

**Funktionale Charakterisierung neuer Komponenten
der mitochondrialen Morphogenese in
*Saccharomyces cerevisiae***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

– Doktor der Naturwissenschaften –

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Miriam Hammermeister

aus Berlin

Bayreuth 2010

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)“.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2005 bis Januar 2010 an der Universität Bayreuth am Institut für Zellbiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Benedikt Westermann angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 28.04.10

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 17.09.10

Prüfungsausschuss:

Erstgutachter: Prof. Dr. Benedikt Westermann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Olaf Stemmann

Vorsitzender: Prof. Dr. Stephan Clemens

Prof. Dr. Thomas Scheibel

PD Dr. Martina Meyering-Vos

Für Matthias

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	IX
Summary.....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Modellorganismus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>).....	1
1.2 Funktion, Struktur und Ursprung von Mitochondrien.....	2
1.3 Die mitochondriale Morphologie.....	4
1.3.1 Fusion und Teilung von Mitochondrien in <i>S. cerevisiae</i>	5
1.3.1.1 Die mitochondriale Fusionsmaschinerie.....	6
1.3.1.2 Die mitochondriale Teilungsmaschinerie.....	8
1.3.2 Das Aktinzytoskelett.....	12
1.3.3 <i>MDM</i> -Gene.....	13
1.4 Zielsetzung.....	14
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.1.1 Verwendete Plasmide.....	17
2.1.2 Präparation von DNA.....	18
2.1.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	18
2.1.2.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	19
2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	19
2.1.4 Enzymatische Modifikationen von DNA.....	21
2.1.4.1 Restriktionsverdau von DNA.....	21
2.1.4.2 Dephosphorylierung von DNA mit Alkalischer Phosphatase.....	21
2.1.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase.....	22
2.1.5 Reinigung und Analyse von DNA.....	22
2.1.5.1 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	22
2.1.5.2 Agarosegelelektrophorese.....	22
2.1.5.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	22
2.1.5.4 Reinigung von DNA mittels Qiagen PCR-Purification Kit.....	23
2.1.6 Übertragung von genetischem Material in <i>E. coli</i>	23
2.1.6.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	23
2.1.6.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	23
2.2 Methoden der Hefegenetik.....	24
2.2.1 Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	24
2.2.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.2.3 Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> mittels Tüpfeltest.....	27
2.2.4 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Hefepiasmiden.....	27

2.2.5 Kreuzung und Tetradenanalyse von <i>S. cerevisiae</i> zur Herstellung von Doppelmutanten.....	28
2.2.6 Deletion nicht essentieller Gene in <i>S. cerevisiae</i> mittels homologer Rekombination.....	29
2.2.7 Nachweis chromosomaler Deletionen in <i>S. cerevisiae</i>	29
2.3 Methoden der Zellbiologie.....	30
2.3.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe.....	30
2.3.2 Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	30
2.3.3 Reinigung isolierter Mitochondrien mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	31
2.3.5 Fluoreszenzmikroskopische Analysen.....	32
2.3.5.1 Färbung subzellulärer Strukturen in <i>S. cerevisiae</i> für die Fluoreszenzmikroskopie.....	32
2.3.5.2 Fixierung von Zellen.....	34
2.3.5.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	34
2.3.5.4 Konfokale Mikroskopie.....	34
2.3.6 Elektronenmikroskopie.....	35
2.3.6.1 Hefepreparation und Einbettung von Hefezellen nach Bauer <i>et al.</i> (2001) und Spurr (1969).....	35
2.3.6.2 Trimmen, Schneiden und Nachkontrastierung der Proben.....	36
2.3.6.3 Elektronenmikroskopie.....	36
2.3.6.4 Erstellen eines 3D-Modells mit IMOD.....	37
2.3.6.5 Befilmen von Kupfer-Lochgrids.....	37
2.3.7 Behandlung von Hefezellen mit Latrunculin A.....	37
2.3.8 <i>In vivo</i> Nachweis der mitochondrialen Fusion (Mating Assay).....	37
2.4 Methoden der Proteinbiochemie.....	38
2.4.1 Präparation von Proteinen.....	38
2.4.1.1 Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> zur Erzeugung polyklonaler Antiseren.....	38
2.4.1.2 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine <i>in vitro</i>	40
2.4.1.3 <i>In vitro</i> Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien.....	40
2.4.1.4 Flotationsexperiment mit vorgeschaltetem Importansatz.....	41
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	42
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.4.4 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western-Blot).....	43
2.4.5 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mittels Autoradiographie.....	44
2.4.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	44
3 Ergebnisse.....	45
3.1 Die mitochondriale Morphologiekomponente Mdm36.....	45
3.1.1 Die Δ <i>mdm36</i> -Mutante besitzt netzähnliche Mitochondrien.....	45
3.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Δ <i>mdm36</i> -Mutante und die Erstellung eines 3D-Modells bestätigen den netzähnlichen mitochondrialen Phänotyp.....	47
3.1.3 Der Verlust von Mdm36 hat keinen Einfluss auf die Vakuolen, das Endoplasmatische Retikulum oder auf das Aktinzytoskelett.....	51
3.1.4 Einordnung von Mdm36 in die mitochondriale Morphogenesemaschinerie.....	52
3.1.4.1 Untersuchung von Doppelmutanten, in denen <i>MDM36</i> und eine mitochondriale Fusionskomponente deletiert ist.....	53

3.1.4.2 Untersuchung von Doppelmutanten, in denen <i>MDM36</i> und eine mitochondriale Teilungskomponente deletiert ist	60
3.1.5 In der $\Delta mdm36$ -Mutante ist die Fragmentierung der Mitochondrien nach Depolymerisation des Aktinzytoskeletts gestört.....	66
3.1.6 Lokalisation von Mdm36.....	69
3.1.6.1 Mdm36 wird nicht in die Mitochondrien importiert.....	70
3.1.6.2 Mdm36 liegt an den Mitochondrien assoziiert vor.....	72
3.1.7 Die Anzahl an teilungsaktiven Dnm1-Komplexen ist in $\Delta mdm36$ -Zellen reduziert.....	75
3.1.8 Die Geschwindigkeit und die Bewegung der Mitochondrien ist in der $\Delta mdm36$ -Mutante erhöht.....	80
3.1.9 In $\Delta mdm36$ -Mutanten ist die Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex gestört.....	85
3.1.10 In der $\Delta mdm36$ -Mutante ist die Kolokalisation von Num1-RFP und Dnm1-GFP gestört.....	87
3.2 Die mitochondriale Morphologiekomponente Mdm35.....	89
3.2.1 Die Deletion von <i>MDM35</i> , <i>EMI1</i> und <i>MRP10</i> führt zu einer veränderten mitochondrialen Morphologie.....	89
3.2.2 Die $\Delta mdm35$ -Deletionsmutante besitzt sphärische Mitochondrien und eine verminderte respiratorische Kompetenz.....	91
3.2.3 Die Ultrastruktur der $\Delta mdm35$ -Mutante zeigt veränderte mitochondriale Strukturen.....	93
3.2.4 Mdm35 hat keine Auswirkungen auf die mitochondriale Fusionseffizienz.....	95
3.2.5 Der gleichzeitige Verlust von <i>MDM35</i> und <i>MDM31</i> bzw. <i>MDM32</i> ist synthetisch letal.....	97
3.2.6 Mdm35 ist mitochondrial lokalisiert.....	99
4 Diskussion.....	102
4.1 Mdm36: Eine neue Komponente der mitochondrialen Teilungsmaschinerie.....	102
4.1.1 $\Delta mdm36$ -Mutanten besitzen eine reduzierte Teilungsaktivität.....	102
4.1.2 In <i>mdm36</i> -Deletionsmutanten ist die Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex gestört.....	105
4.1.3 Der Einfluss der mitochondrialen Zellkortexverankerung auf die Teilung.....	107
4.2 Mdm35: Eine neue Morphologiekomponente.....	108
5 Literaturverzeichnis.....	111
6 Anhang.....	121
Publikationsliste.....	123
Danksagung.....	124
Erklärungen.....	125

Abkürzungsverzeichnis

AM	mitochondriale Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
CC	Coiled-coil-Domäne
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnm1-GFP	Fusionsprotein aus Dnm1 und GFP
DTT	Dithiothreitol
EB-Puffer	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
5-FOA	5 Fluororotsäure
G418	Geneticin-Disulfat
GED	GTPase-Effektordomäne
IM	mitochondriale Innenmembran
IMR	mitochondrialer Intermembranraum
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
LB	<i>lysogeny broth</i> bzw. Luria-Bertani-Medium (<i>E. coli</i> -Nährlösung)
MOPS	3-[N-Morpholino]ethansulfonat
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale DNA
mtGFP	Fusionsprotein aus GFP und mitochondrialer Präsequenz
mtRFP	Fusionsprotein aus RFP und mitochondrialer Präsequenz
NTE	<i>N-terminal extension</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglykol
<i>pet</i>	<i>petite</i>
[<i>rho</i> ⁰]	kompletter Verlust der mtDNA
[<i>rho</i> ⁺]	intakte mtDNA
[<i>rho</i> ⁻]	partieller Verlust der mtDNA durch Mutationen oder Deletionen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD/SGal	Minimalselektivmedium mit Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors</i>
ssCarrierDNA	Lachsspermien DNA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TPR	<i>tetratricopeptid repeat</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- propan-1,3-diol
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

YPD/YPG/YPGal Hefenährmedium aus Hefeextrakt und Pepton mit Glukose, Glycerin oder Galaktose als Kohlenstoffquelle

Zusammenfassung

Die Morphologie und die Dynamik von Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle bei der Funktion und Vererbung dieser Organellen. Zum besseren Verständnis der beteiligten Prozesse müssen alle dazugehörigen Komponenten identifiziert und charakterisiert werden. Die Erforschung von zwei Proteinen, Mdm35 und Mdm36, die die mitochondriale Morphologie und Verteilung beeinflussen, und ihre mögliche Eingliederung in den Morphogenesapparat der Mitochondrien war Gegenstand dieser Arbeit.

Der erste Teilabschnitt der Arbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung und Ermittlung der Funktion von Mdm36 in der Gestaltgebung von Mitochondrien. Die Dynamik der Mitochondrien wird maßgeblich von den beiden antagonistischen Prozessen Fusion und Teilung bestimmt. Dnm1, eine Dynamin-verwandte GTPase, stellt die Schlüsselkomponente der mitochondrialen Teilung in Hefe dar, die in Zusammenarbeit mit weiteren Komponenten agiert. Teilungsmutanten besitzen netzartige Mitochondrien, die aufgrund der gestörten Teilung bei fortlaufender Fusion entstehen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Deletionsmutanten von *MDM36* stark verzweigte mitochondriale Netzwerke aufweisen, die denen der Teilungsmutanten sehr ähneln. Doppeldeletionsstudien mit den Fusionskomponenten Fzo1 und Mdm30 lassen annehmen, dass Mdm36 der Fusion entgegengesetzt wirkt. Außerdem ist in Δ *mdm36*-Mutanten die durch die Depolymerisation des Aktinzytoskeletts induzierte mitochondriale Teilung blockiert und die Anzahl an teilungsaktiven Dnm1-Komplexen reduziert. Das Zellkortex-assoziierte Protein Num1 interagiert mit mitochondrial assembliertem Dnm1 und fördert über die dadurch geschaffene Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex die mitochondriale Teilung. Der mitochondriale Phänotyp der Δ *mdm36*- und Δ *num1*-Mutanten ist fast identisch. Beide Mutanten besitzen netzähnliche, kompakte Mitochondrien, die wenig Nähe zur Zellperipherie aufweisen und hoch dynamisch sind. Durch die Abwesenheit von Mdm36 wird die Kollokalisierung von Dnm1 und Num1 aufgehoben. Diese Ergebnisse liefern weitere Einblicke in die mitochondriale Teilungsmaschinerie und legen ein Modell nahe, in dem Mdm36 für die Bildung des Num1/Dnm1-Komplexes und folglich für die Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex benötigt wird. Über diesen wird dann die notwendige Spannung entlang des Mitochondrientubulus für die Dnm1-abhängige Teilung erzeugt.

Im zweiten Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die mitochondriale Morphologie der Mutanten der kürzlich identifizierten Twin Cx₉C-Protein-Familie analysiert. Anschließend wurde das dabei und durch eine vorhergehende systematische Durchmusterung einer Hefedeletionsstammsammlung auffällig gewordene Protein Mdm35 näher untersucht.

Mdm35 ist ein mitochondriales Protein des Intermembranraums, dessen Deletionsmutante zum Großteil sphärische Mitochondrien besitzt und einen Wachstumsdefekt bedingt durch den Verlust von mitochondrialer DNA aufweist. Die Mitochondrien und das instabile mitochondriale Genom der $\Delta mdm35$ -Mutante zeigen Ähnlichkeiten zu Zellen auf, denen entweder die mitochondrialen Innenmembranproteine Mdm31 bzw. Mdm32 fehlen, oder die mitochondrialen Außenmembranproteine Mmm2, Mdm10, Mdm12 bzw. das integrale Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums Mmm1. Die gleichzeitige Deletion von *MDM35* und *MDM31* bzw. *MDM32* ist synthetisch letal, was ein Hinweis darauf ist, dass die Proteine an demselben zellulären Prozess beteiligt sind. Für die Deletion von *MDM31* und *MDM32* konnte bereits eine synthetische Letalität mit *MMM1*, *MMM2*, *MDM10* und *MDM12* gezeigt werden. Mmm1, Mmm2, Mdm10 und Mdm12 bilden einen Komplex aus, der eine Bindung zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien herstellt und vermutlich für den Austausch von Calcium und Phospholipiden zuständig ist. Dieser Komplex befindet sich außerdem in Nachbarschaft aktiv replizierender mitochondrialer DNA. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mdm35 möglicherweise als Protein des Intermembranraums eine Funktion bei der Vermittlung zwischen dem Mmm1/Mmm2/Mdm10/Mdm12-Proteinkomplex und den Innenmembranproteinen Mdm31/Mdm32 besitzt und so ein koordiniertes mitochondriales Wachstum ermöglicht durch Kopplung der Replikation des mitochondrialen Genoms und der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Membranen über den Lipidtransport.

Summary

Morphology and dynamics of mitochondria play a central role for function and inheritance of these organelles. For a better understanding of the involved processes all corresponding components have to be identified and characterized. The investigation of two proteins, Mdm35 and Mdm36, which influence the mitochondrial morphology and distribution, and the unraveling of their possible roles within the mitochondrial morphogenesis machinery was subject of this work.

The first part of the work dealt with the characterization and determination of the function of Mdm36 concerning the morphology of mitochondria. The dynamic behavior of mitochondria is crucially determined by the antagonistic processes fusion and fission. Dnm1, a dynamin-related GTPase, is the key component of mitochondrial division in yeast which is acting in concert with additional components. Division mutants harbor net-like mitochondria which are formed due to blocked fission by ongoing fusion. Here, it was shown that deletion mutants of *MDM36* possess highly interconnected mitochondrial networks that resemble mitochondria of division mutants. Double deletion analyses with the fusion components Fzo1 and Mdm30 indicate that Mdm36 acts antagonistically to the fusion process. Furthermore, in Δ *mdm36*-mutants mitochondrial fission induced by depolymerization of the actin cytoskeleton is blocked and the amount of fission-active Dnm1 complexes is reduced. The cell cortex-associated protein Num1 interacts with mitochondrially assembled Dnm1 and thus promotes mitochondrial division via the binding of mitochondria to the cell cortex. The mitochondrial phenotype of the Δ *mdm36*- and Δ *num1*-mutants is virtually identical. Both mutants show net-like, compact mitochondria that are not restricted to the cell periphery and highly motile. In the absence of Mdm36 the colocalization of Dnm1 and Num1 is abolished. These results provide further insight into the mitochondrial division machinery and suggest that Mdm36 is required for the formation of the complex containing Num1 and Dnm1 and thus for the binding of mitochondria to the cell cortex. This complex then is necessary for the generation of tension along mitochondrial tubules that is critical for a Dnm1-dependent division.

In the second part of the work the mitochondrial morphology of the mutants of the recently identified twin Cx₉C protein family was analyzed. Afterwards the protein Mdm35, which also was found in a systematic screen of a yeast deletion library, was further investigated. Mdm35 is a mitochondrial protein of the intermembrane space. Deletion mutants mainly harbor spherical mitochondria and show a growth defect due to the loss of mitochondrial DNA. The mitochondria and the unstable mitochondrial genome of Δ *mdm35*-

mutants strikingly resemble cells that lack either the mitochondrial inner membrane proteins Mdm31 or Mdm32, or the mitochondrial outer membrane proteins Mmm2, Mdm10, Mdm12 or the integral membrane protein of the endoplasmic reticulum Mmm1. The mutual deletion of *MDM35* and *MDM31* or *MDM32* is synthetically lethal. This observation points to a role of these proteins in the same cellular process. For the deletion of *MDM31* and *MDM32* it was already shown that additional deletion of *MMM1*, *MMM2*, *MDM10* and *MDM12* is also synthetically lethal. Mmm1, Mmm2, Mdm10 and Mdm12 form a complex that works as a molecular tether between the endoplasmic reticulum and mitochondria and is presumably responsible for calcium and phospholipid exchange. In addition, this complex is localized adjacent to actively replicating mitochondrial DNA. These data suggest that Mdm35, maybe as a protein of the intermembrane space, functions as a mediator between the Mmm1/Mmm2/Mdm10/Mdm12 protein complex and the inner membrane proteins Mdm31/Mdm32. Thus coordinated mitochondrial growth would be possible by coupling mitochondrial genome replication and membrane upkeep via transport of lipids.

1 Einleitung

Mitochondrien sind essentielle Organellen fast aller eukaryotischer Zellen. Ihre Hauptfunktion ist die Energieerzeugung über die oxidative Phosphorylierung (Saraste, 1999). Aber auch andere wichtige metabolische Prozesse, wie z.B. die Eisen/Schwefel-Cluster-Assemblierung, die Lipidbiosynthese sowie die Synthese einiger Aminosäuren, werden von mitochondrial lokalisierten Proteinen bewerkstelligt (Scheffler, 2001). Mitochondrien sind komplexe, von einer Doppelmembran umgebene Organellen mit einer charakteristischen Morphologie und Verteilung innerhalb der Zelle. Beide Faktoren sind für die Aufrechterhaltung sämtlicher mitochondrial gesteuerter Prozesse von großer Bedeutung. Eine Fehlfunktion dieser Prozesse hat viele neurodegenerative Krankheiten zur Folge, wie z.B. Parkinson und Alzheimer, sowie die Zellalterung und Apoptose (Schapira, 2006; Schapira, 2008). Die Entschlüsselung der an der mitochondrialen Morphogenese beteiligten Komponenten ist deswegen von erheblicher Relevanz. Einige Proteine, die die Morphologie und die Verteilung der Mitochondrien beeinflussen, wurden bereits aufgedeckt, andere hingegen bedürfen noch weiterer Erforschung.

1.1 Der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein eukaryotischer, einzelliger Pilz aus dem Stamm der Ascomyceten, der sich als Modellorganismus für die Erforschung von zellulären Prozessen aus mehreren Gründen bewährt hat. Zum einen ist das Genom der Bäckerhefe seit 1996 vollständig sequenziert (Goffeau *et al.*, 1996) und aufgrund der großen Homologien zwischen *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten (46% Homologie zum Menschen) lassen sich die erhaltenen Erkenntnisse auch auf mehrzellige Organismen übertragen (Lander *et al.*, 2001; Foury und Kucej, 2002). Zum anderen sind Hefezellen leicht kultivierbar, besitzen eine kurze Generationszeit (~ 2 h) und können bei -80°C über Jahre hinweg stabil gelagert werden. Diese Faktoren zusammen mit der leichten gentechnischen Manipulierbarkeit machen Hefe zu einem experimentell einfach zu handhabenden Modellorganismus.

Für die Erforschung von Mitochondrien ist *S. cerevisiae* ein besonders gut geeigneter Organismus. Hefezellen sind fakultativ anaerob und können somit ihren Energiebedarf durch Fermentation decken (Tzagoloff und Dieckmann, 1990). Folglich sind nur wenige Proteine für das Überleben der Hefezellen essentiell. Aus diesem Grund sind auch Deletionen und Mutationen von Genen leicht zu analysieren, die für die Funktion von Mitochondrien nötig sind, wie z.B. die respiratorische Kompetenz und die mitochondriale Morphologie.

Bäckerhefe kann sowohl haploid ($MATa$ und $MAT\alpha$) als auch diploid ($MATa/\alpha$) vorliegen, was für genetische Arbeiten von großem Nutzen ist. Gentechnische Manipulationen können sehr leicht an haploiden Hefezellen durchgeführt werden, da nur eine Kopie des Gens verändert werden muss. Diploide Hefezellen entstehen durch Verschmelzung von haploiden Zellen entgegengesetzten Paarungstyps (sexueller Zyklus). Sowohl Diploide als auch Haploide können sich durch Knospung vermehren (vegetativer Zyklus). Bei schlechten Lebensbedingungen bilden diploide Hefezellen außerdem über Meiose haploide Sporen aus, die als Tetrade in einem sogenannten Ascus vorliegen. Bei besseren Bedingungen können diese wieder zu haploiden Zellen keimen (Herskowitz, 1988; Kassir *et al.*, 2003).

1.2 Funktion, Struktur und Ursprung von Mitochondrien

Mitochondrien sind an einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen beteiligt. Ihre zentrale Rolle liegt in der Versorgung der Zelle mit Energie in Form von ATP (Saraste, 1999). Eine weitere wichtige Funktion beinhaltet die Biogenese und Assemblierung von Eisen/Schwefel-Clustern, die essentielle Kofaktoren von Proteinen bilden, die im Elektronentransport, in der enzymatischen Katalyse sowie in der Regulation der Genexpression involviert sind (Kispal *et al.*, 2005; Lill und Mühlhoff, 2005). Außerdem sind Mitochondrien an Prozessen beteiligt wie dem Fettsäureabbau, dem Harnstoffzyklus, der Häm-Biosynthese sowie der Synthese einiger Aminosäuren und Lipide (Scheffler, 2001; Sickmann *et al.*, 2003). Durch die Rolle der Organellen bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, (Green und Reed, 1998; Perfettini *et al.*, 2005) und in der Zellalterung (Balaban *et al.*, 2005) sowie durch die Entdeckung von Krankheiten, die auf eine Fehlfunktion der Mitochondrien zurückzuführen sind (Schapira, 2006; Schapira, 2008), wird in der zellbiologischen Forschung wieder ein Hauptaugenmerk auf die Mitochondrien gelegt.

Laut der Endosymbiontentheorie sind Mitochondrien durch Phagozytose eines α -Proteobakteriums in eine präeukaryotische Urzelle entstanden (Gray *et al.*, 1999). Darin liegt auch der Aufbau der Mitochondrien begründet. Das Organell ist von zwei Membranen umgeben, der mitochondrialen Außen- und Innenmembran, die den Matrixbereich vom Zytosol abgrenzen. Zwischen der mitochondrialen Außen- und Innenmembran liegt ein schmaler Raum, der als Intermembranraum bezeichnet wird. Die sogenannten Cristae, Einstülpungen der Innenmembran, dienen zur Oberflächenvergrößerung und ragen in den Matrixraum hinein. Die Cristae stellen eigene Mikrokompimente dar, die über *cristae junctions* mit der *inner boundary membrane*, der parallel zur Außenmembran verlaufenden Innenmembran, verbunden sind (Perkins *et al.*, 1997; Mannella, 2008). Infolgedessen wird die

Innenmembran nochmals in zwei Subkompartimente unterteilt: die Cristae-Membran und die *inner boundary membrane* (Vogel *et al.*, 2006; Wurm und Jakobs, 2006). Somit entstehen fünf von einander getrennte Reaktionsräume, die aufgrund ihrer räumlichen Trennung und einer unterschiedlichen Ausstattung an Proteinen verschiedene Funktionen in den Mitochondrien übernehmen können.

Zusätzlich zu der Doppelmembran, die für die Endosymbiontentheorie spricht, gibt es noch ein weiteres Argument, das diese Hypothese untermauert: Mitochondrien sind im Besitz eines eigenen Genoms. Die zirkuläre mitochondriale DNA (mtDNA) liegt in *S. cerevisiae* in Form von ~10-15 mtDNA-Nukleoiden pro Zelle vor (Williamson und Fennell, 1979). Nukleoide sind große Komplexe, die ein bis zwei Kopien der DNA-Moleküle sowie verschiedenste Proteine beinhalten, wie z.B. in der Bäckerhefe die mtDNA-Polymerase Mip1 (Foury, 1989), das DNA-bindende Verpackungsprotein Abf2 (Diffley und Stillman, 1991; Diffley und Stillman, 1992) sowie das DNA-bindende Protein Mgm101, das für die Reparatur oxidativer mtDNA-Schäden verantwortlich ist (Chen *et al.*, 1993; Meeusen *et al.*, 1999). Abhängig vom jeweiligen Organismus kodiert die mtDNA aber nur für wenige mitochondriale Faktoren. Unter ihnen sind tRNAs, rRNAs, Untereinheiten der mitochondrialen Ribosomen sowie der Atmungskettenkomplexe (Grivell, 1995; Gray *et al.*, 1999). Im Verlauf der Evolution wurde beinahe das gesamte Genom des Endosymbionten eliminiert bzw. über Gentransfer in den Zellkern integriert (Adams und Palmer, 2003; Timmis *et al.*, 2004). Folglich liegt eine Vielzahl der für die mitochondrialen Proteine kodierenden Gene im Kerngenom vor (ungefähr 1000 Proteine in Hefe) (Sickmann *et al.*, 2003; Güldener *et al.*, 2005). Nach der im Zytosol erfolgten Synthese müssen die Proteine posttranslational über die in den mitochondrialen Membranen lokalisierten Transportkomplexe in die Mitochondrien importiert werden (Pfanner *et al.*, 2004; Reichert und Neupert, 2004). Damit Mitochondrien funktionsfähig sind, muss also die Expression des Kerngenoms und der mtDNA koordiniert ablaufen.

Hefemutanten mit einem Defekt in der oxidativen Phosphorylierung können auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle nicht wachsen. Sie werden als *pet*-Mutanten (*petite*) bezeichnet, da sie auf einer begrenzten Menge an fermentierbarer Kohlenstoffquelle kleinere Kolonien ausbilden als der Wildtyp (Ephrussi *et al.*, 1949). Dabei wird zwischen zytoplasmatischen und nukleären *petites* unterschieden. Zu den zytoplasmatischen *pet*-Mutanten gehören Hefestämme, die einen Defekt in der mtDNA besitzen. Kommt es zur Beschädigung der mtDNA, so wird die Bezeichnung [*rho*⁻] und beim kompletten Verlust der mtDNA die Bezeichnung [*rho*⁰] verwendet. Hefestämme, die funktionelle mtDNA besitzen,

werden als $[rho^+]$ bezeichnet. Nukleäre *pet*-Mutanten hingegen tragen die Mutation im Kerngenom (Tzagoloff und Dieckmann, 1990).

Da Mitochondrien nicht *de novo* synthetisiert werden können, müssen sie zusammen mit der mtDNA an die Tochterzellen vererbt werden. Dafür wurde ein membrandurchspannender Komplex bestehend aus den Proteinen Mmm1 (*mitochondrial maintenance of morphology*), Mmm2, Mdm10 (*mitochondrial distribution and morphology*) und Mdm12 postuliert, der möglicherweise eine Verbindung zwischen der mtDNA und dem Aktinzytoskelett herstellt (Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003). Mdm31 und Mdm32 sind Proteine der Innenmembran, die die Verbindung der mtDNA mit dem membrandurchspannenden Komplex herstellen könnten (Dimmer *et al.*, 2005). Nach neuesten Erkenntnissen scheint Mmm1 jedoch kein mitochondriales Außenmembranprotein zu sein, sondern ein integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Kornmann *et al.*, 2009). Die Proteine Mmm1, Mmm2, Mdm10 und Mdm12 bilden vermutlich einen Komplex (ERMES = *ER-mitochondria encounter structure*), der eine Bindung zwischen ER und den Mitochondrien herstellt und für den Austausch von Calcium und Phospholipiden zuständig ist (Kornmann *et al.*, 2009).

1.3 Die mitochondriale Morphologie

Mitochondrien sind keine starren Gebilde mit einer nierenförmigen Gestalt, so wie es in vielen Lehrbüchern dargestellt ist. Abhängig vom Organismus und dem Zelltyp sowie dem zellulären metabolischen Bedarf existieren Mitochondrien in unterschiedlicher Form und Anzahl. Sogar in einem einzelligen Organismus wie *S. cerevisiae* ist die Morphologie der Mitochondrien sehr variabel. In logarithmisch wachsenden Hefezellen bilden die Mitochondrien ein verzweigtes, tubuläres Netzwerk unter dem Zellkortex aus (Hoffmann und Avers, 1973; Stevens, 1981). Dabei ist die Kohlenstoffquelle ausschlaggebend für den Grad der Verzweigung. Auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle müssen die Hefezellen ihren ATP-Bedarf über die Atmung decken, was eine höhere Mitochondrienmasse zur Folge hat (Visser *et al.*, 1995; Egner *et al.*, 2002). Auch die jeweilige Wachstumsphase der Zellen hat einen starken Einfluss auf die mitochondriale Morphologie. In der stationären Wachstumsphase besitzen die Hefezellen anstelle des mitochondrialen Retikulums zahlreiche kleine Fragmente. Für die Adaption der mitochondrialen Morphologie an die jeweiligen physiologischen Bedingungen sowie für die Vererbung der Mitochondrien sind sowohl die koordinierten Prozesse Teilung und Fusion als auch der gerichtete Transport der

Mitochondrien entlang des Zytoskeletts essentiell (Bereiter-Hahn, 1990; Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto und Shaw, 2005; Merz *et al.*, 2007).

1.3.1 Fusion und Teilung von Mitochondrien in *S. cerevisiae*

Die Ausbildung eines kontinuierlichen mitochondrialen Netzwerkes ist abhängig von einem dynamischen Gleichgewicht der beiden antagonistischen Prozesse Teilung und Fusion (Sesaki und Jensen, 1999; Shaw und Nunnari, 2002; Westermann, 2008). Durch das Fehlen einer Teilungs- bzw. einer Fusionskomponente wird das Gleichgewicht in Richtung Fusion bzw. Teilung verschoben, wodurch das mitochondriale Netzwerk einer starken morphologischen Veränderung unterliegt (Abb.1-1). Ist die Teilung blockiert, indem z.B. das kodierende Gen der Teilungskomponente Dnm1 (*dynamin-related*) deletiert ist, so kommt es aufgrund der fortschreitenden Fusion zur Ausbildung von stark miteinander verbundenen, netzartigen (fischernetzartigen) Mitochondrien (Abb.1-1) (Otsuga *et al.*, 1998). Wird das Gleichgewicht hingegen durch Verlust einer Fusionskomponente wie Fzo1 (*fuzzy onions*) in Richtung Teilung verschoben, kommt es zur Fragmentierung des mitochondrialen Retikulums (Abb.1-1) und zusätzlich zur respiratorischen Inkompetenz durch Verlust der mtDNA. Bei der gleichzeitigen und gleich starken Störung beider Prozesse bildet sich hingegen wieder ein wildtypähnliches, mitochondriales Netzwerk aus (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999).

Der mitochondriale Phänotyp kann durch die Reihenfolge der Ausschaltung der Gene stark beeinflusst werden. So zeigt eine Doppelmutante, in der zuerst *FZO1* deletiert wurde und dann *DNM1*, zum großen Teil fragmentierte mitochondriale Strukturen. Wird hingegen zunächst die Teilungskomponente Dnm1 blockiert und dann die Fusionskomponente Fzo1, so weist der Hefestamm eine netzartige Mitochondrienmorphologie auf (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999).

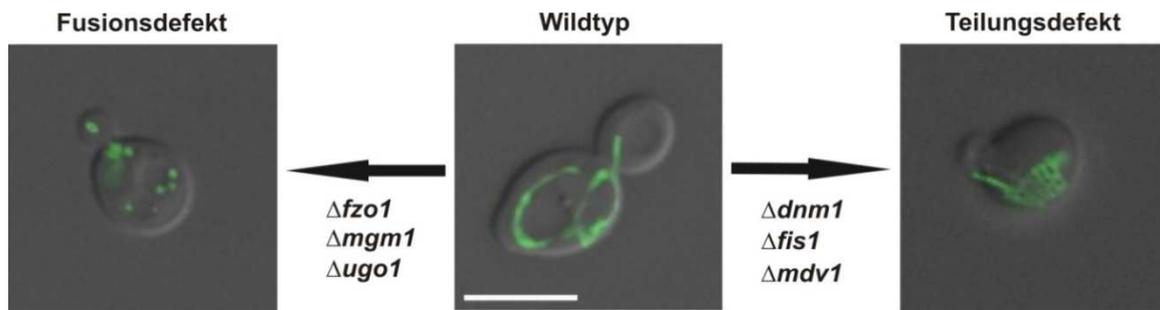


Abb.1-1: Mitochondriale Morphologie bei Blockade des Fusions- oder Teilungsapparates. Bei Fehlen von Fusionskomponenten (Fzo1, Mgm1, Ugo1) kommt es durch Störung der mitochondrialen Fusion bei fortlaufender mitochondrialer Teilung zur Ausbildung von fragmentierten Mitochondrien (links). Umgekehrt bilden sich bei der Blockade der mitochondrialen Teilung durch Verlust von Dnm1, Fis1 bzw. Mdv1 bei andauernder Fusionsaktivität der Mitochondrien stark verzweigte, netzartige (fischernetzartige) mitochondriale Strukturen aus (rechts). Ein wildtypähnliches, mitochondriales Retikulum entsteht durch gleichzeitige Deletion von Teilungs- und Fusionskomponenten (Mitte). Dargestellt sind jeweils Überlagerungen einer Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) mit einer Fluoreszenzaufnahme der Mitochondrien (mtGFP). Der Größenbalken entspricht 5 μm .

1.3.1.1 Die mitochondriale Fusionsmaschinerie

Mitochondrien sind Organellen, die eine Doppelmembran besitzen, weswegen für ihre Fusion sowohl Komponenten der Innen- als auch der Außenmembran benötigt werden. Die mitochondriale Fusionsmaschinerie in *S. cerevisiae* besteht aus drei Kernkomponenten: Fzo1, Ugo1 und Mgm1. *FZO1* aus der Hefe wurde als Homolog des *fuzzy onions*-Gens von *Drosophila melanogaster* identifiziert (Hales und Fuller, 1997; Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Das Fzo1-Protein ist evolutionär konserviert und eine große GTPase, die in hochmolekulare Komplexe assembliert. Fzo1 besitzt zwei Transmembrandomänen, die es in der Außenmembran der Mitochondrien verankern, und exponiert zwei oder drei Coiled-Coil-Domänen und die GTPase-Domäne ins Zytosol. Die Loop-Region zwischen den beiden Transmembrandomänen ist im Intermembranraum lokalisiert (Abb.1-2) (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2001). Über diese könnte Fzo1 mit Komponenten der mitochondrialen Innenmembran interagieren. Vermutlich stellt Fzo1 die Schlüsselkomponente der mitochondrialen Fusion dar, indem es das Vermischen der Lipid-Doppelschicht der mitochondrialen Außenmembranen vermittelt (Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008).

Die Dynamamin-verwandte GTPase Mgm1 (*mitochondrial genome maintenance*) wurde in einem Screen entdeckt, in dem nach Mutanten gesucht wurde, die einen Defekt im Erhalt des mitochondrialen Genoms aufwiesen (Jones und Fangman, 1992). Mgm1 besitzt einen Transmembrananker, eine GTPase-Domäne, eine mittlere Domäne unbekannter Funktion und eine GTPase-Effektordomäne (GED) (Wong *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2003; Okamoto und Shaw, 2005) und liegt in zwei Isoformen vor, einer langen (l-Mgm1) und einer kurzen (s-

Mgm1) (Abb.1-2). Die lange Isoform l-Mgm1 ist über eine Transmembrandomäne in der mitochondrialen Innenmembran verankert. S-Mgm1 wird durch proteolytische Prozessierung erzeugt, wodurch es zu einer Abspaltung der Transmembranregion von l-Mgm1 kommt. Es liegt im Intermembranraum peripher an der Innenmembran assoziiert vor (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003).

Die dritte mitochondriale Fusionskomponente Ugo1 (*ugo* = japanisch für Fusion) ist in der mitochondrialen Außenmembran eingebettet (Abb.1-2) (Sesaki und Jensen, 2001). Ugo1 besitzt drei Transmembrandomänen sowie zwei vermeintliche Carrier-Domänen. Während der N-Terminus ins Zytosol ragt, befindet sich der C-Terminus im Intermembranraum (Hoppins *et al.*, 2009).

Der *Turnover* von Fzo1 reguliert die Effizienz der mitochondrialen Fusion. Dieser ist abhängig von Mdm30 (*mitochondrial distribution and morphology*). Mdm30 ist ein Mitglied der F-Box-Protein-Familie und vermittelt die Ubiquitylierung und den dadurch initiierten Abbau von Fzo1 (Cohen *et al.*, 2008). Beim Verlust von Mdm30 kommt es zur Akkumulation von Fzo1 und zur Aggregation von Mitochondrien, wobei die Mitochondrien miteinander verbunden zu sein scheinen, aber trotzdem unfähig sind ein vollständiges Fusionsereignis durchzuführen (Fritz *et al.*, 2003; Neutzner und Youle, 2005; Escobar-Henriques *et al.*, 2006).

Für die Fusion von Mitochondrien müssen vier Membranen in einer koordinierten Art und Weise miteinander verschmelzen. Der erste Schritt ist die Bildung von *trans*-Komplexen, die durch Proteine auf der Oberfläche beider Fusionspartner erreicht werden (Abb.1-2). Der zweite Schritt beinhaltet die Vermischung der Lipid-Doppelschicht. Virale Fusionsproteine und SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) bilden durch Aneinanderlagerung von Coiled-Coil-Domänen α -helikale Bündel aus, die so die entgegengesetzten Membran in räumliche Nähe zueinander bringen und die Vermischung der Lipid-Doppelmembran initiieren (Weber *et al.*, 1998). Fzo1 besitzt die für solch ein Fusogen notwendigen Voraussetzungen: Coiled-Coil-Domänen, zwei Transmembrandomänen und eine GTPase-Domäne, deren bereitgestellte Energie ausreichend wäre, um die Energiebarriere für die Durchmischung der Lipid-Doppelschicht zu überwinden (Okamoto und Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Nach der Fusion der Außenmembran muss die Fusion der Innenmembran stattfinden. Hierbei spielt vermutlich Mgm1 die Schlüsselrolle. Mgm1 könnte wie Fzo1 die Bildung von *trans*-Komplexen und somit die Lipid-Durchmischung zur Folge haben (Meeusen *et al.*, 2006; Hoppins *et al.*, 2007). Ugo1 könnte als Adapter zwischen Fzo1 und Mgm1 bei der koordinierten Fusion der Außen- und der

Innenmembran wirken. Alternativ wäre auch eine direkte Interaktion von Fzo1 über seine Loop-Region mit Mgm1 denkbar (Merz *et al.*, 2007).

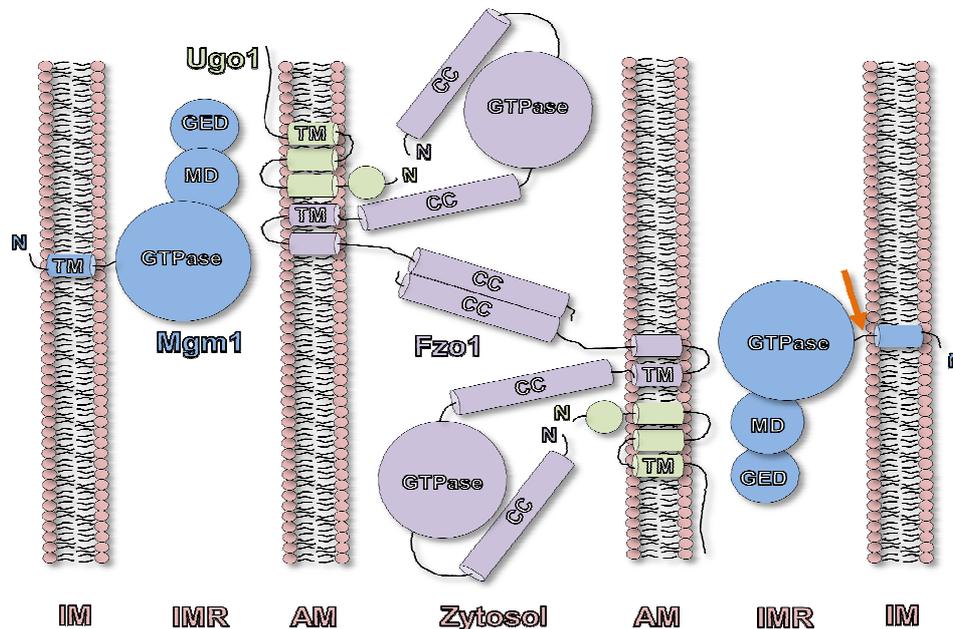


Abb.1-2: Modell der mitochondrialen Fusionsmaschinerie in *S. cerevisiae*. Dargestellt sind zwei Fzo1-Moleküle (lila) benachbarter Mitochondrien, die über ihre C-terminalen Coiled-Coil-Domänen (CC) α -helikale Bündel ausbilden, wodurch deren Membranen in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Ugo1 (grün) besitzt drei Transmembrandomänen und ist in der Außenmembran lokalisiert. Mgm1 (blau) existiert in zwei Isoformen, einer langen Form, die eine Transmembrandomäne in der Innenmembran (IM) aufweist, und einer kurzen Form, bei der durch proteolytische Spaltung (Spaltstelle gekennzeichnet mit Pfeil) diese Domäne entfernt wird. Über welche Domänen die drei Proteine miteinander interagieren, ist noch unbekannt. Die N-Termini der Proteine sind jeweils mit N gekennzeichnet. AM: mitochondriale Außenmembran, CC: Coiled-Coil-Domäne, GED: GTPase-Effektordomäne, IM: mitochondriale Innenmembran, IMR: Intermembranraum, MD: mittlere Domäne, TM: Transmembrandomäne (verändert nach Westermann, 2008).

1.3.1.2 Die mitochondriale Teilungsmaschinerie

Die Kernmaschinerie der mitochondrialen Teilung in *S. cerevisiae* besteht aus den vier Proteinen Dnm1, Fis1, Mdv1 und Caf4. Die Schlüsselkomponente Dnm1 (*dynamin-related*), eine Dynamin-verwandte GTPase, besitzt eine N-terminale hoch konservierte GTPase-Domäne, eine mittlere Domäne, eine Region, die als Insert B bezeichnet wird und deren Funktion unbekannt ist, sowie eine C-terminale GTPase-Effektordomäne (GED) (Abb.1-3 A) (Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Die mittlere und die GED-Domäne sind für intra- und intermolekulare Wechselwirkungen wichtig, die für die Selbstassemblierung und für die durch die Assemblierung stimulierte Hydrolyse benötigt werden (Sever *et al.*, 1999; Hoppins *et al.*, 2007). Zytoplasmatisches Dnm1 assembliert als punktförmige Strukturen an den Mitochondrien (Otsuga *et al.*, 1998). Diese Komplexe sind hoch dynamisch und werden durch kontinuierliche Assoziation und Dissoziation bestimmt (Legesse-Miller *et al.*, 2003).

Fis1 (*fission*), ein über seine C-terminale Transmembrandomäne in der mitochondrialen Außenmembran verankertes Protein, liegt gleichmäßig über die mitochondriale Oberfläche verteilt vor (Mozdy *et al.*, 2000). Der N-Terminus von Fis1 ragt ins Zytosol und besitzt sechs α -Helices, die eine superhelikale TPR-ähnliche (*tandem tetratricopeptide repeats*) Falte ausbilden. Die dadurch gebildete konkave, hydrophobe Oberfläche dient Protein-Protein-Interaktionen (Abb.1-3 A) (Suzuki *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2005).

Mdv1 (*mitochondrial division*) und Caf4 (*CCR4 associated factor*) sind zwei verwandte lösliche Proteine, die die gleiche Domänenstruktur besitzen: eine NTE-Domäne (*N-terminal extension*) mit zwei α -Helices, über die sie mit Fis1 interagieren, eine Coiled-Coil-Domäne, die homotypische Interaktionen vermittelt, und ein C-terminales WD40-Motiv, das einen siebenblättrigen Propeller ausbildet, der mit Dnm1 wechselwirkt (Abb.1-3 A) (Tieu und Nunnari, 2000; Tieu *et al.*, 2002; Cerveny und Jensen, 2003; Griffin *et al.*, 2005; Zhang und Chan, 2007). Fis1 fungiert in dem Teilungskomplex als Membranrezeptor, während Mdv1 und Caf4 als Adapterproteine Dnm1 rekrutieren. Das Mdv1-Paralog Caf4 besitzt zwar die gleiche Domänenstruktur und vermittelt analoge intra- und intermolekulare Interaktionen, dennoch sind beide Proteine funktionell nicht redundant. In Hefezellen, in denen die Rekrutierung von Dnm1 nur von Caf4 vermittelt wird, ist die mitochondriale Teilung stark beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu liegt in $\Delta caf4$ -Mutanten ein wildtypisches, mitochondriales Netzwerk vor mit einer Teilungsrate, die auch in einer Wildtypzelle zu beobachten ist (Griffin *et al.*, 2005). Die Caf4-enthaltenden Komplexe scheinen vielmehr eine andere Funktion als die der Teilung zu übernehmen. Von Schauss *et al.* (2006) wurde gezeigt, dass Fis1/Caf4-Komplexe möglicherweise für eine verstärkte Zellkortex-orientierte Rekrutierung von Dnm1 verantwortlich sind. Diese Dnm1-Komplexe könnten eine Bindung mit dem Zellkortex vermitteln (Schauss *et al.*, 2006), die wiederum eine Rolle bei der mitochondrialen Motilität und bei der Retention der Mitochondrien während des Transports des Organells zur entstehenden Knospe spielen würde.

Interessanterweise wurde Num1 (*nuclear migration*), ein Protein, das eigentlich die Segregation des Zellkerns vermittelt (Kormanec *et al.*, 1991), als mögliche Komponente entdeckt, die die Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex bewerkstelligt (Cerveny *et al.*, 2007). Num1 ist am Zellkortex über eine C-terminale PH-Domäne (*pleckstrin homology*) verankert und nimmt eine Funktion bei der mitochondrialen Teilung und Verteilung ein (Cerveny *et al.*, 2007). Der Verlust von Num1 führt zwar nicht zum vollständigen Teilungsdefekt, dennoch werden in dieser Mutante $\Delta dnm1$ -ähnliche mitochondriale Strukturen beobachtet. Zusätzlich dazu kolokalisiert Num1 teilweise mit mitochondrial

assemblierten Dnm1-Komplexen, wobei das Adapterprotein Mdv1 allerdings nicht in diesen Komplexen enthalten ist. Außerdem weisen in einigen Hefezellen, die weder Dnm1 noch Num1 besitzen, die Mutterzellen keine Mitochondrien auf. Folglich könnten beide Proteine, Dnm1 und Num1, bei dem Erhalt und somit der Vererbung der Mitochondrien eine wichtige Rolle spielen (Cervený *et al.*, 2007). Dabei könnte die durch Fis1/Caf4-vermittelte Zellkortex-orientierte Rekrutierung von Dnm1 eine Funktion bei der Bindung der Mitochondrien über Num1 an den Zellkortex übernehmen (Abb.1-3 B). Diese Verankerung würde nicht nur die Retention der Mitochondrien bewerkstelligen, sondern auch zur mitochondrialen Teilung beitragen, indem durch die zusätzliche Bindung der Mitochondrien an wachsende Aktinkabel die mögliche notwendige Spannung für die Teilung erzeugt werden würde (Cervený *et al.*, 2007; Schauss und McBride, 2007).

Gegenwärtige Modelle der mitochondrialen Teilung gehen davon aus, dass Dnm1 die eigentliche Teilung der Membranen vermittelt (Okamoto und Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Merz *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Fis1, der Membranrezeptor, und Mdv1/Caf4, die Adapterproteine, rekrutieren Dnm1 an die mitochondriale Oberfläche und helfen im ersten Schritt der Teilungsreaktion bei der dynamischen Assemblierung von Dnm1. *In vitro* wurde gezeigt, dass Dnm1 durch Selbstassemblierung im nukleotidfreien oder im GDP-gebundenen Zustand gebogene Filamente bzw. im GTP-gebundenen Zustand sogar ausgedehnte Spiralen bildet (Ingerman *et al.*, 2005). Infolgedessen könnte sich Dnm1 an den Mitochondrien spiralenförmig anlagern, wobei das gesamte Organell von der Spirale umschlossen wäre. Der Durchmesser dieser beobachteten Dnm1-Spiralen liegt bei ~100 nm, während der Durchmesser eines Mitochondrientubulus aber 300-400 nm beträgt. Die Selbstassemblierung von Dnm1 in Form von Spiralen könnte über GTP-Hydrolyse und dadurch entstehende Konformationsänderungen die notwendige Reduktion des Durchmessers des Mitochondrientubulus (Einschnürung = *constriction*) und die anschließende Teilung des Organells zur Folge haben (Ingerman *et al.*, 2005; Okamoto und Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007). In diesem Fall wäre die Funktion von Dnm1 ähnlich, wie die von anderen Mitgliedern der Dynamin-Familie, die an Teilungsereignissen von Membranen beteiligt sind (Praefcke und McMahon, 2004). Durch zeitaufgelöste mikroskopische Analysen wurde allerdings gezeigt, dass die Dnm1-Assemblierung und die letztendliche Teilung nur stattfinden kann, wenn parallel eine Einschnürung des Mitochondrientubulus erfolgt, die mit ~100 nm in etwa dem Durchmesser von Dnm1-Spiralen entspricht (Legesse-Miller *et al.*, 2003; Ingerman *et al.*, 2005). Außerdem konnten *constrictions* dieser Art auch in $\Delta fis1$ - und $\Delta dnm1$ -Zellen beobachtet werden (Jakobs *et al.*, 2003). Infolgedessen können diese Ereignisse auch

unabhängig von Dnm1 und Fis1 erfolgen. Der Ausbildung einer Mitochondrien-umschließenden Dnm1-Spirale muss somit möglicherweise erst die Einschnürung des Mitochondrientubulus vorausgehen. Denkbar wäre, dass die vorher benötigte *constriction* durch die Teilung der mitochondrialen Innenmembran vermittelt wird.

Eine mögliche Komponente dafür ist das Protein Mdm33 (*mitochondrial distribution and morphology*), das ein mitochondriales Innenmembranprotein darstellt (Messerschmitt *et al.*, 2003). Durch Deletion von *MDM33* entstehen ringähnliche und hohlkugelförmige Mitochondrien. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen weist die Mutante langgestreckte Organellen auf, wobei die Doppelmembranen einen schmalen Matrixraum umschließen. Die Fusion dieser Mitochondrien in der zweiten und dritten Ebene könnte zu den mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbaren ringähnlichen und hohlkugelförmigen Strukturen führen. Die Überexpression von *MDM33* führt hingegen zu einem starken Wachstumsdefekt und zur Fragmentierung der Mitochondrien. Außerdem konnten auf ultrastruktureller Ebene Septen bzw. vesikuläre Strukturen der mitochondrialen Innenmembran beobachtet werden. Interessanterweise verhält sich $\Delta m d m 3 3$ in Doppeldeletionsstudien epistatisch zu $\Delta f i s 1$, und $\Delta f z o 1$ epistatisch zu $\Delta m d m 3 3$. Folglich ist Mdm33 notwendig für die Ausbildung des netzartigen mitochondrialen Phänotyps in $\Delta f i s 1$ -Zellen und Fzo1 für die Bildung der ringähnlichen Mitochondrien in $\Delta m d m 3 3$ -Mutanten. Mdm33 besitzt laut Vorhersage zwei Transmembrandomänen. Der C-Terminus und der N-Terminus befinden sich in der mitochondrialen Matrix und der die beiden Transmembrandomänen verbindende Bereich im Intermembranraum (Abb.1-3 A) (Messerschmitt *et al.*, 2003). Der N-terminale Bereich bildet wahrscheinlich Coiled-Coil-Strukturen aus. Über diese könnten die gegenüberliegenden mitochondrialen Innenmembranen durch Ausbildung von *trans*-Komplexen in räumliche Nähe gebracht werden und so eine Fusion (= Teilung) dieser Membranen bewirken. Dieses Ereignis hätte möglicherweise auch eine Einschnürung des mitochondrialen Tubulus zur Folge, was wiederum Grundvoraussetzung für die Teilung der Mitochondrien ist.

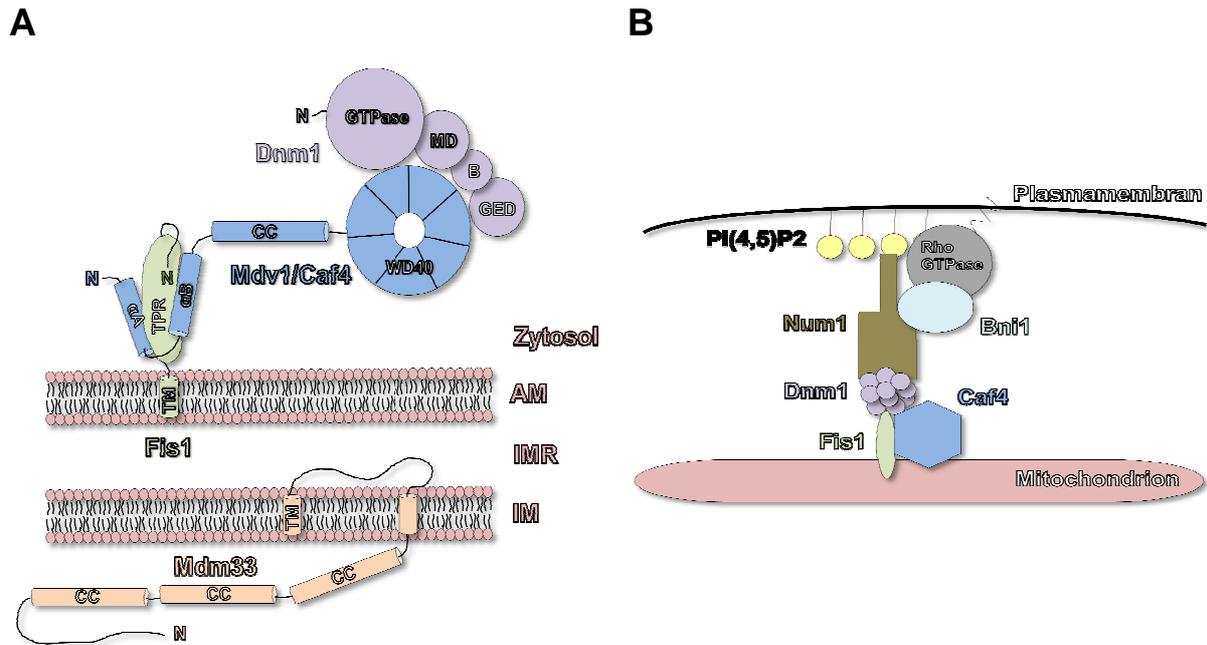


Abb.1-3: Modell der mitochondrialen Teilungsmaschinerie in *S. cerevisiae*. (A) Die Kernkomponenten Dnm1, Fis1 und Mdv1/Caf4 bilden bei der mitochondrialen Teilung einen Komplex aus. Mdv1 und Caf4 (blau) besitzen die gleiche Domänenstruktur und dienen als Adapterproteine, um Dnm1 (lila) an das integrale Außenmembranprotein Fis1 (grün) zu binden. Es ist nicht bekannt, welche Domäne von Dnm1 mit dem WD40-Motiv von Mdv1/Caf4 interagiert. Dnm1 assembliert in Form von dynamischen Komplexen an die Mitochondrien, die letztendlich Spiralen bilden, die das Organell umschließen und so die Teilung vermitteln. Für die Ausbildung der Dnm1-Spiralen ist die Einschnürung des mitochondrialen Tubulus wichtig. Mdm33 könnte zur Ausbildung dieser Einschnürungen und/oder zur Teilung der mitochondrialen Innenmembran beitragen. Die N-Termini der Proteine sind jeweils mit N gekennzeichnet (verändert nach Westermann, 2008). (B) Die Aktivierung der Rho GTPase an der Zelloberfläche führt zur Rekrutierung des Formins Bni1 (*bud neck involved*), welches die Bildung der Aktinkabel reguliert. Bni1 rekrutiert Num1, das dann die Mitochondrien an der Plasmamembran verankert, über seine Interaktion mit PI(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) und Dnm1. Dnm1 könnte über Fis1 und die Adapterproteine Mdv1/Caf4 an die Mitochondrien binden. Da Fis1/Caf4-Komplexe vermutlich für eine verstärkte Zellkortex-orientierte Rekrutierung von Dnm1 verantwortlich sind (Schauss *et al.*, 2006), wäre eine Bindung von Dnm1 an Num1 über diesen Komplex sehr wahrscheinlich (verändert nach Schauss und McBride, 2007). αA und αB : α -Helices in der NTE-Domäne (*N-terminal extension*) von Mdv1/Caf4, AM: mitochondriale Außenmembran, B: Insert B, CC: Coiled-Coil-Domäne, GED: GTPase-Effektordomäne, IM: mitochondriale Innenmembran, IMR: Intermembranraum; MD: mittlere Domäne, TM: Transmembrandomäne, TPR: *tandem tetrapeptide repeats*.

1.3.2 Das Aktinzytoskelett

Der Transport von Mitochondrien in der Zelle erfolgt entlang zytoskelettaler Strukturen. Die Zytoskelett-abhängige Bewegung der Mitochondrien mit der gleichzeitigen Membranfusion und -teilung ist notwendig, damit die Anzahl, die Morphologie und die intrazelluläre Position der Mitochondrien an zelluläre Anforderungen angepasst werden kann (Bereiter-Hahn, 1990; Yaffe, 1999; Chan, 2006; Dimmer und Scorrano, 2006). In *S. cerevisiae* werden die Mitochondrien ausschließlich über das Aktinzytoskelett transportiert (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994; Hermann und Shaw, 1998; Merz *et al.*, 2007). Die Mutation von Genen, die für Aktin kodieren oder für Faktoren, die an der Dynamik der Aktinfilamente

beteiligt sind, führen zu einer stark veränderten mitochondrialen Morphologie und Verteilung (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1999; Singer *et al.*, 2000; Boldogh *et al.*, 2001a; Fehrenbacher *et al.*, 2004; Altmann und Westermann, 2005). Auch Toxine, die zu einer Depolymerisierung der Aktinfilamente führen, wirken sich gleichermaßen auf die Bewegung und Morphologie der Mitochondrien aus (Boldogh *et al.*, 1998).

Das Aktinzytoskelett besteht hauptsächlich aus dem Protein Aktin, das 42 kDa groß ist und entweder als Monomer (G-Aktin) (Kabsch *et al.*, 1990; Schutt *et al.*, 1993; Otterbein *et al.*, 2001) oder als Polymer (F-Aktin) vorliegt (Holmes *et al.*, 1990; Milligan *et al.*, 1990). Aktinfilamente bestehen aus zwei helixartig umeinander gewundene F-Aktin-Ketten, die durch Assemblierung von monomerem Aktin entstehen. Aktinfilamente besitzen eine intrinsische Polarität, das *barbed* und das *pointed end*, die unterschiedlich schnell wachsen. Ständige Polymerisierungs- und Depolymerisierungsereignisse bewirken eine hohe Dynamik des Aktinzytoskeletts (Pollard und Cooper, 1986). Das F-Aktin selbst kann in *S. cerevisiae* in zwei strukturell unterscheidbare Gruppen unterteilt werden (Abb.1-4): die zytoplasmatischen Aktinkabel und die kortikalen *patches*. Die Aktinkabel bestehen aus Bündeln von Aktinfilamenten (Adams und Pringle, 1984), die entlang der Mutter-Tochter-Achse orientiert sind. Kortikale *patches* setzen sich aus einem Knäuel von Aktinfilamenten zusammen und befinden sich in der Knospe an Stellen des polarisierten Wachstums (Kilmartin und Adams, 1984; Ford und Pringle, 1991; Mulholland *et al.*, 1994; Pruyne *et al.*, 1998).

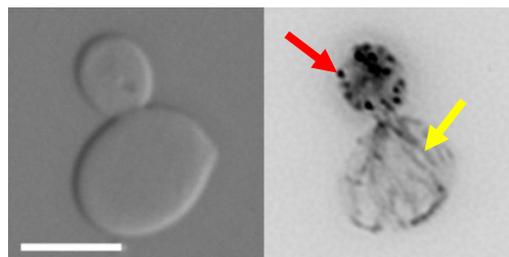


Abb.1-4: Darstellung des Aktinzytoskeletts in *S. cerevisiae*. Abgebildet ist eine Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahme (DIC) auf der linken Seite und auf der rechten Seite ein inverses Bild des mit Rhodamin-Phalloidin gefärbten Aktinzytoskeletts. Der gelbe Pfeil markiert ein Aktinkabel und der rote Pfeil ein kortikales *patch*. Der Maßstab stellt 5 μm dar.

1.3.3 MDM-Gene

In einem systematischen Screen nicht-essentieller Hefegene wurde von Dimmer *et al.* (2002) nach Genen gesucht, die an der mitochondrialen Verteilung und Morphologie beteiligt sind. Die dabei identifizierten MDM-Gene (*mitochondrial distribution and morphology*) lassen sich

in drei Klassen einteilen. Gene der Klasse I kodieren für Proteine, die essentiell für die Ausprägung des wildtypischen mitochondrialen Phänotyps sind. In den Mutanten der Klasse I konnten folglich niemals wildtypische Mitochondrien beobachtet werden. Die Mutanten der Klasse II sind respiratorisch kompetent und zeigen nur unter bestimmten Bedingungen einen mitochondrialen Morphologiedefekt. Klasse III-Mutanten besitzen einen *pet*-Phänotyp zusätzlich zu ihrem veränderten mitochondrialen Phänotyp. In den Mutanten der Klasse II und III waren meist fragmentierte oder aggregierte Mitochondrien sichtbar, der restliche Teil der Zellen zeigte ein wildtypisches, mitochondriales Retikulum. Deswegen sind die Gene der Klasse II und III nicht essentiell für den Erhalt eines mitochondrialen, tubulären Netzwerkes.

Der Klasse I konnten 10 bis dahin uncharakterisierte Gene (*MDM30-MDM39*) zugeordnet werden. 8 davon wurden bereits näher untersucht: *MDM30* kodiert für ein F-Box-Protein, das die mitochondriale Fusion reguliert (Fritz *et al.*, 2003), *MDM31* und *MDM32* für mitochondriale Innenmembranproteine, die mit Komponenten des ERMES-Komplexes interagieren (Dimmer *et al.*, 2005), *MDM33* für ein mitochondriales Innenmembranprotein, das für die mitochondriale Innenmembranteilung zuständig ist (Messerschmitt *et al.*, 2003), *MDM34* (*MMM2*) für eine Komponente des ERMES-Komplexes (Kornmann *et al.*, 2009), *MDM37* (*PCP1*) für eine Protease (Esser *et al.*, 2002; Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003), *MDM38* für ein mitochondriales Innenmembranprotein, das bei der Insertion einiger Proteine in die mitochondriale Innenmembran beteiligt ist (Frazier *et al.*, 2006) und *MDM39* (*GET1*) für ein Protein, das bei der Insertion von Proteinen in die ER-Membran involviert ist (Schuldiner *et al.*, 2008). Die Morphologie bestimmenden Komponenten Mdm35 und Mdm36 sind hingegen noch weitestgehend uncharakterisiert.

1.4 Zielsetzung

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryotischer Zellen, die eine Reihe metabolischer Prozesse ausführen. Um die Prozesse, die die Funktion und Vererbung von Mitochondrien bestimmen, zu verstehen, müssen die beteiligten Komponenten identifiziert werden. In den letzten Jahrzehnten wurden einige Komponenten, die die mitochondriale Morphogenese wesentlich bedingen, aufgedeckt und teilweise charakterisiert. Dennoch konnten durch das Screening der Deletionsbibliothek von Dimmer *et al.* (2002) noch weitaus mehr Proteine erfasst werden, die Einfluss auf die mitochondriale Morphologie ausüben. Unter ihnen waren die beiden Proteine Mdm35 und Mdm36. Beide Deletionsmutanten wurden als Mutanten der Klasse I eingestuft, d.h. die kodierenden Gene sind essentiell für die

Ausprägung eines tubulären, mitochondrialen Netzwerkes. Doch welche Funktion besitzen diese beiden Proteine in der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie?

Im ersten Teilabschnitt dieser Arbeit sollten Informationen über die generellen Eigenschaften des Proteins Mdm36 erhalten werden. Insbesondere sollte die mögliche Bedeutung und Funktion während der mitochondrialen Morphogenese bestimmt werden. Durch die genaue Charakterisierung des mitochondrialen Phänotyps (Quantifizierung des Phänotyps mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie Analyse der ultrastrukturellen Eigenschaften mittels Elektronenmikroskopie und Erstellung eines 3D-Modells aus Ultradünnschnitten) und Doppeldeletionsstudien (mit Komponenten der Teilungs- und Fusionsmaschinerie) wurde Mdm36 zunächst in den mitochondrialen Fusions- bzw. Teilungsapparat eingeordnet werden. Weiterhin sollten die Lokalisation von Mdm36 sowie die Analyse der mitochondrialen Fragmentierung nach der Depolymerisation des Aktinzytoskeletts in der $\Delta m d m 3 6$ -Mutante einen direkten Beweis für eine mögliche Funktion von Mdm36 in der mitochondrialen Teilungsmaschinerie liefern. Die Teilung von Mitochondrien wird hauptsächlich durch das Protein Dnm1 vermittelt. Als mögliche mitochondriale Teilungskomponente könnte Mdm36 folglich einen Einfluss auf die Außenmembranteilungskomponente Dnm1 haben. Deswegen wurden durch eingehende Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie sowohl die mitochondriale Assemblierung der GFP-markierten Dnm1-Punkte sowie die Anzahl der teilungsaktiven Dnm1-Komplexe ermittelt. Das Zellkortex-assoziierte Protein Num1 interagiert mit Dnm1 und fördert die Teilung der Mitochondrien. Der Num1/Dnm1-Komplex dient vermutlich als Anker der Mitochondrien am Zellkortex, der den Erhalt der Mitochondrien in der Mutterzelle während der Zellteilung sicherstellt. Die Bestimmung der Geschwindigkeit und die Ermittlung der räumlichen Verteilung der Mitochondrien innerhalb der $\Delta m d m 3 6$ -Hefezelle im Vergleich zum Wildtyp und der $\Delta n u m 1$ -Mutante sollten Klarheit über eine mögliche Rolle von Mdm36 in der Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex schaffen. Mit einem Kollokalisationsexperiment von Dnm1-GFP und Num1-RFP in der $m d m 3 6$ -Deletionsmutante wurde die Funktion von Mdm36 bei der Zellkortexverankerung der Mitochondrien verifiziert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde zunächst die mitochondriale Morphologie der Mutanten der von Longen *et al.* (2009) identifizierten Twin Cx₉C-Proteine bestimmt, wobei diese vermutlich Proteine des Intermembranraums darstellen. Anschließend wurde das in diesem Screen auffällige und bereits von Dimmer *et al.* (2002) entdeckte Protein Mdm35 untersucht. Hierbei sollte zunächst der Einfluss der Deletion von *MDM35* auf die mitochondriale Morphologie mittels Fluoreszenzmikroskopie, auf ultrastruktureller Ebene

mittels Elektronenmikroskopie sowie auf die respiratorische Kompetenz mithilfe von Wachstums- und mtDNA-Analysen bestimmt werden. Ein *in vivo*-Fusionsnachweis der Mitochondrien wurde zur Ermittlung der Bedeutung von Mdm35 bei der mitochondrialen Fusion herangezogen. Außerdem sollten Doppeldeletionsstudien einen Einblick in die mögliche Funktion des Proteins geben. Die Herstellung von Antikörpern gegen Mdm35 sollte letztendlich zur Lokalisation von Mdm35 beitragen.

2 Material und Methoden

Alle Chemikalien und Biochemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Verwendete Enzyme stammten in der Regel von Fermentas (St. Leon-Rot).

2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden standardgemäß durchgeführt.

2.1.1 Verwendete Plasmide

Für die Markierung von Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum (ER) in Hefezellen sowie die Expression von *DNM1-GFP* wurden die in Tab.2-1 aufgeführten Plasmide benutzt. Das Plasmid pQE40-*MDM35* diente der Expression von His-DHFR-Mdm35 zur Herstellung von polyklonalem Antiserum in Kaninchen. Die plasmidale Expression mit dem endogenen Promotor von *MDM32* wurde mit dem Plasmid pRS316-*MDM32* und von *FZO1* mit dem Plasmid pRS416-*FZO1* durchgeführt. Für die *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion von mitochondrialen Vorstufenproteinen wurde das Plasmid pGEM3 benutzt, in das die betreffende kodierende DNA-Sequenz unter Kontrolle des SP6-Promotors kloniert war. Zur Deletion von *MDM36* in RJ2194 wurde die Nourseothricin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pFA6a-*natNT2* amplifiziert (2.1.3) und mittels homologer Rekombination (2.2.6) in das Hefegenom eingebracht. Eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide findet sich in Tabelle 2-1.

Tab.2-1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide.

Name	Selektionsmarker	Verwendung	Referenz
pVT100U-mtGFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Westermann und Neupert, 2000
pVT100U-mtRFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Mark Dürr, Universität Bayreuth (unpublizierte Daten)
pYX113-mtGFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Westermann und Neupert, 2000
pRS416-GAL1+PrFoATP9-RFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Mozdy <i>et al.</i> , 2000
pWP1055	<i>URA3</i>	Markierung von ER	Prinz <i>et al.</i> , 2000
pHS20	<i>LEU2</i>	Expression von <i>DNM1-GFP</i>	Cervený <i>et al.</i> , 2007

Name	Selektionsmarker	Verwendung	Referenz
pRS316- <i>MDM32</i>	<i>URA3</i>	Expression von <i>MDM32</i>	Kai Stefan Dimmer, Universität München (unpublizierte Daten)
pRS416- <i>FZO1</i>	<i>URA3</i>	Expression von <i>FZO1</i>	Fritz <i>et al.</i> , 2001
pSu9 ₁₋₆₉ -DHFR	Amp	<i>in vitro</i> Transkription und Translation	Pfanner <i>et al.</i> , 1987
pGEM3- <i>MDM36</i>	Amp	<i>in vitro</i> Transkription und Translation	Bastian Seubert, Universität Bayreuth (unpublizierte Daten)
pQE40- <i>MDM35</i>	Amp	Expression von His-DHFR-Mdm35	diese Arbeit
pFA6a- <i>natNT2</i>	Amp	Resistenzkassette zur Deletion von Genen	Janke <i>et al.</i> , 2004

2.1.2 Präparation von DNA

2.1.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Mini-Präparation mittels alkalischer Lyse

Zur Gewinnung kleinerer Mengen an Plasmid-DNA wurden *E. coli*-Zellen aus einer 1,5 ml LB-Amp über Nacht-Kultur (1% (w/v) Pepton (Carl Roth, Karlsruhe), 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt (Serva, Heidelberg), 1% (w/v) NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) mittels Zentrifugation (1 min, RT, 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) geerntet und in 100 µl GTE-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM Glukose, 2 mg/ml RNaseA) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 200 µl NaOH/SDS (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) versetzt, durch Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 150 µl KOAc (5 M, pH 4,8), das Invertieren der Suspension und eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm (Sigma 3K30, Rotor 12154-H) wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 0,3 ml des Überstandes mit dem zweifachen Volumen an 96%igem Ethanol (v/v) gemischt und zentrifugiert (15 min, 4°C, 13.000 rpm; Sigma 3K30, Rotor 12154-H). Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen, für 1 h bei RT oder für 10 min bei 72°C getrocknet und dann in 30-50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) resuspendiert.

Midi-Präparation

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde eine Midi-Präparation mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Midi Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. 50 ml einer *E. coli*- LB-Amp-Flüssigkultur wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden

durch Zentrifugation (5 min, RT, 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) pelletiert. Anschließend wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren. Die DNA-Fällung mittels Isopropanol erfolgte durch eine 60-minütige Zentrifugation bei 4°C und 5.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44). Die Plasmid-DNA wurde nach der Fällung in 40-60 µl EB-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.1.2.2 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolation genomischer DNA aus Hefezellen erfolgte mit dem YeaStar™ Genomic DNA Kit der Firma Zymo Research (Orange, USA), wobei nach Anleitung des Herstellers vorgegangen wurde. Die isolierte DNA wurde in 30-50 µl EB-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR von DNA-Fragmenten (Klonierungsinserts) bzw. der Nachweis von Deletionen in Hefestämmen wurde mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase durchgeführt. 50 µl Reaktionsansätze setzten sich aus 200-500 ng plasmidaler bzw. genomischer DNA, 0,2 mM dNTPs (Stammlösung: 10 mM), 1x PCR-Puffer (Stammlösung: 5x Puffer; Promega, Mannheim), 10 pmol je Primer (Stammlösung: 100 pmol; Metabion, Martinsried) sowie 0,025 U/µl *GOTaq*®-DNA-Polymerase (5 U/µl; Promega, Mannheim) zusammen. Polymerase-Kettenreaktionen wurden im PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Electric, Waltheim, USA) mit dem in Tab.2-2 aufgeführten Programm durchgeführt bzw. im Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg) mit dem Programm aus Tab.2-3.

Der 50 µl-Reaktionsansatz für die Amplifikation der *natNT2*-Kassette aus dem Plasmid pFA6a-*natNT2* bestand aus folgenden Komponenten: ~100 ng plasmidale DNA, 0,2 mM dNTPs (Stammlösung: 10 mM), 1x PCR-Puffer (Stammlösung: 5x Phire™ Reaktionspuffer; Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf), 10 pmol je Primer (Stammlösung: 100 pmol; Metabion, Martinsried), 1,5 µl DMSO (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) sowie 0,04 U/µl Phire™ Hot Start DNA-Polymerase (2 U/µl; Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf). Die PCR wurde im Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg) nach dem Programm von Janke *et al.* (2004) ausgeführt. Die Oligonukleotide und deren Verwendungszweck sind der Tab.2-4 zu entnehmen.

Tab.2-2: Verwendetes PCR-Programm mit dem PCR Sprint Thermal Cycler.

Reaktionsabschnitt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Anfangsdenaturierung	1	94	2
Denaturierung	35	94	1
Primer-Anlagerung	35	55-60	1
Elongation	35	72	1
Endelongation	1	72	10

Tab.2-3: Verwendetes PCR-Programm mit dem Eppendorf Mastercycler ep gradient S.

Reaktionsabschnitt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
Anfangsdenaturierung	1	94	120
Denaturierung	35	94	5
Primer-Anlagerung	35	55-60	5
Elongation	35	72	30
Endelongation	1	72	60

Tab.2-4: Verwendete Oligonukleotide. Unterstrichene Nukleotide stellen Restriktionsschnittstellen dar.

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
DNM1GFPf	GGG CGA TAT AGA TGA CCT TGA AAA CGC	Nachweis von <i>DNM1-GFP</i>
Dnm1 nach Stopp	CCA TGT AGA AGG TCT ATC TGC	Nachweis von <i>DNM1-GFP</i> , Nachweis der <i>DNM1</i> -Deletion
Fzo1_R	CTC GTC AAA ATC AAC TTG CTC C	Nachweis der <i>FZO1</i> -Deletion
MDM30-out R	GCC ATA TCT CGC TGA ACT TCC	Nachweis der <i>MDM30</i> -Deletion
Mdm31_R	CTC ATA GTC CAC TTT CTG GGG C	Nachweis der <i>MDM31</i> -Deletion
Mdm32_R	CCT CTG GTG GAA TAT GTC ACC G	Nachweis der <i>MDM32</i> -Deletion
Mdm33_R	GAC TGT ACC ATT GAG TTG AGC C	Nachweis der <i>MDM33</i> -Deletion
Mdm35_R	GTC AGG GAA CAA TTC TGT AAG CG	Nachweis der <i>MDM35</i> -Deletion
Mdm36-R(his-Test)	GAG ACC TGA GGT GAA GGG AAG	Nachweis der <i>MDM36</i> -Deletion
num1-reverse	GTA AGC GTT GCT GTT TCA AAC	Nachweis der <i>NUM1</i> -Deletion
YB3MDM36R	TCA GGC TTA AAC TCG CTG CGA TGG G	Nachweis der <i>MDM36</i> -Deletion
His-Kassette-F	CAT GCA GGC TGG AGC TTA CGA C	Nachweis der <i>HIS3MX6</i> - Deletionskassette
kan kassette F	CCG GAT TCA GTC GTC ACT CAT GG	Nachweis der <i>kanMX4</i> - Deletionskassette
natNT2 Kassette F	CTT CGT GGT CAT CTC GTA CTC	Nachweis der <i>natNT2</i> - Deletionskassette
MAT1	AGT CAC ATC AAG ATC GTT TAT GG	Nachweis des Paarungstyps
MAT2	GCA CGG AAT ATG GGA CTA CTT CG	Nachweis des Paarungstyps
MAT3	ACT CCA CTT CAA GTA AGA GTT TG	Nachweis des Paarungstyps

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
Mdm36-R(his)	CGG AAC AAA GCC GAA AAG CC	Amplifikation der <i>HIS3MX6</i> -Deletionskassette aus Δ <i>mdm36</i> für die homologe Rekombination
Mdm36-F(his)	GCC CTT TGT TCT TCC TGG CA	Amplifikation der <i>HIS3MX6</i> -Deletionskassette aus Δ <i>mdm36</i> für die homologe Rekombination
Mdm36nat-F2	TGG CCC AAA AGA AAT ACA ACG AGT CAT CTC CTC GCA GTA AAC TGT ACA ACA GCA AAG AAA CAG TTA AAA	Amplifikation der <i>natNT2</i> -Resistenzkassette aus pFA6a- <i>natNT2</i> mit homologen Überhängen für die Deletion von <i>MDM36</i>
Mdm36nat-R2	GTT GTT ATA TGT GTT ATG TAT GAT AAA AGT CTT GCT TTG TAT TTA TGT ACT CAA CCC TCG CAT TTA GTT	Amplifikation der <i>natNT2</i> -Resistenzkassette aus pFA6a- <i>natNT2</i> mit homologen Überhängen für die Deletion von <i>MDM36</i>
Mdm35-Üex/His-F	AAA <u>GAA TTC</u> AAG CTT TCA TTT GTC AAC TTC TTT TAG TTT	Klonierung von pQE40- <i>MDM35</i>
Mdm35-His-R2	AAA <u>GGT ACC</u> GGG AAT ATA ATG TCA GCT AGT TTT	Klonierung von pQE40- <i>MDM35</i>

2.1.4 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.1.4.1 Restriktionsverdau von DNA

Präparativer Restriktionsverdau

Standard 50 μ l-Reaktionsansätze setzten sich aus 3-4 μ g DNA, 20-40 U Restriktionsenzym (10 U/ μ l; Fermentas, St. Leon-Rot) und 5 μ l des jeweiligen 10x Puffers zusammen. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Doppelverdaue wurden sequentiell durchgeführt. Die DNA wurde nach jedem Verdau mittels PCR-Purification Kit (2.1.5.4) gereinigt.

Analytischer Restriktionsverdau

Nach einer Mini- oder Midi-Präparation (2.1.2.1) wurde die Plasmid-DNA mit einem analytischen Restriktionsverdau überprüft. Hierfür wurde 1 μ g Plasmid-DNA, 5-10 U je Enzym (10 U/ μ l; Fermentas, St. Leon-Rot) und 1 μ l des entsprechenden 10x Puffers mit ddH₂O auf 10 μ l aufgefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Reaktionsansätze mit Gel-Ladepuffer (4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese (2.1.5.2) analysiert.

2.1.4.2 Dephosphorylierung von DNA mit Alkalischer Phosphatase

Um eine mögliche Religation des Vektors zu verhindern, wurden die Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Dazu wurden 2-4 μ g des gereinigten Vektors mit 10 U Antarctic Phosphatase (5 U/ μ l; NEB, Frankfurt am Main) und 2 μ l 10x Puffer in einem 20 μ l

Reaktionsansatz vereint und für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine 5-minütige Hitzeinaktivierung bei 65°C.

2.1.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

In einem 10 µl Gesamtansatz wurde der dephosphorylierte Vektor (0,1-0,5 µg) und das verdaute Insert mit 1 µl 10x Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase (1 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und für 5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Insert lag dabei meist in einem molaren Überschuss vor. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für die anschließende *E. coli*-Transformation (2.1.6.2) verwendet.

2.1.5 Reinigung und Analyse von DNA

2.1.5.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde 1 µl der gewonnenen DNA mit 500 µl Wasser verdünnt und die DNA-Konzentration bei 260 nm und 280 nm gegen Wasser als Referenz in einem BioMateTM 3 Series Spectrophotometer (Thermo Spectronic Corporation, Egelsbach) gemessen. Der Quotient E_{260}/E_{280} ist dabei ein Maß für die Reinheit der Präparation und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.5.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden zur Analyse oder Reinigung in 0,8%igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA; pH 8,35) bei einer Spannung von 8-10 V/cm. Die DNA wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid und Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht.

2.1.5.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Amplifizierte Fragmente und Vektoren, die neben der eigentlichen Hauptbande unspezifische Nebenbanden aufwiesen, wurden nach Ausschneiden aus dem Agarosegel mit Hilfe des QIAEX II Gel-Extraction-Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt. Dabei wurde gemäß der Anleitung des Herstellers vorgegangen. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl EB-Puffer.

2.1.5.4 Reinigung von DNA mittels Qiagen PCR-Purification Kit

Die Reinigung von PCR-Produkten sowie von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten und Vektoren erfolgte mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers. Für die DNA-Elution wurden 30-50 µl EB-Puffer verwendet.

2.1.6 Übertragung von genetischem Material in *E. coli*

2.1.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Der *E. coli*-Stamm XL1-blue (Stratagene, La Jolla, USA) wurde über Nacht auf LB-Platten (1% (w/v) Pepton (Carl Roth, Karlsruhe), 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt (Serva, Heidelberg), 1% (w/v) NaCl, 2% (w/v) Agar-Agar) angezogen. 5 ml LB-Flüssigmedium (1% (w/v) Pepton (Carl Roth, Karlsruhe), 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt (Serva, Heidelberg), 1% (w/v) NaCl) wurden damit beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml dieser Kultur inokuliert und bei 37°C inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2-0,4 wurden die Kulturen für 2 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 4°C und 7.000 rpm (Beckmann-Zentrifuge J2-21, Rotor JA-10) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem, sterilen Tfb I-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂-Dihydrat, 30 mM Kaliumacetat, 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt) aufgenommen, für 30-60 min auf Eis inkubiert und die Zellen abermals durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 7.000 rpm (Beckmann-Zentrifuge J2-21, Rotor JA-10) geerntet. Das Pellet wurde in 3 ml sterilem Tfb II-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin; pH 7,0 mit NaOH eingestellt) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden in je 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.6.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

100 µl kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-blue) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid oder 10 µl Ligationsansatz versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden. Danach wurde der Transformationsansatz kurz auf Eis gekühlt, mit 500 µl SOC-Medium (2% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,05% (w/v) NaCl, 0,0186% (w/v) KCl, pH 7,0, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 0,4% (w/v) D-Glukose) gemischt und für 30-45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 100 µl der transformierten Bakterien wurden auf LB-Amp-Platten (1% (w/v) Pepton (Carl Roth, Karlsruhe), 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt

(Serva, Heidelberg), 1% (w/v) NaCl, 2% (w/v) Agar-Agar, 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.2 Methoden der Hefegenetik

Standardmethoden der Hefegenetik wurden nach Burke *et al.* (2000) durchgeführt.

2.2.1 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Hefestämme sind in Tab.2-5 aufgeführt. Hefestämme, die mit Plasmiden transformiert waren, die für die Markierung von Mitochondrien und dem ER sowie für die Expression von *DNM1-GFP* verwendet wurden, sind nicht aufgelistet. Die Plasmide sind der Tab.2-1 zu entnehmen.

Tab.2-5: Verwendete Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
BY4741	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4741 <i>DNM1-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, ura3, met15, DNMI-GFP-kanMX6</i>	Schauss <i>et al.</i> , 2006
BY4742	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
$\Delta cmc1$	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, cmc1::kanMX4</i>	Longen <i>et al.</i> , 2009
$\Delta cmc2$	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, cmc2::kanMX4</i>	Longen <i>et al.</i> , 2009
$\Delta cmc3$	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, cmc3::kanMX4</i>	Longen <i>et al.</i> , 2009
$\Delta cmc4$	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, cmc4::kanMX4</i>	Longen <i>et al.</i> , 2009
$\Delta cox17$	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, cox17::kanMX4</i>	Longen <i>et al.</i> , 2009
$\Delta cox19$	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, cox19::kanMX4</i>	Longen <i>et al.</i> , 2009
$\Delta cox23$	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, cox23::kanMX4</i>	Longen <i>et al.</i> , 2009
$\Delta dnm1$	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, dnm1::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
$\Delta dnm1/\Delta mdm30$	<i>MATa, n.d., dnm1::kanMX4, mdm30::kanMX4</i>	Fritz <i>et al.</i> , 2003
$\Delta dnm1/\Delta mdm30$	<i>MATa, n.d., dnm1::kanMX4, mdm30::kanMX4</i>	Fritz <i>et al.</i> , 2003
$\Delta emi1$	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, emi1::kanMX4</i>	Longen <i>et al.</i> , 2009

Stamm	Genotyp	Referenz
$\Delta fis1$	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, fis1::kanMX4</i>	Giaever et al., 2002
$\Delta fzo1$	<i>MATα, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::kanMX4</i>	Rapaport et al., 1998
$\Delta mdm30$	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3, mdm30::kanMX4</i>	Giaever et al., 2002
$\Delta mdm30$	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mdm30::kanMX4</i>	Giaever et al., 2002
$\Delta mdm31$	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3, mdm31::kanMX4</i>	Giaever et al., 2002
$\Delta mdm32$	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mdm32::kanMX4</i>	Giaever et al., 2002
$\Delta mdm33$	<i>MATα, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, mdm33::HIS3MX6</i>	Yvonne Baberowski, Universität Bayreuth (unpublizierte Daten)
$\Delta mdm35$	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mdm35::kanMX4</i>	Longen et al., 2009
$\Delta mdm35$	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3, mdm35::kanMX4</i>	Giaever et al., 2002
$\Delta mdm35$ / [pRS316-MDM32]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mdm35::kanMX4, [URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm35/\Delta mdm32$ / [pRS316-MDM32]	n.d., <i>mdm32::kanMX4, mdm35::kanMX4, [URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm36$	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, mdm36::kanMX4</i>	Giaever et al., 2002
$\Delta mdm36$	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3, mdm36::kanMX4</i>	Giaever et al., 2002
$\Delta mdm36$	<i>MATα, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, mdm36::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm36$ DNM1-GFP	<i>MATα, his3, leu2, ura3, met15, mdm36::HIS3MX6, DNM1-GFP-kanMX6</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm36/\Delta fzo1(1)$	<i>MATα, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::kanMX4, mdm36::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm36/\Delta fzo1(2)$ / [pRS416-FZO1]	n.d., <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::kanMX4, mdm36::HIS3MX6, [URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm36/\Delta mdm30$	<i>MATα, n.d., mdm30::kanMX4, mdm36::kanMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm36/\Delta mdm30$	<i>MATα, n.d., mdm30::kanMX4, mdm36::kanMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm36/\Delta mdm33$	n.d., <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, mdm33::HIS3MX6, mdm36::HIS3MX6</i>	Yvonne Baberowski, Universität Bayreuth (unpublizierte Daten)
$\Delta mdm36/\Delta num1$	n.d., <i>leu2, his3, ura3, met15, num1::kanMX4, mdm36::kanMX4</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm36/\Delta num1$ DNM1-GFP	<i>MATα, ura3, leu2, his3, lys2, num1::kanMX4, mdm36::HIS3MX6, DNM1-GFP-kanMX6</i>	diese Arbeit
$\Delta mdm36$ RJ2194	<i>MATα, ura3, lys2, trp1, leu2, his3, dnm1::HIS3MX6, NUM1-DsRed.T1-kanMX6, mdm36::natNT2</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
Δ mdv1	MAT α , his3, leu2, lys2, ura3, mdv1::kanMX4	Giaever et al., 2002
Δ mic14	MAT α , his3, leu2, lys2, ura3, mic14::kanMX4	Longen et al., 2009
Δ mic17	MAT α , his3, leu2, lys2, ura3, mic17::kanMX4	Longen et al., 2009
Δ mrp10	MAT α , his3, leu2, lys2, ura3, mrp10::kanMX4	Longen et al., 2009
Δ num1	MAT α , his3, leu2, lys2, ura3, num1::kanMX4	Giaever et al., 2002
Δ num1 DNM1-GFP	MAT α , ura3, leu2, his3, num1::kanMX4, DNM1-GFP-kanMX6	diese Arbeit
Δ pet191	MAT α , his3, leu2, lys2, ura3, pet191::kanMX4	Longen et al., 2009
RJ2194	MAT α , ura3, lys2, trp1, leu2, his3, dnm1::HIS3MX6, NUM1-DsRed.T1-kanMX6	Cervený et al., 2007
Δ som1	MAT α , his3, leu2, lys2, ura3, som1::kanMX4	Longen et al., 2009
YPH500	MAT α , ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2	Sikorski und Hieter, 1989

2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefezellen erfolgte standardmäßig auf YPD-Medium (1% (w/v) Hefe Extrakt (Serva, Heidelberg), 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA), 2% Glukose). Zur Selektion auf mitochondriale Funktionen wurde YPG-Medium (1% (w/v) Hefe Extrakt (Difco, Lawrence, USA), 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA), 3% Glyzerin) verwendet. Die Selektion von Hefezellen mit spezifischen Auxotrophiemarkern erfolgte auf SD-Medium (0,69% (w/v) Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Formedium, Norwich, UK), 2% Glukose), das je nach Selektionsbedingungen entsprechend supplementiert wurde (20 mg/l Histidin, 30 mg/l Leucin, 30 mg/l Lysin, 20 mg/l Methionin, 20 mg/l Tryptophan, 20 mg/l Uracil, 20 mg/l Adenin-Sulfat). Die Expression von Genen, die hinter einen GAL-Promotor kloniert waren, erfolgte entweder auf YPGal-Medium (1% (w/v) Hefe Extrakt (Serva, Heidelberg), 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA), 2% Galaktose) oder unter Selektionsdruck auf entsprechendem SGal-Medium (0,69% (w/v) Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Formedium, Norwich, UK), 2% Galaktose), das mit der für SD-Medium angegebenen Menge an Aminosäuren versetzt war. Für die Selektion auf kanamycinresistente bzw. nourseothricinresistente Hefezellen wurde dem jeweiligen Medium Geniticin G418 (Endkonzentration: 250 µg/ml; Roth, Karlsruhe) bzw. Nourseothricin (NTC, Endkonzentration: 100 µg/ml; Jena Bioscience, Jena) zugesetzt. Die Selektion gegen das

wildtypische *URA3*-Allel erfolgte auf 5-FOA-Medium (*SD-Medium mit 0,1% 5-Fluorotsäure (5-FOA) und 50 mg/l Uracil*). Zur Kultivierung von Hefezellen auf Medienplatten wurde dem jeweiligen Medium 2% (w/v) Agar-Agar zugesetzt. Die Standardtemperatur zur Kultivierung von *S. cerevisiae* betrug 30°C. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte unter Schütteln (150 rpm) in Reagenzgläsern oder Kolben. Hefestämme wurden bis zu 2 Monate auf Agarplatten bei 4°C gelagert. Für eine längere Lagerung wurden die Hefestämme in 15% (v/v) Glycerin bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Test des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae* mittels Tüpfeltest

Die jeweiligen Hefestämme wurden über Nacht bei 30°C in 1,5 ml YPD-Flüssigmedium angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 abzentrifugiert (1 min, RT, 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Das Pellet wurde mit 1 ml ddH₂O gewaschen und anschließend in 1 ml ddH₂O aufgenommen. Es wurde eine Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) mit sterilem ddH₂O erstellt und davon jeweils 5 µl auf YPD- und YPG-Platten getropft. Die Platten wurden 2-4 Tage bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

2.2.4 Transformation von *S. cerevisiae* mit Hefepiasmiden

Für die Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA wurde das „Quick and Easy TRAF0 Protocol“ (<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Quick.html>) verwendet. Der jeweilige Hefestamm wurde auf einer YPD- oder Selektivmediumplatte ausgestrichen und bei 30°C über Nacht inkubiert. Etwa 1 cm² Zellmaterial wurde in 1 ml sterilem ddH₂O resuspendiert und abzentrifugiert (1 min, RT, 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Parallel wurde die Carrier-DNA (Herringsspermien-DNA: 2 mg/ml in ddH₂O; Sigma, Taufkirchen) in einem kochenden Wasserbad für 10 min denaturiert, gevortext und in einem Eisbad abgekühlt. Für die Transformation wurden folgende Komponenten dem Zellpellet in der aufgelisteten Reihenfolge hinzugefügt: 240 µl 50 % PEG 4000 (w/v), 36 µl 1 M LiAc, 50 µl gekochte ssCarrier-DNA und 1 µg Plasmid-DNA in 34 µl ddH₂O. Der Reaktionsansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und bei 42°C für 40-60 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (1 min, RT, 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124), der Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml sterilem ddH₂O aufgenommen. 400 µl der Probe wurden auf einer entsprechenden SD-Selektivmediumplatte ausgebracht und bei 30°C für 3-4 Tage inkubiert. Transformanten wurden zur Reinigung auf frischen SD-Platten ausgestrichen.

2.2.5 Kreuzung und Tetradenanalyse von *S. cerevisiae* zur Herstellung von Doppelmutanten

Zur Herstellung von Doppelmutanten wurden zunächst durch Kreuzung der gewünschten haploiden Hefestämme entgegengesetzten Paarungstyps diploide Stämme erzeugt. Dazu wurden die haploiden Hefestämme jeweils strichförmig auf einer YPD-Platte ausgebracht, über Nacht bei 30°C inkubiert und auf eine frische YPD-Platte über Kreuz gestempelt. Nach nochmaliger Inkubation bei 30°C über Nacht wurden die Zellen auf eine Selektivmediumplatte überstempelt, die entsprechend supplementiert wurde, so dass nur die durch Paarung entstandenen diploiden Zygoten zum Wachstum in der Lage waren. Nach 1-2 Tagen bei 30°C wurde von der Kreuzungsstelle Zellmaterial entnommen, auf eine frische SD-Platte als Einzelkoloniausstrich überführt und für 2-3 Tage bei 30°C kultiviert. Eine einzelne Kolonie wurde nun auf eine YPD-Platte überstrichen.

Zur Sporulation von diploiden Hefestämmen wurde das GNA-Protokoll von Riles & Curtis (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/spo_riles) verwendet. Dazu wurden die diploiden Zellen auf eine GNA-Platte (3% (w/v) *Nutrient Broth* (Difco, Lawrence, USA), 1% (w/v) *Hefe Extrakt* (Difco, Lawrence, USA), 5% (w/v) *Glukose*, 2% (w/v) *Agar-Agar*) übertragen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Von dieser Platte wurde abermals Zellmaterial auf eine neue GNA-Platte überführt und bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden 2 ml Flüssigsporulationsmedium (1% (w/v) *Kaliumacetat*, 0,005% (w/v) *Zinkacetat*, versetzt mit $\frac{1}{4}$ der für SD-Medium angegebenen Aminosäure-Menge) mit den diploiden Zellen inokuliert und 5 Tage bei RT und danach 3 Tage bei 30°C geschüttelt.

Für die Tetradendissektion wurden 270 µl der Flüssigkultur mit 30 µl Zymolyase 20-T (Stammlösung: 10 mg/ml gelöst in ddH₂O; Seikagaku Corporation, Tokio, Japan) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Es wurden 100 µl der Zellsuspension auf eine YPD-Platte (strichförmig) aufgetragen und mit Hilfe eines Mikromanipulators (Schuett Labortechnik, Göttingen; Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments, Düsseldorf) wurden die Tetraden aufgenommen und die einzelnen Sporen voneinander getrennt. Nachdem nach etwa 3 Tagen bei 30°C die einzelnen Sporen Kolonien ausgebildet hatten, wurden sie unter Einhaltung der jeweiligen Position strichförmig auf einer frischen YPD-Platte ausgebracht und über Nacht bei 30°C bebrütet. Um die Tetraden auf ihre Auxotrophiemarker hin zu überprüfen, wurden diese auf SD-Selektivmediumplatten (entsprechend supplementiert) oder auf YPD-Platten mit G418 überstempelt. Die deletierten Gene der Doppelmutanten wurden mittels PCR (2.1.3; 2.2.7) überprüft.

2.2.6 Deletion nicht essentieller Gene in *S. cerevisiae* mittels homologer Rekombination

Die Deletion nicht essentieller Gene in Hefe mittels homologer Rekombination erfolgte in Anlehnung an Gietz *et al.* (1992). Dazu wurden 50 ml einer YPD-Flüssigkultur (OD_{600} 0,7-1) 5 min bei 5.000 rpm und 4°C (*Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44*) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml sterilem ddH₂O gewaschen, in 1 ml sterilem ddH₂O resuspendiert und 1 min bei RT und 13.000 rpm (*Sigma 1-15, Rotor 12124*) pelletiert. Nachdem das Pellet in 1,5 ml frischem TE/LiOAc (*10x TE (0,1 M Tris/HCl, 0,01 M EDTA; pH 7,5)* und *10x LiOAc (1 M LiOAc, pH 7,5) im Verhältnis 1:1*) resuspendiert wurde, erfolgte eine Zentrifugation für 30 sec bei RT und 13.000 rpm (*Sigma 1-15, Rotor 12124*). Die Zellen wurden in 200 µl TE/LiOAc aufgenommen. Parallel dazu wurde die Carrier-DNA (Herringsspermien-DNA: 10 mg/ml in ddH₂O; Sigma, Taufkirchen) für 10 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Etwa 5 µg des gereinigten PCR-Produktes wurden für die Deletion im Genom mit 50 µg denaturierter ssCarrier-DNA vereint und mit 50 µl der in TE/LiOAc-aufgenommenen Zellen durch Invertieren vermengt. Danach wurde der Ansatz mit 300 µl frischer 40%iger PEG 4000-Lösung (*50% PEG 4000, 10x TE, 10x LiOAc; im Verhältnis (v/v) 8:1:1*) versetzt, für 30 min bei 30°C und 15 min bei 42°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl sterilem ddH₂O wurden die Zellen pelletiert (*30 sec, 13.000 rpm, RT; Sigma 1-15, Rotor 12124*), der Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml YPD-Flüssigmedium resuspendiert. Die Flüssigkultur wurde für 2-3 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert, pelletiert (*30 sec, 13.000 rpm, RT; Sigma 1-15, Rotor 12124*) und in 500 µl ddH₂O aufgenommen. Danach wurden die Zellen auf einer der Deletionskassette entsprechend supplementierten YPD- (G418, NTC) bzw. SD-Platte (ohne Histidin) ausgebracht und bei 30°C für 2-5 Tage inkubiert.

2.2.7 Nachweis chromosomaler Deletionen in *S. cerevisiae*

Zur Erzeugung von Deletionsmutanten wurden in einigen verwendeten Hefestämmen chromosomale Deletionen mittels homologer Rekombination oder Kreuzung eingefügt. Es wurde entweder die *kanMX4*-, die *HIS3MX6*- oder die *natNT2*-Kassette in das Hefegenom integriert. Zunächst wurde mit dem YeaStarTM Genomic DNA Kit (2.1.2.2) DNA des gewünschten Hefestammes isoliert. Der korrekte Einbau der jeweiligen Kassette wurde schließlich mittels PCR (2.1.3) überprüft. Hierzu wurden Primerpaare verwendet, deren Forwardprimer in der Markerkassette und deren Reverseprimer im flankierenden Bereich des

jeweiligen deletierten Gens binden. Die korrekte Integration der Markerkassette konnte durch ein Fragment mit der entsprechenden Größe mittels Agarosegelelektrophorese (2.1.5.2) nachgewiesen werden.

2.3 Methoden der Zellbiologie

2.3.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe

Zur Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe wurden 10-20 ml einer Flüssigkultur bei einer OD_{600} von 0,2 abzentrifugiert (5 min, RT, 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44), das Pellet in 200 μ l SDS-Probenpuffer (4x SDS-Probenpuffer: 0,3 M Tris, pH 6,8, 2,4% SDS, 6,7% Glycerin, 13,3% β -Mercaptoethanol) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dem Ansatz wurden Glasperlen (\varnothing 0,25-0,5 mm; Roth, Karlsruhe), dem Volumen des Zellpellets entsprechend, hinzugefügt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 20 sec gevortext und dann 20 sec auf Eis gekühlt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Dann wurden die Proben in einem kochenden Wasserbad für 10 min erhitzt und konnten schließlich in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; 2.4.3) verwendet werden.

2.3.2 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* erfolgte nach dem von Daum *et al.* (1982) beschriebenen Protokoll. Die Hefekulturen wurden bei einer OD_{600} von 1,0-2,0 für 5 min bei 5.000 rpm und RT (Sorvall Evolution Centrifuge, Thermo Scientific, Rotor FIBERLite F8-6x1000y) geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit dH_2O gewaschen und ihr Feuchtgewicht bestimmt. Das Zellpellet wurde in 2 ml/g Feuchtgewicht Puffer A (0,1 M Tris/HCl, pH 9,4, 10 mM DTT (immer frisch zugeben)) aufgenommen und für 10 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 5.000 rpm, RT; Sorvall Evolution Centrifuge, Thermo Scientific, Rotor FIBERLite F8-6x1000y) und zweimal mit 40-100 ml Puffer B (1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) gewaschen. Für die Sphäroplastizierung wurden die Zellen in 4 ml/g Feuchtgewicht Puffer B mit 8 mg/g Feuchtgewicht Zymolyase 20-T (Seikagaku Corporation, Tokio, Japan) resuspendiert und für 30-60 min bei 30°C geschüttelt. Die Bildung von Sphäroplasten wurde durch osmotische Lyse überprüft. Hierfür wurden 20 μ l Zellsuspension jeweils in 1 ml ddH_2O und in 1 ml Puffer B (als Vergleich) gegeben und kurz geschüttelt. Als Referenz diente 1 ml ddH_2O . Die

Zymolyasebehandlung war ausreichend, wenn die ursprünglich trübe Suspension in ddH₂O genauso klar wurde wie die Referenz.

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit gekühlten Geräten durchgeführt. Die Sphäroplasten wurden geerntet (5 min, 5.000 rpm, 4°C; *Sorvall Evolution Centrifuge, Thermo Scientific, Rotor FIBERLite F8-6x1000y*) und mit 40-100 ml Puffer B gewaschen. Die Sphäroplasten wurden dann in 3 ml/g Feuchtgewicht Homogenisierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,6 M Sorbitol, 1 mM PMSF (Stammlösung: 0,2 M in EtOH; haltbar 1-3 Monate bei -20°C; frisch dazu geben)) aufgenommen und in einem Dounce-Homogenisator mit 13-15 Stößen aufgeschlossen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 5.000 rpm und 4°C (*Sorvall Evolution Centrifuge, Thermo Scientific, Rotor FIBERLite F21-8x50*) wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Das erhaltene Pellet wurde nochmals in Homogenisierungspuffer aufgenommen, im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und zentrifugiert (5.000 rpm, 5 min, 4°C; *Sorvall Evolution Centrifuge, Thermo Scientific, Rotor FIBERLite F21-8x50*). Die beiden Überstände, die die Mitochondrien enthalten, wurden vereint und die Mitochondrien durch einen Zentrifugationsschritt (12.000 rpm, 12 min, 4°C; *Sorvall Evolution Centrifuge, Thermo Scientific, Rotor FIBERLite F21-8x50*) pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml/g Feuchtgewicht Homogenisierungspuffer (ohne PMSF) aufgenommen und bei 5.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert (*Sorvall Evolution Centrifuge, Thermo Scientific, Rotor FIBERLite F21-8x50*). Der Überstand wurde nun abermals einer 12-minütigen Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C (*Sorvall Evolution Centrifuge, Thermo Scientific, Rotor FIBERLite F21-8x50*) ausgesetzt. Das Mitochondrienpellet wurde in 0,5-1 ml Puffer C (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4) vorsichtig resuspendiert. Danach wurde die Proteinkonzentration (2.4.2) bestimmt und je nach Bedarf wurden die Mitochondrien (100-200 µg) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Alternativ wurden die Mitochondrien mittels einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation weiter aufgereinigt (2.3.3).

2.3.3 Reinigung isolierter Mitochondrien mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Um die isolierten Mitochondrien (2.3.2) weiter zu reinigen, wurden diese in einem Ultrazentrifugenröhrchen auf einen Gradienten aus 20%, 30%, 40%, 50% und 60% (w/w) Saccharose in Gradientenpuffer (10 mM MOPS/KOH, pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (frisch dazu geben)) aufgetragen und ultrazentrifugiert (40.000 rpm, 30 min, 4°C; *Beckman Optima TM LE-80 K Ultrazentrifuge, SW40-Rotor*). Nach der Zentrifugation

sammeln sich die Mitochondrien zwischen der 40 und 50%igen Saccharose-Stufe. Die Mitochondrien wurden abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 15 ml SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2) versetzt und zentrifugiert (12.000 rpm, 12 min, 4°C; Sorvall Evolution Centrifuge, Thermo Scientific, Rotor FIBERLite F21-8x50). Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml SEM-Puffer. Die Mitochondrien wurden in 0,5-1 ml SEM-Puffer gelöst, die Proteinkonzentration (2.4.2) bestimmt und aliquotiert (100-200 µg Mitochondrien). Anschließend wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingefroren.

2.3.5 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

2.3.5.1 Färbung subzellulärer Strukturen in *S. cerevisiae* für die Fluoreszenzmikroskopie

Färbung von Mitochondrien

Zur stabilen Färbung von Hefezellen wurden Hefeexpressionsvektoren (2.1.1), welche GFP oder RFP mit mitochondrialer Zielsteuerungssequenz (mtGFP, mtRFP) kodieren (Mozdy *et al.*, 2000; Westermann und Neupert, 2000), in die zu untersuchenden Hefestämme transformiert (2.2.4). Je nach Promotor wurde GFP oder RFP konstitutiv oder induzierbar exprimiert. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.3.5.3).

DAPI-Färbung

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; Sigma, Taufkirchen) interkaliert mit doppelsträngiger DNA und bildet mit dieser einen fluoreszierenden Komplex. Somit werden nicht nur die Zellkerne sondern auch die mtDNA-Nukleotide der Mitochondrien angefärbt. 1 ml einer Hefeflüssigkultur wurde bei einer OD₆₀₀ von ~1,0 geerntet (1 min, RT, 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Die Zellen wurden in 700 µl Methanol aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 19 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, in 1 ml PBS resuspendiert und mit 1 µl DAPI (Stammlösung: 1 mg/ml in ddH₂O) versetzt. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert. Es folgten vier Waschschriffe mit PBS (13.000 rpm, 1 min, RT; Sigma 1-15, Rotor 12124). Die Zellen wurden in 100-500 µl PBS aufgenommen und mikroskopisch analysiert (2.3.5.3). Alternativ konnten die fixierten Zellen auch bis zu 1 Woche bei 4°C gelagert und dann mikroskopiert werden.

Vakuolenfärbung

Die Färbung der Vakuolen erfolgte mit dem Farbstoff Carboxy-DCFDA (5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetat; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, USA). Hierzu wurden die Zellen aus 1 ml Kultur durch eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm pelletiert (*Sigma, 1-15, Rotor 12124*) und in 200 µl frischem Medium aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µl Carboxy-DCFDA (Stammlösung: 10 mM in DMSO) erfolgte eine Inkubation von 15-30 min bei RT. Anschließend wurden die Hefezellen mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.3.5.3) untersucht.

ER-Färbung

Hefestämme deren ER-Struktur sichtbar gemacht werden sollte, wurden mit dem Plasmid pWP1055 (Prinz *et al.*, 2000) transformiert (2.2.4), welches GFP exprimiert, das in das ER importiert wird. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.3.5.3).

Aktinfärbung

Das Aktinzytoskelett wurde mit Rhodamin-Phalloidin (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, USA) angefärbt. Dazu wurden Hefekulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,4 angezogen. 5-15 ml der Kultur wurden mit 4% Formaldehyd für 10 min fixiert und anschließend pelletiert (*5.000 rpm, 5 min, RT; Eppendorf 5804R Zentrifuge, A-4-44 Rotor*). Die Zellen wurden in PBS mit 4% Formaldehyd (5-15 ml) resuspendiert und für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 5-15 ml PBS. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 50-100 µl PBS aufgenommen, mit 2-10 µl des nach Angaben des Herstellers in Methanol gelösten Farbstoffes versetzt und 1 h im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgten fünf Waschschrte mit je 1 ml PBS. Das Pellet wurde in 20-100 µl PBS aufgenommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (2.3.5.3). Eine Lagerung der Proben bei 4°C war bis zu zwei Wochen möglich.

Zellwandfärbung mittels Biotinylierung und Streptavidin Alexa Fluor 488 Konjugat

Zum Anfärben der Zellwand wurden 10 ml einer YPD-Hefekultur bei einer OD₆₀₀ von 0,7-1,0 geerntet (*5 min, 5.000 rpm, RT; Eppendorf 5804R Zentrifuge, A-4-44 Rotor*), in 1 ml sterilem PBS aufgenommen, mit 1 ml PBS gewaschen und in 0,4 ml PBS resuspendiert. 8 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin (30 min vorher auftauen; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gelöst in 300 µl sterilem PBS wurden auf 10⁸ Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei

RT unter leichtem Schütteln. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen, um überschüssiges Sulfo-NHS-LC-Biotin zu entfernen (*2 min, 5.000 rpm, RT; Sigma, 1-15, Rotor 12124*). Die Zellen wurden in 1 ml YPD aufgenommen und mit 1-10 µl Streptavidin Alexa Fluor 488 Konjugat (Stammlösung: 1 mg/ml in PBS; Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und für 10-30 min bei RT geschüttelt. Die Zellen wurden fixiert (2.3.5.2) und anschließend mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert (2.3.5.4).

2.3.5.2 Fixierung von Zellen

900 µl einer Hefekultur wurden mit 4% Formaldehyd versetzt und für 30 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml PBS gewaschen (*1 min, 13.000 rpm, RT; Sigma, 1-15, Rotor 12124*), in 50-200 µl PBS aufgenommen und anschließend mikroskopiert (2.3.5.3; 2.3.5.4). Die Proben konnten bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden.

2.3.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Für die mikroskopische Analyse wurden lebende oder fixierte Zellsuspensionen durch Zugabe von 0,5% (w/v) Low Melting Point Agarose auf dem Objektträger immobilisiert. Fluoreszenz- und Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahmen (DIC) wurden an einem Axioplan 2 Mikroskop mit Plan-Neofluar 100x/1.30 NA Ph3 Öl-Objektiv (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) durchgeführt. Für die Untersuchung von mtGFP, ER-GFP und Carboxy-DCFDA wurde Filtersatz Nr. 10 (Anregung: 450-490 nm, Emission: >515 nm) und von Rhodamin-Phalloidin und mtRFP Filtersatz Nr.15 (Anregung: 534-558 nm, Emission: >590 nm) verwendet. Die DAPI- und Vakuolenfärbung wurde mit Filtersatz Nr. 01 (Anregung: 353-377 nm, Emission: >397 nm) analysiert. Die Fluoreszenz- und DIC-Aufnahmen wurden mit einer Evolution VF Mono Cooled Monochrome Kamera (Intas, Göttingen) aufgenommen und mit der Software Image-Pro Plus 5.0 und Scope-Pro 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) bearbeitet.

2.3.5.4 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie zur Analyse von lebenden oder fixierten Zellsuspensionen wurde an einem invertiertem Leica TCS Sp1 System (Leica, Bensheim) mit einem 100x/1.40 HCX PL APO Öl-Objektiv durchgeführt. Dazu wurden die Zellen durch

Zugabe von 0,5% (w/v) Low Melting Point Agarose auf dem Objektträger immobilisiert. Die Serien wurden anschließend mit der Software ImageJ 1.41 (Abramoff *et al.*, 2004) bearbeitet.

2.3.6 Elektronenmikroskopie

2.3.6.1 Hefepräparation und Einbettung von Hefezellen nach Bauer *et al.* (2001) und Spurr (1969)

50 ml einer Hefeflüssigkultur (YPD oder YPG) wurden bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 bei 30°C inkubiert und mittels Zentrifugation (5 min, 4°C, 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) geerntet. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und 30 min bei 4°C in 10 ml Cacodylat-Puffer (1 mM CaCl₂ in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2) mit 2% Glutaraldehyd fixiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit jeweils 10 ml Cacodylat-Puffer und das Ablösen der Zellwand in Tris-Sorbitol-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1,4 M Sorbitol) mit 0,5% (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,15 mg/ml Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation, Tokio, Japan) für 10-30 min bei RT. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 rpm und 4°C für 5 min (Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) pelletiert und zweimal mit 10 ml Cacodylat-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 2 ml Cacodylat-Puffer aufgenommen, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, RT, 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Das Zellpellet wurde nun zunächst in 0,5 ml 0,5% (w/v) Osmiumtetroxid resuspendiert, anschließend mit 0,5 ml 1,6% (w/v) Kalium-Ferrocyanid versetzt und nach dem Mischen für 5 min bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (5 min, RT, 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) und abermals mit Osmiumtetroxid und Kalium-Ferrocyanid behandelt. Danach wurde dreimal mit je 1 ml ddH₂O gewaschen (5 min, RT, 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124).

Das Zellpellet wurde mit der Pipettenspitze gelockert und im Verhältnis 1:1 mit 2% (w/v) Agarose Typ IX versetzt und gevortext. Nachdem die Agarose erhärtet war, wurden 1 mm³ große Blöckchen mit einer Rasierklinge geschnitten und diese in ein Reaktionsgefäß mit ddH₂O überführt. Das Wasser wurde durch 2 ml einer 1%igen (w/v) Uranylacetat-Lösung ersetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Agaroseblöckchen mit 2 ml ddH₂O wurden die Zellen mit Hilfe von Aceton entwässert. Dazu wurden die Agaroseblöckchen jeweils für 15 min in 2 ml 25%igem, 50%igem, 70%igem und 96%igem Aceton (v/v) und dreimal für 20 min in 100%igem Aceton inkubiert. Für die Einbettung in Spurr-Harz (40 ml: 26 g Nonenylsuccinicanhydrid (NSA), 10 g ERL-4221D, 6 g D.E.R. 736 und 0,4 g 2-Dimethylaminoethanol) wurden die Proben zunächst in einem 1:3 Spurr:Aceton-Gemisch für 3-4 h und anschließend in einem 1:1 Spurr:Aceton-Gemisch über Nacht

inkubiert. Danach erfolgte eine 3-4stündige Inkubation in einem 3:1 Spurr-Aceton-Gemisch und darauffolgend wurden die Blöckchen zweimal für 3-4 h und über Nacht in purem Spurr eingelegt. Zum Schluss wurden BEEM-Kapseln (Plano GmbH, Wetzlar) mit purem Spurr gefüllt und jeweils ein Agarose-Zellblöckchen darauf gegeben. Die Polymerisation des Harzes erfolgte zunächst für 3-4 h bei 40°C und anschließend für 3-5 Tage bei 50°C. Die ausgehärteten Proben wurden aus den Plastikkapseln entfernt und weiter bearbeitet (2.3.6.2).

2.3.6.2 Trimmen, Schneiden und Nachkontrastierung der Proben

Überschüssiges Harz der eingebetteten Proben wurde zunächst mit dem Trimmgerät EM TRIM (Leica, Bensheim) und der Diamantfräse entfernt. Die Feinschnittpräparate wurden mit einem Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) am Ultramikrotom Leica Ultracut UCT (Leica, Bensheim) durchgeführt. Es wurden 70 nm-dicke Schnitte hergestellt und als Schnittbänder auf befilmte Kupfer-Lochgrids (slot grids, 2x1 mm; Plano, Wetzlar) aufgenommen. Für Serien wurden ebenfalls 70 nm-dicke Schnitte erzeugt. Eine Serie bestand aus ~35 Schnitten.

Es folgte eine Nachkontrastierung der Proben (Reynolds, 1963). Dazu wurden die Grids für 10 min in 2% (w/v) Uranylacetat inkubiert und dreimal für 1 min in ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Grids für 3 min in Bleicitrat-Lösung (*2,1 ml Natriumcitrat-Lösung: 4,12 g in 50 ml ddH₂O + 2,1 ml Bleinitrat-Lösung: 3,13 g in 50 ml ddH₂O + 0,8 ml 1 M NaOH*) und dreimal für 1 min in ddH₂O inkubiert. Nachdem die Grids auf Filterpapier getrocknet waren, konnten sie elektronenmikroskopisch untersucht werden (2.3.6.3).

2.3.6.3 Elektronenmikroskopie

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem EM 902 A Transmissions-Elektronenmikroskop mit Plattenkamera (Carl ZeissSMT, Oberkochen) bei 80 kV untersucht. Die Negative (Kodak, Stuttgart) wurden entwickelt und mit 300-600 dpi mit dem ScanMaker i900 (Mikrotek, Overath) eingescannt. Außerdem wurde das Elektronenmikroskop JEOL JEM-2100 (Jeol, Eching) verwendet. Hierbei wurden die Bilder mit der Kamera ES500W Erlangshen (Gatan 782; Pleasanton, USA) aufgenommen und mit der Software von Gatan (Gatan digital micrograph, Version 1.70.16) bearbeitet.

2.3.6.4 Erstellen eines 3D-Modells mit IMOD

Zum Erstellen eines 3D-Modells aus elektronenmikroskopischen Serienschnitten wurde das Programm IMOD 3.13.5 (Boulder Laboratory, USA; Kremer *et al.*, 1996) verwendet. Die einzelnen Bilder wurden übereinander gelagert und die Mitochondrien und die Zellwand nachgezeichnet. Das 3D-Modell wurde dann von der Software anhand der Vorgabe erstellt.

2.3.6.5 Befilmen von Kupfer-Lochgrids

Zum Befilmen von Kupfer-Lochgrids wurden Objektträger in eine 1%ige Pioloformlösung ((w/v) in Chloroform) gelegt und getrocknet. Der Pioloform-Film wurde vom Objektträger gelöst und auf eine Wasseroberfläche überführt. Anschließend wurde der Film mit Kupfer-Lochgrids belegt und mit Parafilm von der Oberfläche des Wassers entfernt. Die Grids wurden getrocknet und für die Aufnahme von Ultradünnschnitten verwendet (2.3.6.2).

2.3.7 Behandlung von Hefezellen mit Latrunculin A

Latrunculine sind Toxine, die an monomeres Aktin binden und dessen Polymerisation verhindern, was zu einem Ungleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation führt, so dass sich die Aktinfilamente auflösen (Ayscough *et al.*, 1997). Für die Behandlung von Hefezellen mit Latrunculin A wurde eine 1 ml YPD-Kultur über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml YPD-Flüssigmedium mit der Vorkultur inokuliert und bei 30°C unter Schütteln bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ 0,2-0,5) kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (3 min, 5.000 rpm, RT; Sigma 1-15, Rotor 12124) und in 1 ml YPD resuspendiert. Je 500 µl der Zellsuspension wurden in zwei frische Kulturröhrchen überführt. Zu den Kulturen wurden 5 µl Latrunculin A-Lösung (Stammlösung: 2 mM gelöst in DMSO; Merck, Calbiochem, Läuelfingen) bzw. 5 µl DMSO (als Kontrolle) hinzugefügt. Die Kulturen wurden bei RT unter Schütteln inkubiert. Die mikroskopische Analyse (2.3.5.3) erfolgte vor der Zugabe sowie 60 min nach der Zugabe von DMSO bzw. Latrunculin A-Lösung. Zur zusätzlichen Färbung des Aktinzytoskeletts wurde jeweils nach entsprechender Behandlung die Probe mit Rhodamin-Phalloidin (2.3.5.1) gefärbt.

2.3.8 *In vivo* Nachweis der mitochondrialen Fusion (Mating Assay)

Zum *in vivo*-Nachweis von mitochondrialer Fusion wurde ein „Mating Assay“ durchgeführt (Nunnari *et al.*, 1997). Dazu wurden haploide Stämme entgegengesetzten Paarungstyps mit

GAL-induzierbaren Plasmiden, die entweder mtGFP (pYX113-mtGFP; Westermann und Neupert, 2000) oder mtRFP (pRS416-GAL1+PrFoATP9-RFP; Mozdy *et al.*, 2000) exprimieren, transformiert (2.2.4). 50 ml YPGal-Kulturen (1% (w/v) *Hefe Extrakt* (Serva, Heidelberg), 2% (w/v) *Pepton* (USB, Cleveland, Ohio, USA), 2% *Galaktose*) wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,2 geerntet (5 min, RT, 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44), in 20 ml YPD (pH 3,5) resuspendiert und für 1,5 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert, um die durch den *GAL*-Promotor vermittelte Proteinexpression zu stoppen. Anschließend wurden die Kulturen beider Stämme entgegengesetzten Paarungstyps vereinigt, geerntet (5 min, RT, 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) und in 1 ml sterilem ddH₂O aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf einen Nitrozellulosefilter überführt, der auf drei Lagen Whatman-Papier lag. Die Nitrozellulosemembran wurde mit den Zellen nach oben auf eine YPD-Platte (pH 4,5) gelegt und für 3 h bei 30°C inkubiert. Hierbei führt die Änderung des pH-Wertes zu einer Synchronisation der Zellen, was somit die Paarungseffizienz steigert. Danach wurde der Filter in ein 15 ml Röhrchen mit 15 ml ddH₂O überführt und gevortext. Die Auswertung der mitochondrialen Fusion in den Zygoten erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.3.5.3).

2.4 Methoden der Proteinbiochemie

2.4.1 Präparation von Proteinen

2.4.1.1 Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* zur Erzeugung polyklonaler Antiseren

Für die Erzeugung von Antiseren gegen Mdm35 wurde das *MDM35*-Gen in den Vektor pQE40 kloniert (2.1.1). Folglich konnte Mdm35 mit sechs N-terminalen Histidinresten und DHFR in *E. coli* exprimiert werden. Zur Reinigung von His-DHFR-Mdm35 aus *E. coli* wurden 100 ml LB-Amp-Flüssigkultur über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 ml LB-Amp-Flüssigmedium mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,4 inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5-0,7 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit 1 mM IPTG (Stammlösung: 100 mg/ml) für 4-5 h bei 37°C induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4.000 rpm, RT; Beckman-Zentrifuge, JA10-Rotor) geerntet, das Pellet in 12 ml Puffer B1 (25% (w/v) *Saccharose*, 20 mM *HEPES-KOH*, pH 7,4) resuspendiert, 1 mg/ml *Lysoszym* hinzugegeben und für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden 1 mM *PMSF*, 1 mM β -Mercaptoethanol und 2%

Triton X-100 zur Suspension hinzugefügt und die Zellen durch Sonifizieren (8 x 12 Pulse, zwischendrin jeweils 1 min warten) aufgeschlossen.

Die Inclusion Bodies wurden durch Zentrifugation (4.000 rpm, 20 min, 4°C; Eppendorf 5804 R Zentrifuge, Rotor A-4-44) pelletiert und nacheinander jeweils mit 12 ml mit den Puffern B2 (20 mM HEPES-KOH, 1 mM PMSF; pH 7,4, 1% Triton X-100), B3 (20 mM HEPES-KOH, 1 mM PMSF, pH 7,4; 0,1% Triton X-100) und B4 (20 mM HEPES-KOH, 1 mM PMSF; pH 7,4) gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde sonifiziert (8 x 12 Pulse, zwischendrin jeweils 1 min warten) und zentrifugiert (4.000 rpm, 20 min, 4°C; Eppendorf 5804 R Zentrifuge, Rotor A-4-44). Dann wurde das Pellet in 12 ml Harnstoffpuffer (20 mM HEPES-KOH, 0,1 M NaCl, 8 M Harnstoff; pH 7,4) resuspendiert und sterilfiltriert.

Danach wurde nach dem Protokoll von Qiagen („The QIAexpressionist 06/2003, Protocol 17. Batch purification of 6xHis-tagged proteins from *E. coli* under denaturing conditions.”) vorgegangen. Dazu wurde pro 4 ml Lysat 1 ml 50% Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden) zugegeben und die Suspension für 15-60 min leicht geschüttelt. Die Suspension wurde nun bei 4.000 rpm für 20 min bei 4°C (Eppendorf 5804 R Zentrifuge, Rotor A-4-44) abzentrifugiert und der Überstand abgenommen (Durchfluss). Die Suspension mit der Ni-NTA Agarose wurde zweimal mit 12 ml Waschpuffer (20 mM HEPES-KOH, 0,1 M NaCl, 8 M Harnstoff, 20 mM Imidazol; pH 7,4) gewaschen (4.000 rpm, 20 min, 4°C; Eppendorf 5804 R Zentrifuge, Rotor A-4-44) und der Überstand jeweils abgenommen (W1 und W2). Das Protein wurde zweimal mit 8 ml Elutionspuffer (20 mM HEPES-KOH, 0,1 M NaCl, 8 M Harnstoff, 250 mM Imidazol; pH 7,4) durch 10-20-minütiges Schütteln von der Ni-NTA Agarose eluiert (E1 und E2).

Da das Protein nach der Elution in harnstoffhaltigem Puffer gelöst war, der für die Immunisierung der Kaninchen nicht geeignet ist, musste der Harnstoff mittels Dialyse entfernt werden. Dazu wurden die Dialyseschläuche (Roth, Karlsruhe) zunächst für 3-4 h bei 60°C in 2%igem NaHCO₃ mit 1 mM EDTA eingelegt, anschließend mit ddH₂O gespült und dann bis zur Verwendung in 0,05% Azid/H₂O aufbewahrt. Für die Dialyse wurde der Dialyseschlauch mit 3 ml des Proteins befüllt. Der gefüllte Dialyseschlauch wurde entweder über Nacht oder zweimal für 1-2 h in 1 l PBS unter langsamem Rühren inkubiert. Das Antigen wurde mit einer Glaspipette aus dem Dialyseschlauch entnommen und zur Immunisierung der Kaninchen an die Firma Biogenes in Berlin geschickt. Die entnommenen Aliquots wurden mittels SDS-PAGE (2.4.3) analysiert.

2.4.1.2 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

Für die gekoppelte TNT[®]-Lysat Transkriptions-/Translationsreaktion wurde *MDM36* in den Vektor pGEM3 vor einen SP6-RNA-Polymerase-Promtor kloniert. Für den Reaktionsansatz wurde das TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega (Mannheim) verwendet. [³⁵S]-Methionin wurde von Hartmann Analytics (Braunschweig) bezogen. Ein Standard-Ansatz setzte sich aus den in Tab.2-6 aufgelisteten Komponenten zusammen.

Tab.2-6: Verwendete Komponenten für den *in vitro* Transkriptions-/Translationsansatz.

Komponente	Menge
TNT [®] Kaninchen-Retikulozytenlysat	25 µl
TNT [®] Reaktionspuffer	2 µl
TNT [®] RNA-Polymerase	1 µl
Aminosäure-Mix ohne Methionin [1 mM]	1 µl
[³⁵ S]-Methionin [10 mCi/ml]	2 µl
RNasin [®] Ribonuklease Inhibitor [40 U/µl]	1 µl
DNA Template [0,5 µg/µl]	2 µl
Nuklease-freies ddH ₂ O	ad 50 µl

Die Komponenten wurden ohne [³⁵S]-Methionin in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und gut gemischt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 2 µl [³⁵S]-Methionin versetzt und für 90 min bei 30°C inkubiert. Dem Ansatz wurden 2 µl entnommen, die mit 20 µl 1-4x SDS-Probenpuffer (*4x SDS-Probenpuffer: 0,3 M Tris, pH 6,8, 2,4% SDS, 6,7% Glycerin, 13,3% β-Mercaptoethanol*) gemischt und bei 100°C für 2 min gekocht wurden. Es wurden 15 µl mittels SDS-PAGE (2.4.3), Western-Blot (2.4.4) und anschließender Autoradiographie (2.4.5) analysiert. Der restliche Reaktionsansatz wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.1.3 *In vitro* Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien

Für einen Standard-Importansatz wurden 100 µg Mitochondrien in 100 µl Import-Puffer (*50 mM HEPES/KOH, pH 7,2, 3% (w/v) fettsäurefreies BSA, 0,5 M Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM MnCl₂, 2 mM Kp_i, pH 7,2*) aufgenommen und mit 5 mM NADH, 2,5 mM ATP, 10 mM Kreatinphosphat und 10 mg/ml Kreatinphosphokinase (Sigma, Taufkirchen) versetzt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 25°C vorinkubiert. Dann wurde abhängig vom Vorstufenprotein 0,2-10 µl in Retikulozytenlysat translatiertes Protein (2.4.1.2) zugegeben. Der Import des Proteins erfolgte bei 25°C für 15 min. Nach der Importreaktion

wurden die Mitochondrien für 10 min bei 4°C und 12.000 rpm (*Hettich Mikrorapid/K, Rotor 1395*) gesammelt und in SEM-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE (2.4.3), Western-Blot (2.4.4) und Autoradiographie (2.4.5) analysiert.

Als Kontrolle dienten Proben, bei denen die Mitochondrien bei der Vorinkubation bei 25°C mit 0,2 µM Valinomycin (Sigma, Taufkirchen) behandelt wurden. Valinomycin ist ein Ionophor, das selektiv Kaliumionen transportiert und somit das Membranpotential der Mitochondrien zerstört, was den Import von Proteinen in die Mitochondrien verhindert.

Lokalisierung der importierten Vorstufenproteine in Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden nach der Importreaktion unterschiedlichen Behandlungen unterzogen, um die intramitochondriale Lokalisierung importierter Proteine nachzuweisen. Die in SEM-Puffer resuspendierten Mitochondrien wurden mit 100 µg/ml Proteinase K für 25 min auf Eis behandelt, um nicht importierte Proteine bzw. Vorstufenproteine und zytosolische Proteindomänen abzubauen. Die Protease-Behandlung wurde durch 1 mM PMSF und einer 5-minütigen Inkubation auf Eis unterbrochen. Zum Verdau von Proteinen und Proteindomänen im Intermembranraum wurden die Mitochondrien zunächst in 50 µl SEM-Puffer resuspendiert und mit hypotonischen Puffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7,4) 1:20 verdünnt und für 25 min auf Eis inkubiert. Dies führt zur Erzeugung von Mitoplasten, d.h. Mitochondrien, deren äußere Membran geöffnet ist. Für die Protease-Behandlung von Mitoplasten wurde dem hypotonischen Puffer 100 µg/ml Proteinase K zugefügt. Die Proteinase K-Behandlung wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF und 5 min Inkubation auf Eis beendet. Die Mitochondrien und die Mitoplasten wurden durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 12.000 rpm; *Hettich Mikrorapid/K, Rotor 1395*) reisoliert, mit 100 µl SEM-Puffer gewaschen (ohne Resuspension des Pellets) und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (2.4.3), Übertragung auf Nitrozellulose (2.4.4) und Autoradiographie (2.4.5) untersucht.

2.4.1.4 Flotationsexperiment mit vorgeschaltetem Importansatz

Für den Importansatz wurden 200 µg Mitochondrien in 200 µl Importpuffer aufgenommen und mit 5 mM NADH, 2,5 mM ATP, 10 mM Kreatinphosphat und 10 mg/ml Kreatinphosphokinase versetzt und für 5 min bei 25°C vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µl in Retikulozytenlysat translatiertes Protein und die Inkubation für 15 min bei 25°C. Die Reaktionsansätze wurden für 10 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert

(Hettich Mikrorapid/K, Rotor 1395) und anschließend zweimal mit 100 µl SEM-Puffer gewaschen, ohne das Pellet dabei zu resuspendieren. Das Pellet wurde in 500 µl SEM-Puffer mit 1 mM PMSF resuspendiert. Die Proben wurden durch Zugabe von 1300 µl 2,5 M (w/v) Saccharoselösung mit 1 mM PMSF auf eine Saccharosekonzentration von 1,8 M eingestellt und auf den Boden eines SW60-Ultrazentrifugenröhrchens geladen. Danach wurden die Proben mit 1,5 ml 1,7 M Saccharose-Puffer (10 mM MOPS, pH 7,2, 1 mM EDTA, 1,7 M Saccharose, 1 mM PMSF) und dann mit 500 µl SEM-Puffer mit 1 mM PMSF überschichtet. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 4 h bei 4°C und 25.000 rpm (Beckman Optima TM LE-80 K Ultrazentrifuge, SW60-Rotor). Die Mitochondrien beinhaltende Fraktion wurden abgenommen, mit 1,5 ml SEM-Puffer versetzt, für 10 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert (Hettich Mikrorapid/K, Rotor 1395) und mit 1 ml SEM-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 30 min unter Schütteln gelöst und 2 min bei 100°C gekocht. Es wurde jeweils die gleiche Menge an Protein pro Probe mittels SDS-PAGE (2.4.3), Western-Blot (2.4.4) und Autoradiographie (2.4.5) analysiert.

Für einen zusätzlichen Versuchsansatz wurden die Mitochondrien zuvor einer Trypsin-Behandlung unterzogen. Die Mitochondrien (200 µg) wurden in 200 µl SEM-Puffer resuspendiert, mit 1 µl Trypsin (Stammlösung: 10 mg/ml; Sigma, Taufkirchen) versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von 4 µl STI (*soybean trypsin inhibitor*, Stammlösung: 10 mg/ml; Sigma, Taufkirchen) und einer erneuten Inkubation für 5 min auf Eis wurde der Verdau gestoppt. Nach anschließender Zentrifugation für 4 min bei 4°C und 12.000 rpm (Sigma 3k30, Rotor 12154-H) wurde das Pellet zweimal mit 200 µl SEM-Puffer gewaschen (ohne Resuspension des Pellets). Danach wurde wie beschrieben mit dem Flotationsexperiment vorgegangen.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration einer Proteinlösung erfolgte nach Bradford *et al.* (1976). Dazu wurden die Proben 1:1000 mit ddH₂O verdünnt. 800 µl der verdünnten Probe wurden mit 200 µl Rothi[®]-Quant (Roth, Karlsruhe) gemischt. Als Referenz diente 800 µl ddH₂O vermengt mit 200 µl Rothi[®]-Quant. Beide Ansätze wurden für 5 min bei RT inkubiert. Es wurde nun die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Anhand einer BSA-Eichgerade konnte dann die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Denaturierte Proteine wurden mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Es wurden Minigelapparaturen der Firma Biorad (Hercules, USA) verwendet. Für das 10%ige Trenngel wurden 1,9 ml H₂O, 1,7 ml 30%ige Acryl-Bisacrylamidlösung, 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% Ammoniumpersulfat und 2 µl TEMED gemischt. Das 5%ige Sammelgel setzte sich aus 680 µl H₂O, 170 µl 30%ige Acryl-Bisacrylamidlösung, 130 µl 1,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 10 µl 10% SDS, 10 µl 10% Ammoniumpersulfat sowie 1 µl TEMED zusammen. Die Proben wurden je nach Anwendung in 1-4x SDS-Probenpuffer (*4x SDS-Probenpuffer: 0,3 M Tris, pH 6,8, 2,4% SDS, 6,7% Glycerin, 13,3% β-Mercaptoethanol*) gelöst und für 10 min in einem kochendem Wasserbad bzw. für 2 min bei 100°C im Heizblock erhitzt. Die Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer (*1,0 g/l SDS, 3,03 g/l Tris, 14,41 g/l Glycin*) in einer senkrechten Kammer bei einer angelegten Stromstärke von 15 mA. Nach der Auftrennung wurden die Proteine entweder auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (2.4.4) und mittels Autoradiographie (2.4.5) oder immunologischer Detektion (2.4.6) analysiert oder mit 0,1% Coomassie-Brilliant-Blau R-250 in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure angefärbt und anschließend mit 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure entfärbt.

2.4.4 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western-Blot)

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch oder mittels Autoradiographie nachweisen zu können, wurden diese mit dem „semi-dry“-Blotverfahren (Towbin *et al.*, 1979) auf Nitrozellulosemembranen (Hybond; Amersham Biosciences, Piscataway, USA) transferiert. Dazu wurden das Gel, die Nitrozellulosemembran und sechs Whatman-Filterpapiere mit Transferpuffer (*20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,02% (w/v) SDS*) getränkt. Drei Whatman-Filterpapiere wurden auf die untere Graphitelektrode (Anode) gelegt. Danach folgten die Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel, drei weitere Whatman-Filterpapiere und die obere Graphitelektrode (Kathode). Für den Transfer der Proteine wurde eine Stromstärke von 1,5 mA/cm² für 1,5 h angelegt. Die Membran wurde zur Kontrolle der Übertragung der Proteine und zum Markieren des Standards mit Ponceau S-Lösung (*0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA*) für 2 min gefärbt.

2.4.5 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mittels Autoradiographie

Die Detektion von radioaktiv markierten Proteinen erfolgte mittels Autoradiographie. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran mit den darauf transferierten Proteinen auf eine Imaging plate (BAS-IP MS 2025; Fujifilm, Düsseldorf) gelegt. Die Imaging plate wurde nach 1-4tägiger Exposition mit dem FLA-7000 von Fujifilm Science (Düsseldorf) sowie der Software Multi Gauge V3.2 (Fujifilm, Düsseldorf) ausgewertet.

2.4.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Transfer der Proteine (2.4.4) bei RT für 30 min in TBST-Puffer (*6,05 g/l Tris, 8,76 g/l NaCl, 0,5 ml/l Tween 20*) mit 5% (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Immunodekoration bei RT oder über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen Antikörper, der je nach Titer zwischen 1:250 bis 1:2.000 in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt war. Die Membran wurde dreimal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Der Nachweis des gebundenen primären Antikörpers erfolgte durch eine einstündige Inkubation bei RT mit einem sekundären Antikörper, der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Der sekundäre Antikörper wurde 1:10.000 in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt. Es folgten drei Waschschrte für jeweils 10 min in TBST-Puffer. Die Membran wurde mit Lumineszenz-Lösung (*8 ml Luminollösung (5 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,6 nach Zugabe), 12 mg Luminol, ad 50 ml ddH₂O), 800 µl Coumarsäure (11 mg in 10 ml DMSO), 2,4 µl 30% H₂O₂)*) benetzt. Durch die ablaufende Chemilumineszenz-Reaktion konnten die Banden auf einem Röntgenfilm (Fuji medical X-Ray Film, Fujifilm, Düsseldorf) durch eine Exposition für 10 sec bis 10 min oder mit dem Luminescent Image Analyser (LAS-4000; Fujifilm, Düsseldorf) und der Software Image Reader LAS-4000 (Fujifilm, Düsseldorf) sichtbar gemacht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Die mitochondriale Morphologiekomponente Mdm36

In vielen Organismen, wie auch in *S. cerevisiae*, unterliegen die Mitochondrien ständigen morphologischen Veränderungen, um sich an die physiologischen Bedingungen anzupassen. Im letzten Jahrzehnt wurden einige Komponenten, die für diese Prozesse nötigen Maschinerien identifiziert. Dennoch sind viele Zusammenhänge noch nicht vollständig aufgeklärt. In einer genomweiten Durchmusterung wurde nach Deletionsmutanten nicht essentieller Hefegene gesucht, die eine veränderte mitochondriale Verteilung und Morphologie aufweisen (*MDM* = *mitochondrial distribution and morphology*) (Dimmer *et al.*, 2002). Dabei wurde unter anderem Mdm36 als neue Morphologie bestimmende Komponente identifiziert. *MDM36* (systematischer Name *YPR083w*) kodiert für ein 579 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 65 kDa und weist Homologe in vielen anderen Ascomyceten auf. Die Proteinsequenz besitzt eine konservierte vorhergesagte Coiled-Coil-Domäne (zwischen den Aminosäureresten 405-450; Lupas *et al.*, 1991) und eine Serinreiche Region mit einer unbekanntenen Funktion (zwischen den Aminosäureresten 466-518). Eine Transmembrandomäne sowie eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz konnten nicht vorhergesagt werden. Die Charakterisierung von Mdm36 und die Ermittlung der möglichen Funktion sollten weitere Einblicke in den mitochondrialen Morphologie- und Vererbungsapparat geben.

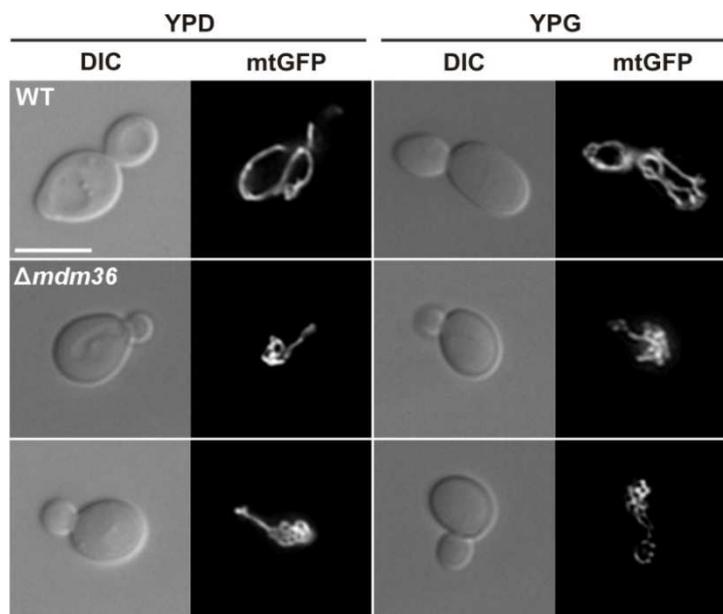
3.1.1 Die Δ *mdm36*-Mutante besitzt netzähnliche Mitochondrien

Mitochondrien sind sehr dynamische Organellen, deren Morphologie unter anderem von den antagonistischen Prozessen Fusion und Teilung abhängig ist. In wildtypischen Hefezellen bilden die Mitochondrien elongierte, tubuläre Strukturen aus. Wird hingegen der mitochondriale Fusionsprozess blockiert, entstehen fragmentierte Mitochondrien. Bei einem Verlust der mitochondrialen Teilungsaktivität besitzen die Hefezellen stark verzweigte, netzartige (fischernetzartige, Netze) Mitochondrien, wobei die Maschen sehr gleichmäßig angeordnet sind. Folglich kann die mitochondriale Morphologie einer Deletionsmutante Aufschluss über die mögliche Funktion eines Proteins geben. Deswegen wurde die Δ *mdm36*-Mutante im Vergleich zum isogenen Wildtyp (BY4742) zunächst fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Hierfür wurden die Stämme mit dem Plasmid pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) transformiert, welches GFP mit einer mitochondrialen Zielsteuerungssequenz kodiert und somit die Mitochondrien stabil markiert.

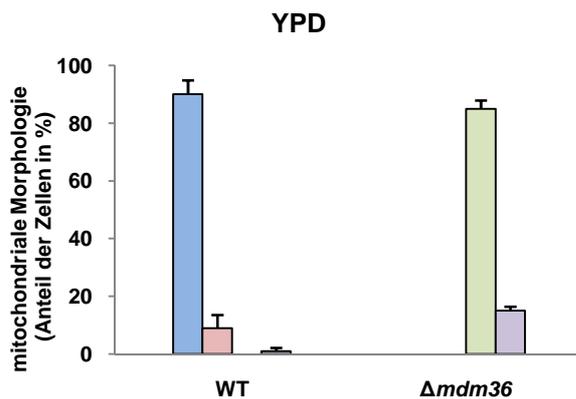
Auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPD-Medium) wies der Wildtyp zu 90% tubuläre, verzweigte Mitochondrien auf (Abb.3-1 A und 3-1 B) und auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPG-Medium) zu 98% (Abb.3-1 A und 3-1 C). Lediglich die Stärke der mitochondrialen Verzweigung war auf glyzerinhaltigem Medium erhöht, da die Zellen gezwungen waren, ihren ATP-Bedarf über die Atmungskette zu decken. Die $\Delta mdm36$ -Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine stark veränderte mitochondriale Morphologie. Die Hefezellen bildeten auf YPD-Medium zu 85% bzw. auf YPG-Medium zu 94% sehr kompakte Mitochondrien aus, die meist auf einer Seite der Zelle lokalisiert waren (Abb.3-1 A mittlere Bildreihe, B und C). Diese netzähnlichen mitochondrialen Strukturen waren sehr unorganisiert. Auffällig waren auch die auf glukosehaltigem Medium zu 15% und auf glyzerinhaltigem Medium zu 6% sichtbaren „echten“ Netze (gleichmäßige Anordnung der Maschen) (Abb.3-1 A untere Bildreihe, B und C). Diese sind typisch für mitochondriale Teilungsmutanten.

Insgesamt ähneln die beobachteten netzähnlichen Mitochondrien der $\Delta mdm36$ -Mutante sehr der mitochondrialen Morphologie der $\Delta dnm1$ - (Otsuga *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999), $\Delta mdv1$ - (Tieu und Nunnari, 2000) und $\Delta fis1$ -Mutanten (Mozdy *et al.*, 2000). Dnm1, Mdv1 und Fis1 sind Komponenten der mitochondrialen Teilungsmaschinerie, deren Verlust zu netzartigen Mitochondrien führt, die durch die Störung der Teilung bei fortlaufender Fusion entstehen. Ein ähnlicher mitochondrialer Phänotyp kann auf eine gemeinsame Funktion hindeuten. Der mitochondriale Phänotyp der $\Delta mdm36$ -Zellen würde dementsprechend eine mögliche Rolle von Mdm36 in der mitochondrialen Teilung signalisieren.

A



B



C

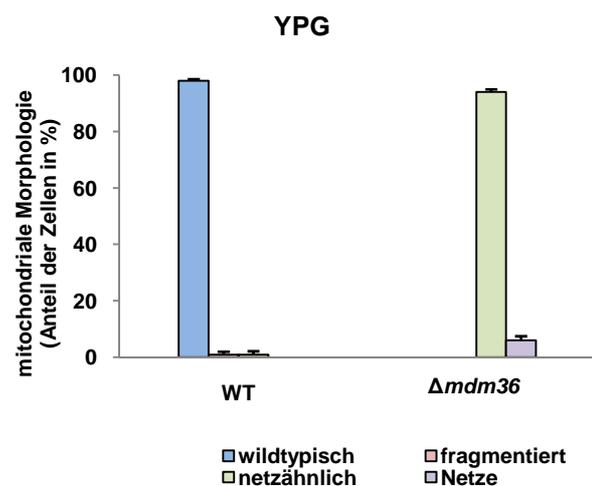


Abb.3-1: Die mitochondriale Morphologie der $\Delta mdm36$ -Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp stark verändert. Mit pVT100U-mtGFP transformierte Wildtyp- und $\Delta mdm36$ -Zellen wurden auf YPD- bzw. auf YPG-Medium bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mitochondrialen Morphologie. Es ist jeweils eine Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahme (DIC) der Hefezellen und eine Fluoreszenzaufnahme (mtGFP) der Mitochondrien abgebildet. Der Größenbalken entspricht 5 μm . **(B und C)** Quantifizierung der mitochondrialen Phänotypen auf YPD- bzw. YPG-Medium. Angegeben sind Durchschnittswerte aus je drei Auszählungen (n jeweils ≥ 100) mit Standardabweichungen.

3.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der $\Delta mdm36$ -Mutante und die Erstellung eines 3D-Modells bestätigen den netzähnlichen mitochondrialen Phänotyp

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Analysen konnte in der $\Delta mdm36$ -Mutante ein deutlich veränderter mitochondrialer Phänotyp beobachtet werden. Die elektronenmikroskopische

Untersuchung sollte zunächst die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen bestätigen und zusätzlich nähere Aufschlüsse über mögliche Veränderungen in der Ultrastruktur, insbesondere der mitochondrialen Membranstruktur, geben, die fluoreszenzmikroskopisch nicht erfassbar sind. Die $\Delta mdm36$ -Zellen und der isogene Wildtyp (YPH500) wurden für die Einbettung nach Bauer *et al.* (2001) und Spurr (1969) auf YPD bis zu einer OD_{600} von 0,5-1,0 angezogen und in Kunstharz eingebettet. Es wurden Ultradünnschnitte der Proben hergestellt und diese elektronenmikroskopisch untersucht (Abb.3-2 A).

In den Wildtypzellen waren die Mitochondrien über die gesamte Zelle verteilt (Abb.3-2 A) und zeigten Cristae- und Doppelmembranstrukturen (Abb.3-2 A, rote Pfeile). Auch in der $\Delta mdm36$ -Mutante konnten analoge Cristae- und Doppelmembranstrukturen (Abb.3-2 A, rote Pfeile) festgestellt werden. Auffällig war hingegen die Verteilung der Mitochondrien in der $\Delta mdm36$ -Zelle. Die Mitochondrien lagen meist auf einer Seite der Zelle angehäuft vor (Abb.3-2 A) und waren vielfach miteinander verbunden (Abb.3-2 A, gelber Pfeil). Eine elektronenmikroskopische Quantifizierung ergab, dass die Mitochondrien im Wildtyp zu 99% wildtypisch (Tab.3-1), also über die gesamte Zelle, verteilt waren und in der $\Delta mdm36$ -Mutante zu 87% als Anhäufungen bzw. Aggregate (Tab.3-1) vorlagen. Die mitochondrialen Anhäufungen in der $\Delta mdm36$ -Mutante bestätigen den mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachteten mitochondrialen Phänotyp.

Um zu unterscheiden, ob die Mitochondrien in der $\Delta mdm36$ -Mutante tatsächlich netzähnlich und miteinander verbunden vorliegen, wurde ein 3D-Modell erstellt. Dazu wurden Serienschritte angefertigt, die aus jeweils 35 Schnitten mit einer Dicke von 70 nm bestanden. Die einzelnen Schnitte wurden anschließend mit Hilfe des Programmes IMOD 3.13.5 (Boulder Laboratory, USA; Kremer *et al.*, 1996) übereinander gelagert und davon ein 3D-Modell erstellt (Abb.3-2 B).

Bei Betrachtung des Wildtyp-3D-Modells ist zu erkennen, dass sich die Mitochondrien durch die ganze Zelle ziehen und lange, verzweigte Schläuche ausbilden, die charakteristisch für wildtypische Mitochondrien sind (Abb.3-2 B). Außerdem ist ersichtlich, dass die Mitochondrien keine vollständig zusammenhängende Einheit bilden (Abb.3-2 B). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Mitochondrien hoch dynamische Organellen sind, die ständigen Fusions- und Teilungsereignissen unterliegen. Das 3D-Modell der $\Delta mdm36$ -Mutante bestätigt und verdeutlicht die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen. Die Mitochondrien sind auf einer Seite der Zelle lokalisiert und bilden ein stark verzweigtes, miteinander verbundenes mitochondriales Netzwerk aus, das zu einem einzigen Organell fusioniert ist (Abb.3-2 B). Folglich scheint die mitochondriale Teilung blockiert zu sein, wie

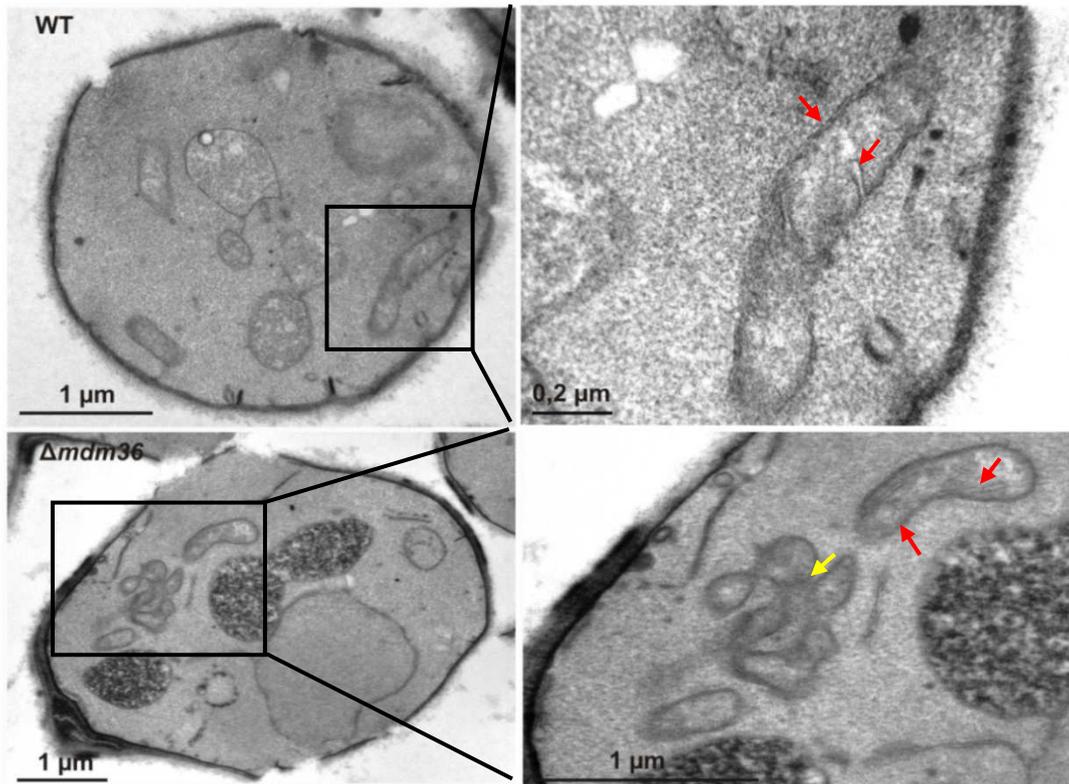
es der Fall in den Teilungsmutanten $\Delta dnm1$, $\Delta mdv1$ und $\Delta fis1$ ist. Der mitochondriale Phänotyp der $\Delta mdm36$ -Mutante ist also vermutlich das Resultat einer gestörten Teilung der Mitochondrien.

Tab.3-1: Elektronenmikroskopische Auswertung der mitochondrialen Phänotypen der $\Delta mdm36$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp (in Zusammenarbeit mit Bastian Seubert, Institut für Zellbiologie, Universität Bayreuth, Diplomarbeit 2008, erstellt). Hefezellen wurden auf YPD-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,5-1,0 kultiviert und anschließend fixiert (Bauer *et al.*, 2001) und in Kunstharz eingebettet (Spurr, 1969). Ultradünnschnitte wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Bei der Auszählung wurde nur zwischen wildtypischen (in der gesamten Zelle verteilt) und aggregierten (Anhäufungen) Mitochondrien unterschieden. Ultradünnschnitte, in denen keine Mitochondrien zu sehen waren, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Es wurden jeweils > 140 Zellen ausgezählt.

Stamm	mitochondrialer Phänotyp (Anteil der Zellen in %)	
	wildtypisch	Aggregate
WT	99	1
$\Delta mdm36$	13	87

Abb.3-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und 3D-Modell von Wildtyp- und $\Delta mdm36$ -Zellen (in Zusammenarbeit mit Bastian Seubert, Institut für Zellbiologie, Universität Bayreuth, Diplomarbeit 2008, erstellt) (siehe S.50). Hefezellen wurden bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,5-1,0 in YPD-Medium angezogen und anschließend fixiert (Bauer *et al.*, 2001) und in Kunstharz eingebettet (Spurr, 1969). **(A)** Ultradünnschnitte wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Das linke Bild stellt jeweils eine Übersicht der Zelle dar, das rechte Bild jeweils eine Vergrößerung der in der Zelle enthaltenen Mitochondrien. Der Wildtyp weist gleichmäßig in der Zelle verteilte Mitochondrien mit Cristae- und Doppelmembranstrukturen auf (rote Pfeile). In der $\Delta mdm36$ -Mutante sind die Mitochondrien auf einer Seite der Zelle lokalisiert und bilden Aggregate, die miteinander verbunden sind (gelber Pfeil). Die Ultrastruktur der Mitochondrien (Cristae, Doppelmembran) weist keine Veränderungen in der Mutante auf (rote Pfeile). **(B)** 3D-Modell des Wildtyps (links) und der $\Delta mdm36$ -Mutante (rechts), das mit IMOD 3.13.5 (Boulder Laboratory, USA; Kremer *et al.*, 1996) durch Überlagerung von je 35 Serienschnitten à 70 nm erstellt worden ist. Die Mitochondrien sind golden gefärbt, die Zellwand weiß. Das 3D-Modell ist jeweils aus verschiedenen Perspektiven gezeigt. Der Größenbalken stellt 5 μm dar. Im Vergleich zum Wildtyp weist die $\Delta mdm36$ -Mutante netzähnliche Mitochondrien auf, die dem mitochondrialen Phänotyp von Teilungsmutanten ähneln.

A



B

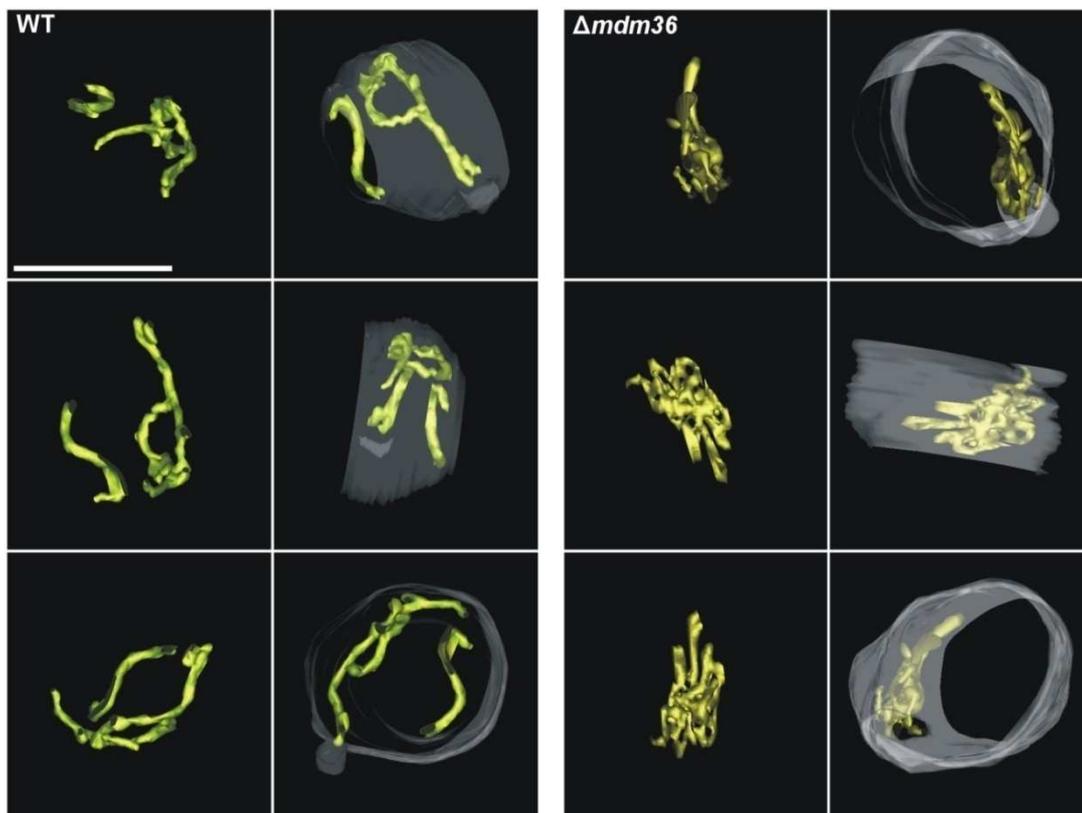


Abb.3-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und 3D-Modell von Wildtyp- und Δmdm36 -Zellen (in Zusammenarbeit mit Bastian Seubert, Institut für Zellbiologie, Universität Bayreuth, Diplomarbeit 2008, erstellt). Beschreibung siehe S. 49.

3.1.3 Der Verlust von Mdm36 hat keinen Einfluss auf die Vakuolen, das Endoplasmatische Retikulum oder auf das Aktinzytoskelett

Die Morphologie und Dynamik von Mitochondrien in *S. cerevisiae* ist abhängig von der korrekten Ausbildung des Aktinzytoskeletts (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1995). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der beobachtete mitochondriale Phänotyp der $\Delta m d m 3 6$ -Mutante auf ein defektes Aktinzytoskelett zurückzuführen ist oder die Deletion des *MDM36*-Gens einen pleiotropen Effekt auf andere Zellorganellen ausübt, wurden das filamentöse Aktin, das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die Vakuolen für die Fluoreszenzmikroskopie markiert. Zur Untersuchung der Vakuolen wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxy-DCFDA behandelt, der sich in das Lumen der Vakuolen einlagert. Die Morphologie des ER wurde mit pWP1055 transformierten Zellen, die ER-lokalisiertes GFP exprimieren, analysiert. Das Aktinzytoskelett wurde in pVT100U-mtGFP transformierten Hefestämmen mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht.

Sowohl im Wildtyp als auch in der $\Delta m d m 3 6$ -Mutante konnten 1-5 Vakuolen pro Zelle beobachtet werden (Abb.3-3 A), was nach Seeley *et al.* (2002) eine normale vakuoläre Verteilung darstellt. Im Wildtyp und in der Deletionsmutante waren das kortikale und das perinukleäre ER deutlich erkennbar und wiesen keine Veränderungen auf (Abb.3-3 B). Auch das Aktinzytoskelett mit seinen Aktinkabeln und kortikalen *patches* war in der Kontrolle und in der Mutante identisch (Abb.3-3 C). Die kortikalen *patches* befanden sich bei beiden Stämmen vorwiegend in der Tochterzelle, während sich die Aktinkabel durch die gesamte Zelle erstreckten. Die für Wildtyp- und $\Delta m d m 3 6$ -Zellen charakteristischen Mitochondrien schienen sich außerdem an das Aktinzytoskelett anzulagern, was einem Transport der Mitochondrien entlang des Aktinzytoskeletts entspricht.

Da der Verlust von Mdm36 weder eine Veränderung der Vakuolen, des ERs noch des Aktinzytoskeletts zur Folge hat, kann man davon ausgehen, dass es sich bei dem beobachteten Morphologiedefekt weder um einen pleiotropen noch um einen sekundären Effekt handelt. Somit hat Mdm36 einen spezifischen Einfluss auf die mitochondriale Verteilung und Morphologie.

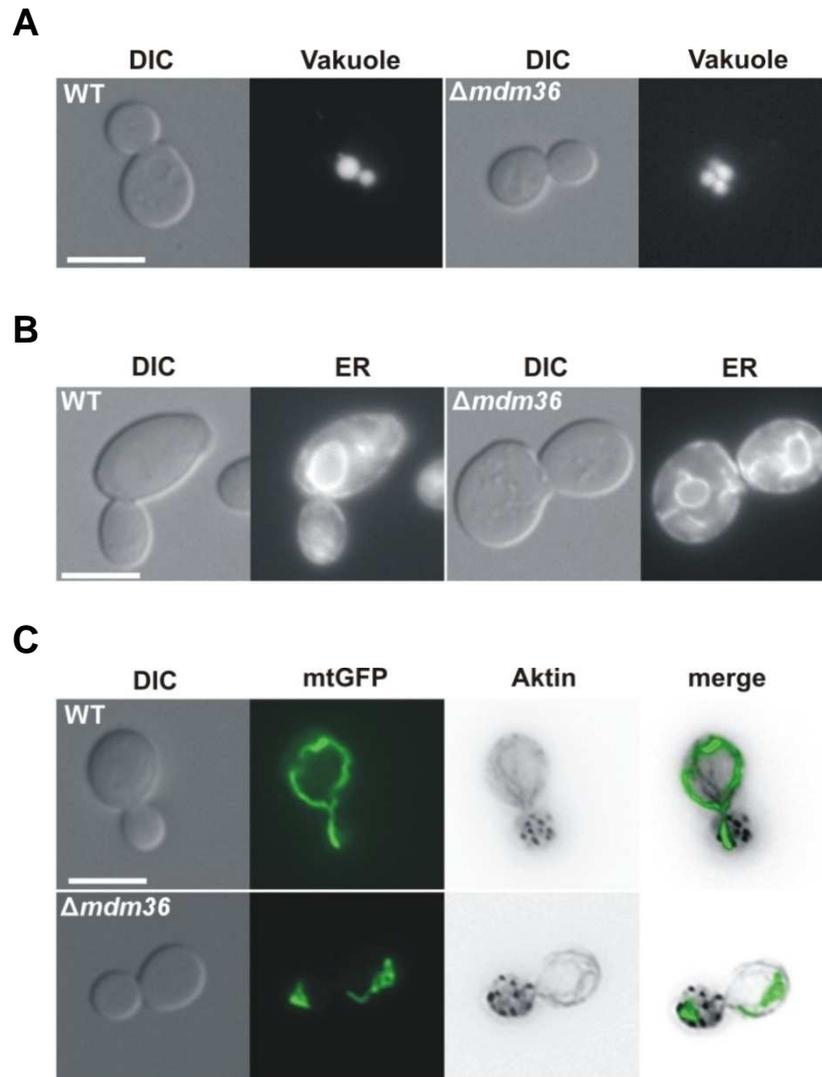


Abb.3-3: Mdm36 hat keinen Einfluss auf andere Zellstrukturen. Die Wildtyp- und die $\Delta mdm36$ -Zellen wurden bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium angezogen. Der Größenbalken stellt 5 μm dar. **(A)** Färbung der Vakuolen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxy-DCFDA. Dargestellt ist jeweils eine Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und eine Fluoreszenzaufnahme (Vakuole). **(B)** Die mit pWP1055 transformierten Zellen exprimieren ER-lokalisiertes GFP. Zu sehen ist jeweils eine Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und eine Fluoreszenzaufnahme (ER). **(C)** Mit pVT100U-mtGFP transformierte Zellen wurden mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Dargestellt ist jeweils eine Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC), eine mtGFP- und eine Aktin-Fluoreszenzaufnahme (invertierte Abbildung zur besseren Visualisierung von schwachen Aktinkabeln und kortikalen *patches*) sowie eine Überlagerung der mtGFP- und Aktinfluoreszenzaufnahmen (merge).

3.1.4 Einordnung von Mdm36 in die mitochondriale Morphogenese-maschinerie

Die Ausbildung eines mitochondrialen Netzwerkes ist abhängig von dem dynamischen Gleichgewicht zwischen Fusions- und Teilungsereignissen (Sesaki und Jensen, 1999; Shaw und Nunnari, 2002). Das Fehlen einer Fusions- bzw. Teilungskomponente verschiebt das Gleichgewicht in Richtung Teilung (fragmentierte Mitochondrien, Verlust von mitochondrialer DNA) bzw. Fusion (netzartige Mitochondrien). Wird hingegen die Fusions-

und Teilungsmaschinerie gleichzeitig blockiert, so bildet sich wieder ein wildtypisches mitochondriales Netzwerk aus (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Voraussetzung dafür ist aber, dass Fusion und Teilung auf gleicher Ebene gestört werden. Die zusätzliche Deletion von Teilungs- oder Fusionskomponenten in der $\Delta mdm36$ -Mutante sollte somit eine Zuordnung von Mdm36 zu einem der beiden Prozesse ermöglichen.

3.1.4.1 Untersuchung von Doppelmutanten, in denen *MDM36* und eine mitochondriale Fusionskomponente deletiert ist

Die zusätzliche Deletion von *MDM36* in $\Delta fzo1$ -Zellen führt zu einer teilweisen Rettung des mutanten $\Delta fzo1$ -Phänotyps

$\Delta mdm36/\Delta fzo1$ -Doppelmutanten wurden generiert, um zu untersuchen, ob die Deletion von *MDM36* die Fragmentierung der Mitochondrien und den Verlust der mitochondrialen DNA (mtDNA) in Zellen revertiert, denen die Fusionskomponente *Fzo1* fehlt. Da auch die Reihenfolge, in der die Gene ausgeschaltet werden, eine große Rolle bei der Untersuchung spielt (Sesaki und Jensen, 1999), wurden Doppelmutanten, die durch zwei verschiedene Herangehensweisen erhalten wurden, analysiert. Zum einen wurde eine $\Delta mdm36/\Delta fzo1(1)$ -Doppelmutante erzeugt, in der die Gene durch Kreuzung der haploiden Einzelmutanten gleichzeitig deletiert wurden. Zum anderen wurde eine $\Delta mdm36/\Delta fzo1(2)$ -Mutante hergestellt, die *FZO1* zunächst plasmidal mit seinem wildtypischen Hefepromotor (pRS416-*FZO1*; Fritz *et al.*, 2001) exprimierte. Das Plasmid wurde anschließend über Selektion auf 5'-FOA-Platten entfernt. Auf diese Weise konnte der Funktionsverlust von Mdm36 und *Fzo1* entkoppelt werden.

Der isogene Wildtyp (YPH500) wies zu 96% verzweigte, tubuläre Mitochondrien auf (Abb.3-4 A und B). Die $\Delta mdm36$ -Mutante zeigte in 96% der Zellen ihre charakteristischen, auf einer Seite der Zelle lokalisierten, netzähnlichen Mitochondrien (Abb.3-4 A und B). Aufgrund des Fusionsdefektes entstand in der $\Delta fzo1$ -Mutante zu 87% ein fragmentierter mitochondrialer Phänotyp, wobei die Fragmente über die gesamte Zelle verteilt waren (Abb.3-4 A und B). In beiden Doppelmutanten ($\Delta mdm36/\Delta fzo1(1)$, $\Delta mdm36/\Delta fzo1(2)$) konnte zwar kein wildtypisches mitochondriales Netzwerk wiederhergestellt werden, dennoch trat im Vergleich zur $\Delta fzo1$ -Einzelmutante eine deutliche Veränderung der Lokalisation der Mitochondrienfragmente ein. Diese waren in der $\Delta mdm36/\Delta fzo1(1)$ -Mutante zu 90% und in der $\Delta mdm36/\Delta fzo1(2)$ -Mutante zu 96% einseitig lokalisiert (einseitig fragmentiert/aggregiert) (Abb.3-4 A und B). Die Reihenfolge der Deletion der Gene spielte bei der Verteilung und Morphologie der Mitochondrien keine Rolle. Bei dem beobachteten Phänotyp war nicht

genau feststellbar, ob die Mitochondrien miteinander verbunden waren oder fragmentiert vorlagen. Es könnte sich dabei um einen Übergangszustand der Teilung handeln, der aber nur mithilfe einer Elektronentomographie eindeutig nachweisbar wäre.

$\Delta fzol$ -Deletionsmutanten sind aufgrund ihres Verlustes der mtDNA nicht mehr in der Lage auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPG) zu wachsen. Die zusätzliche Deletion von *MDM36* führt zwar nicht zur Wiederherstellung des wildtypischen mitochondrialen Phänotyps, dennoch könnte sich die Deletion auf das Wachstumsverhalten auswirken. Aus diesem Grund wurde ein Tüpfeltest durchgeführt. Hierfür wurden die Stämme bis zu einer $OD_{600} \sim 1,0$ angezogen und anschließend jeweils eine Verdünnungsreihe (unverdünnt, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) auf YPD- und YPG-Platten getüpfelt. Die Platten wurden bei 30°C und bei 37°C (erschwerte Wachstumsbedingungen) inkubiert. Sowohl der Wildtyp als auch die $\Delta mdm36$ -Mutante wuchsen auf YPD- und auf YPG-Medium bei 30°C und bei 37°C bis zur letzten Verdünnungsstufe (Abb.3-4 C). Die $\Delta fzol$ -Mutante zeigte auf YPD bei 30°C und bei 37°C ein wildtypähnliches Wachstum, wohingegen auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle bei beiden Temperaturen kein Wachstum zu beobachten war (Abb.3-4 C). Die beiden Doppelmutanten ($\Delta mdm36/\Delta fzol(1)$, $\Delta mdm36/\Delta fzol(2)$) wiesen das gleiche Wachstumsverhalten wie die $\Delta fzol$ -Einzelmutante auf (Abb.3-4 C). Die respiratorische Kompetenz konnte demnach in den Doppelmutanten nicht wiederhergestellt werden.

Die respiratorische Inkompetenz kann auf einen Verlust der mtDNA [rho^0], wie es in der $\Delta fzol$ -Mutante der Fall ist, bzw. auf Anhäufungen von Schäden in der mtDNA [rho^-] zurückzuführen sein. Deswegen wurde durch Färbung der Zellen mit DAPI, einem Fluoreszenzfarbstoff für DNA, und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Analyse das Vorhandensein der mtDNA überprüft. Im isogenen Wildtyp konnten hierbei neben dem Zellkern (Abb.3-4 D, gelber Pfeil) in 99% der Zellen 10-15 mtDNA-Nukleotide (Abb.3-4 D, roter Pfeil; Tab.3-2) beobachtet werden. Auch die $\Delta mdm36$ -Mutante wies zu 97% eine wildtypische Anzahl an mtDNA-Nukleotiden auf (Abb.3-4 D; Tab.3-2). In der $\Delta fzol$ -Mutante und in den beiden Doppelmutanten wurde hingegen in keiner Zelle mtDNA nachgewiesen (Abb.3-4 D; Tab.3-2). Der respiratorische Defekt in diesen Stämmen ist damit auf einen Verlust der mtDNA zurückführbar.

Die Deletion von *MDM36* kann den mutanten Phänotyp der $\Delta fzol$ -Zellen nur teilweise retten. Dabei beschränkt sich die Reversion auf die mitochondriale Morphologie. Die beobachteten aggregierten Mitochondrienfragmente in begrenzten Bereichen der Doppelmutanten sprechen für stärker miteinander verbundene Mitochondrien im Vergleich zur $\Delta fzol$ -Mutante. Deshalb scheint *Mdm36* einen leichten antagonistischen Effekt gegenüber

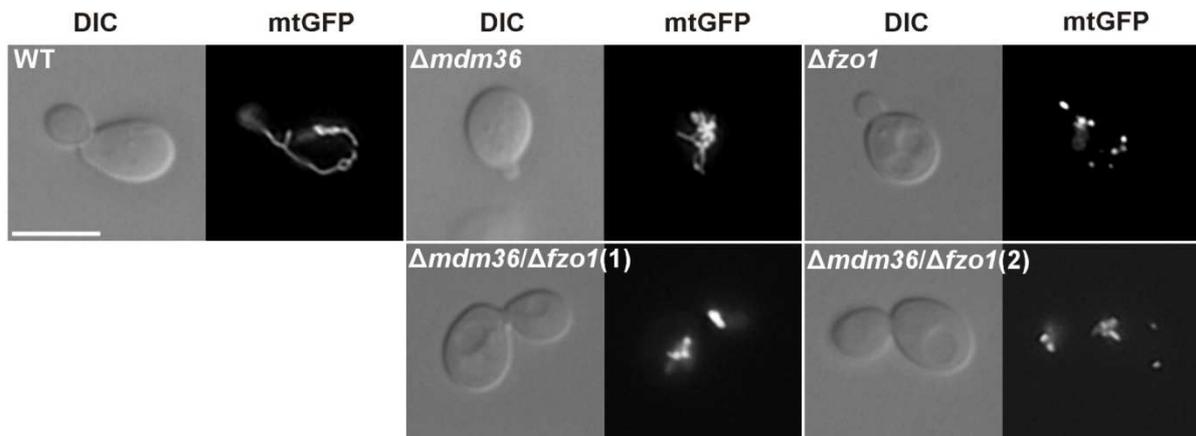
Fzo1 zu besitzen. Eine analoge einseitige Lokalisation der Mitochondrien konnte schon in der $\Delta mdm36$ -Mutante beobachtet werden. Denkbar wäre somit außerdem, dass die Deletion von *MDM36* zusätzlich Auswirkungen auf die Verteilung der Mitochondrien hat.

Tab.3-2: Auszählung der Zellen mit und ohne mtDNA. Die Hefestämme wurden über Nacht bei 30°C kultiviert, mit DAPI gefärbt und anschließend die Zellen mit und ohne mtDNA-Nukleotide quantifiziert. Angegeben sind Durchschnittswerte aus zwei Auszählungen (jeweils $n \geq 100$).

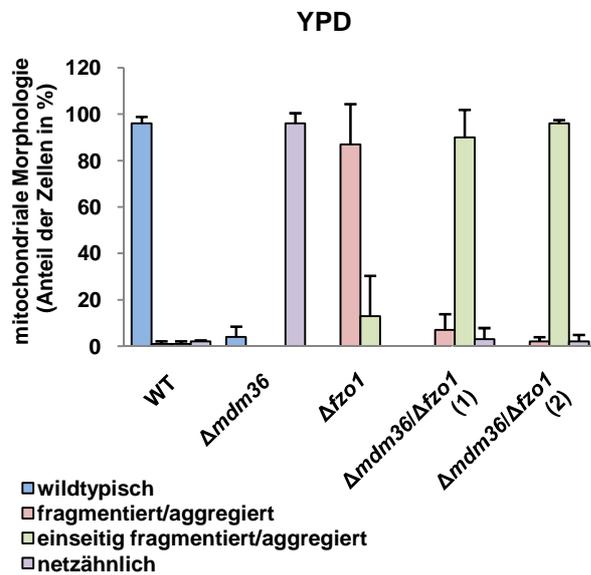
Stamm	Anteil der Zellen in %	
	mit mtDNA	ohne mtDNA
WT	99	1
$\Delta mdm36$	97	3
$\Delta fzo1$	0	100
$\Delta mdm36/\Delta fzo1(1)$	0	100
$\Delta mdm36/\Delta fzo1(2)$	0	100

Abb.3-4: Die zusätzliche Deletion von *MDM36* in $\Delta fzo1$ -Zellen führt zu einer teilweisen Rettung des mutanten $\Delta fzo1$ -Phänotyps (siehe S. 56). (A) Die mit pVT100U-mtGFP transformierten Zellen wurden auf YPD-Medium bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und dann fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Jedes Bildpaar besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und aus einer Fluoreszenzaufnahme der Mitochondrien (mtGFP). Der Größenbalken entspricht 5 μm . (B) Quantifizierung der in (A) dargestellten Hefestämme mit Standardabweichung. In je drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils $n \geq 100$ Zellen ausgewertet. (C) Für den Tüpfeltest wurden die Stämme auf YPD-Medium bis zur einer $OD_{600} \sim 1,0$ bei 30°C angezogen. Es wurden serielle Verdünnungen auf YPD- und auf YPG-Platten getropft und bei 30°C und 37°C inkubiert. (D) Die Hefestämme wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und anschließend mit DAPI gefärbt. Sowohl das Kerngenom (gelber Pfeil) als auch die mtDNA-Nukleotide (roter Pfeil) können so fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Zu sehen ist jeweils eine Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und eine Fluoreszenzaufnahme (DAPI). Der Größenbalken beträgt 5 μm .

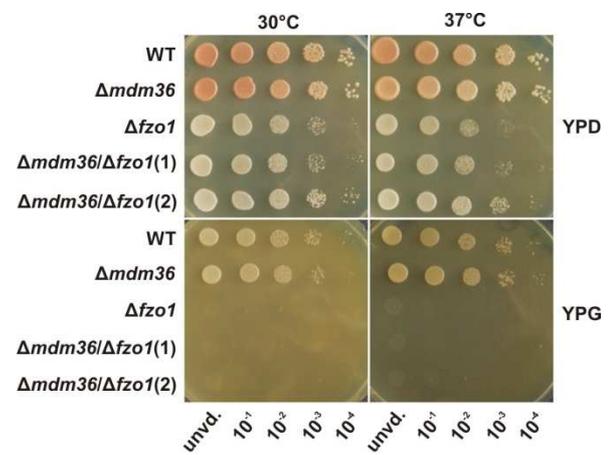
A



B



C



D

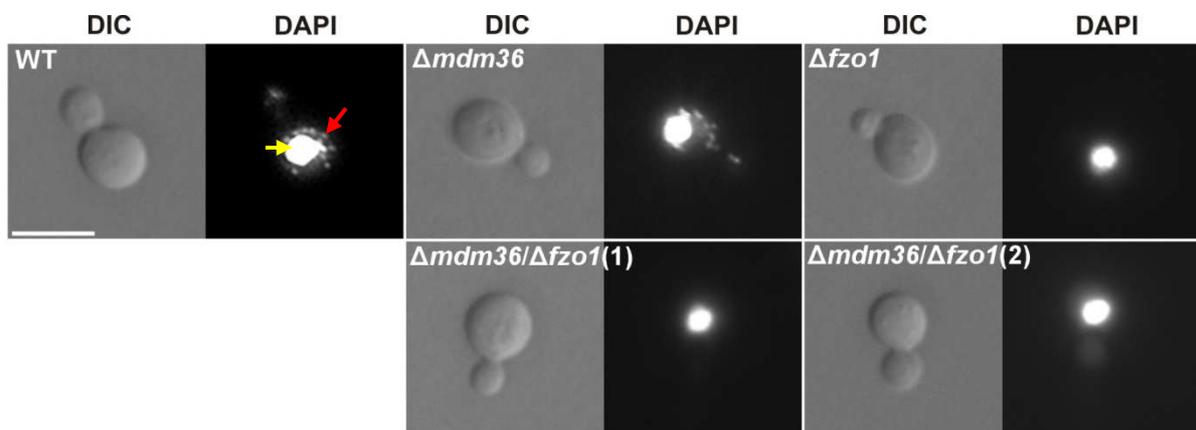


Abb.3-4: Die zusätzliche Deletion von *MDM36* in $\Delta fzo1$ -Zellen führt zu einer teilweisen Rettung des mutanten $\Delta fzo1$ -Phänotyps. Beschreibung siehe S.55.

Wiederherstellung der Vermischung des mitochondrialen Matrixinhaltes in der $\Delta mdm30$ -Mutante durch Deletion von *MDM36*

Vorhergehende Studien zeigten, dass für die vollständige Rettung des mitochondrialen $\Delta fzo1$ -Phänotyps vermutlich eine komplette Blockierung der mitochondrialen Teilung nötig ist (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Die beobachtete aggregierte Mitochondrienfragmentierung in der $\Delta mdm36/\Delta fzo1$ -Doppelmutante legt nahe, dass $\Delta mdm36$ -Mutanten noch eine restliche Teilungsaktivität besitzen, es sich bei Mdm36 also um eine untergeordnete Teilungskomponente handelt. Deswegen würde eine mögliche Funktion von Mdm36 in der mitochondrialen Teilung vermutlich deutlicher werden, wenn der antagonistische Prozess, die Fusion, nur teilweise blockiert wäre. Mdm30 ist eine regulatorische Komponente der mitochondrialen Fusion, die den Abbau von Fzo1 induziert (Fritz *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2008). $\Delta mdm30$ -Zellen besitzen fragmentierte Mitochondrien, sind aber in der Lage ihre mtDNA zu erhalten. Da es in $\Delta mdm30$ -Mutanten zur Ausbildung von inaktiven Fzo1-Aggregaten kommt, sind die Mitochondrien nicht mehr bzw. kaum noch fusionsfähig (Fritz *et al.*, 2003). Die gleichzeitige Deletion des kodierenden Gens der Teilungskomponente Dnm1 hingegen ermöglicht die Fusion der Mitochondrien wieder (Fritz *et al.*, 2003), was durch die reduzierte, aber nicht komplett gestörte, Fusionsaktivität der $\Delta mdm30$ -Mutante erklärbar ist. Wenn das mitochondriale Netzwerk in beiden Paarungspartnern eine Einheit bildet, reicht ein einziges Fusionsereignis, damit der komplette Matrixinhalt in der Zygote vermischt wird. Hingegen müssen in Zellen, in denen die Teilungsmaschinerie intakt ist, für die vollständige Vermischung mehrere Fusionsereignisse stattfinden. Wenn Mdm36 eine Komponente der mitochondrialen Teilungsmaschinerie ist, dann sollte die Deletion von *MDM36* in der $\Delta mdm30$ -Mutante eine ähnliche Auswirkung haben wie die *DNM1*-Deletion. Zur Untersuchung der Mitochondrienfusion *in vivo* wurden haploide Zellen entgegengesetzten Paarungstyps mit unterschiedlich fluoreszierenden mitochondrialen Markern (pYX113-mtGFP, Westermann und Neupert, 2000; pRS416-GAL1+PrFoATP9-RFP, Mozdy *et al.*, 2000) gepaart (Nunnari *et al.*, 1997). In den Zygoten konnte dann anhand der Überlagerung der mtGFP- und mtRFP-Fluoreszenzen die Fusion der Mitochondrien überprüft werden. Es wurde dabei zwischen Fusion (vollständige Überlagerung der Fluoreszenzen), keiner Fusion (keine Überlagerung der Fluoreszenzen) und teilweiser Fusion (teilweise Überlagerung der Fluoreszenzen) unterschieden (Abb.3-5).

Wie zu erwarten war, konnte in dem Kreuzungsansatz des Wildtypstammes (BY4741 x BY4742) zu 100% eine Überlagerung der aus den Elternstämmen stammenden mitochondrialen Markern beobachtet werden, d.h. die Mitochondrien sind in der Lage zu

fusionieren und dadurch ihren Matrixinhalt zu vermischen (Abb.3-5, Tab.3-3). Die Paarung der $\Delta mdm36$ -Mutanten führte ebenfalls zu einer 100%igen Vermischung des Matrixinhaltes in den Zygoten (Abb.3-5, Tab.3-3). Analog zu Fritz *et al.* (2003) war in den $\Delta mdm30$ -Zygoten hingegen zu 69% keine und zu 25% nur eine teilweise Vermischung der mitochondrialen Fluoreszenzen zu detektieren (Abb.3-5, Tab.3-3). Eine komplette Überlagerung der Fluoreszenzen konnte nur in 6% der Zygoten beobachtet werden. Die zusätzliche Deletion von *DNM1* in der $\Delta mdm30$ -Mutante führte, wie von Fritz *et al.* (2003) bereits beschrieben, zu einer 100%igen Vermischung des Matrixinhaltes in den Zygoten (Abb.3-5, Tab.3-3). Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Kreuzung der $\Delta mdm36/\Delta mdm30$ -Mutanten. Auch hier konnte durch die Deletion von *MDM36* in der $\Delta mdm30$ -Mutante eine vollständige Vermischung des Matrixinhaltes in 86% der Zygoten wiederhergestellt werden. In 9% der Zygoten fand eine teilweise Überlagerung der Fluoreszenzen statt, während in nur 5% der $\Delta mdm36/\Delta mdm30$ -Zygoten keine Mitochondrienfusion stattfand (Abb.3-5, Tab.3-3).

Die mitochondriale Matrix liegt in $\Delta mdm36$ -Zellen vermutlich sehr stark miteinander verbunden vor, so dass die restliche Fusionsaktivität in Zellen, in denen zusätzlich *Mdm30* fehlt, ausreichend für eine effiziente Vermischung des mitochondrialen Matrixinhaltes ist. Infolgedessen ist das Protein *Mdm36* in dem der Fusionskomponente *Mdm30* entgegengesetzten Prozess beteiligt, wodurch seine mögliche Rolle in der mitochondrialen Teilung noch weiter untermauert wird.

Tab.3-3: Quantifizierung des *in vivo*-Fusionsnachweises. Es wurden jeweils zwischen 20 bis 60 Zygoten ausgewertet. Dabei wurde zwischen einer vollständigen (Fusion), einer teilweisen (teilweise Fusion) und keiner (keine Fusion) Überlagerung der mtRFP- und mtGFP-Fluoreszenzen unterschieden.

Stamm	Anteil der Zellen in %		
	Fusion	teilweise Fusion	keine Fusion
WT x WT	100	0	0
$\Delta mdm30$ x $\Delta mdm30$	6	25	69
$\Delta mdm36$ x $\Delta mdm36$	100	0	0
$\Delta dnm1/\Delta mdm30$ x $\Delta dnm1/\Delta mdm30$	100	0	0
$\Delta mdm36/\Delta mdm30$ x $\Delta mdm36/\Delta mdm30$	86	9	5

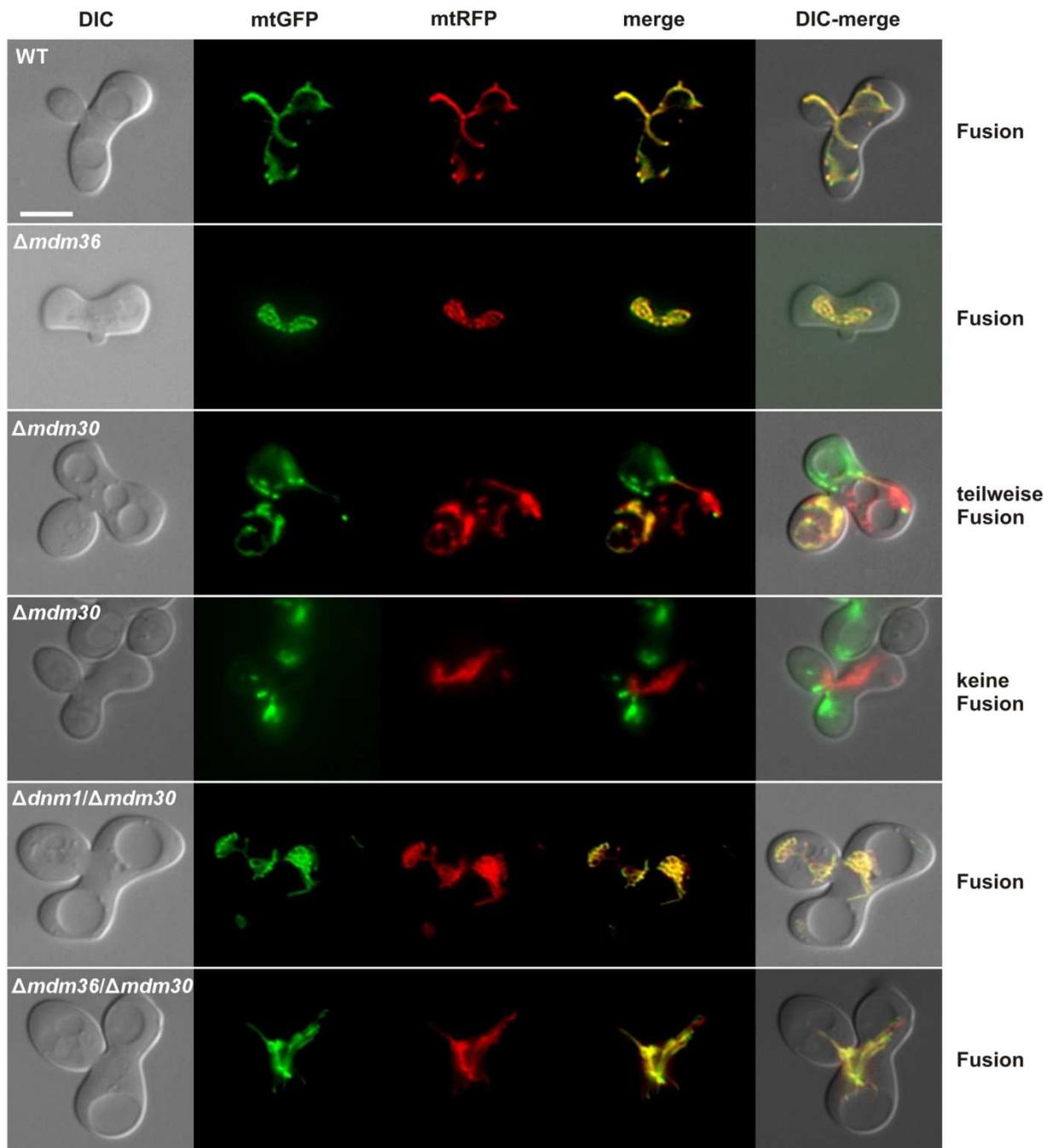


Abb.3-5: Wiederherstellung der Vermischung des mitochondrialen Matrixinhaltes in der $\Delta mdm30$ -Mutante durch Deletion von *MDM36*. Zur Untersuchung der mitochondrialen Fusionseffizienz in verschiedenen Hefestämmen wurde ein *in vivo* Fusionsnachweis durchgeführt. Dazu wurden Stämme entgegengesetzten Paarungstyps verwendet, die mitochondriales GFP (pYX113-mtGFP; Westermann und Neupert, 2000) bzw. mitochondriales RFP (pRS416-GAL1+PrFoATP9-RFP; Mozdy *et al.*, 2000) exprimieren. Nach der Paarung wurden die Zygoten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Jede Bildreihe besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahme (DIC), einer mtGFP- und einer mtRFP-Fluoreszenzaufnahme, der Überlagerung der mtGFP- und mtRFP-Fluoreszenzaufnahmen (merge) sowie der Überlagerung der DIC-Aufnahme mit der merge-Abbildung (DIC-merge). Der Größenbalken entspricht 5 μm . Es wurde zwischen Fusion, teilweiser Fusion und keiner Fusion unterschieden.

3.1.4.2 Untersuchung von Doppelmutanten, in denen *MDM36* und eine mitochondriale Teilungskomponente deletiert ist

Die *Δdnm1*-Mutation verhält sich epistatisch zur *Δmdm36*-Mutation

Der mitochondriale Phänotyp der *Δmdm36*-Mutante ähnelt stark dem der Teilungsmutante *Δdnm1*. Die Deletion von *DNM1* führt zu netzartigen Mitochondrien, die aufgrund der blockierten Teilung bei fortlaufender Fusion entstehen (Otsuga *et al.*, 1998). Dennoch weisen die mitochondrialen Phänotypen der beiden Mutanten feine Unterschiede auf. Während Zellen, in denen *MDM36* deletiert ist, auf eine Seite der Zelle lokalisierte, eher unorganisierte (netzähnliche) Mitochondrien besitzen (auf YPD: 92%; auf YPG: 94%; Abb.3-6 A-C), sind in der *Δdnm1*-Mutante organisierte Netze (fischernetzartig) zu beobachten (auf YPD: 90%; auf YPG: 89%; Abb.3-6 A-C). In der *Δmdm36*-Mutante sind hingegen in nur 10% der Zellen organisierte Netze vorhanden (Abb.3-6 A-C). Die Untersuchung einer *Δmdm36/Δdnm1*-Doppelmutante sollte Aufschluss darüber geben, ob *MDM36* genetisch mit dem Gen *DNM1*, das für eine mitochondriale Außenmembranteilungskomponente kodiert, interagiert. Dabei wurde deutlich, dass die Doppelmutante auf YPD-Medium zu 91% und auf YPG-Medium zu 89% Netze besaß (Abb.3-6 A-C), die sich von den Netzen der *dnm1*-Einzelmutante nicht unterschieden. Wildtypische Mitochondrien, elongierte, tubuläre Strukturen, wie sie im Wildtyp vorzufinden waren (auf YPD: 90%; auf YPG: 98%; Abb.3-6 A-C), konnten in fast keiner Zelle detektiert werden.

Da die Mitochondrienmorphologie der Doppelmutante identisch zu Mitochondrien in Zellen ist, in denen *DNM1* deletiert ist, verhält sich die *Δdnm1*-Mutation epistatisch zur *Δmdm36*-Mutation. Dies geht einher mit der Annahme, dass *Dnm1* eine essentielle Teilungskomponente der Mitochondrien darstellt, wohingegen *Mdm36* vermutlich eher eine untergeordnete Rolle einnimmt.

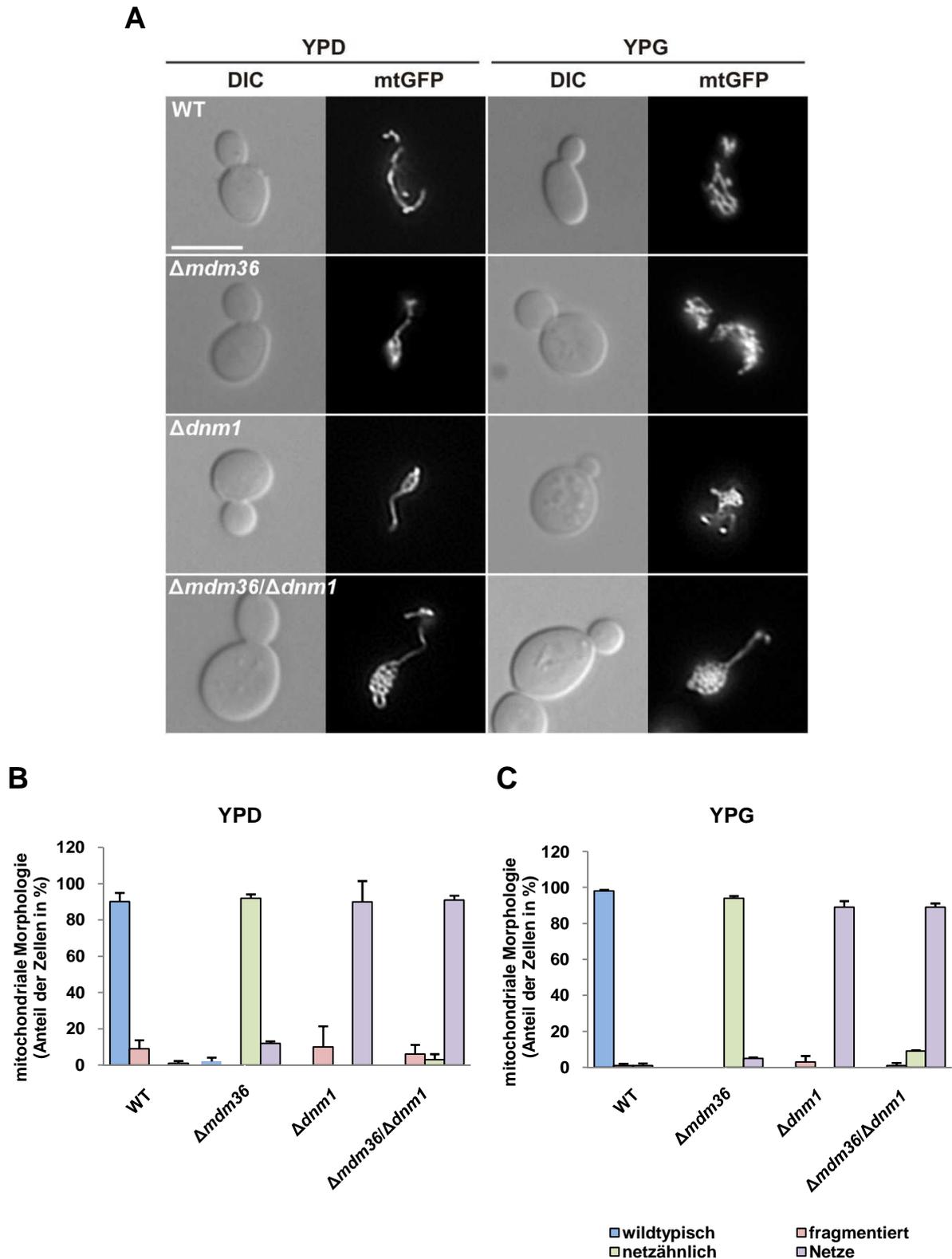


Abb.3-6: Die Δ *dnm1*-Mutation verhält sich epistatisch zur Δ *mdm36*-Mutation. Die mit pVT100U-*mtGFP* transformierten Hefestämme wurden bei 30°C auf YPD- und YPG-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. **(A)** Dargestellt ist jeweils eine Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und eine Fluoreszenzaufnahme (*mtGFP*). Der Größenbalken stellt 5 μ m dar. **(B und C)** Quantifizierung der in (A) dargestellten Hefestämme. Angegeben sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten pro Nährmedium (jeweils $n \geq 100$) mit Standardabweichungen.

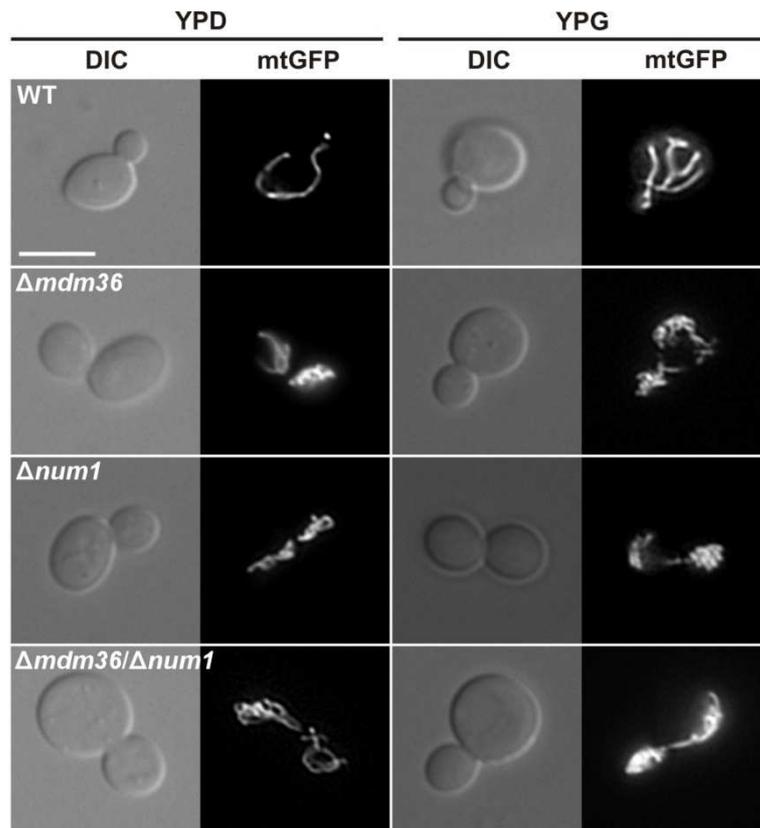
Die $\Delta mdm36/\Delta num1$ -Doppelmutante besitzt den gleichen mitochondrialen Phänotyp wie die beiden Einzelmutanten

Die mitochondriale Teilung in Hefezellen ist abhängig von dem Dynamin-verwandten Protein Dnm1. In einem Screen, in dem nach Dnm1-interagierenden Proteinen gesucht wurde, konnte Num1 als weitere Komponente der mitochondrialen Teilungs- und Vererbungsmaschinerie zugeordnet werden (Cervený *et al.*, 2007). Num1 kolokalisiert teilweise mit mitochondrial assemblierten Dnm1-Komplexen und in einigen Hefezellen, in denen *DNM1* und *NUM1* deletiert ist, weisen die Mutterzellen keine Mitochondrien auf. $\Delta num1$ -Mutanten besitzen ein stark verzweigtes Netzwerk an mitochondrialen Tubuli, das dem mitochondrialen Phänotyp von Zellen, in denen *DNM1* deletiert ist, sehr ähnlich ist (Dimmer *et al.*, 2002; Cervený *et al.*, 2007). Da die mitochondriale Morphologie in Zellen, in denen *MDM36* deletiert ist, ebenfalls eine starke Ähnlichkeit zu $\Delta dnm1$ -Mutanten besitzt, sollten die mitochondrialen Phänotypen der beiden Einzelmutanten, $\Delta mdm36$ und $\Delta num1$, und der Doppelmutante $\Delta mdm36/\Delta num1$ genauer analysiert werden.

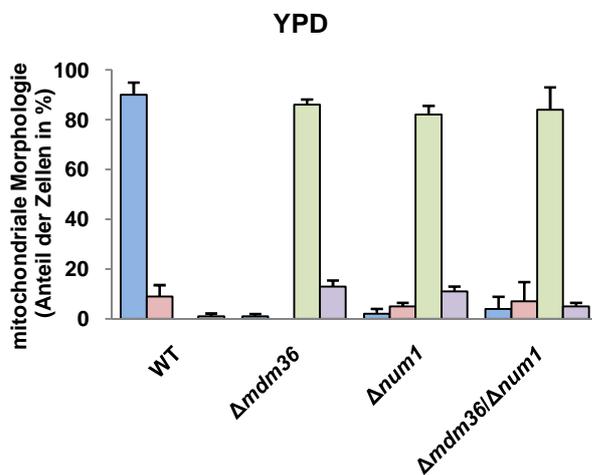
Dabei zeigte der Wildtyp (BY4742) auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle zu 90% und auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle zu 98% ein verzweigtes, tubuläres Netzwerk an Mitochondrien (Abb.3-7 A-C). Die beiden Einzelmutanten $\Delta mdm36$ und $\Delta num1$ wiesen stark verzweigte, netzähnliche mitochondriale Strukturen auf. In der $\Delta mdm36$ -Mutante waren davon auf YPD-Medium 86% und auf YPG-Medium 93% zu beobachten (Abb.3-7 A-C) und in der *num1*-Deletionsmutante auf YPD-Medium 82% und auf YPG-Medium 86% (Abb.3-7 A-C). Die mitochondrialen Phänotypen beider Einzelmutanten waren dabei so gut wie identisch. Auch die Doppelmutante $\Delta mdm36/\Delta num1$ war vom mitochondrialen Phänotyp nicht unterscheidbar von den beiden Einzelmutanten. Die netzähnlichen Mitochondrien beliefen sich bei Kultivierung auf YPD-Medium auf 84% und bei Wachstum auf YPG-Medium auf 90% (Abb.3-7 A-C).

Die fast identischen Mitochondrienmorphologien der Einzel- und Doppelmutanten weisen darauf hin, dass Mdm36 und Num1 eine ähnliche Funktion in der mitochondrialen Morphogenese einnehmen. Da $\Delta mdm36$ - und $\Delta num1$ -Mutanten wiederum einen ähnlichen mitochondrialen Phänotyp wie $\Delta dnm1$ -Zellen aufweisen und durch Cervený *et al.* (2007) für Num1 bereits eine Interaktion mit Dnm1 und eine Funktion in der mitochondrialen Teilung nachgewiesen wurde, scheint Mdm36 tatsächlich Teil dieses Prozesses zu sein.

A



B



C

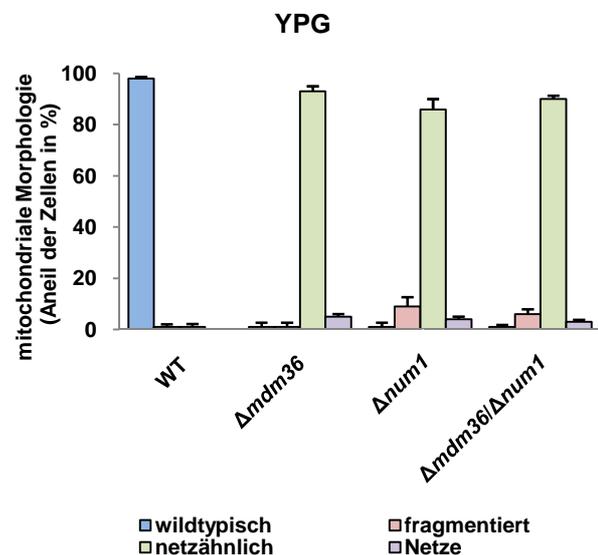


Abb.3-7: Die $\Delta m36/\Delta num1$ -Doppelmutante besitzt den gleichen mitochondrialen Phänotyp wie die beiden Einzelmutanten. Die mtGFP exprimierenden Hefestämme wurden auf YPD- und YPG-Medium bei 30°C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. **(A)** Dargestellt sind jeweils eine Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und eine Fluoreszenzaufnahme (mtGFP). Der Größenbalken entspricht 5 μ m. **(B und C)** Auszählung der mitochondrialen Morphologie auf fermentierbarer und nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Angegeben sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils $n \geq 100$) mit Standardabweichungen.

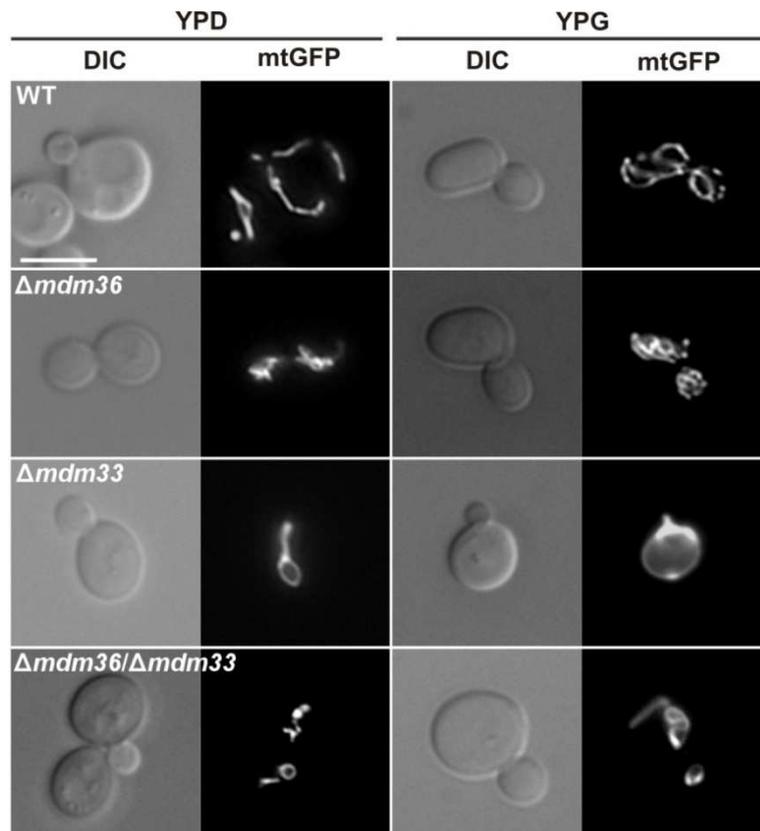
Die $\Delta mdm36/\Delta mdm33$ -Mutante besitzt einen intermediären mitochondrialen Phänotyp

Mdm33 ist die einzige bekannte Komponente, die vermutlich für die mitochondriale Innenmembranteilung verantwortlich ist (Messerschmitt *et al.*, 2003). Die Deletion von Mdm33 führt zu einem einzigartigen mitochondrialen Phänotyp bestehend aus ring- bzw. lassoförmigen Organellen (Messerschmitt *et al.*, 2003). Da Mdm36 eine mögliche mitochondriale Teilungskomponente der Außenmembran darstellt, könnte eine genetische Interaktion zwischen Mdm36 und Mdm33 vorliegen. Doppeldeletionsstudien zeigten bereits, dass sich $\Delta mdm33$ epistatisch zur Außenmembranteilungsmutante $\Delta fis1$ verhält. Folglich ist Mdm33 notwendig für die Ausbildung der netzartigen Mitochondrien in $\Delta fis1$ -Zellen (Messerschmitt *et al.*, 2003). Mittels Fluoreszenzmikroskopie sollte nun ermittelt werden, ob die zusätzliche Deletion von *MDM36* in der $\Delta mdm33$ -Mutante ähnliche epistatische Beziehungen hervorruft.

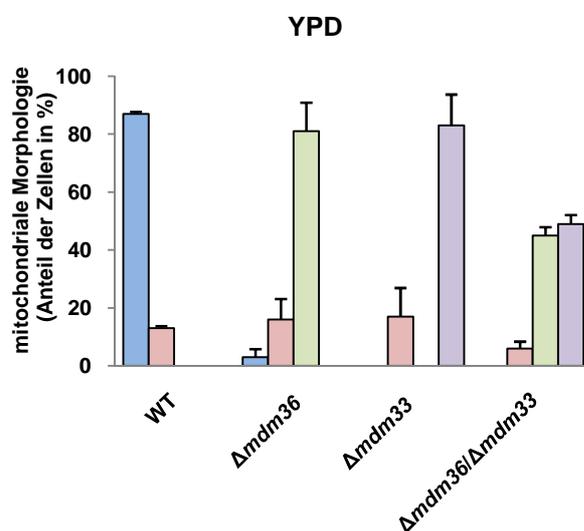
Bei keiner der betrachteten Kulturen konnte dabei das im Wildtyp (YPH500) vorgefundene tubuläre mitochondriale Netzwerk, das sich über die gesamte Zelle erstreckte (auf YPD-Medium: 87%; auf YPG-Medium: 100%; Abb.3-8 A-C), in mehr als 3% der Zellen beobachtet werden. In der $\Delta mdm36$ -Mutante waren auf YPD-Medium zu 81% und auf YPG-Medium zu 100% die für die Deletionsmutante typischen netzähnlichen Mitochondrien zu sehen (Abb.3-8 A-C). In der $\Delta mdm33$ -Mutante dominierten die von Messerschmitt *et al.* (2003) beschriebenen lasso- und ringähnlichen Mitochondrien mit je 83% auf YPD- sowie auf YPG-Medium (Abb.3-8 A-C). Der einzige Unterschied auf nichtfermentierbarer Kohlenstoffquelle bestand darin, dass die ring- und lassoähnlichen Mitochondrien größer waren, was auf den Energiebedarf zurückzuführen ist. Die Doppelmutante $\Delta mdm33/\Delta mdm36$ besaß hingegen einen intermediären mitochondrialen Phänotyp, der sich auf glukosehaltigem Medium aus 45% netz- und 49% ringähnlichen Mitochondrien und auf glyzerinhaltigem Medium aus 63% netz- und 35% ringähnlichen mitochondrialen Strukturen zusammensetzte (Abb.3-8 A-C).

Im Gegensatz zur epistatischen Beziehung von $\Delta mdm33$ zu $\Delta fis1$ (Messerschmitt *et al.*, 2003) verhält sich $\Delta mdm33$ nicht epistatisch zu $\Delta mdm36$. Im Gegenteil, beide Proteine scheinen gleichermaßen die mitochondriale Morphologie zu bestimmen, wodurch der intermediäre Phänotyp der Mitochondrien in der Doppelmutante entsteht.

A



B



C

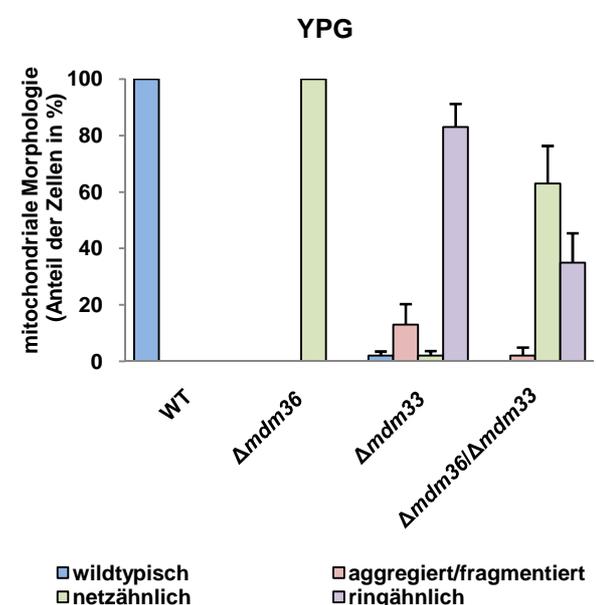


Abb.3-8: Die $\Delta mdm36/\Delta mdm33$ -Mutante besitzt einen intermediären mitochondrialen Phänotyp. Die mtGFP-exprimierenden Hefestämme wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 30°C inkubiert und danach fluoreszenzmikroskopisch analysiert. **(A)** Jedes Bildpaar besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und eine Fluoreszenzaufnahme (mtGFP). Der Größenbalken entspricht 5 μ m. **(B und C)** Auswertung der mitochondrialen Phänotypen der verschiedenen Hefestämme auf YPD- und YPG-Medium. Abgebildet sind Durchschnittswerte aus vier bis fünf unabhängigen Experimenten (jeweils $n \geq 100$) mit Standardabweichungen.

3.1.5 In der $\Delta mdm36$ -Mutante ist die Fragmentierung der Mitochondrien nach Depolymerisation des Aktinzytoskeletts gestört

Die Behandlung von Hefezellen mit dem Toxin Latrunculin A (LatA) führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation und letztendlich zum Auflösen von Aktinfilamenten (Ayscough *et al.*, 1997). Boldogh *et al.* (1998b) zeigten, dass Hefezellen, die mit Latrunculin A behandelt worden waren, nach kurzer Zeit bereits fragmentierte mitochondriale Strukturen aufweisen. Diese Fragmentierung ist von der Teilungsmaschinerie abhängig, da sie in $\Delta dnm1$ - und $\Delta mdv1$ -Mutanten blockiert ist (Jensen *et al.*, 2000; Cervený *et al.*, 2001). Um einen direkteren Beweis zu erhalten, dass Mdm36 eine Rolle in der mitochondrialen Teilung einnimmt, wurde die mitochondriale Fragmentierung nach Depolymerisation des Aktinzytoskeletts überprüft. Der isogene Wildtyp (BY4742), verschiedene Teilungsmutanten ($\Delta dnm1$, $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$, $\Delta mdm33$, $\Delta num1$) sowie die $\Delta mdm36$ -Mutante, die jeweils mtGFP exprimierten, wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen und anschließend entweder mit LatA oder als Kontrolle mit DMSO (Lösungsmittel von LatA) behandelt. Als weitere Kontrolle diente die Untersuchung einer jeweils vor der Behandlung mit LatA bzw. DMSO entnommenen Probe. Die Depolymerisation des Aktinzytoskeletts wurde mittels Färbung mit Rhodamin-Phalloidin kontrolliert. Die Zellen wurden nach der Färbung fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

In Wildtyp-Zellen war jeweils vor und nach der Behandlung für 60 min mit DMSO zu 88-89% ein tubuläres, mitochondriales Netzwerk zu erkennen (Abb.3-9, Abb.3-10 A und B). Das Aktinzytoskelett erschien normal. Es waren deutlich die Aktinkabel und kortikalen *patches* zu sehen (Abb.3-9). Die Inkubation des Wildtyps für 60 min mit Latrunculin A führte zu den von Boldogh *et al.* (1998b) beschriebenen fragmentierten mitochondrialen Strukturen (89%), die von kleinen ringförmigen bis hin zu kleinen vernetzten Mitochondrien reichten, wobei das Aktinzytoskelett vollkommen zerstört war (Abb.3-9, Abb.3-10 C). In den Teilungsmutanten der mitochondrialen Außenmembran $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ waren vor und nach der Kultivierung für 60 min mit DMSO zu 88-96% hauptsächlich Mitochondrien mit der charakteristischen Netz-Struktur zu beobachten (Abb.3-9, Abb.3-10 A und B). Das mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemachte Aktinzytoskelett zeigte auch hier keine Auffälligkeiten. Die 60-minütige Inkubation der Mutanten mit Latrunculin A hatte keine Auswirkungen auf den mitochondrialen Phänotyp trotz fehlendem Aktinzytoskelett. Die Mitochondrien lagen zu über 90% als Netze vor, die über die gesamte Zelle ausgebreitet waren (Abb.3-9, Abb.3-10 C). Es fand somit keine Fragmentierung der Mitochondrien statt. Diese Beobachtung konnte auch in den beiden Mutanten $\Delta mdm36$ und $\Delta num1$ gemacht

werden. Netzhähnliche Mitochondrien waren hier neben den ~13-20% Netzen sowohl vor und als auch nach der Behandlung mit Latrunculin A zu 78-87% vorherrschend (Abb.3-9, Abb.3-10 A-C). Cervený *et al.* (2007) hingegen konnten in der $\Delta num1$ -Mutante eine teilweise Fragmentierung der Mitochondrien beobachten, die sie auf eine restliche Teilungsaktivität zurückführten. In diesem Versuch wurde allerdings eine komplette Störung der mitochondrialen Fragmentierung detektiert. Die Teilungsmutante der mitochondrialen Innenmembran $\Delta mdm33$ besaß vor (85%) und nach 60-minütiger Inkubation mit DMSO (87%) die bekannten ring- und lassoähnlichen Mitochondrien, die auch nach Wirkung des Giftes zu 90% vorhanden waren (Abb.3-9, Abb.3-10 A-C).

Infolgedessen verhält sich die $\Delta mdm36$ -Mutante nach Zerstörung des Aktinzytoskeletts wie die mitochondrialen Teilungsmutanten $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$, $\Delta num1$ und $\Delta mdm33$. Es entstehen so gut wie keine fragmentierten mitochondrialen Strukturen. Demnach ist die mitochondriale Fragmentierung von Latrunculin A-behandelten Hefezellen auch Mdm36-abhängig. Mdm36 ist somit eine wichtige Komponente der mitochondrialen Teilungsmaschinerie.

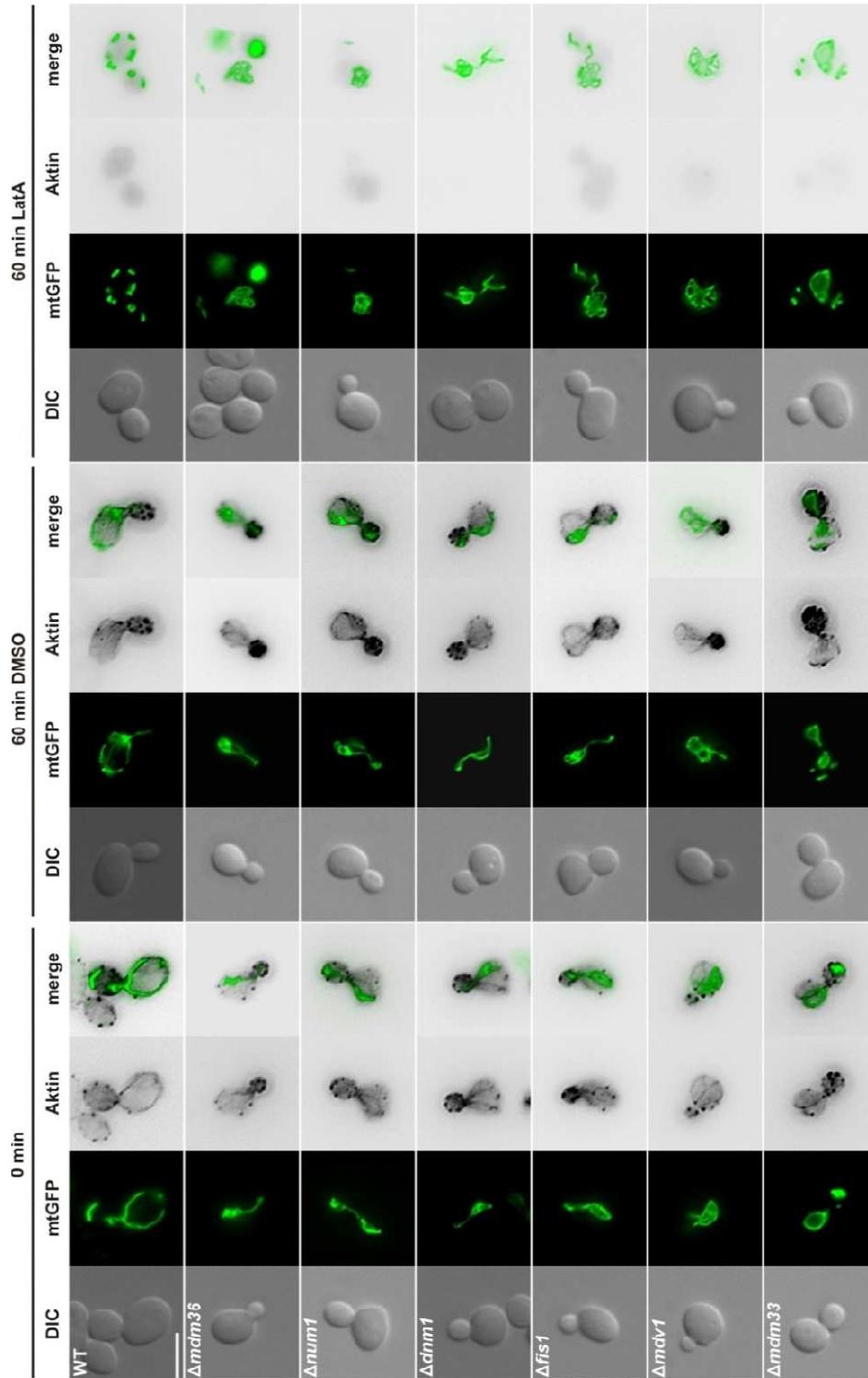


Abb.3-9: In der $\Delta mtdm36$ -Mutante ist die Fragmentierung der Mitochondrien nach Depolymerisation des Aktinzytoskeletts gestört. Die mit pVT100U-mtGFP transformierten Hefestämme wurden auf YPD-Medium bis zur OD_{600} von 0,2-0,5 kultiviert. Die Hefezellen wurden entweder zur Kontrolle 60 min mit DMSO (60 min DMSO) oder mit Latrunculin A (60 min LatA), was das Aktinzytoskelett zerstört, behandelt. Als Vergleich diente jeweils eine unbehandelte Probe (0 min). In allen Zellen wurde das Aktinzytoskelett mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt. Die Stämme wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dargestellt ist jeweils eine Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC), eine Fluoreszenzaufnahme, die die Mitochondrien (mtGFP) bzw. das Aktin (invertierte Abbildung zur besseren Visualisierung von schwachen Aktinkabeln und kortikalen patches) zeigt und eine Überlagerung von mtGFP und Aktin (merge). Der Größenbalken stellt 5 μm dar.

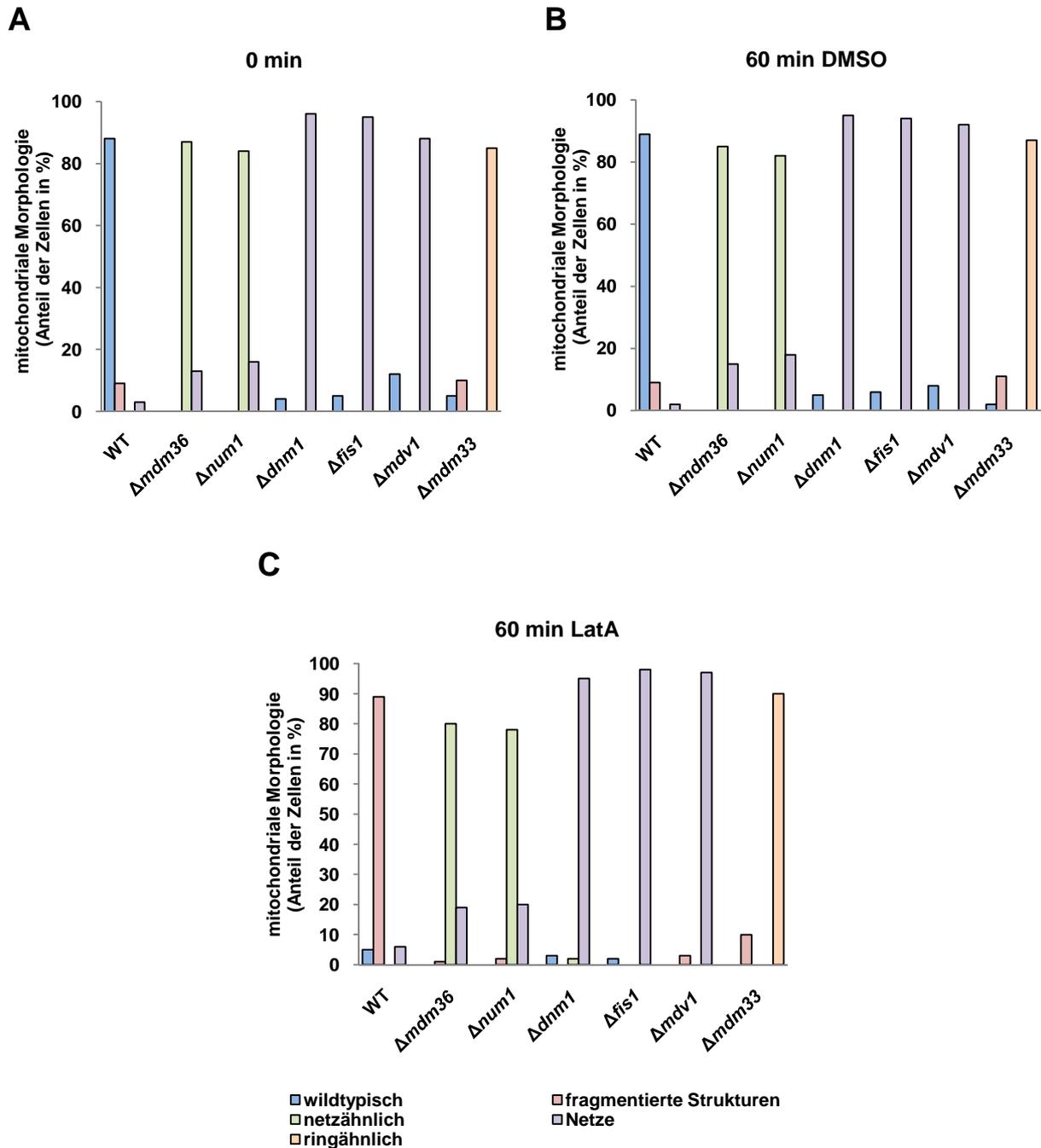


Abb.3-10: Auswertung der mit Latrunculin A behandelten Hefestämme. Die mtGFP exprimierenden Hefestämme wurden auf YPD-Medium bis zur OD_{600} von 0,2-0,5 angezogen. Die Hefezellen wurden entweder zur Kontrolle 60 min mit DMSO (60 min DMSO) oder zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts mit Latrunculin A (60 min LatA) behandelt. Als Vergleich diente jeweils eine unbehandelte Probe (0 min). Abgebildet sind Durchschnittswerte aus zwei unabhängigen Auszählungen (jeweils $n \geq 100$).

3.1.6 Lokalisation von Mdm36

Die so weit erhaltenen Daten belegen eine Funktion von Mdm36 im mitochondrialen Teilungsprozess. Daher sollte untersucht werden, ob Mdm36 direkt mit den Mitochondrien interagiert. Ein immunologischer Nachweis eines endogen exprimierten Mdm36-

Fusionsproteins (mit einem C-terminalen GFP- bzw. HA-Tag) schlug fehl (unveröffentlichte Daten). Außerdem konnte kein Antikörper gegen Mdm36 hergestellt werden, da mit verschiedensten Expressionssystemen keine Expression von Mdm36 möglich war (nicht gezeigte Daten). Da hingegen die radioaktive Markierung von Mdm36 mit [³⁵S]-Methionin durchführbar war, wurde in den folgenden *in vitro*-Experimenten radioaktiv markiertes Mdm36 verwendet.

3.1.6.1 Mdm36 wird nicht in die Mitochondrien importiert

Viele mitochondriale Proteine sind kernkodiert und müssen posttranslational in die Mitochondrien importiert werden. Für diesen Import ist eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz nötig. Mdm36 besitzt keine N-terminale Zielsteuerungssequenz. Allerdings können interne Zielsteuerungssequenzen mit den gängigen Programmen, wie z.B. MitoProt II (<http://ihg2.helmholtzmuenchen.de/ihg/mitoprot.html>), nicht nachgewiesen werden. Ein *in vitro* Importexperiment sollte deshalb klären, ob Mdm36 in die Mitochondrien importiert wird. Dazu wurde zunächst ein mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiertes Vorstufenprotein synthetisiert, welches anschließend mit isolierten Mitochondrien inkubiert wurde. Die Detektion des radioaktiv markierten Proteins erfolgte mittels Autoradiographie. Für die nähere Untersuchung wurden verschiedene Ansätze durchgeführt. Zum einen wurde nach der Importreaktion ein Proteaseverdau mit Proteinase K durchgeführt, wodurch nicht importierte Proteine, Vorstufenproteine sowie zytosolische Proteindomänen abgebaut werden und das durch die mitochondriale Membran geschützte, importierte Protein erhalten bleibt. Außerdem wurde die Importreaktion in An- und Abwesenheit von Valinomycin durchgeführt, einem Ionophor, das das Membranpotential der inneren mitochondrialen Membran und folglich den Proteinimport zum Erliegen bringt. Auch hier wurden in einem weiteren Ansatz nicht importierte Proteine, Vorstufenproteine und zytosolische Proteindomänen mit Proteinase K verdaut. Weiterhin wurden durch osmotische Schwellung Mitoplasten hergestellt, deren äußere Membran geöffnet ist. Durch zusätzliche Behandlung mit Proteinase K werden alle Proteine, die nicht in der Matrix bzw. in der Innenmembran lokalisiert sind, abgebaut. Als Kontrolle diente Su9-DHFR, eine Dihydrofolatreduktase (DHFR), an die die mitochondriale Präsequenz der Untereinheit 9 des F₀-Teils der mitochondrialen ATP-Synthase von *Neurospora crassa* fusioniert war (Pfanner *et al.*, 1987). Diese Präsequenz veranlasst den Import von DHFR in die mitochondriale Matrix. Die *in vitro* Importreaktion erfolgte mit Saccharose-Dichtegradienten-gereinigten Mitochondrien aus Wildtyp-Hefezellen

(BY4742) bei gleichzeitiger Zugabe beider radioaktiv markierter Vorstufenproteine, Su9-DHFR und Mdm36.

Die gekoppelte *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion ergab für die Kontrolle Su9-DHFR bei ca. 29 kDa sowie für Mdm36 bei ca. 65 kDa jeweils eine dominante Bande (Abb.3-11, Bahn 1). Die 29 kDa-große Bande von Su9-DHFR stellt dabei das Vorstufenprotein (V) dar, das bei Import in die Mitochondrien durch Abspaltung der Zielsteuerungssequenz prozessiert wird (Abb.3-11, Bahn 2, R = reifes Protein). Die Behandlung mit Proteinase K hatte im Fall der Kontrolle keine Auswirkungen. Su9-DHFR wird durch die mitochondriale Membran geschützt (Abb.3-11, Bahn 3). Der Einsatz von Valinomycin führte, wie zu erwarten war, zu einem blockierten Import von Su9-DHFR (Abb.3-11, Bahn 4). Sämtliches nicht importiertes Protein wurde durch den Proteaseverdau abgebaut (Abb.3-11, Bahn 5). Durch die Erzeugung von Mitoplasten wurde deutlich, dass Su9-DHFR in die Matrix importiert wird. Alle Proteine des Intermembranraumes werden durch die osmotische Schwellung der Mitochondrien freigesetzt. Da trotz Proteinase K-Verdau das Kontrollprotein nicht abgebaut wurde, wird es von der Innenmembran geschützt (Abb.3-11, Bahn 6 und 7). Mdm36 hingegen wurde nicht importiert, da nach der Importreaktion und der Proteinase-Behandlung keine Bande zu beobachten ist (Abb.3-11, Bahn 3). Valinomycin und die osmotische Schwellung der Mitochondrien hatten folglich auch keine Auswirkung auf den Import (Abb.3-11, Bahn 4-7). Auffällig war hingegen, dass bei den verschiedenen Importansätzen immer eine relativ schwache Bande detektierbar war (Abb.3-11, Bahn 2, 4 und 6), die nach Zugabe von Proteinase K verschwand (Abb.3-11, Bahn 3, 5 und 7). In Abb.3-11 Bahn 1, 2, 4, und 6 ist außerdem bei ~50 kDa eine Bande zu sehen, bei der es sich vermutlich um ein durch ein internes Startmethionin erzeugtes oder um ein vorzeitig abgebrochenes Translationsprodukt von Mdm36 handelt. Insgesamt verhielt sich dieses Produkt bei den verschiedenen Behandlungen wie das radioaktiv markierte Mdm36-Vollängenprotein. Sowohl das verkürzte Translationsprodukt als auch das Mdm36-Vollängenprotein werden folglich nicht posttranslational in die Mitochondrien importiert.

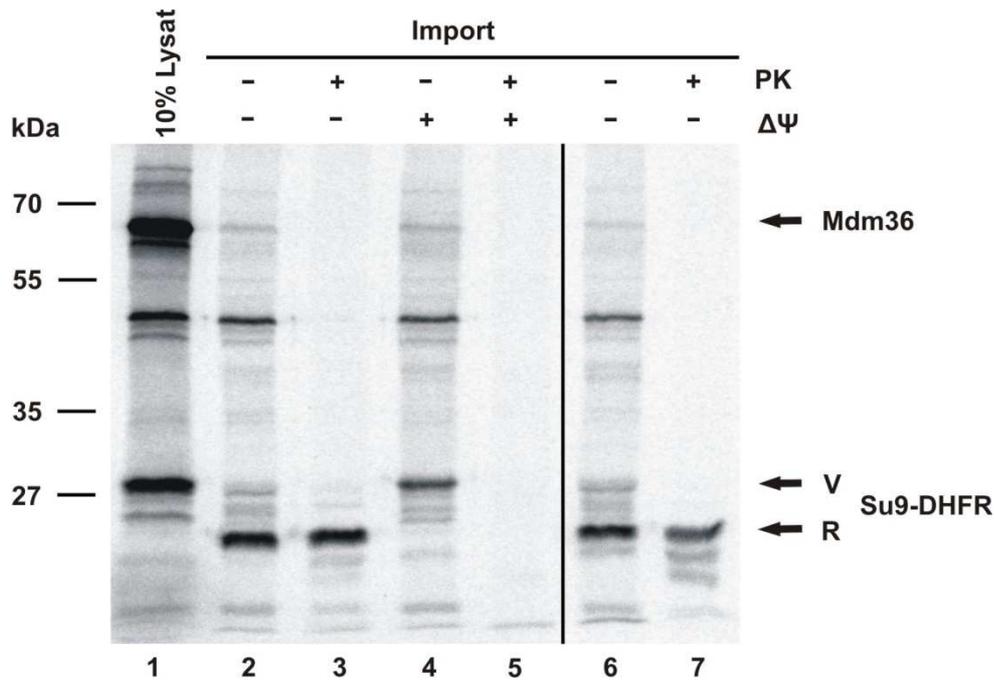


Abb.3-11: Mdm36 wird nicht in die Mitochondrien importiert. Zunächst wurden mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markierte Vorstufenproteine hergestellt. Für den Reaktionsansatz wurde das TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega (Mannheim) verwendet. Das radioaktive Vorstufenprotein wurde dann mit Saccharose-Dichtegradienten-gereinigten Mitochondrien des Wildtypstammes BY4742 inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulosemembran und Autoradiographie analysiert. Als Kontrolle diente Su9-DHFR, eine Dihydrofolatreduktase (DHFR), an die die mitochondriale Präsequenz der Untereinheit 9 des F₀-Teils der mitochondrialen ATP-Synthase von *Neurospora crassa* fusioniert war. Bahn 1: 10% des in der Importreaktion eingesetzten Vorstufenproteins, Bahn 2: Importreaktion, Bahn 3: nach der Importreaktion erfolgte eine Behandlung mit Proteinase K (PK), Bahn 4: die für die Importreaktion verwendeten Mitochondrien wurden vorher mit Valinomycin behandelt (ΔΨ), Bahn 5: vor dem Import wurden die Mitochondrien mit Valinomycin behandelt und nach der Importreaktion mit PK, Bahn 6: nach der Importreaktion wurden die Mitochondrien einer osmotischen Schwellung unterzogen, wodurch Mitoplasten entstehen (Öffnung der äußeren Membran), Bahn 7: nach der Importreaktion wurden Mitoplasten erzeugt, die zusätzlich mit PK behandelt wurden. V: Vorstufenprotein, R: reifes Protein.

3.1.6.2 Mdm36 liegt an den Mitochondrien assoziiert vor

Bei dem *in vitro* Importexperiment wurde einerseits deutlich, dass Mdm36 nicht in die Mitochondrien importiert wird. Andererseits konnte bei ~65 kDa eine Bande detektiert werden, bei der es sich entweder um ein Proteinaggregat, das durch Zentrifugation in der Mitochondrienfraktion sichtbar wird, oder um eine Assoziation von Mdm36 an den Mitochondrien handelt. Der Protease-Verdau würde in beiden Fällen, wie beobachtet, zum Abbau des Proteins führen. Ein Flotationssexperiment sollte zwischen den beiden Möglichkeiten unterscheiden. In diesem Versuch wurden Saccharose-Dichtegradienten-gereinigte Mitochondrien mit [³⁵S]-Methionin markiertem Mdm36 inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend an den Boden eines Saccharose-Dichtegradienten geladen. Bei der folgenden Ultrazentrifugation flotieren die Mitochondrien samt assoziiert vorliegenden Proteinen aufgrund ihrer geringeren Dichte in dem Gradienten nach oben (in

einen ihrer Dichte entsprechenden Bereich). Proteinaggregate würden wegen ihrer Schwere am Boden bleiben. Die Fraktion, die die Mitochondrien enthielt, wurde abgenommen und mittels SDS-PAGE, Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Autoradiographie analysiert. Da Mdm36 möglicherweise über Protein-Protein-Interaktionen an den Mitochondrien assoziiert vorliegt und außerdem sehr wahrscheinlich eine mitochondriale Teilungskomponente darstellt, wurden nicht nur isolierte Mitochondrien aus dem Wildtyp (BY4742) und der $\Delta m d m 3 6$ -Mutante verwendet, sondern auch aus den Teilungsmutanten $\Delta d n m 1$ und $\Delta n u m 1$. Zur Überprüfung, ob es sich bei der Assoziation von Mdm36 an die Mitochondrien um eine Protein-Protein-Interaktion handelt, wurden in einem weiteren Versuchsansatz die Mitochondrien vor Zugabe des radioaktiven Proteins mit Trypsin behandelt. Der Trypsin-Verdau wurde mit Antikörpern gegen Tom70 und Tom40 immunologisch nachgewiesen. Tom70 ist ein mitochondriales Außenmembranprotein und genauso wie Tom40 Teil des TOM-Komplexes (*translocase of the outer mitochondrial membrane*). Tom70 wird im Gegensatz zu Tom40 durch Trypsin komplett abgebaut. Bei Behandlung von Tom40 mit Trypsin entsteht ein zusätzliches kleineres Fragment, da Tom40 relativ geschützt vorliegt und nur teilweise N-terminal abgebaut wird.

Sowohl in dem Versuchsansatz mit den isolierten Mitochondrien aus dem Wildtyp als auch mit den Mitochondrien aus den Mutanten $\Delta m d m 3 6$, $\Delta d n m 1$ und $\Delta n u m 1$ ist bei ~65 kDa radioaktiv markiertes Mdm36 zu sehen (Abb.3-12 A, Bahn 2, 4 und 6; Abb.3-12 B, Bahn 2 und 4). In allen Reaktionsansätzen, in denen die Mitochondrien vor der Zugabe des radioaktiven Proteins mit Trypsin behandelt wurden, konnte diese 65 kDa-Bande nicht mehr detektiert werden (Abb.3-12 A, Bahn 3, 5 und 6; Abb.3-12 B, Bahn 3 und 5). Der Trypsin-Verdau hat in allen Ansätzen einwandfrei funktioniert. Tom70 (~70 kDa) wurde komplett verdaut, während mit dem Tom40-Antikörper das typische Bandenmuster (~40 kDa), also ein zusätzliches kleineres Tom40-Fragment, nachgewiesen werden konnte (Abb.3-12 A, Bahn 3, 5 und 7; Abb.3-12 B, Bahn 3 und 5).

Da mit diesem Versuchsaufbau sicher gestellt wurde, dass keine Proteinaggregate in der Mitochondrienfraktion vorhanden sind, kann man davon ausgehen, dass Mdm36 mit den Mitochondrien assoziiert vorliegt. Die mitochondriale Assoziation von Mdm36 ist dabei abhängig von mitochondrialen Proteinen, da nach dem Abbau von an den Oberflächen des Organells exponierten Proteinen keine Bindung von Mdm36 mehr stattfinden kann. Die Interaktion von Mdm36 erfolgt aber weder über bereits assoziiertes Mdm36 noch über Dnm1 und Num1, da in dem Ansatz mit den aus den Mutanten isolierten Mitochondrien, Mdm36 im gleichen Maße detektierbar ist wie in dem Reaktionsansatz mit isolierten wildtypischen

Mitochondrien. Mdm36 interagiert vermutlich mit den Mitochondrien in einer Rezeptor-abhängigen Art und Weise, wobei die Interaktion wohl eher schwach oder transient ausgeprägt ist.

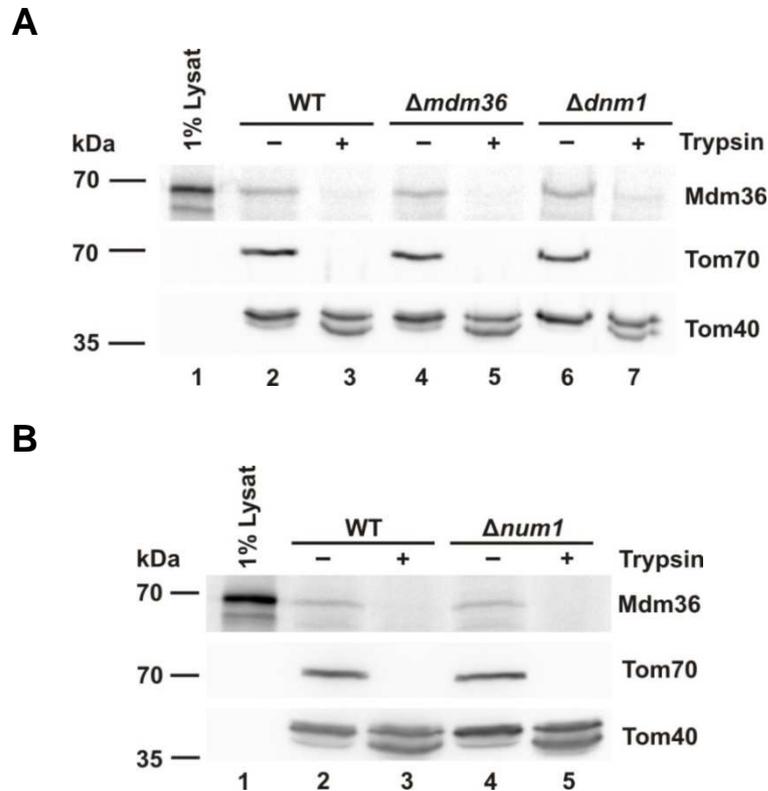


Abb.3-12: Flotationsexperiment: Mdm36 liegt an den Mitochondrien assoziiert vor. Saccharose-Dichtegradienten-gereinigte Mitochondrien wurden mit [³⁵S]-Methionin markiertem Mdm36 inkubiert und anschließend an den Boden eines Saccharose-Dichtegradienten geladen. In der nachfolgenden Ultrazentrifugation steigen die Mitochondrien sowie die mit den Mitochondrien assoziierten Proteine in einen ihrer Dichte entsprechenden Bereich des Gradienten auf. Die Mitochondrien-enhaltende Fraktion wurde abgenommen und mittels SDS-PAGE, Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Autoradiographie analysiert. Der Trypsin-Verdau wurde zusätzlich mit Antikörpern gegen Tom70 und Tom40 (Proteine der mitochondrialen Außenmembran) bestätigt. **(A)** Bahn 1: 1% des in dem Flotationsexperiment eingesetzten Vorstufenproteins, Bahn 2: Reaktionsansatz mit Zugabe von isolierten Mitochondrien aus dem Wildtyp, Bahn 3: Versuchsansatz mit Zugabe von Trypsin-behandelten isolierten Mitochondrien aus dem Wildtyp, Bahn 4: Ansatz mit isolierten Mitochondrien aus der $\Delta mdm36$ -Mutante, Bahn 5: Reaktionsansatz mit isolierten Mitochondrien aus der $\Delta mdm36$ -Mutante, die vor der Inkubation mit radioaktivem Mdm36 mit Trypsin behandelt wurden, Bahn 6: Ansatz mit Zugabe von isolierten Mitochondrien aus der $\Delta dnm1$ -Mutante, Bahn 7: die Mitochondrien der $\Delta dnm1$ -Mutante wurden vor der Zugabe von radioaktiv markiertem Mdm36 mit Trypsin inkubiert. **(B)** Bahn 1: 1% des in dem Flotationsexperiment eingesetzten Vorstufenproteins, Bahn 2: Reaktionsansatz mit Zugabe von isolierten Mitochondrien aus dem Wildtyp, Bahn 3: Versuchsansatz mit Zugabe von Trypsin-behandelten isolierten Mitochondrien aus dem Wildtyp, Bahn 4: Ansatz mit Zugabe von isolierten Mitochondrien aus der $\Delta num1$ -Mutante, Bahn 5: die Mitochondrien der $\Delta num1$ -Mutante wurden vor der Zugabe von radioaktiv markiertem Mdm36 mit Trypsin inkubiert

3.1.7 Die Anzahl an teilungsaktiven Dnm1-Komplexen ist in $\Delta mdm36$ -Zellen reduziert

Die Regulierung der mitochondrialen Dynamik in *S. cerevisiae* ist wichtig für den Erhalt der mitochondrialen Struktur und der Vererbung von Mitochondrien während des Wachstums, der Paarung und der Sporulation (Yaffe, 1999). Die GTPase Dnm1 ist besonders relevant für die regulierte Teilung der mitochondrialen Außenmembran (Otsuga *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Ein Teil des Dnm1-Proteins liegt zytosolisch vor, während der Rest über den Membrananker Fis1 und die Adapterproteine Mdv1/Caf4 an die Mitochondrien assoziiert. Dnm1-GFP ist an den Mitochondrien als punktförmige Cluster vorhanden, die fluoreszenzmikroskopisch sichtbar sind (Otsuga *et al.*, 1998). Die mitochondriale Dnm1-Assoziation ist sehr dynamisch und wird durch Fis1, Mdv1 und Caf4 beeinflusst. Die Assemblierung von Dnm1 an den Mitochondrien ist in Mutanten, in denen eines der für diese Proteine kodierenden Gene deletiert ist, reduziert (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Griffin *et al.*, 2005; Schauss *et al.*, 2006). Auch die erst kürzlich identifizierte Teilungskomponente Num1, deren Deletion zu einem fast identischen mitochondrialen Phänotyp führt wie in der $\Delta mdm36$ -Mutante, scheint einen leichten Einfluss auf die Dnm1-Assoziation zu haben (Cervený *et al.*, 2007). Um zu testen, ob sich die Deletion von *MDM36* und/oder von *NUM1* auf die Dnm1-Assemblierung bzw. -Assoziation auswirkt, wurden Stämme untersucht, die die entsprechende Deletion besaßen und zusätzlich Dnm1-GFP exprimierten ($\Delta mdm36$, $\Delta num1$, $\Delta mdm36/\Delta num1$). Als Vergleich diente der Dnm1-GFP exprimierende Wildtyp (BY4741) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stefan Jakobs, Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen). Alle Stämme besaßen zudem das Plasmid pVT100U-mtRFP (Mark Dürr, Universität Bayreuth, unveröffentlichte Daten), das RFP mit einer mitochondrialen Zielsteuerungssequenz exprimiert und somit die Mitochondrien stabil markiert. Zunächst wurde die Anzahl der Dnm1-GFP-Cluster pro μm^3 in den einzelnen Stämmen auf YPD- und YPG-Medium bestimmt. Dabei wurden zum einen die insgesamt in den Hefestämmen vorkommenden Dnm1-GFP-Cluster pro μm^3 und zum anderen die an den Mitochondrien assoziierten und die im Zytosol vorliegenden Dnm1-GFP-Cluster pro μm^3 dokumentiert. Damit alle Dnm1-GFP-Cluster und mitochondrialen Strukturen erfasst werden konnten, wurden konfokale Aufnahmen durch begrenzte Zellabschnitte hindurch mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop erstellt. Für die konfokale Mikroskopie wurden die Hefestämme bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und danach mit Formaldehyd fixiert.

Die mitochondriale Morphologie auf YPD- und auf YPG-Medium verhielt sich dem Wildtyp bzw. den Mutanten entsprechend. Der Wildtyp zeigte ein tubuläres Netzwerk an Mitochondrien und die $\Delta mdm36$ -, $\Delta num1$ - und $\Delta mdm36/\Delta num1$ -Mutante den schon beschriebenen stark verzweigten, netzähnlichen mitochondrialen Phänotyp (Abb.3-13). Somit hatte weder die Fixierung noch die Dnm1-GFP Expression eine Auswirkung auf die mitochondriale Struktur. Die Anzahl der Dnm1-GFP-Cluster pro μm^3 war im Wildtyp auf YPD-Medium mit $\sim 0,15$ leicht erhöht im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten mit $\sim 0,13$ und der Doppelmutante mit $\sim 0,11$ (Abb.3-13, Abb.3-14 A). Auf YPG-Medium lag die Anzahl der Dnm1-GFP-Cluster pro μm^3 im Wildtyp mit $\sim 0,32$ ebenfalls höher im Vergleich zu den Mutanten mit $\sim 0,21$ - $0,22$ (Abb.3-13, Abb.3-14 B). Insgesamt war die Anzahl der Dnm1-GFP-Punkte in allen Stämmen auf glukosehaltigem Medium niedriger als auf glyzerinhaltigem Medium. Da die Zellen auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle darauf angewiesen sind, ihre Energie über die oxidative Phosphorylierung zu erzeugen, kommt es zu einer erhöhten Mitochondrienmasse, was wiederum zu einer erhöhten Anzahl an Dnm1-GFP-Clustern führt. Unabhängig vom Nährmedium lagen die Dnm1-GFP-Punkte hauptsächlich an den Mitochondrien assoziiert vor (Abb.3-13, Abb.3-14 A und B). Nur vereinzelt waren zytosolische Dnm1-GFP-Punkte sichtbar (Abb.3-13, Abb.3-14 A und B). Dennoch lässt sich festhalten, dass die Anzahl der Dnm1-Punkte im Zytosol in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp leicht zunimmt. Allgemein blieb aber der Unterschied zwischen Wildtyp und $\Delta mdm36$, $\Delta num1$ sowie $\Delta mdm36/\Delta num1$ bei Betrachtung der Anzahl der Dnm1-GFP-Cluster pro μm^3 an den Mitochondrien ähnlich im Vergleich zur Anzahl der Dnm1-GFP-Cluster pro μm^3 insgesamt. Der Vergleichswildtyp besitzt somit eine leicht höhere Anzahl an Dnm1-GFP-Clustern pro μm^3 an den Mitochondrien (Abb.3-13, Abb.3-14 A und B). Diese lag dabei je nach Mutante und Kohlenstoffquelle um 15-35% höher. In Hinblick auf die Größe und Form der Dnm1-GFP-Punkte waren keine Unterschiede zwischen den Stämmen festzustellen. Weder Mdm36 noch Num1 sind essentiell für die Dnm1-Assemblierung an der Mitochondrienoberfläche. Dennoch sinkt die Anzahl der Dnm1-Cluster in den Einzel- und Doppelmutanten. Somit haben beide Proteine zumindest einen geringen Einfluss auf Dnm1-GFP-Assemblierung.

Die mitochondrialen Dnm1-Assemblierungen lassen sich in zwei Subgruppen unterteilen. Ein Teil davon ist hauptsächlich seitlich an mitochondrialen Tubuli angelagert. Die andere Fraktion der mitochondrialen Dnm1-Assemblierungen repräsentiert Dnm1-Spiralen (oder Ringe), die tubuläre Einschnürungen der Mitochondrien umspannen. Bei dieser Subgruppe handelt es sich vermutlich um teilungsaktive Dnm1-Komplexe (Schauss *et al.*,

2006). Nach einem Teilungsereignis bleiben Dnm1-Komplexe vorübergehend an einem durch die Teilung generierten mitochondrialen Ende assoziiert (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Folglich müsste nach einem Teilungsereignis der Dnm1-Komplex an einem der Mitochondrientubuli fluoreszenzmikroskopisch sichtbar sein, wenn der verwendete Stamm Dnm1-GFP exprimiert. Somit würde die Quantifizierung der an den Enden von Mitochondrientubuli sichtbaren Dnm1-GFP-Punkte Aufschluss über die teilungsaktiven Dnm1-Komplexe in dem Stamm geben.

Die genauere Auswertung der konfokalen Aufnahmen der Dnm1-GFP exprimierenden Mutanten zeigte deutliche Unterschiede der an den Enden von Mitochondrientubuli assoziierten Dnm1-Komplexe im Vergleich zum Wildtyp. Im Wildtypstamm waren auf YPD-Medium 0,76 und auf YPG-Medium 0,62 Dnm1-GFP-Cluster pro Schlauchende zu erkennen (Abb.3-13, Abb.3-14 C). Diese Anzahl an Dnm1-Komplexen pro Schlauchende lag deutlich höher als in den Mutanten und war unabhängig von der Kohlenstoffquelle. In der $\Delta mdm36$ -Mutante war die Anzahl der Dnm1-GFP-Cluster mit 0,43 pro Schlauchende auf YPD-Medium um 43% und auf YPG-Medium mit 0,26 Komplexen um 58% niedriger als im Vergleichswildtyp (Abb.3-13, Abb.3-14 C). Die $\Delta num1$ -Mutante verhielt sich ähnlich mit 0,58 Dnm1-Komplexen pro Schlauchende auf glukosehaltigem Medium (24% niedriger als im Wildtyp) und 0,28 Dnm1-Punkten auf glyzerinhaltigem Medium (55% niedriger als im Wildtyp) (Abb.3-13, Abb.3-14 C). Auch der Dnm1-GFP exprimierende Stamm mit Deletion von *MDM36* und *NUM1* fügte sich in diese Beobachtung ein. Mit 0,32 (YPD-Medium) und 0,26 (YPG-Medium) Dnm1-GFP-Clustern pro Schlauchende war deren Anzahl jeweils um 58% geringer als im Vergleichswildtyp (Abb.3-13, Abb.3-14 C). In allen Stämmen war die Anzahl der Dnm1-GFP-Cluster pro Schlauchende auf YPG-Medium geringer als auf YPD-Medium, obwohl auf YPG-Medium in allen Stämmen insgesamt mehr Dnm1-GFP-Cluster vorhanden waren als auf YPD-Medium (Abb.3-13, Abb.3-14 A-C). Die stärkere Verzweigung der Mitochondrien (größere Mitochondrienmasse) führte auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle zu weniger sichtbaren freien Schlauchenden im Vergleich zur fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Das hat wiederum eine erniedrigte Anzahl an teilungsaktiven Dnm1-Komplexen auf YPG-Medium zur Folge.

Da Dnm1-Komplexe an freien Enden von Mitochondrien sehr wahrscheinlich auf ein Teilungsereignis zurückzuführen sind und diese in allen Mutanten unabhängig von der Kohlenstoffquelle reduziert waren, liegt vermutlich in Zellen, in denen *MDM36* oder *NUM1* deletiert ist, eine reduzierte Aktivität der Dnm1-abhängigen mitochondrialen Teilungsmaschinerie vor.

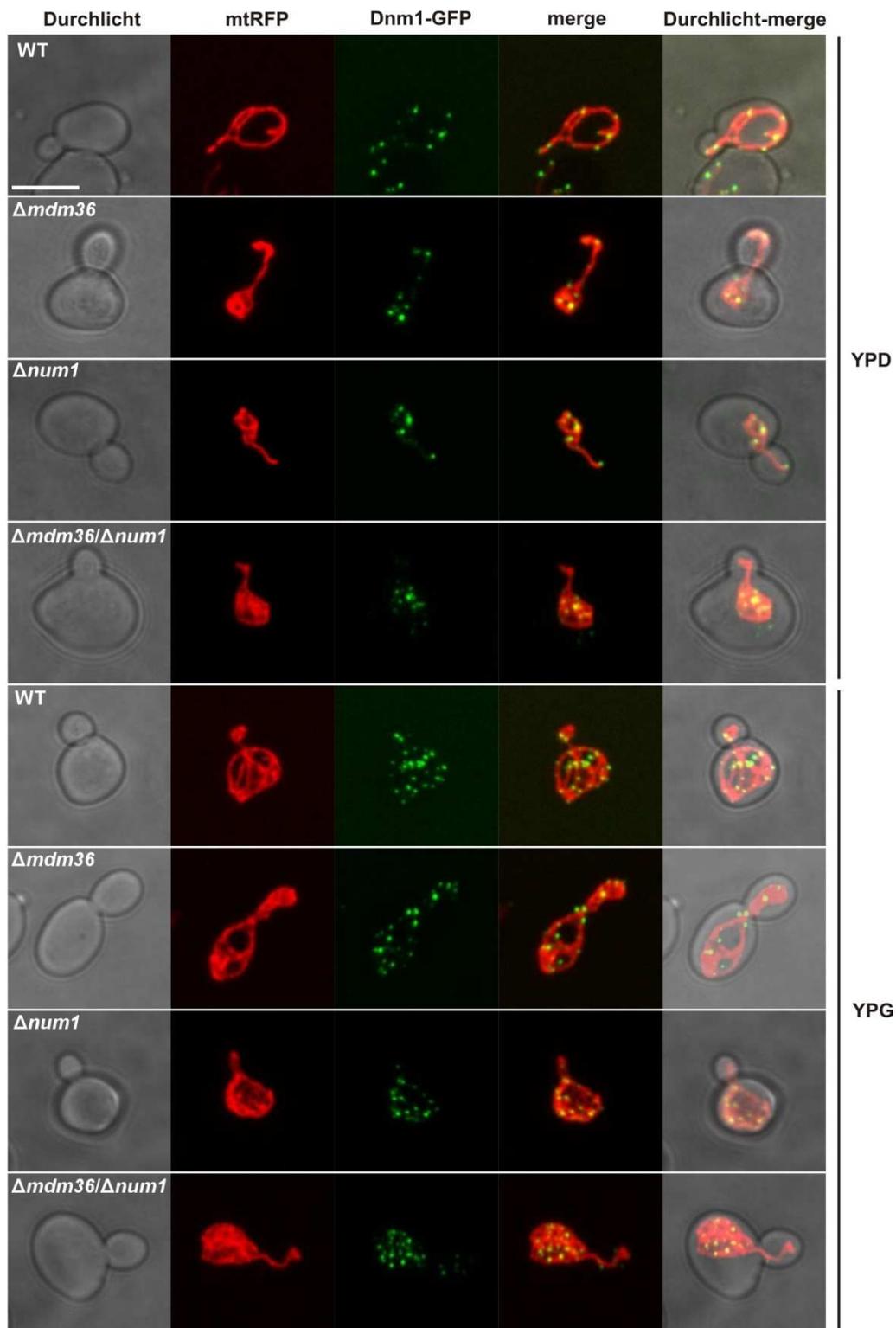


Abb. 3-13: Erfassung der mitochondrialen Morphologie und Lokalisation von Dnm1-GFP-Clustern mittels konfokaler Mikroskopie. mtRFP und Dnm1-GFP exprimierende Zellen wurden über Nacht auf YPD- bzw. YPG-Medium bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und anschließend fixiert. Es wurden konfokale Aufnahmen durch begrenzte Zellabschnitte hindurch mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS Sp1 erstellt. Dargestellt sind jeweils Durchlichtaufnahmen, *Maximum Intensity Projektionen* der Mitochondrien (mtRFP) sowie der Dnm1-GFP-Punkte (Dnm1-GFP) und Überlagerungen der mtRFP- und Dnm1-GFP-Projektionen (merge) sowie der Durchlichtaufnahme und der Überlagerung (Durchlicht-merge). Der Größenbalken stellt 5 μm dar. Die Dnm1-GFP-Punkte liegen in allen Stämmen hauptsächlich mit den Mitochondrien assoziiert vor.

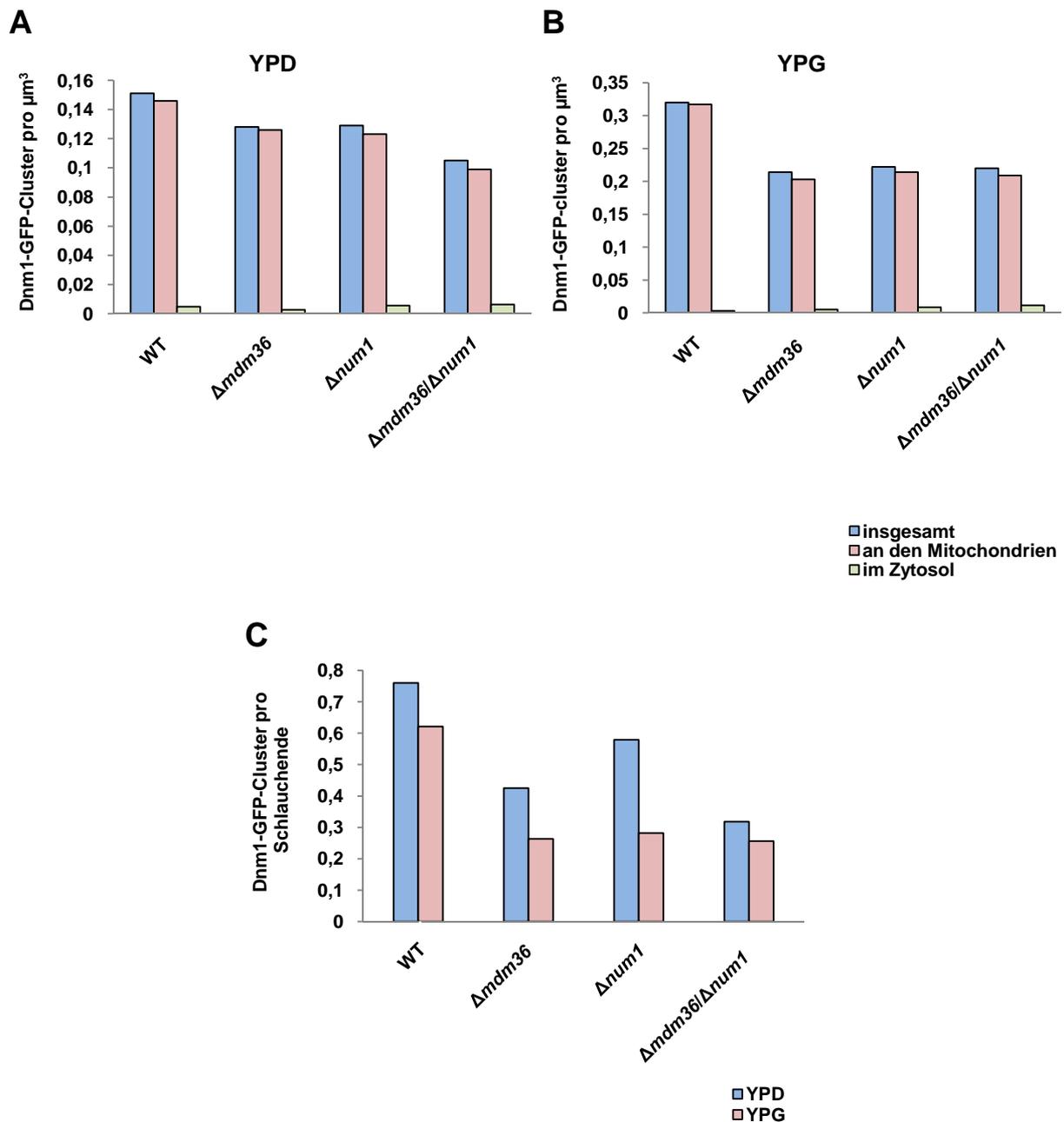


Abb.3-14: Die Anzahl an teilungsaktiven Dnm1-Komplexen ist in $\Delta mdm36$ -Zellen reduziert. Für die jeweiligen Auswertungen wurden die Zellen auf YPD- bzw. YPG-Medium bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und danach fixiert. Es wurden konfokale Aufnahmen durch begrenzte Zellabschnitte hindurch mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS Sp1 erstellt. *Maximum Intensity Projektionen* wurden dann für die Auszählungen verwendet. Es wurden pro Stamm und Medium jeweils $n \geq 50$ Zellen ausgewertet. **(A und B)** Quantifizierung der Dnm1-GFP-Cluster pro μm^3 insgesamt, an den Mitochondrien assoziiert pro μm^3 und im Zytosol pro μm^3 vorliegend (auf YPD- und YPG-Medium). **(C)** Bestimmung der Dnm1-GFP-Cluster pro Schlauchende (teilungsaktive Dnm1-Komplexe) auf fermentierbarer und nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle.

3.1.8 Die Geschwindigkeit und die Bewegung der Mitochondrien ist in der $\Delta mdm36$ -Mutante erhöht

Num1 ist ein Protein, das über seine C-terminale PH-Domäne (*pleckstrin homology*) am Zellkortex verankert ist (Kormanec *et al.*, 1991; Farkasovsky und Küntzel, 1995). Es wird angenommen, dass Num1 die mitochondriale Morphologie beeinflusst, indem es als kortikaler Anker für das mit den Mitochondrien assoziierte Dnm1 agiert (Cervený *et al.*, 2007; Schauss und McBride, 2007). Während fluoreszenzmikroskopischer Analysen wurde beobachtet, dass die Mitochondrien der $\Delta mdm36$ -Mutante eine hohe Dynamik aufweisen. Da $\Delta num1$ -Mutanten einen sehr ähnlichen mitochondrialen Phänotyp wie $\Delta mdm36$ -Mutanten besitzen, stellt sich die Frage, ob Mdm36 ebenfalls an der Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex beteiligt ist. Eine höhere Motilität der Mitochondrien würde dafür sprechen. Um eine genauere Aussage treffen zu können, wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop konfokale Aufnahmen in verschiedenen optischen Zellebenen über einen bestimmten Zeitraum angefertigt. Pro Stamm wurde jeweils durch Analyse von 10 Zellen die durchschnittliche Geschwindigkeit der Mitochondrien bestimmt. Hierfür wurden pro Zelle je 50 z-Stapel à 10 Zellebenen über einen Zeitraum von ~6 min erstellt (zwischen jedem z-Stapel lagen ~7,2 sec). Die z-Stapel wurden dann jeweils als *Maximum Intensity Projektionen* dargestellt. Mit der Software ImageJ 1.41 (Abramoff *et al.*, 2004) wurde nun die Veränderung der Position (x- und y-Koordinaten) der Mitochondrien pro Zeiteinheit bestimmt, indem die Enden von den beweglichen Organellen markiert wurden. Pro Zelle wurden mehrere Enden verfolgt und daraus eine Durchschnittsgeschwindigkeit bestimmt. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Mitochondrien pro Hefestamm ergab sich dann aus den errechneten Durchschnittsgeschwindigkeiten der jeweils 10 untersuchten Zellen.

Für den Wildtypstamm (BY4742) konnte dadurch eine durchschnittliche Geschwindigkeit der Bewegung der Mitochondrien von $26,6 \pm 5,7$ nm/sec ermittelt werden (Tab.3-4). In Abb.3-15 A ist klar zu erkennen, dass keine nennenswerte Veränderung des mitochondrialen Netzwerkes über den Beobachtungszeitraum hinweg stattfindet. Das mitochondriale Retikulum erscheint relativ starr. Im Gegensatz dazu konnte in der $\Delta mdm36$ - und in der $\Delta num1$ -Mutante eine fast doppelt so hohe Durchschnittsgeschwindigkeit für die Mitochondrien berechnet werden. Diese lag im Fall der $\Delta mdm36$ -Mutante bei $40,5 \pm 10,4$ nm/sec und im Fall der $\Delta num1$ -Mutante bei $44,4 \pm 10,0$ nm/sec (Tab.3-4). Beide Mutanten wiesen über den Zeitraum der Untersuchung starke und schnelle Veränderungen der mitochondrialen Strukturen auf (Abb.3-15 B und C). Besonders deutlich wird dies auch bei Betrachtung der eingezeichneten zurückgelegten Wege der einzelnen Enden in den

Durchlichtaufnahmen der Mutanten und dem Wildtyp (Abb.3-15 A-C) sowie den unter <http://www.molbiolcell.org/cgi/content/full/E10-02-0096/DC1> veröffentlichten Filmen. Die tatsächlichen Geschwindigkeiten der Mitochondrien sind sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten vermutlich etwas größer als die hier dargestellten, da bei der Ermittlung die Bewegung in z-Richtung vernachlässigt wurde.

Es lässt sich also festhalten, dass zum einen die durchschnittliche Geschwindigkeit in den Mutanten $\Delta mdm36$ und $\Delta num1$ höher ist als im Wildtyp und zum anderen die Veränderungen der Form/Gestalt der Mitochondrien in den Mutanten häufiger und deutlicher auftreten. Beide Faktoren sprechen für eine verringerte Zellkortexbindung der Mitochondrien, da das Fehlen der Aufhängepunkte möglicherweise zu einer unkoordinierteren und schnelleren Bewegung entlang der Aktinkabel führt. Mdm36 nimmt somit eine ähnliche Funktion wie Num1 ein.

Tab.3-4: Ermittelte durchschnittliche Geschwindigkeiten der Bewegung der Mitochondrien. Zur Bestimmung der mitochondrialen Geschwindigkeit wurde mit der Software ImageJ 1.41 (Abramoff *et al.*, 2004) die Veränderung der x/y-Position verschiedener Enden von beweglichen Mitochondrien pro Zeiteinheit bestimmt und ein Durchschnittswert ermittelt. Pro Stamm wurden jeweils 10 Zellen ausgewertet und davon die durchschnittliche Geschwindigkeit bestimmt.

Stamm	Geschwindigkeit [nm/sec]
WT	26,6 ± 5,7
$\Delta mdm36$	40,5 ± 10,4
$\Delta num1$	44,4 ± 10,0

Abb.3-15: Die Geschwindigkeit der Bewegung der Mitochondrien ist in der $\Delta mdm36$ -Mutante erhöht. Mit pVT100U-mtGFP transformierte Zellen wurden bei 30°C auf YPD-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Anschließend wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS Sp1 konfokale Aufnahmen in verschiedenen optischen Zellebenen über einen Zeitraum von 355 sec (ein z-Stapel wurde ungefähr alle 7,2 sec aufgenommen) erstellt. Pro Zelle sind je 50 z-Stapel als *Maximum Intensity Projektionen* (à 10 Zellebenen) der mtGFP-Fluoreszenz dargestellt. Die Bewegungen der freien mitochondrialen Enden wurden jeweils mit ImageJ 1.41 (Abramoff *et al.*, 2004) nachverfolgt und in die Durchlichtaufnahmen eingezeichnet. Der Größenbalken entspricht jeweils 5 µm. **(A)** Zeitaufnahme durch eine wildtypische Hefezelle. Es wurde die Bewegung von 5 mitochondrialen Enden verfolgt und in die Durchlichtaufnahme eingezeichnet. Siehe Seite 82. **(B)** Zeitaufnahme durch eine $\Delta mdm36$ -Hefezelle. Es wurde die Bewegung von 6 mitochondrialen Enden verfolgt und in die Durchlichtaufnahme eingezeichnet. Siehe Seite 83. **(C)** Zeitaufnahme durch eine $\Delta num1$ -Hefezelle. Es wurde die Bewegung von 5 mitochondrialen Enden verfolgt und in die Durchlichtaufnahme eingezeichnet. Siehe Seite 84.

A



Abb.3-15: Die Geschwindigkeit und die Bewegung der Mitochondrien ist in der $\Delta mdm36$ -Mutante erhöht. Beschreibung siehe S. 81.

B

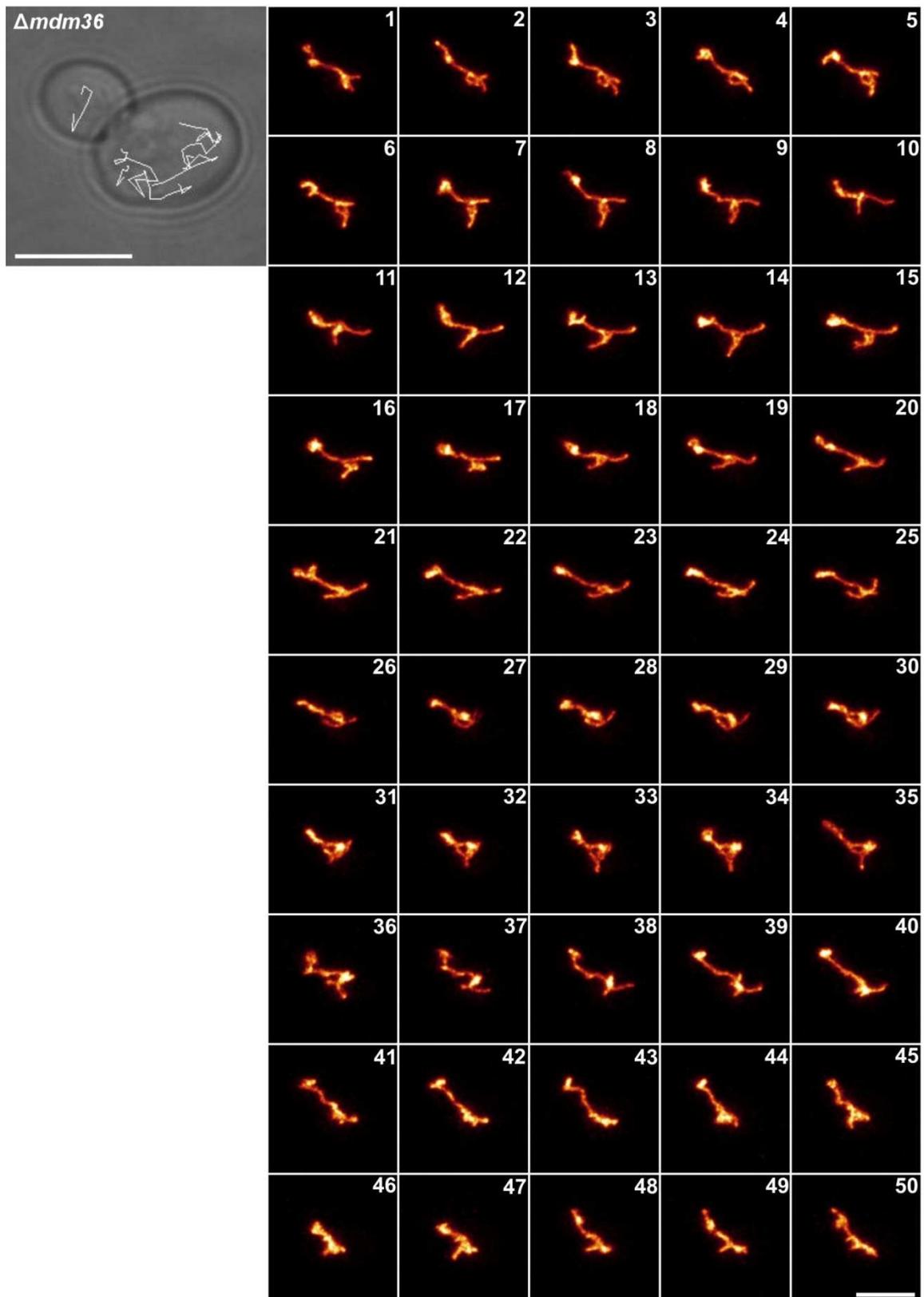


Abb.3-15: Die Geschwindigkeit und die Bewegung der Mitochondrien ist in der $\Delta mdm36$ -Mutante erhöht. Beschreibung siehe S. 81.

C



Abb.3-15: Die Geschwindigkeit und die Bewegung der Mitochondrien ist in der $\Delta mdm36$ -Mutante erhöht. Beschreibung siehe S. 81.

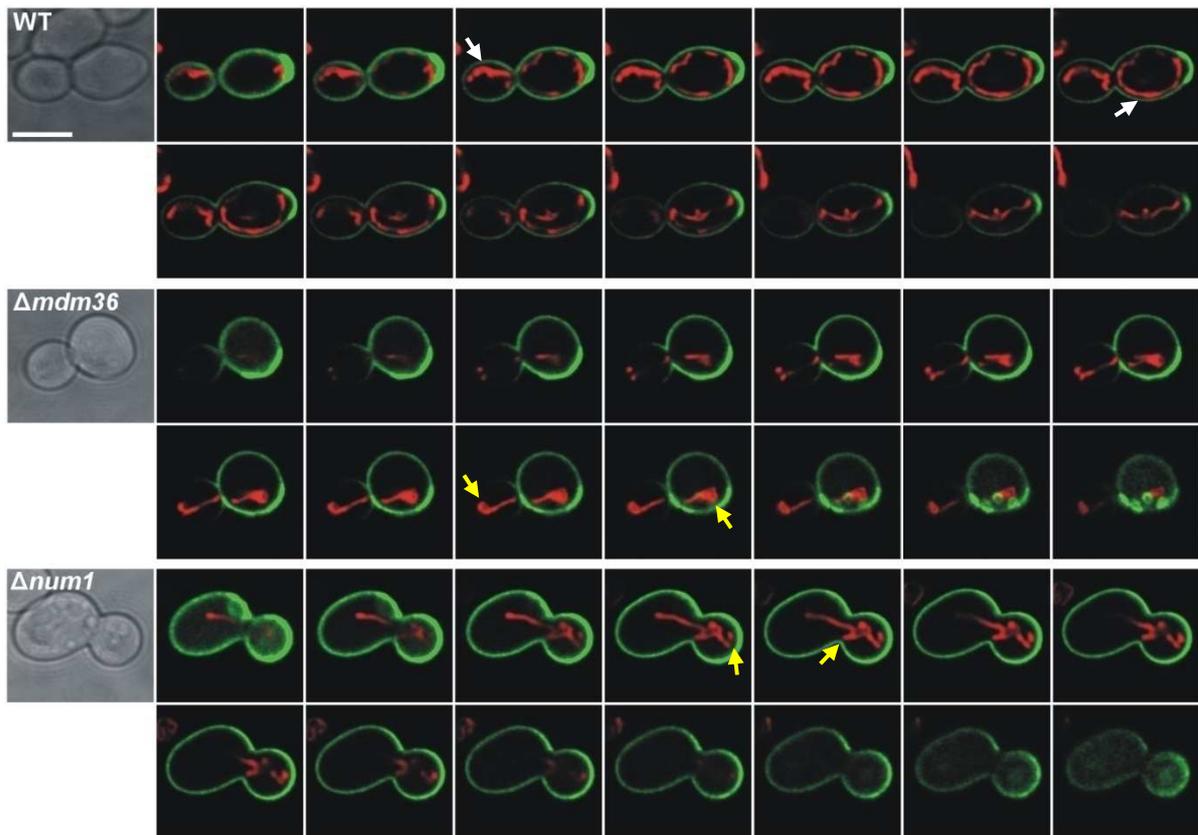
3.1.9 In $\Delta mdm36$ -Mutanten ist die Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex gestört

In *S. cerevisiae* befindet sich das mitochondriale Netzwerk direkt unter dem Zellkortex, wo ständige Fusions- und Teilungsereignisse ihre Form bestimmen (Hoppins *et al.*, 2007). Num1 ist für die Bindung der Mitochondrien am Zellkortex verantwortlich (Cervený *et al.*, 2007) und Mdm36 nimmt vermutlich eine ähnliche Funktion ein. Eine gestörte mitochondriale Zellkortexbindung könnte folglich Auswirkungen auf die Verteilung der Mitochondrien unter dem Zellkortex haben. Die gleichzeitige Markierung der Zellwand und der Mitochondrien sollte Aufschluss darüber geben, wie sich die Mitochondrien in der $\Delta mdm36$ - und in der $\Delta num1$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp (BY4742) in der Zelle bzw. unter dem Zellkortex anordnen. Zur Färbung der Zellwand der mtRFP exprimierenden Zellen wurden die Zellen mit Biotin markiert und anschließend mit Streptavidin Alex Fluor 488 Konjugat versetzt, was an das Biotin bindet. Die Zellen wurden danach fixiert und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop wurden konfokale Aufnahmen in verschiedenen Zellebenen erstellt. Pro Zelle wurden z-Stapel mit jeweils 30 optischen Zellebenen aufgenommen. Für die *Maximum Intensity Projektionen* wurden davon pro Zelle 14 optische Zellebenen verwendet, die sich jeweils um die Zellmitte herum befanden.

Beim Wildtyp ist klar erkennbar, dass sich das mitochondriale Netzwerk mit seinen verzweigten Tubuli hauptsächlich direkt an der Zellwand bzw. direkt unter dem Zellkortex befindet (Abb.3-16 A, weißer Pfeil). Im Vergleich zum Wildtyp sind die für die Mutanten ($\Delta mdm36$, $\Delta num1$) typischen kompakten, einseitig lokalisierten Mitochondrien immer nur an ein bis zwei Punkten direkt in der Nähe der Zellwand lokalisiert (Abb.3-16 A, gelber Pfeil).

Die Ergebnisse bestätigen zum einen die Vermutung von Cervený *et al.* (2007) und Schauss und McBride (2007), dass in der $\Delta num1$ -Mutante die Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex gestört ist. Zum anderen zeigen sie, dass auch in der $\Delta mdm36$ -Mutante die Zellkortexverankerung der Mitochondrien beeinträchtigt ist. Diese Beobachtung geht einher mit der bereits beschriebenen erhöhten Dynamik sowie der starken Gestaltveränderung der Mitochondrien in den Mutanten. Mdm36 nimmt somit eine Funktion bei der Zellkortexbindung der Mitochondrien ein.

A



B

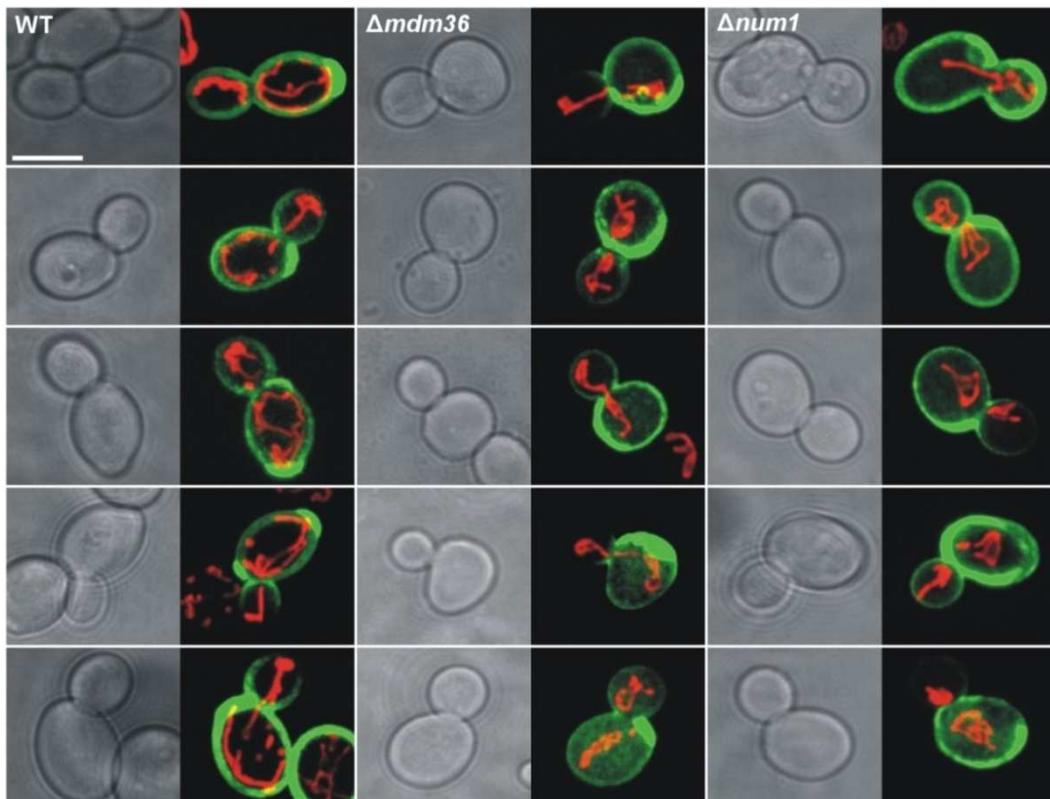


Abb.3-16: In $\Delta mdm36$ -Mutanten ist die Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex gestört. Beschreibung siehe S.87.

Abb.3-16: In $\Delta mdm36$ -Mutanten ist die Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex gestört. Hefezellen, die mtRFP exprimieren, wurden auf YPD-Medium bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, mit Biotin markiert und danach mit Streptavidin Alex Fluor 488 Konjugat versetzt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS Sp1 konfokale Aufnahmen in verschiedenen optischen Zellebenen erstellt. Der Größenbalken stellt 5 μm dar. **(A)** Dargestellt ist jeweils eine Durchlichtaufnahme und die Überlagerung der roten (Mitochondrien) und grünen (Zellwand) Fluoreszenz. Pro Zelle sind 14 Bilder der Überlagerungen in verschiedenen Zellebenen zu sehen. Der Wildtyp zeigt ein mitochondriales Netzwerk, das sich direkt unter der Zellwand bzw. dem Zellkortex befindet (weißer Pfeil). Die beiden Mutanten $\Delta mdm36$ und $\Delta num1$ besitzen kompakte, mitochondriale Strukturen, die meist auf einer Seite der Zelle lokalisiert sind. Dabei gibt es nur vereinzelte Bereiche, die sich in der Nähe der Zellwand bzw. dem Zellkortex befinden (gelber Pfeil). **(B)** Als Überblick sind nochmals von je 5 Zellen pro Stamm *Maximum Intensity Projektionen* der überlagerten Fluoreszenzbilder und eine Durchlichtaufnahme abgebildet. Die obere Zelle stellt dabei immer die in A jeweils gezeigte Zelle dar.

3.1.10 In der $\Delta mdm36$ -Mutante ist die Kolokalisation von Num1-RFP und Dnm1-GFP gestört

Cervený *et al.* (2007) haben festgestellt, dass Dnm1 und Num1 interagieren und dass eine kleine Fraktion von Dnm1-GFP-Punkten mit Num1-RFP kolokalisiert. Diese Interaktion scheint wichtig für die Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex zu sein. Aufgrund des ähnlichen mitochondrialen Phänotyps der $\Delta mdm36$ - und $\Delta num1$ -Deletionsmutanten und der in den vorhergehenden Versuchen beobachteten ebenfalls gestörten Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex in der *mdm36*-Mutante wäre es denkbar, dass Mdm36 die Interaktion von Num1 und Dnm1 fördert. Deswegen sollten $\Delta mdm36$ - und Wildtypzellen (RJ2194; Cervený *et al.*, 2007), die Num1-RFP und Dnm1-GFP koexprimieren, mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

In Wildtypzellen konnte die von Cervený *et al.* (2007) beschriebene Kolokalisation von Dnm1-GFP und Num1-RFP sowohl auf SD- (Selektivmedium) als auch auf YPG-Medium beobachtet werden (Abb.3-17 weißer Pfeil). Bei Deletion von *MDM36* war diese Kolokalisation (von Num1-RFP und Dnm1-GFP) auf beiden Nährmedien selten zu finden (Abb.3-17). Die Dnm1-GFP-Punkte waren eher im Inneren der Zelle lokalisiert als in der Nähe der Zellperipherie (Abb.3-17 gelber Pfeil), wodurch eine Kolokalisation mit dem kortikalen Num1-RFP schwer möglich ist. Zur Verdeutlichung sind im Anhang (Abb.A1 A-B) noch weitere repräsentative Aufnahmen von $\Delta mdm36$ - und Wildtypzellen zu finden.

Schwer festzustellen ist, ob die durch die Deletion von *MDM36* hervorgerufene Änderung der mitochondrialen Morphologie die Bindung zum Zellkortex stört oder ob die gestörte mitochondriale Zellkortexverankerung den mutanten mitochondrialen Phänotyp hervorruft. Da aber die $\Delta num1$ -Mutante eine ähnliche mitochondriale Morphologie aufweist, Num1 am Zellkortex verankert ist und außerdem mit mitochondrial assemblierten Dnm1 interagiert, kann man davon ausgehen, dass Letzteres der Fall ist. Somit wird klar, dass

Mdm36 eine wichtige Rolle bei der Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex über Dnm1 und Num1 spielt.

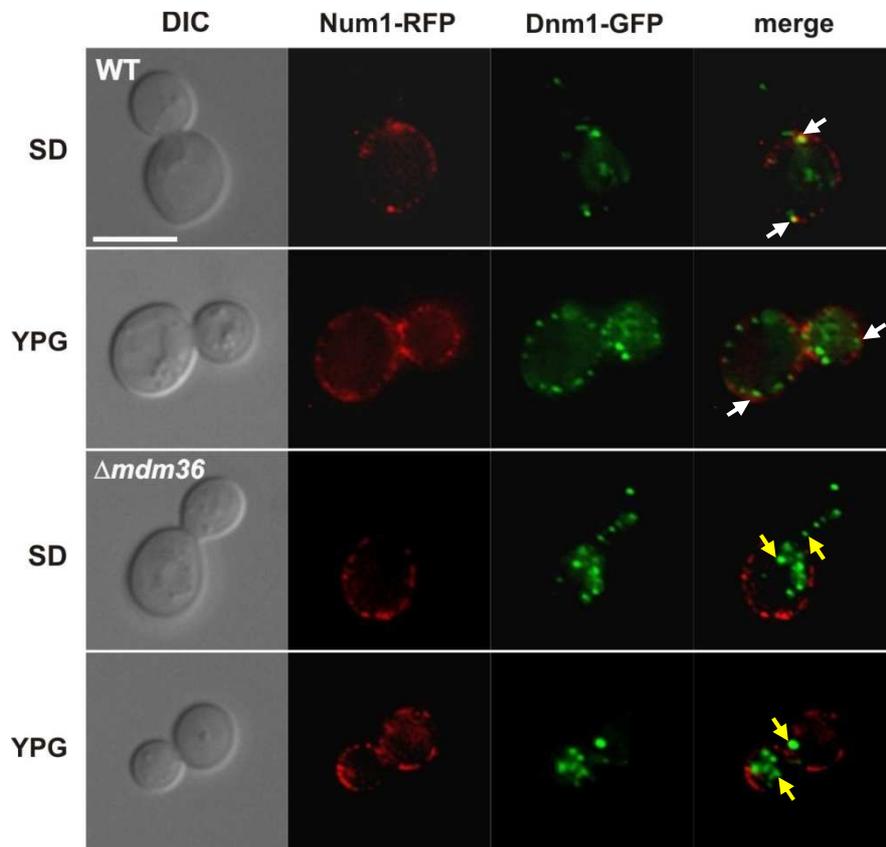


Abb.3-17: In der $\Delta mdm36$ -Mutante ist die Kolokalisation von Num1-RFP und Dnm1-GFP gestört. Dnm1-GFP und Num1-RFP exprimierende Hefezellen wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf SD- oder YPG-Medium angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind (von links nach rechts): Differential-Interferenz-Kontrastaufnahmen (DIC), rote Fluoreszenzaufnahmen (Num1-RFP), grüne Fluoreszenzaufnahmen (Dnm1-GFP), Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzaufnahmen (merge). Der Balken stellt 5 μ m dar. In den Wildtypzellen kann eine Kolokalisation von Dnm1-GFP und Num1-RFP (weißer Pfeil) beobachtet werden. In der $\Delta mdm36$ -Mutante ist diese Kolokalisation gestört (gelber Pfeil). Weitere repräsentative Aufnahmen sind im Anhang in Abb.A1 A-B zu finden.

3.2 Die mitochondriale Morphologiekomponente Mdm35

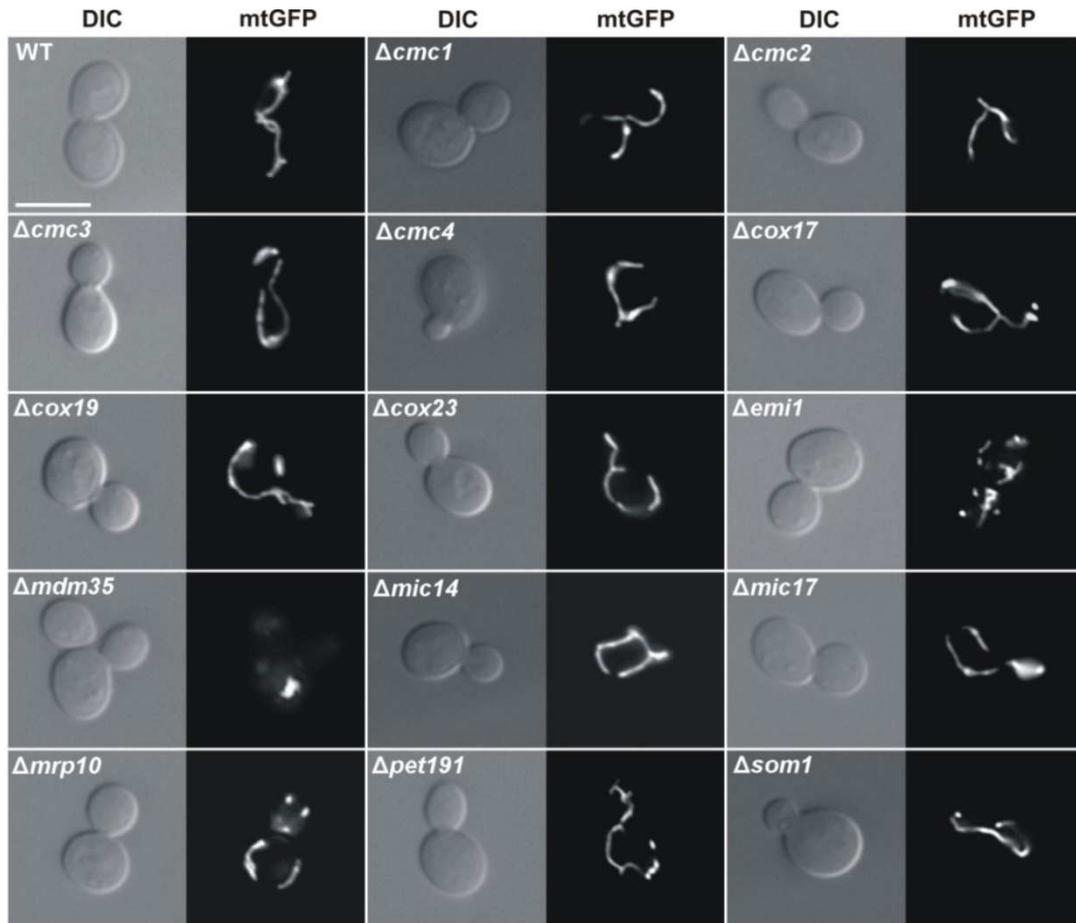
3.2.1 Die Deletion von *MDM35*, *EMI1* und *MRP10* führt zu einer veränderten mitochondrialen Morphologie

Proteine des Intermembranraumes der Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus, beim Transfer von Proteinen, Ionen und Metaboliten zwischen der Innen- und Außenmembran sowie in der Metallionen Homöostase (Carr und Winge, 2003; Koehler, 2004; Herrmann und Hell, 2005; Wiedemann *et al.*, 2006). Die Proteine des Intermembranraumes sind kernkodiert und müssen posttranslational in die Mitochondrien importiert werden. Einige dieser Proteine besitzen N-terminale Zielsteuerungssequenzen und können über die Translokasen der mitochondrialen Außen- und Innenmembran in den Intermembranraum transloziert werden (Koehler, 2004; Neupert und Herrmann, 2007; Bolender *et al.*, 2008). Viele andere Proteine hingegen verfügen über Cystein-Motive, die ihren Import in den Intermembranraum vermitteln. Dabei kann zwischen Twin Cx₃C- und Twin Cx₉C-Motiven unterschieden werden. In einem Screen von Longen *et al.* (2009), in dem nach Proteinen gesucht wurde, die das Twin Cx₉C-Motiv besitzen, konnten 14 Proteine als mögliche Mitglieder dieser Familie identifiziert werden. Um zu testen, ob der Verlust der Twin Cx₉C-Proteine eine Auswirkung auf die mitochondriale Morphologie hat, wurden die mtGFP exprimierenden Deletionsmutanten mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

In fast allen Mutanten konnte dabei eine wildtypische Morphologie der Mitochondrien beobachtet werden. Auffällig waren hingegen nur die drei Mutanten $\Delta mdm35$, $\Delta mrp10$ und $\Delta emi1$. Die $\Delta mdm35$ -Mutante zeigte zu 52% geschwollene, sphärische Mitochondrien, wie sie auch schon von Dimmer *et al.* (2002) beobachtet wurden (Abb.3-18 A und B). Beim Verlust von Mrp10 und Emi1 waren bei rund der Hälfte der Zellen kurze mitochondriale Tubuli mit einer unregelmäßigen Form zu beobachten (Abb.3-18 A und B).

Demnach werden die Twin Cx₉C-Proteine Mdm35, Mrp10 und Emi1 für den Erhalt der mitochondrialen Morphologie benötigt. Alle anderen Twin Cx₉C-Proteine hingegen haben keinen bzw. keinen starken Einfluss auf die mitochondriale Morphogenese.

A



B

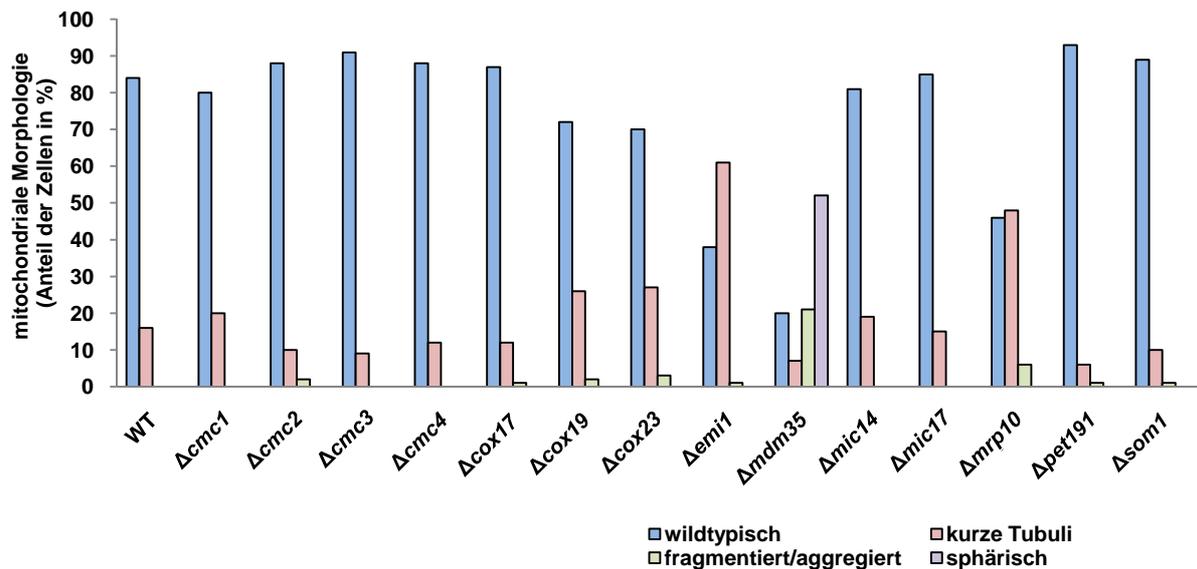


Abb.3-18: Mdm35, Mrp10 und Emi1 sind wichtig für den Erhalt der mitochondrialen Morphologie. Hefezellen, die mitochondrial zielgesteuertes GFP exprimieren, wurden bei 30°C auf YPD-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. **(A)** Dargestellt ist jeweils eine Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und eine Fluoreszenzaufnahme der Mitochondrien (mtGFP). Der Größenbalken entspricht 5 μ m. **(B)** Die mitochondriale Morphologie wurde quantifiziert. Für jeden Stamm wurden zwischen 200 und 500 Zellen ausgewertet (Longen *et al.*, 2009).

3.2.2 Die $\Delta m d m 3 5$ -Deletionsmutante besitzt sphärische Mitochondrien und eine verminderte respiratorische Kompetenz

Sowohl in dem Screen von Dimmer *et al.* (2002) als auch im Screen von Longen *et al.* (2009) war die mitochondriale Morphologie der $\Delta m d m 3 5$ -Mutante sehr auffällig. Diese Mutante zeigte geschwollene, sphärische Mitochondrien wie sie auch in den Mutanten $\Delta m m m 1$, $\Delta m m m 2$, $\Delta m d m 1 0$, $\Delta m d m 1 2$, $\Delta m d m 3 1$ und $\Delta m d m 3 2$ beobachtet werden konnten (Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994; Dimmer *et al.*, 2002; Dimmer *et al.*, 2005). Aus diesem Grund sollte die $\Delta m d m 3 5$ -Mutante näher untersucht werden. Zur Bestätigung des mitochondrialen Phänotyps wurde die Mutante zunächst nochmals fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Der mitochondriale Phänotyp der Deletionsmutante konnte dabei reproduziert werden. Die $\Delta m d m 3 5$ -Mutante wies zu 51% die charakteristischen sphärischen Mitochondrien auf, wohingegen im Wildtyp (BY4742) keine Mitochondrien dieser Art beobachtet werden konnten (Abb.3-19; Tab.3-5). Ansonsten lagen die Mitochondrien in der Mutante zu 36% fragmentiert/aggregiert oder zu 13% als kurze Tubuli vor (Tab.3-5). Im Wildtyp hingegen war zu 92% ein tubuläres mitochondriales Netzwerk sichtbar (Abb.3-19; Tab.3-5).

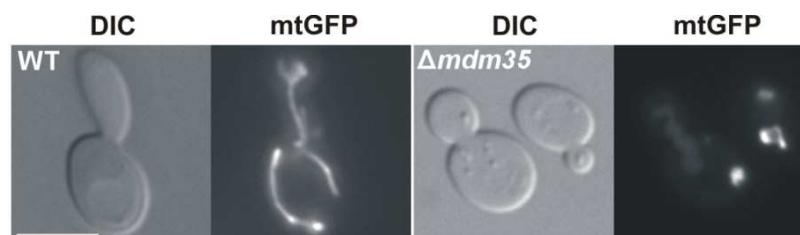


Abb.3-19: Die $\Delta m d m 3 5$ -Mutante weist größtenteils sphärische Mitochondrien auf. Die mit pVT100U-mtGFP transformierten Hefezellen wurden bei 30°C auf YPD-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dargestellt sind Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und Fluoreszenzaufnahmen der Mitochondrien (mtGFP). Der Größenbalken entspricht 5 μ m.

Tab.3-5: Auswertung des mitochondrialen Phänotyps der $\Delta m d m 3 5$ -Mutante. Die Hefestämme wurden bei 30°C auf YPD-Medium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen und dann fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Pro Stamm wurden zwischen 300 und 500 Zellen ausgezählt.

Stamm	Medium	mitochondrialer Phänotyp (Anteil der Zellen in %)			
		wildtypisch	kurze Tubuli	fragmentiert/ aggregiert	sphärisch
WT	YPD	92	0	8	0
$\Delta m d m 3 5$	YPD	0	13	36	51

Zur Überprüfung, ob Mdm35 wie die anderen Mutanten ($\Delta mmm1$, $\Delta mmm2$, $\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$, $\Delta mdm31$, $\Delta mdm32$), die einen ähnlichen mitochondrialen Phänotyp aufzeigen, für die respiratorische Aktivität nötig ist, wurde ein Wachstumstest durchgeführt. Hierzu wurden der Vergleichswildtyp (BY4742) und die Mutante auf YPD-Medium bis zu einer OD_{600} von ~1,0 angezogen und anschließend davon serielle Verdünnungen auf YPD- und YPG-Platten getropft, die bei 30°C und bei 37°C inkubiert wurden. Auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle konnte die Mutante wie der Wildtyp bei 30°C und bei 37°C bis zur letzten Verdünnungsstufe wachsen (Abb.3-20 A). Auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle zeigte die $\Delta mdm35$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp hingegen einen Wachstumsdefekt, der auch von Longen *et al.* (2009) beobachtet wurde, wobei die Mutante bei 30°C nur bis zur dritten und bei 37°C nur bis zur zweiten Verdünnungsstufe wachsen konnte (Abb.3-20 A).

Dieser Wachstumsdefekt kann entweder auf einen Verlust der mtDNA [rho^0] bzw. auf eine Anhäufung von Schäden in der mtDNA [rho^-] zurückzuführen sein. Deshalb wurden die Zellen mit DAPI angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Eine wildtypische Hefezelle besitzt typischerweise ~10-15 mtDNA-Nukleioide. Diese konnten auch in der Mehrzahl aller Wildtypzellen detektiert werden (Abb.3-20 B; Tab.3-6). Im Gegensatz dazu besaßen Zellen der $\Delta mdm35$ -Mutante generell weniger mtDNA-Nukleioide als die des Wildtypstamms (zu 44% nur 2-5 mtDNA-Nukleioide) und zu 20% gar keine mtDNA-Nukleioide (Abb.3-20 B, roter Pfeil; Tab.3-6). Teilweise waren auch vergrößerte mtDNA-Nukleoid-Strukturen erkennbar (Abb.3-20 B, gelber Pfeil) wie sie auch schon in den $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Mutanten beobachtet werden konnten (Dimmer *et al.*, 2005). Folglich ist der Wachstumsdefekt auf den Verlust der mtDNA zurückzuführen.

Tab.3-6: Quantifizierung der mtDNA-Nukleioide in Wildtyp- und $\Delta mdm35$ -Zellen. Die Hefestämme wurden auf YPD-Medium über Nacht angezogen, mit DAPI gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Pro Stamm wurden ~400 Zellen ausgewertet.

Stamm	mtDNA (Anteil der Zellen in %)				
	11-15 Nukleioide	6-10 Nukleioide	2-5 Nukleioide	1 Nukleoid	keine Nukleioide
WT	62	25	13	0	0
$\Delta mdm35$	9	19	44	8	20

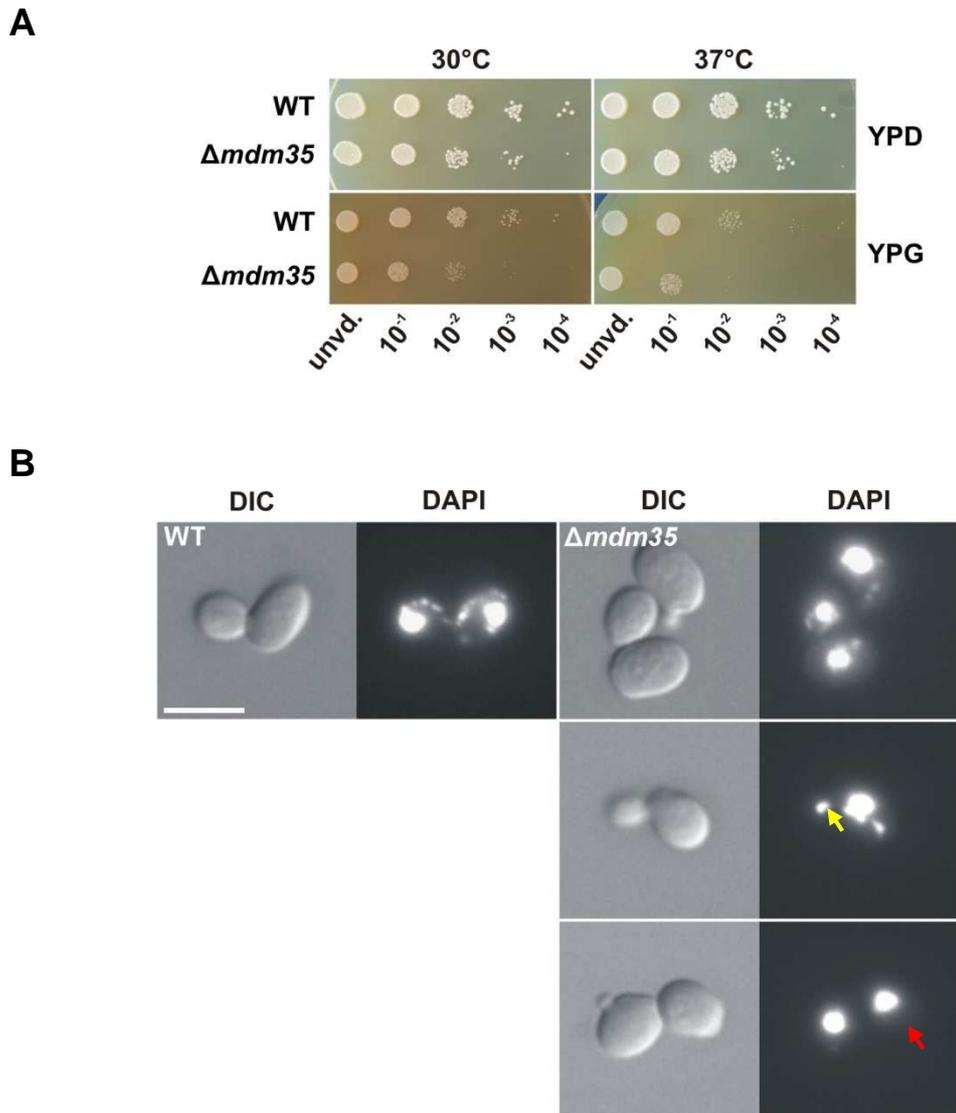


Abb.3-20: Der Wachstumsdefekt der $\Delta mdm35$ -Mutante ist auf einen Verlust der mtDNA zurückzuführen. (A) Die Zellen wurden auf YPD-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{600} von $\sim 1,0$ kultiviert. Anschließend wurde davon eine serielle Verdünnung auf YPD- und YPG-Platten getropft und bei 30°C und 37°C inkubiert. **(B)** Die Hefestämme wurden über Nacht bei 30°C auf YPD-Medium angezogen und danach mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. Links ist die Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und rechts die Fluoreszenzaufnahme (DAPI) zu sehen. Der Größenbalken stellt 5 μm dar. Vergrößerte mtDNA-Nukleoid-Strukturen sind mit einem gelben Pfeil markiert und Zellen ohne mtDNA mit einem roten.

3.2.3 Die Ultrastruktur der $\Delta mdm35$ -Mutante zeigt veränderte mitochondriale Strukturen

Der Verlust von Mdm31 bzw. Mdm32 führt zu einem stark veränderten mitochondrialen Phänotyp, der dem der $\Delta mdm35$ -Mutante sehr ähnlich ist. Alle drei Mutanten besitzen zu einem großen Anteil sphärische Mitochondrien (Dimmer *et al.*, 2005; Longen *et al.*, 2009). Die beiden Deletionsmutanten $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$ zeigen auch auf ultrastruktureller Ebene große Veränderungen, wobei die Organellen im Allgemeinen sehr groß sind und meistens keine Cristae besitzen. Außerdem haben beide Deletionen dramatische

Auswirkungen auf die Organisation der mitochondrialen Membranen, die sich in verkürzten Cristae und kreisrunden von einer Doppelmembran umgebenen Strukturen widerspiegeln (Dimmer *et al.*, 2005). Die elektronenmikroskopische Untersuchung der $\Delta mdm35$ -Mutante sollte Aufschluss darüber geben, ob auch in dieser Mutante die Ultrastruktur einer Änderung unterliegt. Die $\Delta mdm35$ -Zellen und der isogene Wildtyp (BY4742) wurden auf YPD- und YPG-Nährmedium bis zu einer OD_{600} von 0,5-1,0 kultiviert und danach in Kunstharz eingebettet. Es wurden Ultradünnschnitte der Proben hergestellt und diese elektronenmikroskopisch untersucht.

In Wildtypzellen wiesen die Mitochondrien sowohl auf YPD- als auch YPG-Medium reguläre Cristae- und Doppelmembranstrukturen auf (Abb.3-21, gelber Pfeil). Die Mitochondrien der $\Delta mdm35$ -Mutante zeigten ebensolche Strukturen (Abb.3-21, roter Pfeil). Dennoch konnten auch elongierte Mitochondrien, die sich ringförmig anordneten, aber keinen geschlossenen Ring bildeten, beobachtet werden (Abb.3-21). Weder auf YPD- noch YPG-Medium konnten Riesenmitochondrien, wie sie bei Dimmer *et al.* (2005) in den $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Mutanten bzw. in der $\Delta mmm1$ -Mutante (Burgess *et al.*, 1994) gesehen wurden, identifiziert werden. Dennoch könnte es sich bei den elongierten mitochondrialen Strukturen um sphärische Mitochondrien handeln, wenn die Mitochondrien in der dritten Dimension (z-Ebene) geschlossen vorliegen. Die Membranen könnten dabei Zytosol einschließen, was mittels Fluoreszenzmikroskopie als dunklere Bereiche (Löcher) zu sehen wäre (Abb.3-19). Für genauere Aussagen müssten aber Serienschnitte und daraus ein 3D-Modell erstellt werden. Die Cristae-Struktur sah zunächst in der $\Delta mdm35$ -Mutante zumindest auf glyzerinhaltigem Medium (Abb.3-21) im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert aus. Andererseits kann man in dem kreisförmigen Mitochondrion der Mutante auf glukosehaltigem Medium (Abb.3-21) gar keine Cristae erkennen.

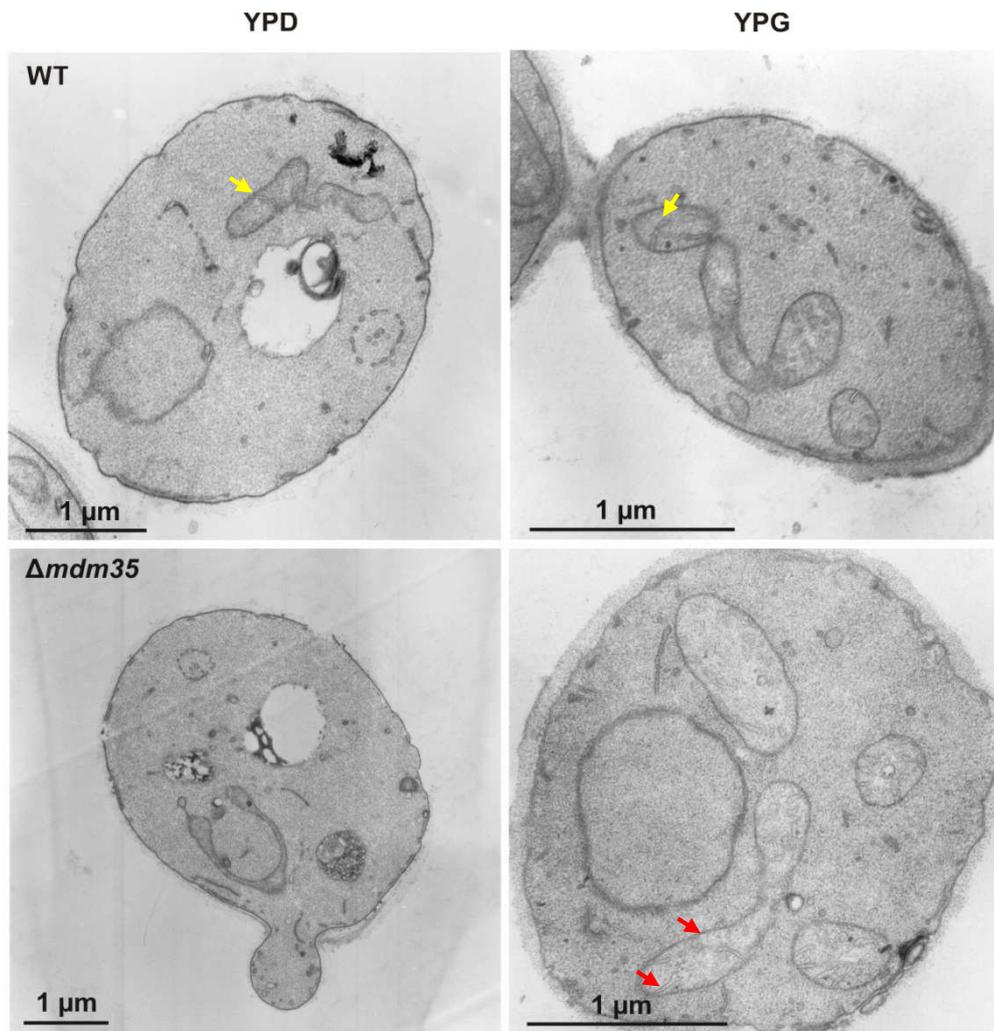


Abb.3-21: Die $\Delta mdm35$ -Mutante besitzt veränderte Mitochondrien. Die $\Delta mdm35$ -Zellen und der isogene Wildtyp (BY4742) wurden für die Einbettung nach Bauer *et al.* (2001) und Spurr (1969) auf YPD- und YPG-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,5-1,0 kultiviert und danach in Kunstharz eingebettet. Es wurden Ultradünnschnitte der Proben hergestellt und diese elektronenmikroskopisch untersucht. Der Wildtypstamm besitzt reguläre Cristae- und Doppelmembranstrukturen (gelber Pfeil) wie die Mutante auch (roter Pfeil). Dennoch konnten in der Mutante auch elongierte mitochondriale Strukturen beobachtet werden, bei denen es sich um Mitochondrien handeln könnte, die in der dritten Dimension geschlossen vorliegen (sphärische Mitochondrien).

3.2.4 Mdm35 hat keine Auswirkungen auf die mitochondriale Fusionseffizienz

Das mitochondriale Netzwerk ist abhängig von einem Gleichgewicht zwischen Fusions- und Teilungsereignissen. Durch das Fehlen einer Komponente verschiebt sich dieses Gleichgewicht (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999; Shaw und Nunnari, 2002). Mit Hilfe eines *in vivo* Fusionsexperimentes kann bestimmt werden, ob das zu untersuchende Protein eine Fusionskomponente darstellt. Dazu wurden Stämme entgegengesetzten Paarungstyps mit unterschiedlich fluoreszierenden mitochondrialen Markern (pYX113-mtGFP, Westermann und Neupert, 2000; pRS416-GAL1+PrFoATP9-RFP, Mozdy *et al.*,

2000) gepaart. Anhand der Überlagerung der mtGFP- und mtRFP-Fluoreszenzen konnte in den entstandenen Zygoten eine mögliche Fusion der Mitochondrien überprüft werden.

In 100% aller $\Delta mdm35$ -Zygoten konnten wie in 100% der Wildtypzygoten die Mitochondrien miteinander fusionieren (Abb.3-22, Tab.3-7). Es war immer eine vollständige Überlagerung der mtGFP- und mtRFP-Fluoreszenzen zu beobachten (Abb.3-22). Jedoch wiesen die Mitochondrien in allen untersuchten Zygoten der $\Delta mdm35$ -Mutante eine wildtypische Morphologie auf (Abb.3-22), was nicht zu erwarten war, da die *mdm35*-Deletionsmutante eigentlich zum Großteil sphärische Mitochondrien besitzt. Anscheinend beeinflusst die Bildung von Zygoten die mitochondriale Morphogenese in der $\Delta mdm35$ -Mutante. Ein ähnliches Phänomen konnte auch beim *in vivo* Fusionsnachweis in den Zygoten der $\Delta mfb1$ -Mutante gezeigt werden (Dürr *et al.*, 2006). Insgesamt kann festgehalten werden, dass Mdm35 keinen Effekt auf die mitochondriale Fusion ausübt.

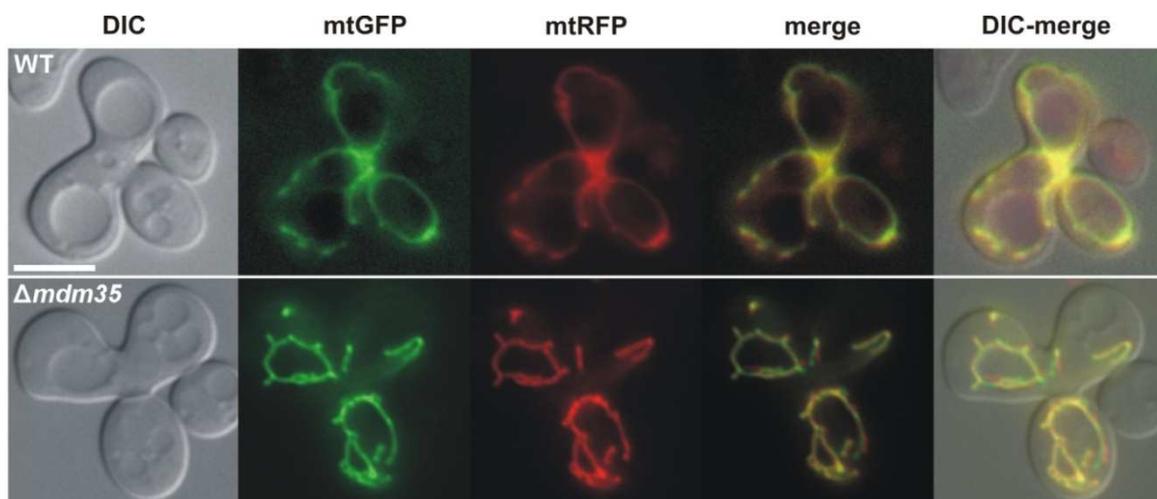


Abb.3-22: Mdm35 wirkt sich nicht auf die mitochondriale Fusion aus. Stämme entgegengesetzten Paarungstyps mit unterschiedlich fluoreszierenden mitochondrialen Markern (pYX113-mtGFP, Westermann und Neupert, 2000; pRS416-GAL1+PrFoATP9-RFP, Mozdy *et al.*, 2000) wurden gepaart und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Anhand der Überlagerung der mtGFP- und mtRFP-Fluoreszenzen konnte in den entstandenen Zygoten eine mögliche Fusion der Mitochondrien überprüft werden.

Tab.3-7: Auswertung der mitochondrialen Fusionseffizienz in Zygoten des Wildtyps und der $\Delta mdm35$ -Mutante. Stämme entgegengesetzten Paarungstyps mit unterschiedlich fluoreszierenden mitochondrialen Markern wurden gepaart. Anhand der Überlagerung der Fluoreszenzen in den Zygoten konnte die Fusionseffizienz ermittelt werden. Pro Stamm wurden ~50 Zygoten ausgewertet.

Stamm	Anteil der Zygoten in %	
	Fusion	keine Fusion
WT x WT	100	0
$\Delta mdm35$ x $\Delta mdm35$	100	0

3.2.5 Der gleichzeitige Verlust von *MDM35* und *MDM31* bzw. *MDM32* ist synthetisch letal

Die Beziehung zweier Gene zueinander wird als synthetisch letal bezeichnet, wenn die gleichzeitige Deletion beider Gene zum Tod des Organismus führt. Dabei weist die synthetische Letalität häufig auf eine Beteiligung der Proteine am gleichen zellulären Prozess hin (Guarente, 1993; Hartman *et al.*, 2001). Bei der Einordnung von Mdm35 in die mitochondriale Morphogenesemaschinerie wurde aufgrund des ähnlichen mitochondrialen Phänotyps versucht, eine Doppeldeletionsmutante mit den Morphologiekomponenten Mdm31 und Mdm32 herzustellen. Dazu wurde der haploide $\Delta m d m 3 5$ -Stamm mit dem haploiden $\Delta m d m 3 1$ - bzw. $\Delta m d m 3 2$ -Stamm entgegengesetzten Paarungstyps gekreuzt. Der heterozygote diploide Doppeldeletionsstamm wurde nun sporuliert und einer Tetradendisektion unterzogen. Weder die $\Delta m d m 3 5 / \Delta m d m 3 1$ - noch die $\Delta m d m 3 5 / \Delta m d m 3 2$ -Mutante konnten auf diesem Weg erzeugt werden, was darauf hindeutet, dass die gleichzeitige Deletion von *MDM35* und *MDM31* bzw. *MDM32* synthetisch letal ist.

Für einen heterozygot diploiden Doppeldeletionsstamm gibt es bei der Sporulation drei verschiedene Aufspaltungsmöglichkeiten. Beim *tetratype* (T) entstehen eine Wildtypspore, eine Doppeldeletionsspore und jeweils eine Einzeldelationsspore. Beim sogenannten *parental ditype* (P) bilden sich jeweils zwei Einzeldelationssporen, während beim *nonparental ditype* (N) zwei Wildtyp- und zwei Doppeldeletionssporen entstehen. Das theoretische Aufspaltungsverhältnis zwischen den drei Varianten liegt dabei bei 4:1:1 (T:N:P). Für jede Kreuzung wurden > 50 Tetraden untersucht und ihr Aufspaltungsverhältnis ermittelt (Tab.3-8). Eine typische Tetradendisektionsplatte ist in Abbildung 3-23 A zu sehen, wobei hier nur repräsentativ die Aufspaltung des heterozygot diploiden Doppeldeletionsstammes entstanden aus der Kreuzung von $\Delta m d m 3 2$ mit $\Delta m d m 3 5$ abgebildet ist. Bei den Tetradenanalysen konnte sowohl bei der Kreuzung mit $\Delta m d m 3 1$ als auch mit $\Delta m d m 3 2$ eine annähernde Aufspaltung von 4:1:1 beobachtet werden (Tab.3-8). Deutlich zu erkennen war, dass bei jeder erwarteten Doppeldeletionsspore keine Kolonie heran wuchs (Abb.3-23 A), was den synthetisch letalen Effekt der Doppeldeletion bestätigt.

Zum Beweis des synthetisch letalen Effekts wurde exemplarisch im diploiden heterozygoten Doppeldeletionsstamm $\Delta m d m 3 5 / \Delta m d m 3 2$ Mdm32 plasmidal unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert (pRS316-*MDM32*; Kai Stefan Dimmer, Universität München, unpublizierte Daten). Der Hefestamm wurde sporuliert und einer Tetradendisektion unterzogen. Auf diese Art und Weise konnten haploide Doppeldeletionsstämme erhalten werden, die das Plasmid pRS316-*MDM32* trugen. Durch

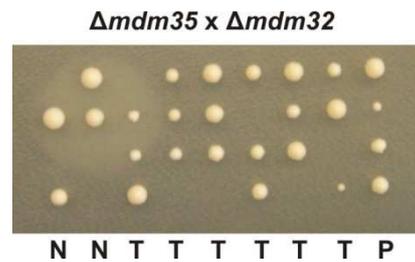
Übertragung des Stammes auf 5-FOA-haltige Platten konnte dann eindeutig festgestellt werden, dass die Doppeldeletion von *MDM32* und *MDM35* synthetisch letal ist. Auf diesen Platten konnte kein Wachstum des Stammes beobachtet werden (Abb.3-23 B), da der Stamm auf dem Plasmid das *URA3*-Gen trug. Stämme, die das *URA3*-Gen plasmidal oder genomisch besitzen, bauen 5-FOA zu einem zelltoxischen Intermediat um. Somit können auf den 5-FOA-Platten nur Zellen wachsen, die in dem Fall das Plasmid pRS316-*MDM32* verloren haben. Nicht Wachstum des Stammes zeigt, dass der Stamm das Plasmid nicht verlieren konnte, da die Doppeldeletion synthetisch letal ist. Dieser Effekt konnte für vier erhaltene aus Sporen gekeimte Kolonien beobachtet werden (Abb.3-23 B). Als Kontrollen dienten zum einen der haploide $\Delta mdm35$ -Stamm, der das Plasmid pRS316-*MDM32* trug, und zum anderen der Stamm R1158, der das *URA3*-Gen im Genom besitzt. Der $\Delta mdm35$ -Stamm mit dem Plasmid konnte auf 5-FOA-Platten wachsen, da er nicht auf das Plasmid angewiesen ist (Abb.3-23 B). Der R1158-Stamm hingegen konnte auf 5-FOA-Platten nicht wachsen (Abb.3-23 B).

Da eine synthetische letale Beziehung häufig auf eine Beteiligung im gleichen Prozess hindeutet, steht Mdm35 möglicherweise in funktioneller Beziehung zu den potentiell mtDNA-erhaltenen Innenmembranproteinen Mdm31 und Mdm32.

Tab.3-8: Aufspaltung der Tetraden der heterozygot diploiden Doppeldeletionsstämme. Es gibt drei Aufspaltungsmöglichkeiten eines solchen Stammes: *tetratype* (T), *nonparental ditype* (N) und *parental ditype* (P). Das Aufspaltungsverhältnis liegt dabei theoretisch bei 4:1:1 (T:N:P). Ein ähnliches Aufspaltungsverhältnis der Tetraden konnte bei beiden heterozygot diploiden Doppeldeletionsstämmen beobachtet werden. Es wurden jeweils $n > 50$ Tetraden ausgewertet.

Stamm	Tetradentyp	<i>parental ditype</i> (P)	<i>nonparental ditype</i> (N)	<i>tetratype</i> (T)
theoretische Verteilung		1	1	4
$\Delta mdm35 \times \Delta mdm31$		0,9 (n=16)	1,9 (n=36)	3,2 (n=59)
$\Delta mdm35 \times \Delta mdm32$		1,45 (n=17)	1,45 (n=17)	3,1 (n=36)

A



B

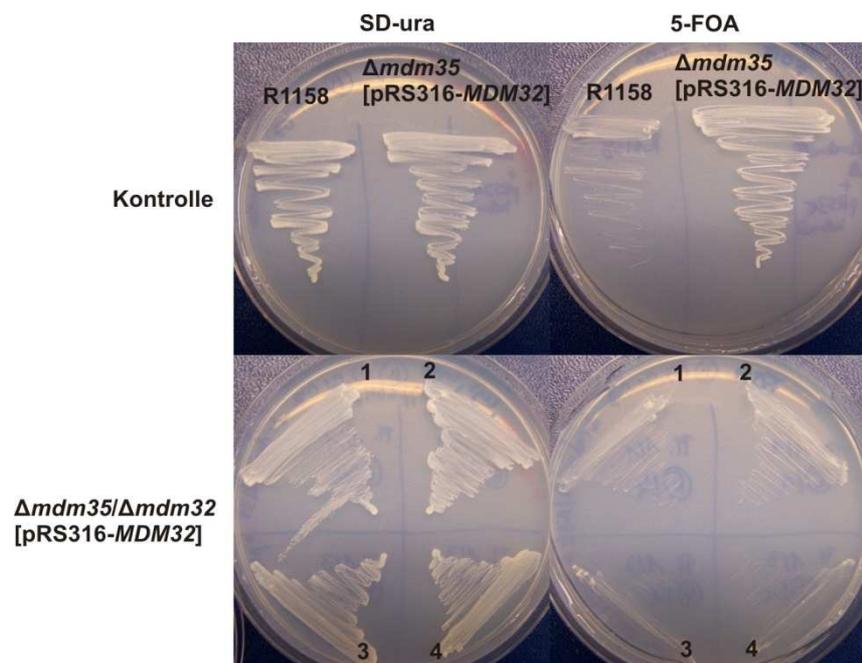


Abb.3-23: Der gleichzeitige Verlust von *MDM35* und *MDM31* bzw. *MDM32* ist synthetisch letal. (A) Exemplarische Tetradendissektionsplatte nach Sporulation des heterozygot diploiden Doppeldeletionsstammes $\Delta mdm35/\Delta mdm32$. Es gibt drei Aufspaltungsmöglichkeiten für einen heterozygot diploiden Doppeldeletionsstamm: *tetratype* (T), *nonparental ditype* (N), *parental ditype* (P). Das Aufspaltungsverhältnis liegt dabei bei 4:1:1 (T:N:P). (B) Das Wachstum von vier unabhängig voneinander erhaltenen haploiden Doppeldeletionsstämmen, die *Mdm32* plasmidal unter Kontrolle des endogenen Promotors (pRS316-*MDM32*; Kai Stefan Dimmer, Universität München, unpublizierte Daten) exprimieren, wurde auf SD- und 5-FOA-Platten untersucht. Als Kontrolle diente der haploide $\Delta mdm35$ -Stamm, der das Plasmid pRS316-*MDM32* trug und der Stamm R1158, der das *URA3*-Gen im Genom besitzt.

3.2.6 Mdm35 ist mitochondrial lokalisiert

Mdm35 ist ein Twin Cx₉C-Protein, dessen Deletion der kodierenden Sequenz zu einer defekten mitochondrialen Morphologie führt. Twin Cx₉C-Proteine teilen die Eigenschaft, dass sie vermutlich mitochondrial lokalisiert vorkommen (Longen *et al.*, 2009). Zur Untersuchung dieser Annahme wurde zunächst ein Antikörper gegen *Mdm35* hergestellt. Dazu wurde die kodierende Sequenz von *Mdm35* in den Vektor pQE40 kloniert. Dadurch wird die Expression eines *Mdm35*-Fusionsproteins, das N-terminal ein 6xHis-DHFR besitzt, möglich. Die

Überexpression des Mdm35-Fusionsproteins in *E. coli* wurde durch IPTG induziert. Sowohl vor der Induktion als auch nach der Induktion ist eine dominante Bande der Größe des Fusionsproteins (~36 kDa) auf dem Gel nach der SDS-PAGE sichtbar (Abb.3-24 A). Die Expression von Mdm35 mit dem pQE40-System ergab unlösliche Inclusion Bodies (Abb.3-24 A). Die Inclusion Bodies wurden isoliert und anschließend über Ni-NTA Agarose unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert. Es wurde der Durchfluss, die Waschfraktionen 1 und 2 und das Eluat 1 und 2 aufgetragen. Bei allen konnte eine Bande bei ~36 kDa detektiert werden, die dem Fusionsprotein entspricht (Abb.3-24 A). Nach der denaturierenden Aufreinigung des Fusionsproteins wurde zur Entfernung des Harnstoffes eine Dialyse durchgeführt und der Ansatz ebenfalls mittels SDS-PAGE untersucht (Abb.3-24 A). Das so erhaltene Antigen wurde zur Immunisierung von Kaninchen an die Firma BioGenes geschickt.

Das aus den Kaninchen erhaltene Antiserum wurde anschließend getestet. Hierzu wurde Gesamtzellextrakt des Wildtypstammes BY4742 (WT (GSZ)) verwendet, Gesamtzellextrakt aus einem Hefestamm mit Überexpression von Mdm35 (Mdm35[↑] (GSZ)) und isolierte Mitochondrien des Wildtypstammes BY4742 (WT Mitochondrien). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das Antiserum aus den Kaninchen wurde für den immunologischen Nachweis eingesetzt. In dem Gesamtzellextrakt aus dem Wildtypstamm konnte kein Mdm35 nachgewiesen werden, aber sowohl bei dem Gesamtzellextrakt mit Überexpression von Mdm35 als auch bei den aus dem Wildtyp isolierten Mitochondrien konnte eine Bande detektiert werden, die in etwa dem Molekulargewicht von Mdm35 (~9,7 kDa) entspricht (Abb.3-24 B). Vermutlich war die Konzentration von Mdm35 in dem wildtypischen Gesamtzellextrakt für die Detektion zu gering.

Die erhaltenen Daten deuten auf eine mitochondriale Lokalisation von Mdm35 hin. Aufgrund der fehlenden Kontrollen kann aber keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden. Allerdings wurde bereits von Gabriel *et al.* (2007) eine Lokalisation von Mdm35 im Intermembranraum nachgewiesen. Die hier beobachtete mitochondriale Lokalisation von Mdm35 stimmt mit dieser Tatsache überein.

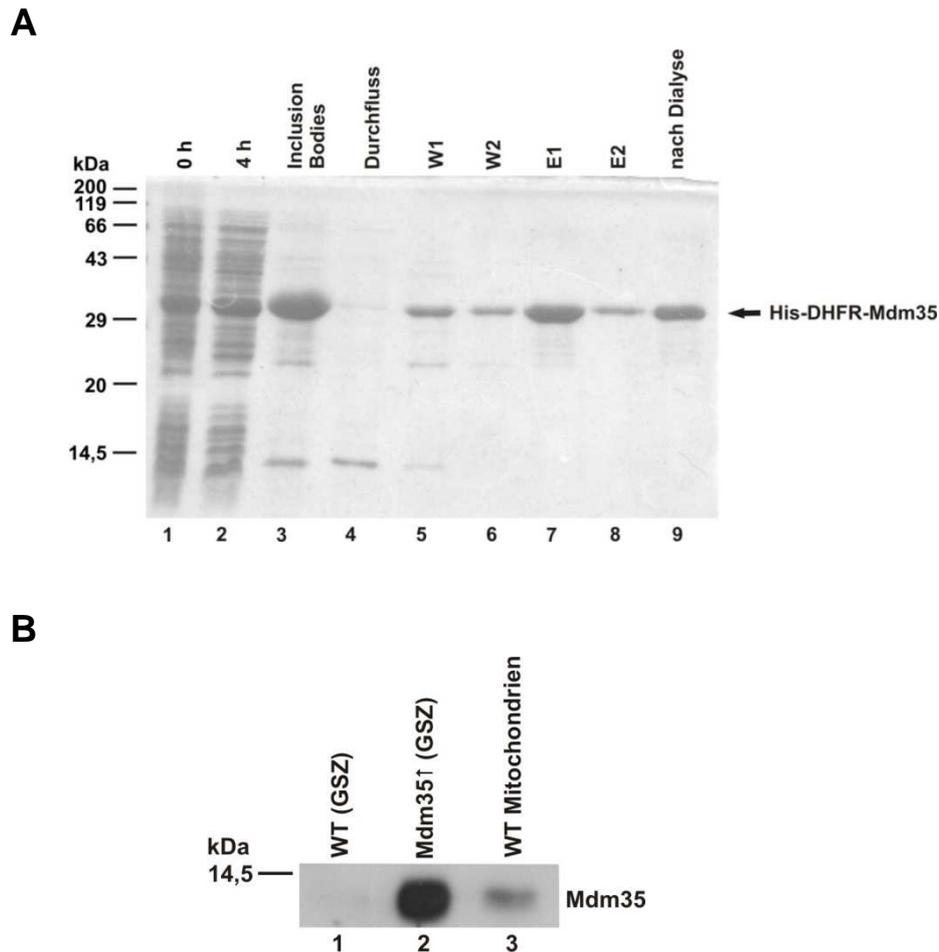


Abb.3-24: Mdm35 ist mitochondrial lokalisiert. (A) Zur Herstellung eines Antikörpers gegen Mdm35 wurde *MDM35* in den Vektor pQE40 kloniert, wodurch es zur Expression eines Mdm35-Fusionsproteins kommt. Dieses Fusionsprotein besitzt N-terminal ein 6xHis-DHFR (~36 kDa). Die Überexpression des Fusionsproteins wurde durch IPTG induziert. Die durch die Expression von Mdm35 mit dem pQE40-System erhaltenen Inclusion Bodies wurden unter denaturierenden Bedingungen über Ni-NTA Agarose gereinigt. Zur Entfernung des Harnstoffes wurde anschließend eine Dialyse durchgeführt. Alle gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Bahn 1: 0 h (vor Induktion), Bahn 2: 4 h (nach Induktion), Bahn 3: Inclusion Bodies, Bahn 4: Durchfluss bei Ni-NTA-Aufreinigung, Bahn 5: Waschfraktion 1 bei Ni-NTA-Aufreinigung, Bahn 6: Waschfraktion 2 bei Ni-NTA-Aufreinigung, Bahn 7: Eluat 1 bei Ni-NTA-Aufreinigung, Bahn 8: Eluat 2 bei Ni-NTA-Aufreinigung, Bahn 9: His-DHFR-Mdm35 nach der Dialyse (Antigen für die Immunisierung). **(B)** Es wurde Gesamtzellextrakt aus wildtypischen Hefezellen (Bahn 1) und aus Hefezellen, die Mdm35 überexprimieren (Bahn 2), isoliert sowie Mitochondrien aus Wildtypzellen (Bahn 3). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das durch Immunisierung der Kaninchen mit dem Antigen His-DHFR-Mdm36 erhaltene Antiserum wurde zum Nachweis von Mdm35 verwendet. In Bahn 2 (Überexpression von Mdm35) und 3 (wildtypische Mitochondrien) konnte Mdm35 (~9,7 kDa) mit dem Antiserum detektiert werden.

4 Diskussion

Die Morphologie und die dynamische Reorganisation des mitochondrialen Netzwerkes spielen eine essentielle Rolle für Funktion und Vererbung dieser Organellen. Zum besseren Verständnis der daran beteiligten Prozesse müssen die dazugehörigen Komponenten identifiziert und charakterisiert werden. In den letzten Jahrzehnten konnten einige an der mitochondrialen Morphogenese beteiligte Proteine durch genetische oder morphologische Screens identifiziert werden (Berger und Yaffe, 2000; Jensen *et al.*, 2000; Boldogh *et al.*, 2001b; Dimmer *et al.*, 2002; Mozdy und Shaw, 2003; Westermann, 2003; Merz *et al.*, 2007). Die Erforschung von zwei im Screen von Dimmer *et al.* (2002) entdeckten Kandidaten und ihre mögliche Eingliederung in den Morphogeneseapparat der Mitochondrien war Gegenstand dieser Arbeit.

4.1 Mdm36: Eine neue Komponente der mitochondrialen Teilungsmaschinerie

4.1.1 $\Delta mdm36$ -Mutanten besitzen eine reduzierte Teilungsaktivität

Mitochondrien bilden ein hoch dynamisches Netzwerk direkt unter dem Zellkortex aus, das durch ein Gleichgewicht an Fusions- und Teilungsereignissen bestimmt wird (Sesaki und Jensen, 1999; Shaw und Nunnari, 2002). Die Kernkomponenten beider Prozesse sind weitestgehend bekannt (Zusammenfassung in: Merz *et al.*, 2007; Westermann, 2008; Lackner und Nunnari, 2009). An der mitochondrialen Teilung der Außenmembran sind die Proteine Dnm1, Fis1, Mdv1 und Caf4 beteiligt. Num1 ist ein Protein, dem erst kürzlich eine Funktion in der mitochondrialen Teilung und Vererbung zugesprochen wurde (Cervený *et al.*, 2007). Teilungsmutanten bilden eine netzartige mitochondriale Morphologie aus. $\Delta mdm36$ -Mutanten zeigen analoge mitochondriale Strukturen. Lediglich die Anordnung der Maschen erschien im Vergleich zur $\Delta dnm1$ -Mutante unorganisierter. Die Erstellung eines 3D-Modells konnte den Phänotyp der $\Delta mdm36$ -Mutante nochmals bestätigen und die Ähnlichkeit zu den Teilungsmutanten hervorheben. Da ähnliche mitochondriale Phänotypen meist auf eine gemeinsame Funktion der Proteine hindeuten, liegt die Vermutung nahe, dass Mdm36 eine Rolle in der mitochondrialen Teilung übernimmt. Dennoch wird deutlich, dass in der *mdm36*-Deletionsmutante eine Restteilungsaktivität besteht, da organisierte Netze, wie sie in der $\Delta dnm1$ -Mutante häufig zu finden sind, nur etwa zu 10% in $\Delta mdm36$ vorkommen. Außerdem verhält sich die $\Delta dnm1$ -Mutation epistatisch zur $\Delta mdm36$ -Mutation. Das ist vereinbar mit der

Annahme, dass Dnm1 eine essentielle Teilungskomponente darstellt, während Mdm36 eine untergeordnete, unterstützende Funktion in der mitochondrialen Teilung übernimmt.

Durch Doppeldeletionsstudien konnte die Hypothese, dass Mdm36 antagonistisch zu Komponenten der mitochondrialen Fusionsmaschinerie agiert, weiter verifiziert werden. Das Fehlen einer Fusions- bzw. Teilungskomponente verschiebt das Gleichgewicht in Richtung Teilung (fragmentierte Mitochondrien, Verlust von mitochondrialer DNA) bzw. Fusion (netzartige Mitochondrien). Wird hingegen die Fusions- und Teilungsmaschinerie auf gleicher Ebene simultan blockiert, so bildet sich wieder ein wildtypisches mitochondriales Netzwerk aus, wie z.B. bei $\Delta dnm1/\Delta fzo1$ (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Die Deletion von *MDM36* und der Fusionskomponente *Fzo1* führt zu einer partiellen Rettung des mitochondrialen Phänotyps der $\Delta fzo1$ -Mutante. Im Gegensatz zu den in der gesamten Zelle verteilten mitochondrialen Fragmenten der $\Delta fzo1$ -Mutante sind in der Doppelmutante die Fragmente bzw. Aggregate auf einer Seite der Zelle lokalisiert. Die aggregierten, mitochondrialen Strukturen könnten dabei einen Übergangszustand der Teilung darstellen. Die Tatsache, dass die Deletion von *MDM36* im Gegensatz zu $\Delta dnm1$ (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999) nur zu einer teilweisen Reversion des mutanten $\Delta fzo1$ -Phänotyps führt, weist darauf hin, dass in Hefezellen, in denen die Morphologie bestimmende Komponente Mdm36 deletiert ist, die Teilungsaktivität lediglich reduziert und nicht komplett blockiert ist.

Die parallele Deletion von *MDM36* und *MDM30* stellte die Vermischung des mitochondrialen Matrixinhaltes wieder her. Mdm30 übernimmt eine regulatorische Funktion in der Fusion, indem es den Abbau der Fusionskomponente *Fzo1* vermittelt (Fritz *et al.*, 2003). In einem *in vivo* Fusionsnachweis konnte durch Fritz *et al.* (2003) bereits gezeigt werden, dass in $\Delta mdm30$ -Mutanten der Fusionsdefekt der Mitochondrien durch die zusätzliche Deletion der Teilungskomponente Dnm1 ebenfalls revertiert werden kann, was durch die reduzierte, aber nicht komplett gestörte, Fusionsaktivität der $\Delta mdm30$ -Mutante erklärbar ist. Die reduzierte Teilungsaktivität der *mdm36*-Deletion genügt also, um eine stark vernetzte Mitochondrienmorphologie hervorzurufen, bei der ein einziges Fusionsereignis zur Vermischung des mitochondrialen Matrixinhaltes ausreichend ist.

Ein weiteres Argument für eine Beteiligung von Mdm36 an der Teilung der Mitochondrien konnte durch die Behandlung von Hefezellen mit dem Toxin Latrunculin A erzielt werden. Dieses Gift führt zum Abbau des Aktinzytoskeletts und zu einer Dnm1-abhängigen Fragmentierung der Mitochondrien (Ayscough *et al.*, 1997; Boldogh *et al.*, 1998). Hefezellen, in denen eine Teilungskomponente blockiert ist, sollten somit - wie für $\Delta dnm1$ -

und $\Delta mdv1$ -Mutante bereits experimentell belegt ist (Jensen *et al.*, 2000; Cervený *et al.*, 2001) - ihre mitochondrialen netzartigen Strukturen beibehalten. Auch in der $\Delta mdm36$ -Mutante war keine Fragmentierung der Mitochondrien zu beobachten. Analog zu den Teilungsmutanten waren immer noch die charakteristischen netzähnlichen Mitochondrien detektierbar.

Die Schlüsselkomponente der mitochondrialen Teilung ist die Dynamin-verwandte GTPase Dnm1. Zytoplasmatisches Dnm1 assembliert als punktförmige Strukturen an den Mitochondrien (Otsuga *et al.*, 1998). In Hefe sind mittlerweile drei Möglichkeiten bekannt, wie Dnm1 gezielt an die Außenmembran der Mitochondrien gebracht werden kann: 1) Fis1/Mdv1-abhängig, 2) Fis1/Caf4-abhängig und 3) Num1-abhängig (Lackner und Nunnari, 2009). Wenn Mdm36 ein Bestandteil der Teilungsmaschinerie der Mitochondrien ist, dann könnte das Protein ebenfalls einen Einfluss auf die Dnm1-Assemblierung und/oder auf die teilungsaktiven Dnm1-Komplexe ausüben. Aus diesem Grund wurde zum einen die Anzahl der Dnm1-GFP-Cluster pro μm^3 an den Mitochondrien (Dnm1-Assemblierung) bestimmt und zum anderen die Anzahl der Dnm1-GFP-Cluster pro Schlauchende/Ende eines Mitochondrientubulus (teilungsaktive Dnm1-Komplexe). Die Quantifizierung der mitochondrial lokalisierten Dnm1-GFP-Cluster in der $mdm36$ -Deletionsmutante zeigte, dass kein großer Einfluss auf die Dnm1-Assemblierung besteht. Deutlicher wurde der Einfluss von Mdm36 auf die Teilungsaktivität. In der $\Delta mdm36$ -Mutante war die Anzahl an Dnm1-GFP-Punkten pro Schlauchende um ~44% auf YPD-Medium und ~58% auf YPG-Medium niedriger als im Vergleichswildtyp. Die Bildung von teilungsaktiven Dnm1-Komplexen scheint also primär durch das Fehlen von Mdm36 gestört zu sein.

Die bereits diskutierten Beobachtungen sprechen für eine Funktion von Mdm36 als mitochondriale Teilungskomponente. Voraussetzung für solch eine Funktion ist eine mitochondriale Lokalisation bzw. Assoziation des Proteins. Deshalb sollte diese experimentell überprüft werden. Durch den Flotationsversuch mit radioaktiv markiertem Mdm36 wurde gezeigt, dass das Protein mit den Mitochondrien assoziiert vorliegt. Dabei wird die Assoziation vermutlich über Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, woran aber weder Dnm1, Num1 noch Mdm36 beteiligt zu sein scheinen. Diese Protein-Protein-Interaktion könnte über die vorhergesagte Coiled-Coil-Region eingegangen werden. Eine genauere Aussage kann allerdings nur getroffen werden, wenn eine Kolo-kalisation bzw. eine Interaktion von Mdm36 mit einem Protein nachgewiesen werden würde. Da allerdings kein endogen exprimiertes, fluoreszenzmarkiertes Mdm36-Fusionsprotein herstellbar war und auch kein Antikörper gegen Mdm36 produziert werden konnte, bleibt diese Frage noch offen.

4.1.2 In *mdm36*-Deletionsmutanten ist die Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex gestört

Der mitochondriale Phänotyp der $\Delta dnm1$ - und der $\Delta mdm36$ -Mutante ist zwar sehr ähnlich, kann aber aufgrund des weniger ausgeprägten Netzanteils in der *mdm36*-Deletionsmutante klar unterschieden werden. Im Gegensatz dazu sind die Mitochondrienmorphologien der $\Delta num1$ -Mutante, der $\Delta mdm36$ -Mutante und der Doppelmutante $\Delta num1/\Delta mdm36$ phänotypisch praktisch identisch. Das lässt vermuten, dass beide Proteine am gleichen zellulären Prozess beteiligt sind. Ursprünglich wurde das Zellkortex-assoziierte Num1 als ein Protein identifiziert, das die Segregation des Zellkerns vermittelt (Kormanec *et al.*, 1991). Durch Dimmer *et al.* (2002) und Sickmann *et al.* (2003) wurde Num1 zusätzlich eine Funktion in der mitochondrialen Morphogenese zugeschrieben, die durch Cervený *et al.* (2007) der mitochondrialen Teilung und Verteilung zugeordnet werden konnte. Das aktuelle Modell geht davon aus, dass die durch Fis1/Caf4-vermittelte Zellkortex-orientierte Rekrutierung von Dnm1 eine Funktion bei der Bindung der Mitochondrien über Num1 an den Zellkortex übernimmt (Schauss *et al.*, 2006; Cervený *et al.*, 2007; Schauss und McBride, 2007). In dieser Arbeit wurden Hinweise gefunden, die zeigen, dass Mdm36 ebenfalls eine Funktion in der Zellkortexverankerung der Mitochondrien einnimmt.

Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, ob Mdm36 an der Aufhängung der Mitochondrien beteiligt ist, wurde die Anordnung der Mitochondrien in Bezug auf Zellwandnähe analysiert. Bei der Betrachtung von $\Delta mdm36$ - und $\Delta num1$ -Zellen, in denen sowohl die Zellwand mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und die Mitochondrien stabil mit mtRFP markiert waren, wurde deutlich, dass die Mitochondrien der Mutante nur wenig Nähe zur Zellwand zeigen. In wildtypischen Hefezellen verläuft das mitochondriale Netzwerk direkt unter dem Zellkortex, daher zeigen die elongierten Tubuli große Nähe zur gefärbten Zellwand. Entlang dieser Tubuli können viele Aufhängepunkte mit dem Zellkortex bestehen. In der $\Delta mdm36$ - und in der $\Delta num1$ -Mutante liegen die Mitochondrien hingegen als kompakte, netzähnliche Strukturen vor, die nur an ein bis zwei Stellen Nähe und einen möglichen Kontakt zum Zellkortex bieten. Beide Proteine scheinen folglich für die Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex verantwortlich zu sein. Welche Aufgabe Mdm36 dabei übernimmt ist allerdings noch unklar.

Neben der verringerten Nähe zur Zellwand wurde sowohl in der $\Delta mdm36$ - als auch in der $\Delta num1$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine fast doppelt so hohe Geschwindigkeit der Mitochondrien dokumentiert. Während die Mitochondrien in wildtypischen Hefezellen relativ starr und unbeweglich waren, unterlagen die Mitochondrien der Mutanten stetigen,

schnellen Veränderungen. Die erhöhte Dynamik der Mitochondrien in den Einzelmutanten könnte ebenfalls für eine gestörte Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex sprechen. Aufhängepunkte an dem Zellkortex würden das mitochondriale Netzwerk stabilisieren und als eine Art Stütze bzw. Gerüst wirken. Die Störung dieser Aufhängung des mitochondrialen Netzwerkes würde zumindest die einseitig lokalisierten, mitochondrialen Strukturen in $\Delta mdm36$ - und $\Delta num1$ -Mutanten sowie in den $\Delta dnm1$ - und $\Delta fis1$ -Mutanten erklären. Möglicherweise ist die zusätzliche Bindung an den Zellkortex für eine koordinierte Bewegung der Mitochondrien nötig. Das Fehlen der Bindung an den Zellkortex könnte somit zu einer unkoordinierteren und schnelleren Bewegung entlang der Aktinkabel führen.

Aufgrund des ähnlichen mitochondrialen Phänotyps der $\Delta mdm36$ - und $\Delta num1$ -Deletionsmutanten und der in den vorhergehenden Versuchen beobachteten ebenfalls gestörten Bindung der Mitochondrien an den Zellkortex in der $\Delta mdm36$ -Mutante wäre es denkbar, dass Mdm36 die Interaktion von Num1 und Dnm1 fördert. Cervený *et al.* (2007) berichteten, dass ungefähr 70% der Num1-RFP-Punkte mit den Dnm1-GFP-Punkten kolokalisieren. Ein ähnliches Bild ergab sich im Rahmen dieser Arbeit bei der Betrachtung der Num1-RFP- und Dnm1-GFP-Kolokalisation in wildtypischen Hefezellen. Im Gegensatz dazu war die Kolokalisation von Num1-RFP und Dnm1-GFP in $\Delta mdm36$ -Zellen kaum noch detektierbar. Während im Vergleichswildtyp beide fluoreszierenden Foci in sehr starker räumlicher Nähe zueinander standen, konnten in der Mutante wenige Num1-RFP- und Dnm1-GFP-Punkte in enger Nachbarschaft festgestellt werden. Der mitochondriale Phänotyp der $\Delta mdm36$ -Mutante steht im Einklang mit dieser Beobachtung. Die eher einseitig bzw. zur Zellmitte hin lokalisierten Mitochondrien würden eine derartige Kolokalisation des mitochondrial assemblierten Dnm1 und des Zellkortex-assoziierten Num1 gar nicht zulassen. Dennoch stellt sich die Frage, ob die durch die Deletion von *MDM36* hervorgerufene Änderung der mitochondrialen Morphologie die Bindung zum Zellkortex stört oder ob die gestörte mitochondriale Zellkortexverankerung den mutanten mitochondrialen Phänotyp hervorruft. Da aber die $\Delta num1$ -Mutante eine ähnliche mitochondriale Morphologie aufweist und Num1 im Zellkortex verankert ist und außerdem mit mitochondrial assemblierten Dnm1 interagiert, kann man davon ausgehen, dass Letzteres der Fall ist. Folglich scheinen Mdm36, Num1 und Dnm1 durch ihre gemeinsame Aktivität für die Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex verantwortlich zu sein.

Zwei weitere Aspekte sind Indizien für die Funktion von Mdm36 bei der Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex. Erstens führte die gleichzeitige Deletion von *MDM36* und von der postulierten Innenmembranteilungskomponente Mdm33 zu einem intermediären

mitochondrialen Phänotyp bestehend aus netzähnlichen Mitochondrien, die für die $\Delta m d m 3 6$ -Einzelmutante charakteristisch sind, und aus ringähnlichen Mitochondrien, die in der $\Delta m d m 3 3$ -Mutante zu beobachten sind. In diesem Fall wirkt sich $\Delta m d m 3 3$ nicht epistatisch zu $\Delta m d m 3 6$ aus, so wie es für $\Delta m d m 3 3$ und die Außenmembranteilungsmutante $\Delta f i s 1$ ersichtlich war (Messerschmitt *et al.*, 2003). Es scheinen also beide Proteine in ihren Funktionen vergleichbar wichtig zu sein. Für die Teilung der Außenmembran wurde gezeigt, dass zunächst eine Einschnürung des Mitochondrientubulus stattfinden muss, was vermutlich durch die Mdm33-vermittelte Teilung der Innenmembran erreicht wird (Messerschmitt *et al.*, 2003). Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass sich $\Delta m d m 3 3$ epistatisch zu $\Delta f i s 1$ verhält. Wenn Mdm36 aber eine zusätzliche Funktion in der Aufhängung der Mitochondrien am Zellkortex besitzt und beide Prozesse (Teilung der Innenmembran und Zellkortexbindung) gleich wichtig sind, dann wäre eine intermediäre Mitochondrienmorphologie, wie sie in der $\Delta m d m 3 3 / \Delta m d m 3 6$ -Mutante dokumentiert wurde, nicht unrealistisch.

Zweitens konnte in der $\Delta f z o 1 / \Delta m d m 3 6$ -Doppelmutante eine andere Verteilung der Mitochondrien erfasst werden. Im Gegensatz zu den in der gesamten Zelle verteilten mitochondrialen Fragmenten der $\Delta f z o 1$ -Mutante, waren in der Doppelmutante die Fragmente bzw. Aggregate auf einer Seite der Zelle lokalisiert. Eine einseitige Lokalisation der Mitochondrien ist auch in der $\Delta m d m 3 6$ -Mutante zu beobachten. Interessanterweise besitzen die Teilungsmutanten $\Delta d n m 1$, $\Delta f i s 1$ und $\Delta n u m 1$ zu einer Seite der Zelle kollabierte, mitochondriale Netze (Cervený *et al.*, 2001; Griffin *et al.*, 2005; Cervený *et al.*, 2007). Da für Num1 eine Rolle bei der Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex postuliert wird, wobei Num1 diese Funktion über die Interaktion mit Dnm1 ausübt (Cervený *et al.*, 2007), könnte eine einseitige Lokalisation der Mitochondrien auf eine Störung der Zellkortexbindung zurückzuführen sein. Mdm36 scheint somit für die Ausbildung des Num1-Dnm1-Komplexes unerlässlich zu sein.

4.1.3 Der Einfluss der mitochondrialen Zellkortexverankerung auf die Teilung

Die Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Verteilung der Mitochondrien während der Zellteilung, sondern auch bei der mitochondrialen Teilung (Cervený *et al.*, 2007; Schauss und McBride, 2007). In Abwesenheit von Num1 ist die mitochondriale Teilung verringert, aber nicht komplett gestört, wie es der Fall in der Teilungsmutante von Dnm1 ist. Num1 stellt durch seine Interaktion mit Dnm1 eine Verbindung zwischen mitochondrialer Teilung und Verteilung her, die dadurch gegeben ist,

dass das Zellkortex-assoziierte Num1 außerdem noch an den Aktinnukleator Bni1 bindet (Evangelista *et al.*, 2003). Interessanterweise ist für die Teilung von Membranen durch Dynamin die Erzeugung von Spannung auf die Membranen entscheidend (Roux *et al.*, 2006). Infolgedessen ist eine Interaktion der Mitochondrien mit dem Aktinzytoskelett für deren Teilung von großer Bedeutung. Es wurde vorgeschlagen, dass über den Num1/Dnm1-Zellkortexanker zusammen mit der Dynamik des Aktinzytoskeletts die nötige Spannung entlang des Mitochondrientubulus erzeugt werden kann, die zusammen mit der Einschnürung (*constriction*) des Mitochondrientubulus für eine durch die Dnm1/Fis1/Mdv1-Maschinerie vermittelte Membranteilung wichtig ist (Schauss und McBride, 2007; Lackner und Nunnari, 2009). Die in dieser Arbeit erbrachten Beweise unterstützen dieses Modell und fügen Mdm36 als eine neue Komponente diesem Prozess hinzu. Wie genau Mdm36 daran beteiligt ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Denkbar wäre, dass Mdm36 zwischen Dnm1 und Num1 als Interaktionspartner fungiert. Da aber die endogene Expression eines Mdm36-Fusionsproteins (mit einem C-terminalen GFP- bzw. HA-Tag) zu schwach und nicht detektierbar war und auch kein Antikörper gegen Mdm36 produziert werden konnte (unveröffentlichte Daten), eine Interaktion also nicht nachweisbar war, bleibt dies nur eine Vermutung. Weil der Verlust von Mdm36 aber die Bindung zwischen Num1 und Dnm1 stört, scheint Mdm36 für die Bildung des Num1/Dnm1-Komplexes benötigt zu werden. Infolgedessen gehen in der $\Delta mdm36$ -Mutante die Aufhängepunkte für die Mitochondrien am Zellkortex verloren, worin auch die erhöhte Dynamik/Gestaltveränderung und die veränderte Verteilung der Mitochondrien begründet liegen. Der Verlust der mitochondrialen Zellkortexverankerung in der *mdm36*-Deletionsmutante führt letztendlich auch zu einer geringeren Teilungseffizienz des Dnm1/Fis1/Mdv1-Komplexes, da die für die mitochondriale Teilung nötige Spannung über den Num1/Dnm1-Komplex nicht erzeugt werden kann. Der mitochondriale Phänotyp und die reduzierte Anzahl an teilungsaktiven Dnm1-Komplexen in der Mutante sprechen eindeutig dafür.

4.2 Mdm35: Eine neue Morphologiekomponente

Mdm35 ist ein Protein, das einerseits von Dimmer *et al.* (2002) als ein Protein identifiziert wurde, das die mitochondriale Verteilung und Morphologie bestimmt, und andererseits durch Longen *et al.* (2009) als ein Twin Cx₉C-Protein. In beiden Ansätzen konnte in der $\Delta mdm35$ -Mutante eine veränderte mitochondriale Morphologie beobachtet werden. Die Deletionsmutante von *MDM35* weist starke phänotypische Ähnlichkeiten zu Mutanten auf, denen entweder die Komponente Mmm1 bzw. die mitochondrialen

Außenmembrankomponenten Mmm2, Mdm10 und Mdm12 oder die Innenmembrankomponenten Mdm31 und Mdm32 fehlen (Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994; Berger *et al.*, 1997; Boldogh *et al.*, 1998; Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003; Youngman *et al.*, 2004; Dimmer *et al.*, 2005). Anstelle des tubulären mitochondrialen Netzwerkes besitzen alle Deletionsmutanten meist sphärische Mitochondrien, die oft zytosolische Einschlüsse beherbergen. Das mitochondriale Genom ist instabil und geht in allen Deletionsstämmen nach einigen Generationen verloren. Der Verlust von mtDNA ist auch charakteristisch für Fusionsmutanten. Die $\Delta mdm35$ -Mutante zeigte allerdings keinerlei Einschränkungen in ihrer Fusionseffizienz, womit Mdm35 als Fusionskomponente ausgeschlossen werden kann. In den Deletionsmutanten $\Delta mmm1$, $\Delta mmm2$, $\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$, $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$ wurde auch eine veränderte Nukleoidstruktur festgestellt. Im Gegensatz zu den ~10-15 mtDNA-Nukleoiden in Wildtypzellen findet man in diesen Mutanten oft nur ein bis zwei diffuse mtDNA-Strukturen, die stark vergrößert sind (Berger *et al.*, 1997; Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003; Youngman *et al.*, 2004; Dimmer *et al.*, 2005). Die $\Delta mdm35$ -Mutante besitzt ebenfalls teilweise abnorme und vergrößerte Nukleoidstrukturen, dennoch waren diese nicht ganz so groß wie die der anderen Mutanten.

Phänotypische Ähnlichkeiten sind oft ein Hinweis auf eine ähnliche Funktion. Dies wird durch die synthetische Letalität bei einer gleichzeitigen Deletion von *MDM35* und *MDM31* oder *MDM32* noch untermauert. Für *MDM31* und *MDM32* konnte außerdem eine synthetische Letalität mit *MMM1*, *MMM2*, *MDM10* und *MDM12* nachgewiesen werden (Dimmer *et al.*, 2005). Für Mdm35 wurde bis heute solch eine Beziehung noch nicht gezeigt. Der Versuch in der $\Delta mdm35$ -Mutante zusätzlich *MMM1*, *MMM2*, *MDM10* bzw. *MDM12* zu deletieren, würde klären, ob hier ebenfalls ein synthetisch letales Verhältnis besteht.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten führen zu der Annahme, dass zumindest Mdm35 und Mdm31 bzw. Mdm32 an einem gleichen Prozess beteiligt sind. Da bereits für Mdm31 und Mdm32 postuliert wurde, dass sie zusammen mit Mmm1, Mmm2, Mdm10 und Mdm12 ebenfalls an einem gleichen die mitochondriale Morphologie beeinflussenden Prozess beteiligt sind (Dimmer *et al.*, 2005), kann man davon ausgehen, dass Ähnliches für Mdm35 der Fall ist. Es wird angenommen, dass für die Vererbung von mtDNA ein membrandurchspannender Komplex bestehend aus den Proteinen Mmm1, Mdm10 und Mdm12 verantwortlich ist (Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003). Von Dimmer *et al.* (2005) wurden die beiden Innenmembranproteine Mdm31 und Mdm32 zu diesem Komplex hinzugefügt. Dieser Komplex stellt somit eine Verknüpfung zwischen der mtDNA

und dem Zytosol her. Von Kornmann *et al.* (2009) konnte hingegen gezeigt werden, dass es sich bei dem Protein Mmm1 nicht wie angenommen um ein mitochondriales Außenmembranprotein handelt, sondern um ein integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Zusammen mit den Proteinen Mmm2, Mdm10 und Mdm12 bildet Mmm1 einen Komplex aus, der eine Bindung zwischen ER und Mitochondrien herstellt (ERMES = *ER-mitochondria encounter structure*) und vermutlich für den Austausch von Calcium und Phospholipiden zuständig ist. Dieser Komplex befindet sich außerdem in Nachbarschaft aktiv replizierender mitochondrialer DNA. Da für Mdm35 ebenfalls eine Rolle im Lipidmetabolismus (Osman *et al.*, 2009) angenommen wird und das Protein im Intermembranraum lokalisiert ist (Gabriel *et al.*, 2007), wäre eine Funktion bei der Vermittlung zwischen der mitochondrialen Außen- und Innenmembran für Mdm35 denkbar. Folglich wäre der ERMES-Komplex mit den Innenmembranproteinen Mdm31 und Mdm32 und dadurch mit dem mitochondrialen Genom verbunden und gezieltes mitochondriales Wachstum - durch Kopplung der mtDNA-Replikation mit der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Membran über den Lipidtransport - wäre möglich. Eine regulative Rolle von Mdm35 bei der Lipidhomöostase ist ebenfalls nicht auszuschließen. Weitere Untersuchungen werden sicherlich bald mehr Aufschluss geben.

5 Literaturverzeichnis

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., and Ram, S.J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophot Int* 11, 36-42.
- Adams, A.E., und Pringle, J.R. (1984). Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 98, 934-945.
- Adams, K.L., und Palmer, J.D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol* 29, 380-395.
- Aiken Hobbs, A.E., Srinivasan, M., McCaffery, J.M., und Jensen, R.E. (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol* 152, 401-410.
- Altmann, K., und Westermann, B. (2005). Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16, 5410-5417.
- Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., und Drubin, D.G. (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* 137, 399-416.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., und Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Bauer, C., Herzog, V., und Bauer, M.F. (2001). Improved technique for electron microscope visualization of yeast membrane structure. *Microsc Microanal* 7, 530-534.
- Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* 122, 1-63.
- Berger, K.L., 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.
- Berger, K.H., und Yaffe, M.P. (2000). Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol* 8, 508-513.
- 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.
- 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., Yang, H.-C., Nowakowski, W.D., Karmon, S.L., Hays, L.G., Yates III, J.R., und Pon, L.A. (2001a). Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3162-3167.
- Boldogh, I.R., Yang, H.-C., und Pon, L.A. (2001b). Mitochondrial inheritance in budding yeast. *Traffic* 2, 368-374.
- 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.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., und Pfanner, N. (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* 9, 42-49.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., und Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.

- 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.
- Burgess, S.M., Delannoy, M., and Jensen, R.E. (1994). *MMMI* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol* 126, 1375-1391.
- Burke, D., Dawson, D., and Stearns, T. (2000). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Carr, H.S., and Winge, D.R. (2003). Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res* 36, 309-316.
- Cervený, K.L., McCaffery, J.M., and Jensen, R.E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DNMI1-interacting protein, *Net2p*. *Mol Biol Cell* 12, 309-321.
- Cervený, K.L., and Jensen, R.E. (2003). The WD-repeats of *Net2p* interact with *Dnm1p* and *Fis1p* to regulate division of mitochondria. *Mol Biol Cell* 14, 4126-4139.
- Cervený, K.L., Studer, S.L., Jensen, R.E., and Sesaki, H. (2007). Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical *num1* protein. *Dev Cell* 12, 363-375.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252.
- Chen, X.J., Guan, M.X., and Clark-Walker, G.D. (1993). *MGM101*, a nuclear gene involved in maintenance of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21, 3473-3477.
- Cohen, M.M., Leboucher, G.P., Livnat-Levanon, N., Glickman, M.H., and Weissman, A.M. (2008). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell* 19, 2457-2464.
- Daum, G., Böhni, P.C., and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. *J Biol Chem* 257, 13028-13033.
- Diffley, J.F., and Stillman, B. (1991). A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein *HMG1* in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7864-7868.
- Diffley, J.F., and Stillman, B. (1992). DNA binding properties of an *HMG1*-related protein from yeast mitochondria. *J Biol Chem* 267, 3368-3374.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., and Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 847-853.
- Dimmer, K.S., Jakobs, S., Vogel, F., Altmann, K., and 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.
- Dimmer, K.S., and Scorrano, L. (2006). (De)constructing mitochondria: what for? *Physiology* 21, 233-241.
- Drubin, D.G., Jones, H.D., and Wertman, K.F. (1993). Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin binding site. *Mol Biol Cell* 4, 1277-1294.
- Dürr, M., Escobar-Henriques, M., Merz, S., Geimer, S., Langer, T., and Westermann, B. (2006). Nonredundant roles of mitochondria-associated F-box proteins *Mfb1* and *Mdm30* in maintenance of mitochondrial morphology in yeast. *Mol Biol Cell* 17, 3745-3755.
- Egner, A., Jakobs, S., and Hell, S.W. (2002). Fast 100 nm resolution 3D-microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 3370-3375.
- Ephrussi, B., Hottinguer, H., and Tavlitzi, J. (1949). Action de l'acriflavine sur les levures II. Étude génétique du mutant "petite colonie". *Ann Inst Pasteur* 76, 419-442.

- Escobar-Henriques, M., Westermann, B., und Langer, T. (2006). Regulation of mitochondrial fusion by the F-box protein Mdm30 involves proteasome-independent turnover of Fzo1. *J Cell Biol* 173, 645-650.
- Esser, K., Tursun, B., Ingenhoven, M., Michaelis, G., and Pratje, E. (2002). A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J Mol Biol* 323, 835-843.
- Evangelista, M., Zigmond, S., und Boone, C. (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci* 116, 2603-2611.
- Farkasovsky, M., und Küntzel, H. (1995). Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions. *J Cell Biol* 131, 1003-1014.
- 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.
- Ford, S.K., und Pringle, J.R. (1991). Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC11 gene product and the timing of events at the budding site. *Dev Genet* 12, 281-292.
- Foury, F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene *MIP1* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 264, 20552-20560.
- Foury, F., und Kucej, M. (2002). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* 6, 106-111.
- Frazier, A.E., Taylor, R.D., Mick, D.U., Warscheid, B., Stoepel, N., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Guiard, B., and Rehling, P. (2006). Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol* 172, 553-564.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., und Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* 152, 683-692.
- Fritz, S., Weinbach, N., und Westermann, B. (2003). Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 2303-2313.
- Gabriel, K., Milenkovic, D., Chacinska, A., Muller, J., Guiard, B., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2007). Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway. *J Mol Biol* 365, 612-620.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W., und Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387-391.
- Gietz, D., Jean, A.S., Woods, R.A., und Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl Acids Res* 20, 1425.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., und Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546-552.
- Gray, M.W., Burger, G., und Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Green, D.R., und Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

- Griffin, E.E., Graumann, J., und Chan, D.C. (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* 170, 237-248.
- Grivell, L.A. (1995). Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 121-164.
- Guarente, L. (1993). Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool come of age. *Trends Genet* 9, 362-366.
- Güldener, U., Münsterkötter, M., Kastenmüller, G., Strack, N., van Helden, J., Lemer, C., Richelles, J., Wodak, S.J., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortin, J.E., Michael, H., Kaps, A., Talla, E., Dujon, B., Andre, B., Souciet, J.L., De Montigny, J., Bon, E., Gaillardin, C., und Mewes, H.W. (2005). CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. *Nucleic Acids Res* 33, D364-368.
- Hales, K.G., und Fuller, M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.
- Hartman, J.L., Garvik, B., und Hartwell, L. (2001). Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 291, 1001-1004.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., und Reichert, A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 278, 27781-27788.
- Hermann, G.J., und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev Biol* 14, 265-303.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143, 359-373.
- Herrmann, J.M., und Hell, K. (2005). Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 30, 205-211.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52, 536-553.
- Hoffmann, H.-P., und Avers, C.J. (1973). Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science* 181, 749-750.
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., und Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* 347, 44-49.
- Hoppins, S., Lackner, L., und Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 751-780.
- Hoppins, S., Horner, J., Song, C., McCaffery, J.M., und Nunnari, J. (2009). Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol* 184, 569-581.
- 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.
- 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.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., und Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-962.
- Jensen, R.E., Aiken Hobbs, A.E., Cervený, K.L., und Sesaki, H. (2000). Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc Res Tech* 51, 573-583.

- Jones, B.A., und Fangman, W.L. (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* 6, 380-389.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., und Holmes, K.C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347, 37-44.
- 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.
- Kilmartin, J.V., und Adams, A.E. (1984). Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J Cell Biol* 98, 922-933.
- Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janaky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Rotte, C., und Lill, R. (2005). Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J* 24, 589-598.
- Koehler, C.M. (2004). New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 309-335.
- Kormanec, J., Schaaff-Gerstenschlager, I., Zimmermann, F.K., Perecko, D., und Kuntzel, H. (1991). Nuclear migration in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the highly repetitive 313 kDa NUM1 protein. *Mol Gen Genet* 230, 277-287.
- 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.
- Kremer, J.R., Mastrorarde, D.N., und McIntosh, J.R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 116, 71-76.
- 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., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., LeHoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe,

- T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., und Chen, Y.J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- 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.
- Legesse-Miller, A., Massol, R.H., und Kirchhausen, T. (2003). Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 14, 1953-1963.
- Lill, R., und Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 30, 133-141.
- Longen, S., Bien, M., Bihlmaier, K., Kloeppe, C., Kauff, F., Hammermeister, M., Westermann, B., Herrmann, J.M., und Riemer, J. (2009). Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family. *J Mol Biol* 393, 356-368.
- Lupas, A., Van Dyke, M., und Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.
- Mannella, C.A. (2008). Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 171-179.
- McQuibban, G.A., Saurya, S., und Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423, 537-541.
- Meeusen, S., Tieu, Q., Wong, E., Weiss, E., Schieltz, D., Yates, J.R., und Nunnari, J. (1999). Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *J Cell Biol* 145, 291-304.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., und Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.
- Merz, S., Hammermeister, M., Altmann, K., Dürr, M., und Westermann, B. (2007). Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem* 388, 917-926.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K.S., Neupert, W., und Westermann, B. (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 160, 553-564.
- Milligan, R.A., Whittaker, M., und Safer, D. (1990). Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* 348, 217-221.
- Mozdy, A., McCaffery, J.M., und Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fusion is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151, 367-379.
- Mozdy, A.D., und Shaw, J.M. (2003). A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 468-478.
- Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D., und Botstein, D. (1994). Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J Cell Biol* 125, 381-391.
- Neupert, W., und Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 723-749.
- Neutzner, A., und Youle, R.J. (2005). Instability of the mitofusin Fzo1 regulates mitochondrial morphology during the mating response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 18598-18603.
- Nunnari, J., und Walter, P. (1996). Regulation of organelle biogenesis. *Cell* 84, 389-394.

- 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.
- Okamoto, K., und Shaw, J.M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39, 503-536.
- Osman, C., Haag, M., Potting, C., Rodenfels, J., Dip, P.V., Wieland, F.T., Brügger, B., Westermann, B., and Langer, T. (2009). The genetic interactome of prohibitins links their function to cardiolipin and phosphatidylethanolamine in mitochondria. *J Cell Biol* 184, 583-596.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W., und Shaw, J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 143, 333-349.
- Otterbein, L.R., Graceffa, P., und Dominguez, R. (2001). The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293, 708-711.
- Perfettini, J.L., Roumier, T., und Kroemer, G. (2005). Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 15, 179-183.
- 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., Muller, H.K., Harmey, M.A., und Neupert, W. (1987). Mitochondrial protein import: involvement of the mature part of a cleavable precursor protein in the binding to receptor sites. *EMBO J* 6, 3449-3454.
- Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C., und Lithgow, T. (2004). Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1044-1048.
- Pollard, T.D., und Cooper, J.A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* 55, 987-1035.
- Praefcke, G.J., und McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 133-147.
- 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.
- Pruyne, D.W., Schott, D.H., und Bretscher, A. (1998). Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J Cell Biol* 143, 1931-1945.
- 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.
- 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.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A., und De Camilli, P. (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441, 528-531.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science* 283, 1488-1493.
- Schapira, A.H. (2006). Mitochondrial disease. *Lancet* 368, 70-82.
- Schapira, A.H. (2008). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 33, 2502-2509.

- Schauss, A.C., Bewersdorf, J., und Jakobs, S. (2006). Fis1p and Caf4p, but not Mdv1p, determine the polar localization of Dnm1p clusters on the mitochondrial surface. *J Cell Sci* 119, 3098-3106.
- Schauss, A.C., und McBride, H.M. (2007). Mitochondrial fission: a non-nuclear role for Num1p. *Curr Biol* 17, R467-470.
- Scheffler, I.E. (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1, 3-31.
- Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H.D., Schwappach, B., and Weissman, J.S. (2008). The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* 134, 634-645.
- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C., und Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 365, 810-816.
- Seeley, E.S., Kato, M., Margolis, N., Wickner, W., und Eitzen, G. (2002). Genomic analysis of homotypic vacuole fusion. *Mol Biol Cell* 13, 782-794.
- Sesaki, H., und Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol* 147, 699-706.
- Sesaki, H., und Jensen, R.E. (2001). *UGO1* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 152, 1123-1134.
- Sever, S., Muhlberg, A.B., und Schmid, S.L. (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 398, 481-486.
- Shaw, J.M., und Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol* 12, 178-184.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., und Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13207-13212.
- Sikorski, R.S., und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- 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.
- Singer, J.M., Hermann, G.J., und Shaw, J.M. (2000). Suppressors of *mdm20* in yeast identify new alleles of *ACT1* and *TPM1* predicted to enhance actin-tropomyosin interactions. *Genetics* 156, 523-534.
- 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.
- 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* 130, 1361-1373.
- Spurr, A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26, 31-43.
- Stevens, B. (1981). Mitochondrial structure. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, eds. E.W. Strathern, E.W. Jones, und J.R. Broach, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 471-504.
- Suzuki, M., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Youle, R.J., und Tjandra, N. (2003). The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol* 334, 445-458.

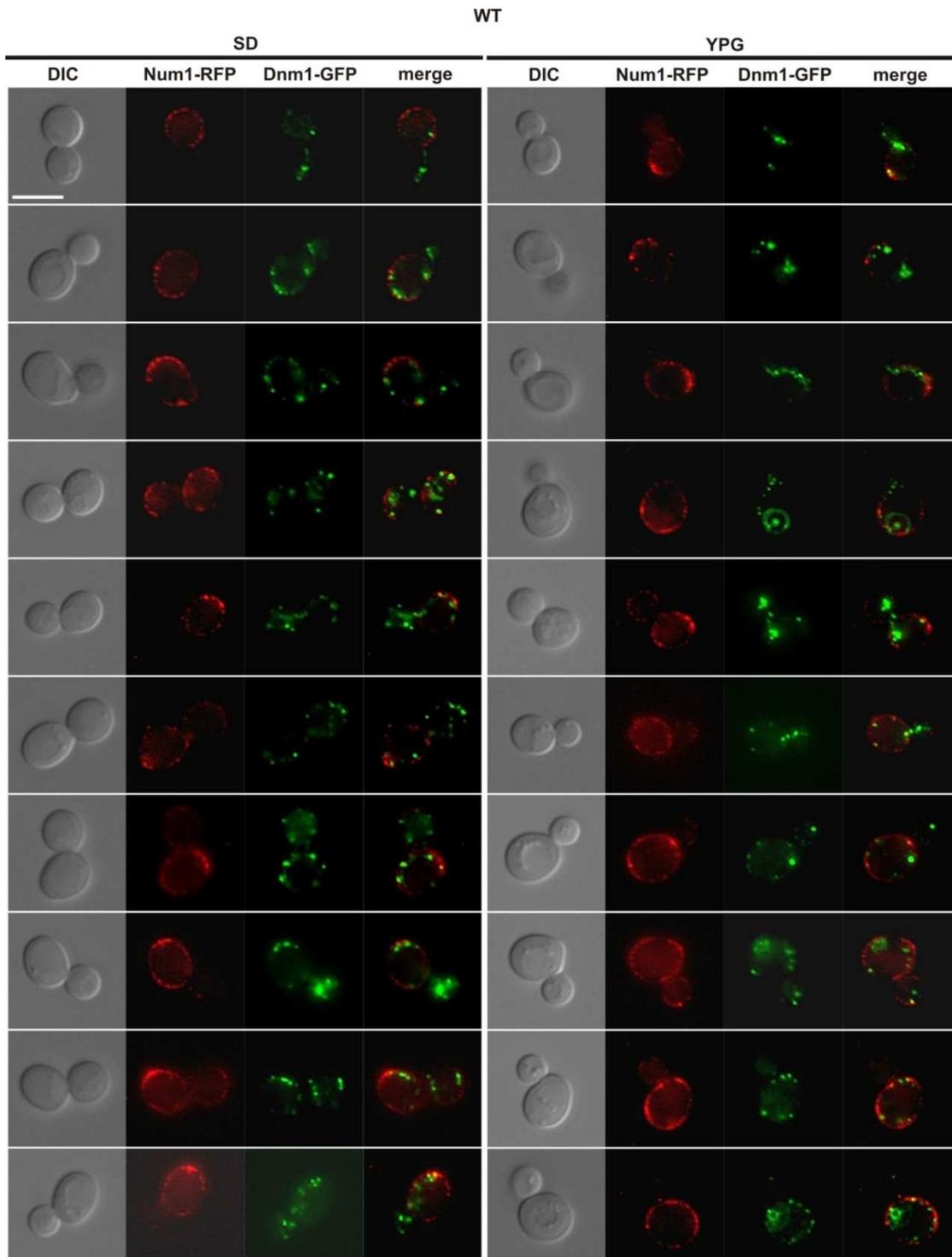
- Suzuki, M., Neutzner, A., Tjandra, N., und Youle, R.J. (2005). Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 280, 21444-21452.
- Tieu, Q., und Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol* 151, 353-365.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K., und Nunnari, J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* 158, 445-452.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., und Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5, 123-135.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354.
- Tzagoloff, A., und Dieckmann, C.L. (1990). *PET* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 54, 211-225.
- Visser, W., van Spronsen, E.A., Nanninga, N., Pronk, J.T., Gijs Kuenen, J., und van Dijken, J.P. (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67, 243-253.
- Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., und Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175, 237-247.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., und Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.
- 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.
- Westermann, B. (2003). Mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 1641, 195-202.
- Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem* 283, 13501-13505.
- Wiedemann, N., Pfanner, N., und Chacinska, A. (2006). Chaperoning through the mitochondrial intermembrane space. *Mol Cell* 21, 145-148.
- Williamson, D.H., und D.J. Fennell. (1979). Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol* 56, 728-33.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., und Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* 151, 341-352.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinski, T.J., Cassidy-Stone, A., und Nunnari, J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 160, 303-311.
- Wurm, C.A., 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. (1999). Dynamic mitochondria. *Nature Cell Biol* 1, E149-E150.
- 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.
- Youngman, M.J., Aiken 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.

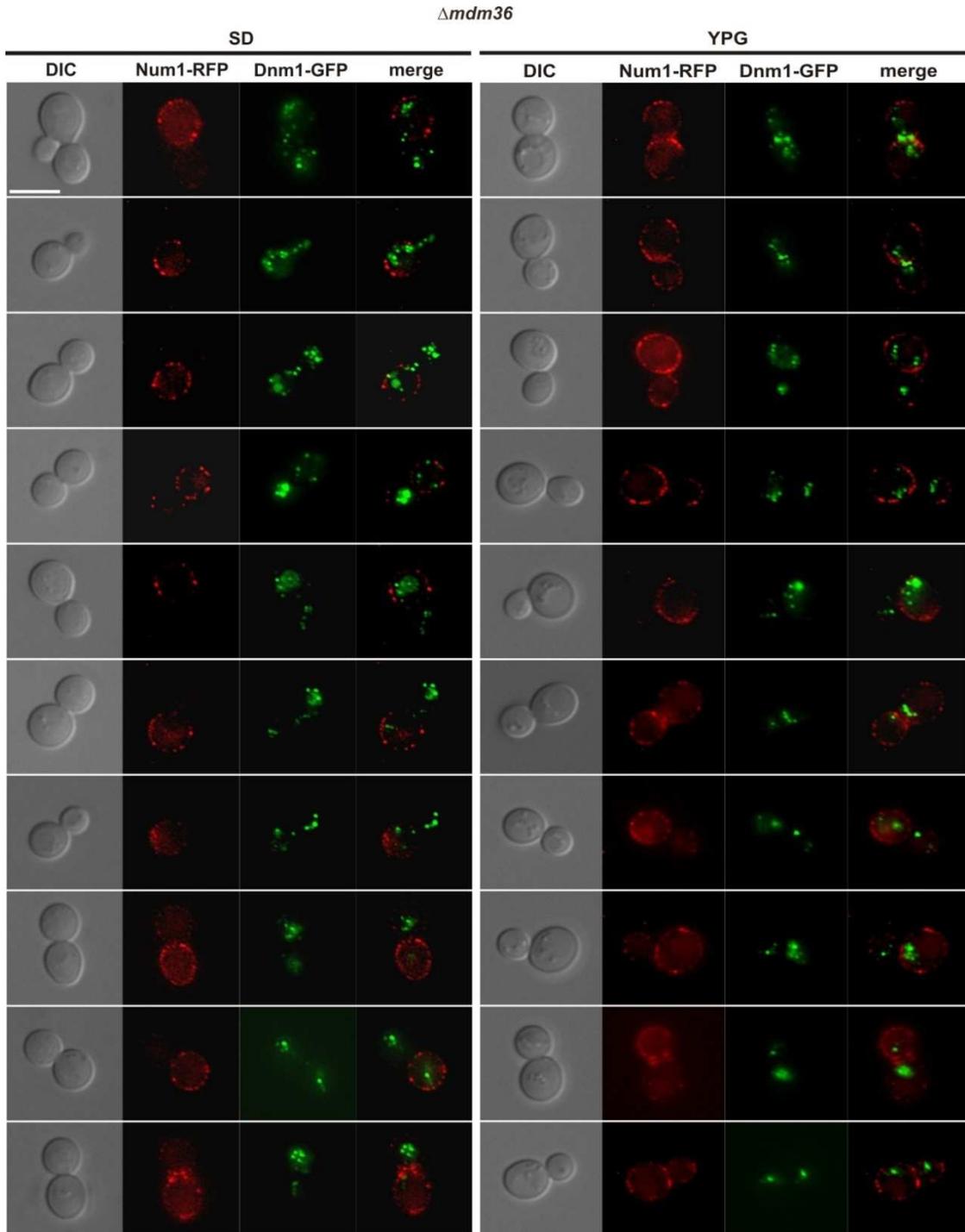
Zhang, Y., und Chan, D.C. (2007). Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1. *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 18526-18530.

6 Anhang

Abb.A1: Kolokalisation von Num1-RFP und Dnm1-GFP in Wildtyp- und Δ *mdm36*-Zellen. Dnm1-GFP und Num1-RFP exprimierende Hefezellen wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf SD- oder YPG-Medium angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind (von links nach rechts): Differential-Interferenz-Kontrastaufnahmen (DIC), rote Fluoreszenzaufnahmen (Num1-RFP), grüne Fluoreszenzaufnahmen (Dnm1-GFP), Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzaufnahmen (merge). Der Balken stellt 5 μ m dar. Zusätzliche repräsentative Zellen sind in Abb.3-17 dargestellt. **A)** Dnm1-GFP und Num1-RFP exprimierende Wildtypzellen. **B)** Dnm1-GFP und Num1-RFP exprimierende Δ *mdm36*-Zellen.

A



B

Im Rahmen der Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Merz, S., Hammermeister, M., Altmann, K., Dürr, M., und Westermann, B. (2007). Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem* 388, 917-926.

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

Hammermeister, M., Schödel, K., und Westermann, B. (2010). Mdm36 is a mitochondrial fission-promoting protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 21, 2443-2452.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Benedikt Westermann möchte ich mich für die Vergabe des Themas und die interessante und sehr lehrreiche Zeit an seinem Institut bedanken. Danke auch für die gute fachliche Betreuung sowie die Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Dissertation.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Deutsche Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Olaf Stemmann und Dr. Stefan Heidmann für die Nutzung einiger ihrer Laborgeräte danken.

Ich danke außerdem unserer Technischen Assistentin Annette Suske für die reibungslose und hervorragende Zusammenarbeit sowie Rita Grotjahn und Dr. Stefan Geimer für die geduldige Einführung und Hilfe bei allen elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Besonderer Dank gilt der unersetzlichen und lieben Petra Helies, die nicht nur für saubere Kölbchen sondern auch für eine Menge Spaß sorgte, immer ein offenes Ohr hatte und den besten Kuchen der Welt gebacken hat (manchmal fehlte auch eine Zutat).

Zunächst möchte ich meinen (Ex)Laborkollegen und Freunden Katrin, Marky und Sandi danken, mit denen ich die längste, intensivste und auch schönste Zeit im Labor verbracht habe. Danke, dass wir immer füreinander da waren und noch sind. Vielen Dank auch an Sandi für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Außerdem möchte ich auch allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern für den Spaß und die Freude an manch grauem Tag danken. Dabei geht ein großer Dank an Dirk und Kerstin (auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die tollen Joggingstunden) und Eric, die meine (Ex)Laborkollegen gut ersetzt haben.

Ich möchte mich außerdem bei meinen Studienkollegen Ulli, Mark, Jochen, Benni, Paul, Norbert und Ulle bedanken, die mich während meiner Studienzeit begleitet haben und sehr gute Freunde geworden sind.

Zusätzlich danke ich Norbert Nießen, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich so akzeptiert, wie ich bin.

Ein großer Dank geht auch an meine Eltern und meine Geschwister, die mir immer zur Seite stehen, mit denen ich über alles reden kann und die an mich glauben.

Der größte Dank gilt meinem Freund Matthias, der mich nicht nur während meiner Promotion sondern in jeder Lebenslage unterstützt und verstanden hat, der für mich da ist, wann immer ich ihn brauche, und der mir das Gefühl gibt, etwas Besonderes zu sein. Danke für alles!

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.

Miriam Hammermeister

Bayreuth, den 21.04.2010