT im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 20-50 μl PBS aufgenommen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Färbung von Vakuolen mittels CellTracker Blue CMAC

Um die Vakuolen zu färben, wurden die Zellen bis zur logarithmischen Phase in SD-Flüssigmedium angezogen. 100 μl dieser Kultur wurden dann mit 1 μl 10 mM *CellTracker Blue CMAC* (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und für 30 min unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml SD-Medium wurden die Zellen in 20-50 μl SD-Medium aufgenommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Fluoreszenzmikroskopie

Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen bis zur logarithmischen Phase in YPD- oder SD-Medium angezogen, durch Zentrifugation und Resuspension aufkonzentriert und mit 0,5% Agarose auf einem Objektträger immobilisiert.

Langzeit Lebendzellmikroskopie

Für Experimente mit zeitaufgelöster 3D-Fluoreszenzmikroskopie, die sich über mehrere Stunden erstreckten, wurde zur Immobilisierung von Hefezellen in einer optischen Ebene eine Y02C ONIX™ Microfluidic Plate (cellASIC, San Leandro, USA) verwendet. Diese Inkubationskammer wurde an ein ONIX™ Microfluidic Perfusion System (cellASIC, San Leandro, USA) nach Angaben des Herstellers angeschlossen und mittels ONIX™ FG Software (cellASIC, San Leandro, USA) angesteuert. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde am inversen Leica DMI 6000 Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Nach dem Öffnen der Inkubationskammer wurde die Transportlösung entfernt. Anschließend wurden die *wells* A, B und C mit YPD-Medium ausgespült und mit 300 µl YPD-Medium befüllt. Um die restliche Transportlösung aus der Kammer zu spülen, wurden die 3 Kanäle A, B und C für jeweils 10 min mit 8 psi Flussrate gespült. Danach wurde das YPD-Medium aus dem Zellreservoir entfernt und durch 50 µl einer logarithmischen Kultur von etwa 10^7 haploiden Hefezellen ersetzt. Für den Versuch von Abb. 7 wurde aus den beiden zu untersuchenden Stämmen vor dem Laden eine Cokultur mit einer OD_{600} von 0,5 gebildet. Die Zellen wurden nun mit 8 psi in 20 s Intervallen in den Mikroskopiebereich geladen, bis die gewünschte Zelldichte erreicht war. Um Zellen, die nicht immobilisiert waren, aus dem Mikroskopiebereich zu spülen, wurde 5 min mit 8 psi gespült, ehe die Zellen während der Mikroskopie konstant mit frischem Medium bei einer Flussrate von 3 psi umspült wurden.

Zeitaufgelöste 3D-Fluoreszenzmikroskopie

Für die Experimente mit zeitaufgelöster 3D-Fluoreszenzmikroskopie wurden die Hefestämme bis zur logarithmischen Wachstumsphase in SD-Medium angezogen. Die Versuche wurden mit dem inversen Leica DMI 6000 Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, wobei die Temperatur konstant bei 30°C lag und durch den Inkubator BL (PeCon GmbH) kontrolliert wurde. Für die Fluoreszenzaufnahmen der *mtGFP*-exprimierenden Zellen wurden alle 2 s z-Stapel ($z=10$) über einen Zeitraum von 1 min aufgenommen. Die Aufnahmen wurden danach über Dekonvolution und Projektion der maximalen Intensität bearbeitet. Die Auswertung erfolgte mit dem *manual tracking tool* von ImageJ, wobei die Bewegung

der mitochondrialen Tubulienden nachverfolgt wurde. Auf diese Weise konnte für jeden Zeitpunkt die 2D-Geschwindigkeit der mitochondrialen Tubuli ermittelt werden.

Postembedding Immuno-Transmissionselektronenmikroskopie

Fixierung und Einbettung

Mitochondrien wurden wie in 2.2.2 beschrieben isoliert. Die mitochondrialen Pellets wurden 30 min bei Raumtemperatur in 1% Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer (0,1 M Na-Cacodylat, 1 mM CaCl₂, pH 7.2) fixiert. Zum Dehydrieren wurden die Proben für jeweils 20 min in Ethanol inkubiert, wobei die Ethanolkonzentration schrittweise um 10% erhöht wurde. Von 10% bis 70% wurden die Pellets auf Eis und von 70% bis 100% bei -20°C entwässert. Bei der Einbettung der Mitochondrien konnte das LR Gold™ Harz (London Resin Co. Ltd.) durch schrittweise Erhöhung von 10% für jeweils 20 min bei -20°C in die Proben eindringen. Um zu gewährleisten, dass der Ethanol restlos entfernt worden war, wurden die Proben mindestens dreimal mit 100% LR Gold™ Harz behandelt. Die Polymerisation des Harzes erfolgte für drei Tage unter UV-Licht bei -20°C, ehe die Blöckchen für 24 h bei Tageslicht und Raumtemperatur aushärteten. Daraufhin wurden ultradünne 60 nm Schnitte mit einem Diamantmesser (type ultra 35°; Diatome, Schweiz) an einem Ultramikrotom (Ultracut UCT; Leica) angefertigt. Sofort im Anschluss wurden die Proben für die Immunmarkierung vorbereitet.

Befilmung von Nickel-Lochgrids, Immunmarkierung und Nachkontrastierung

Beim Befilmen der Nickel-Lochgrids wurden Objektträger in eine Pioloformlösung (1% (w/v) in Chloroform) getaucht und getrocknet. Der Pioloform-Film wurde vom Objektträger gelöst und auf eine Wasseroberfläche gelegt, wo er mit Nickel-Lochgrids belegt und mittels Parafilm von der Wasseroberfläche abgehoben wurde. Nach dem Trocknen wurden 60 nm Ultradünnschnitte der isolierten Mitochondrien auf die Grids gelegt, 30 min bei Raumtemperatur auf einem Tropfen PBS mit 1% acetyliertem BSA (Aurion) und dann 15 min auf PBS mit 0.1% acetyliertem BSA und 0,1% Glyzin inkubiert. Nach dreimaligem Waschen auf PBS mit 0.1% acetyliertem BSA, wurden die Grids über Nacht bei 4°C auf einem Tropfen mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen die Cargo-Bindedomäne (2.2.4) (1:100 in PBS mit 0.1% acetyliertem BSA) inkubiert. Anschließend wurden die Dünnschnitte zweimal mit PBS/0.1% acetyliertem BSA gewaschen und mit Sekundärantikörper (1:50 Verdünnung in PBS mit 0,1% acetyliertem BSA) gekoppelt an 10 nm Goldpartikel (BBInternational) für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde je dreimal für 20 min mit PBS/0.1% acetyliertem BSA und H₂O gewaschen. Die Proben wurden

schließlich für 10-15 min mit 2% Uranylacetat in H₂O und 3-5 min mit Bleicitrat bei Raumtemperatur nachkontrastiert (Reynolds, 1963) und mit einem Transmissionselektronenmikroskop bei 80 kV untersucht.

2.2.4 Methoden der Biochemie

Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinen wurde mit Hilfe eines Bradford-Farbreagenzes (Roti®-Quant, Roth, Karlsruhe) bestimmt (Bradford, 1976). Dazu wurden die Proben 1:1000 mit H₂O verdünnt. Darauf wurde eine Kontrolle aus Wasser und die verdünnten Proben 1:5 mit dem Farbreagenz vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 595 nm ($A_{595\text{nm}}$) wurde in einem BioMate™ 3 Series Spektrophotometer (Thermo Spectronic Corporation, Egelsbach) gemessen. Anhand einer BSA-Eichgerade wurde die Konzentration der Proteine bestimmt.

Aufreinigung der Cargo-Bindedomäne von Myo2

Zur Aufreinigung der Myo2(CBD) wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) pLysS verwendet (Pashkova et al., 2006). Der Stamm enthielt das Plasmid pGEX-4T-1-MYO2, auf dem die Sequenz eines Fusionsproteins aus GST und der globulären Cargo-Bindedomäne von Myo2 (AS 1087-1574) kodiert war (Pashkova et al., 2005b). Kurz zusammengefasst wurden die Zellen in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie Behandlung mit Ultraschall lysiert. Das lösliche Protein wurde anschließend nach den Angaben des Herstellers an Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) gebunden und durch Thrombinverdau (Thrombin Cleavage Capture kit; EMD) eluiert. Das biotinylierte Thrombin wurde anschließend durch Streptavidin-Agarose-Perlen entfernt.

Affinitätsreinigung eines Antikörpers gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2

Mit der aufgereinigten Cargo-Bindedomäne von Myo2 wurden Kaninchen immunisiert (BioGenes, Berlin). Das auf diese Weise gewonnene Antiserum wurde dann affinitätsaufgereinigt. Dazu wurde aufgereinigte Myo2 Cargo-Bindedomäne nach den Angaben des Herstellers an CNBr aktivierte Sepharose gekoppelt (CNBr-Sepharose 4 Fast Flow; GE Healthcare), womit dann das Antiserum aufgereinigt wurde (Harlow und Lane, 1999).

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Sammelgele (10 x 150 x 1 mm) wurden mit 5% (w/v) Acrylamid, 0,033% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1% (v/v) N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED) hergestellt. Für die Herstellung der Trenngele (90 x 150 x 1 mm) wurde 16% (w/v) Acrylamid, 0,1% (w/v) Bisacrylamid, 385 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS und 0,035% (v/v) TEMED verwendet (Westermann et al., 2001). Bei einer konstanten Stromstärke von 15-20 mA je Gel erfolgte die Elektrophorese in einer senkrechten Laufkammer (Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System, BioRad, München) mit 1 x SDS-Laufpuffer (0,1% (w/v) SDS; 192 mM Glycin; 25 mM Tris).

Western-Blot

Um Proteine aus einer SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran (Hybond, Amersham Biosciences, Piscataway, USA) zu transferieren, wurde ein Western-Blot im *semidry*- oder Tankblot-Verfahren durchgeführt. Beim *semidry-blotting* Verfahren wurden 6 Filterpapiere (Whatman, Kent, UK) sowie die Membran mit Transferpuffer (11,26 g/l Glycin, 2,42 g/l Tris, 0,2 g/l SDS, 200 ml/l Methanol) getränkt und zwischen zwei Graphitelektroden arrangiert. Auf die Anode wurden 3 Whatman-Papiere, die Membran, das Gel und nochmals 3 Whatmanpapiere gelegt und von der Kathode bedeckt. Die Proteine wurden dann für 90 min bei 1,5 mA/cm² auf die Membran transferiert. Beim Tankblot-Verfahren wurden die Membran und 2 Whatman-Papiere in Transferpuffer (14,41 g/l Glycin, 3,028 g/l Tris, 200 ml/l Methanol) äquilibriert und in der Reihenfolge Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier in eine Kassette der Blotapparatur (Mini Trans-Blot Cell, BioRad, München) gelegt. Um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, wurde die Kassette im Transferpuffer zusammengebaut und dann in die Blotkammer gestellt, sodass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode zeigte. Geblottet wurde für 20-24 h bei 30 V, wobei die Kammer im Eisbad gekühlt wurde. Um die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Membran nach dem *semidry*- oder Tankblot-Verfahren 1 min in Ponceau-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA) gefärbt.

Immundetektion von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran

Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine durch polyklonale Antikörper nachgewiesen. Zuvor wurden unspezifische Bindestellen auf der Membran durch Schwenken in TBST-Puffer (8,76 g/l NaCl, 6,05 g/l Tris, 0,5 ml/l Tween 20) mit 5% (w/v)

Magermilchpulver für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wurde daraufhin dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit spezifischen, primären Antikörpern in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer für 10 min wurde die Membran in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver mit sekundärem Antikörper (1:10000) für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Beim sekundären Antikörper handelte es sich um einen gegen Kaninchen IgG gerichteten Antikörper, an den eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Danach wurde dreimal mit TBST-Puffer gewaschen, ehe die Membran 1 min mit ECL-Lösung inkubiert wurde. Die Lumineszenz wurde mittels einer ImageQuant LAS-4000 Geldokumentation (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) oder mittels Röntgenfilm (Fuji medical X-Ray Film, Fujifilm, Düsseldorf) durch eine Exposition für 10 sec bis 10 min analysiert.

Colloidal Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Für eine sehr sensitive Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen wurde colloidales Coomassie verwendet (Candiano et al., 2004). Die Gele wurden mit 0,08% (w/v) Coomassie Brilliant G-250 (Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst in 8% (NH₄)₂SO₄, 2% H₃PO₄, 20% (v/v) CH₃OH über mehrere Stunden gefärbt. Anschließend wurden die Gele mit H₂O entfärbt.

Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Falls eine hohe Sensitivität beim Färben von SDS-Polyacrylamidgelen erforderlich war, wurden die Proteine durch Silberfärbung mit einer Nachweisgrenze von etwa 1 ng sichtbar gemacht (Blum et al, 1987). Mit dem nachfolgenden Protokoll (Tab. 5) gelang es, eine kontrastreiche und hochsensitive Silberfärbung zu erzielen und zugleich den Hintergrund zu minimieren.

Tabelle 5) Protokoll zu Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

	Lösung	Dauer
Fixierung	50% (v/v) CH ₃ OH	20 min
	5% (v/v) CH ₃ COOH	
	50% (v/v) CH ₃ OH	10 min
	H ₂ O	10 min

Sensibilisierung	0,02% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃	1 min
	2 x H ₂ O	1 min
Silberreaktion	0,1% (w/v) AgNO ₃ 0,08% CH ₂ O (37%)	20 min
	2 x H ₂ O	1 min
Entwicklung	2% (w/v) Na ₂ CO ₃ 0,04% CH ₂ O (37%)	Bis zur gewünschten Färbung
Abstoppen	5% (v/v) CH ₃ COOH	10 min
	H ₂ O	10 min
Lagerung	10% Glycerin	

***In vitro* Bindeassay von aufgereinigter Myo2 Cargo-Bindedomäne an Mitochondrien**

Aus dem wildtypischen Stamm D273-10B wurden Mitochondrien gemäß 2.2.2 isoliert und für 5 min bei 4°C und 14000 x g (Eppendorf Centrifuge 5417R, Rotor F45-30-11, Eppendorf, Hamburg) pelletiert. Anschließend wurden je 100 µg Mitochondrien in je 100 µl Puffer P⁰ (150 mM KCl; 20 mM HEPES/KOH pH7,4; 0,6 M Sorbitol, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF), P^{SE} (P⁰ mit 1 M KCl) oder P^T (P⁰ ohne PMSF) resuspendiert. Zur Salzextraktion peripherer Membranproteine wurden die Mitochondrien in P⁰ (Kontrolle) oder P^{SE} 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die Proben, deren Mitochondrien mit Trypsin (Sigma, Taufkirchen) behandelt werden sollten, wurden 15 min auf Eis in P^T in Anwesenheit von 50 µg/ml bzw. 250 µg/ml Trypsin unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 200 µg/ml bzw. 1 mg/ml Trypsininhibitor aus Soja (Sigma, Taufkirchen) für 5 min auf Eis abgestoppt. Danach wurden die Proben mit P⁰ gewaschen und in 100 µl P⁰ aufgenommen. Nach Zugabe von jeweils 1 µg aufgereinigter Cargo-Bindedomäne von Myo2 wurden die Mitochondrien für 10 min bei 30°C inkubiert. Schließlich wurden die Proben zweimal mit P⁰ gewaschen, ehe sie in SDS-Probenpuffer resuspendiert wurden. Die Analyse erfolgte nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese über Western-Blot mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2.

GST-pulldown mit GST-Myo2(CBD) und isolierten Mitochondrien

Bei der Suche nach einem mitochondrialen Rezeptor von Myo2 wurde ein *GST-pulldown* durchgeführt. Bei der Aufreinigung der Cargo-Bindedomäne von Myo2 aus *E. coli* gibt es als Intermediat Sepharose-*beads* mit daran gebundener GST-Myo2(CBD). Ein Aliquot dieser *beads* wurde dreimal in Puffer I (300 mM KCl, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) gewaschen. Parallel dazu wurde 1 mg isolierte Mitochondrien aus dem Stamm D273-10B für 5 min bei 4°C und 14000 x g (Eppendorf Centrifuge 5417R, Rotor F45-30-11, Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert, für 30 min in Puffer II (0,5% Triton X-100, 100 mM KCl, 5 mM EDTA, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) lysiert und mit Puffer III (20 mM Hepes KOH pH 7,4, 100 mM KCl, 1mM PMSF, 1 mM EDTA) auf 1 ml aufgefüllt. Die gewaschenen Sepharose-*beads* mit daran gebundener GST-Myo2(CBD) wurden zugegeben und für 1 h bei 4°C unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Die Proben wurden anschließend dreimal mit Puffer III gewaschen und über SDS-PAGE analysiert (Abb.32A). Falls sich nach dem letzten Waschen noch ein Thrombinverdau der Thrombin Spaltstelle zwischen GST und der Myo2(CBD) nach Angaben des Herstellers (Thrombin Cleavage Capture kit; EMD) anschloss, wurde Puffer III ohne PMSF verwendet. Zudem wurden für den *pulldown* 5 mg isolierte Mitochondrien des Stammes D273-10B eingesetzt und Puffer I, II und III ohne EDTA, ohne KCl und mit 2,5 mM CaCl₂ verwendet (Abb. 32B). Nach Analyse der Colloidal Coomassie- oder Silber-gefärbten SDS-Gele wurden interessante Banden ausgeschnitten und über Massenspektrometrie (Heike Bauerschmitt, LMU München) identifiziert.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Arp2/3-Komplex-abhängigen Aktinpolymerisation auf den Transport von Mitochondrien

Der Arp2/3-Komplex wurde erstmals als Aktinnukleator in *Acanthamoeba* identifiziert und seine Rolle bei der Internalisation während der Endozytose aufgedeckt (Machesky et al., 1994; Moreau et al., 1997). Kurz darauf wurde entdeckt, dass sich das pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* der Kontrolle des wirtseigenen Arp2/3-Komplexes bemächtigt und durch Aktinpolymerisation an der Bakterienoberfläche intrazellulär fortbewegt (Welch et al., 1997). Da Komponenten des Arp2/3-Komplexes auf isolierten Hefemitochondrien nachgewiesen werden konnten, wurde ein ähnlicher Transportmechanismus für Mitochondrien in *S. cerevisiae* vorgeschlagen (Boldogh et al., 2001a). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Aktinpolymerisation durch den Arp2/3-Komplex der Hauptmechanismus des mitochondrialen Transportes ist.

Arc40 stellt eine essentielle Komponente des Arp2/3-Komplexes dar, weshalb die Untersuchung des Phänotyps von *arc40Δ* in haploiden Hefen nicht möglich ist. Allerdings existiert ein temperatursensitives Allel von *ARC40* an dessen endogenem Locus, sodass der Effekt einer Depletion von funktionellem Arc40 und damit einer Reduktion der Aktivität des Arp2/3-Komplexes untersucht werden konnte. Daneben verfügte der *arc40^{ts}* Stamm noch über eine sogenannte *magic marker* Kassetten, mit deren Hilfe die Bibliothek der temperatursensitiven Allele essentieller Gene hergestellt wurde (Ben-Aroya et al., 2008). Um die Analyse zu erleichtern, wurde ein Stamm verwendet, bei dem die *magic marker* Kassetten über Kreuzung entfernt wurde. Dies ermöglichte die Anwendung bestehender Plasmide zur Analyse von Mitochondrien. Zudem verfügt dieser Stamm über chromosomal deletiertes und zugleich plasmidkodiertes *MYO2*¹. Da sich die Ausprägung konditionaler Mutationen unter leicht veränderten Bedingungen mitunter gravierend unterscheidet, wurde die Funktionalität des *arc40^{ts}* Allels im Tüpfeltest überprüft. Während sich bei Inkubation bei 25°C kein Unterschied im Wachstum zwischen dem Wildtyp und der *arc40^{ts}* Mutante feststellen lässt, ist das Wachstum bei 30°C bereits leicht reduziert, und bei 37°C ist die Mutation letal (Abb. 6A). Darüber hinaus wurde der Einfluss des *arc40^{ts}* Allels auf das Aktinzytoskelett bei induktiver Temperatur fluoreszenzmikroskopisch durch Färbung mit Rhodamin-Phalloidin untersucht. Dabei

¹ Herstellung von Sabrina Schmid im Rahmen ihrer Bachelorarbeit

bindet Phalloidin, das Gift des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, hoch affin an F-Aktin und verhindert die Depolymerisierung des Filaments am *pointed-end*. Um das F-Aktin fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, ist an das Alkaloid der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin gekoppelt.

Bei 25°C gibt es nur bei wenigen Zellen Unterschiede im Aktinzytoskelett zwischen Wildtyp und der *arc40^{ts}* Mutante. Nach Veränderung der Inkubationstemperatur auf 37°C nimmt im Wildtyp der Anteil an Zellen mit schwachen Veränderungen des Aktinzytoskeletts zu. Die *arc40^{ts}* Mutation führt allerdings zu einer gravierenden Störung des Aktinzytoskeletts und nach zwei Stunden bei 37°C wird in 47%, nach drei Stunden bei 37°C in 86% der Zellen der Knospencortex mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt (Abb. 6B). Das Fehlen von Aktinpatches und die Färbung des Knospencortex deuten auf eine Störung der Endozytose hin, die auf funktionalen Arp2/3-Komplex angewiesen ist (Moreau et al., 1997). Daher wurde die endozytotische Aufnahme des nicht membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoffes Luzifer Yellow bei induktiver Temperatur untersucht. Bei 25°C lässt sich bei der *arc40^{ts}* Mutante nur ein schwacher Defekt der Endozytose beobachten, wohingegen nach drei Stunden Inkubation bei 37°C lediglich 26% der Zellen von *arc40^{ts}* im Vergleich zu 91% der wildtypischen Zellen Luzifer Yellow in die Zelle aufnehmen und in die Vakuole transportieren konnten (Abb. 6C). Diese Versuchsergebnisse legen den Schluss nahe, dass sowohl die Organisation des Aktinzytoskeletts als auch die Endozytoseaktivität in diesem Stamm bereits nach zwei Stunden und besonders stark nach drei Stunden in Mitleidenschaft gezogen ist. Dies deutet darauf hin, dass das *arc40^{ts}* Allel effektiv zu einer Depletion von funktionalem Arc40 führt, da der Arp2/3-Komplex seine zellulären Aufgaben nicht mehr übernehmen kann.

Wenn nun der Arp2/3-Komplex entscheidend an der anterograden Bewegung der Mitochondrien beteiligt ist (Fehrenbacher et al., 2004), so wäre zu erwarten, dass man nach Inkubation bei nichtpermissiver Temperatur einen deutlichen Unterschied im Bewegungsmuster zwischen dem Wildtyp und der *arc40^{ts}* Mutante erkennen müsste. Um dies zu überprüfen, wurden zeitaufgelöste 3D-Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt, wobei die Zellen in einer Durchflusskammer inkubiert wurden. In dieser Kammer werden die Zellen in einer optischen Ebene fixiert und konstant mit frischem Medium umspült, sodass die Zellen über einen längeren Zeitraum untersucht werden können. Zudem kann die Temperatur in der Inkubationskammer des Mikroskopes reguliert werden, sodass eine Inkubation bei 25°C sowie 37°C möglich ist. Die *arc40^{ts}* Mutante wurde in der

Durchflusskammer inkubiert, wobei die Mitochondrien über plasmidal kodiertes mitochondriales GFP (*mtGFP*) sichtbar gemacht werden konnten.

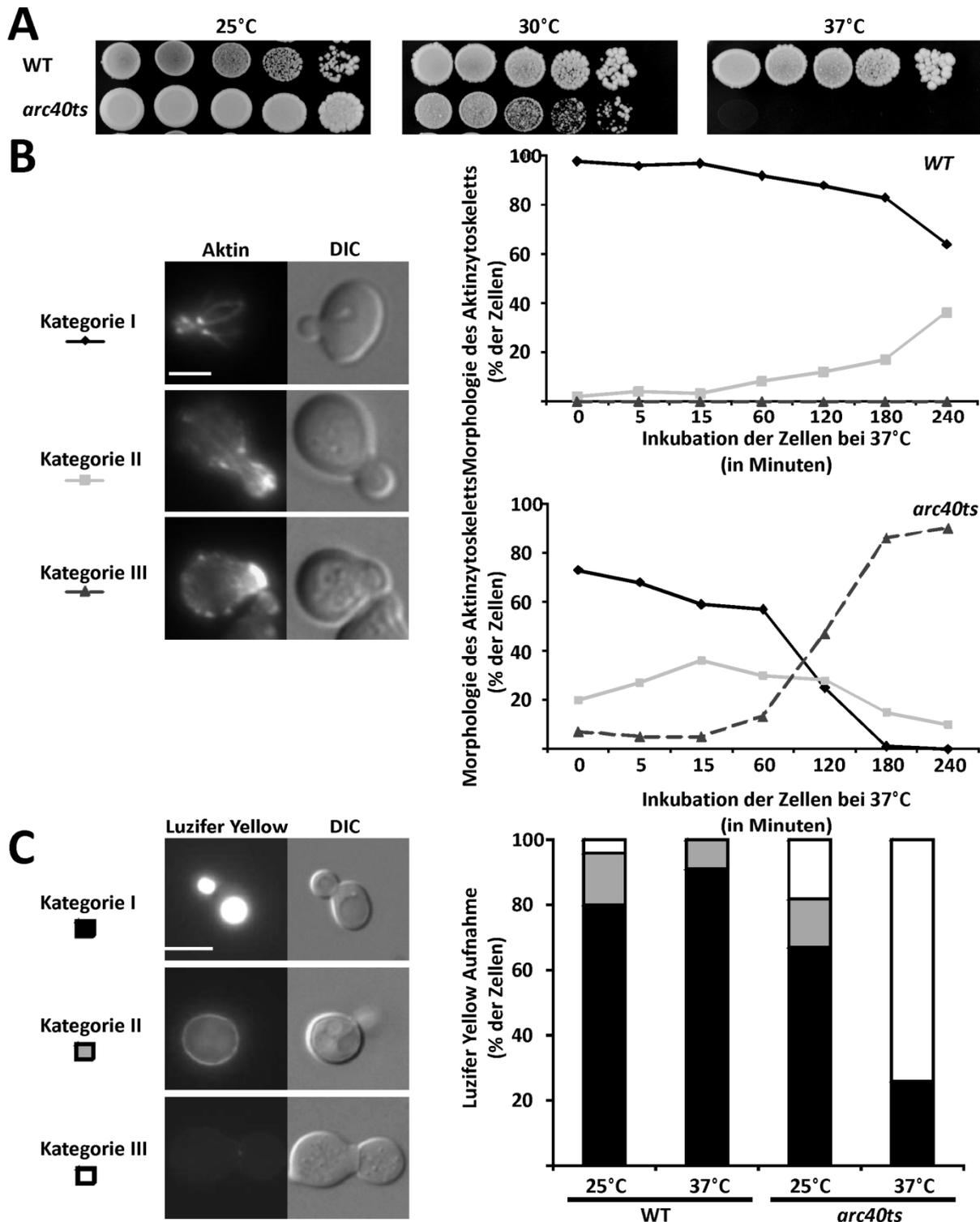


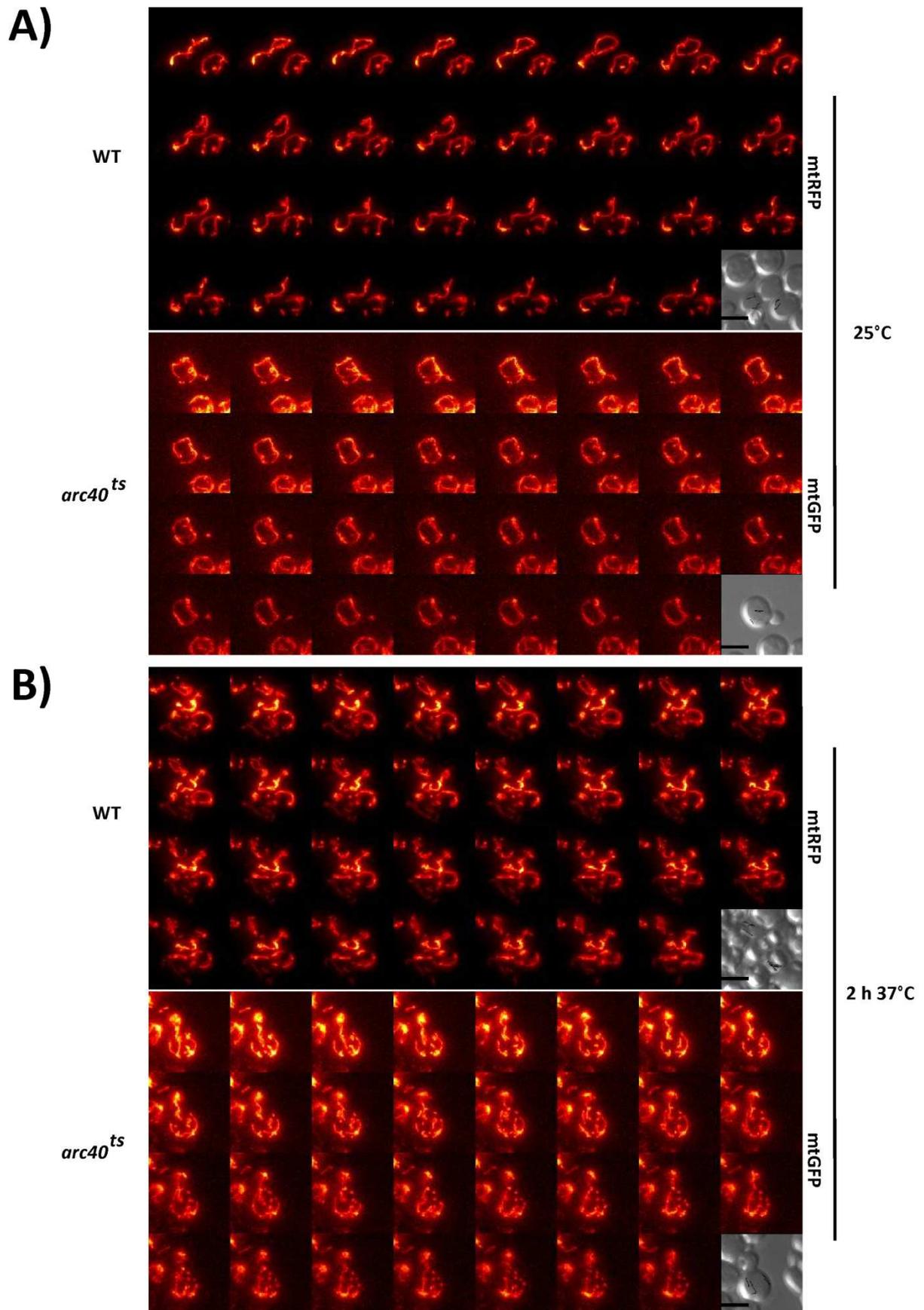
Abbildung 6) Einfluss der *arc40^{ts}* Mutation auf das Wachstum, das Aktinzytoskelett und die Fähigkeit zur Endozytose.
A) Eine serielle 10-fache Verdünnungsreihe von Zellen des WT und der *arc40^{ts}* Mutante wurde auf YPD-Platten getüpfelt

und drei Tage bei 25°C (links), 30°C (Mitte) oder 37°C (rechts) inkubiert. **B)** Zellen des WT und der *arc40^{ts}* Mutante wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C in YPD angezogen. Danach wurde die Inkubationstemperatur auf 37°C erhöht und zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Aktinzytoskelett mittels Rhodamin-Phalloidin gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Links: In polarisiert wachsenden Zellen akkumulieren Aktinpatches in der Knospe oder am Knospenhals und Aktinkabel durchziehen die Zelle von der Knospe bis in die Mutterzelle. Zellen mit diesem Phänotyp wurden der wildtypischen Kategorie I zugerechnet und Kategorie II bezeichnet Zellen mit schwachen Veränderungen des Aktinzytoskeletts dergestalt, dass die Aktinpatches vermehrt über die gesamte Zelle verteilt sind. Mit Kategorie III werden schwerwiegende Veränderungen der Morphologie des Aktinzytoskeletts beschrieben. Veränderungen bei den Aktinkabeln lassen sich nicht beobachten, allerdings wird im Gegensatz zu distinkten Aktinpatches großflächig der Knospencortex mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt. Größenstandard: 5 µm. Rechts: Es wurden zu jedem Zeitpunkt 100 Zellen des WT (oben) und der *arc40^{ts}* Mutante quantifiziert. **C)** Zellen des WT und der *arc40^{ts}* Mutante wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD bei 25°C angezogen und für drei Stunden bei 25°C oder 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Fähigkeit zur Aufnahme von Luzifer Yellow fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Links: neben der Aufnahme des Farbstoffes in die Vakuole (Kategorie I) können auch eine Anlagerung an die Plasmamembran oder die Zellwand (Kategorie II) sowie Zellen ohne Luzifer Yellow Färbung (Kategorie III) beobachtet werden. Größenstandard: 5 µm. Rechts: Es wurden jeweils 100 Zellen bei 25°C und 37°C ausgezählt.

Als interne Kontrolle wurde ein wildtypischer Stamm verwendet, der als Fluorophor plasmidal kodiertes mitochondriales RFP (*mtRFP*) exprimiert. Bei 25°C konnten sowohl bei der Morphologie als auch bei der Bewegung der Mitochondrien keine Unterschiede festgestellt werden zwischen dem Wildtyp und der *arc40^{ts}* Mutante (Abb. 7A).

Daraufhin wurde die Inkubationskammer auf 37°C aufgeheizt und es wurden erneut zeitaufgelöste Aufnahmen angefertigt. Nach zwei Stunden bei nichtpermissiver Temperatur konnten bei der Endozytoseaktivität und der Morphologie des Aktinzytoskeletts beim *arc40^{ts}* Allel schon deutliche Unterschiede festgestellt werden im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 6B, C). Allerdings konnte kein Transportdefekt von Mitochondrien in die Knospe beobachtet werden und auch die Morphologie war vergleichbar dem Wildtyp mit einem tubulären Netzwerk (Abb. 7B, C). In vorherigen Experimenten war nach drei Stunden bei 37°C das Aktinzytoskelett in 86% der Zellen und die Fähigkeit zur Endozytose in 74% der Zellen stark in Mitleidenschaft gezogen (6B, C). Auch bei der Morphologie der Mitochondrien konnten erste Veränderungen beobachtet werden und das tubuläre Netzwerk wies vermehrt fragmentierte oder aggregierte Bereiche auf. Allerdings konnte auch nach drei Stunden kein Transportdefekt in die Knospe beobachtet werden. Zudem konnten sowohl nach 2 als auch nach 3,5 Stunden Zellen von *arc40^{ts}* beobachtet werden, deren Mitochondrien anterograd transportiert wurden (Abb. 7; Film 1-6).

Diese Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass die Effekte der *arc40^{ts}* Mutation auf den Transport sowie die Morphologie des tubulären Netzwerkes der Mitochondrien indirekt durch Beeinflussung des Aktinzytoskeletts ausgelöst werden und nicht durch direkte Unterbindung des anterograden Transportes der Mitochondrien.



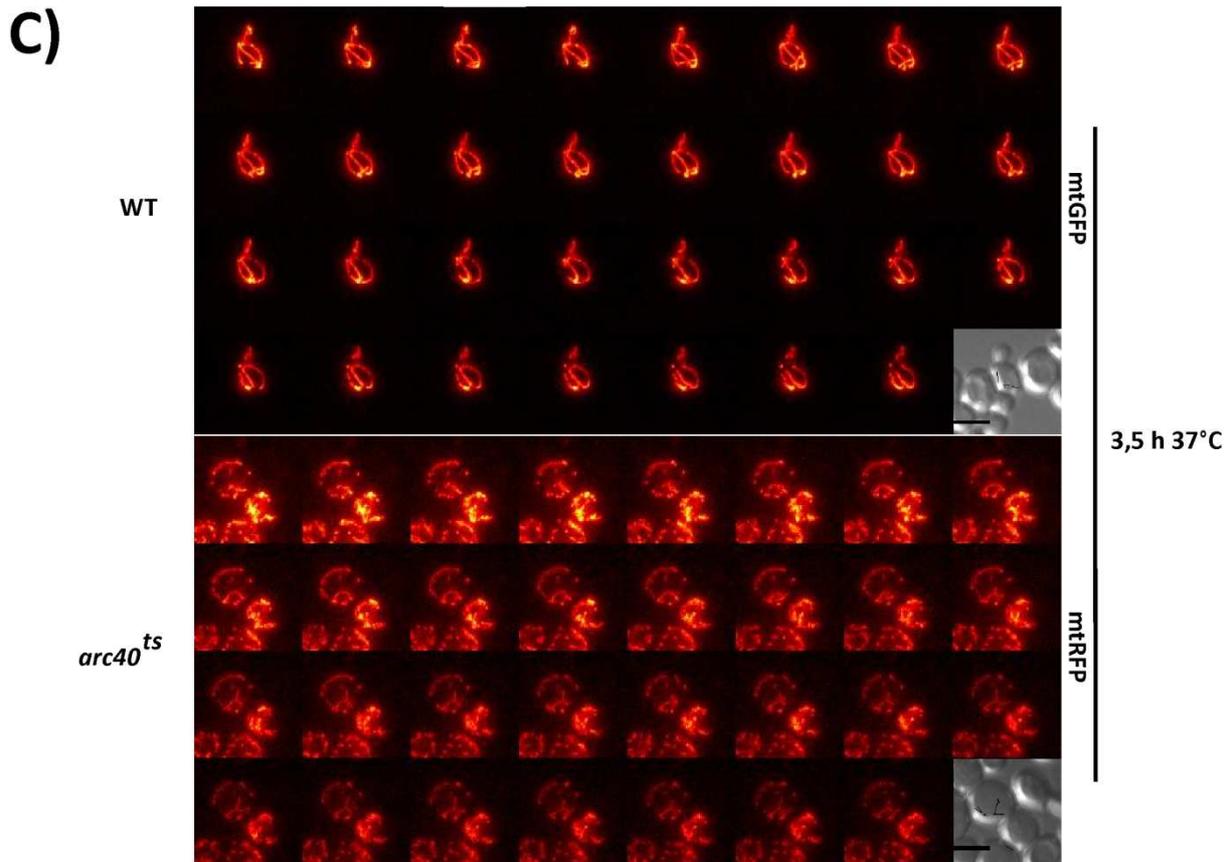


Abbildung 7) Mitochondriale Bewegungen im WT und der *arc40^{ts}* Mutante bei permissiver (A) und nichtpermissiver (B-C) Temperatur. Zellen des WT und der *arc40^{ts}* Mutante wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium bei 25°C inkubiert. Daraufhin wurden beide Stämme in einer Durchflusskammer zu einer Kokultur vereinigt, wobei im WT mtRFP und in der *arc40^{ts}* Mutante *mtGFP* exprimiert wurde. Die mitochondrialen Bewegungen wurden mittels zeitaufgelöster 3D-Fluoreszenzmikroskopie bei 25°C (A) und nach 2 h (B) oder 3,5 h (C) bei 37°C analysiert. Dabei wurden über einen Zeitraum von 10 min alle 20 s z-Stapel der *mtGFP*- und *mtRFP*-exprimierenden Zellen aufgenommen und durch Ausschneiden und Projektion der maximalen Intensität bearbeitet. In den DIC Bildern sind die Spuren der mitochondrialen tracks markiert. Die Filme 1-6 sind von denselben Zellen. Größenstandard: 5 µm.

3.2 Mutationen in der Cargo-Bindedomäne von Myo2 beeinflussen den Transport und die Morphologie von Mitochondrien

Die C-terminale Cargo-Bindedomäne von Myo2 umfasst 15 amphipathische α -Helices, deren Kristallstruktur aufgeklärt werden konnte (Pashkova et al., 2006). Zudem lässt sich die globuläre Cargo-Bindedomäne in zwei Subdomänen unterteilen, welche funktionell unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Subdomäne II setzt sich aus den AS 1310–1527 zusammen und beinhaltet Bindestellen für den Transport von Vesikeln und Peroxisomen. Subdomäne I besteht aus den AS 1131–1309 und 1528–1574 und interagiert mit Vakuolen (Catlett et al., 2000; Pashkova et al., 2005b; Pashkova et al., 2006; Fagarasanu et al., 2009). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Allele

myo2(Q1233R) sowie *myo2(L1301P)* neben einem Transportdefekt der Vakuolen auch zu veränderter Morphologie und einer Beeinträchtigung der Vererbung von Mitochondrien führen (Altmann et al., 2008). Um die mitochondriale Bindestelle von Myo2 genauer zu charakterisieren, wurden mehrere Punktmutanten in der Nachbarschaft von AS 1233 sowie AS 1301 hergestellt: *myo2(L1229A)*, *myo2(T1230A)*, *myo2(K1234A)*, *myo2(V1235A)*, *myo2(V1236A)*, *myo2(T1237A)*, *myo2(E1293A)*, *myo2(Y1303A)*, *myo2(I1308A)*, und *myo2(P1529S)*² (Abb. 8). Darüber hinaus wurden die Allele *myo2(G1248D)*, *myo2(D1297N)*, *myo2(D1297G)*, *myo2(N1304S)*, und *myo2(N1304D)* untersucht, welche bereits im Hinblick auf den Transport von Vakuolen untersucht worden waren (Catlett und Weisman, 1998; Catlett et al., 2000). Als Kontrolle wurden mit *myo2(K1538A)* und *myo2(F1542A)*² zudem zwei Aminosäurereste gegen Alanin ausgetauscht, welche auf der gegenüberliegenden Seite der Subdomäne I zu finden sind (Abb. 8).

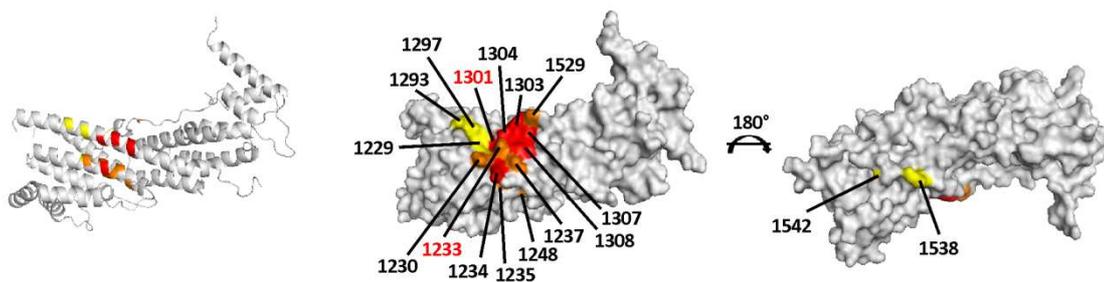


Abbildung 8) Mutationen in der proximalen Hälfte der Cargo-Bindedomäne von Myo2. Bänder- (links) und Oberflächen- (Mitte und rechts) Diagramme der Cargo-Bindedomäne von Myo2 wurden mit der PyMOL Software (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3; Schrödinger) hergestellt. Die Lokalisation der mutierten Aminosäuren ist angegeben, wobei die Aminosäurereste L1301 und Q1233, die im Allel *myo2(LQ)* mutiert vorliegen, in rot hervorgehoben sind. V1236 ist nicht angegeben, da der Aminosäurerest im Inneren der Domäne verborgen ist. Rot, >20% der Knospen sind ohne Mitochondrien; orange, 10-20% der Knospen sind ohne Mitochondrien; gelb, in weniger als 10% der Knospen fehlen Mitochondrien (Förtsch et al., 2011).

Die meisten Stämme zeigten keinen Wachstumsdefekt auf einer fermentierbaren oder nichtfermentierbaren Kohlenstoffquelle. Das Allel *myo2(K1234A)* allerdings zeigte einen starken Wachstumsdefekt auf beiden Kohlenstoffquellen. Dies lässt darauf schließen, dass die Funktion der Cargo-Bindedomäne durch diesen Aminosäureaustausch gravierend beeinträchtigt ist (Abb.9).

² Herstellung von Melanie Krist im Rahmen ihrer Diplomarbeit

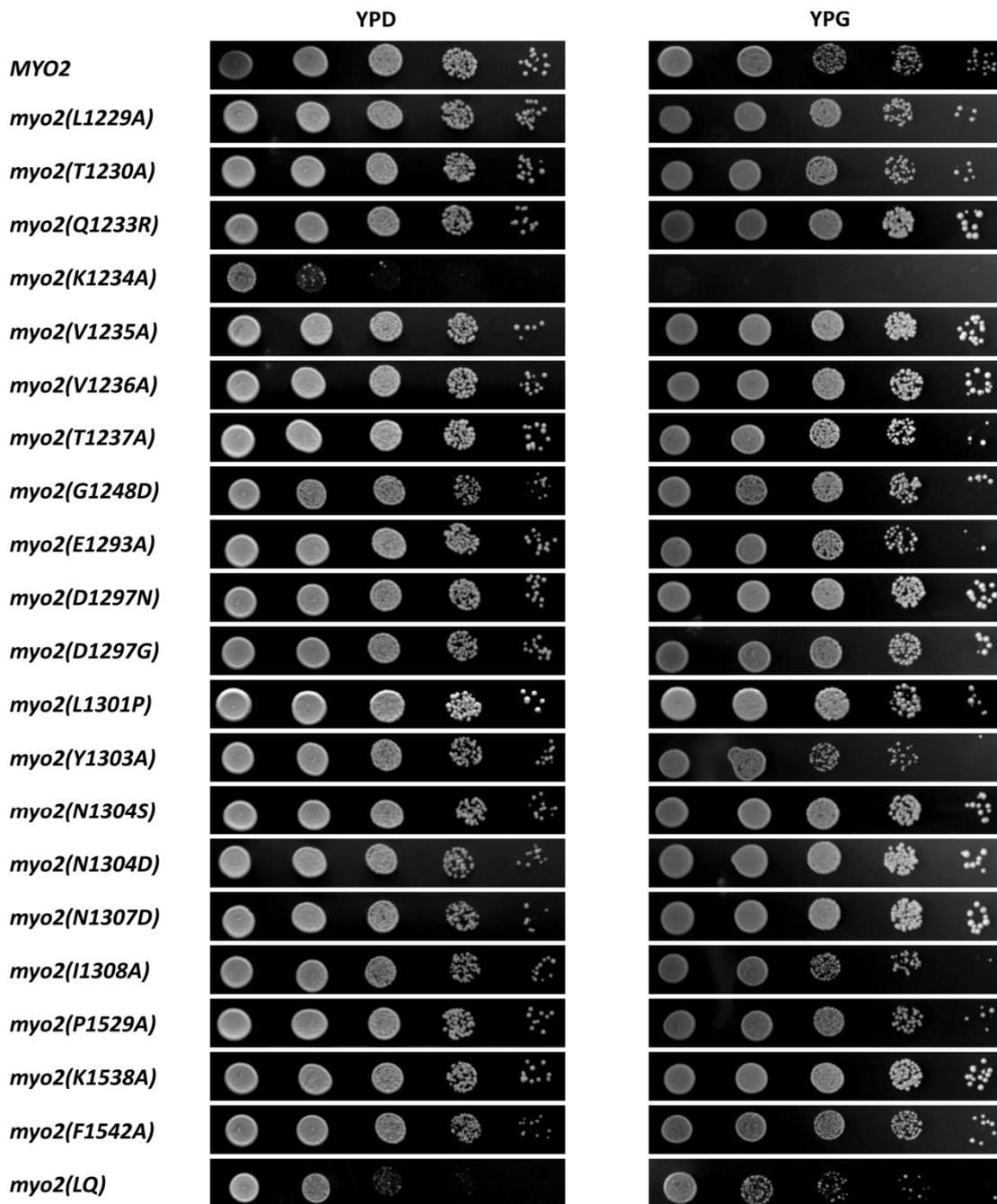


Abbildung 9) Wachstumsvorläufe der *myo2* Mutanten (in Zusammenarbeit mit Melanie Krist). Vom WT (*MYO2*) und den *myo2* Mutanten wurden serielle 10-fache Verdünnungen auf YPD- oder YPG-Platten getüpfelt und drei Tage bei 30°C inkubiert. Bei der Mutante *myo2(LQ)* wurden die beiden Allele *myo2(L1301P)* und *myo2(Q1233R)* zu einer Zweifachmutante vereint (Förtsch et al., 2011).

Die verschiedenen Allele von *myo2* wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie im Hinblick auf die Morphologie und Verteilung der Mitochondrien mit mtGFP als Fluorophor untersucht. Zudem wurden die Versuche bei 30°C und 37°C durchgeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Versuchsergebnissen früherer Untersuchungen (Altmann et al., 2008) zu ermöglichen.

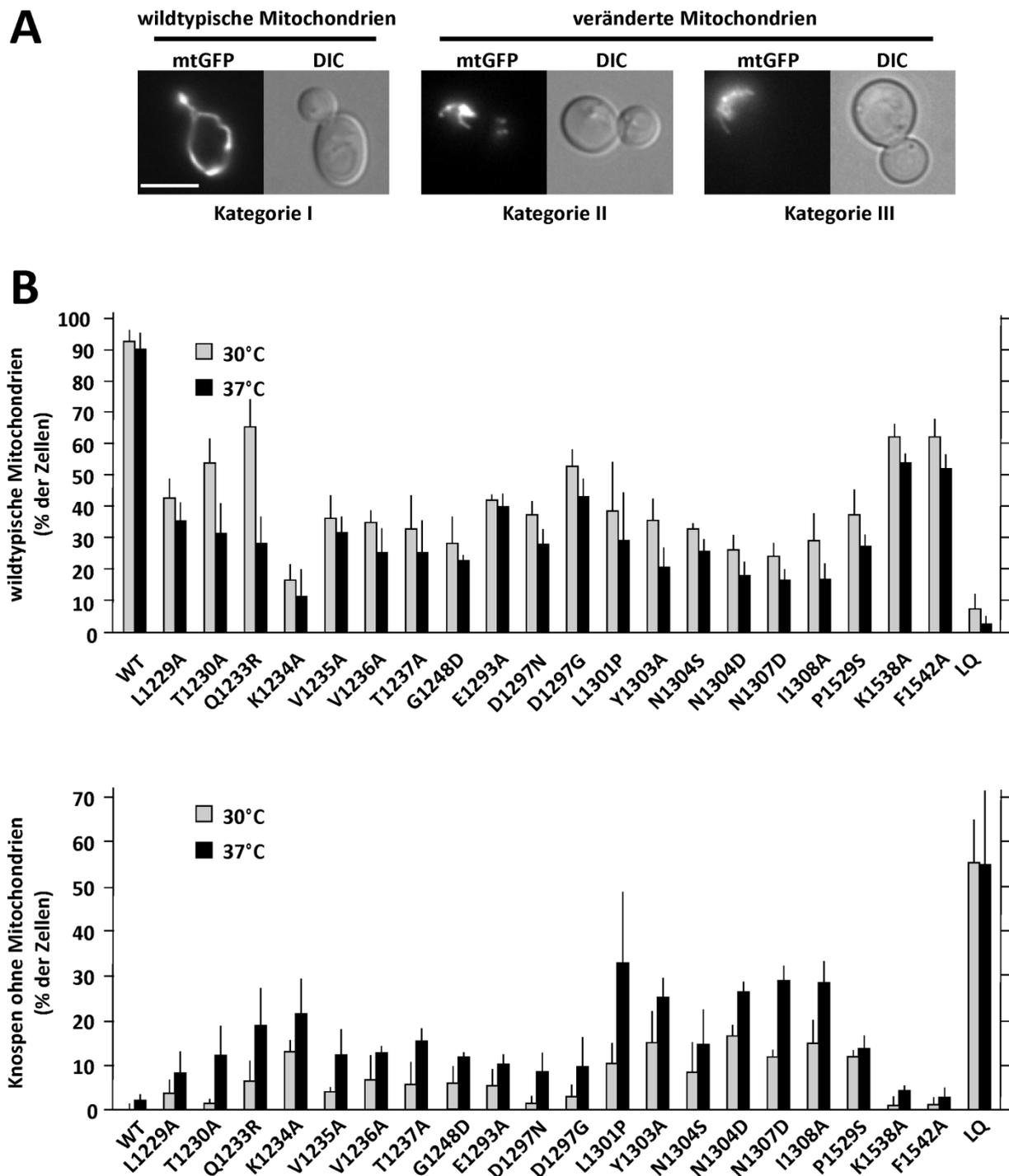


Abbildung 10) Mutationen in der proximalen Hälfte der Myo2 Cargo-Bindedomäne führen zu einem Morphologie- und Transportdefekt von Mitochondrien (in Zusammenarbeit mit Melanie Krist). A) Einteilung der Morphologie von Mitochondrien in Kategorien. Die mitochondriale Morphologie wurde fluoreszenzmikroskopisch in *mtGFP*-exprimierenden Zellen ermittelt. Kategorie I umfasst Zellen mit wildtypischer mitochondrialer Morphologie. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass sich das tubuläre Netzwerk gleichmäßig über die gesamte Zelle bis in die Knospe erstreckt. In Kategorie II wurden Zellen zusammengefasst, welche eine leicht veränderte mitochondriale Morphologie aufwiesen. So ließen sich Zellen mit partiell aggregierten, stellenweise verdickten oder fragmentierten Mitochondrien beobachten. Mit Kategorie III werden Zellen beschrieben, in denen die Mitochondrien am gegenüberliegenden Pol der Knospe akkumulieren.

Größenstandard: 5 µm. **B)** Quantifizierung des mitochondrialen Transport- und Morphologiedefektes. Die Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium angezogen und für drei Stunden bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Es wurden die mitochondriale Morphologie (oben) und Knospen ohne Mitochondrien (unten) bei Raumtemperatur mittels Fluoreszenzmikroskopie in *mtGFP*-exprimierenden Zellen ausgezählt. Bei der LQ-Mutante wurden die beiden Allele *myo2(L1301P)* und *myo2(Q1233R)* zu einer Zweifachmutante vereint. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen (n=100) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder (Förtsch et al., 2011).

Um eine phänotypische Quantifizierung der Morphologie zu ermöglichen, wurden drei Kategorien festgelegt. So werden in Kategorie I Zellen mit wildtypischer, tubulärer Morphologie der Mitochondrien und in Kategorie II Zellen mit leicht veränderter mitochondrialer Morphologie zusammengefasst. Kategorie III beschreibt eine starke Veränderung der Morphologie, bei der die Mitochondrien gegenüber der Knospe akkumulieren (Abb. 10A). Zudem wurde der mitochondriale Vererbungsdefekt der einzelnen Punktmutanten ausgewertet, indem der prozentuale Anteil von Knospen ohne Mitochondrien quantifiziert wurde. Alle Mutanten wiesen eine signifikante Anzahl von Zellen mit veränderter mitochondrialer Morphologie und/oder einem Vererbungsdefekt in die Knospe auf. Den stärksten Effekt hatten Veränderungen der Aminosäuren in der direkten Umgebung von 1233 sowie 1301, deutlich schwächer wirkten sich Veränderungen von Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Seite, in Subdomäne II, aus (Abb. 10B,C). Daraus wird geschlossen, dass die Region um die Aminosäuren 1233 und 1301 der Subdomäne I von Myo2 essentiell ist für den anterograden Transport von Mitochondrien.

In dieser Region liegen auch die Aminosäuren 1297, 1301, 1304, und 1307, welche eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Vakuolen und damit deren Transport spielen. Um den Effekt der neueingeführten Allele auf die Vererbung der Vakuolen zu untersuchen, wurden Zellen mit *CellTracker Blue CMAC* (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. Fluoreszenzmikroskopisch wurde dann der prozentuale Anteil von Knospen ohne Vakuole quantifiziert, wobei ähnliche Effekte wie für den mitochondrialen Transport beobachtet werden konnten (Tab. 6). Somit überlappen die Regionen, die für den vakuolären und mitochondrialen Transport von Bedeutung sind.

Tabelle 6) Vererbungsdefekt von Vakuolen und Mitochondrien in den *myo2* Mutanten (in Zusammenarbeit mit Melanie Krist). Die Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium angezogen und für drei Stunden bei der angegebenen Temperatur inkubiert. In *mtGFP*-exprimierenden Zellen wurden Knospen ohne Mitochondrien und in Zellen, die mit *CellTracker Blue CMAC* gefärbt wurden, Knospen ohne Vakuolen quantifiziert. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten (n=100) unter Angabe der Standardabweichung (Förtsch et al., 2011).

Vererbungsdefekt der Organellen				
(% der Zellen ohne Mitochondrien oder Vakuole in der Knospe)				
Stamm	30°C		37°C	
	Mitochondrien	Vakuole	Mitochondrien	Vakuole
Wildtyp	0±0.5	3±1.5	2±1.3	5±2.4
<i>myo2 (L1229A)</i>	4±2.8	3±1.6	8±4.7	7±1.6
<i>myo2 (T1230A)</i>	1±1	1±1.6	12±6.4	5±2.2
<i>myo2 (Q1233R)</i>	7±4.1	37±0.7	18±8.6	41±13.5
<i>myo2 (K1234A)</i>	13±3.2	55±9.0	22±7.7	44±4.3
<i>myo2 (V1235A)</i>	4±1.5	4±4.5	12±5.6	7±1.0
<i>myo2 (V1236A)</i>	7±5.7	3±1.8	13±1.2	5±2.7
<i>myo2 (T1237A)</i>	6±5	2±0.7	15±2.9	7±3.2
<i>myo2 (E1293A)</i>	5±3.8	2±2.6	10±2.3	4±3.3
<i>myo2 (L1301P)</i>	10±4.9	56±3.8	33±16.2	55±8.6
<i>myo2 (Y1303A)</i>	15±7	23±3.8	25±4.5	40±11.6
<i>myo2 (I1308A)</i>	15±5	8±3.6	29±4.7	14±4.4
<i>myo2 (P1529S)</i>	12±1.1	1±1.3	14±2.7	14±4.0
<i>myo2 (K1538A)</i>	1±1.7	3±1.3	4±0.7	7±6.6
<i>myo2 (F1542A)</i>	1±0.8	5±4.6	3±2	8±0.8
<i>myo2 (LQ)</i>	56±9.5	42±14.9	55±16.2	42±16.6
	>20%	>10%	>5%	<5%

Daraufhin wurden die beiden starken Mutationen *myo2(Q1233R)* und *myo2(L1301P)* in einer Zweifachmutante vereint, wobei die *myo2(LQ)*³ Mutante die Morphologie sowie die Vererbung von Mitochondrien gravierender beeinflusst als die jeweilige Einzelmutante. Neben einem schwachen Wachstumsdefekt (Abb.9) hatten mehr als 90% der Zellen eine veränderte mitochondriale Morphologie und etwa 50% der Zellen besaßen Knospen ohne Mitochondrien (Abb. 10B). Da Mitochondrien in *S. cerevisiae* entlang von Aktinkabeln transportiert werden, könnten Veränderungen in der Aktinstruktur zu einem mitochondrialen Vererbungsdefekt führen. Eine Aktinfärbung mit Rhodamin-Phalloidin ließ bei der *myo2(LQ)* Mutante jedoch keine Unterschiede zum Wildtyp erkennen. Dies spricht dafür, dass Transport entlang von Aktinkabeln prinzipiell möglich ist (Abb. 11A). Der Effekt auf die Vererbung von Mitochondrien könnte neben reduzierter Cargo-Bindung auch durch eine reduzierte Proteinstabilität des Myo2 Motors erklärt werden. Um zu überprüfen, ob die Mutationen in *MYO2* Einfluss auf das steady-state Level des Motorproteins haben, wurde Myo2 im Zellextrakt geblottet. Dabei konnte kein unterschiedliches Proteinlevel bei Stämmen mit *MYO2*, *myo2(Q1233R)*, *myo2(L1301P)*, und *myo2(LQ)* festgestellt werden (11B; Förtsch et al., 2011).

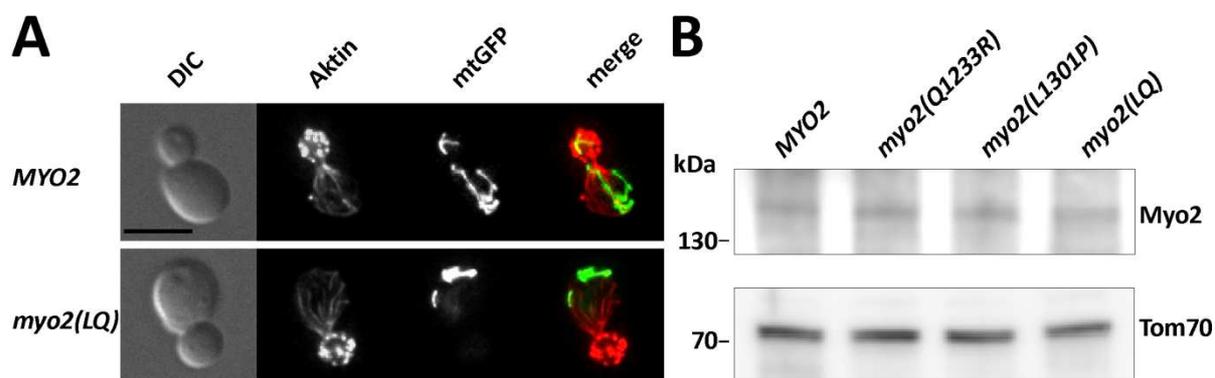


Abbildung 11) Die Zweifachmutante *myo2(LQ)* und das Expressionsniveau von Myo2 Mutanten. A) Zellen des WT (*MYO2*) und von *myo2(LQ)*, die *mtGFP* exprimierten, wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD angezogen. Anschließend wurden die Zellen fixiert und es wurde das Aktinzytoskelett mittels Rhodamin-Phalloidin gefärbt. (Rechts) Überlagerung der Rhodamin-Phalloidin und GFP Fluoreszenz. Die Fluoreszenzbilder sind Projektionen der maximalen Intensität von z-Stapeln bestehend aus 20 Ebenen. Zudem wurden die Bilder mittels Dekonvolution bearbeitet. Größenstandard: 5 μ m. **B)** Zellextrakte von Zellen mit WT *MYO2*, *myo2(Q1233R)*, *myo2(L1301P)* und *myo2(LQ)* wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2 untersucht. Als Ladekontrolle diente mit Tom70 ein Protein der mitochondrialen Außenmembran (Förtsch et al., 2011).

³ Herstellung von Melanie Krist im Rahmen ihrer Diplomarbeit

3.3 Verankerung von Myo2 in der mitochondrialen Außenmembran

Der Transport von Mitochondrien in *S. cerevisiae* befindet sich im Gleichgewicht zwischen anterogradem und retrogradem Transport. Das dynamische Gleichgewicht scheint in *myo2* Mutanten, in denen die Mitochondrien gegenüber der Knospe akkumulieren, zum retrograden Transport hin verschoben zu sein. Diese Beobachtung ließe sich durch beide Modelle für die Rolle des Motorproteins Myo2 bei der mitochondrialen Vererbung erklären. So bedingen nach dem Motormodell Veränderungen in der Cargo-Bindedomäne eine Beeinträchtigung der anterograden Bewegung. Ausgelöst wird dies durch eine abgeschwächte Bindung von Myo2 an Mitochondrien. Das zweite Modell wiederum besagt, dass die Mutationen in *MYO2* dazu führen, dass der Transport von mitochondrialen Retentionsfaktoren durch Myo2 behindert wird und damit die Häufigkeit von retrograden Bewegungen zunimmt.

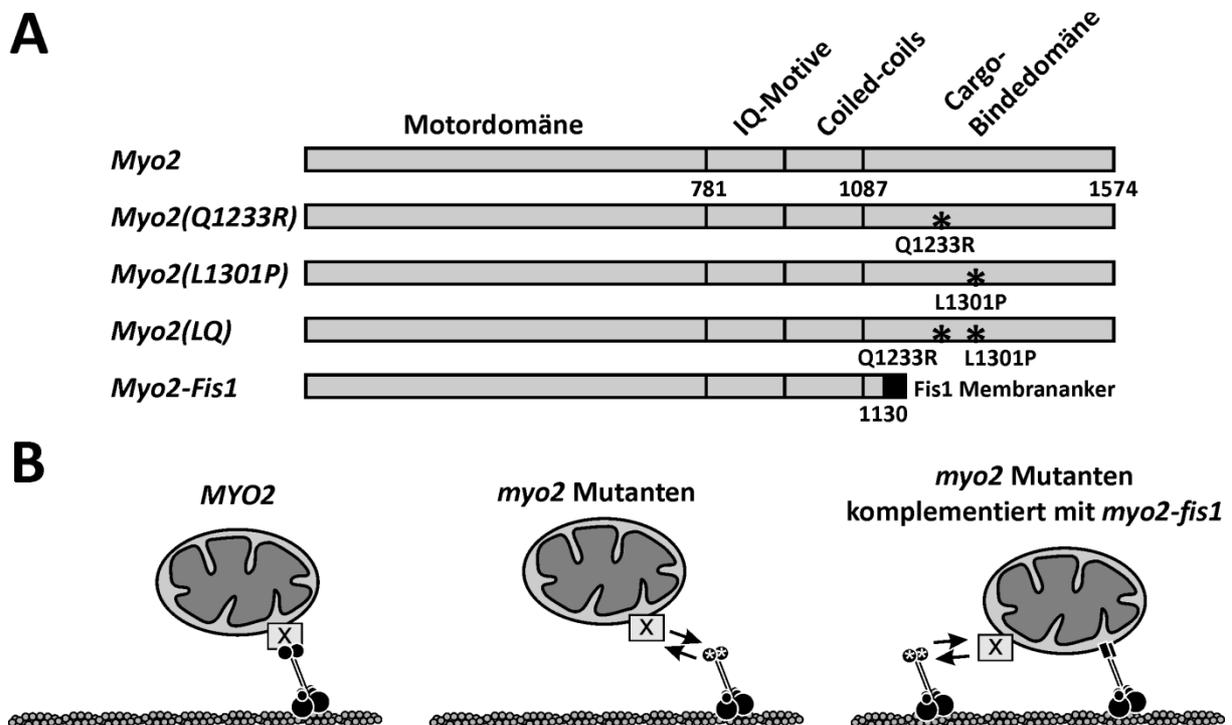


Abbildung 12) Verankerung des Myo2 Motorproteins auf der mitochondrialen Oberfläche. A) Domänenstruktur des wildtypischen und mutanter Myo2 Proteine. Die Zahlen stehen für Aminosäurereste und die Sterne für Mutationen. **B)** Modell für die erwartete Bindung der Varianten von Myo2 an Mitochondrien. Es wird angenommen, dass Myo2 über einen noch nicht identifizierten Rezeptor (x) an die mitochondriale Oberfläche bindet (links). Mutationen (Sterne) in der Cargo-Bindedomäne von Myo2 schwächen vermutlich die Bindung von Myo2 an Mitochondrien (Mitte). Durch den Transmembrananker von Fis1 wird Myo2-Fis1 direkt in die Außenmembran von Mitochondrien inseriert und soll den mitochondrialen Transportdefekt der *myo2* Mutanten retten (rechts) (Förttsch et al., 2011).

Um zwischen diesen beiden Modellen zu unterscheiden, wurde die Cargo-Bindedomäne von Myo2 (Aminosäurereste 1131-1574) gegen die C-terminale Transmembrandomäne des mitochondrialen

Außenmembranproteins Fis1 (Aminosäurereste 129-155; Abb. 12A) ausgetauscht. Dieses Teilstück von Fis1 genügt, um Proteine wie z.B. GFP in der mitochondrialen Außenmembran zu verankern (Kemper et al., 2008). Bei Funktionalität dieses Konstruktes wäre zu erwarten, dass eine Expression des Gens für das Myo2-Fis1 Fusionsproteins keinen Einfluss auf den Transport von Retentionsfaktoren hat, da die Cargo-Bindedomäne deletiert wurde. Vielmehr sollte das Myo2-Fis1 Fusionsprotein Mutationen in *myo2* retten können, welche auf eine Beeinträchtigung der direkten Bindung von Myo2 an Mitochondrien zurück zu führen sind (Abb. 12B).

Das *myo2-fis1* Konstrukt wurde unter Kontrolle des endogenen *MYO2* Promotors in *single-copy* (*myo2-fis1(ARS-CEN)*) oder *high-copy* (*myo2-fis1(2 μ)*) Plasmiden gestellt. Um die Auswirkungen einer Expression von *myo2-fis1* *in vivo* zu untersuchen, wurden die Allele *MYO2*, *myo2(Q1233R)*, *myo2(L1301P)*, und *myo2(LQ)* bei Expression von *myo2-fis1(ARS-CEN)* oder *myo2-fis1(2 μ)* fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei führte die Anwesenheit von *myo2-fis1(ARS-CEN)* in der Mehrheit der Zellen zu wildtypischen Mitochondrien oder mit schwachem Morphologiedefekt. Besonders in *myo2(LQ)* spiegelt die deutliche Abnahme des Anteils an Zellen mit Mitochondrien, welche gegenüber der Knospe aggregieren, eine Wiederherstellung des Gleichgewichts der anterograden und retrograden mitochondrialen Bewegung wider (Abb. 13; Tab. 7). Die Expression von *myo2-fis1(2 μ)* führte zur Akkumulation von Mitochondrien in der Knospe oder bei Zellen mit größerer Knospe am Knospenhals. Dieser Phänotyp wurde als Kategorie IV eingeführt und deutet auf eine Verschiebung des Gleichgewichtes der Bewegung zum anterograden Transport hin (Abb. 13; Tab. 7). Der Einfluss von *myo2-fis1* auf die Vererbung von Mitochondrien wurde durch Quantifizierung von Knospen ohne Mitochondrien untersucht. Hierbei ist im Wildtyp der Anteil an Knospen mit Mitochondrien bei allen Bedingungen >95%. Von den *myo2* Mutanten weist *myo2(LQ)* den stärksten Vererbungsdefekt auf und bei 37°C fehlten in circa 60% der großen Knospen Mitochondrien. Dieser Transportdefekt konnte durch *myo2-fis1* beinahe komplett gerettet werden (Abb. 10B; 13; Tab. 6; 7). Daraus kann geschlossen werden, dass der mitochondriale Morphologie- und Verteilungsdefekt in *myo2(Q1233R)*, *myo2(L1301P)*, und *myo2(LQ)* Mutanten nicht durch das Fehlen oder eine Fehllokalisierung von Retentionsfaktoren hervorgerufen wird. Vielmehr deutet es darauf hin, dass eine beeinträchtigte Bindung von Myo2 an die Mitochondrien dafür verantwortlich ist.

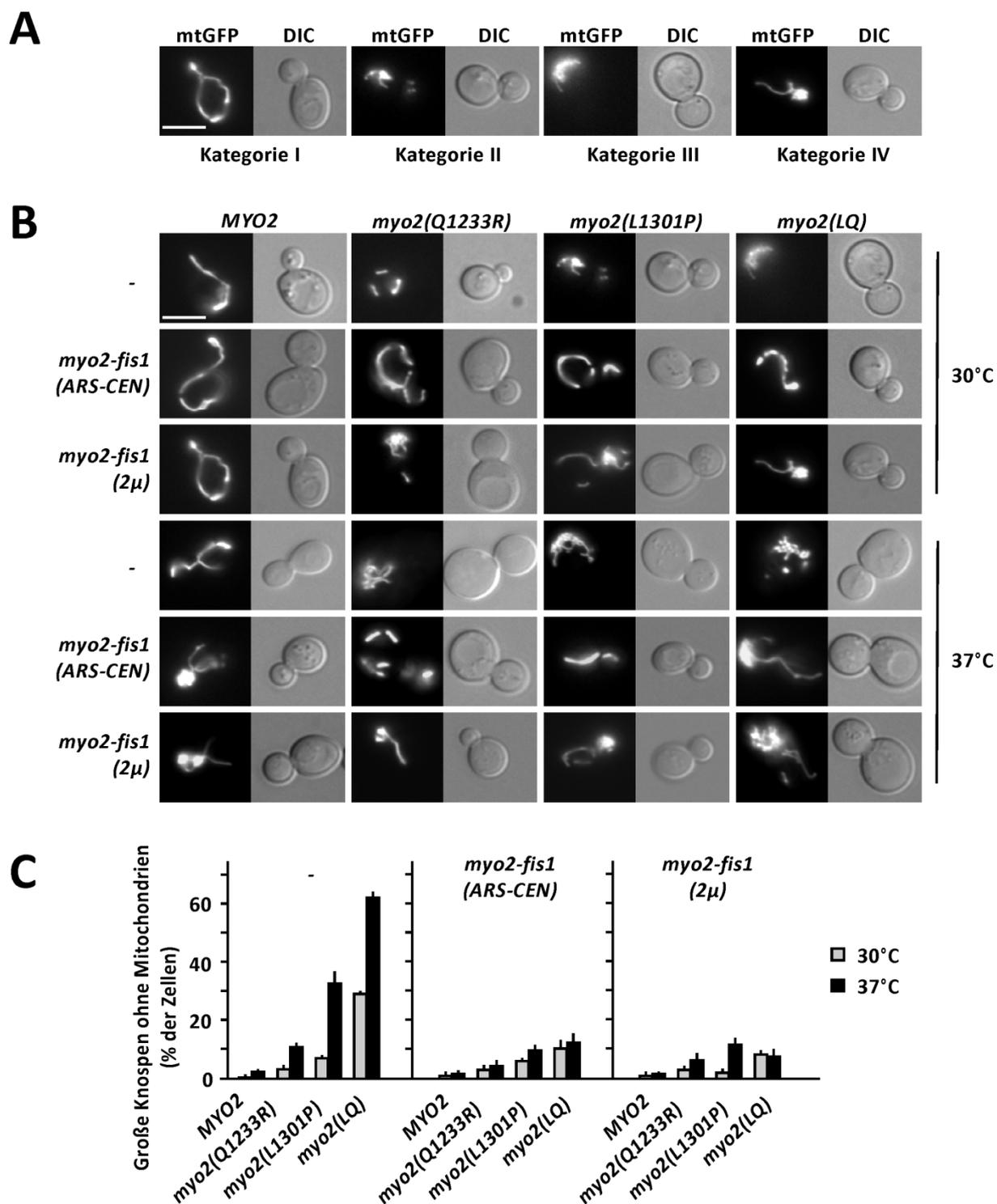


Abbildung 13) Rettung des mitochondrialen Morphologie- und Transportdefektes in *myo2* Mutanten durch Expression von *myo2-fis1* (in Zusammenarbeit mit Evelin Urban). A) Die mitochondriale Morphologie wurde fluorezenzmikroskopisch in *mtGFP*-exprimierenden Zellen ermittelt. Kategorie I, II und III wie in Abb. 10A beschrieben. Kategorie IV beschreibt Zellen, in denen Mitochondrien in der Knospe oder am Knospenhals akkumulieren. (Links) GFP Fluoreszenz, (rechts) Bilder des differentiellen Interferenzkontrastes (DIC). Größenstandard: 5 μ m. B) Die *mtGFP*-exprimierenden Zellen wurden in SD-Minimalmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, für drei Stunden bei der angegebenen Temperatur

inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie bei Raumtemperatur untersucht. (Links) GFP Fluoreszenz, (rechts) Bilder des differentiellen Interferenzkontrastes (DIC). Größenstandard: 5 μ m. **C)** Die Zellen wurden angezogen und untersucht wie in **B)** und es wurden Knospen ohne Mitochondrien in Zellen mit großer Knospe ausgezählt, wobei die Größe der Knospe mehr als ein Drittel der Mutterzelle betrug. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen (n=100) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider (Förtsch et al., 2011).

Tabelle 7) Mitochondriale Morphologiedefekte in *myo2* Mutanten (in Zusammenarbeit mit Evelin Urban). Zellen, die eine chromosomale Deletion des *MYO2* Gens und das wildtypische *MYO2* oder mutante *myo2* Allele auf einem Plasmid trugen, wurden wie in Abb. 13B angezogen und analysiert. Die Morphologie wurde anhand der Kategorien in Abb. 13A ausgezählt. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen (n=100) und die Standardabweichung ist angegeben (Förtsch et al., 2011).

Temp.	myo2::kanMX4		Mitochondriale Morphologie (% der Zellen)			
	Plasmid 1	Plasmid 2	Kategorie I	Kategorie II	Kategorie III	Kategorie IV
30°C	-	<i>MYO2</i>	95.0±1.0	5.0±1.0	0	0
		<i>myo2(Q1233R)</i>	69.7±3.2	23.3±1.5	7.0±1.7	0
		<i>myo2(L1301P)</i>	30.3±1.1	60±1.7	9.7±1.5	0
		<i>myo2(LQ)</i>	6.3±0.6	52.3±1.5	41.3±1.5	0
	<i>myo2-fis1</i> (<i>ARS-CEN</i>)	<i>MYO2</i>	74.4±6.5	15.3±9.3	0	10.3±2.1
		<i>myo2(Q1233R)</i>	40.0±4.4	29.3±2.3	5.3±0.6	25.7±5.5
		<i>myo2(L1301P)</i>	56.0±4.6	16.7±2.5	9.7±4.0	19.3±2.9
		<i>myo2(LQ)</i>	50.3±1.5	18.7±0.6	7.0±3.0	24.0±3.6
	<i>myo2-fis1</i> (<i>2μ</i>)	<i>MYO2</i>	42.0±5.3	16.7±2.9	1.3±1.5	40.0±7.8
		<i>myo2(Q1233R)</i>	20.7±2.1	23.7±4.0	7.0±2.0	48.6±0.6
		<i>myo2(L1301P)</i>	24.0±2.0	18.3±4.0	6.0±1.7	51.7±4.5
		<i>myo2(LQ)</i>	15.0±1.0	24.3±3.8	9.7±2.1	51.0±0.0

Temp.	<i>myo2::kanMX4</i>		Mitochondriale Morphologie (% der Zellen)			
	Plasmid 1	Plasmid 2	Kategorie I	Kategorie II	Kategorie III	Kategorie IV
37°C	-	<i>MYO2</i>	86.0±1.0	13.3±1.5	0	0
		<i>myo2(Q1233R)</i>	32.3±1.5	56.3±1.5	11.4±0.6	0
		<i>myo2(L1301P)</i>	24.3±1.5	67.3±1.2	8.3±2.5	0
		<i>myo2(LQ)</i>	4.0±1.7	30.0±2.6	66.0±4.0	0
	<i>myo2-fis1</i> (ARS-CEN)	<i>MYO2</i>	30.3±5.0	28.0±3.5	4.7±1.5	37.0±1.7
		<i>myo2(Q1233R)</i>	23.7±3.8	39.3±6.8	5.3±1.5	25.1±5.0
		<i>myo2(L1301P)</i>	32.7±2.9	28.3±5.1	17.3±5.5	21.7±2.3
		<i>myo2(LQ)</i>	22.7±5.5	24.0±5.3	19.7±3.8	34.0±4.6
	<i>myo2-fis1</i> (2μ)	<i>MYO2</i>	30.7±2.1	18.0±5.2	1.7±0.6	49.7±5.5
		<i>myo2(Q1233R)</i>	11.0±1.0	36.0±1.0	6.7±1.5	46.3±0.6
		<i>myo2(L1301P)</i>	10.0±1.0	27.7±1.5	14.3±2.1	48.0±2.6
		<i>myo2(LQ)</i>	11.3±2.1	16.3±2.1	13.0±1.7	63.0±3.5
			>60%	>40%	>20%	<20%

Um die intrazelluläre Lokalisation von Myo2-Fis1 *in vivo* zu überprüfen, wurde mit *myo2-GFP-fis1(2μ)* ein Allel hergestellt, bei dem GFP zwischen das Motorprotein ohne Cargo-Bindedomäne und den Membrananker kloniert wurde. Durch Einfügen des GFP in Myo2-Fis1 könnte die Faltung des verankerten Motorproteins gestört werden. Jedoch konnten kaum Unterschiede in der mitochondrialen Morphologie zwischen den Allelen *myo2-fis1(2μ)* und *myo2-GFP-fis1(2μ)* beobachtet werden (Abb. 14C). Zudem kann man in Zellen ohne Knospe eine mitochondriale Färbung des gesamten Netzwerkes beobachten, wobei das Myo2-GFP-Fis1 Signal mit dem des mitochondrialen Matrixmarkers colokalisiert. In knospenden Zellen wiederum ist das Fluoreszenzsignal größtenteils in der Knospe zu finden und überlappt ebenso mit dem mtCherry Signal (Abb. 14B; Förtsch et al., 2011).

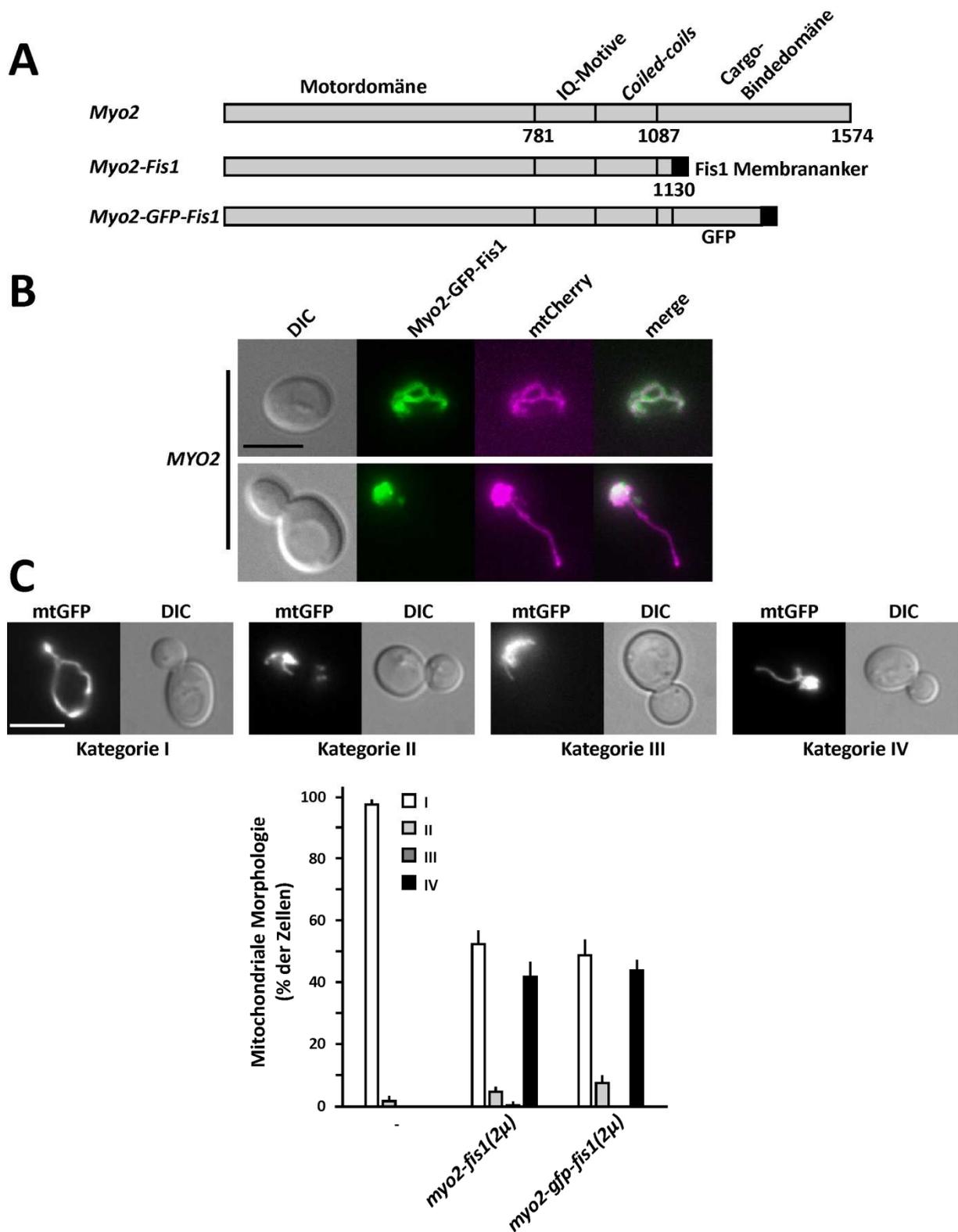


Abbildung 14) Lokalisation von Myo2-GFP-Fis1. A) Domänenstruktur des wildtypischen und mutanter Varianten von Myo2. Die Zahlen stehen für Aminosäurereste. B) WT Zellen, die Plasmide für *myo2-gfp-fis1(2μ)* und *mtcherry* besaßen, wurden bis zur spät- (oben) oder logarithmischen (unten) Wachstumsphase in SD-Medium angezogen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. (Rechts) Überlagerung der GFP und mtCherry Fluoreszenz. Fluoreszenzbilder sind

Projektionen der maximalen Intensität von z-Stapeln bestehend aus 10 Ebenen. Größenstandard: 5 μm (Förtsch et al., 2011). **C)** Morphologie der Mitochondrien in Kategorie I-IV wie in Abb. 13A. *MYO2* WT Zellen ohne oder mit multicopy Plasmiden (2μ), die für Myo2-Fis1 oder Myo2-GFP-Fis1 kodieren, wurden in SD-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Die mitochondriale Morphologie wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie der *mtGFP*- oder *mtCherry*-exprimierenden Zellen ausgezählt. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen ($n=100$) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder (Förtsch et al., 2011).

3.4 Organellspezifität der *myo2(LQ)* und *myo2-fis1* Allele

Das Klasse V Motorprotein Myo2 ist am Transport zahlreicher Cargos in der Zelle beteiligt. Dies erschwert die Unterscheidung zwischen direkten Effekten von Mutationen in Myo2 und pleiotropen Effekten als Folge einer beeinträchtigten Funktionalität von Myo2. Um zu überprüfen, ob der mitochondriale Morphologie- und Vererbungsdefekt von *myo2(LQ)* sowie der Effekt von *myo2-fis1(2 μ)* spezifisch für Mitochondrien ist, wurde die Verteilung von weiteren Zellorganellen untersucht, deren Transport und Verteilung von Myo2 abhängt.

3.4.1 Vesikel

MYO2 ist aufgrund seiner Rolle beim gerichteten Transport von Vesikeln ein essentielles Gen. Die Bindestelle für Vesikel liegt in Subdomäne II der Cargo-Bindedomäne von Myo2. Lebensfähige, temperatursensitive Mutanten in dieser Region von Myo2 weisen bei nichtpermissiver Temperatur keine polarisierte Akkumulation der Rab-GTPase Sec4 an der Spitze von kleinen Knospen mehr auf (Schott et al., 1999). Da *myo2(LQ)* einen schwachen Wachstumsdefekt aufweist (Abb.9), galt es die Frage zu klären, ob dieser durch Beeinträchtigung der mitochondrialen Vererbung oder durch Beeinflussung des Vesikeltransportes hervorgerufen wird. Daher wurde eine *GFP-SEC4* Variante in den Stämmen mit dem wildtypischen Gen für das Myo2 Motorprotein, *MYO2*, und dem *myo2(LQ)* Allel mit und ohne *myo2-fis1(2 μ)* exprimiert und die Lokalisation des GFP-Signals in Zellen mit kleiner Knospe quantifiziert. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *MYO2* und *myo2(LQ)* beobachtet werden. Auch das *myo2-fis1(2 μ)* Allel hatte keinen Einfluss auf die polarisierte Verteilung von Sec4 in der Zelle (Abb. 15). Das deutet darauf hin, dass der Transport von Vesikeln bei den untersuchten Allelen nicht in Mitleidenschaft gezogen wird (Förtsch et al., 2011).

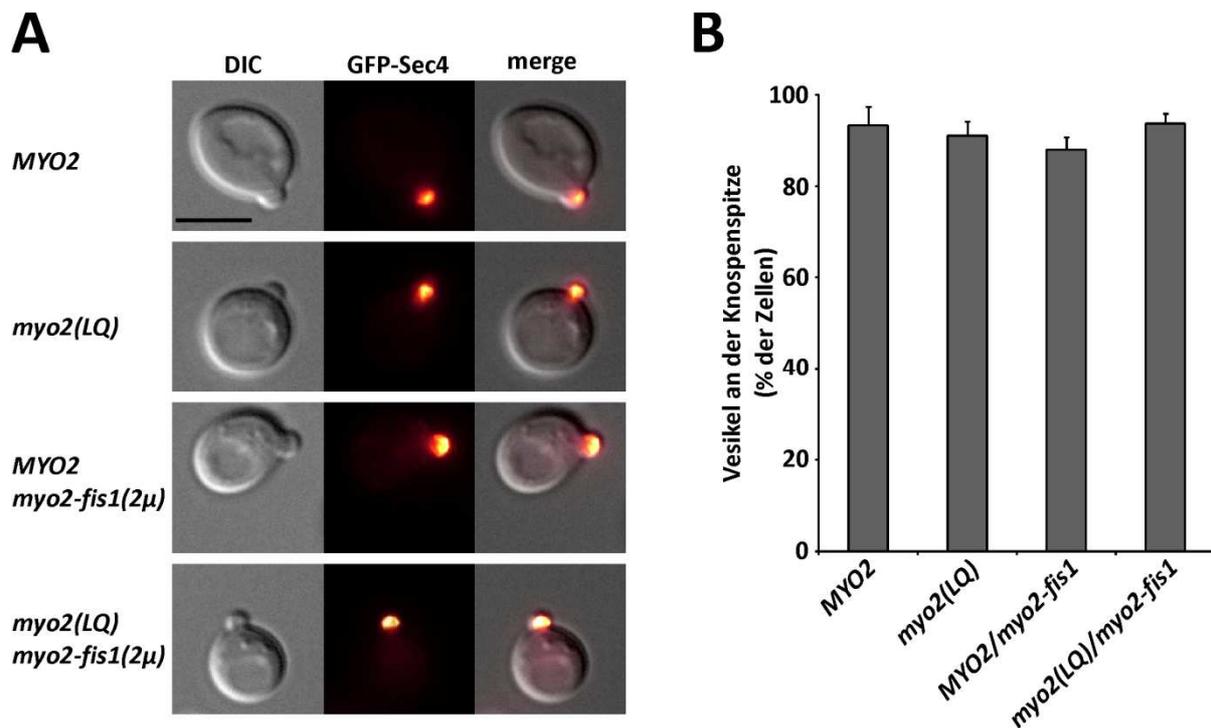


Abbildung 15) Einfluss der *myo2* Allele auf den Transport von Vesikeln. **A)** Zellen, die *GFP-SEC4* exprimierten, wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in SD-Medium angezogen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. DIC Bild einer repräsentativen Zelle (links). Projektion der maximalen Intensität von 10 z-Ebenen (Mitte). Überlagerung (rechts). Größenstandard: 5 μ m. **B)** Die Lokalisation des Vesikelmarkers GFP-Sec4 wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen ($n=100$) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider (Förtsch et al., 2011).

3.4.2 Peroxisomen

Ein weiteres Organell, dessen Bindungsstelle in Subdomäne II zu finden ist, sind Peroxisomen. Werden Veränderungen dieser Bindestelle in *MYO2* eingeführt, so wird der anterograde Transport von Peroxisomen behindert und in der Mehrzahl der Knospen fehlen Peroxisomen (Fagarasanu et al., 2009). Die Verteilung der Peroxisomen kann dabei durch Fluoreszenzproteine mit einem peroxisomalen Lokalisationssignal (PTS1) beobachtet werden (Smith et al., 2002). Fluoreszenzmikroskopisch konnte kein Unterschied in der Verteilung von DsRed-PTS1 in *MYO2* und *myo2(LQ)* beobachtet werden. Auch bei Expression von *myo2-fis1(2μ)* hatten ähnlich viele Zellen Peroxisomen in der Knospe in den Stämmen *MYO2* und *myo2(LQ)* (Abb. 16). Allerdings akkumulierten beim Wildtyp in etwa 4% und bei *myo2(LQ)* bei Expression von *myo2-fis1* in etwa 18% der Zellen Peroxisomen in der Knospe. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da Fis1 auch in der peroxisomalen Membran verankert vorliegt (Motley et al., 2008). Das deutet darauf hin, dass der Transport von Peroxisomen bei den untersuchten Allelen nicht in Mitleidenschaft gezogen wird (Förtsch et al., 2011).

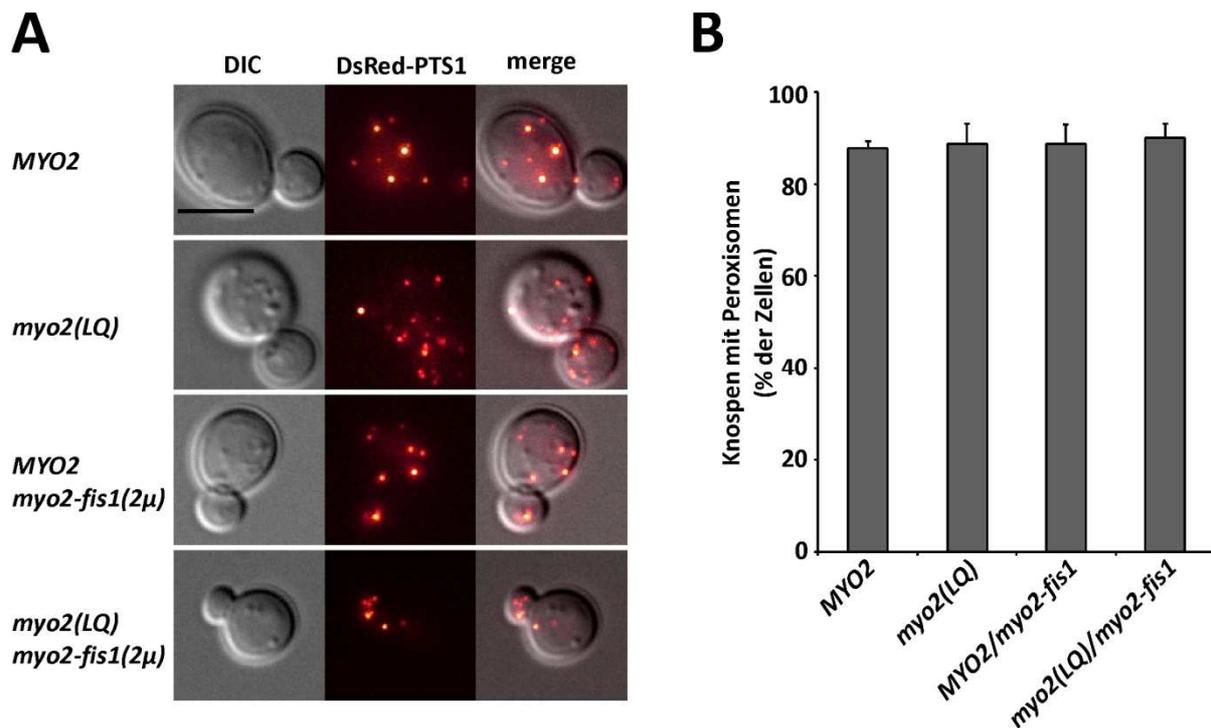


Abbildung 16) Einfluss der *myo2* Allele auf den Transport von Peroxisomen. **A)** Zellen wurden analysiert wie in Abb. 15. DIC Bild einer repräsentativen Zelle (links). Projektion der maximalen Intensität von 10 z-Ebenen (Mitte). Überlagerung (rechts). Größenstandard: 5 μ m. **B)** Die Lokalisation des Peroxisomenmarkers DsRed-PTS1 wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen (n=100) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider (Förttsch et al., 2011).

3.4.3 Golgi Apparat

Auch auf die polarisierte Verteilung von Golgi Zisternen hat Myo2 Einfluss (Rossanese et al., 2001). Elemente des *trans*-Golgi akkumulieren in der Knospe oder bei Zellen mit großer Knospe am Knospenhals, was man mit einer GFP Fusion des *trans*-Golgi Proteins Sft2 beobachten kann (Conchon et al., 1999). Bei Expression von *GFP-SFT2* konnten keine großen Unterschiede in der Lokalisation des *trans*-Golgi in den Stämmen *MYO2* und *myo2(LQ)* mit und ohne *myo2-fis1(2μ)* Plasmid festgestellt werden (Abb. 17). Das deutet darauf hin, dass die Verteilung des Golgi bei den untersuchten Allelen nicht in Mitleidenschaft gezogen wird (Förttsch et al., 2011).

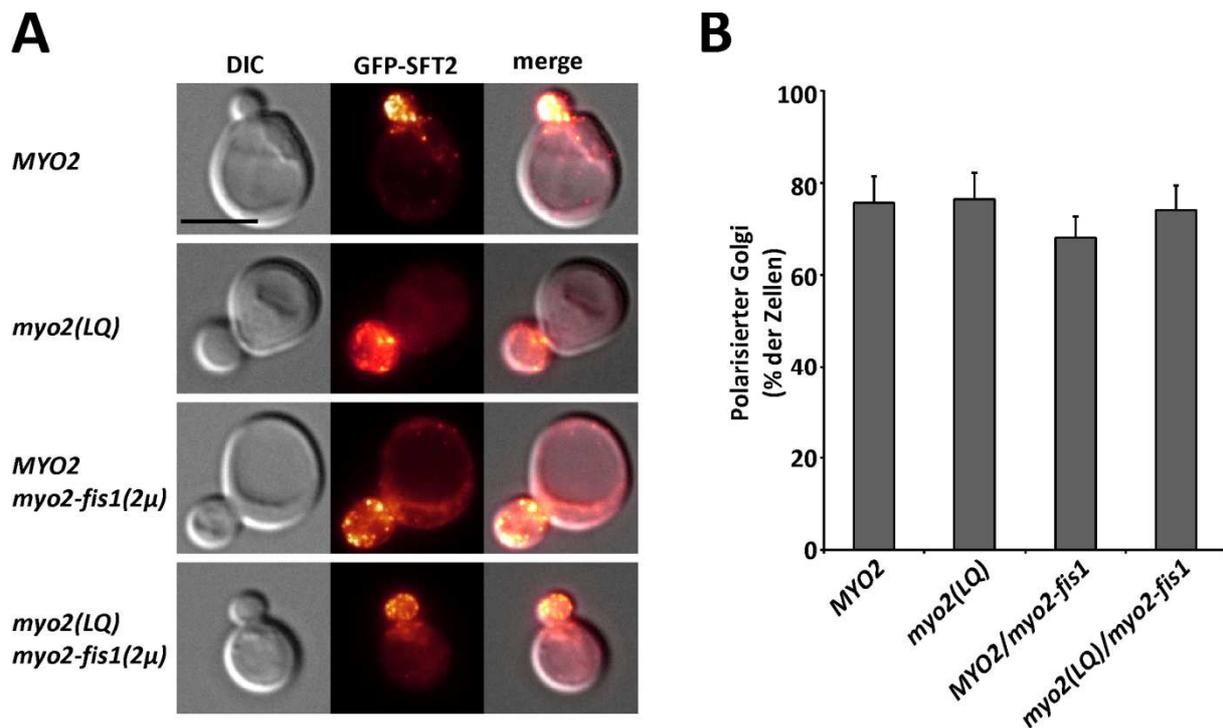


Abbildung 17) Einfluss der *myo2* Allele auf die Verteilung des Golgi. **A)** Zellen wurden analysiert wie in Abb. 15. DIC Bild einer repräsentativen Zelle (links). Projektion der maximalen Intensität von 10 z-Ebenen (Mitte). Überlagerung (rechts). Größenstandard: 5 μ m. **B)** Die Lokalisation des *trans*-Golgimarkers GFP-SFT2 wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen (n=100) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder (Förtsch et al., 2011).

3.4.4 Vakuolen

Die Bindestelle für Vakuolen liegt in Subdomäne I um die Aminosäurereste Q1233 und L1301, die auch für den mitochondrialen Transport von Bedeutung sind (Pashkova et al., 2006; Altmann et al., 2008). Da das Allel *myo2(LQ)* die Vererbung von Vakuolen und auch Mitochondrien beeinflusst (Tab. 6), wurde der Einfluss von *myo2-fis1(2μ)* auf den vakuolären Transport untersucht. So wurden *MYO2* und *myo2(LQ)*, die *mtGFP* exprimierten, zusätzlich mit dem vakuolären Marker *CellTracker Blue CMAC* gefärbt. Im Stamm *MYO2* konnte eine wildtypische Verteilung von Vakuolen und Mitochondrien beobachtet werden, wohingegen *myo2(LQ)* einen Vererbungsdefekt beider Organellen aufweist. Wird in *myo2(LQ)* zusätzlich *myo2-fis1(2μ)* exprimiert, so wird das Gleichgewicht der mitochondrialen Bewegung zum anterograden Transport hin verschoben und die Mitochondrien akkumulieren in der Knospe. Gleichzeitig ist die Vererbung von Vakuolen noch immer beeinträchtigt und die Knospe ist frei von Vakuolen (Abb. 18). Dies deutet darauf hin, dass Myo2-Fis1 Mitochondrien-spezifisch ist, da der Transportdefekt der Vakuolen in der *myo2(LQ)* Mutante bei Expression von *myo2-fis1* nicht gerettet wird (Förtsch et al., 2011).

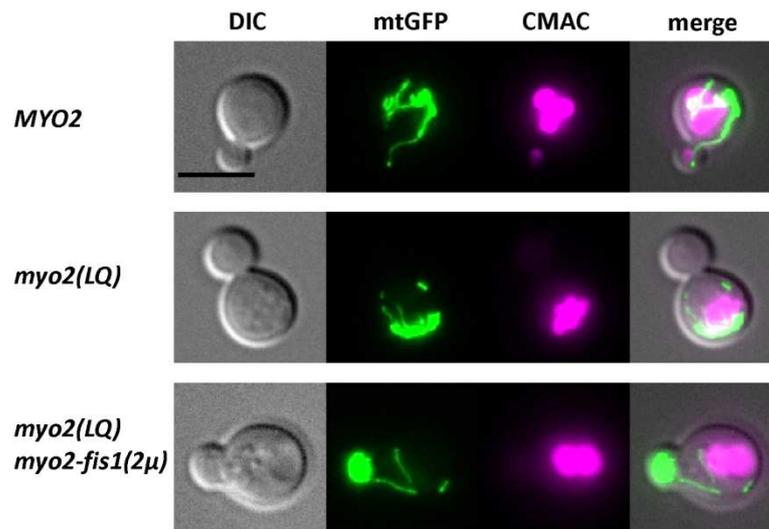


Abbildung 18) Einfluss der *myo2* Allele auf den Transport von Vakuolen. Zellen, die *mtGFP* exprimierten, wurden mit dem Vakuolenmarker *Celltracker Blue CMAC* gefärbt und analysiert wie in Abb. 15. Überlagerung der GFP und CMAC Fluoreszenz und des DIC Bildes (rechts). Die Fluoreszenzbilder stellen Projektionen der maximalen Intensität von 10 z-Ebenen dar. Größenstandard: 5 μm (Förtisch et al., 2011).

3.4.5 Endoplasmatisches Retikulum

Bisher gibt es noch keine Anzeichen dafür, dass das ER mittels Myo2 transportiert wird. Jedoch ist bekannt, dass es in der Zelle relativ stabile Kontakte zwischen Mitochondrien und ER gibt (Kornmann et al., 2009), was zu einer gemeinsamen Vererbung beider Zellorganellen führen könnte. Es wurde bereits gezeigt, dass in *myo4 Δ* Zellen Mitochondrien weiterhin normal vererbt werden. Diesen Zellen fehlt das Motorprotein Myo4, was zu einem Transportdefekt von kortikalem ER führt (Estrada et al., 2003). Bei der *myo2(LQ)* Mutante konnte kein Unterschied zum Wildtyp ausgemacht werden bei der Verteilung eines ER Markers, welcher aus einer Signalsequenz, einem GFP sowie einem Retentionsignal für das ER besteht. So kann man auch in Zellen der Kategorie III, welche keine Mitochondrien in der Knospe besitzen, kortikales ER beobachten (Abb. 19). Dies spricht dafür, dass der Transport von Mitochondrien und ER voneinander unabhängig erfolgt.

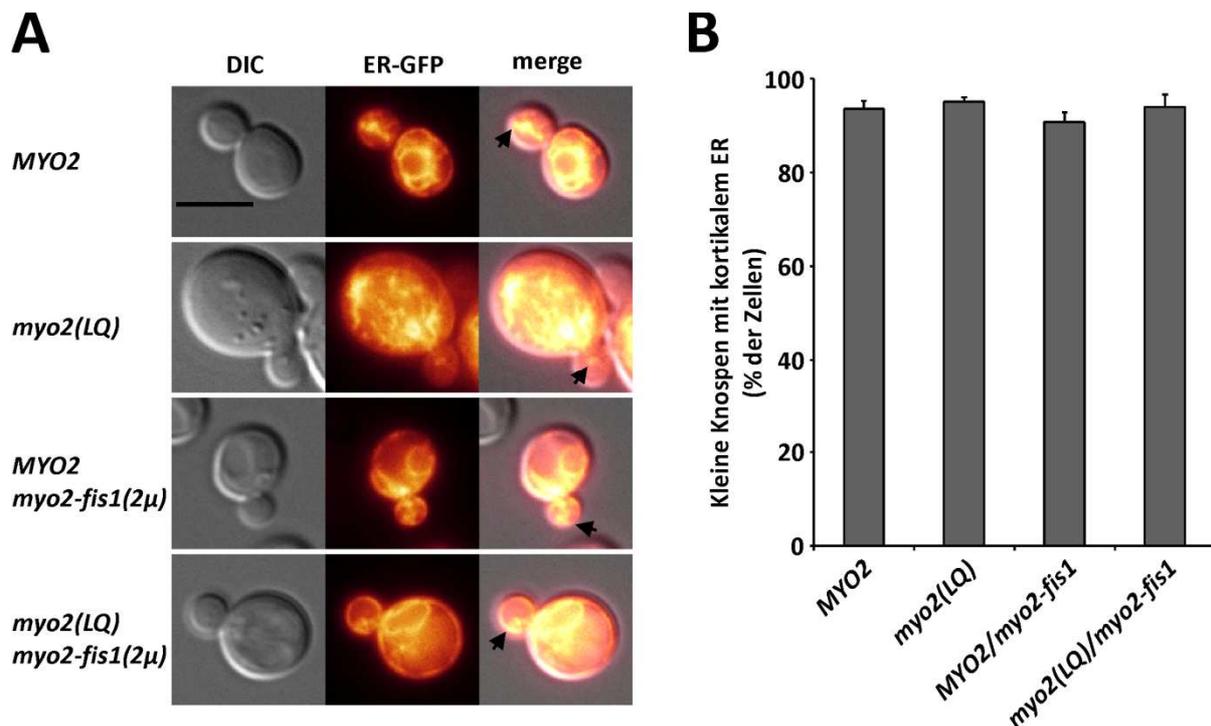
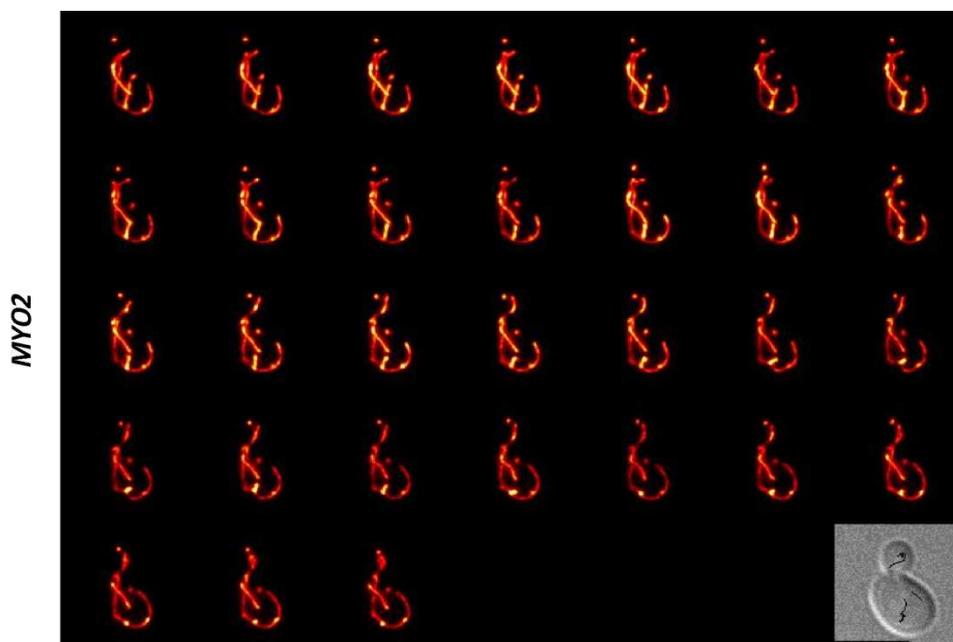


Abbildung 19) Einfluss der *myo2* Allele auf den Transport des kortikalen ER. **A)** Zellen, die einen Marker für das endoplasmatische Retikulum exprimieren, wurden analysiert wie in Abbildung 15, mit der Ausnahme, dass nur eine Ebene mit Fokus auf die Knospe untersucht wurde. Pfeile deuten ER an, das sich in der Knospe befindet. Größenstandard: 5 μ m. **B)** Die Anwesenheit von ER in kleinen Knospen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgezählt, wobei die Größe der Knospe höchstens ein Drittel der Mutterzelle betrug. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen (n=100) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider (Förtsch et al., 2011).

Wird bei einer Mutation eine Aminosäure gegen Prolin substituiert, so kann das weitreichende Folgen für die Struktur der Proteindomäne haben. Allerdings hat die Mutation *myo2(L1301P)* nur Einfluss auf die Bindung des vakuolären Rezeptors, Vac17, nicht jedoch auf die Bindung von Kar9, das bei der cytoplasmatischen Orientierung von Mikrotubuli eine Rolle spielt, und des kinesin-ähnlichen Smy1. Dies legt den Schluss nahe, dass die Struktur der Cargo-Bindedomäne von Myo2 nicht global verändert wird (Pashkova et al., 2005a). Analog ist die Verteilung von Vesikeln, Peroxisomen und Golgi normal in *myo2(LQ)*, was zudem darauf hindeutet, dass die distale Hälfte der Cargo-Bindedomäne von Myo2 größtenteils intakt ist. Darüber hinaus scheint die Vererbung von Mitochondrien nicht mit dem Transport von Vakuolen oder ER gekoppelt zu sein. Expression von *myo2-fis1(2μ)* hat großen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung von Mitochondrien. Bei Peroxisomen lässt sich eine schwache Auswirkung auf den Transport feststellen, da ein Teil von Myo2-Fis1 in der peroxisomalen Membran verankert vorzuliegen scheint. Kein Effekt von Myo2-Fis1 lässt sich bei sekretorischen Vesikeln, Golgi, ER und Vakuolen beobachten (Förtsch et al., 2011).

3.5 In *myo2* Mutanten ist die Passage von Mitochondrien durch den Knospenhals erschwert

Um die Frage zu beantworten, ob Mutationen in der Cargo-Bindedomäne direkten Einfluss auf den anterograden Transport von Mitochondrien haben, wurden *MYO2*, *myo2(LQ)* und *myo2-fis1(2 μ)* Zellen durch zeitaufgelöste 3D-Fluoreszenzmikroskopie in 16-27 Zellen pro Stamm untersucht. Dabei wurden über einen Zeitraum von einer Minute alle zwei Sekunden z-Stapel mittels Epifluoreszenzmikroskopie von den *mtGFP*-exprimierenden Zellen aufgenommen. Die Bilder wurden daraufhin mittels Dekonvolution und Projektion der maximalen Intensität bearbeitet. In wildtypischen Zellen konnten sowohl anterograde als auch retrograde Bewegungen von Mitochondrien in der Mutter- und auch der Tochterzelle beobachtet werden. Die Mitochondrien von *myo2(LQ)* bewegten sich ebenso, allerdings war der mitochondriale Transport auf die Mutterzelle begrenzt und es gab kaum mitochondriale Tubuli, die bis in die Knospe ragten. Im Gegensatz dazu akkumulierten die Mitochondrien in *myo2-fis1(2 μ)* in der Knospe, wobei häufig ein oder zwei lange mitochondriale Tubuli am Pol gegenüber der Knospe verankert sind (Abb. 20; Filme 7-9). Diese Beobachtungen legen nahe, dass Myo2 für den anterograden Transport von Mitochondrien und deren Eintritt in die Knospe benötigt wird.



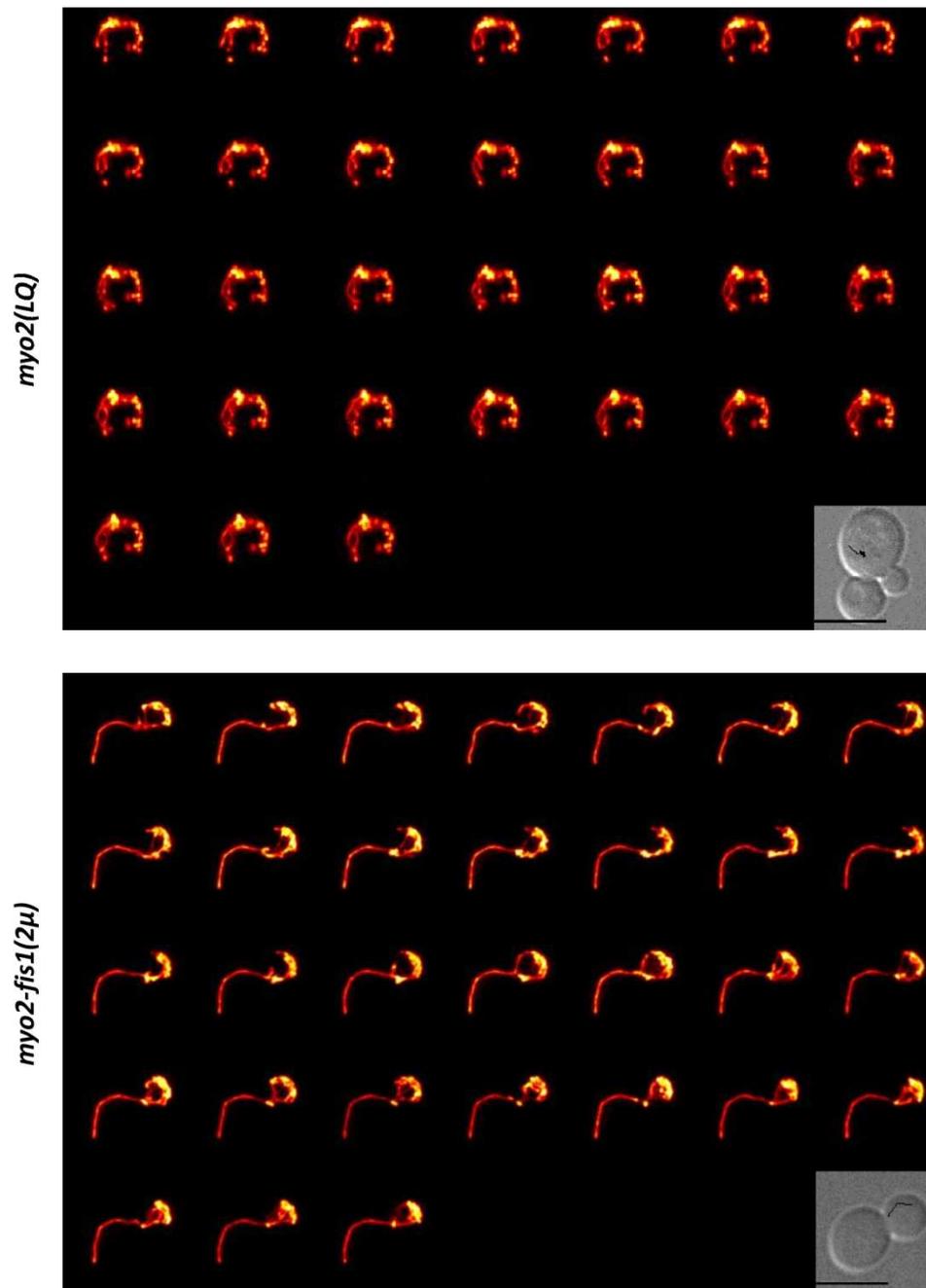


Abbildung 20) Mitochondriale Bewegungen im WT, *myo2(LQ)* und *myo2-fis1* Stamm. Zellen mit WT *MYO2*, die *myo2(LQ)* Mutante und *MYO2* Zellen, die *myo2-fis1* von einem *high-copy* Plasmid (*myo2-fis1(2μ)*) exprimierten, wurden in SD-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und mittels zeitaufgelöster 3D-Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Es wurden über einen Zeitraum von 1 min alle 2 s z-Stapel der *mtGFP*-exprimierenden Zellen aufgenommen und durch Dekonvolution und Projektion der maximalen Intensität bearbeitet. In den DIC Bildern sind die Spuren der mitochondrialen *tracks* markiert. Diese Abbildung zeigt repräsentative Zellen der Auswertung von Abb. 21. Die Filme 7-9 sind von den gleichen Zellen. Größenstandard: 5 μ m (Förtsch et al., 2011).

In der Vergangenheit wurde bezweifelt, dass Myo2 direkt an der Vererbung von Mitochondrien beteiligt ist, da eine Verkürzung des Hebelarms durch Reduktion der Anzahl der IQ-Motive von Myo2

keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit von Mitochondrien hat (Boldogh et al., 2004; Boldogh und Pon, 2007; Peraza-Reyes et al., 2010). Allerdings wird bei diesen Überlegungen außer Acht gelassen, dass die Transportgeschwindigkeit von weiteren Faktoren als lediglich der Schrittweite des Motormoleküls abhängt. So beeinflussen wohl auch die Anzahl an Motormolekülen, die Größe des Cargo oder die Menge an ATP die Geschwindigkeit der durch Myo2 bewegten Organellen. Aufgrund der bisherigen Beobachtungen wurde angenommen, dass in Stamm *myo2-fis1(2 μ) in vivo* eine Myo2-vermittelte Bewegung von Mitochondrien vorliegt. Falls nun die Geschwindigkeit in Stamm *MYO2* und *myo2(LQ)* ebenso von Myo2 abhängen, so sollte die Geschwindigkeit des mitochondrialen Transportes in diesen Stämmen gleich sein. Um dies zu überprüfen wurden die mitochondrialen Geschwindigkeiten von *MYO2*, *myo2(LQ)* sowie *myo2-fis1(2 μ)* in den zeitaufgelösten 3D-Fluoreszenzaufnahmen untersucht. So wurden die Spitzen der mitochondrialen Tubuli bei den Aufnahmen über die Zeit nachverfolgt. Aus den zurückgelegten Strecken konnte auf die Geschwindigkeit der Tubuli zwischen den einzelnen z-Stapeln geschlossen werden.

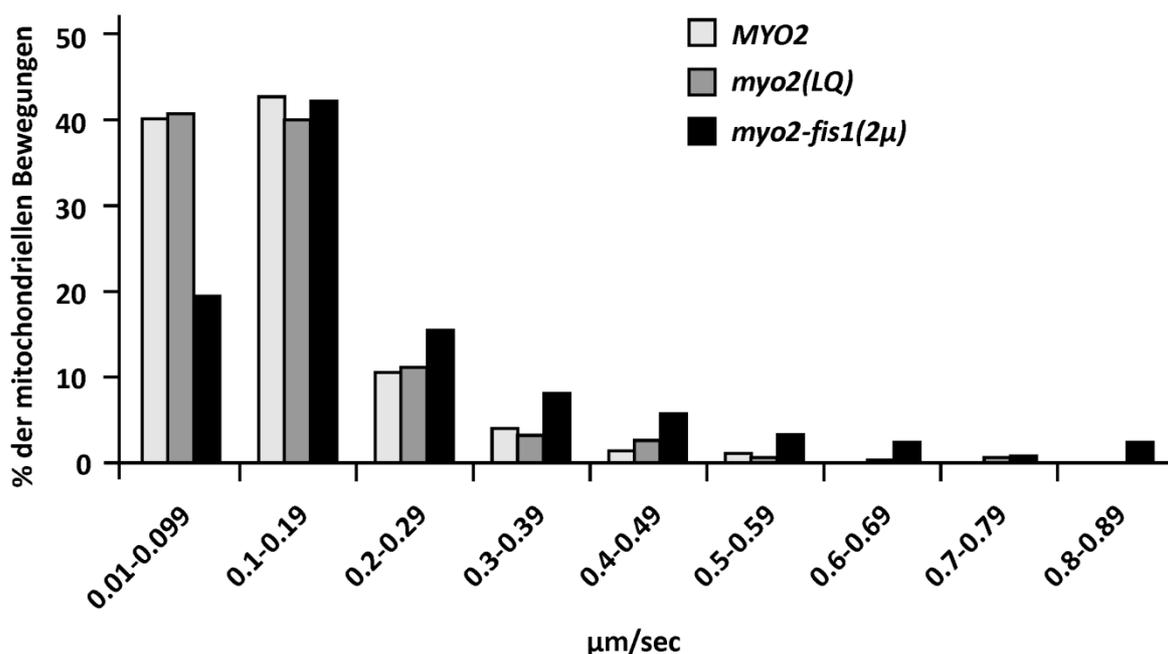


Abbildung 21) Die Geschwindigkeit der mitochondrialen Bewegungen im WT, *myo2(LQ)* und *myo2-fis1* Stamm sind sich ähnlich. Zellen mit WT *MYO2*, die *myo2(LQ)* Mutante und *MYO2* Zellen, die Myo2-Fis1 von einem *high-copy* Plasmid (*myo2-fis1(2 μ)*) exprimierten, wurden wie in Abb. 20 analysiert. In 27 WT Zellen wurden insgesamt 41 *tracks* mitochondrialer Spitzen bestehend aus 276 Zeitpunkten rekonstruiert. In der *myo2(LQ)* Mutante waren es 50 *tracks* bestehend aus 341 Zeitpunkten in 25 Zellen und bei der *myo2-fis1(2 μ)* Mutante waren es 28 *tracks* in 16 Zellen mit 123 Zeitpunkten. Für jeden Zeitpunkt wurde die 2D-Geschwindigkeit bestimmt und verdeutlicht als Prozentsatz der gesamten mitochondrialen Bewegungen für jeden Stamm (Förtsch et al., 2011).

Beim Wildtyp konnten Geschwindigkeiten von $<0,1$ bis $0,9 \mu\text{m/s}$ beobachtet werden, wobei der Großteil der Einzelgeschwindigkeiten 0 bis $0,2 \mu\text{m/s}$ betrug (Abb. 21). Diese Werte sind vergleichbar zu bereits beobachteten Geschwindigkeiten (Fehrenbacher et al., 2004). Die Werte der Stämme *myo2(LQ)* und *myo2-fis1(2 μ)* unterschieden sich nicht stark vom Wildtyp (Abb. 21). Dies deutet darauf hin, dass in den drei Stämmen der gleiche Transportmechanismus für die mitochondriale Bewegung verantwortlich ist (Förtsch et al., 2011).

3.6 Keine Rettung der mitochondrialen Transport- und Morphologiedefekte in ERMES-Komplex Mutanten durch *myo2-fis1*

Für eine Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie und Vererbung sind die vier Gene *MMM1*, *MDM10*, *MDM12* und *MDM34* von entscheidender Bedeutung. Fehlt eines der Genprodukte so bilden sich große, sphärische Mitochondrien aus, die nicht mehr transportiert werden können. Zudem verlieren die meisten Zellen ihr mitochondriales Genom und es lassen sich häufig Knospen ohne Mitochondrien beobachten (Burgess et al., 1994; Sogo und Yaffe, 1994; Berger et al., 1997; Boldogh et al., 1998; Dimmer et al., 2002; Boldogh et al., 2003; Youngman et al., 2004). Im Modell für den anterograden Transport von Mitochondrien, bei dem der Arp2/3-Komplex die Energie für die Bewegung bereitstellen soll, wurde ein Komplex aus *Mmm1*, *Mdm10* und *Mdm12* für die Bindung der Mitochondrien an das Aktinzytoskelett vorgeschlagen (Boldogh et al., 2003; Boldogh und Pon, 2007; Peraza-Reyes et al., 2010).

Wären die Morphologie- und Vererbungsdefekte von *mmm1 Δ* , *mdm10 Δ* , *mdm12 Δ* und *mdm34 Δ* durch fehlenden mitochondrialen Transport bedingt, so sollte die Möglichkeit bestehen, dass das *myo2-fis1* Konstrukt den Vererbungsdefekt aufhebt. Jedoch konnte selbst mit dem *myo2-fis1(2 μ)* Plasmid in diesen Stämmen nicht die für das Konstrukt typische Akkumulation von Mitochondrien in der Knospe beobachtet werden. So bildeten sich in den Deletionsstämmen bei Expression von *myo2-fis1* nach wie vor große, sphärische Mitochondrien aus. Und auch der Transportdefekt in die Knospe konnte durch das *myo2-fis1(ARS-CEN)* oder *myo2-fis1(2 μ)* Plasmid nicht gerettet werden. So verfügte ein signifikanter Anteil an Zellen ob mit oder ohne *Myo2-Fis1* über Knospen ohne Mitochondrien (Abb. 22).

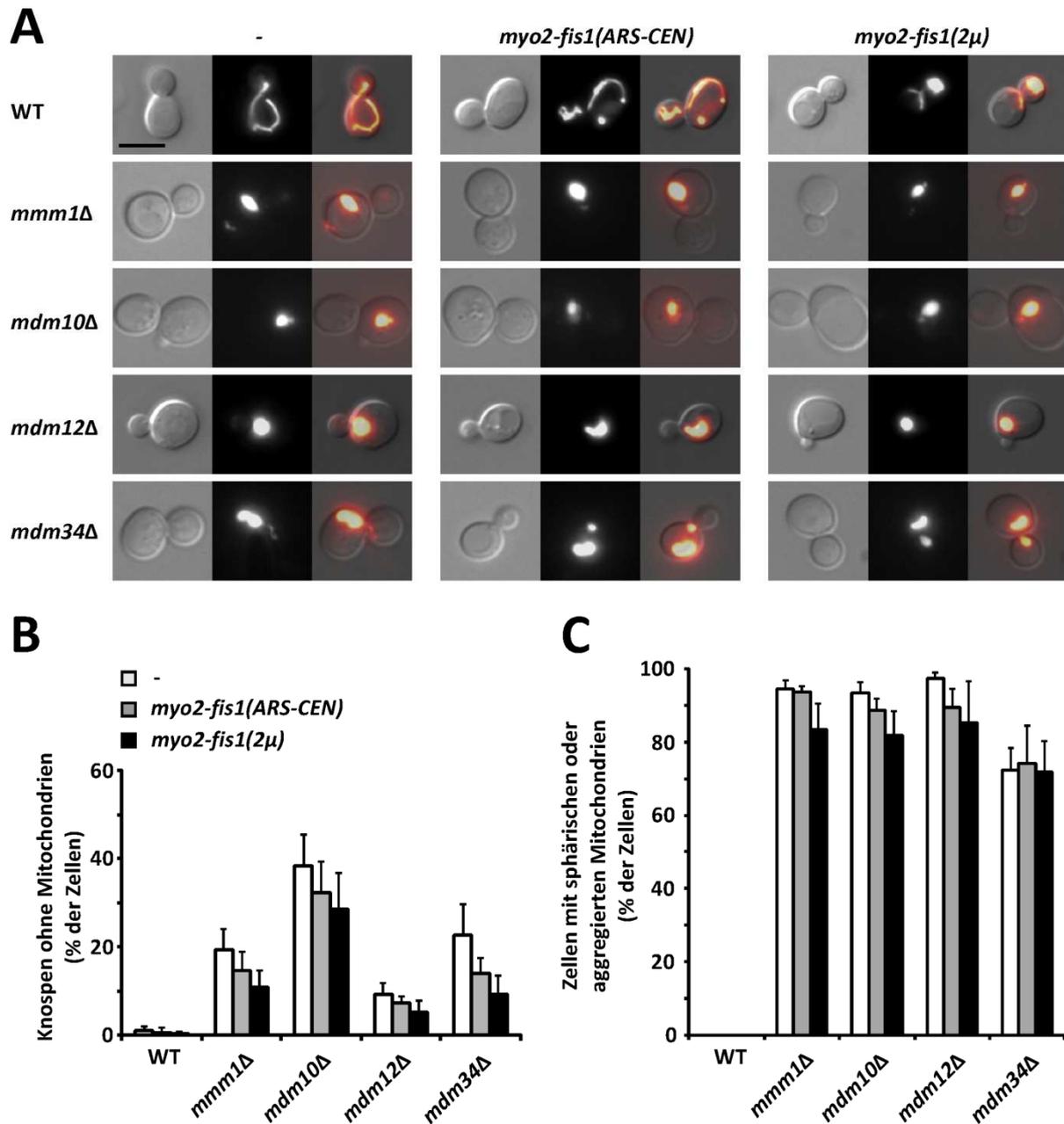


Abbildung 22) Der Transportdefekt ausgelöst durch Abwesenheit von Mmm1, Mdm10, Mdm12 und Mdm34 wird nicht durch Myo2-Fis1 kompensiert (in Zusammenarbeit mit Evelin Urban). **A)** Zellen, die *mtGFP* exprimierten, wurden in SD-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. (Links) DIC Bild, (Mitte) GFP Fluoreszenz, (rechts) Überlagerung. Größenstandard: 5 μ m. **B)** Die Zellen wurden angezogen und analysiert wie in **A)**. Der mitochondriale Vererbungsdefekt wurde durch Zählen von Knospen ohne Mitochondrien quantifiziert. **C)** Mitochondriale Morphologiedefekte wurden ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt. **B)** und **C)** Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen ($n=100$) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder (Förtisch et al., 2011).

Mdm10 ist nicht nur Teil des ERMES-Komplexes, sondern spielt als Komponente des mitochondrialen SAM-(*sorting and assembly machinery*) Komplexes auch eine Rolle beim Proteinimport in die äußere Membran von Mitochondrien (Meisinger et al., 2004). Daher sollte überprüft werden, ob in *mdm10Δ* der Proteinimport von Myo2-Fis1 verhindert wird und aus diesem Grund keine Rettung des Morphologie- und Transportdefektes von Mitochondrien in den Deletionsmutanten des ERMES-Komplexes beobachtet werden kann. Da Myo2-GFP-Fis1 in *mmm1Δ*, *mdm10Δ*, *mdm12Δ* und *mdm34Δ* noch mitochondriale Lokalisation aufweist und mit einem mitochondrialen Matrixmarker kolokalisiert, kann davon ausgegangen werden, dass der mitochondriale Vererbungsdefekt nicht auf einen Importdefekt von Myo2-GFP-Fis1 zurückgeführt werden kann (Abb. 23). Zudem deuten die Beobachtungen darauf hin, dass eine Störung des anterograden Transportes nicht die Ursache ist für den mitochondrialen Morphologie- und Vererbungsdefekt in den ERMES-Komplex Mutanten (Förtsch et al., 2011).

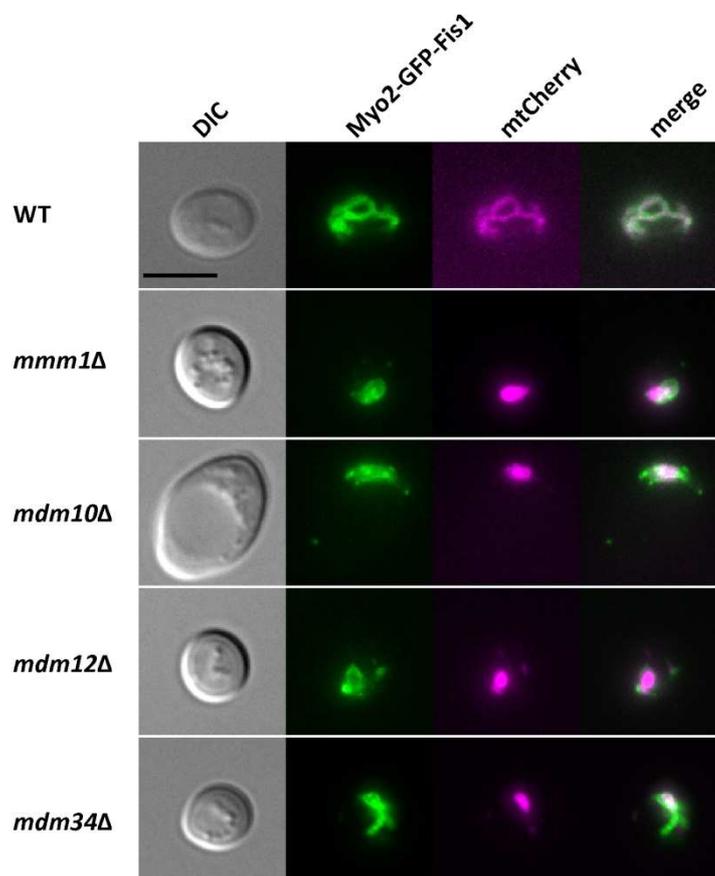


Abbildung 23) Lokalisation von Myo2-GFP-Fis1 in den ERMES-Komplex Mutanten. Intrazelluläre Verteilung von Myo2-GFP-Fis1 in WT, *mmm1Δ*, *mdm10Δ*, *mdm12Δ* oder *mdm34Δ*. Die Zellen exprimierten *myo2-GFP-fis1(2μ)* und *mtcherry*, wurden bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase in SD-Medium angezogen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. (Rechts) Überlagerung der GFP und mtCherry Fluoreszenz. Die Fluoreszenzbilder stellen Projektionen der maximalen Intensität von 10 z-Ebenen dar. Größenstandard: 5 μ m (Förtsch et al., 2011).

3.7 Lokalisation von Myo2 auf der mitochondrialen Oberfläche

Bisher gab es nur indirekte Hinweise dafür, dass Myo2 auf der mitochondrialen Oberfläche lokalisiert ist. So kann bei einem *in vitro* Aktinbindeassay die Bindung von Mitochondrien an polymerisierte Aktinfilamente durch Zugabe von Antikörper gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2 aufgehoben werden (Altmann et al., 2008). *In vivo* wurde Myo2 mittels Immunfluoreszenz und Myo2-GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie hauptsächlich in den Wachstumszonen der Zelle an der Knospenspitze und dem Knospenhals lokalisiert (Lillie und Brown, 1994; Huh et al., 2003). Jedoch blieben aufgrund von schwachem Fluoreszenzsignal des chromosomal kodierten Myo2-GFP und der Bindung des Motors an zahlreiche Cargos Versuche, eine Colokalisation von Myo2 und Mitochondrien nachzuweisen, bislang erfolglos. Um eine mögliche Lokalisation von Myo2 Mitochondrien zu überprüfen, wurde eine mitochondriale Lokalisation von Myo2 mittels Immuno-EM untersucht. Dafür wurden Mitochondrien über differentielle und anschließend Saccharosedichtegradienten Zentrifugation aus dem wildtypischen Stamm D273-10B isoliert. Nach Fixierung in Glutaraldehyd und Einbettung in LR Gold™ Harz wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Diese wurden mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2 (α -Myo2(CBD)) sowie mit Gold gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert und mittels Transmissions-EM untersucht. Bei Mitochondrien, die durch ihre Doppelmembran eindeutig identifiziert werden konnten, war eine Markierung durch Immunogold auf der Oberfläche zu finden (Abb. 24A). Um die Spezifität der Markierung zu überprüfen, wurden von den Mitochondrien vor der Fixierung mit Glutaraldehyd die peripher gebundenen Proteine mittels Salzextraktion entfernt. Daneben wurden Außenmembranproteine mit Hilfe von Trypsin abverdaut. Zu erwarten wäre dabei eine Abnahme der Myo2 Antigene und somit eine Reduzierung der Menge des gebundenen Immunogold je Organell. Als weitere Kontrolle wurden Mitochondrien aus einem *TetO₇-myo2* Stamm isoliert, der *MYO2* unter Kontrolle eines reprimierbaren Promotors trägt. Zugabe von Doxycyclin zum Medium führt zur Reprimierung des Promotors und es kommt zur Depletion von Myo2. Ohne Doxycyclin wird *MYO2* hingegen überexprimiert (Mnaimneh et al., 2004; Altmann et al., 2008). Bei Salzextraktion, Trypsinverdau sowie Reprimierung des *TetO₇-myo2* Allels konnte eine Reduzierung des Immunogold Signals auf der mitochondrialen Oberfläche beobachtet werden, wohingegen die Überexpression von *MYO2* zu mehr Immunogold auf den Mitochondrien im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp führte (Abb. 24B; Tab.8). Diese Beobachtungen deuten auf eine spezifische Immundekoration von Myo2 hin und lassen auf eine Lokalisation von Myo2 auf der mitochondrialen Oberfläche schließen (Förtsch et al., 2011).

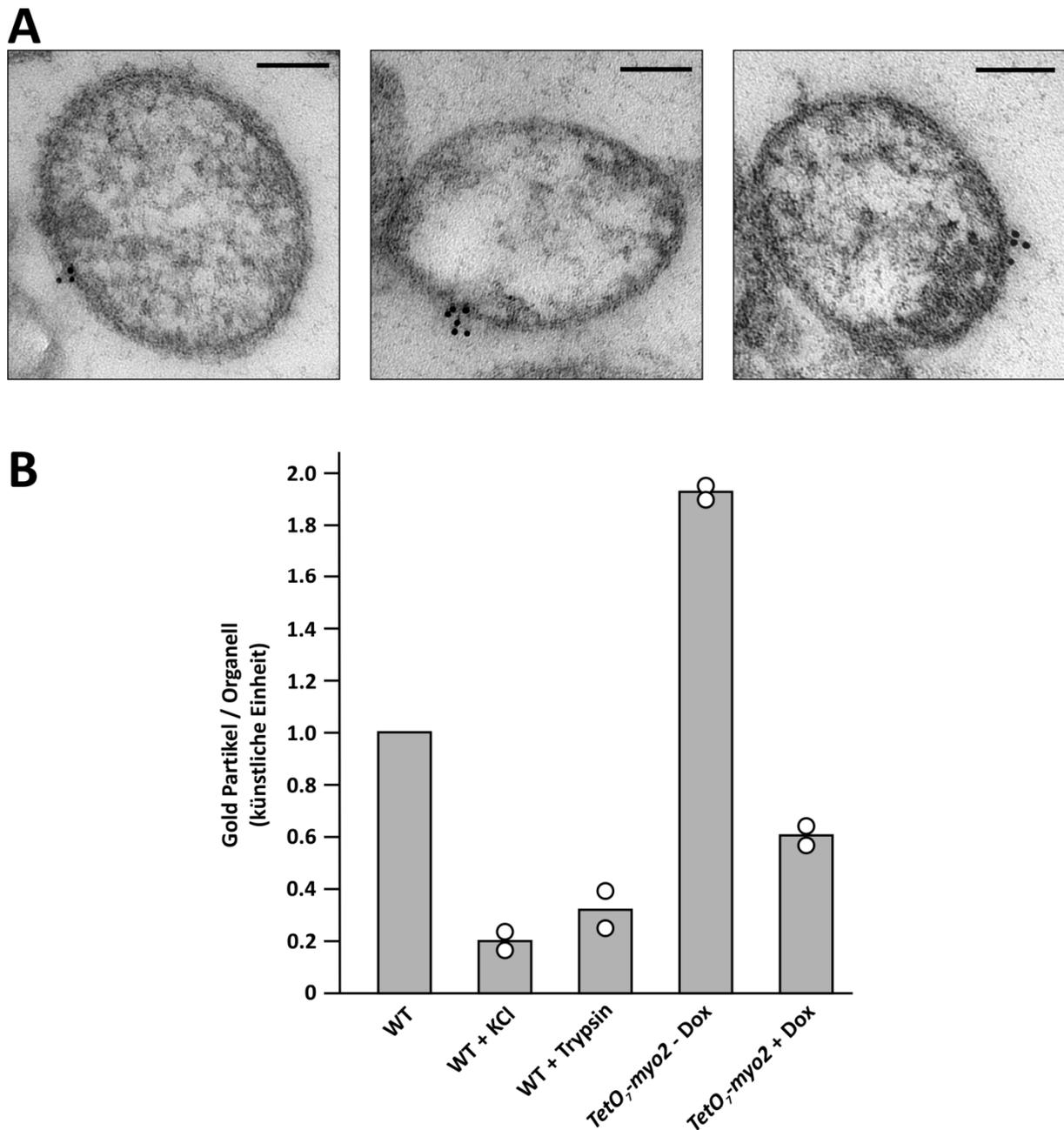


Abbildung 24) Lokalisation von Myo2 auf der Oberfläche von Mitochondrien (in Zusammenarbeit mit Eric Hummel).
A) Mitochondrien wurden aus WT Zellen isoliert und mittels Zentrifugation über einen Saccharose Dichtegradienten aufgereinigt. Bei der Analyse durch *postembedding* Immuno-EM wurde affinitätsgereinigter Antikörper gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2 verwendet. Größenstandard: 100 nm. **B)** WT Mitochondrien wurden entweder unbehandelt analysiert (WT), mit hoher Salzkonzentration extrahiert (WT+KCl) oder mit Trypsin verdaut (WT+Trypsin). Aus dem *TetO₇-myo2* Stamm wurden die Mitochondrien in Abwesenheit (TetO₇-Dox) oder Anwesenheit (TetO₇+Dox) von Doxycyclin extrahiert. Die Mitochondrien wurden mittels Immuno-EM wie in **A)** analysiert. Es wurden zwischen 106 und 341 Mitochondrien je Probe auf die Anwesenheit von Goldpartikeln hin untersucht. Die Anzahl der Goldpartikel pro Organell wurde in Relation zur unbehandelten WT Probe gesetzt, die im gleichen Experiment untersucht wurde. Ergebnisse sind Mittelwerte von zwei unabhängigen Markierungsexperimenten (Tab. 8). Die einzelnen Datenpunkte werden durch Kreise repräsentiert (Förtsch et al., 2011).

Tabelle 8) Quantifizierung der Immunmarkierung von Myo2 auf isolierten Mitochondrien (in Zusammenarbeit mit Eric Hummel). Die Mitochondrien wurden wie in Abb. 24 behandelt. Zusammen mit einer WT Kontrolle wurde jede Probe in zwei unabhängigen Markierungsexperimenten analysiert. Mindestens 100 Organellen wurden pro Probe (Spalte 1) auf Goldmarkierung hin überprüft. Die Summe aus den Goldpartikeln in der Nähe von Membranen (Spalte 3), im Lumen von Organellen (Spalte 4), und außerhalb von Organellen (Spalte 5) ergibt die Gesamtanzahl an Goldpartikeln (Spalte 2). Goldpartikel im Lumen und außerhalb der Organellen wurden als unspezifischer Hintergrund betrachtet. In der Nähe von Membranen mit einer Entfernung von höchstens 35 nm sind jedoch die Signale zu erwarten, die auf eine Markierung von Myo2 hindeuten. Die Länge der Membranen (Spalte 6) in den Dünnschnitten wurde bestimmt, um mögliche Größenunterschiede der Organellen in den einzelnen Präparationen zu berücksichtigen. Die Anzahl der Goldpartikel in der Nähe der Membranen wurde berechnet relativ zur Länge der Organellmembranen (Spalte 7) und der Anzahl der Organellen (Spalte 9). Diese relativen Zahlen wurden in einer künstlichen Einheit angegeben (Spalte 8 und 10), wobei der Wert der WT-Probe auf 1 gesetzt wurde. Dadurch konnten unterschiedliche Markierungsexperimente miteinander verglichen werden. Die Werte von Spalte 10 (hervorgehoben in Gelb) wurden für Abb. 24 verwendet. Der Quotient aus der Gesamtanzahl der Goldpartikel in der Nähe von Membranen und der Gesamtanzahl der Goldpartikel in der Probe (Spalte 11) gibt Aufschluss über die Spezifität der Goldmarkierung in jeder Probe. In verschiedenen Markierungsreaktionen der gleichen Probe sollten sich ähnliche Werte ergeben (d. h. WT sollte ähnlich sein in den Experimenten 1, 2 und 3; WT + KCl sollte ähnlich sein in den Experimenten 1 und 2, etc.). Die Werte in Spalte 8 und 10 spiegeln eine spezifische Markierung wider und sollten sich mit unterschiedlichem Myo2 Proteinlevel auf den Mitochondrien ändern (Förtsch et al., 2011).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Experiment 1											
WT	221	506	274	110	122	220	1.25	1	1.24	1	0.54
WT + KCl	126	168	37	26	105	243	0.15	0.12	0.29	0.23	0.22
<i>TetO₇-myo2</i> - Dox	108	371	256	51	77	129	1.99	1.59	2.37	1.91	0.69
<i>TetO₇-myo2</i> + Dox	199	540	156	118	266	264	0.59	0.47	0.78	0.63	0.29
Experiment 2											
WT	341	430	287	70	73	339	0.85	1	0.84	1	0.67
WT + KCl	106	81	15	23	43	227	0.07	0.08	0.14	0.17	0.19
WT + Trypsin	139	262	46	76	140	271	0.17	0.2	0.33	0.39	0.18
<i>TetO₇-myo2</i> - Dox	160	556	260	131	165	247	1.05	1.24	1.63	1.94	0.47
<i>TetO₇-myo2</i> + Dox	202	336	99	102	135	341	0.29	0.34	0.49	0.58	0.29
Experiment 3											
WT	196	153	95	24	34	238	0.40	1	0.48	1	0.62
WT + Trypsin	132	107	16	14	77	191	0.08	0.2	0.12	0.25	0.15

1) Gesamtanzahl der untersuchten Organellen

2) Gesamtanzahl der Goldpartikel

3) Gesamtanzahl der Goldpartikel in der Nähe von Membranen

4) Gesamtanzahl der Goldpartikel im Lumen von Organellen

5) Gesamtanzahl der Goldpartikel außerhalb von Organellen

11) Verhältnis der Gesamtanzahl der Goldpartikel in der Nähe von Membranen zur Gesamtanzahl von Goldpartikeln

6) Gesamtlänge der Organellenmembranen (μm)

7) Gesamtanzahl der Goldpartikel in der Nähe von Membranen pro Membranlänge (μm^{-1})

8) Gold pro Membran (künstliche Einheit, WT=1)

9) Gesamtanzahl der Goldpartikel in der Nähe von Membranen pro Gesamtanzahl der Organellen

10) Gold pro Organell (künstliche Einheit, WT=1)

3.8 Untersuchungen zur Rolle von *MMR1* und *YPT11* bei der Vererbung von Mitochondrien

3.8.1 *ypt11Δ* interagiert genetisch mit den Allelen *myo2(Q1233R)*, *myo2(L1301P)* und *myo2(LQ)*

Ypt11 gehört zur Klasse der kleinen Rab-GTPasen, interagiert mit Myo2 und ist an der mitochondrialen Vererbung beteiligt. So ließ sich eine Interaktion zwischen der Cargo-Bindedomäne von Myo2 und Ypt11 bei einem *Yeast two-hybrid assay* als auch durch Coimmunopräzipitation finden. Darüber hinaus interagiert *ypt11Δ* mit einigen Allelen von *myo2* auf Genebene (Itoh et al., 2002). Wird *YPT11* überexprimiert, so akkumulieren Mitochondrien in der Knospe oder am Knospenhals. Dies wiederum deutet darauf hin, dass Ypt11 den anterograden Transport von Mitochondrien positiv beeinflusst (Itoh et al., 2004; Frederick et al., 2008).

Im Folgenden wurde überprüft, ob das Deletionsallel *ypt11Δ* mit *myo2* Allelen, die die mitochondriale Verteilung beeinflussen, genetisch interagiert. Dazu wurden *YPT11* und *ypt11Δ* Stämme verwendet, die eine chromosomale Deletion von *MYO2* und eine wildtypische Kopie des essentiellen *MYO2*-Gens auf einem Plasmid mit *URA3*-Marker besitzen. Diese Stämme wurden mit Plasmiden transformiert, welche das *myo2(LQ)* und/oder das *myo2-fis1(2μ)* Allel exprimieren. Solange die Stämme über das *MYO2* Allel auf dem *URA3*-Plasmid verfügten, konnte im Wachstum kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 25). Um die Stämme von dem *URA3*-Plasmid und damit dem wildtypischen Allel von *MYO2* zu befreien, wurden sie auf Medienplatten mit 5-fluororotischer Säure (5-FOA) inkubiert. Da das Genprodukt von *URA3* die 5-FOA zum toxischen Intermediat 5-Fluoruracil umsetzt, kann damit auf Verlust des *URA3*-Plasmides selektiert werden. Wie erwartet war der Verlust von *MYO2* letal in Stämmen ohne weiteres *myo2* Allel inklusive *myo2-fis1*. Dies bedeutet auch, dass das Fusionsprotein Myo2-Fis1 die essentielle Rolle von Myo2 beim Transport anderer Organellen und besonders der sekretorischen Vesikel nicht kompensieren kann. Die Stämme mit dem *myo2(LQ)* Allel mit und ohne *myo2-fis1(2μ)* zeigten nach Verlust des *MYO2* Plasmids einen schwachen Wachstumsdefekt im wildtypischen *YPT11* Hintergrund. Die Kombination aus der *myo2(LQ)* Mutation und *ypt11Δ* führt jedoch zur Letalität (Abb. 25). Bereits Itoh et al. (2002) beobachteten synthetische Letalität von *ypt11Δ* mit dem *myo2-573^{ts}* Allel, welches sechs Mutationen in der Cargo-Bindedomäne von Myo2 besitzt. Synthetische Letalität kann dabei durch die Kombination von zwei nichtessentiellen Mutationen auftreten, wenn diese entweder in zwei verschiedenen oder im gleichen Pathway zu finden sind (Boone et al., 2007). Nachdem Ypt11 und Myo2 physikalisch interagieren (Itoh et al., 2002), scheint es wahrscheinlich, dass diese im gleichen Pathway wirken. Interessanterweise kann die Letalität von *ypt11Δ/myo2(LQ)* durch Expression von

myo2-fis1(2 μ) aufgehoben werden (Abb. 25). Dies deutet darauf hin, dass ein Stoppen des mitochondrialen Transportes das Überleben der Zellen verhindert. Aus diesem Grunde wird gefolgert, dass die Myo2-abhängige Vererbung von Mitochondrien essentiell ist für das Überleben der Zellen.

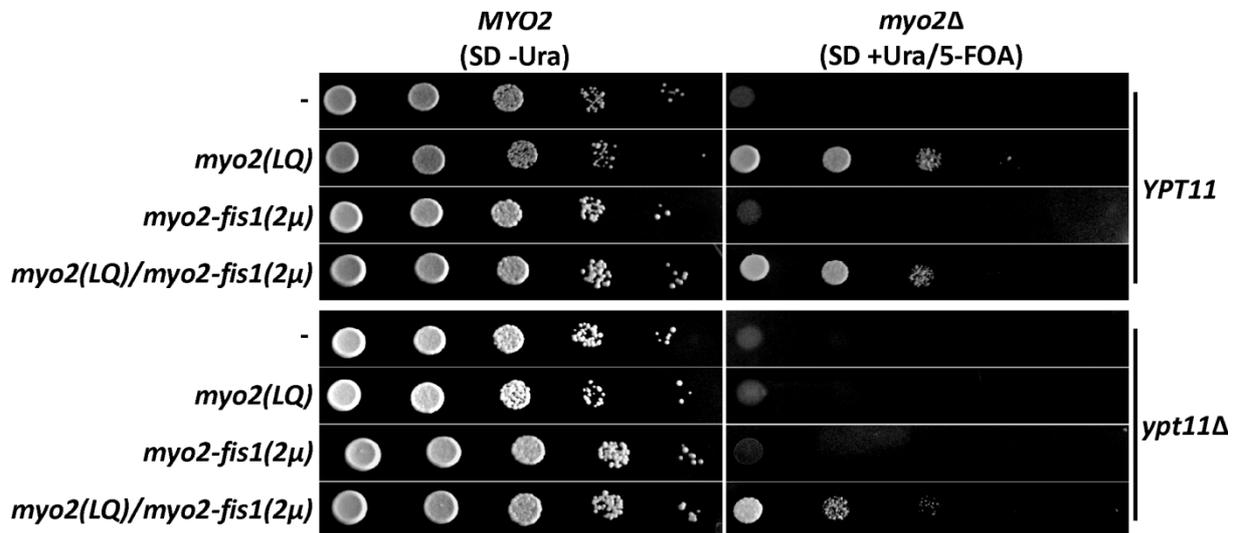


Abbildung 25) Das *myo2(LQ)* Allel ist synthetisch letal mit *ypt11Δ*. Es wurde das Wachstum von Stämmen untersucht, die eine chromosomale *myo2::kanMX4* Deletion und das *MYO2* WT Allel auf einem Plasmid mit *URA3*-Marker tragen. Zusätzlich waren die Stämme entweder im *YPT11* WT (oben) oder im *ypt11Δ* Hintergrund (unten) mit dem Leervektor (-), einem *myo2(LQ)* Plasmid, einem *myo2-fis1(2 μ)* Plasmid, oder *myo2(LQ)* Plasmid und *myo2-fis1(2 μ)* Plasmid gemeinsam transformiert. Die Zellen wurden über Nacht in SD-Medium mit Uracil angezogen, um den Verlust des *MYO2* Plasmids zu erlauben. Dann wurde eine 10-fache Verdünnungsreihe auf SD-Platten ohne Uracil (links) getüpfelt, um das Wachstum von Zellen mit WT Myo2 zu ermöglichen. Die SD-Platten mit Uracil und 5-FOA (rechts) dienten der Selektion von Zellen, die das WT *MYO2* Plasmid verloren hatten. Die SD – Ura Platten wurden drei Tage bei 30°C und die SD + Ura/5-FOA Platten wurden fünf Tage bei 30°C inkubiert (Förtsch et al., 2011).

Darüber hinaus wurde überprüft, ob eine Deletion von *YPT11* mit einem synthetischen mitochondrialen Phänotyp in den lebensfähigen Doppelmutanten *ypt11Δ/myo2(Q1233R)* und *ypt11Δ/myo2(L1301P)* einhergeht. Dabei konnte beobachtet werden, dass ein Fehlen von Ypt11 zu einer Verstärkung des mitochondrialen Transport- und Morphologiedefektes in *myo2(Q1233R)* und *myo2(L1301P)* führt (Abb. 26; Tab. 9). In der *myo2(L1301P)* Mutante im wildtypischen *YPT11* Hintergrund hatten etwa 15% der Zellen keine Mitochondrien in der Knospe, wohingegen bis zu 90% der *ypt11Δ/myo2(L1301P)* Zellen einen mitochondrialen Vererbungsdefekt besaßen. Durch Expression von *myo2-fis1(2 μ)* konnten diese Morphologie- und Vererbungsdefekte jedoch effizient gerettet werden (Abb. 26; Tab. 9).

Tabelle 9) Mitochondriale Morphologiedefekte in *ypt11Δ/myo2* Doppelmutanten (in Zusammenarbeit mit Evelin Urban). Zellen, die eine chromosomale Deletion des *YPT11* und des *MYO2* Gens, sowie das WT *MYO2* oder mutante *myo2* Allele auf einem Plasmid trugen, wurden wie in Tab. 7 angezogen und analysiert. Die Morphologie wurde anhand der Kategorien in Abb. 13A ausgezählt. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen (n=100) und die Standardabweichung ist angegeben (Försch et al., 2011).

Temp. Mitochondriale Morphologie (% der Zellen)						
	Plasmid 1	Plasmid 2	Kategorie I	Kategorie II	Kategorie III	Kategorie IV
30°C	ohne Plasmid	<i>MYO2</i>	77.0±4.7	15.0±5.3	8.0±1.0	0
		<i>myo2(Q1233R)</i>	20.6±3.2	49.4±3.5	30.0±3.6	0
		<i>myo2(L1301P)</i>	5.4±3.2	20.3±7.2	74.3±4.0	0
	<i>myo2-fis1</i> (<i>ARS-CEN</i>)	<i>MYO2</i>	48.7±8.1	19.9±2.6	9.7±1.2	21.7±8.5
		<i>myo2(Q1233R)</i>	49.7±7.2	25.0±1.7	1.7±2.1	23.6±6.7
		<i>myo2(L1301P)</i>	26.3±3.5	30.3±2.9	8.0±2.6	35.4±4.0
	<i>myo2-fis1</i> (2μ)	<i>MYO2</i>	30.3±0.6	14.3±1.5	4.0±1.7	51.4±2.5
		<i>myo2(Q1233R)</i>	19.0±8.2	35.3±4.0	6.7±0.6	39.0±5.2
		<i>myo2(L1301P)</i>	19.3±7.6	19.0±1.0	0.7±0.6	61.0±6.6
37°C	ohne Plasmid	<i>MYO2</i>	38.0±4.6	66.0±8.2	0	0
		<i>myo2(Q1233R)</i>	4.7±1.5	46.0±4.4	49.3±3.1	0
		<i>myo2(L1301P)</i>	0	6.0±1.7	94.0±1.7	0
	<i>myo2-fis1</i> (<i>ARS-CEN</i>)	<i>MYO2</i>	10.7±2.9	52.3±6.7	5.3±3.2	31.7±4.7
		<i>myo2(Q1233R)</i>	14.7±3.8	45.7±2.9	8.3±2.1	31.3±3.1
		<i>myo2(L1301P)</i>	11.0±1.7	42.3±4.0	7.7±3.5	39.0±3.5
	<i>myo2-fis1</i> (2μ)	<i>MYO2</i>	9.3±0.6	39.0±2.0	2.0±1.7	49.7±0.6
		<i>myo2(Q1233R)</i>	1.3±1.6	42.7±2.1	13.0±2.6	43.0±3.0
		<i>myo2(L1301P)</i>	5.7±1.5	28.7±2.1	1.6±2.9	64.0±2.6
		>60%	>40%	>20%	<20%	

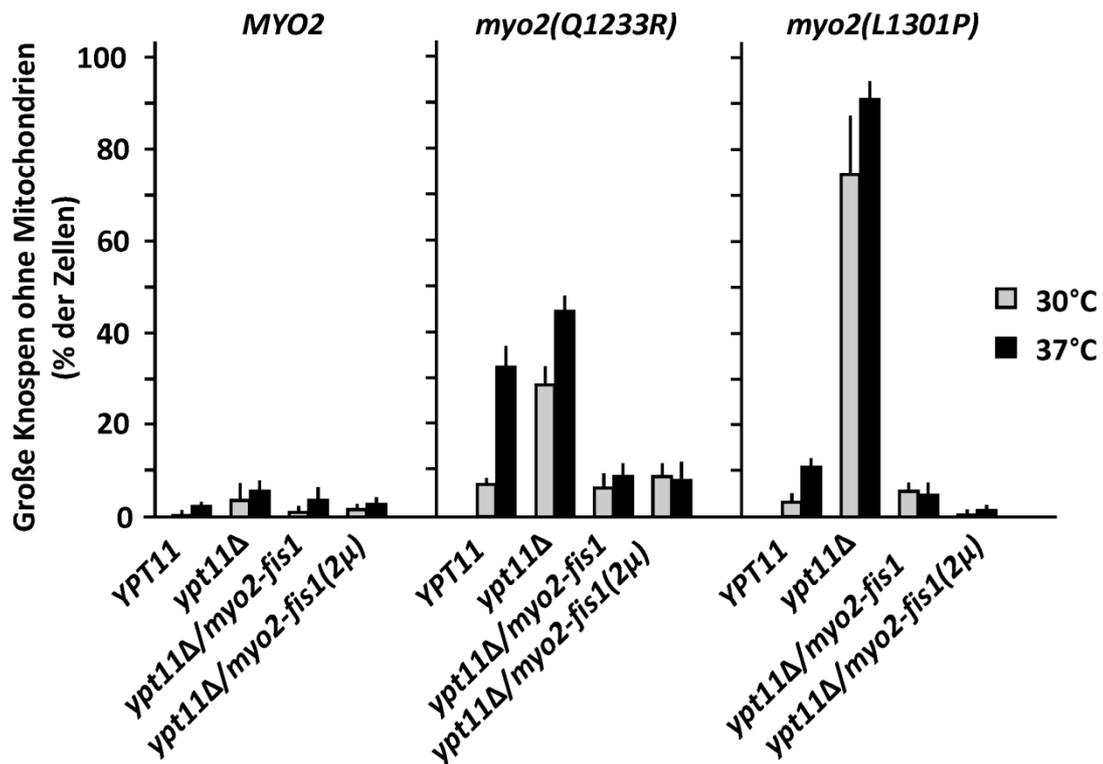


Abbildung 26) Das *myo2(LQ)* Allel interagiert genetisch mit *myo2(Q1233R)* und *myo2(L1301P)* (in Zusammenarbeit mit Evelin Urban). Die Zellen wurden wie in Abb. 13B angezogen und wie in 13C analysiert. Die Ergebnisse stammen aus der selben Serie von Experimenten (Förtsch et al., 2011).

Deletion von *YPT11* führt auch zu einem Verlust der polarisierten Verteilung des Golgi (Arai et al., 2008) und einem schwachen Defekt in der Verteilung des ER (Buvelot Frei et al., 2006). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob sich in den *ypt11Δ/myo2* Doppelmutanten auch synthetische Phänotypen dieser beiden Zellorganellen beobachten ließen. So konnte im Einklang mit den Ergebnissen von Arai et al. (2008) beobachtet werden, dass in *ypt11Δ* Zellen der *trans*-Golgi Marker nicht mehr polarisiert in der Knospe oder am Knospenhals, sondern über die ganze Zelle verteilt vorlag. Bei der Verteilung des *trans*-Golgi wurden keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Stämmen *ypt11Δ*, *ypt11Δ/myo2(Q1233R)* und *ypt11Δ/myo2(L1301P)* festgestellt (Abb. 27A). Dies deutet darauf hin, dass die *myo2* Allele gemeinsam mit einer Deletion von *YPT11* in den untersuchten Stämmen nicht zu einem synthetischen Defekt der Vererbung des Golgi führen. Ebenso besaßen mehr als 90% der kleinen Knospen der *myo2* Mutanten in An- oder Abwesenheit von *YPT11* kortikales ER (Abb. 19; Abb. 27B).

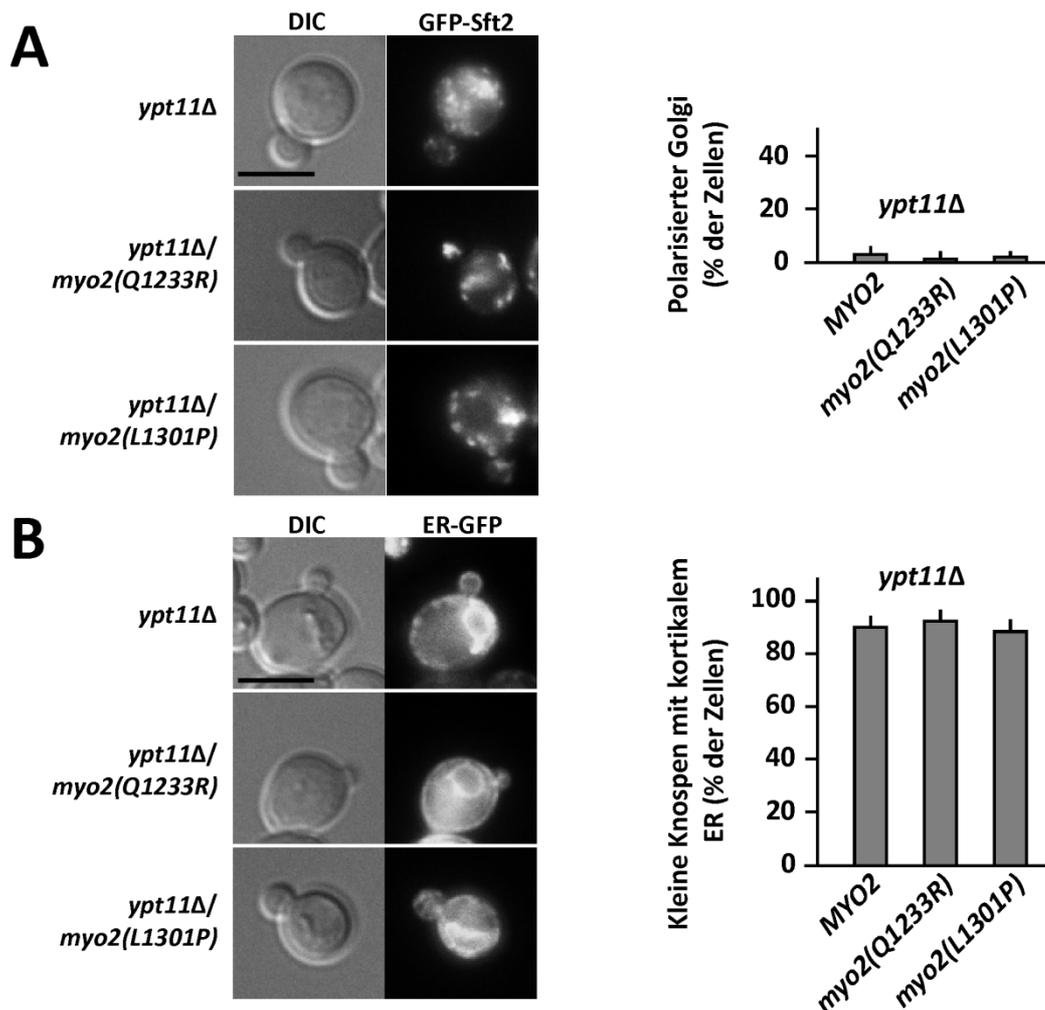


Abbildung 27) Die genetische Interaktion von *ypt11Δ* und *myo2(Q1233R)* oder *myo2(L1301P)* wirkt sich nicht auf den Golgi oder das ER aus. A) *ypt11Δ* Zellen mit einer chromosomalen Deletion von *MYO2*, die Plasmide für eine Expression für WT (*MYO2*), *myo2(Q1233R)*, oder *myo2(L1301P)* trugen. *GFP-SFT2*-exprimierende Zellen wurden in SD-Minimalmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. (Links) DIC Bild einer repräsentativen Zelle. (Rechts) Projektion der maximalen Intensität eines z-Stapels bestehend aus 10 fokalen Ebenen. B) *ER-GFP*-exprimierende Zellen wurden wie in A) untersucht mit der Ausnahme, dass die Fluoreszenzaufnahmen eine fokale Ebene repräsentieren, die auf die Knospe fokussiert ist. A-B) Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen (n=100) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider, wobei die Größe der Knospe in B) höchstens ein Drittel der Mutterzelle betrug. Größenstandard: 5 μ m (Förtsch et al., 2011).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das *myo2(Q1233R)* oder *myo2(L1301P)* Allel gemeinsam mit einer Deletion von *YPT11* zu einem synthetischen mitochondrialen Defekt führt. Gleichzeitig ist die Vererbung des Golgi und ER in diesen Stämmen jedoch nicht beeinträchtigt, da kein Unterschied in der Verteilung dieser Organellen zwischen der *ypt11Δ* Einzel- sowie den entsprechenden Doppelmutanten festgestellt werden konnte (Förtsch et al., 2011).

3.8.2 *mmr1Δ* zeigt keine negative genetische Interaktion mit dem *myo2(LQ)* Allel

Das Protein Mmr1 ist in der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert und wurde als *high-copy* Suppressor von *myo2-573^{ts}* entdeckt (Itoh et al., 2004). Mmr1 befindet sich hauptsächlich in den Mitochondrien der Knospe und bildet einen Komplex mit Myo2. Wie auch bei *YPT11* führt eine Überexpression von *MMR1* zur Akkumulation von Mitochondrien in der Knospe (Itoh et al., 2004; Frederick et al., 2008). Bei Überexpression von *MMR1* ist die Akkumulation von Mitochondrien in der Knospe jedoch unabhängig von der Anwesenheit von Ypt11 und anders herum. Daher wurde vorgeschlagen, dass Mmr1 und Ypt11 unabhängig voneinander agieren (Itoh et al., 2004).

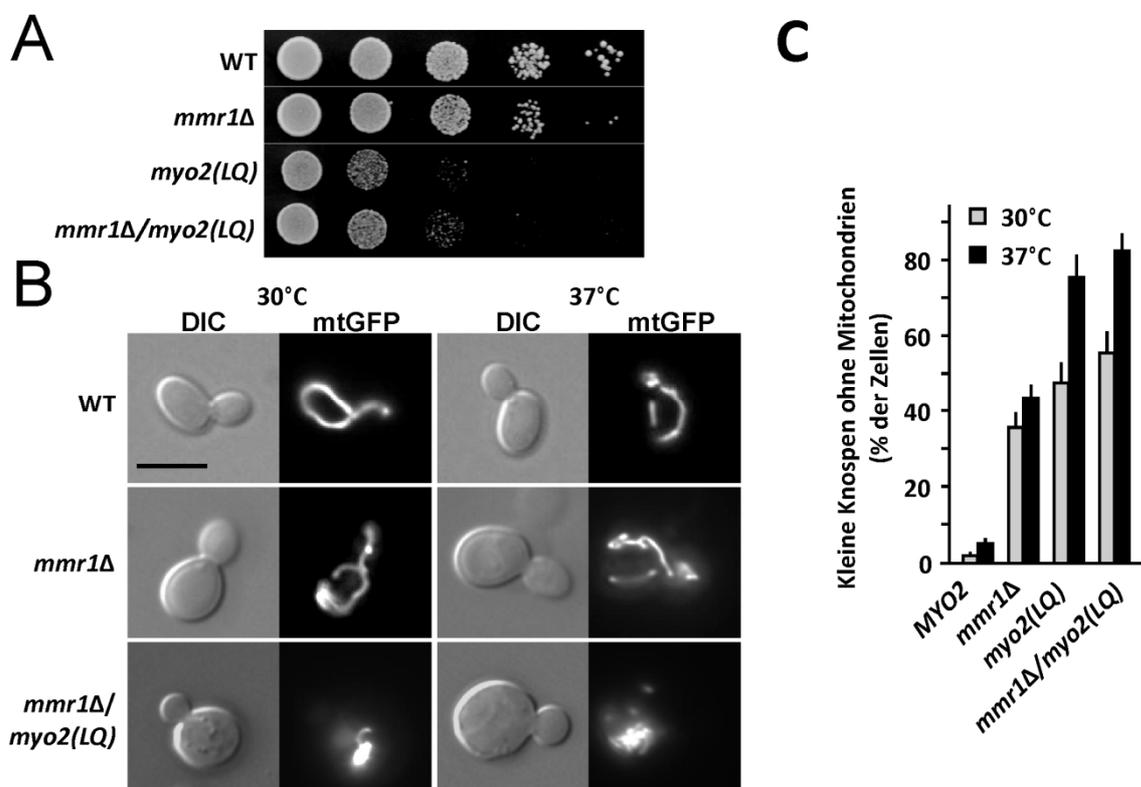


Abbildung 28) Zellen der *mmr1Δ/myo2(LQ)* Doppelmutante ähneln der *myo2(LQ)* Einzelmutante (in Zusammenarbeit mit Philipp Schmid). A) Eine 10-fache Verdünnungsreihe der Zellsuspensionen wurde auf YPD-Platten getüpfelt und für drei Tage bei 30°C inkubiert. B) Zellen, die *mtGFP* exprimierten, wurden bei der angegebenen Temperatur in YPD-Medium angezogen und mittels Fluoreszenzmikroskopie bei Raumtemperatur analysiert. (Links) DIC Bild, (rechts) GFP Fluoreszenz. Größenstandard: 5 μm . C) Die Zellen wurden wie in B) angezogen und es wurden kleine Knospen ohne Mitochondrien ausgezählt, wobei die Größe der Knospe höchstens ein Drittel der Mutterzelle betrug. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Auszählungen ($n=100$) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider (Förtisch et al., 2011).

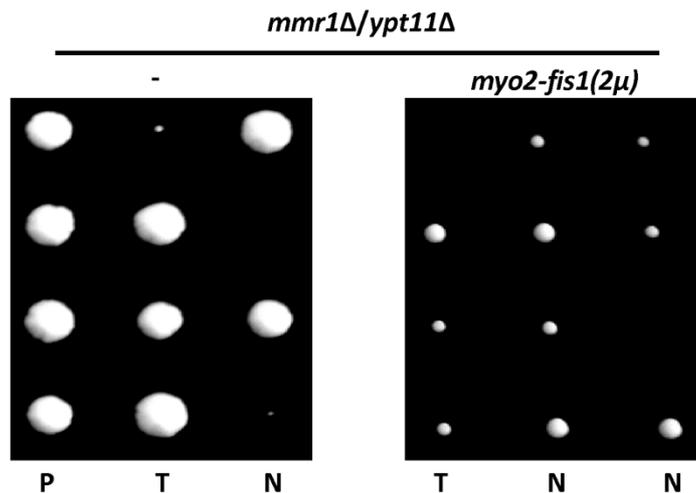
Um zu überprüfen, ob auch *mmr1Δ* genetisch mit *myo2(LQ)* interagiert, wurde eine Doppelmutante hergestellt und deren Phänotyp untersucht. Die Zellen von *mmr1Δ/myo2(LQ)* sind lebensfähig und der Wachstumsdefekt der *myo2(LQ)* Einzelmutante wurde durch zusätzliche Deletion des *MMR1* Gens nicht zusätzlich verstärkt (Abb. 28A). Zudem besitzen *mmr1Δ* Zellen Mitochondrien mit annähernd wildtypischem Phänotyp, wohingegen die Mitochondrien von *mmr1Δ/myo2(LQ)* starke Ähnlichkeit zu den Mitochondrien von *myo2(LQ)* aufweisen (Abb. 28B). Da *mmr1Δ* lediglich einen schwachen Effekt auf die Vererbung von Mitochondrien aufweist, erscheint es unwahrscheinlich, dass es sich bei Mmr1 um den mitochondrialen Myo2 Rezeptor handelt. Im Einklang mit den Beobachtungen von Itoh *et al.* (2004) konnte ein signifikanter Transportdefekt von Mitochondrien in kleine Knospen beobachtet werden, der in *myo2(LQ)* Zellen deutlich stärker ausgeprägt ist. Eine Kombination beider Mutationen führt allerdings nicht zu einer signifikanten Änderung des mitochondrialen Transportdefektes (Abb. 28C).

Epistasie kann als Situation definiert werden, in welcher ein Gen die Effekte einer Mutation an einem anderen Genlokus maskiert. Dadurch kann eine Aussage über die Reihenfolge zweier Genprodukte in einem Stoffwechselweg getroffen werden (Boone *et al.*, 2007). Da der Phänotyp der *mmr1Δ/myo2(LQ)* Doppelmutante dem der *myo2(LQ)* ähnelt, kann daraus geschlossen werden, dass *myo2(LQ)* epistatisch ist zu *mmr1Δ*. Dies legt den Schluss nahe, dass Myo2 bei der mitochondrialen Vererbung vor Mmr1 benötigt wird und damit eine übergeordnete Rolle spielt (Förtsch *et al.*, 2011).

3.8.3 Rettung der negativen synthetischen Interaktion von *mmr1Δ* und *ypt11Δ* durch das *myo2-fis1(2μ)* Konstrukt

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Doppeldeletion *mmr1Δ/ypt11Δ* letal ist (Itoh *et al.*, 2004). Dabei wurde der YPH Stammhintergrund verwendet (Sikorski und Hieter, 1989). In einer weiteren Analyse dieser beiden Gene gelang es, eine lebensfähige *mmr1Δ/ypt11Δ* Doppelmutante herzustellen. Dabei wurde jedoch der W303 (Altmann *et al.*, 2007) Stammhintergrund verwendet und die Doppelmutante wies einen starken Wachstumsdefekt auf (Frederick *et al.*, 2008). Da beide Gene eine Rolle beim mitochondrialen Transport spielen und eine Doppeldeletion beider Gene schwere Auswirkungen auf das Zellwachstum bis hin zur Letalität hervorruft, wurde überprüft, ob dieser Defekt durch Expression des *myo2-fis1(2μ)* Allels gerettet werden könne.

A



Tetradentyp	Plasmid	<i>tetratype</i> (T)	<i>parental ditype</i> (P)	<i>nonparental ditype</i> (N)	Anzahl der wachsenden Doppelmutanten
<i>theoretisch</i>		4	1	1	
<i>mmr1Δ/ypt11Δ</i>	-	3 (n=14)	1,7 (n=8)	1,3 (n=6)	0 (26)
<i>mmr1Δ/ypt11Δ</i>	<i>myo2-fis1(2μ)</i>	2,9 (n=14)	2,3 (n=11)	0,8 (n=4)	12 (22)

B

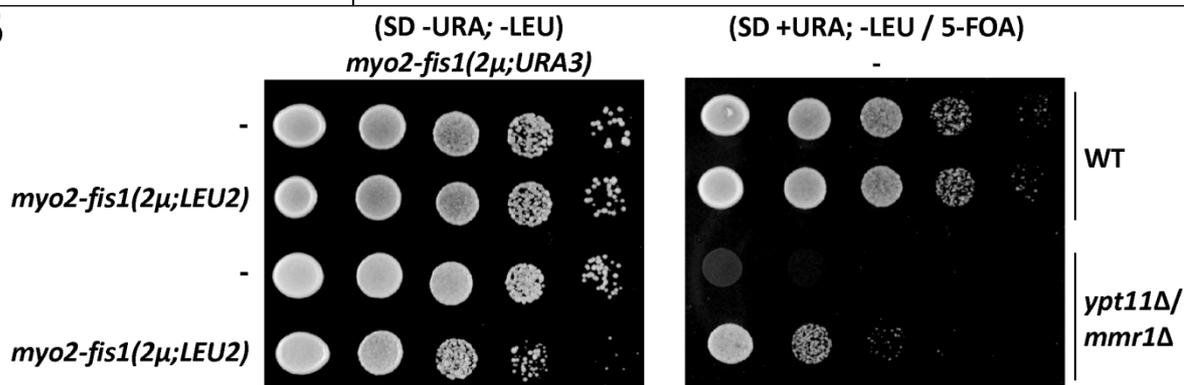


Abbildung 29) Die synthetische Letalität von *mmr1Δ/ypt11Δ* kann durch Expression von *myo2-fis1(2μ)* gerettet werden.
A) Aus BY4741 *mmr1Δ* und BY4742 *ypt11Δ* Zellen wurden diploide Zellen über Kreuzung erzeugt. Nach Sporulation wurden Tetraden dissektiert und für 4 (links) beziehungsweise 2 (rechts) Tage auf YPD-Platten bei 30°C inkubiert. Mittels YPD^{G418} wurde der Aufspaltungstyp analysiert, da nur die Stämme mit einer Gendeletion über eine Kanamycin-Resistenzkassette verfügen. Dabei war die Aufspaltung als *tetratype* (T), *nonparental ditype* (N) oder *parental ditype* (P) möglich. Die Gendeletionen der Doppelmutanten, die für weitere Analysen verwendet wurden, konnten über PCR bestätigt werden.
B) Es wurde das Wachstum des WT und der *mmr1Δ/ypt11Δ* Doppelmutante untersucht. Dabei trugen die Stämme ein *myo2-fis1(2μ; URA3)* Plasmid und zusätzlich entweder den Leervektor oder ein *myo2-fis1(2μ; LEU2)* Plasmid. Die Zellen wurden über Nacht in SD-Medium mit Uracil angezogen, um den Verlust des *myo2-fis1(2μ; URA3)* Plasmids zu erlauben. Dann wurde eine 10-fache Verdünnungsreihe auf SD-Platten ohne Uracil (links) getüpfelt. Die SD-Platten mit Uracil und 5-FOA (rechts) dienen der Selektion von Zellen, die das *myo2-fis1(2μ; URA3)* Plasmid verloren hatten. Die SD – Ura Platten wurden drei Tage bei 30°C und die SD + Ura/5-FOA Platten wurden fünf Tage bei 30°C inkubiert

Ein BY4741 *ypt11Δ* Stamm wurde mit einem BY4742 *mmr1Δ* Stamm mit oder ohne *myo2-fis1(2μ)* gekreuzt und es wurden Tetraden dissektiert. In der Doppelmutante *mmr1Δ/ypt11Δ* im BY Stammhintergrund spiegelt sich ein starker Wachstumsdefekt in der Bildung von Mikrokolonien wider. Eine Analyse von 28 Tetraden bestätigte dies, da jede Kolonie der 26 Doppelmutanten einen starken Wachstumsdefekt zeigte. Mit dem *myo2-fis1(2μ)* Allel wurden 29 Tetraden untersucht, wobei eine Analyse des Aufspaltungsverhältnisses 22 Kolonien von Doppelmutanten ergab. Im Gegensatz zu den *mmr1Δ/ypt11Δ* Stämmen ohne *myo2-fis1(2μ)* bildeten 12 der 22 Doppelmutanten eine Koloniegröße vergleichbar mit dem Wildtyp oder den jeweiligen Einzelmutanten (Abb. 29A). Da die verwendeten *multi-copy (2μ)* Plasmide im Gegensatz zu den *single-copy (ARS/CEN)* Plasmiden kein Centromer besitzen, werden sie weniger zuverlässig in die Tochterzelle vererbt. In diesem Versuch wurde das *myo2-fis1(2μ)* Plasmid verwendet, was die Ursache dafür sein könnte, dass nur in 55% der Doppelmutanten der Wachstumsdefekt gerettet wird.

Daraufhin wurde überprüft, ob die Rettung des Wachstumsdefektes durch Expression des Gens für das Myo2-Fis1 Fusionsprotein durch Verlust des *myo2-fis1* Plasmids aufgehoben werden kann. Deshalb wurde bei Stämmen des Wildtyps und der *mmr1Δ/ypt11Δ* Doppelmutante, die über das *myo2-fis1(2μ; URA3)* Plasmid und das *myo2-fis1(2μ; LEU2)* Plasmid oder den entsprechenden Leervektor verfügten, im Tüpfeltest mittels 5-FOA auf Verlust des *myo2-fis1(2μ; URA3)* Plasmids selektiert. Solange die Zellen über das Plasmid mit *URA3*-Marker zur Expression von *myo2-fis1* verfügten, ließ sich kein Unterschied im Wachstum feststellen. Auf Medium mit 5-FOA jedoch konnten lediglich diejenigen Zellen der *mmr1Δ/ypt11Δ* Doppelmutante wachsen, die zuvor zusätzlich mit dem *myo2-fis1(2μ; LEU2)* Plasmid transformiert worden waren (Abb. 29B). Aus diesem Grund kann festgestellt werden, dass eine Deletion von *YPT11* und *MMR1* im BY Stammhintergrund zu einem starken synthetischen Defekt führt, der durch Expression des *myo2-fis1(2μ)* Allels gerettet werden kann.

3.8.4 Verankerung von Mitochondrien am Zellcortex

Für die mitochondriale Verteilung ist ein Gleichgewicht aus anterogradem und retrogradem Transport ausschlaggebend. Um einen Rücktransport zu verhindern, ist jedoch auch davon auszugehen, dass die Mitochondrien in der Knospe verankert werden. Dabei könnte Mmr1 eine Rolle spielen. So kann in *mmr1Δ* Zellen mit kleiner Knospe ein mitochondrialer Vererbungsdefekt beobachtet werden, wohingegen große Knospen in der Regel über Mitochondrien verfügen (Abb. 28C). Der spezifische Phänotyp von Zellen, die *myo2-fis1* und einen Mitochondrienmarker

exprimieren, ist eine Akkumulation von Mitochondrien in der Knospe. Daneben erstrecken sich aber ein oder häufig zwei mitochondriale Tubuli in die Mutterzelle, deren Enden sich kaum bewegen (Abb. 20). Hier könnte ein Komplex von Num1 und Dnm1 eine Rolle bei der Verankerung der Mitochondrien am Zellcortex spielen (Cervený et al., 2007). Für die Ausbildung dieser Komplexe ist zudem Mdm36 von Bedeutung. So bewegen sich die Mitochondrien bei einer Depletion von Num1 oder Mdm36 schneller als im Wildtyp (Hammermeister et al., 2010). Interessanterweise weisen Doppelmutanten aus *num1Δ* und *mmr1Δ* eine positive genetische Interaktion auf (Hoppins et al., 2011). Da dies auf eine antagonistische Rolle der beiden Genprodukte hindeuten könnte, sollte eine Rolle von Mmr1 bei der Verankerung von Mitochondrien in der Knospe untersucht werden.

Hierfür wurde die Verteilung von Mitochondrien in verschiedenen Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Für schwache Effekte könnte jedoch eine Aussage, ob sich Mitochondrien in der Knospe befinden oder nicht, zu grob sein. Daher wurde ein *assay* entwickelt, mit dessen Hilfe man die mitochondriale Masse in der Knospe im Verhältnis zur Mutterzelle bestimmen kann. Dabei wurde angenommen, dass das mtGFP Signal proportional zur Menge an Mitochondrien sei. So wurde die Fluoreszenzintensität des mtGFP Signals in der Knospe ins Verhältnis gesetzt zum mtGFP Signal in der Mutterzelle. Zusätzlich wurde das Volumen der Knospe und der Mutterzelle miteinander ins Verhältnis gesetzt. Überraschenderweise war das Verhältnis im Wildtyp größer als 1. Das bedeutet, dass sich jeweils bezogen auf das Volumen mehr Mitochondrien in der Knospe befinden als in der Mutterzelle. In *num1Δ* Zellen ist das Verhältnis etwas größer als im Wildtyp, wohingegen eine Deletion von *MMR1* dazu führt, dass die Mitochondrien stärker in der Mutterzelle lokalisiert sind als in der Knospe. Werden *NUM1* und *MMR1* zugleich deletiert, so führt das zu einem intermediären Phänotyp (Abb. 30; Tab. 10). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Num1 und Mmr1 antagonistische Prozesse in der Zelle ausüben. Da Num1 eine Rolle bei der Zellkortexverankerung von Mitochondrien in der Mutterzelle spielt (Cervený et al., 2007; Hammermeister et al., 2010), könnte Mmr1 bei deren Verankerung in der Knospe beteiligt sein.

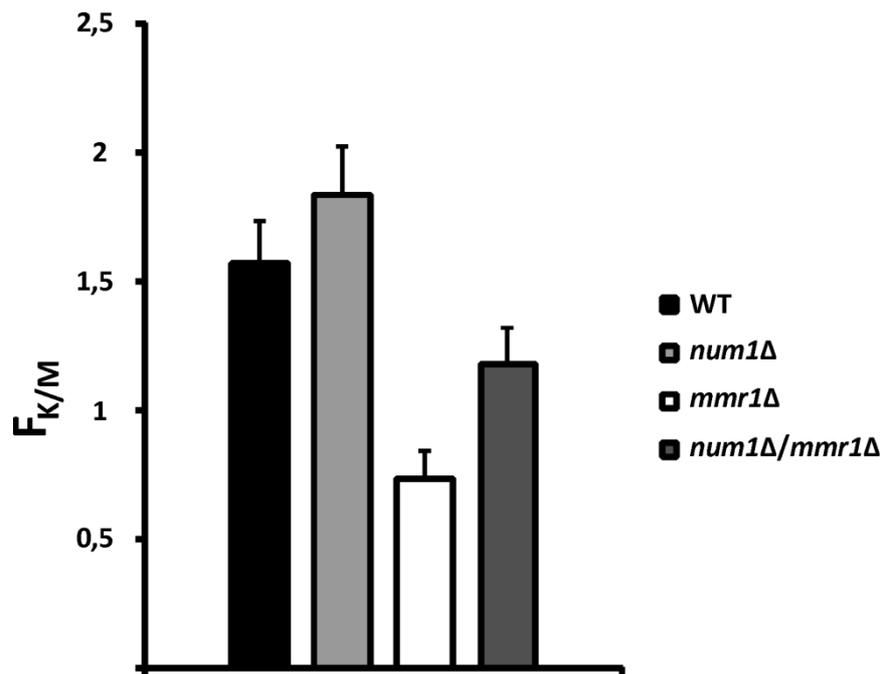


Abbildung 30) Menge an Mitochondrien in der Knospe im Verhältnis zur Mutterzelle. Zellen, die *mtGFP* exprimieren, wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in SD-Medium angezogen. Daraufhin wurden 3D-Fluoreszenzaufnahmen ($z=10$) gemacht und jeweils die Projektion der maximalen Fluoreszenzintensität erstellt. Mit der LAS AF Software (Leica) wurde anschließend die Knospe beziehungsweise die Mutterzelle umrandet. Dadurch wurden Werte für die Gesamtfluoreszenzintensität sowie die Fläche des umrandeten Bereiches erhalten. Aus der Fläche wurde unter Annahme einer Kugel auf das Volumen rückgeschlossen. Mit diesen Werten konnten die Summe der Fluoreszenzintensitäten der Knospe zur Mutter ($I_{K/M}$) und das Volumenverhältnis der Knospe zur Mutterzelle ($V_{K/M}$) bestimmt werden. Damit wurde schließlich das Fluoreszenzverhältnis der Knospe zur Mutterzelle bezogen auf das Volumen ($F_{K/M}$) berechnet. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen ($n \geq 100$) und die Standardabweichung ist angegeben.

Eine Deletion von *NUM1* hat starken Einfluss auf die mitochondriale Morphologie. So bildet sich ein zusammenhängendes Netzwerk aus, das einem Fischernetz gleicht. Dieser Phänotyp lässt sich auch in *dnm1Δ*, *fis1Δ* oder *mdm36Δ* finden, weshalb die bekannten Komponenten der Teilungsmaschinerie von Mitochondrien mit diesem *assay* untersucht wurden (Tab. 10). Während in *dnm1Δ* und *mdm36Δ* Zellen die Verteilung der Mitochondrien dem Wildtyp gleich, war in *fis1Δ* und *caf4Δ* Zellen das Verhältnis leicht zur Knospe hin verschoben. Da es sich jedoch um sehr schwache Effekte handelte, wurden noch einige Kontrollstämme untersucht. So waren in der *myo2(LQ)* Mutante deutlich mehr Mitochondrien in der Mutterzelle als in der Knospe, was sich im niedrigsten Verteilungsverhältnis ($0,59 \pm 0,17$) aller Mutanten niederschlug. Im Wildtyp und den Stämmen mit Deletion von *num1Δ* und *mmr1Δ* konnte bei zusätzlicher Expression von *myo2-fis1(2μ)* eine deutliche Verschiebung der mitochondrialen Verteilung hin zur Knospe detektiert werden. Überraschenderweise hatte jedoch die

Anwesenheit von Myo2-Fis1 kaum Einfluss auf die Verteilung der Mitochondrien in der *num1Δ/mmr1Δ* Doppelmutante, obwohl die Expression von *myo2-fis1(2μ)* in den jeweiligen Einzelmutanten zur Akkumulation von Mitochondrien in der Knospe führte (Tab. 10). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass *MMR1* eine Rolle spielt als Retentionsfaktor von Mitochondrien in der Knospe. Bei *mmr1Δ* Zellen werden die Mitochondrien demzufolge nach dem Transport in die Knospe nicht an der Knospenspitze verankert und wieder retrograd über den Knospenhals in die Mutterzelle transportiert.

Tabelle 10) Menge an Mitochondrien in der Knospe im Verhältnis zur Mutterzelle. Zellen der einzelnen Stämme wurden wie in Abb. 30 angezogen, mikroskopiert und ausgewertet. Die Quantifizierungen sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen ($n \geq 100$) und die Standardabweichung ist angegeben.

Stamm		$F_{K/M} = I_{K/M} * (V_{K/M})^{-1}$	Anzahl der Zellen (N)
WT		1,57±0,3	382
<i>num1Δ</i>		1,83±0,15	376
<i>mmr1Δ</i>		0,73±0,09	459
<i>num1Δ/mmr1Δ</i>		1,18±0,17	459
<i>dnm1Δ</i>		1,43±0,17	412
<i>mdm36Δ</i>		1,5±0,13	405
<i>fis1Δ</i>		1,66±0,16	481
<i>caf4Δ</i>		1,35±0,09	428
<i>myo2(LQ)</i>		0,59±0,17	447
WT	<i>myo2-fis1(2μ)</i>	4,3±0,49	424
<i>num1Δ</i>	<i>myo2-fis1(2μ)</i>	5,52±1,77	321
<i>mmr1Δ</i>	<i>myo2-fis1(2μ)</i>	4,27±0,58	311
<i>num1Δ/mmr1Δ</i>	<i>myo2-fis1(2μ)</i>	0,86±0,07	459

3.9 Suche nach dem mitochondrialen Myo2 Rezeptor

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Organell-spezifische Myo2 Rezeptoren identifiziert. Sehr gut ist dabei der vakuoläre Rezeptorkomplex bestehend aus Vac8 und Vac17 charakterisiert, wobei Vac8 in der Vakuolenmembran lokalisiert ist und über Vac17 mit der Cargo-Bindedomäne von Myo2 interagiert (Ishikawa et al., 2003). Ebenso ist bekannt, dass dieser Komplex in der Knospe

durch Abbau von Vac17, welches eine PEST Sequenz trägt, aufgelöst wird. Dabei handelt es sich um eine Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) Sequenz, die als Signal für den proteolytischen Abbau des Proteins sorgt. Im Falle der Degradation von Vac17 und dem Zerfall des vakuolären Myo2 Rezeptors wird verhindert, dass die Vakuole von der Knospenspitze zum Knospenhals fehllokalisiert wird (Tang et al., 2003). Inp2 stellt den peroxisomalen Rezeptor dar und es wird angenommen, dass ein Komplex bestehend aus Ypt11 und Ret2 eine wichtige Rolle beim Transport von Elementen des *trans*-Golgi spielt (Fagarasanu et al., 2006; Arai et al., 2008). Nun ist die Frage, welche Proteine an der Bindung der Cargo-Bindedomäne von Myo2 (Myo2(CBD)) an Mitochondrien beteiligt sind. Daher sollte im Folgenden mit einem *pull-down* nach physikalischen Interaktionspartnern von Myo2 und Mitochondrien gesucht werden.

3.9.1 *In vitro* Bindeassay von isolierten Mitochondrien und heterolog aufgereinigter Cargo-Bindedomäne von Myo2

Es konnte bei einem *in vitro* Aktinbindeassay gezeigt werden, dass bei Zugabe von Antikörpern gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2 die Bindung von Mitochondrien an polymerisierte Aktinkabel aufgehoben wird (Altmann et al., 2008). Um die Bindungsfähigkeit von Myo2 an Mitochondrien zu überprüfen, wurde folgender *assay* durchgeführt. Das Gen für ein Fusionsprotein aus N-terminalem GST-Tag gefolgt von einer *Thrombin cleavage site* und der Cargo-Bindedomäne (Aminosäurereste 1087-1574) von Myo2 (GST-Myo2(CBD)) wurde von Plasmid pGEX-4T-1MYO2 in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt (Pashkova et al., 2005b; Pashkova et al., 2006). Die Cargo-Bindedomäne von Myo2 wurde anschließend mit isolierten Mitochondrien des Stammes D273-10B inkubiert. Als Kontrolle wurden die mitochondrialen Außenmembranproteine mittels Trypsin abverdaut und peripher gebundene Proteine wurden salzextrahiert. Nach mehrmaligem Waschen der Mitochondrien wurden die mitochondrialen Proteine mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen die Cargo-Bindedomäne von Myo2 per Western Blot analysiert (Abb. 31).

Die Ergebnisse des *in vitro* Bindeassays legen nahe, dass Myo2(CBD) an isolierte Mitochondrien bindet. Zudem wird diese Bindung durch vorherigen Verdau mitochondrialer Außenmembranproteine durch Trypsin aufgehoben. Da die Salzextraktion keinen Effekt auf die Bindung der Myo2(CBD) hat, deutet dies darauf hin, dass es sich um einen integralen Rezeptor handelt, der nicht lediglich lateral oder peripher mit Mitochondrien assoziiert ist.

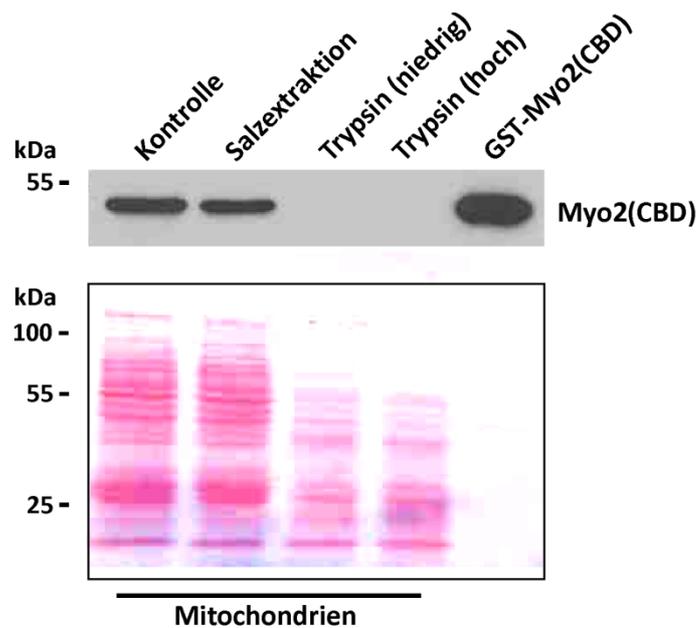
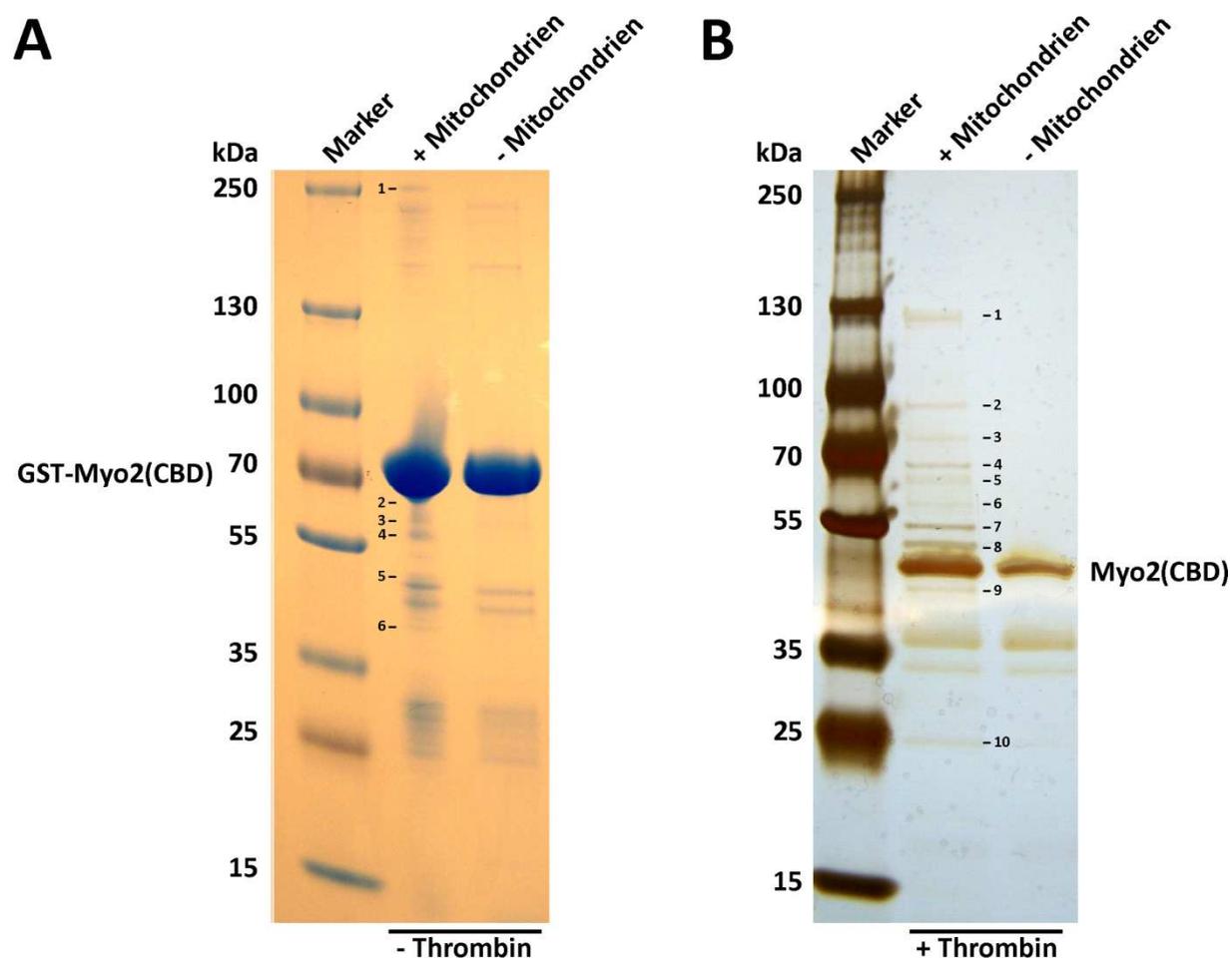


Abbildung 31) *In vitro* Bindeassay von Myo2(CBD) an Mitochondrien. Rekombinante GST-Myo2(CBD) wurde aus *E. coli* aufgereinigt. Zudem wurden Mitochondrien aus dem Stamm D273-10B isoliert. Die Mitochondrien wurden vor Zugabe der Myo2(CBD) mit hoher Salzkonzentration inkubiert, um peripher gebundene Proteine zu entfernen, mit 50 µg/ml und 250 µg/ml Trypsin verdaut, um oberflächenexponierte Proteine zu entfernen, oder als Kontrolle auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Mitochondrien abzentrifugiert und durch Western-Blot mit affinitätsgereinigten Antikörper gegen die Myo2(CBD) analysiert. In der rechten Spur wurden 100 ng der rekombinanten Myo2(CBD) aufgetragen. (Unten) Färbung der Membran mit Ponceau S.

3.9.2 GST-pulldown mit GST-Myo2(CBD) und isolierten Mitochondrien

Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die Cargo-Bindedomäne von Myo2 an isolierte Mitochondrien binden kann, sollte nun mittels *GST-pulldown* nach physikalischen Interaktionspartnern, die spezifisch für Mitochondrien sind, gesucht werden. Hierzu wurde Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) mit daran gebundenem Fusionsprotein GST-Myo2(CBD), einem Intermediat der Aufreinigung der Myo2 Cargo-Bindedomäne aus *E. coli*, mit isolierten Mitochondrien des Stammes D273-10B inkubiert. Um zu verhindern, dass Mitochondrien bei den Zentrifugationsschritten mit den Sepharose-beads präzipitierten, wurden sie zuvor mit Triton-X lysiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Cargo-Bindedomäne von Myo2 mit biotinyliertem Thrombin vom GST-tag abgespalten. Die Glutathion-Sepharose-beads mit der gebundenen Glutathion-S-Transferase wurden mittels Zentrifugation über einen Membranfilter abgetrennt. Der Durchfluss wurde anschließend über SDS-Page aufgetrennt und mittels Silber- oder kolloidaler Coomassiefärbung analysiert. Proteine in interessanten Banden, die in der Kontrolle ohne Mitochondrien nicht zu finden waren, wurden ausgeschnitten und über Massenspektrometrie identifiziert (Abb. 32).



C

Analyse der Banden mittels Massenspektrometrie

A)		B)	
Bande 1	Myo2	Bande 1	Myo2
Bande 2	Glycerin 3-Phosphatdehydrogenase	Bande 2	Aconitase
Bande 3	Myo2	Bande 3	Myo2
Bande 4	ATPase UE α	Bande 4	Glycerin 3-Phosphatdehydrogenase
Bande 5	-	Bande 5	Acetyl-CoA Hydrolase (<i>ACH1</i>)
Bande 6	ATPase UE β	Bande 6	Mitoch. Aldehyddehydrogenase
		Bande 7	ATPase UE α
		Bande 8	ATPase UE δ
		Bande 9	Myo2
		Bande 10	ATPase UE γ

Abbildung 32) GST-pulldown von GST-Myo2(CBD) mit isolierten Mitochondrien. **A)** Als Intermediat bei der Aufreinigung der Myo2(CBD) aus *E. coli* erhält man an Gluthation Sepharose 4B gebundene GST-Myo2(CBD). Diese wurde beim *pulldown* mit (Spur 2) und ohne (Spur 3) Mitochondrien des Stammes D-273-10B inkubiert, die mit Hilfe von Triton-X lysiert worden waren. Nach dem Waschen wurden die Sepharose-beads in SDS-Probenpuffer gekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde schließlich mit Colloidal Coomassie gefärbt. Die gekennzeichneten Banden wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie in Kooperation mit Heike Bauerschmitt (LMU, München) analysiert. **B)** Der *pulldown* wurde

wie in **A)** durchgeführt, wobei die Änderungen in 2.2.4 aufgeführt sind. Nach dem Waschen wurde die Myo2(CBD) jedoch durch Thrombin Verdau von der Glutathion Sepharose und dem daran gebundenen GST-*tag* abgespalten. Nach Abzentrifugieren der Glutathion Sepharose-*beads* über einen Membranfilter wurde der Durchfluss in SDS-Probenpuffer aufgeköcht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden auf dem Gel wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die gekennzeichneten Banden wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie in Kooperation mit Heike Bauerschmitt (LMU, München) analysiert. **C)** Angegeben sind die besten *hits* der einzelnen Banden, die durch Massenspektrometrie untersucht wurden. Die Analyse der einzelnen Peptide erfolgte mittels ALDENTE (ExpASY Proteomics Server).

Mit Hilfe eines GST-*pulldown* wurde versucht Proteine zu identifizieren, die physikalisch mit der Cargo-Bindedomäne von Myo2 interagieren und mitochondrial lokalisiert sind. Dazu wurde bei verschiedenen Pufferbedingungen ein *pulldown* durchgeführt und erhaltene Proteinbanden wurden mittels Massenspektrometrie analysiert. Da jedoch mehrere ATPase Untereinheiten oder Matrixproteine wie Aconitase detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass die Bedingungen nicht stringent genug waren.

4. Diskussion

Obwohl die Bäckerhefe auf die mtDNA und damit auf eine funktionierende Atmungskette verzichten kann, so müssen die Mitochondrien selbst weiter vererbt werden, da sie nicht *de novo* synthetisiert werden können. Dies geschieht entlang des Aktinzytoskeletts und ist energieabhängig, da der retrograde Aktinfluss überwunden werden muss. Bis heute dauert die Diskussion um den Mechanismus der Vererbung der Mitochondrien in Hefe an und es wurden zwei alternative Hypothesen entworfen hinsichtlich des anterograden Transportes (Abb. 4; Abb. 5). Ziel dieser Arbeit war die Rolle von Myo2 beim mitochondrialen Transport näher zu untersuchen und gegebenenfalls zwischen den beiden Modellen zu differenzieren.

4.1 Arp2/3-Komplex-abhängiger, anterograder Transport von Mitochondrien

Im Mittelpunkt der motorunabhängigen Transporthypothese steht die Vermutung, dass die Mitochondrien mit Hilfe der Arp2/3-abhängigen Aktinpolymerisation entlang des Aktinzytoskeletts von der Mutter in die Tochterzelle transportiert werden (Boldogh et al., 2001a; Fehrenbacher et al., 2004; Boldogh et al., 2005). In dieser Arbeit wurde der Transport von Mitochondrien in einer temperatursensitiven Mutante von *ARC40*, einer essentiellen Komponente des Arp2/3-Komplexes, untersucht (Abb. 7). Wäre die Polymerisation von F-Aktin durch den Arp2/3-Komplex der maßgebliche Mechanismus für die Vererbung von Mitochondrien, so wäre zu erwarten gewesen, dass bei Depletion von funktionalem Arc40 die Mitochondrien nur noch retrograd transportiert würden. Nach Inkubation bei nicht-permissiver Temperatur von drei Stunden war die Organisation des Aktinzytoskeletts (Abb. 6B) ebenso in Mitleidenschaft gezogen wie die Fähigkeit zur Endozytose (Abb. 6C). Die Morphologie der Mitochondrien war jedoch nicht mit der des Stammes *myo2(LQ)* zu vergleichen, bei dem die Mitochondrien am der Knospe gegenüberliegenden Pol aggregieren (Abb. 11A). Vielmehr fragmentierten die Mitochondrien und aggregierten in unterschiedlichen Bereichen der Zelle. Auch konnte kein Transportdefekt in die Knospe beobachtet werden. Bei der Untersuchung des Transportes von Mitochondrien in der *arc40^{ts}* Mutante konnte auch nach mehrstündiger Inkubation bei 37°C noch Bewegung von Mitochondrien beobachtet werden. Insgesamt deuteten die Versuchsergebnisse darauf hin, dass der Arp2/3-Komplex nicht allein für die mitochondriale Bewegung in *S. cerevisiae* verantwortlich ist. Vorstellbar wäre jedoch, dass der Transport über kurze Strecken über diesen Mechanismus gewährleistet wird. So kann man bei zeitaufgelösten 3D-Fluoreszenzaufnahmen neben distinkten *tracks* auch stets ungerichtete Bewegung der Mitochondrien beobachten. Dabei könnte auf diese Weise ein Mitochondrium durch ungerichtete

Bewegung im Zytosol an ein bereits bestehendes Aktinkabel herangeführt werden. Es ist bekannt, dass eine Depletion der Proteine Arc35, Arc40 oder Arp2, die essentielle Bestandteile des Arp2/3-Komplexes sind, starken Einfluss auf die mitochondriale Morphologie hat (Altmann und Westermann, 2005).

4.2 Rolle des ERMES-Komplexes bei der mitochondrialen Vererbung

Wesentlicher Bestandteil der Arp2/3-Hypothese ist die Interaktion der Mitochondrien mit dem Aktinzytoskelett über den sogenannten *Mitochore*-Komplex (Boldogh et al., 2003). Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass mit Mmm1 eine Komponente des Komplexes fehllokalisiert wurde und sich nicht in der mitochondrialen Außenmembran, sondern in der Membran des ER befindet. Dafür spricht die für ER-Proteine typische Glykosylierung von in diesem Fall drei Asparagin-Resten in der N-terminalen Domäne (Kornmann et al., 2009; Stroud et al., 2011). Mmm1 bildet gemeinsam mit Mdm10, Mdm12 und Mdm34 Verknüpfungsstellen zwischen dem ER und Mitochondrien, die als etwa ein bis fünf diskrete Punkte pro Zelle fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden können (Kornmann et al., 2011). Bei *pulldown*-Experimenten konnte jüngst auch erstmals eine physikalische Interaktion von Mdm34 mit den restlichen Komponenten nachgewiesen werden (Stroud et al., 2011), obwohl frühere biochemische Daten nicht darauf hindeuteten (Youngman et al., 2004). Das bedeutet, dass eine direkte Rolle des ERMES-Komplexes bei der Vererbung von Mitochondrien unwahrscheinlich ist.

Ebenfalls über *pulldown*-Experimente konnte unlängst mit Gem1 eine weitere, fünfte Komponente des ERMES-Komplexes identifiziert werden (Kornmann et al., 2011; Stroud et al., 2011). Gem1 gehört zu den Miro-(*mitochondrial rho-like*) GTPasen, einer konservierten Gruppe von Proteinen, die für den Transport von Mitochondrien von Bedeutung sind. In Nervenzellen von *Drosophila* und Säugern werden Mitochondrien entlang der Mikrotubuli transportiert und mittels Miro-GTPasen direkt an das Kinesin Motorprotein gekoppelt (Guo et al., 2005; Wang und Schwarz, 2009). In *S. cerevisiae* werden die Mitochondrien jedoch entlang des Aktinzytoskelettes transportiert. Allerdings führt eine Deletion von *GEM1* zu einem Morphologie- und Vererbungsdefekt von Mitochondrien, wobei die Rolle von Gem1 unklar blieb (Frederick et al., 2004; Frederick et al., 2008). In Deletionsstämmen der vier bisher bekannten Komponenten des ERMES-Komplexes können mikroskopisch keine diskreten Punkte in Zellen mit fluoreszenz-markiertem ERMES-Komplex mehr beobachtet werden im Gegensatz zu *gem1Δ*, wo sich jedoch die Anzahl der ausgebildeten Komplexe verringert und deren Größe zunimmt. Dies deutet darauf hin, dass Gem1 zwar nicht für die Integrität des Komplexes essentiell ist, jedoch

dessen Organisation reguliert (Kornmann et al., 2011) und somit ebenso wie die bisher bekannten Komponenten des ERMES-Komplexes nicht direkt am Transport von Mitochondrien beteiligt ist.

Neben dem Austausch von Lipiden scheint der ERMES-Komplex auch an der Regulation der Organisation der mtDNA beteiligt zu sein (Rizzuto et al., 1998; de Brito und Scorrano, 2008; Dimmer et al., 2005; Wiedemann et al., 2009). Daneben könnte dem ERMES-Komplex eine weitere Rolle bei der Teilung von Mitochondrien zukommen. So wurde vor kurzem herausgefunden, dass das ER vielleicht die Stellen festlegt, an denen die Teilung der Mitochondrien erfolgt (Friedman et al., 2011). Dafür spräche unter anderem, dass Dnm1 Oligomere an vielen Stellen über die mitochondriale Oberfläche verteilt sind, aber nicht jede Ansammlung von Dnm1 zu einem Teilungsevent führt. Außerdem ist der Durchmesser von Dnm1 Helices auf Lipidröhren *in vitro* mit etwa 100 nm deutlich geringer als der Durchmesser eines mitochondrialen Tubulus von etwa 300 nm. So könnte die enge Verknüpfung mit dem ER für die Konstriktion des mitochondrialen Tubulus notwendig sein. Mit einer Rolle des ERMES bei diesem Vorgang steht im Einklang, dass die Deletion einer der Komponenten des ERMES-Komplexes zu riesigen, kugelförmigen Mitochondrien führt (Westermann, 2011).

Man geht davon aus, dass die genannten Funktionen des ERMES-Komplexes unabhängig von der Interaktion der Mitochondrien mit dem Aktinzytoskelett erfolgen. Wird das Ausbilden des ERMES-Komplexes durch Deletion eines der Gene verhindert, so führt das zu einer drastischen Veränderung der mitochondrialen Morphologie und zieht auch einen signifikanten Transportdefekt in die Knospe der Hefezellen nach sich. Diese Defekte konnten jedoch nicht gerettet werden durch die Expression von *myo2-fis1* (Abb. 22). Zudem bewirkt die Deletion von *MMM1* sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *Neurospora crassa* einen ähnlichen mitochondrialen Phänotyp. Da die Mitochondrien in *N. crassa* jedoch entlang von Mikrotubuli transportiert werden, spricht dies auch dafür, dass die Rolle von *Mmm1* unabhängig vom Zytoskelett ist (Fuchs et al., 2002; Prokisch et al., 2000). Dies alles deutet darauf hin, dass ein funktionsfähiger ERMES-Komplex Voraussetzung für den mitochondrialen Transport ist und durch die Kontakte mit dem ER für eine transportfähige Struktur der Mitochondrien sorgt (Förtsch et al., 2011).

4.3 Myo2-abhängiger Transport von Mitochondrien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit *myo2(LQ)* ein neues Allel hergestellt, das zu einem starken Morphologie- und Vererbungsdefekt von Mitochondrien führt (Abb. 10B, 11A). Die Verteilung von Vesikeln und anderen Zellorganellen ist davon jedoch nicht betroffen (Abb. 15, 16, 17, 19). Die Auswirkungen dieser Mutationen in *MYO2* konnten durch die Expression von *myo2-fis1*, einem

Motor spezifisch für Mitochondrien, gerettet werden (Abb. 13). Dies spricht für eine direkte Rolle von Myo2 beim anterograden Transport von Mitochondrien. Auch die synthetische Letalität von *ypt11Δ/myo2(LQ)* konnte durch Myo2-Fis1 gerettet werden. Daher kann angenommen werden, dass die mitochondriale Vererbung nicht durch Mechanismen bewerkstelligt werden kann, die unabhängig von Myo2 sind. Die Detektion von Myo2 auf isolierten Mitochondrien des Wildtyps mittels Immuno-EM weist ebenfalls auf eine direkte Rolle von Myo2 beim knospengerichteten Transport hin. Daher wird vorgeschlagen, dass in *S. cerevisiae* der anterograde Transport von Mitochondrien durch Myo2 vermittelt wird. Darüber hinaus ist dieser Mechanismus ausschlaggebend für die Lebensfähigkeit der Zellen (Förtsch et al., 2011).

4.3.1 Geschwindigkeit der mitochondrialen Bewegungen

In den letzten Jahren wurde die Rolle von Myo2 als mitochondriales Motorprotein vielfach angezweifelt (Boldogh et al., 2004; Boldogh und Pon, 2007; Pon, 2008; Peraza-Reyes et al., 2010). Es wurde argumentiert, dass Mutationen in Myo2 keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der mitochondrialen Bewegung haben. Besonders hervorzuheben ist dabei das *myo2-Δ6IQ* Allel, bei dem der Hebelarm des Myosin Motors entfernt wurde. Dies führt zu einer Verlangsamung der vesikulären Transportgeschwindigkeit von 3 auf etwa 0,3 $\mu\text{m/s}$ (Schott et al., 2002). Mitochondrien bewegten sich jedoch im *myo2-Δ6IQ* Stamm und im WT gleichermaßen mit etwa 0,18 $\mu\text{m/s}$ fort (Boldogh et al., 2004). Vakuolen und Peroxisomen, die auch mit Hilfe von Myo2 transportiert werden, bewegen sich im Vergleich dazu mit 0,1-0,2 $\mu\text{m/s}$ bzw. etwa 0,45 $\mu\text{m/s}$ fort (Hill et al., 1996; Fagarasanu et al., 2006). Der Großteil der in Abb. 21 aufgeführten mitochondrialen Bewegungen ist jedoch mit weniger als 0,1-0,2 $\mu\text{m/s}$ langsamer als die Geschwindigkeit des vesikulären Transportes in *myo2-Δ6IQ*. Zudem war das Bewegungsmuster der Mitochondrien in dem Stamm, der das für Mitochondrien spezifische Motorallel, *myo2-fis1*, exprimiert, ähnlich zu dem des WT und der *myo2(LQ)* Mutante. Darüber hinaus scheint die Geschwindigkeit der Mitochondrien nicht von der Geschwindigkeit des Myosin Motors bestimmt zu werden. Mit Messungen der Geschwindigkeit von Mitochondrien in *myo2* Mutanten kann Myo2 somit nicht als mitochondrialer Motor in *S. cerevisiae* ausgeschlossen werden (Frederick und Shaw, 2007; Förtsch et al., 2011).

Es wurde vorgeschlagen, dass Myo2 lediglich indirekt an der mitochondrialen Vererbung beteiligt ist, indem es Retentionsfaktoren in die Knospe transportiert (Boldogh et al., 2004; Boldogh und Pon, 2007; Pon, 2008; Peraza-Reyes et al., 2010). Wenn dies der Fall wäre, sollte der Myo2 unabhängige Transport von Mitochondrien in die Knospe in *myo2* Mutanten nicht beeinträchtigt sein. Um dies zu

untersuchen, wurde die Geschwindigkeit von Mitochondrien in *myo2(L1301P)* bei geringer zeitlicher Auflösung über einen längeren Zeitraum (ein z-Stapel alle 3 min über einen Zeitraum von 30 min) untersucht (Altmann et al., 2008). In dieser Arbeit wurden die mitochondrialen Bewegungen in der *myo2(LQ)* Mutante bei hoher zeitlicher Auflösung (ein z-Stapel alle 2 s über einen Zeitraum von 1 min) analysiert (Abb. 21). In beiden Fällen konnten sowohl anterograde als auch retrograde Bewegungen von Mitochondrien in der Mutter- und auch Tochterzelle des Wildtyps beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde der Knospenhals in den *myo2* Mutanten nur sehr selten von Mitochondrien passiert. Das deutet darauf hin, dass der Transport von Mitochondrien in die Knospe direkt beeinflusst wird durch die Mutationen in der Cargo-Bindedomäne von Myo2. Da eine komplette Blockierung des anterograden Transportes letal wäre, ist davon auszugehen, dass die mutanten Motorproteine noch Restaktivität besitzen. Diese verringerte Funktionalität könnte zu einer Reduzierung der zurückgelegten Distanz und/oder der Häufigkeit mitochondrialer Bewegung führen (Förtsch et al., 2011).

4.3.2 Die Rolle von *YPT11* bei der Vererbung von Mitochondrien

Die Rab-GTPase Ypt11 und Myo2 interagieren physikalisch miteinander (Itoh et al., 2002). Gleichzeitig kann man einen synthetischen, mitochondrialen Phänotyp in *ypt11Δ/myo2* Doppelmutanten beobachten. Da die *myo2* Mutanten noch über eine Restaktivität des Myo2 Motorproteins verfügen müssen, ist daher davon auszugehen, dass der synthetische Effekt durch die Funktion von Myo2 und Ypt11 im selben Schritt der mitochondrialen Vererbung begründet ist (Dixon et al., 2009). Zudem hat man herausgefunden, dass Rab-GTPasen häufig die Interaktion von Klasse V Myosinen mit den zu transportierenden Organellen unterstützen (Hammer und Wu, 2002; Seabra und Coudrier, 2004; Akhmanova und Hammer, 2010). So wirken zum Beispiel die Rab-GTPasen Ypt31/Ypt32 sowie Sec4 beim Transport von Vesikeln mit (Lipatova et al., 2008; Santiago-Tirado et al., 2011). Die Rab11 Homologe Ypt31/Ypt32 werden dabei für die Bildung von *trans*-Golgi Vesikeln benötigt und später durch Sec4 für die Fusion dieser Vesikel ersetzt. Dabei interagieren sowohl Ypt31/Ypt32 als auch Sec4 direkt mit derselben Subdomäne der Myo2(CBD). Allerdings ist bislang unbekannt, wie Myo2 an den Vesikeln beim Transport angeheftet bleibt, wenn Ypt31 und Ypt32 von den Vesikeln dissoziieren. Dies macht die Existenz weiterer Myo2 Rezeptorproteine auf Vesikeln wahrscheinlich (Jin et al., 2011). Daneben wird die Bindung von Myo2 an Ret2, einer Untereinheit der COPI Hülle der vom Golgi abgeleiteten Transportvesikel, durch Ypt11 erleichtert. Dabei sind der anterograde Transport und die Vererbung des Golgi auf die Rekrutierung von Myo2 durch diesen Mechanismus angewiesen (Arai et al., 2008). Die Analyse der in dieser Arbeit generierten

genetischen Daten unterstützt ein Modell, in dem Ypt11 auf ähnliche Weise mit Myo2 bei der Vererbung von Mitochondrien interagiert. Dabei könnte durch Ypt11 die Bindung von Myo2 an einen bislang noch unbekanntem Rezeptorkomplex, der sich auf der mitochondrialen Oberfläche befindet, reguliert werden. Eine Deletion von *YPT11* sowie Mutationen in der Region von *MYO2*, die für die Cargo-Bindedomäne kodiert, könnten die Bindung des Motors an Mitochondrien zwar nicht komplett aufheben, jedoch beeinträchtigen. Bei einer Kombination der beiden Mutationen würde man eine weitere Schwächung der Bindung von Myo2 an das Organell erwarten, was den anterograden, mitochondrialen Transport zum Erliegen bringen würde. Die damit einhergehende fehlende Vererbung von Mitochondrien führt daraufhin zum Verlust der Lebensfähigkeit der Zellen. Eine Expression von *myo2-fis1* kann diesen letalen Phänotyp jedoch retten. Dabei ist ein Stamm mit Myo2-Fis1, bei dem der Myo2 Motor durch die mitochondriale Proteinimportmaschinerie zur mitochondrialen Oberfläche befördert wird, nicht mehr auf eine Rekrutierung von Myo2 durch Ypt11 sowie eine intakte Cargo-Bindedomäne von Myo2 angewiesen (Förtsch et al., 2011).

4.4 Verankerung von Mitochondrien am Zellcortex

Nach dem momentan gültigen Modell für den retrograden Transport werden Mitochondrien passiv durch Bindung an das Aktinzytoskelett transportiert (Valiathan und Weisman, 2008). Um nun zu verhindern, dass die Mitochondrien nach ihrem Transport in die Knospe wieder zurück in die Mutterzelle befördert werden, müssen sie vermutlich in der Knospe verankert werden (Simon et al., 1995). Ein möglicher Retentionsfaktor ist dabei Mmr1, dessen mRNA durch den Komplex aus She2, She3, und Myo4 an die Knospenspitze transportiert wird und dort detektiert werden kann (Shepard et al., 2003). Darüber hinaus ist das Protein in den Mitochondrien der Knospe stark angereichert (Itoh et al., 2004). So könnte das Genprodukt von *MMR1* an Faktoren am Knospencortex binden und damit den Rücktransport der Mitochondrien in die Mutterzelle verhindern. Dass die *myo2(LQ)* Mutation epistatisch zu *mmr1Δ* ist (Abb. 28), deutet darauf hin, dass Mmr1 *downstream* von Ypt11 und Myo2 benötigt wird. Das bedeutet, dass eine Anwesenheit von Mmr1 nicht notwendig ist, solange die Mitochondrien noch nicht zur Knospenspitze transportiert wurden (Förtsch et al., 2011). Eine Deletion von *MMR1* hat kaum Einfluss auf die tubuläre Morphologie der Mitochondrien. Jedoch lässt sich ein signifikanter Anteil an Zellen mit kleiner Knospe ohne Mitochondrien beobachten (Abb. 28C). Beim Wildtyp können in der Knospe mehr Mitochondrien bezogen auf das Volumen detektiert werden als in der Mutterzelle. Im Gegensatz dazu befinden sich bei Deletion von *MMR1* jedoch weniger Mitochondrien in kleinen und auch in großen Knospen als in der Mutterzelle (Abb. 30), was für eine Rolle von Mmr1 als Retentionsfaktor in der Knospe spricht. Neueste Untersuchungen legen

nahe, dass Mmr1 diese Aufgabe durch Verknüpfung der Mitochondrien mit dem kortikalen ER an der Knospenspitze erfüllt. So konnte man fluoreszenzmikroskopisch Mmr1p auf gegenüberliegenden Seiten der Mitochondrien und des kortikalen ER beobachten. Zudem konnte Mmr1 gemeinsam mit Mitochondrien und auch ER aufgereinigt werden (Swayne et al., 2011). In diesem Zusammenhang wurde aber noch nicht untersucht, ob derERMES-Komplex dabei auch eine Rolle spielt. Die postulierten Kontakte zwischen Mitochondrien und ER durch Mmr1 sind nicht notwendig für die Biosynthese von Phospholipiden. Im Gegensatz zumERMES-Komplex mit seinen vielfältigen Aufgaben könnten diese Verknüpfungen mit dem kortikalen ER eine Rolle bei der Verankerung von Mitochondrien an der Knospenspitze spielen. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Wirkungsweise von Mmr1 derERMES-Komplex an die Knospenspitze transportiert wird, um dort die Mitochondrien an das kortikale ER zu verankern (Swayne et al., 2011; McBride, 2011).

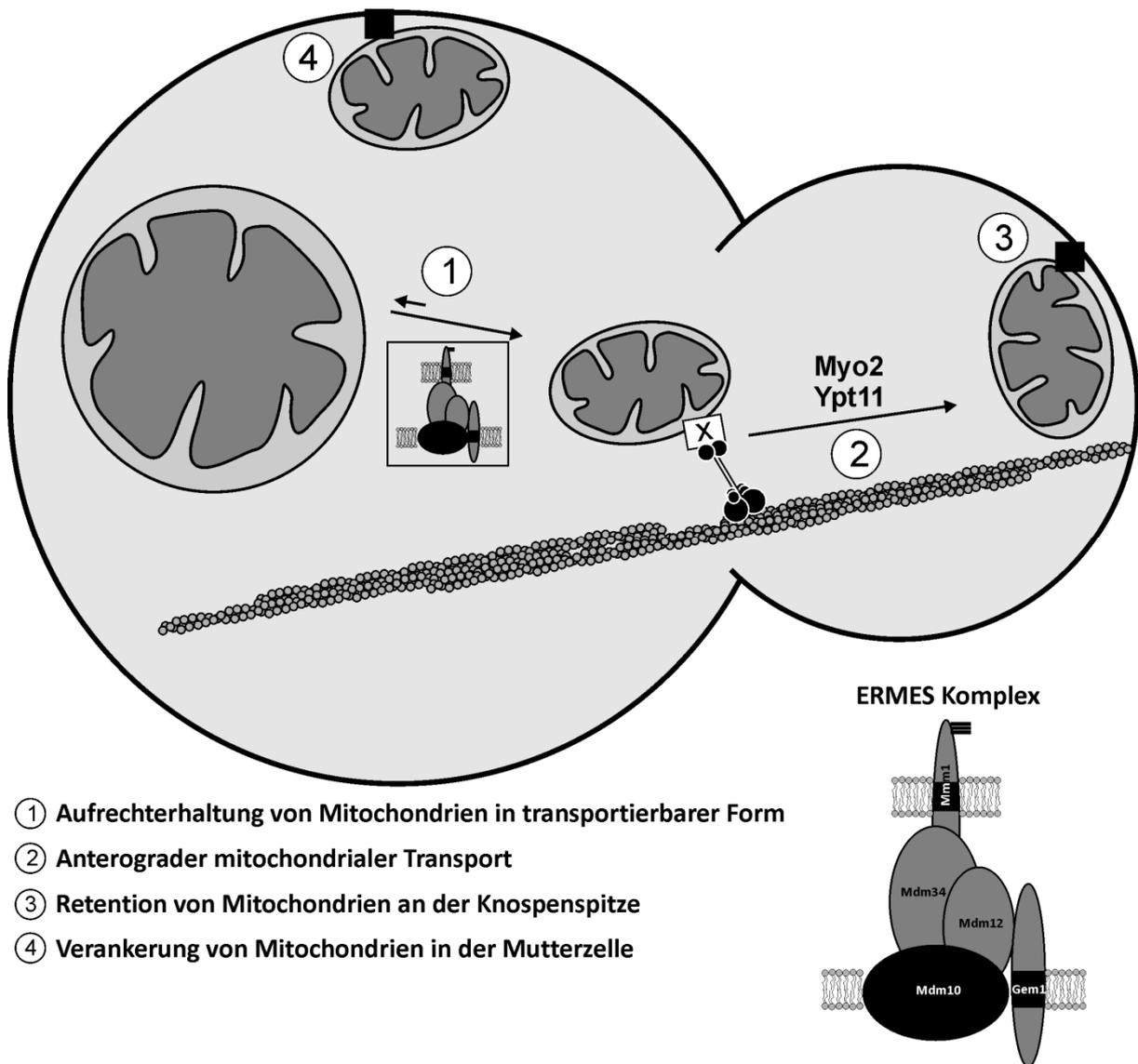
Ein weiteres Protein, das in diesem Fall eine Rolle spielt, ist die Serin/Threonin Phosphatase Ptc1. Identifiziert im Hinblick auf den Transport von Mitochondrien wurde diese Typ 2C Proteinphosphatase bei einem Screen nach temperatursensitiven Hefestämmen, die einen Vererbungsdefekt von Mitochondrien besitzen (Hermann et al., 1997). Ähnlich wie bei *mmr1Δ* kann in *ptc1Δ* Zellen mit kleiner Knospe ein Transportdefekt beobachtet werden. Dabei handelt es sich um eine Verzögerung der mitochondrialen Vererbung, da in großen Knospen schließlich Mitochondrien zu finden sind (Roeder et al., 1998). Darüber hinaus beeinflusst eine Deletion von *PTC1* neben der Lokalisation von Myo2 und Myo4 auch mehrere Organell-spezifische Myo2 Adapterproteine. So konnten in *ptc1Δ* Zellen reduzierte Expressionslevel des vakuolären Rezeptors *VAC17*, des peroxisomalen Rezeptors *INP2* sowie des mitochondrial lokalisierten *MMR1* detektiert werden (Jin et al., 2009). Ebenso führt eine Depletion von Ptc1 zur verstärkten Phosphorylierung von Mmr1. Zudem wird dessen Assoziation mit Mitochondrien verringert und stärker zum ER hin verlagert (Swayne et al., 2011). Das bedeutet, dass Ptc1 eine übergeordnete Rolle beim Transport von Organellen und sekretorischen Vesikeln spielt.

Der spezifische Phänotyp bei einer Expression von *myo2-fis1* ist die Akkumulation von Mitochondrien in der Knospe oder am Knospenhals. Zudem reichen ein oder zwei mitochondriale Tubuli in die Mutterzelle. Die jeweiligen Enden am der Knospe gegenüberliegenden Pol der Zelle scheinen dabei befestigt zu sein und es lässt sich kaum Bewegung beobachten (Abb. 20; Filme 7-9). Dies spricht für eine Verankerung der Mitochondrien, um zu gewährleisten, dass auch die Mutterzelle über

Mitochondrien verfügt. So existiert eine Retentionszone in der Mutterzelle gegenüber der Knospe, die Aktin-abhängig ist (Yang et al., 1999). Dabei könnte ein Komplex aus dem Zellkortex assoziierten Num1 und einem Teil des mitochondrialen Teilungsfaktor Dnm1 eine Rolle spielen. In *num1Δ/dnm1Δ* Doppelmutanten lassen sich häufig Zellen mit Akkumulation von Mitochondrien in der Knospe und zugleich Mutterzellen ohne die Organellen beobachten (Cerveny et al., 2007). Für die Ausbildung der Komplexe aus Num1 und Dnm1 wird zudem Mdm36 benötigt. Eine Depletion von Num1 oder Mdm36 hat den Verlust der Zellkortexverankerung der Mitochondrien zur Folge. Dies führt wiederum in *num1Δ* und *mdm36Δ* Zellen dazu, dass sich die Mitochondrien schneller bewegen als im Wildtyp (Hammermeister et al., 2010). Zudem wurde beim Erstellen einer genomweiten genetischen Interaktionskarte herausgefunden, dass *num1Δ* und *mmr1Δ* eine positive genetische Interaktion aufweisen (Costanzo et al., 2010). Dies könnte auf eine antagonistische Aktivität der jeweiligen Genprodukte hindeuten. Während Mmr1 eine Rolle bei der Verankerung der Mitochondrien an der Knospenspitze einnimmt, könnte eine Retention durch Num1 in Kombination mit Dnm1 und Mdm36 einen Teil der Mitochondrien in der Mutterzelle verankern. Wie bereits erwähnt hat eine Deletion von *MMR1* Einfluss auf die Verteilung der Mitochondrien, die verstärkt in der Mutterzelle lokalisiert sind. In *num1Δ* Zellen konnten im Vergleich zum Wildtyp jedoch etwas mehr Mitochondrien in der Knospe als in der Mutterzelle detektiert werden. So führt eine Verankerung der Mitochondrien in der Mutterzelle und der Knospe dazu, dass das dynamische Gleichgewicht der mitochondrialen Verteilung bestehen bleibt. Dafür spricht auch, dass durch eine Doppeldeletion von *mmr1Δ* und *num1Δ* der mitochondriale Verteilungsdefekt von *mmr1Δ* zum Teil wieder aufgehoben werden kann und sich ein intermediärer Phänotyp ausbildet (Abb. 30).

4.5 Neues Modell zum Myo2-abhängigen Transport in *S. cerevisiae*

Mit Hilfe der genetischen Daten dieser Arbeit und von anderen Studien wurde in Abb. 32 ein Modell zur Vererbung von Mitochondrien in *S. cerevisiae* mit drei aufeinanderfolgenden Schritten erstellt (Itoh et al., 2002; Itoh et al., 2004; Boldogh et al., 2004; Frederick et al., 2008; Cerveny et al., 2007; Kornmann et al., 2009; Hammermeister et al., 2010; Förtsch et al., 2011; Kornmann et al., 2011; Swayne et al., 2011).



- ① Aufrechterhaltung von Mitochondrien in transportierbarer Form
- ② Anterograder mitochondrialer Transport
- ③ Retention von Mitochondrien an der Knospenspitze
- ④ Verankerung von Mitochondrien in der Mutterzelle

Abbildung 33) Modell für die Vererbung von Mitochondrien in *S. cerevisiae* (verändert nach: Förtsch et al., 2011). **1)** Für den ersten Schritt dieses *pathway* werden die Proteine des ERMES-Komplexes (Mmm1, Mdm10, Mdm12, Mdm34) benötigt. Dies scheint auch wahrscheinlich, da die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membran von den Kontakten zum ER abhängt und damit die Größe und Form der Mitochondrien beeinflusst. Gem1, dessen Depletion Einfluss auf die mitochondriale Vererbung hat (Frederick et al., 2008), konnte mittlerweile dem ERMES-Komplex zugeordnet werden (Kornmann et al., 2011). **2)** Im zweiten Schritt werden die Mitochondrien anterograd zur Knospe transportiert. Neben der Interaktion eines bislang unbekanntes mitochondrialen Myo2 Rezeptors ist bei diesem Schritt Ypt11 von Bedeutung (Itoh et al., 2002; Abb. 26). **3)** Nach dem Transport in die Knospe werden die Mitochondrien durch einen Retentionsfaktor an der Knospenspitze verankert. Diese Rolle wird vermutlich von Mmr1 übernommen (Abb. 30; Swayne et al., 2011). Zudem sind die Mitochondrien vermutlich wie in **4)** am Zellcortex verankert, wobei Num1, Mdm36 und Dnm1 beteiligt sind (Cervený et al., 2007; Hammermeister et al., 2010). Die Größenverhältnisse in der Abbildung sind nicht maßstabsgetreu.

4.6 Suche nach dem mitochondrialen Myo2-Rezeptor

Eine wichtige Frage im Hinblick auf den Myo2-abhängigen mitochondrialen Transport ist diejenige nach der Identität des mitochondrialen Myo2 Rezeptors. Die Suche mittels *GST-pulldown* war bislang jedoch nicht erfolgreich. Dies könnte daran liegen, dass die Protein-Protein Interaktionen in den mitochondrialen Extrakten für das Detergens zu instabil waren oder der Rezeptor nicht in ausreichender Menge mit den Mitochondrien aufgereinigt werden konnte. In weiteren *pulldown*-Experimenten könnte man nun die Mutationen des starken *myo2(LQ)* Allels in die rekombinante Cargo Bindedomäne von Myo2 einführen. Dadurch wäre es möglich, besser zwischen spezifischen und unspezifischen Banden zu unterscheiden.

Literaturverzeichnis

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., und Ram, S.J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophot Int* **11**, 36-42.
- Akhmanova, A., und Hammer, J.A., 3rd (2010). Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 479-487.
- Altmann, K., Durr, M., und Westermann, B. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. *Methods Mol Biol* **372**, 81-90.
- 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*. *J Cell Biol* **181**, 119-130.
- Altmann, K., und Westermann, B. (2005). Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**, 5410-5417.
- Arai, S., Noda, Y., Kainuma, S., Wada, I., und Yoda, K. (2008). Ypt11 functions in bud-directed transport of the Golgi by linking Myo2 to the coatamer subunit Ret2. *Curr Biol* **18**, 987-991.
- Attardi, G., und Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 289-333.
- Ben-Aroya, S., Coombes, C., Kwok, T., O'Donnell, K.A., Boeke, J.D., und Hieter, P. (2008). Toward a comprehensive temperature-sensitive mutant repository of the essential genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **30**, 248-258.
- Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* **122**, 1-63.
- Bereiter-Hahn, J., und Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* **27**, 198-219.
- Berger, K.H., Sogo, L.F., und Yaffe, M.P. (1997). Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol* **136**, 545-553.
- Bi, E., Maddox, P., Lew, D.J., Salmon, E.D., McMillan, J.N., Yeh, E., und Pringle, J.R. (1998). Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol* **142**, 1301-1312.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., und Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* **1**, 298-304.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S., und Pon, L.A. (1998). Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J Cell Biol* **141**, 1371-1381.
- Boldogh, I.R., Fehrenbacher, K.L., Yang, H.C., und Pon, L.A. (2005). Mitochondrial movement and inheritance in budding yeast. *Gene* **354**, 28-36.
- Boldogh, I.R., Nowakowski, D.W., Yang, H.C., Chung, H., Karmon, S., Royes, P., und Pon, L.A. (2003). A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell* **14**, 4618-4627.

- Boldogh, I.R., und Pon, L.A. (2006). Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1763, 450-462.
- Boldogh, I.R., und Pon, L.A. (2007). Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol* 17, 502-510.
- Boldogh, I.R., Ramcharan, S.L., Yang, H.C., und Pon, L.A. (2004). A type V myosin (Myo2p) and a Rab-like G-protein (Ypt11p) are required for retention of newly inherited mitochondria in yeast cells during cell division. *Mol Biol Cell* 15, 3994-4002.
- Boldogh, I.R., Yang, H.C., Nowakowski, W.D., Karmon, S.L., Hays, L.G., Yates, J.R., 3rd, und Pon, L.A. (2001a). Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3162-3167.
- Boldogh, I.R., Yang, H.C., und Pon, L.A. (2001b). Mitochondrial inheritance in budding yeast. *Traffic* 2, 368-374.
- Boone, C., Bussey, H., und Andrews, B.J. (2007). Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nat Rev Genet* 8, 437-449.
- Botstein, D., und Fink, G.R. (2011). Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 189, 695-704.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brown, S.S. (1997). Myosins in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 9, 44-48.
- Burgess, S.M., Delannoy, M., und Jensen, R.E. (1994). MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol* 126, 1375-1391.
- Burke, V.D., Dawson, D., und Stearns, T. (2000). *Methods in Yeast Genetics* (Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Buttery, S.M., Yoshida, S., und Pellman, D. (2007). Yeast formins Bni1 and Bnr1 utilize different modes of cortical interaction during the assembly of actin cables. *Mol Biol Cell* 18, 1826-1838.
- Buvelot Frei, S., Rahl, P.B., Nussbaum, M., Briggs, B.J., Calero, M., Janeczko, S., Regan, A.D., Chen, C.Z., Barral, Y., Whittaker, G.R., *et al.* (2006). Bioinformatic and comparative localization of Rab proteins reveals functional insights into the uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p. *Mol Cell Biol* 26, 7299-7317.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., und Righetti, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- Carlsson, A.E., Shah, A.D., Elking, D., Karpova, T.S., und Cooper, J.A. (2002). Quantitative analysis of actin patch movement in yeast. *Biophys J* 82, 2333-2343.
- Catlett, N.L., Duex, J.E., Tang, F., und Weisman, L.S. (2000). Two distinct regions in a yeast myosin-V tail domain are required for the movement of different cargoes. *J Cell Biol* 150, 513-526.
- Catlett, N.L., und Weisman, L.S. (1998). The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14799-14804.
- Cavalier-Smith, T. (1987). The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts, and microbodies. *Ann N Y Acad Sci* 503, 55-71.

- Cervený, K.L., Studer, S.L., Jensen, R.E., und Sesaki, H. (2007). Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical num1 protein. *Dev Cell* **12**, 363-375.
- Chesarone, M.A., DuPage, A.G., und Goode, B.L. (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 62-74.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., und Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119-122.
- Conchon, S., Cao, X., Barlowe, C., und Pelham, H.R. (1999). Got1p and Sft2p: membrane proteins involved in traffic to the Golgi complex. *EMBO J* **18**, 3934-3946.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L., Toufighi, K., Mostafavi, S., *et al.* (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425-431.
- de Brito, O.M., und Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605-610.
- 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*. *Mol Biol Cell* **13**, 847-853.
- Dimmer, K.S., Jakobs, S., Vogel, F., Altmann, K., und Westermann, B. (2005). Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J Cell Biol* **168**, 103-115.
- Dixon, S.J., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Andrews, B., und Boone, C. (2009). Systematic mapping of genetic interaction networks. *Annu Rev Genet* **43**, 601-625.
- Doyle, T., und Botstein, D. (1996). Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3886-3891.
- 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. *Mol Biol Cell* **4**, 1277-1294.
- Egner, A., Jakobs, S., und Hell, S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3370-3375.
- Estrada, P., Kim, J., Coleman, J., Walker, L., Dunn, B., Takizawa, P., Novick, P., und Ferro-Novick, S. (2003). Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **163**, 1255-1266.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C., und Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol* **4**, 260-269.
- Fagarasanu, A., Fagarasanu, M., Eitzen, G.A., Aitchison, J.D., und Rachubinski, R.A. (2006). The peroxisomal membrane protein Inp2p is the peroxisome-specific receptor for the myosin V motor Myo2p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev Cell* **10**, 587-600.
- Fagarasanu, A., Mast, F.D., Knoblauch, B., Jin, Y., Brunner, M.J., Logan, M.R., Glover, J.N., Eitzen, G.A., Aitchison, J.D., Weisman, L.S., *et al.* (2009). Myosin-driven peroxisome partitioning in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* **186**, 541-554.
- Fagarasanu, A., Mast, F.D., Knoblauch, B., und Rachubinski, R.A. (2010). Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 644-654.

- Fehrenbacher, K.L., Boldogh, I.R., und Pon, L.A. (2005). A role for Jsn1p in recruiting the Arp2/3 complex to mitochondria in budding yeast. *Mol Biol Cell* 16, 5094-5102.
- Fehrenbacher, K.L., Yang, H.C., Gay, A.C., Huckaba, T.M., und Pon, L.A. (2004). Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. *Curr Biol* 14, 1996-2004.
- Förtsch, J., Hummel, E., Krist, M., und Westermann, B. (2011). The myosin-related motor protein Myo2 is an essential mediator of bud-directed mitochondrial movement in yeast. *J Cell Biol* 194, 473-488.
- Foury, F., und Kucej, M. (2002). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* 6, 106-111.
- Frederick, R.L., McCaffery, J.M., Cunningham, K.W., Okamoto, K., und Shaw, J.M. (2004). Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol* 167, 87-98.
- Frederick, R.L., Okamoto, K., und Shaw, J.M. (2008). Multiple pathways influence mitochondrial inheritance in budding yeast. *Genetics* 178, 825-837.
- Frederick, R.L., und Shaw, J.M. (2007). Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* 8, 1668-1675.
- Frey, T.G., und Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25, 319-324.
- Frey, T.G., Renken, C.W., und Perkins, G.A. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 1555, 196-203.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., und Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358-362.
- Fuchs, F., Prokisch, H., Neupert, W., und Westermann, B. (2002). Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *J Cell Sci* 115, 1931-1937.
- Gabaldon, T., und Huynen, M.A. (2007). From endosymbiont to host-controlled organelle: the hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism. *PLoS Comput Biol* 3, e219.
- Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 334-361.
- Garcia-Rodriguez, L.J., Gay, A.C., und Pon, L.A. (2007). Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J Cell Biol* 176, 197-207.
- Geli, M.I., und Riezman, H. (1996). Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* 272, 533-535.
- Ghaemmighami, S., Huh, W., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., und Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.
- 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.
- Giblin, J., Fernandez-Golbano, I.M., Idrissi, F.Z., und Geli, M.I. (2011). Function and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* myosins-I in endocytic budding. *Biochem Soc Trans* 39, 1185-1190.
- Gietz, R.D., und Schiestl, R.H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2, 31-34.

- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-547.
- Goodson, H.V., Anderson, B.L., Warrick, H.M., Pon, L.A., und Spudich, J.A. (1996). Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 133, 1277-1291.
- Gouin, E., Welch, M.D., und Cossart, P. (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* 8, 35-45.
- Gray, M.W., Burger, G., und Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Gray, M.W., und Doolittle, W.F. (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev* 46, 1-42.
- Guo, X., Macleod, G.T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M.P., Atwood, H.L., und Zinsmaier, K.E. (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron* 47, 379-393.
- Hammer, J.A., 3rd, und Wu, X.S. (2002). Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 14, 69-75.
- Hammermeister, M., Schodel, K., und Westermann, B. (2010). Mdm36 is a mitochondrial fission-promoting protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 21, 2443-2452.
- Harlow, E., und Lane, D. (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Heinicke, S., Livstone, M.S., Lu, C., Oughtred, R., Kang, F., Angiuoli, S.V., White, O., Botstein, D., und Dolinski, K. (2007). The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PLoS One* 2, e766.
- Hermann, G.J., King, E.J., und Shaw, J.M. (1997). The yeast gene, MDM20, is necessary for mitochondrial inheritance and organization of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 137, 141-153.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143, 359-373.
- Herrmann, H., und Aebi, U. (1998). Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* 8, 177-185.
- Herskovitz, S., Lipton, R.B., und Lantos, G. (1988). Neuro-Behcet's disease: CT and clinical correlates. *Neurology* 38, 1714-1720.
- Heuck, A., Fetka, I., Brewer, D.N., Huls, D., Munson, M., Jansen, R.P., und Niessing, D. (2010). The structure of the Myo4p globular tail and its function in ASH1 mRNA localization. *J Cell Biol* 189, 497-510.
- Hill, K.L., Catlett, N.L., und Weisman, L.S. (1996). Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 135, 1535-1549.
- Hollenbeck, P.J., und Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118, 5411-5419.
- Hoppins, S., Collins, S.R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., Devay, R.M., Lackner, L.L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J.S., und Nunnari, J. (2011). A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol* 195, 323-340.

- Huckaba, T.M., Gay, A.C., Pantalena, L.F., Yang, H.C., und Pon, L.A. (2004). Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *167*, 519-530.
- 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.
- Humphries, C.L., Balcer, H.I., D'Agostino, J.L., Winsor, B., Drubin, D.G., Barnes, G., Andrews, B.J., und Goode, B.L. (2002). Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J Cell Biol* *159*, 993-1004.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T., und Takai, Y. (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* *16*, 2745-2755.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., und Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* *170*, 1021-1027.
- Ishikawa, K., Catlett, N.L., Novak, J.L., Tang, F., Nau, J.J., und Weisman, L.S. (2003). Identification of an organelle-specific myosin V receptor. *J Cell Biol* *160*, 887-897.
- Itoh, T., Toh, E.A., und Matsui, Y. (2004). Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast. *EMBO J* *23*, 2520-2530.
- Itoh, T., Watabe, A., Toh, E.A., und Matsui, Y. (2002). Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *22*, 7744-7757.
- Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A.C., Egner, A., Westermann, B., und Hell, S.W. (2003). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J Cell Sci* *116*, 2005-2014.
- Jin, Y., Sultana, A., Gandhi, P., Franklin, E., Hamamoto, S., Khan, A.R., Munson, M., Schekman, R., und Weisman, L.S. (2011). Myosin V transports secretory vesicles via a Rab GTPase cascade and interaction with the exocyst complex. *Dev Cell* *21*, 1156-1170.
- Jin, Y., Taylor Eves, P., Tang, F., und Weisman, L.S. (2009). PTC1 is required for vacuole inheritance and promotes the association of the myosin-V vacuole-specific receptor complex. *Mol Biol Cell* *20*, 1312-1323.
- Kaksonen, M., Sun, Y., und Drubin, D.G. (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* *115*, 475-487.
- Kassir, Y., Adir, N., Boger-Nadjar, E., Raviv, N.G., Rubin-Bejerano, I., Sagee, S., und Shenhar, G. (2003). Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. *Int Rev Cytol* *224*, 111-171.
- Kastenmayer, J.P., Ni, L., Chu, A., Kitchen, L.E., Au, W.C., Yang, H., Carter, C.D., Wheeler, D., Davis, R.W., Boeke, J.D., *et al.* (2006). Functional genomics of genes with small open reading frames (sORFs) in *S. cerevisiae*. *Genome Res* *16*, 365-373.
- Kemper, C., Habib, S.J., Engl, G., Heckmeyer, P., Dimmer, K.S., und Rapaport, D. (2008). Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J Cell Sci* *121*, 1990-1998.
- Kennedy, E.P., und Lehninger, A.L. (1949). Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* *179*, 957-972.

- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 14151-14156.
- Kornmann, B., und Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci* *123*, 1389-1393.
- Kushnirov, V.V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* *16*, 857-860.
- Lackner, L.L., und Nunnari, J.M. (2009). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim Biophys Acta* *1792*, 1138-1144.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.
- Lascaratos, G., Garway-Heath, D.F., Willoughby, C.E., Chau, K.Y., und Schapira, A.H. (2011). Mitochondrial dysfunction in glaucoma: Understanding genetic influences. *Mitochondrion*.
- Lazzarino, D.A., Boldogh, I., Smith, M.G., Rosand, J., und Pon, L.A. (1994). Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity. *Mol Biol Cell* *5*, 807-818.
- Leem, J., und Koh, E.H. (2012). Interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res* *2012*, 242984.
- Lill, R., und Muhlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* *30*, 133-141.
- Lillie, S.H., und Brown, S.S. (1994). Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *125*, 825-842.
- Lipatova, Z., Tokarev, A.A., Jin, Y., Mulholland, J., Weisman, L.S., und Segev, N. (2008). Direct interaction between a myosin V motor and the Rab GTPases Ypt31/32 is required for polarized secretion. *Mol Biol Cell* *19*, 4177-4187.
- Lipinski, K.A., Kaniak-Golik, A., und Golik, P. (2010). Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome--from genetics to evolution and systems biology. *Biochim Biophys Acta* *1797*, 1086-1098.
- Lippincott, J., und Li, R. (1998). Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution. *J Cell Biol* *143*, 1947-1960.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., und Pollard, T.D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* *127*, 107-115.
- Matsui, Y. (2003). Polarized distribution of intracellular components by class V myosins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Rev Cytol* *229*, 1-42.
- McBride, H.M. (2011). Mitochondrial-ER tethering: the inheritance of a functional unit. *Curr Biol* *21*, R949-951.

- Meisinger, C., Rissler, M., Chacinska, A., Szklarz, L.K., Milenkovic, D., Kozjak, V., Schonfisch, B., Lohaus, C., Meyer, H.E., Yaffe, M.P., *et al.* (2004). The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell* 7, 61-71.
- Merz, S., Hammermeister, M., Altmann, K., Durr, M., und Westermann, B. (2007). Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem* 388, 917-926.
- Mnaimneh, S., Davierwala, A.P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W.T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., *et al.* (2004). Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell* 118, 31-44.
- Mooseker, M.S., und Cheney, R.E. (1995). Unconventional myosins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 633-675.
- Moreau, V., Galan, J.M., Devilliers, G., Haguenaer-Tsapis, R., und Winsor, B. (1997). The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis. *Mol Biol Cell* 8, 1361-1375.
- Moseley, J.B., und Goode, B.L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 605-645.
- Motley, A.M., Ward, G.P., und Hettema, E.H. (2008). Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p. *J Cell Sci* 121, 1633-1640.
- Mullins, R.D., Stafford, W.F., und Pollard, T.D. (1997). Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol* 136, 331-343.
- Munn, E.A. (1974). The application of the negative staining technique to the study of membranes. *Methods Enzymol* 32, 20-35.
- Nass, S., und Nass, M.M. (1963). Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *J Cell Biol* 19, 613-629.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., und Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* 8, 1233-1242.
- Pashkova, N., Catlett, N.L., Novak, J.L., und Weisman, L.S. (2005a). A point mutation in the cargo-binding domain of myosin V affects its interaction with multiple cargoes. *Eukaryot Cell* 4, 787-798.
- Pashkova, N., Catlett, N.L., Novak, J.L., Wu, G., Lu, R., Cohen, R.E., und Weisman, L.S. (2005b). Myosin V attachment to cargo requires the tight association of two functional subdomains. *J Cell Biol* 168, 359-364.
- Pashkova, N., Jin, Y., Ramaswamy, S., und Weisman, L.S. (2006). Structural basis for myosin V discrimination between distinct cargoes. *EMBO J* 25, 693-700.
- Peraza-Reyes, L., Crider, D.G., und Pon, L.A. (2010). Mitochondrial manoeuvres: latest insights and hypotheses on mitochondrial partitioning during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioessays* 32, 1040-1049.
- Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M., und Frey, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* 119, 260-272.
- Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C., und Lithgow, T. (2004). Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1044-1048.

- Pon, L.A. (2008). Golgi inheritance: rab rides the coat-tails. *Curr Biol* 18, R743-R745.
- Prinz, W.A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J.A., Silver, P.A., und Rapoport, T.A. (2000). Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 150, 461-474.
- Prokisch, H., Neupert, W., und Westermann, B. (2000). Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell* 11, 2961-2971.
- Pruyne, D., und Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* 113 (Pt 4), 571-585.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., und Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 297, 612-615.
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., und Bretscher, A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 559-591.
- 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*. *J Biol Chem* 273, 20150-20155.
- Reck-Peterson, S.L., Provance, D.W., Jr., Mooseker, M.S., und Mercer, J.A. (2000). Class V myosins. *Biochim Biophys Acta* 1496, 36-51.
- Reichert, A.S., und Neupert, W. (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1592, 41-49.
- Reichert, A.S., und Neupert, W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet* 20, 555-562.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208-212.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., und Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763-1766.
- Roeder, A.D., Hermann, G.J., Keegan, B.R., Thatcher, S.A., und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial inheritance is delayed in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the serine/threonine phosphatase PTC1. *Mol Biol Cell* 9, 917-930.
- Rossanese, O.W., Reinke, C.A., Bevis, B.J., Hammond, A.T., Sears, I.B., O'Connor, J., und Glick, B.S. (2001). A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 153, 47-62.
- Sagot, I., Klee, S.K., und Pellman, D. (2002a). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol* 4, 42-50.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., und Pellman, D. (2002b). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* 4, 626-631.
- Sambrook, V.J., und Russell, D.W. (2000). *Molecular Cloning, Vol 3* (Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Santiago-Tirado, F.H., Legesse-Miller, A., Schott, D., und Bretscher, A. (2011). PI4P and Rab inputs collaborate in myosin-V-dependent transport of secretory compartments in yeast. *Dev Cell* 20, 47-59.

- Scannell, D.R., Butler, G., und Wolfe, K.H. (2007). Yeast genome evolution--the origin of the species. *Yeast* **24**, 929-942.
- Scheffler, I.E. (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **1**, 3-31.
- Schon, E.A., und Przedborski, S. (2011). Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* **70**, 1033-1053.
- Schott, D., Ho, J., Pruyne, D., und Bretscher, A. (1999). The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J Cell Biol* **147**, 791-808.
- Schott, D.H., Collins, R.N., und Bretscher, A. (2002). Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J Cell Biol* **156**, 35-39.
- Seabra, M.C., und Coudrier, E. (2004). Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic* **5**, 393-399.
- Sesaki, H., und Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol* **147**, 699-706.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L., und Vale, R.D. (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11429-11434.
- Sherman, F. (1963). Respiration-deficient mutants of yeast. I. *Genetics* **48**, 375-385.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**, 3-41.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., *et al.* (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **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.
- Simon, V.R., Karmon, S.L., und Pon, L.A. (1997). Mitochondrial inheritance: cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motil Cytoskeleton* **37**, 199-210.
- Simon, V.R., Swayne, T.C., und Pon, L.A. (1995). Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J Cell Biol* **130**, 345-354.
- Smith, J.J., Marelli, M., Christmas, R.H., Vizeacoumar, F.J., Dilworth, D.J., Ideker, T., Galitski, T., Dimitrov, K., Rachubinski, R.A., und Aitchison, J.D. (2002). Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. *J Cell Biol* **158**, 259-271.
- Smith, M.G., Simon, V.R., O'Sullivan, H., und Pon, L.A. (1995). Organelle-cytoskeletal interactions: actin mutations inhibit meiosis-dependent mitochondrial rearrangement in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **6**, 1381-1396.
- Smith, M.G., Swamy, S.R., und Pon, L.A. (2001). The life cycle of actin patches in mating yeast. *J Cell Sci* **114**, 1505-1513.
- Sogo, L.F., und Yaffe, M.P. (1994). Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* **126**, 1361-1373.

- Steinberg, G., und Schliwa, M. (1993). Organelle movements in the wild type and wall-less *fg;sg;os-1* mutants of *Neurospora crassa* are mediated by cytoplasmic microtubules. *J Cell Sci* 106 (Pt 2), 555-564.
- Stevens, B. (1981). Mitochondrial Structure. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Stevens, B.J., und White, J.G. (1979). Computer reconstruction of mitochondria from yeast. *Methods Enzymol* 56, 718-728.
- Stroud, D.A., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Bohnert, M., Lewandrowski, U., Sickmann, A., Guiard, B., van der Laan, M., Warscheid, B., und Wiedemann, N. (2011). Composition and topology of the endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure. *J Mol Biol* 413, 743-750.
- Swayne, T.C., Zhou, C., Boldogh, I.R., Charalel, J.K., McFaline-Figueroa, J.R., Thoms, S., Yang, C., Leung, G., McInnes, J., Erdmann, R., *et al.* (2011). Role for cER and Mmr1p in Anchorage of Mitochondria at Sites of Polarized Surface Growth in Budding Yeast. *Curr Biol* 21, 1994-1999.
- Tanaka, K., und Matsui, Y. (2001). Functions of unconventional myosins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Struct Funct* 26, 671-675.
- Tang, F., Kauffman, E.J., Novak, J.L., Nau, J.J., Catlett, N.L., und Weisman, L.S. (2003). Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole. *Nature* 422, 87-92.
- Tong, A.H., und Boone, C. (2006). Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* 313, 171-192.
- Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Page, N., Robinson, M., Raghizadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., *et al.* (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294, 2364-2368.
- Trybus, K.M. (2008). Myosin V from head to tail. *Cell Mol Life Sci* 65, 1378-1389.
- Tzagoloff, A., und Dieckmann, C.L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 54, 211-225.
- Valiathan, R.R., und Weisman, L.S. (2008). Pushing for answers: is myosin V directly involved in moving mitochondria? *J Cell Biol* 181, 15-18.
- Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., und Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175, 237-247.
- Volkman, N., Amann, K.J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D.C., Hazelwood, L., Heuser, J.E., Li, R., Pollard, T.D., und Hanein, D. (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* 293, 2456-2459.
- Waddle, J.A., Karpova, T.S., Waterston, R.H., und Cooper, J.A. (1996). Movement of cortical actin patches in yeast. *J Cell Biol* 132, 861-870.
- Wang, X., und Schwarz, T.L. (2009). The mechanism of Ca²⁺ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136, 163-174.
- Warren, G., und Wickner, W. (1996). Organelle inheritance. *Cell* 84, 395-400.
- Weisman, L.S. (2006). Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 243-252.

- Welch, M.D., Holtzman, D.A., und Drubin, D.G. (1994). The yeast actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 6, 110-119.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A., und Mitchison, T.J. (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385, 265-269.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., und Mitchison, T.J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281, 105-108.
- Westermann, B. (2002). Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep* 3, 527-531.
- Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem* 283, 13501-13505.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 872-884.
- Westermann, B. (2011). Organelle dynamics: ER embraces mitochondria for fission. *Curr Biol* 21, R922-924.
- Westermann, B., Herrmann, J.M., und Neupert, W. (2001). Analysis of mitochondrial translation products in vivo and in organello in yeast. *Methods Cell Biol* 65, 429-438.
- Westermann, B., und Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 1421-1427.
- Wiedemann, N., Meisinger, C., und Pfanner, N. (2009). Cell biology. Connecting organelles. *Science* 325, 403-404.
- Williamson, D.H., und Fennell, D.J. (1979). Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol* 56, 728-733.
- 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.
- Wurm, C.A., und Jakobs, S. (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett* 580, 5628-5634.
- Yaffe, M.P., Harata, D., Verde, F., Eddison, M., Toda, T., und Nurse, P. (1996). Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11664-11668.
- Yang, H.C., Palazzo, A., Swayne, T.C., und Pon, L.A. (1999). A retention mechanism for distribution of mitochondria during cell division in budding yeast. *Curr Biol* 9, 1111-1114.
- Yang, H.C., und Pon, L.A. (2002). Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 751-756.
- Youngman, M.J., Hobbs, A.E., Burgess, S.M., Srinivasan, M., und Jensen, R.E. (2004). Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J Cell Biol* 164, 677-688.

Anhang

Filme 1-6 Mitochondriale Bewegungen in Zellen des WT (1,3,5) und einer *arc40^{ts}* (2,4,6) Mutante bei permissiver (1,2) und nichtpermissiver (3,4,5,6) Temperatur. Zellen des WT und der *arc40^{ts}* Mutante wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium bei 25°C inkubiert. Daraufhin wurden beide Stämme in einer Durchflusskammer zu einer Cokultur vereinigt, wobei im WT *mtRFP* und in der *arc40^{ts}* Mutante *mtGFP* exprimiert wurde. Die mitochondrialen Bewegungen wurden mittels zeitaufgelöster 3D-Fluoreszenzmikroskopie bei 25°C (1,2) und nach 2 h (3,4) oder 3,5 h (5,6) bei 37°C analysiert. Dabei wurden über einen Zeitraum von 10 min alle 20 s z-Stapel der *mtGFP*- und *mtRFP*-exprimierenden Zellen aufgenommen und durch Ausschneiden und Projektion der maximalen Intensität bearbeitet.

Filme 7-9 Mitochondriale Bewegungen in einer WT, einer *myo2(LQ)* sowie einer *myo2-fis1(2 μ)* Zelle (Förtsch et al., 2011). Zellen mit wildtypischem *MYO2* (7), der Mutante *myo2(LQ)* (8) und *MYO2* Zellen, die *myo2-fis1* exprimierten (9), wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in SD-Minimalmedium angezogen. Die zeitaufgelöste 3D-Fluoreszenzmikroskopie wurde mit Hilfe eines inversen Leica DMI6000 B Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) durchgeführt. Z Stapel der *mtGFP*-exprimierenden Zellen wurden alle zwei Sekunden aufgenommen und durch Dekonvolution und Projektion der maximalen Intensität bearbeitet.