

Die mitochondriale Biogenese in *Saccharomyces cerevisiae*: Identifizierung und Charakterisierung neuer Komponenten der mitochondrialen Funktion und Morphogenese

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

– Doktor der Naturwissenschaften –

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Sandra Merz-Jakob

aus Luhe

Bayreuth 2009

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 Januar 2005 bis April 2009 an der Universität Bayreuth am Institut für Zellbiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Benedikt Westermann angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 29.04.09

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 28.09.09

Prüfungsausschuss:

Erstgutachter: Prof. Dr. Benedikt Westermann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Olaf Stemmann

Vorsitzender: Prof. Dr. Stephan Clemens

PD Dr. Martina Meyering-Vos

Prof. Dr. Franz X. Schmid

Für Roman

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN.....	VIII
ZUSAMMENFASSUNG.....	X
SUMMARY.....	XII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Hefe als Modellorganismus.....	1
1.2 Funktionen, Struktur und Ursprung von Mitochondrien.....	2
1.3 Die Atmungskette in <i>S. cerevisiae</i>	5
1.4 Die <i>pet</i> -Mutation in <i>S. cerevisiae</i>	7
1.5 Die mitochondriale Dynamik und ihre physiologische Bedeutung.....	7
1.6 Mitochondriale Fusion und Teilung in <i>S. cerevisiae</i>	9
1.6.1 Die mitochondriale Fusionsmaschinerie.....	10
1.6.2 Die mitochondriale Teilungsmaschinerie.....	11
1.7 Die mitochondriale Morphologiekomponente Mdm33.....	14
1.8 Zielsetzung.....	16
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	18
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.1.1 Präparation von DNA.....	18
2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	18
2.1.1.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	19
2.1.1.3 Isolierung von DNA aus zellfreien Systemen.....	20
2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	21
2.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	23
2.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	24
2.1.4.1 Präparativer Restriktionsverdau.....	24
2.1.4.2 Dephosphorylierung.....	24
2.1.4.3 Ligation.....	24
2.1.4.4 Klonierung von <i>MSS2</i> und <i>COX16</i>	24
2.1.5 Übertragung von genetischem Material in <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.1.5.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.1.5.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.1.6 Analytischer Restriktionsverdau.....	25
2.2 Methoden der Hefegenetik.....	26
2.2.1 Verwendete Hefestämme.....	26
2.2.2 Anzucht von Hefezellen.....	28
2.2.3 Wachstumsanalysen.....	28
2.2.3.1 Semiquantitative Wachstumstests zur Erfassung des <i>MDM33</i> - Überexpressionseffekts.....	28

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.3.2 Erfassung des Wachstumsverhaltens mittels Tüpfel-Test.....	29
2.2.3.3 Erfassung des Wachstumsverhaltens mit Wachstumskurven.....	29
2.2.4 Übertragung von genetischem Material in <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	29
2.2.4.1 Standard Hefetransformation und verwendete Plasmide.....	29
2.2.4.2 Übertragung mitochondrialer DNA durch Cytoduktion.....	31
2.2.5 Komplementations-Test.....	32
2.2.6 Hefe Adaptionsversuch.....	32
2.2.7 Herstellung von Doppelmutanten.....	33
2.2.7.1 Herstellung diploider Stämme.....	33
2.2.7.2 Sporulation und Tetradendisektion.....	33
2.2.8 Herstellung von Glycerin-Stocks.....	34
2.3 Methoden der Zellbiologie.....	34
2.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Analysen.....	34
2.3.1.1 Anzucht von Hefezellen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	34
2.3.1.2 Färbung subzellulärer Strukturen in <i>S. cerevisiae</i> für die Fluoreszenzmikroskopie.....	35
2.3.1.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	36
2.3.2 Elektronenmikroskopie.....	37
2.3.2.1 Anzucht der Hefezellen für die Elektronenmikroskopie.....	37
2.3.2.2 Hefepräparation nach Bauer <i>et al.</i> (2001) und Einbettung von Hefezellen nach Spurr (1969).....	37
2.3.2.3 Trimmen, Schneiden und Nachkontrastierung.....	38
2.3.2.4 Elektronenmikroskopie.....	39
2.3.2.5 Befilmen von Kupfer-Lochgrids.....	39
2.4 Methoden der Proteinbiochemie.....	39
2.4.1 In vivo Markierung mitochondrialer Translationsprodukte.....	39
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.4.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran (Western-Blot) und Autoradiographie.....	40
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	42
3.1 Genetische Basis von respiratorischem Wachstum, mitochondrialem Genom-Erhalt und mitochondrialer Proteinsynthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	42
3.1.1 Durchmusterung einer Hefedeletionsbibliothek nach Mutanten mit Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle.....	42
3.1.1.1 Vergleichende Gendeletionsanalyse.....	42
3.1.1.2 Aussagekraft der Ergebnisse.....	45
3.1.2 Charakterisierung der identifizierten <i>pet</i> -Stämme durch funktionelle Tests....	46
3.1.2.1 Wiedergewinnung der respiratorischen Aktivität durch Kreuzung mit <i>Δmip1</i> und/oder Cytoduktion.....	48
3.1.2.2 Gene, die für den Erhalt der mtDNA benötigt werden.....	50

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.2.3 Gene, die für die mitochondriale Proteintranslation benötigt werden...	53
3.1.2.4 Andere Gene mit Bedeutung für die Respiration.....	58
3.1.2.5 Neue Komponenten, die essentiell für die respiratorische Kompetenz sind.....	59
3.1.2.6 Der Einfluss extragenomischer Faktoren.....	62
3.1.3 Funktionelle Untersuchung der COX-Assemblierungs-Mutanten.....	64
3.1.3.1 Plasmidale Komplementation der Gendeletion.....	64
3.1.3.2 Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	67
3.1.3.3 Modell zur Entstehung der respiratorischen Inkompetenz in den COX-Assemblierungs-Mutanten.....	71
3.2 Studien zur mitochondrialen Morphogenese.....	75
3.2.1 Identifizierung von Wechselwirkungspartnern der mitochondrialen Innenmembranteilungskomponente Mdm33.....	75
3.2.1.1 Beurteilung des Wachstums bei Überexpression von <i>MDM33</i>	76
3.2.1.2 Mitochondriale Morphologie bei Überexpression von <i>MDM33</i>	80
3.2.2 Untersuchung der <i>MDM33</i> -überexpressionstoleranten Stämme mit partiellem Erhalt von Wildtypmitochondrien.....	87
3.2.2.1 Besteht ein Zusammenhang zwischen der Kompensation des überexpressionsspezifischen Wachstums- und Mitochondriendefekts?.....	87
3.2.2.2 Bioinformatische Analysen und Datenbankrecherchen.....	88
3.2.2.3 Funktionelle Charakterisierung.....	89
3.2.2.4 Elektronenmikroskopische Erfassung der mitochondrialen Innenmembranstruktur ohne und mit Überexpression von <i>MDM33</i>	92
3.2.3 Untersuchung des Einflusses von Mdm33 auf die mitochondriale Außenmembranteilungsmaschinerie.....	96
3.2.3.1 Quantitative Erfassung der mitochondrialen Morphologie.....	97
3.2.3.2 Quantifizierung von Dnm1-GFP-Punkten.....	98
4 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	103
4.1 Genetische Basis von respiratorischem Wachstum, mitochondrialem Genom-Erhalt und mitochondrialer Proteinsynthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	103
4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung von Mutanten mit Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle.....	103
4.1.2 Der <i>pet</i> -Phänotyp in den COX-Assemblierungs-Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2	107
4.2 Studien zur mitochondrialen Morphogenese.....	108
4.2.1 Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Wechselwirkungspartnern der mitochondrialen Innenmembranteilungskomponente Mdm33....	108
4.2.2 Der Einfluss von Mdm33 auf die mitochondriale Außenmembranteilungsmaschinerie.....	111
5 LITERATURVERZEICHNIS.....	114
6 ANHANG.....	124
DANKSAGUNG	163
ERKLÄRUNGEN.....	164

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AM	mitochondriale Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
CC	Coiled-coil-Domäne
CL	Cardiolipin
CM	Cristaemembran
COX	Cytochrom c Oxidase
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DHR	Dihydrorhodamin-123
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnm1-GFP	Fusionsprotein aus Dnm1 und GFP
EB-Puffer	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
5-FOA	5'Fluororotsäure
G418	Geneticin-Disulfat
GED	GTPase-Effektordomäne
IBM	<i>inner boundary membrane</i>
IM	mitochondriale Innenmembran
IMR	mitochondrialer Intermembranraum
LB	<i>lysogeny broth</i> bzw. Luria-Bertani-Medium (<i>E. coli</i> -Nährlösung)
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale DNA
mtGFP	Fusionsprotein aus GFP und mitochondrialer Präsequenz
mtRFP	Fusionsprotein aus RFP und mitochondrialer Präsequenz
NBD	<i>nucleotide binding domain</i>
NSA	Nonenylsuccinicanhydrid
NTE	<i>N-terminal extension</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
p. a.	<i>pro analysis</i> ; für die Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
<i>pet</i>	<i>petite</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PPR	<i>pentatricopeptid repeat</i>
Q	Coenzym Q, Ubichinon
$[\rho^0]$	kompletter Verlust der mtDNA
$[\rho^+]$	intakte mtDNA
$[\rho]$	partieller Verlust der mtDNA durch Mutationen oder Deletionen
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reactive Sauerstoffspezies)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD/SGal/SR	Minimalselektivmedium mit Glukose, Galaktose oder Raffinose als Kohlenstoffquelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
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

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TCA	Trichloressigsäure
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
T_m	Schmelzpunkt von Oligonukleotiden
TPR	<i>tetratricopeptid repeat</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- propan-1,3-diol
üN	über Nacht
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
<i>yfg</i>	<i>your favourite gene</i>
YPD/YPG/YPGal	Hefenährmedium aus Hefeextrakt und Pepton mit Glukose, Glycerin oder Galaktose als Kohlenstoffquelle

ZUSAMMENFASSUNG

Deletionsbibliotheken sind heutzutage ein wertvolles Werkzeug, um Genfunktionen zu entschlüsseln und das Verständnis zellulärer Abläufe zu komplettieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von der ~4800 Deletionsmutanten nicht-essentieller Hefegene umfassenden *MAT α* -Deletionsbibliothek *large-scale* Analysen durchgeführt, um das Verständnis zweier wichtiger Teilbereiche der mitochondrialen Biogenese zu erweitern, nämlich (1) dem Erhalt der Atmungsfähigkeit und (2) der mitochondriale Teilung als zentraler Bestandteil der Morphogenese.

Die Biogenese der Atmungskette erfordert die koordinierte Expression des Kerngenoms und des mitochondrialen Genoms, wobei im Zellkern der Großteil der mitochondrialen Proteine kodiert wird und die mitochondriale DNA (mtDNA) nur wenige Gene enthält. Im ersten Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde ein systematischer, genomweiter Screen durchgeführt, um den Satz an kernkodierten Genen zu ermitteln, der für die respiratorische Aktivität sowie den Erhalt und die Expression der mtDNA in Hefe erforderlich ist. Durch vergleichende Gendeletionsanalysen konnte eine unerwartet große phänotypische Plastizität festgestellt werden. Darüber hinaus wurden zehn bisher uncharakterisierte Gene identifiziert, die essentiell für den Erhalt des respiratorischen Wachstums sind (*RRG1* bis *RRG10*). Systematische funktionelle Analysen der 319 respiratorisch inkompetenten Mutanten enthüllten 16 Gene, die essentiell für den Erhalt mitochondrialer DNA sind, 88 Gene, die für die allgemeine mitochondriale Proteintranslation benötigt werden, und zehn Gene, die für die Expression bestimmter mitochondrialer Genprodukte erforderlich sind. In einer Gruppe von 23 Mutanten spielen vermutlich auch extragenomische Faktoren eine Rolle für mitochondriale Funktionen. Darunter waren vier Deletionsstämme mit fehlerhafter Assemblierung der Cytochrom *c* Oxidase. Diese akkumulieren verstärkt reaktive Sauerstoffspezies (ROS), was zu einer schnelleren Alterung führt. Insgesamt verbessern die gewonnenen Daten das Verständnis der molekularen Prozesse, die zum Erhalt der mtDNA, zur mitochondrialen Proteintranslation und zur Assemblierung der Atmungskette beitragen. Sie deckten mehrere bisher uncharakterisierte Komponenten auf und liefern ein umfassendes Bild der molekularen Prozesse, die für die respiratorische Kompetenz in einer relativ einfachen eukaryotischen Zelle benötigt werden.

Die zentrale Bedeutung der Mitochondrien in der Zelle beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Atmungsfähigkeit. Mitochondrien sind vielmehr wichtige Bestandteile zahlreicher

physiologischer Prozesse, deren Funktionalität maßgeblich von der mitochondrialen Dynamik, insbesondere der Fusion und Teilung, abhängt. Der zweite Teilabschnitt der Arbeit beschäftigte sich deshalb mit der mitochondrialen Teilung. Mdm33, ein integrales Innenmembranprotein der Hefemitochondrien, ist die bisher einzige bekannte Komponente der Innenmembranteilung. Seine Überexpression bedingt eine mitochondriale Fragmentierung, die mit einem starken Wachstumsdefekt einher geht. Mögliche Wechselwirkungspartner waren nicht bekannt. Deshalb wurde ein genetischer Screen durchgeführt, um direkte oder indirekte Wechselwirkungspartner von Mdm33 zu identifizieren. *MDM33* wurde in einer Auswahl von 164 Hefedeletionsmutanten überexprimiert, in denen vor allem mitochondrial lokalisierte Proteine fehlten. Anhand der Kriterien Wachstumsfähigkeit und blockierte mitochondriale Fragmentierung bei Überexpression von *MDM33* wurden sieben bisher uncharakterisierte genetische Interaktionspartner identifiziert, die möglicherweise mit Mdm33 funktionell wechselwirken. Dnm1 und Mdv1 sind Komponenten der mitochondrialen Außenmembranteilungsmaschinerie. Die Detektion der Deletionsstämme $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ im Screen als *MDM33*-überexpressions-tolerant weist auf eine Funktion der Außenmembranteilungsmaschinerie bei der Entstehung des *MDM33*-Überexpressionsphänotyps hin und zeigt gleichzeitig, dass die Funktion von Mdm33 *upstream* der Außenmembranteilungsmaschinerie liegt. Dnm1 kann auch in Abwesenheit von Mdm33 auf der mitochondrialen Oberfläche assemblieren. Die Mdm33-abhängige Modulation der Teilungsaktivität erfolgt also nicht durch eine verhinderte Assemblierung, sondern wahrscheinlich durch eine veränderte Aktivierung der Außenmembranteilungsmaschinerie. Diese Ergebnisse liefern weitere Einblicke in den Zusammenhang zwischen der Mdm33-Funktion und der Außenmembranteilungsmaschinerie und untermauern damit die Gültigkeit des bestehenden Mdm33-Wirkmodells, in dem Mdm33 als Voraussetzung für die Außenmembranteilung die Innenmembranteilung/Einschnürung des Mitochondrientubulus vermittelt. Damit wurde ein weiterer Schritt zur Komplettierung des Bilds der mitochondrialen Teilungsmaschinerie getan.

SUMMARY

Today deletion libraries are very valuable tools to decipher gene functions and to increase the knowledge about cellular processes. Based on the *MAT α* -yeast deletion library, which covers ~4800 deletion mutants of non-essential genes, the present work was aimed at large-scale analyses to further the understanding of two important processes of mitochondrial biogenesis: (1) maintenance of respiratory competence and (2) mitochondrial fission as a part of morphogenesis.

Biogenesis of the respiratory chain requires the coordinated expression of the nuclear and the mitochondrial genomes, while the nucleus encodes the vast majority and the mtDNA only a few of the mitochondrial proteins. In the first part of this work, a systematic genome-wide screen was conducted to identify the complete set of nuclear-encoded genes that are essential for respiratory activity, mitochondrial gene expression and mitochondrial genome maintenance. Comparative gene deletion analysis revealed an astonishing phenotypic plasticity. Furthermore ten hitherto uncharacterized genes (*RRG1* to *RRG10*) were found to be essential for maintenance of respiratory competence. Systematic functional analysis of all of the identified 319 respiratory-deficient mutants disclosed 16 genes essential for maintenance of mtDNA, 88 genes important for mitochondrial protein synthesis, and ten genes required for expression of specific mitochondrial gene products. In a group of 23 mutants, extra-genomic factors are presumably important for maintenance of respiratory activity. Among these were four deletion mutants with impaired assembly of cytochrome *c* oxidase, which accumulated reactive oxygen species (ROS) rendering the mutants more sensitive to ageing. Taken together, these data contribute to the understanding of the molecular processes involved in mtDNA maintenance, mitochondrial protein synthesis and assembly of the respiratory chain. They revealed a number of so far uncharacterized components and provide a comprehensive picture of the molecular processes required for respiratory competence in a relatively simple eukaryotic cell.

The central role of mitochondria within the cell is not exclusively related to respiratory competence. In fact, mitochondria are major players of many physiological processes and their functionality depends on the mitochondria's highly dynamic nature, in particular on fusion and fission. Thus, the second part of the present work focused on mitochondrial fission. Mdm33, an integral inner membrane protein of yeast mitochondria, is the only known

player of mitochondrial inner membrane fission. Its overexpression leads to mitochondrial fragmentation, accompanied by a severe growth defect. Possible interaction partners of Mdm33 are currently unknown. Therefore a genetic screen was conducted to identify direct or indirect interaction partners of Mdm33. *MDM33* was overexpressed in a deletion mutant collection covering 164 non-essential genes of *Saccharomyces cerevisiae* encoding mitochondria-localized proteins. Seven so far uncharacterised genetic interaction partners were identified which possibly functionally interact with Mdm33 as deletion of the respective genes restored growth and blocked mitochondrial fragmentation in the presence of excess Mdm33. Dnm1 and Mdv1 are components of the mitochondrial outer membrane fission machinery. Detection of the deletion strains $\Delta dnm1$ and $\Delta mdv1$ as *MDM33* overexpression-tolerant demonstrates the contribution of the outer membrane fission machinery to the development of the *MDM33* overexpression phenotype. At the same time, it shows that Mdm33 influences fission activity upstream the outer membrane fission machinery. In the absence of Mdm33 Dnm1 is still able to assemble on the mitochondrial surface. Thus, the Mdm33-dependent modulation of fission activity does not result from inhibited assembly, but rather from an altered activation of the outer membrane fission machinery. These results provide further insights into the connection between Mdm33 function and the outer membrane fission machinery. They confirm the current hypothesis on Mdm33 function, which proposes Mdm33 to mediate fission of the inner membrane and/or constriction of the mitochondrial tubule as a prerequisite of outer membrane fission. Taken together, these data contribute to an understanding of mitochondrial fission machinery.

1 EINLEITUNG

Seit der Entdeckung von Mitochondrien vor mehr als 100 Jahren durch Kölliker *et al.* wurden stetig neue Erkenntnisse über diese lebenswichtigen Organellen gewonnen: Sie wurden als Ort zahlreicher metabolischer Grundprozesse und der Energiegewinnung charakterisiert (zusammengefasst in Scheffler, 2001; Lill & Mühlenhoff, 2005). Strukturelle Eigenschaften, wie das Vorliegen von mitochondrialer DNA (mtDNA; Nass & Nass, 1963), Doppelmembranen und Cristae, wurden geklärt (Palade, 1952; Perkins *et al.*, 1997) und nicht zuletzt konnte eine beeindruckende Dynamik gezeigt werden (Bereiter-Hahn, 1990; Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto & Shaw, 2005), die von großer physiologischer Bedeutung ist (Westermann, 2008). Dabei wurde das grundlegende Verständnis von Mitochondrien in den letzten Jahren zunehmend durch Fortschritte in der Strukturbiologie beschleunigt. Zum einen lieferten Durchbrüche in der Röntgenstrukturanalyse beispielsweise Details der Atmungskette auf atomarem Level. Zum anderen ermöglichten Weiterentwicklungen in der Lichtmikroskopie, von Fluoreszenzfarbstoffen und im genetischen *engeneering* (speziell GFP-Fusionsproteine) die detaillierte Erfassung von Mitochondrien in lebenden Zellen (Frey & Mannella, 2000). Durch den Zusammenhang mitochondrialer Fehlfunktionen mit zellulärer Alterung und der Entstehung von Krankheiten, wie z. B. Parkinson und Alzheimer, rückten Mitochondrien weiter in den Fokus der Forschung (Schapira, 2006; Schapira, 2008). Dennoch sind auch heute noch nicht alle Aspekte des mitochondrialen Funktions- und Morphologieerhalts verstanden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesen beiden Teilbereichen und ihrem funktionellen Zusammenhang.

1.1 Hefe als Modellorganismus

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ist ein einzelliger, eukaryotischer Organismus, der dem Stamm der Ascomyceten angehört. Hefezellen können sowohl haploid (*MATa* oder *MAT α*) als auch diploid (*MATa/ α*) existieren, wobei diploide Zellen durch Verschmelzung Haploider entstehen. Beide Stadien vermehren sich vegetativ über Knospung. Darüber hinaus bilden diploide Hefezellen unter schlechten Lebensbedingungen über Meiose haploide Sporen aus. Diese sind als Tetraden im sogenannten Ascus organisiert und keimen erneut zu haploiden Zellen, sobald sich die Bedingungen verbessern (Herskowitz, 1988; Kassir *et al.*, 2003).

Viele Eigenschaften machen Hefe zu einem wertvollen Modellsystem, mit dem grundlegende zelluläre Prozesse untersucht werden können. Hefezellen sind leicht kultivierbar, besitzen eine kurze Generationszeit von nur etwa zwei Stunden und können bei -80°C jahrelang stabil gelagert werden. Darüber hinaus ist seit 1996 das etwa 12 Millionen bp große Hefegenom vollständig sequenziert (Goffeau *et al.*, 1996). Zusammen mit der leichten Manipulierbarkeit des Genoms durch gezielte Insertion, Deletion und Mutation ermöglicht dies eine effektive Untersuchung von Funktionen einzelner Gene oder ganzer zellulärer Abläufe. Da hohe Homologien zwischen *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten bestehen (46% der humanen Proteine besitzen Homologe in Hefe), lassen sich daraus gewonnene Informationen auch auf die komplexen, mehrzelligen Organismen übertragen (Foury & Kucej, 2002; Lander *et al.*, 2001).

Besonders die Mitochondrienforschung wird durch die Bäckerhefe erleichtert. *S. cerevisiae* ist fakultativ anaerob und dadurch in der Lage, ihren Energiebedarf ausschließlich über ATP aus der Fermentation zu decken (Tzagoloff & Dieckmann, 1990). Auch wenn O_2 zur Verfügung steht, erzeugen Hefen ihr ATP primär über die Glykolyse mit Ethanol als Fermentationsendprodukt. Die meisten respiratorischen Funktionen sind unter diesen Bedingungen über Katabolitrepression unterdrückt (Gancedo, 1998). Oxidative Phosphorylierung und mitochondriale DNA sind also verzichtbar, solange fermentierbare Kohlenstoffquellen, wie Glukose oder Fruktose, vorliegen. Erst wenn fermentierbare Kohlenstoffquellen begrenzt sind, werden Gene, die für die Atmung benötigt werden, induziert, und ATP wird durch die Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen wie Glycerin, Laktat oder Ethanol erzeugt (Johnston, 1999; Piskur *et al.*, 2006). Deshalb ist Hefe ein idealer Modellorganismus, um Mechanismen zu untersuchen, die für den Erhalt der respiratorischen Kompetenz oder die mitochondriale Morphogenese benötigt werden.

1.2 Funktionen, Struktur und Ursprung von Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle, semiautonome Organellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie sind der primäre Ort der zellulären Energiegewinnung (Atmungskette; vgl. 1.3) und beherbergen zahlreiche Stoffwechselprozesse des Intermediärmetabolismus (Citratzyklus, Harnstoffzyklus, β -Oxidation von Fettsäuren, Häm-Biosynthese sowie Teile des Lipid- und Aminosäuremetabolismus) (Scheffler, 2001; Sickmann *et al.*, 2003). In Mitochondrien wird die Biogenese und Assemblierung von Fe/S-Clustern eingeleitet, was ihren essentiellen Charakter auch in fakultativ anaeroben Organismen, wie *S. cerevisiae*, erklärt (Lill & Mühlenhoff, 2005). In den letzten Jahren wurde

zudem eine enge Verknüpfung der Mitochondrien mit dem programmierten Zelltod (Green & Reed, 1998; Perfettini *et al.*, 2005) und mit zellulären Alterungsprozessen (Balaban *et al.*, 2005) deutlich.

Die räumliche Trennung der diversen mitochondrialen Funktionen wird durch den Aufbau des Organells erreicht. Mitochondrien sind von zwei Membranen umgeben, der mitochondrialen Außenmembran (AM) und der mitochondrialen Innenmembran (IM). Der enge Raum zwischen den beiden Membranen wird als Intermembranraum (IMR) bezeichnet. Die Innenmembran umschließt den proteinreichen Matrixbereich (M) und besitzt zur Oberflächenvergrößerung Einstülpungen (Cristae), die in den Matrixraum hineinragen. Dabei sind die Cristae keine zufälligen Faltungen, sondern tubuläre oder lamellare Mikrokompimente, die durch enge tubuläre Segmente, die sogenannten *cristae junctions* (10-15 nm), in die periphere Region der Membran münden (Perkins *et al.*, 1997; Mannella, 2008). Die parallel zur Außenmembran verlaufende Innenmembran, die als *inner boundary membrane* (IBM) bezeichnet wird, und die Cristae Membranen (CM) sind zwei Subkompimente mit unterschiedlicher Proteinausstattung (Vogel *et al.*, 2006; Wurm & Jakobs, 2006). Insgesamt lassen sich also fünf mitochondriale Reaktionsräume unterscheiden (AM, IMR, IBM, CM, M).

Das Vorliegen zweier mitochondrialer Membranen kann durch die evolutionäre Geschichte des Organells erklärt werden. Heute geht man davon aus, dass Mitochondrien durch endocytotische Aufnahme eines α -Proteobakteriums in eine primitive prä-eukaryontische Zelle entstanden sind (=Endosymbiontentheorie; Gray *et al.*, 1999). Parallelen zwischen der mitochondrialen elektronentransportgekoppelten ATP-Produktion und der α -proteobakteriellen Energiegewinnung sowie phylogenetische Analysen untermauern die Verwandtschaft mit diesen Bakterien (Yang *et al.*, 1985; Gray *et al.*, 2001). Ein weiteres zwingendes Argument für die Endosymbiontentheorie ist die Existenz eigener mitochondrialer DNA (mtDNA) (Nass & Nass, 1963; Gray & Doolittle, 1982) und eines eigenständigen Transkriptions- und Translationsapparats (Attardi & Schatz, 1988; Lecrenier & Foury, 2000; Kelly & Scarpulla, 2004). Aufgrund fortschreitenden Gentransfers wurde im Laufe der Evolution beinahe das gesamte mitochondriale Genom in den Zellkern integriert (Adams & Palmer, 2003; Timmis *et al.*, 2004). Der Großteil des mitochondrialen Proteoms (~1000 Proteine in Hefe; Comprehensive Yeast Genome Database CYGD; Güldener *et al.*, 2005) ist deshalb kernkodiert, wird cytosolisch synthetisiert und posttranslational über die membranständigen Transportkomplexe in das Organell importiert (Pfanner *et al.*, 2004; Reichert & Neupert, 2004). Rezente mitochondriale Genome enthalten somit neben tRNA-

und rRNA-kodierenden nur noch eine sehr begrenzte Anzahl an proteinkodierenden Genen (13 im Menschen und 8 in *S. cerevisiae*; Grivell, 1995; Gray *et al.*, 1999). Ihre Produkte sind einige Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe und in manchen Organismen Komponenten, die für die Synthese und Assemblierung von mitochondrial kodierten Proteinen benötigt werden (Gray *et al.*, 1999). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* sind die Atmungskettenkomponenten-Untereinheiten Atp6, Atp8, Atp9, Cob, Cox1, Cox2 und Cox3 sowie das mitochondriale Ribosomenprotein Var1 mitochondrial kodiert (Towpik, 2005). Auch wenn die Anzahl der mitochondrialen Genprodukte begrenzt ist, sind sie aufgrund ihrer katalytischen Funktionen in Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung essentiell für die Ausbildung respiratorischer Kompetenz (Tzagoloff & Dieckmann, 1990). Um diese Handvoll an Genen zu exprimieren, synthetisiert die Zelle mehr als 200 kernkodierte Proteine, die für die Expression und den mtDNA-Erhalt benötigt werden (Grivell *et al.*, 1999; Sickmann *et al.*, 2003). Die Biogenese der Atmungskette erfordert also die koordinierte Expression des Kern- und des mitochondrialen Genoms.

Die zirkuläre mtDNA liegt nicht als nacktes Molekül vor, sondern ist in Nukleoproteinpartikel organisiert. In Analogie zu DNA-Strukturen prokaryotischer Zellen werden diese Organisationseinheiten als Nukleoide bezeichnet. In Hefezellen liegen pro Zelle ~20 Nukleoide vor, die etwa 400 nm groß sind und ein bis zwei Kopien der 80 kbp-großen DNA-Moleküle enthalten. Nukleoide bestehen in den meisten Organismen aus mehr als 25 verschiedenen Proteinen. Interessanterweise sind neben DNA-bindenden Proteinen der HMG¹-Box-Familie und solchen, die für die Transkription verantwortlich sind, auch metabolische Enzyme verschiedener Funktionen enthalten (z.B. Aconitase (Aco1) und Ilv5²). Möglicherweise ist so eine gezielte Kopplung zwischen mtDNA-Erhalt bzw. -Restrukturierung und metabolischen Veränderungen möglich (Kucej & Butow, 2007). Für die zielgerichtete Vererbung mitochondrialer mtDNA wird ein membrandurchspannender Komplex postuliert, der die Außenmembranproteine Mmm1, Mdm10 und Mdm12 enthält. Vermutlich wird dadurch, unter Beteiligung noch unbekannter Proteine in der Innenmembran, eine Verknüpfung zwischen mtDNA und dem Cytosol hergestellt, was wiederum eine Verbindung zum Aktin-Cytoskelett ermöglichen könnte (Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003). Sowohl die exakte Zusammensetzung von Nukleoiden, der Einfluss sekundärer Wege (Transkription) auf den mtDNA-Erhalt als auch die gezielte Vererbung von mtDNA sind bis heute jedoch nicht voll verstanden (Kucej & Butow, 2007).

¹ HMG-Box (*high mobility group*): DNA-bindende Domäne von 70-80 Aminosäuren

² *IsoLeucine-plus-Valine requiring*; Acetohydroxyacid Reduktoisomerase: beteiligt an der Biosynthese verzweigter Aminosäuren (Zelenaya-Troitskaya *et al.*, 1995)

1.3 Die Atmungskette in *S. cerevisiae*

Die oxidative Phosphorylierung ist das Kernstück des Energiemetabolismus in Tieren, Pflanzen und in vielen anderen mikrobiellen Lebensformen (Frey & Mannella, 2000). Die in der mitochondrialen Cristaemembran lokalisierte Atmungskette (Komplex I bis IV) koppelt hierfür den sequentiellen Elektronentransfer (von NADH/FADH₂ auf den terminalen e⁻-Akzeptor O₂) mit einer Protonentranslokation. Dadurch entsteht eine protonenmotorische Kraft (*proton motive force*; *pmf*), die als Triebkraft der Phosphorylierung von ADP zu ATP durch die F₁F₀-ATPase (Komplex V) dient (chemi-osmotische Kopplung). Die klassische Elektronentransportkette in Tieren besteht aus vier hochmolekularen Oxidoreduktase-Komplexen – NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Succinat-Dehydrogenase (Komplex II; Sdh), Cytochrom *bc*₁-Komplex (Komplex III; *bc*₁) und Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV; COX) – sowie zwei mobilen Komponenten, Ubichinon (Q) und Cytochrom *c* (C). In *S. cerevisiae* liegt kein Komplex I vor. Dieser ist durch drei rotenoninsensitive, alternative NADH-Dehydrogenasen – Ndi1, Nde1 und Nde2 – ersetzt, die jeweils nur aus einer Aminosäurekette bestehen und keine Protonen translozieren (Joseph-Horne *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2008; siehe auch Abb. 1-1). Ndi1 (*NADH dehydrogenase internal*) befindet sich an der matrixorientierten Seite der mitochondrialen Innenmembran und sorgt für die Verwertung mitochondrial produzierten NADHs aus dem Citratzyklus (Marres *et al.*, 1991). Die aktiven Zentren der äußeren NADH-Dehydrogenasen Nde1 und Nde2 (*NADH dehydrogenase external*) weisen in den Intermembranraum, wo sie cytosolisches NADH aus der Glykolyse oxidieren (Overkamp *et al.*, 2000). Darüber hinaus scheinen sie primär an der Atmung während des Wachstums mit Ethanol beteiligt zu sein (Davidson & Schiestl, 2001). Cytosolisches NADH aus der Glykolyse kann zudem über den Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase-Shuttle in der Atmungskette oxidiert werden. Der Shuttle besteht aus cytosolischen NADH-abhängigen Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen (Gpd1/2) und einer membrangebundenen Glycerin-3-Phosphat:Ubichinon-Oxidoreduktase (Gut2) (Larsson *et al.*, 1998). Alle bekannten Wege der respiratorischen NADH oder FADH₂-Oxidation in *S. cerevisiae* laufen über den Ubichinon-Pool (Herrero *et al.*, 2008).

Als unvermeidliches Nebenprodukt der Atmungskette entstehen immer reaktive Sauerstoffspezies (ROS; *reactive oxygen species*), indem Elektronen an Zwischenschritten der Atmungskette austreten und Sauerstoff monoelektronisch reduzieren (Boveris & Chance, 1973). So werden schätzungsweise 1-5% des während der oxidativen Phosphorylierung verbrauchten Sauerstoffs in ROS umgesetzt (Chan, 2006). In Hefemitochondrien werden etwa

die Hälfte der ROS durch die beiden äußeren NADH-Dehydrogenasen Nde1 und Nde2 gebildet, die andere Hälfte entsteht, wie bei höheren Eukaryoten, an Komplex III (Fang & Beattie, 2003; Herrero *et al.*, 2008; vgl. Abb. 1-1). ROS (v. a. das durch die Fenton-Reaktion entstehende Hydroxylradikal HO^\bullet) sind hochreaktive Moleküle, die Proteine, Lipide, DNA und RNA modifizieren und dadurch zelluläre Dysfunktionen induzieren können (Semenza, 2007; Hoye *et al.*, 2008). Viele dieser Dysfunktionen stehen in Zusammenhang mit Alterung und degenerativen Krankheiten (Shigenaga *et al.*, 1994; Schapira, 2006; Hiona & Leeuwenburgh, 2008). Um radikalbedingte Schädigung zu verhindern, existieren zelluläre Abwehrmechanismen, die die Funktion von Enzymen (Superoxiddismutasen Sod1 und Sod2, Catalasen und Peroxidasen) und kleiner Antioxidantien, wie Glutathion, erfordern (Jamieson, 1998; Herrero *et al.*, 2008). Das antioxidative System arbeitet allerdings nur in begrenztem Maße, sodass immer eine Mindestmenge an ROS freigesetzt wird. Die Entwicklung von Schädigungen schreitet verstärkt voran, wenn aufgrund von Fehlfunktionen die ROS-Produktion die Entgiftungsrate übersteigt.

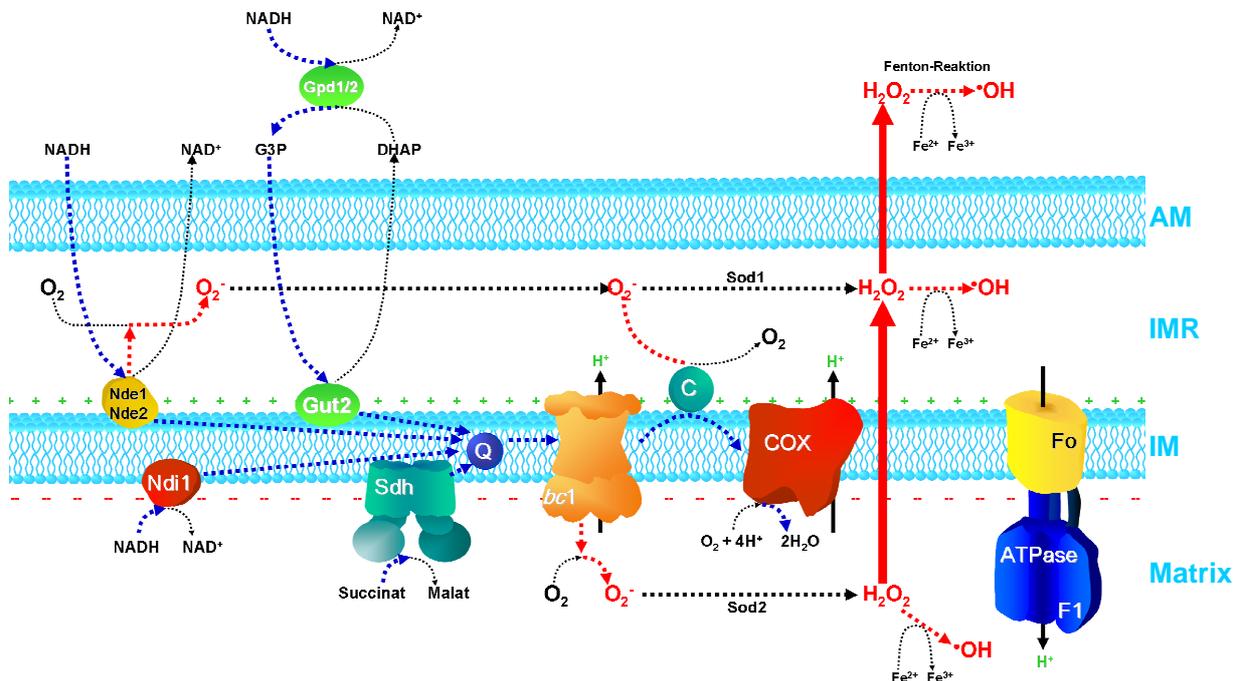


Abbildung 1-1: Atmungskette und Orte der ROS-Produktion in *S. cerevisiae*. Der reguläre Weg der Elektronen in der Atmungskette ist blau dargestellt. Rote Pfeile kennzeichnen die Fehlleitung von Elektronen im Zuge der ROS-Produktion. AM: mitochondriale Außenmembran; ATPase: ATP-Synthase, bestehend aus F_0 - und F_1 -Teil; *bc1*: Cytochrom *bc*₁-Komplex; C: Cytochrom c; COX: Cytochrom c Oxidase; Gpd1/2: Glyzerin-3-Phospat-Dehydrogenase; Gut2: Glyzerin-3-Phospat-Ubichinon-Oxidoreduktase; IMR: Intermembranraum; IM: mitochondriale Innenmembran; NAD: Nicotinamidadenindinukleotid; Nde1/2: NADH dehydrogenase external; Ndi1: NADH dehydrogenase internal; Q: Ubichinon; Sdh: Succinat-Dehydrogenase; Sod1/2: Superoxiddismutase.

1.4 Die *pet*-Mutation in *S. cerevisiae*

Hefemutanten mit Defekten in der oxidativen Phosphorylierung sind nicht in der Lage auf Medien mit ausschließlich nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. Auf Medium mit begrenzter Menge an fermentierbarer Kohlenstoffquelle erzeugen diese Mutanten kleinere Kolonien als der Wildtyp. Dieser charakteristische Phänotyp wird mit dem Begriff *petite* (*pet*) beschrieben (Ephrussi *et al.*, 1949). Grundsätzlich werden zwei Typen an *petite*-Mutanten unterschieden: Cytoplasmatische *petites* sind Mutanten mit mtDNA-bedingtem Defekt (entweder mit großen Deletionen in der mitochondrialen DNA [*rho*⁻] oder komplettem Verlust der mtDNA [*rho*⁰]) und respiratorisch-defiziente Stämme, die die ursächlichen Mutationen in ihrem Kerngenom aufweisen, werden als nukleäre *petites* bezeichnet (Tzagoloff & Dieckmann, 1990). Nukleäre *pet*-Gene kodieren unter anderem für Atmungskettenkomponenten, für Faktoren, die die Faltung und Assemblierung von Atmungskettenuntereinheiten ermöglichen, für Proteine, die für den mtDNA-Erhalt, mitochondriale RNA- und Proteinsynthese benötigt werden, und für Komponenten, die der mitochondrialen Morphologiemaschinerie zuzuordnen sind (Tzagoloff & Dieckmann, 1990; Contamine & Picard, 2000; Dimmer *et al.*, 2002). Im weiteren Text werden sowohl cytoplasmatische als auch nukleäre *petite*-Mutanten als *pet*-Mutanten bezeichnet. Auch wenn durch klassische genetische Methoden und genomweite Durchmusterungen bereits viele *pet*-Gene identifiziert wurden (Tzagoloff & Dieckmann, 1990; Contamine & Picard, 2000; Dimmer *et al.*, 2002), sind die genauen Zusammenhänge und Einflüsse, die für die Entstehung eines *pet*-Phänotyps entscheidend sind, auch heute noch nicht voll verstanden.

1.5 Die mitochondriale Dynamik und ihre physiologische Bedeutung

Mitochondrien sind – anders als in vielen Lehrbüchern dargestellt – keine statischen Objekte. Vielmehr unterliegen sie ständiger morphologischer Veränderung, die durch den koordinierten Ablauf von Fusion, Teilung und Bewegung entlang des Cytoskeletts erreicht wird (Bereiter-Hahn, 1990; Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto & Shaw, 2005). Durch diese Modulation erfolgt eine Anpassung an die jeweiligen physiologischen Bedingungen, sodass Mitochondrien ihre zahlreichen zellulären Funktionen zielgerichtet erfüllen können. In metabolisch aktiven Hefezellen bilden Mitochondrien ein verbundenes Retikulum unter dem Zellkortex aus (Hoffman & Avers, 1973; Stevens and White, 1979). Dabei wird eine morphologische Adaption an die Wachstumsphase oder die verwertbare Kohlenstoffquelle beobachtet. In der stationären Phase liegen stark verkürzte Tubuli vor, die in logarithmisch

wachsenden Zellen zu einem verbundenen Netzwerk fusionieren. Der Grad der Verzweigung ist dabei von der respiratorischen Aktivität und damit der Nährstoffquelle abhängig. Auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle (z. B. Glukose) ist das Netzwerk mäßig verzweigt (vgl. Abb. 1-2), da Glukose zum Großteil über alkoholische Gärung verwertet wird. Aufgrund der erhöhten respiratorischen Aktivität wird auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (z. B. Glycerin) mehr Mitochondrienmasse in stark verzweigter Form gebildet (Egner *et al.*, 2002). Die mitochondriale Fusion ist Grundvoraussetzung für die Ausbildung eines solchen durchgehenden Netzwerks. Dieses stellt eine elektrische Einheit dar, sodass Membranpotential von O₂-reichen auf O₂-arme Bereiche übertragen werden kann. Dadurch wird die effiziente Energieversorgung der gesamten Zelle ermöglicht (Skulachev, 2001). Auch für die Übertragung von Calcium-Signalen sind mitochondriale Netzwerke im Zusammenspiel mit dem Endoplasmatischen Retikulum von großer Bedeutung (Szabadkai *et al.*, 2006). Die Fusion bietet zudem einen effektiven Schutzmechanismus gegen mtDNA-Schädigungen, die z. B. durch ROS entstehen. Durch die Vereinigung und Durchmischung des mitochondrialen Kompartiments kann eine Komplementation von mtDNA-Genprodukten und damit die Kompensation verschiedener somatischer Schäden erfolgen (Sato *et al.*, 2006). Die mitochondriale Teilung wiederum ist insbesondere für die Vererbung von Mitochondrien wichtig. Da diese nicht *de novo*, sondern durch Wachstum bestehender Organellen entstehen, müssen sie während der Cytokinese geteilt und in die Tochterzellen transportiert werden (Warren & Wickner, 1996).

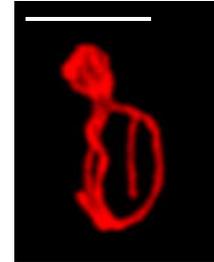


Abbildung 1-2: Mitochondriales Netzwerk einer Hefezelle auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Die Visualisierung erfolgte mittels mtRFP. Der Größenbalken entspricht 5 µm.

In höheren Eukaryoten ist die Fusion zudem entscheidend für Entwicklungsprozesse wie Embryonalentwicklung (Chen *et al.*, 2003) und Spermatogenese (Hales & Fuller, 1997). Auch der antagonistische Prozess der Teilung ist in Entwicklungsprozesse involviert, indem er eine zelluläre Differenzierung während der Embryonalentwicklung in *C. elegans* (Labrousse *et al.*, 1999) und die Synapsenbildung (Li *et al.*, 2004) ermöglicht. Die mitochondriale Teilung ist außerdem maßgeblich an der Apoptose beteiligt. Sie bewirkt eine mitochondriale Fragmentierung, die der Cytochrom *c*-Freisetzung und Caspaseaktivierung vorangeht (Youle & Karbowski, 2005) (Zusammenfassung der physiologischen Bedeutung von Mitochondrien in Westermann, 2008).

1.6 Mitochondriale Fusion und Teilung in *S. cerevisiae*

Mitochondriale Fusion und Teilung sind antagonistische Prozesse, die in einem regulierten Zusammenspiel die mitochondriale Morphologie maßgeblich beeinflussen. Für die Aufrechterhaltung eines zusammenhängenden Retikulums herrscht ein Gleichgewicht zwischen Fusions- und Teilungsereignissen (in logarithmisch wachsenden Hefezellen auf glukosehaltigem Medium bis zu 2,5 Fusionen und Teilungen pro Zelle und pro Minute; Nunnari *et al.*, 1997; Jakobs *et al.*, 2003b). Kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts, z. B. durch Deletion von Teilungs- und Fusionskomponenten, so verändert sich die Struktur der Mitochondrien gravierend (Abb. 1-3). Ist die Teilung blockiert, schreitet die Fusion weiter voran und es entstehen stark verbundene, fischernetzartige Strukturen (z. B. in der $\Delta dnm1$ -Mutante; Otsuga *et al.*, 1998). Wird das Gleichgewicht, z. B. durch Inhibition der Fusionsmaschinerie, in Richtung Teilung verschoben, bilden sich getrennte Mitochondrienfragmente, die ihre mtDNA und damit ihre respiratorische Funktion verlieren. Interessanterweise bildet sich wieder ein wildtypähnliches Retikulum aus, wenn beide Prozesse gleichermaßen gestört werden (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki & Jensen, 1999). Die Grundmechanismen der mitochondrialen Dynamik und die beteiligten Proteine sind dabei evolutionär stark konserviert, sodass Erkenntnisse aus *S. cerevisiae* auch auf höhere Eukaryoten übertragen werden können (Merz *et al.*, 2007).

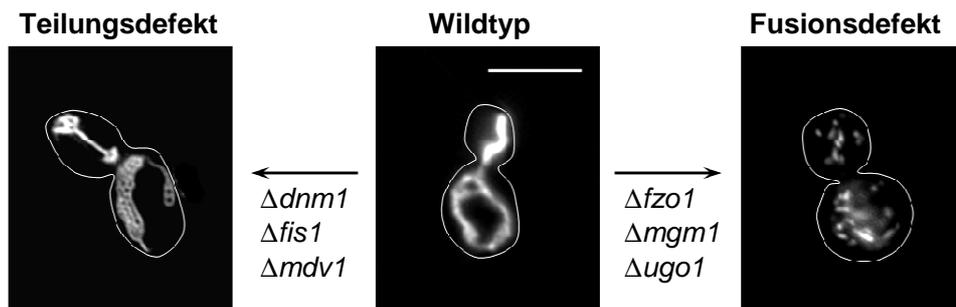


Abbildung 1-3: Mitochondrien bei Störung des Fusions- oder Teilungsgleichgewichts. Bei Beeinträchtigung der mitochondrialen Teilung, z. B. durch Deletion der Teilungskomponenten Dnm1, Fis1 und Mdv1 (Erklärungen sind Kapitel 1.6.2 zu entnehmen), bilden sich durch ein Voranschreiten der mitochondrialen Fusion hoch verzweigte fischernetzähnliche, mitochondriale Strukturen aus (links). Ist die mitochondriale Fusion gestört, z. B. durch Deletion der Fusionskomponenten Fzo1, Mgm1 und Ugo1 (Erklärungen sind Kapitel 1.6.1 zu entnehmen), kommt es zu verstärkter Teilungsaktivität, sodass mitochondriale Fragmente entstehen (rechts). Der Größenbalken entspricht 5 μm .

1.6.1 Die mitochondriale Fusionsmaschinerie

Die mitochondriale Doppelmembran erfordert den koordinierten Ablauf zweier Membranfusionsereignisse. Hierfür existieren individuelle Maschinerien in jeder Membran, deren Funktionen *in vivo* zeitlich gekoppelt sind. In Hefezellen wird die mitochondriale Fusion durch die evolutionär hoch konservierten GTPasen Fzo1 und Mgm1 und das hefespezifische Protein Ugo1 vermittelt. Fzo1 (*fuzzy onions*) wurde als erste mitochondriale Fusionskomponente entdeckt (Hales & Fuller, 1997; Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Das Protein besitzt eine GTPase-Domäne, zwei Transmembranregionen, die es in der mitochondrialen Außenmembran verankern, und mehrere Coiled-Coil-Domänen. Die Coiled-Coil-Strukturen und die GTPase-Domäne ragen in das Cytosol, wohingegen die kleine Loopregion zwischen den Transmembrandomänen im Intermembranraum lokalisiert ist (Abb. 1-4) (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2001). Die dynaminverwandte GTPase Mgm1 (*mitochondrial genome maintenance*; Homolog in Säugern: Opa1) besitzt einen hydrophoben Transmembrananker, eine GTPase-Domäne, eine mittlere Domäne unbekannter Funktion und eine GTPase-Effektordomäne (GED) (Wong *et al.*, 2003; Okamoto & Shaw, 2005). Mgm1 kommt in zwei Isoformen vor, einer langen Form (l-Mgm1), die integral in der Innenmembran sitzt, und einer kurzen Form (s-Mgm1), die durch proteolytische Prozessierung entsteht und im Intermembranraum peripher an der Innenmembran assoziiert ist (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003). Die dritte Fusionskomponente Ugo1 (*ugo*: japanisch für Fusion) liegt in der Außenmembran und besitzt drei Transmembrandomänen im Zentrum des Proteins sowie zwei Motive, die denen mitochondrialer Carrier-Proteine ähneln. Der N-Terminus befindet sich im Cytoplasma, wohingegen der C-terminale Teil des Proteins in den Intermembranraum ragt (Hoppins *et al.*, 2009).

Fzo1, Ugo1 und Mgm1 bilden einen dynamischen Komplex aus, der die Außen- und Innenmembran durchspannt (Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003) und dadurch möglicherweise die Fusionsereignisse der beiden Membranen koordiniert (Hoppins *et al.*, 2007). Das Vorliegen cytosolischer und intermembranraumständiger Domänen in Ugo1 legt nahe, dass dieses Protein als Adapter eine Interaktion zwischen Fzo1 und Mgm1 im Fusionskomplex vermittelt. Alternativ könnte Fzo1 direkt über seine Linkerregion im Intermembranraum mit Mgm1 wechselwirken (Merz *et al.*, 2007). Die mitochondriale Fusion verläuft in drei Schritten (Okamoto & Shaw, 2005). Zunächst bilden sich durch Oberflächenproteine der zu fusionierenden Mitochondrien *trans*-Komplexe aus, wobei Fzo1

maßgeblich beteiligt zu sein scheint (Westermann, 2008). Auch im zweiten Schritt der Fusion, der Vermischung der Lipiddoppelschicht, nimmt Fzo1 eine Schlüsselrolle ein. Aufgrund seiner Topologie könnte Fzo1 hierbei, analog zu viralen Fusionsproteinen oder SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), durch Bildung α -helikaler Bündel entgegengesetzte Membranen in engen räumlichen Kontakt bringen und die Lipiddurchmischung initiieren (Griffin *et al.*, 2006; Westermann, 2008). Die durch die GTPase-Domäne bereitgestellte Energie wäre ausreichend, um die Energiebarriere zur Vermischung der Lipiddoppelschicht zu überwinden. Auch wenn bisher noch keine experimentellen Belege einer solchen Fusogenwirkung existieren, ist eine zentrale Rolle in diesem Prozess unumstritten (Okamoto & Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Abschließend findet die Fusion der Innenmembranen statt. Analog zu Fzo1 könnte Mgm1 durch die Bildung von *trans*-Komplexen die räumliche Nähe der Membranen vermitteln und darüber hinaus auch eine Schlüsselrolle während der Lipiddurchmischung einnehmen (Meeusen *et al.*, 2006; Westermann, 2008). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch nicht bekannt.

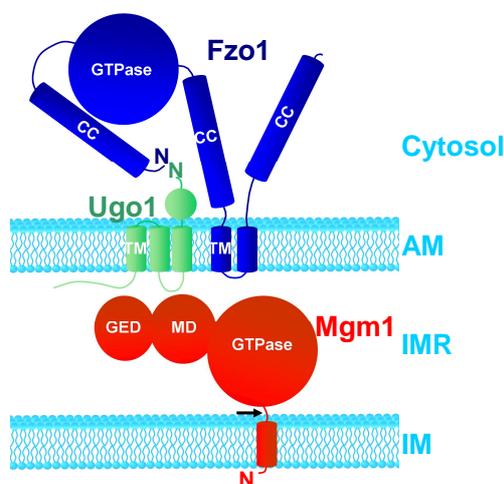


Abbildung 1-4: Die mitochondriale Fusionsmaschinerie in *S. cerevisiae*. Für die mitochondriale Fusion bilden die Proteine Fzo1 (blau), Ugo1 (grün) und Mgm1 (rot) einen dynamischen Komplex. Fzo1 bildet über seine C-terminale Coiled-coil-Domäne α -helikale Bündel, die die Membranen zu fusionierender Organellen in enge räumliche Nähe bringen. Durch proteolytische Spaltung (Spaltstelle durch Pfeil markiert) existiert Mgm1 in zwei Isoformen. Die N-Termini der Proteine sind jeweils gekennzeichnet (N). Details sind dem Text zu entnehmen. AM: mitochondriale Außenmembran; CC: Coiled-coil-Domäne; GED: GTPase-Effektordomäne; IMR: Intermembranraum; IM: mitochondriale Innenmembran (nach Westermann, 2008).

1.6.2 Die mitochondriale Teilungsmaschinerie

Nach heutigem Wissensstand besteht die mitochondriale Teilungsmaschinerie in *Saccharomyces cerevisiae* aus den vier Proteinen Dnm1, Fis1, Mdv1 und Caf4. Die Schlüsselkomponente der mitochondrialen Teilung ist dabei die dynaminverwandte GTPase Dnm1 (*dynamin-related*; Homolog in höheren Eukaryoten: Drp1). Dnm1 besteht aus einer N-terminalen GTPase-Domäne, einer mittleren Domäne gefolgt von einer hydrophilen Region unbekannter Funktion (Insert B) und einer C-terminalen GTPase-Effektordomäne (GED) (Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008; siehe auch Abb. 1-5). Die mittlere Domäne und die

GED vermitteln vermutlich homotypische Proteininteraktionen (Fukushima *et al.*, 2001). Dadurch ist Dnm1 in der Lage über Selbstassemblierung Multimere auszubilden (Hoppins *et al.*, 2007). *In vivo* assembliert Dnm1 in punktuellen Strukturen an Mitochondrien (Otsuga *et al.*, 1998), wobei die Entstehung und der Erhalt dieser mitochondrial lokalisierten Komplexe hochdynamisch sind und durch ständige Assoziation und Dissoziation bestimmt werden (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Im nukleotidfreien oder GDP-gebundenen Zustand entstehen leicht gebogene Dnm1-Filamente und im GTP-gebundenem Zustand ausgedehnte Spiralstrukturen (Naylor *et al.*, 2006). So können sich GTP-abhängig mitochondrienumschließende Spiralen bilden, die vermutlich über mechanochemische Kraft die mitochondriale Teilung vermitteln. Dnm1 scheint also wie andere dynaminverwandte Proteine über Selbstassemblierung und die Bildung GTP-gebundener Spiralen zu funktionieren (Ingerman *et al.*, 2005).

Für eine stabile mitochondriale Bindung von Dnm1 werden die weiteren Teilungskomponenten Fis1 und Mdv1 (*mitochondrial division*) bzw. Caf4 (*CCR4 associated factor*) benötigt, wobei Fis1 die Funktion eines Membranankers übernimmt und Mdv1/Caf4 als Adapter dient. Fis1 (*fission*; Homolog in höheren Eukaryoten: Fis1 bzw. hFis1) ist als sogenanntes *tail-anchored* Protein über eine endständige, C-terminale Transmembrandomäne in der mitochondrialen Außenmembran verankert und dadurch gleichmäßig über die gesamte Mitochondrienoberfläche verteilt (Mozdy *et al.*, 2000). Der große N-terminale Teil des Proteins ragt in das Cytoplasma und beinhaltet sechs α -Helices (Abb. 1-5). Diese falten TPR-ähnlich (*tetratricopeptid repeat*) und bilden so eine hydrophobe konkave Oberfläche aus, die zwei Bindungsstellen enthält (Suzuki *et al.*, 2005). Das lösliche Protein Mdv1 besteht aus einer NTE-Domäne (*N-terminal extension*) mit zwei α -Helices, einer zentralen Coiled-coil-Region, über die homotypische Interaktionen stattfinden, und einem C-terminalen WD40-Motiv, das einen siebenblättrigen β -Propeller bildet. In seiner Adapterfunktion wechselwirken die beiden α -Helices der NTE mit der TPR-ähnlichen Domäne von Fis1 und das WD40-Motiv mit Dnm1. In Abhängigkeit von Dnm1 ist auch Mdv1 in punktuellen Strukturen an Mitochondrien assoziiert (Tieu & Nunnari, 2000; Cerveny *et al.*, 2001; Tieu *et al.*, 2002). Caf4 ist ein Paralog von Mdv1, weist dementsprechend die gleiche Domänenstruktur auf (NTE, Coiled-coil-Region und WD40-Motiv) und kann die gleichen Interaktionen eingehen (Griffin *et al.*, 2005). Mdv1 und Caf4 rekrutieren so unabhängig voneinander Dnm1 an die Mitochondrien. Allerdings scheinen Caf4-enthaltende Komplexe nicht teilungsaktiv zu sein (Griffin *et al.*, 2005) und die $\Delta caf4$ -Deletionsmutante zeigt – anders als die der anderen drei Teilungskomponenten – keine engmaschigen mitochondrialen Netze, sondern ein wildtypisches Retikulum (Griffin *et al.*, 2005; Hoppins *et al.*, 2007). Das Protein ist also nicht

essentiell für die mitochondriale Teilung. Caf4 vermittelt zudem eine verstärkt polare Orientierung der Komplexe zum Zellkortex hin (Schauss *et al.*, 2006). Möglicherweise erfüllen die entsprechenden Mdv1 oder Caf4 enthaltenden, optisch unterscheidbaren Komplexe verschiedene Funktionen.

Für die koordinierte Funktion des Teilungsapparates schlagen Bhar *et al.* (2006) folgendes Modell vor: Im ersten Schritt wird Dnm1 über gleichmäßig an den Mitochondrien verteilte, prä-assemblierte Fis1-Mdv1-Komplexe an die Mitochondrien rekrutiert. Der kleinste Baustein der Dnm1-Assemblierung ist dabei ein Dimer (Ingerman *et al.*, 2005). Danach erfolgt eine GTP-abhängige Dnm1-Multimerisierung, die eine Reorganisation des mitochondrialen Mdv1 in fluoreszenzmikroskopisch sichtbare Multimere und damit die Ausbildung punktueller Teilungskomplexe nach sich zieht. Abschließend kommt es zu einer Aktivierung der Teilungskomplexe und der Teilung des Mitochondrientubulus. Zusätzlich zu seiner Adapterfunktion scheint Mdv1 *post-targeting* auch entscheidend für diese Aktivierung zu sein. Möglicherweise stabilisiert es die teilungsessentiellen Dnm1-Spiralen oder fördert deren Bildung, indem es die GTP-gebundene Form erhält oder als Polymerisationskeim wirkt (Naylor *et al.*, 2006).

Die Triebkraft der eigentlichen Teilung stellt die Bildung mitochondrienumschließender Dnm1-Spiralen und Ringe dar. Allerdings kommt es nur an einem Bruchteil der Dnm1-Assemblierungen tatsächlich zu einer Spiralisierung und zur Teilung. Zeitaufgelöste mikroskopische Analysen legen nahe, dass diese Ereignisse nur dann stattfinden können, wenn parallel zur Dnm1-Assemblierung eine Einschnürung des mitochondrialen Tubulus (*Constriction*) eintritt (Legesse-Miller *et al.*, 2003). *Constrictions* scheinen also eine Grundvoraussetzung für die mitochondriale Teilung zu sein (Jakobs *et al.*, 2003a; Legesse-Miller *et al.*, 2003). Ihre Bildung kann auch in $\Delta fis1$ - und $\Delta dnm1$ -Zellen beobachtet werden, erfolgt also als Fis1- und Dnm1-unabhängiges Ereignis (Jakobs *et al.*, 2003a), und reduziert den Durchmesser des Mitochondrientubulus von 300-400 nm auf ~100 nm. Interessanterweise entspricht dies etwa dem Durchmesser von Dnm1-Spiralen (Ingerman *et al.*, 2005). Möglicherweise wird erst durch die *Constrictions* die Ausbildung von mitochondrienumschließenden Spiralen möglich. Es ist unklar, wie die *Constrictions* entstehen und ob analog zur mitochondrialen Fusionsmaschinerie ein unabhängiger Innenmembranteilungsapparat existiert. Als mögliche Komponente, die diese Prozesse vermittelt, wird das mitochondriale Innenmembranprotein Mdm33 diskutiert (Messerschmitt *et al.*, 2003).

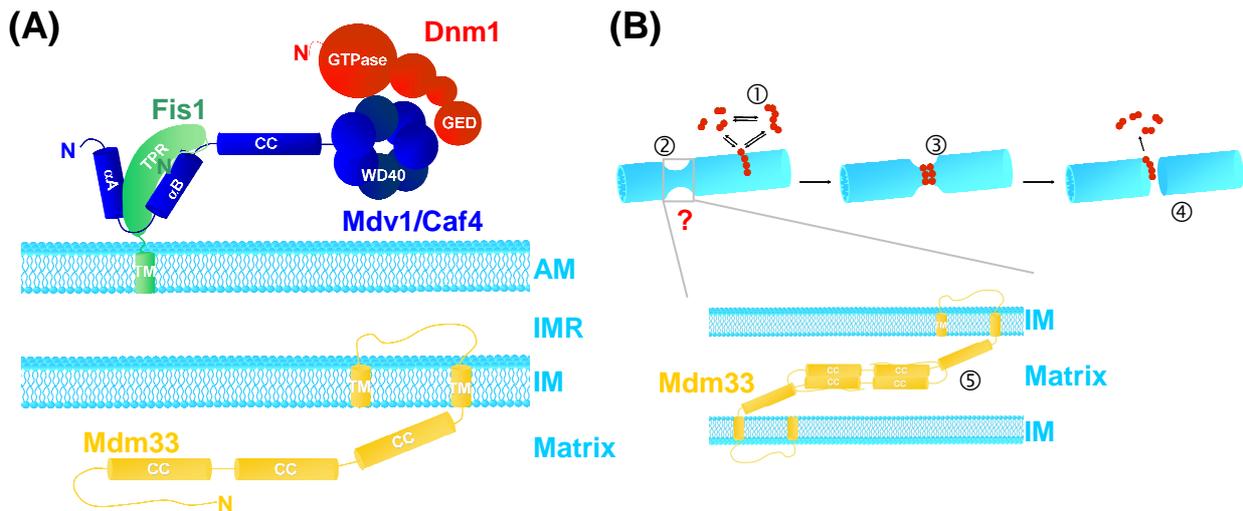


Abbildung 1-5: Die mitochondriale Teilungsmaschinerie in *S. cerevisiae*. (A) Für die mitochondriale Teilung bilden die Komponenten Dnm1, Fis1 und Mdv1/Caf4 einen Komplex aus. Dabei fungiert das integrale Außenmembranprotein Fis1 (grün) als mitochondrialer Anker für die paralogen Adapterproteine Mdv1/Caf4 (blau). Über deren WD40-Domäne erfolgt die Bindung des cytosolischen Proteins Dnm1 (rot). Die N-Termini der Proteine sind jeweils gekennzeichnet (N). αA und αB : α -Helices in der NTE-Domäne (*N-terminal extension*) von Mdv1 und Caf4; AM: mitochondriale Außenmembran; CC: Coiled-coil-Domäne; GED: GTPase-Effektordomäne; IMR: Intermembranraum; IM: mitochondriale Innenmembran (nach Westermann, 2008). (B) Die mitochondriale Assemblierung von Dnm1 (rot) ① und die Einschnürung des mitochondrialen Tubulus (*Constriction*; grauer Kasten) ② erfolgen als voneinander unabhängige Ereignisse. Nur wenn beide Prozesse aufeinandertreffen, können mitochondrienumschließende Dnm1-Spiralen gebildet werden ③, die die Teilung vermitteln ④. Mdm33 wird als Komponente diskutiert, die die Bildung von *Constrictions* und/oder die Innenmembranteilung über Bildung oligomerer Komplexe ⑤ vermitteln könnte. Die genaue Zusammensetzung dieser Komplexe, die Art der Wechselwirkungen und mögliche Wechselwirkungspartner sind nicht bekannt.

1.7 Die mitochondriale Morphologiekomponente Mdm33

Das Gen *MDM33* (*mitochondrial distribution and morphology*; systematischer Name: *YDR393W*) wurde in einem genomweiten Screen nach Hefedeletionsmutanten nicht-essentieller Gene mit veränderter mitochondrialer Morphologie identifiziert (Dimmer *et al.*, 2002). Seine Deletion bewirkt einen spezifisch mitochondrialen Morphologiedefekt. Es entstehen große ringähnliche oder hohlkugelförmige Organellen (Abb. 1-6), die noch Fusionskompetenz aufweisen (Messerschmitt *et al.*, 2003). Als Besonderheit auf ultrastruktureller Ebene bilden die Doppelmembranen von $\Delta m d m 3 3$ -Mitochondrien verlängerte Ausdehnungen, die einen engen Matrixraum umschließen. Möglicherweise entstehen durch Fusion dieser Ausdehnungen in der zweiten und dritten Dimension die fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren ringähnlichen und hohlkugelförmigen Mitochondrien. Die Überexpression von *MDM33* bedingt einen starken Wachstumsdefekt, der bereits durch Espinet *et al.* (1995) gezeigt wurde (daraus ergibt sich der Alternative Name *SHE9*: *sensitivity to high expression*), und die Fragmentierung/Aggregation des mitochondrialen Netzwerks (Abb. 1-6). Gleichzeitig entstehen Septen oder vesikuläre Strukturen der mitochondrialen

Innenmembran und die Cristae gehen verloren (Messerschmitt *et al.*, 2003). Doppeldeletionsstudien zeigten, dass sich $\Delta mdm33$ epistatisch zu $\Delta fis1$ verhält, wohingegen $\Delta fzo1$ epistatisch zu $\Delta mdm33$ ist. Die Funktion von Mdm33 ist also notwendig für die Ausbildung der typischen netzartigen Mitochondrien in $\Delta fis1$ -Zellen und die Fusionsfähigkeit ist eine entscheidende Voraussetzung für die Bildung von ringähnlichen und hohlkugelförmigen Organellen im $\Delta mdm33$ -Hintergrund. Die Deletion von *MDM33* verhindert nicht die $\Delta fzo1$ -bedingte Fragmentierung von Mitochondrien (Messerschmitt *et al.*, 2003).

Mdm33 ist ein pilzspezifisches, 54 kDa großes Innenmembranprotein, das gemäß Sequenzanalyse zwei Transmembrandomänen besitzt (eine direkt am C-Terminus). Dadurch sind sowohl das C-terminale Ende als auch der große N-terminale Bereich, der mit hoher Wahrscheinlichkeit Coiled-coil-Strukturen ausbildet, in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, und der Linkerbereich zwischen den Transmembrandomänen befindet sich im Intermembranraum (Abb. 1-5). Coimmunoprecipitations-Experimente identifizierten Mdm33 als Teil eines hochmolekularen Komplexes unbekannter Zusammensetzung, in dem es homotypische Wechselwirkungen eingeht (Messerschmitt *et al.*, 2003).

Ausgehend von diesen experimentellen Befunden schlägt das bestehende Wirkmodell vor, dass es sich bei Mdm33 um eine Teilungskomponente der Innenmembran handelt. Über *trans*-Wechselwirkungen seiner matrixständigen Coiled-coil-Strukturen könnte das Protein entgegengesetzte mitochondriale Innenmembranen in unmittelbare räumliche Nähe bringen und von der Matrixseite eine Membranfusion einleiten. Denkbar wäre, dass so auch die teilungsessentiellen *Constrictions* gebildet werden. Die mechanistischen Grundlagen und mögliche Wechselwirkungspartner von Mdm33 sind bisher unbekannt (Messerschmitt *et al.*, 2003).

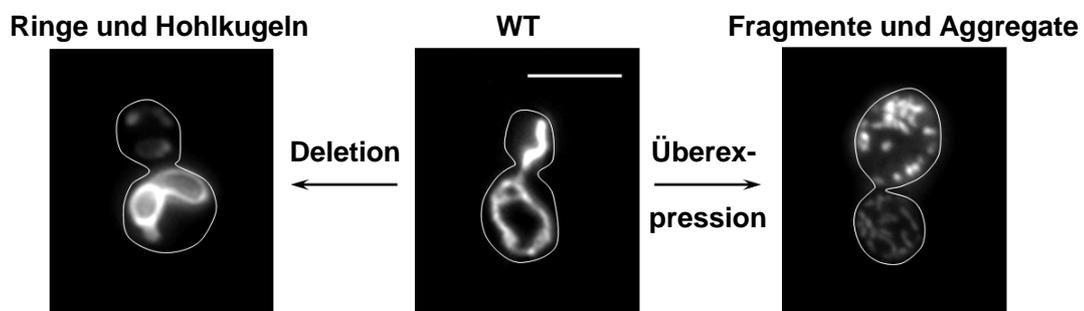


Abbildung 1-6: Die mitochondrialen Morphologie in Abhängigkeit von Mdm33. Das wildtypische mitochondriale Netzwerk geht bei Deletion von *MDM33* in ring- und hohlkugelförmige Strukturen über (links). Bei Überexpression von *MDM33* entstehen fragmentierte und aggregierte Mitochondrien (rechts).

1.8 Zielsetzung

Aufgrund der großen physiologischen Bedeutung von Mitochondrien sind der Erhalt ihrer Funktion und ihre Morphogenese äußerst wichtig für die Zelle. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten sind in diesen beiden Teilbereichen der mitochondrialen Biogenese noch viele Fragen offen. Beispielsweise konnten zwar durch klassische genetische Methoden und genomweite Durchmusterungen zahlreiche *pet*-Gene identifiziert werden, die genauen Zusammenhänge und molekularen Grundlagen, die für die Entstehung eines *pet*-Phänotyps entscheidend sind, sind aber auch heute noch nicht voll verstanden und systematisch erfasst. Im Bereich der mitochondrialen Morphogenese ist weitgehend unklar, wie die Teilung der mitochondrialen Innenmembran bewerkstelligt wird, und ob die bisher einzige identifizierte Komponente Mdm33 Wechselwirkungspartner besitzt. Bereits seit mehreren Jahren ist das Hefegenom komplett entschlüsselt und es stehen kommerziell erwerbliche Deletionsbibliotheken zur Verfügung, die Deletionsmutanten fast aller nicht-essentieller Hefegene enthalten. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, durch systematische, genomweite Analysen ein umfassendes Bild zellulärer Abläufe zu erhalten. Ausgehend von der ~4800 Hefestämme umfassenden *MAT α* -Deletionsbibliothek sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch geeignete Screeningverfahren weitere Einblicke in die zwei oben genannten Teilaspekte der mitochondrialen Biogenese gewonnen werden, (1) Erhalt der Atmungsfähigkeit und (2) Teilung als Bestandteil der Morphogenese.

Im ersten Teilabschnitt wurde ein genomweiter Screen nach respiratorisch inkompetenten Hefedeletionsmutanten durchgeführt, um die volle Anzahl der Gene zu erfassen, die eine Hefezelle für den Erhalt ihrer respiratorischen Aktivität benötigt. Vergleichende Gendeletionsanalysen sollten daraus den kompletten Satz an Genen liefern, die essentiell für die respiratorische Aktivität in Hefe sind. Weiterführend sollte durch systematische funktionelle Tests (CytoDUKTIONS- und Komplementationsexperimente, sowie Studien der mitochondrialen Translation) aller identifizierten Kandidatenstämme ein umfassendes Bild der molekularen Prozesse erhalten werden, die für die respiratorische Kompetenz und den Erhalt sowie die Expression mitochondrialer DNA benötigt werden. Als besonders interessante Gruppe wurden dadurch Deletionsstämme erfasst, bei denen möglicherweise auch extragenomische Faktoren den Erhalt der respiratorischen Aktivität beeinflussen. Stellvertretend für die Vertreter dieser Gruppe sollte die Entstehung der respiratorischen Inkompetenz in den Cytochrom *c* Oxidase-Assemblierungs-Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 detailliert erfasst werden, wobei speziell der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies untersucht wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Studien zur mitochondrialen Formgebung durchgeführt, wodurch ein tieferes Verständnis von Mdm33 erhalten werden sollte. Bisher sind keine Wechselwirkungspartner dieses Proteins bekannt, obwohl seine vorgeschlagene, komplexe Wirkweise als mitochondriale Innenmembranteilungskomponente (Messerschmitt *et al.*, 2003) wahrscheinlich weitere Faktoren erfordert. Deshalb sollten in einer Durchmusterung von 164 Deletionsstämmen, in denen vor allem mitochondrial lokalisierte Proteine unbekannter Funktion fehlten, mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Dieses Verfahren beruhte auf der Überexpression von *MDM33*, die in Wildtypzellen zu einem Wachstumsarrest und einer Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks führt (Messerschmitt *et al.*, 2003). Im Deletionshintergrund der Teststämmen sollten diese Defekte durch das Fehlen eines potentiellen Wechselwirkungspartners aufgehoben werden. Im Rahmen der Durchmusterung wurden deshalb die beiden Parameter Wachstumsverhalten und Mitochondrienmorphologie erfasst. Positive, d. h. Deletionsstämmen mit Überexpressionstoleranz, sollten weiterführend untersucht werden. Hierfür wurde eine funktionelle Charakterisierung durchgeführt (bestehend aus detaillierten Wachstumsanalysen, einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der mtDNA und einer Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie) sowie ultrastrukturelle Analysen mittels Transmissionselektronenmikroskopie vorgenommen. Außerdem sollte der Einfluss von Mdm33 auf die Außenmembranteilungsmaschinerie erfasst werden, indem die mitochondriale Assemblierung von GFP-markiertem Dnm1 untersucht wurde. Eine Quantifizierung von Dnm1-Clustern sollte mögliche Unterschiede in Zahl, Form und Verteilung der Proteinassoziate zwischen Wildtyp- und $\Delta mdm33$ -Zellen aufdecken.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

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

2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.1.1 Präparation von DNA

2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Mini-Präparation: Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979; Birnboim, 1983)

Die alkalische Lyse ist die am häufigsten genutzte Methode zur Präparation von *E. coli* Plasmid-DNA im Kleinmaßstab. Sie beruht darauf, dass der pH-Wert durch die Zugabe von NaOH weit ins Alkalische verschoben wird, was die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären DNA-Strängen destabilisiert. Ausschließlich die Plasmid-DNA ist aufgrund ihrer Konformation in der Lage, sich bei pH-Neutralisation vollständig zu renaturieren und kann somit selektiv wiedergewonnen werden (http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/a/al/alkalische_00032lyse.glos.html).

Transformierte *E. coli*-Zellen aus einer 1,5 ml LB-Amp^uN-Bakterienkultur (1% (w/v) Pepton (Carl Roth, Karlsruhe); 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt (Serva, Heidelberg); 1% (w/v) NaCl; 100 µg/ml Ampicillin) wurden 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. Für Zellaufschluss und alkalische Lyse wurde die Suspension zunächst mit 200 µl NaOH/SDS (0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS) durch Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Neutralisation mit 150 µl KOAc (5 M; pH 4,8) wurden das Invertieren und die 5-minütige Inkubation auf Eis wiederholt. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min; 4°C; 13.000 rpm; Sigma 3K30, Rotor 12154-H) abgetrennt. Für die Fällung der Plasmid-DNA wurden 0,3 ml des erhaltenen Überstands abgenommen, 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 daraus

resultierende Nukleinsäurepellet wurde nach Waschen mit 70% (v/v) Ethanol für 1 h bei RT oder für 10 min bei 72°C getrocknet und in 30-50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) aufgenommen.

Midi-Präparation: Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)

Bei großem Bedarf an Plasmid-DNA wurde das QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dafür wurden 50 ml LB-Amp-Flüssigmedium mit plasmidtragenden *E. coli*-Zellen beimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min; 4°C; 4.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) vom Medium abgetrennt. Die weitere Durchführung ist der Anleitung des Herstellers zu entnehmen. Abweichend davon erfolgte die DNA-Fällung durch 60-minütige Zentrifugation bei 4°C und 5.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44). Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) oder ddH₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.1.1.2 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*-Zellen

Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* nach Burke *et al.* (2000)

Genomische DNA wurde zum Nachweis von Gendelektionen über PCR (2.1.2) nach dem Verfahren von Burke *et al.* (2000) gewonnen. Dafür wurden Hefezellen aus einer 10 ml YPD üN-Kultur (1% (w/v) Hefe Extrakt (Serva, Heidelberg); 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA), 2% (w/v) Glukose) durch Zentrifugation abgetrennt (2 min; 4°C; 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44). Das erhaltene Pellet wurde mit 0,5 ml ddH₂O gewaschen, für den Zellaufschluss mit 0,2 ml Aufschlusspuffer (2% (v/v) Triton; 1% (w/v) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM Na₂-EDTA), 0,2 ml Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (25:24:1) sowie 0,3 g Glasperlen (Ø 0,2-0,25 nm) versetzt und 3-4 min gevortext. Nach Zugabe von 0,2 ml TE-Puffer und Zentrifugation (5 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 1 ml 100% Ethanol p.a. vorgelegt worden war. Die beiden Fraktionen wurden durch Invertieren gemischt und 2 min bei RT und 13.000 rpm (Sigma 1-15, Rotor 12124) zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 0,4 ml TE-Puffer mit 3 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml) resuspendiert und 5 min bei 37°C inkubiert. Die reine DNA wurde daraus durch Fällung mit 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml 100% Ethanol p.a. sowie Zentrifugation (5 min; RT;

13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) als Pellet erhalten, 1 h bei RT getrocknet und in 50 µl TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen.

Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* mit dem YeaStar™ Genomic DNA Kit (Zymo Research, Orange, USA)

Da das Verfahren nach Burke *et al.* (2000) in vielen Fällen DNA nicht in ausreichender Menge lieferte, wurde alternativ das YeaStar™ Genomic DNA Kit (Zymo Research, Orange, USA) verwendet. Die Präparation erfolgte gemäß Anleitung des Herstellers. Für die abschließende Elution der DNA wurden 50 µl TE-Puffer oder ddH₂O verwendet.

2.1.1.3 Isolierung von DNA aus zellfreien Systemen

Gelelution von DNA-Fragmenten

Waren in einem Ansatz – z. B. nach unvollständiger Restriktion – verschiedene DNA-Fragmente enthalten, so wurde das Fragment gewünschter Größe mittels Gelelution gereinigt. Nach Agarosegelelektrophorese (2.1.3) wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers weiter verarbeitet. Die DNA-Elution erfolgte in der Regel mit 30 µl EB-Puffer.

Reinigung von DNA mittels Qiagen PCR-Purification Kit

Die Gewinnung von DNA aus PCR-Ansätzen und nach den einzelnen Klonierungsschritten (2.1.4) erfolgte mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gemäß der Anleitung des Herstellers. Für die abschließende Elution wurden 30-50 µl EB-Puffer oder ddH₂O verwendet.

Reinigung von DNA-Fragmenten durch Ethanol-Fällung

Die Präzipitation von DNA mit Ethanol ermöglicht die Konzentrierung der Nukleinsäuren und das Entfernen von unerwünschten Salzen. Dafür wurde die DNA-Lösung zunächst auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen an 100% Ethanol p.a. versetzt. Nach anschließender 15-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (10 min; 4°C; 13.000 rpm; Sigma 3K30, Rotor 12154-H) wurde das erhaltene DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem entsprechenden Volumen ddH₂O resuspendiert.

2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion nach Mullis *et al.* (1986) können DNA-Fragmente in wiederkehrenden Zyklen aus Doppelstrangtrennung, Bindung zweier sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNA-Synthese mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik zur Herstellung von Klonierungsinserts und zum Nachweis von Deletions- und Wildtyp-Allelen verwendet. Dadurch wurden Hefestämme aus der *MAT α* -Deletionsbibliothek (BioCat, Heidelberg; *MAT α , his3, leu2, lys2, ura3, your favourite gene (yfg)::kanMX4*; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006) überprüft und hergestellte Doppelmутanten bestätigt. Standard 50 μ l-Reaktionsansätze setzten sich aus 200-500 ng Plasmid- oder genomischer DNA, 0,2 mM dNTPs (10 mM Stocklösung), 1x PCR-Puffer (polymerasespezifischer 10x Puffer des Herstellers; Promega, Mannheim), je 10 pmol *forward* und *reverse* Primer (100 pmol Stocklösung; Metabion, Martinsried), sowie 0,025 U/ μ l *GOTaq*[®]-DNA-Polymerase (5 U/ μ l; Promega, Mannheim) zusammen. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zu Klonierungszwecken wurde die prozessivere *Pfu*-Polymerase (3 U/ μ l; Promega, Mannheim) verwendet, da diese eine *proofreading*-Aktivität besitzt. Reaktionen wurden im „PCR Sprint Thermal Cycler“ (Thermo Electric, Waltheim, USA) mit dem in Tab. 2-1 angegebenen Programm durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind Tab. 2-2 zu entnehmen.

Alternativ dazu wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Hefezellmaterial wurde von Medienplatten entnommen, in 200 μ l ddH₂O resuspendiert und für einen Zellaufschluss 10 min gekocht. Anstelle der Plasmid- oder der genomischen DNA wurden 5 μ l der Suspension als Matrize eingesetzt. Die weitere Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, sowie PCR-Programm und Oligonukleotide entsprechen den beschriebenen Standardbedingungen.

Tabelle 2-1: PCR-Programm zum Nachweis von Deletions- bzw. Wildtyp-Allelen und zur Herstellung von Klonierungsinserts.

Reaktionsabschnitt	Temperatur und Dauer des Reaktionsabschnitts	
Anfangsdenaturierung	94°C / 5 min	1x
Denaturierung	94°C / 1 min	} 35x
Primer-Anlagerung	52-57°C / 1 min	
Kettenverlängerung	72°C / 1 min	
abschließende Kettenverlängerung	72°C / 10 min	1x

Tabelle 2-2: Verwendete Oligonukleotide. Angegeben sind Namen, Sequenzen und Schmelzpunkte in °C (T_m ; angegeben sind Basiswerte). Die Berechnung der Schmelzpunkte erfolgte mit Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

Name	Sequenz (5' → 3')	T_m in °C
Forward Primer zum Nachweis von Allelen		
<i>Zum Nachweis der Kanamycin-Deletionskassette:</i>		
Kan-Kassette	CCG GAT TCA GTC ACT CAT GG	54
<i>Zum Nachweis der Wildtyp-Allele in fraglichen Stämmen:</i>		
WT-YAL012W	GGC CAC TAA TAA CAA GCC ATT GTA CGA G	60
WT-YAL047C	CAG TTA AAT ACT TTG GAC AAC CAA AAG TTA ATA CTA TC	59
WT-YBL038W	GTA GAG TGC CAG TTC GTA CA	58
WT-YBR163W	AGG CTC TAA TAC ATT TGA TAT GAC CGC GTT C	60
WT-YDL202W	GTC CAT TAC AAT AAT CTT TCC AAA A	58
WT-YDR268W	CAG CAT TTG GAA CTA ACA AGA CA	59
WT-YDR231C	GGG GTC AAA AGA TCC TCT TAG AAG ACA C	60
WT-YDR323C	CTT CCG CTG CAT ACA TAA ACG AAA AAA TCC TAC	61
WT-YDR332W	GTG GGG CCT CCC TTT AAA AGG TAA G	59
WT-YFL036W	TCG CAT CAG TTC ATG ATT CTT ACT GGA CG	60
WT-YIL036W	CAA TCC CTG GTA CTA CGG CAT GGA AG	61
WT-YJR090C	CGG GCA ACA TAG ATT ACC AAA AAG GGC	60
WT-YKL148C	CAG CCT GGG TTG CCA CAC AAA	56
WT-YML081C-A	GTT GAA AAG ATT CCC TAC CCC TAT CC	58
WT-YML129C	CCA AAT ACG CTT GGT ATA CCA GAG TTA CAG	60
WT-YMR066W	GTC GTC CAT TGT AAA GAA ATT AAT AAA AAG GCA G	58
WT-YOR205C	GGT ATT GAT GTA TTC AAC TCG TGC AAT TCA TC	59
WT-YPL029W	GCA GAC TAT TTC AGA TGA GCT A	58
WT-YPR047W	CTC GAA CTC TGC GGA TGC	58
WT-YPR124W	CTC TTT CAT GAC ATT ATA AGG GCG TTC TTA G	59
<i>Zum Nachweis der Wildtyp-Allele in COX-Stämmen:</i>		
WT-COX10	GAC GTG ATT CGG GCG TGA TTA ATA TTC C	60
WT-COX16	CGG GTT ATG GCC GTA CAC AAG TTA TTA G	60
WT-COX19	GGA GTT GAG AAA CGA GAA AAT CCA AAT AAA GC	59
WT-MSS2	GGA ATT CGT TTT TAG ATT TTA ACA ACA ACA ATA TGA GGG	60
Reverse Primer zum Nachweis von Allelen		
<i>Zur Überprüfung der hergestellten Doppelmutante:</i>		
Mdm33_R	GAC TGT ACC ATT GAG TTG AGC C	55
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in fraglichen Stämmen:</i>		
YAL012W	GAT TGC GGA TGA GTA AGC GAA GAG TTA TAG	60
YAL047C	GGA TCT GAA ATG AGG CAA CCA AAA GAG AG	60
YBL038W	GTT TTT TCT TTG CAG CAT CGA AAT	58
YBR163W	CCA AAG AAC TGA ATC TTG TAG AAT TGA AGG AC	59
YDL202W	TGA CGA TAA TAT CTC TTC TTT GG	58
YDR268W	CTC AAC TCC TTG GCC GCA A	59
YDR231C	GAG AGA CTG CTG GAG AAG CA	60
YDR323C	GAA GCT TCT ATT TAT GTT GAA GCT TCC TTC AG	59
YDR332W	GCA ATC ACC TTT CTT TAT TGC GGG AAT CC	60
YFL036W	CTG GAC GCA AAC AAT AGA CAG GTT TCA C	60
YIL036W	GGC ATA GAT TCA TCA ATG ATG GTA ATA AAC ATT TAA GC	60
YJR090C	CTA GCT AAT GAC AAA GAC GGT GAT CTG G	60
YKL148C	AAA ATC CTG ACC ATC ACG AAT AC	59
YML081C-A	CAA GAA AAT CTA CTA CCC TAA TCT	58
YML129C	ATA AAT AAT GTA CAA TTT TAC GGG TG	58
YMR066W	CCC GAT AGA AGC CAT ATT CAA ATA GCA TTC	59
YOR205C	GCA ATT AAG ATT TTC ATC TTT TAG TGA AAA GAT GAA GG	59
YPL029W	TTT CGT CAA AAT CCT TGG ATG C	58

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m in °C
YPR047W	TGG TTG AGC AAA TTC GAC GG	58
YPR124W	GAT TTC TTT ATG AAA TTT TCT TTA CTC GAA CCT AAA TAT CAC	60
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in COX-Mutanten:</i>		
cox10	GAAAGATATA GCTAAGCTAG TAGCACCTG	59
cox16	GTTGAATTAT CGGTATTTCT TCCGGAAGGG	60
cox19	CC GGTAGATCTG GGAAGTAAAT ACTAAAC	59
mss2	CAAGGATGAT ACGCTCAATT TACTGGATAC	59
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in pet-Stämmen der MATα-Bibliothek:</i>		
YAL013W	GAA CCA GAG GAG AAA GCC AAC CC	59
YBR128C	CAC TTG CAC AAT GGC TCT ATC TCC TC	60
YBR146W	GAT ATG GAT CCA GCC ATC CCA CTG	59
YDL077C	CCC AGC AAT TCT TCC TTT TTC CCT TAG TC	60
YDL157C	CCA AGA TTA CCC AAA GAC CGT ATC TAT TCC	60
YDR448W	CGT AAG GAT CTA CCA GAA TTG TAT TTG AAA ACA G	60
YGL017W	CTT GAC ATT CGC AGA GTA CTT GTC ATC AG	60
YGR243W	CTTATCCAATAAGAACGTAGATGC	60
YMR015C	CAT CCT TCT TGG ATT GCA AAA AGA TTA GCT G	59
YPL188W	GCT GCA CCA TTT ATC TCA TAA TTA TTG CCT AC	59
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in den neu identifizierten pet-Stämmen:</i>		
YDR065W	GGT ACC CGC TAT GCT ATA AGA GTG CG	61
YGR150C	GGG CAG TTA AAT TAA GGT CAC CTT GGC	60
YJL046W	GGT CCA AAT GGC GAC ATT GAA GAC AC	60
YLL033W	CTA GGG TCT GCC TCC AGC AAG AG	61
YLR091W	CGC CCT TTG AGC TGT TCA CTG CG	61
YMR098C	TTG CCG GGC ATA AGA TCC TTT CTA GTG	60
YMR293C	GGT GTG GCC TTC ACT TTC GGC G	60
YOR305W	CGA TAA GTT CGG TAG GTT TAA CGT CGC	60
YPR116W	GAG ACC ACG GTA ACA TAG ACA TTG TAG AT	59
<i>Zum Nachweis der Deletions-Allele in den neu identifizierten Translationskomponenten:</i>		
YAL039C	GGT TGC GAC ACT TCC CCA GAA GG	61
YDR529C	CTA CGA GGA GAA CCC CTC CAC G	60
YEL051W	AAT TTT AGT AGA AAA GAA GCA ACA TAG GGA CC	58
YJL062W-A	CCA TTG GTG CAC GTT GTT GAA GTG GG	61
YOL096C	GAT GTG GTT CAC GAC CCG TCA CTT G	61
Primer zur Klonierung von pRS416-MSS2 und -COX16		
Cox16fw-BamHI	GGA TCC AAT ATT ACC GTG AAT ATC GCG AGC TAC	63
Cox16rev-XhoI	CTC GAG AGG TAT TTA CAA TCA TTT CCT AGA CAT TCT	61
Mss2fw-BamHI	GGA TCC GAT TTT ATG TGT GGA ATG CTA ACG ATG AAC	63
Mss2rev-XhoI	CTC GAG CTCTAA CAG TAT TTC CTA ATT ATT TCA TAG GTA AC	63

2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse oder Reinigung wurden DNA-Fragmente elektrophoretisch mit 0,8%igen (w/v) Agarosegelen getrennt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer (90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,35). Für die Separation wurde eine Spannung von 8-10 V/cm angelegt. Die Nukleinsäuren wurden durch Interkalation von Ethidiumbromid und Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm sichtbar gemacht.

2.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.1.4.1 Präparativer Restriktionsverdau

In einem 50 µl Gesamtansatz wurden 3-4 µg DNA mit 20-40 U Restriktionsenzym (10 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) und 5 µl des dazugehörigen 10x Puffers versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung der Enzyme gemäß der Anleitung des Herstellers sowie die DNA-Isolierung mittels PCR-Purification Kit (2.1.1.3). Bei zwei verschiedenen Schnittstellen wurden, wenn möglich, Doppelverdau mit 20-40 U pro Restriktionsenzym im passenden 10x Puffer durchgeführt (vgl. <http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>).

2.1.4.2 Dephosphorylierung

Um eine Religation des linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die dafür von Ligasen benötigten 5'-Phosphate enzymatisch entfernt. Hierfür wurden 2-4 µg verdauter Vektor, 10 U Antarctic Phosphatase (5 U/µl; NEB, Frankfurt a. M.) und 5 µl 10x Puffer in einem 50 µl Reaktionsansatz zusammen gegeben. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C und/oder die Reinigung der DNA mittels PCR-Purification Kit (2.1.1.3).

2.1.4.3 Ligation

Der linearisierte, dephosphorylierte Vektor (0,1-0,5 µg) und das verdaute Insert wurden in einem 20 µl Gesamtansatz im Verhältnis 1:3 bis 1:5 mit 2 µl Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase (1 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Die Reaktion war nach 5 h bei RT oder üN bei 4°C abgeschlossen. 10 µl des Ligationsansatzes wurden nach Hitzeinaktivierung (10 min, 65°C) in *E. coli*-Transformationen analog 2.1.5.2 eingesetzt.

2.1.4.4 Klonierung von *MSS2* und *COX16*

Für die Konstruktion der Plasmide pRS416-*MSS2* und pRS416-*COX16* wurden die entsprechenden Gene *MSS2* und *COX16* mit den Primern Cox16fw-*BamHI* und Cox16rev-*XhoI* bzw. Mss2fw-*BamHI* und Mss2rev-*XhoI* (Tab. 2-2) von genomischer DNA amplifiziert (2.1.2) und über die *BamHI* und *XhoI*-Schnittstelle in die *Multiple Cloning Site* des Vektors pRS416 (Sikorski & Hieter, 1989) eingebracht.

2.1.5 Übertragung von genetischem Material in *E. coli*-Zellen

2.1.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-blue (Stratagene, La Jolla, USA) wurden üN 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 und zur Herstellung einer 5 ml üN-Kultur in LB-Flüssigmedium (analog LB-Platten; ohne 2% (w/v) Agar-Agar) verwendet. Je 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml dieser üN-Kultur beimpft. Nach 1 h wurde die OD₆₀₀ in 30 min Schritten verfolgt, bis ein Wert von 0,2-0,4 erreicht war. Die Kulturen wurden anschließend 2 min auf Eis gekühlt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 7.000 rpm (Beckmann-Zentrifuge J2-21, Rotor JA-10) geerntet. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem, sterilfiltriertem 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) resuspendiert und 30-60 min auf Eis inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (10 min; 4°C; 7.000 rpm; Beckmann-Zentrifuge J2-21, Rotor JA-10) wurden die Zellen pelletiert. Das gesamte Zellmaterial 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) aufgenommen. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte das Aufteilen in je 100 µl-Aliquots, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

2.1.5.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

100 µl chemischkompetente *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-blue wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µg gereinigter Plasmid-DNA (in 5 µl ddH₂O) oder 10 µl Ligationsansatz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis erfolgte ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42°C. Der Transformationsansatz wurde danach kurz auf Eis gekühlt und mit 500 µl LB-Flüssigmedium gemischt. Die Zellen wurden anschließend für 30-45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 100 µl von jedem Ansatz wurden auf LB-Amp-Selektionsplatten (analog LB-Platten; zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin) ausgebracht und 12-14 h bei 37°C kultiviert.

2.1.6 Analytischer Restriktionsverdau

Der analytische Restriktionsverdau diente zur Überprüfung von Plasmid-DNA nach Mini- oder Midi-Präparation (2.1.1.1). Ein Reaktionsansatz bestand aus 1 µg gereinigter Plasmid-DNA, 5-10 U je Enzym (10 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl enzymspezifischem 10x Reaktionspuffer, sowie ddH₂O ad 10 µl und wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die Restriktions-

produkte wurden anschließend mit 5 µl Gel-Ladepuffer (4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese (2.1.3) analysiert.

2.2 Methoden der Hefegenetik

Gängige Methoden der Hefegenetik sind in Burke *et al.* (2000) zusammengefasst.

2.2.1 Verwendete Hefestämme

Ein Großteil der eingesetzten Stämme wurde aus der *MAT* α -Deletionsbibliothek mit Zusatzplatten kleiner ORFs entnommen (BioCat, Heidelberg; *MAT* α , *his3*, *leu2*, *lys2*, *ura3*, *yfg::kanMX4*; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006). Im Zuge des *pet*-Screens wurden alle enthaltenen Stämme und für den *MDM33*-Überexpressionsscreen eine Auswahl daraus verwendet (Tab. A7). Ausschließlich die im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisierten sowie alle nicht aus der Bibliothek stammenden Hefestämme sind in Tab. 2-3 zusammengefasst. Varianten, die lediglich mit Plasmiden transformiert worden waren, die für mtGFP- oder mtRFP kodieren, sind nicht aufgeführt. Alle verwendeten Plasmide sind Tab. 2-4 zu entnehmen.

Tabelle 2-3: Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
Isogener Wildtyp BY4742	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i>	Brachmann <i>et al.</i> (1998)
Δ <i>cox10</i> / <i>COX10</i>	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>cox10::kanMX4</i> , [<i>LEU2</i> , <i>COX10</i>]	diese Arbeit
Δ <i>cox16</i> / <i>COX16</i>	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>cox16::kanMX4</i> , [<i>URA3</i> , <i>COX16</i>]	diese Arbeit
Δ <i>cox19</i> / <i>COX19</i>	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>cox19::kanMX4</i> , [<i>URA3</i> , <i>COX19</i>]	diese Arbeit
Δ <i>mss2</i> / <i>MSS2</i>	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>mss2::kanMX4</i> , [<i>URA3</i> , <i>MSS2</i>]	diese Arbeit
Δ <i>mip1</i>	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , <i>mip1::kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt)
Δ <i>cox10</i>	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , <i>cox10::kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt)
Δ <i>cox16</i>	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i> , <i>ura3</i> , <i>cox16::kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt)
Cytoduktionsdonor J1361	<i>MAT</i> α , <i>CEN1-16:pGal-K.lactis-URA3</i> , <i>his3</i> , <i>lys2</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>kar1Δ15</i>	Lettier <i>et al.</i> (2006)
Δ <i>atp3</i> /[<i>pYX223</i>] [<i>pVT100U-mtGFP</i>]	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>atp3::kanMX4</i> , [<i>HIS3</i> , <i>URA3</i>]	diese Arbeit

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Stamm	Genotyp	Referenz
$\Delta ybr163w/[pYX223]$ [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ybr163w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta ydr061w/[pYX223]$ [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ydr061w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta yer004w/[pYX223]$ [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>yer004w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta ygl080w/[pYX223]$ [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ygl080w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta mdv1/[pYX223]$ [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>mdv1::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta dnm1/[pYX223]$ [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα/α, his3, leu2, ura3,</i> <i>dnm1::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta ylr091w/[pYX223]$ [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ylr091w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta ylr356w/[pYX223]$ [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ylr356w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta yml030w/[pYX223]$ [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>yml030w::kanMX4, [HIS3, URA3]</i>	diese Arbeit
$\Delta atp3/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>atp3::kanMX4, [HIS3, URA3, GAL-</i> <i>MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ybr163w/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ybr163w::kanMX4, [HIS3, URA3,</i> <i>GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ydr061w/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ydr061w::kanMX4, [HIS3, URA3,</i> <i>GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta yer004w/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>yer004w::kanMX4, [HIS3, URA3,</i> <i>GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ygl080w/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ygl080w::kanMX4, [HIS3, URA3,</i> <i>GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta mdv1/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>mdv1::kanMX4, [HIS3, URA3,</i> <i>GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta dnm1/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα/α, his3, leu2, ura3,</i> <i>dnm1::kanMX4, [HIS3, URA3,</i> <i>GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ylr091w/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ylr091w::kanMX4, [HIS3, URA3,</i> <i>GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta ylr356w/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>ylr356w::kanMX4, [HIS3, URA3,</i> <i>GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
$\Delta yml030w/[pYX223-GAL-$ MDM33] [pVT100U-mtGFP]	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3,</i> <i>yml030w::kanMX4, [HIS3, URA3,</i> <i>GAL-MDM33]</i>	diese Arbeit
<i>DNM1-GFP</i>	<i>MATα, his3, leu2, met15, ura3,</i> <i>DNM1-GFP, kanMX6</i>	Schauss <i>et al.</i> (2006)
$\Delta mdm33-DNM1-GFP$	n.d., <i>DNM1-GFP, kanMX6,</i> <i>mdm33::kanMX4</i>	diese Arbeit

2.2.2 Anzucht von Hefezellen

Als Standardmedium für die Anzucht von Hefezellen wurde YPD (1% (w/v) Hefe Extrakt (Serva, Heidelberg); 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA); 2% Glukose) verwendet. Für obligat respiratorischen Metabolismus wurde YPG-Medium (1% (w/v) Hefe Extrakt (Difco, Lawrence, USA); 2% (w/v) Pepton (USB, Cleveland, Ohio, USA); 3% Glyzerin) eingesetzt. Die Selektion auf Zellen mit spezifischen Auxotrophiemarkern, z. B. nach Transformation mit Plasmiden oder in Paarungsexperimenten, erfolgte auf Selektivmedium mit 2% Glukose (SD: 0,69% (w/v) Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Formedium, Norwich, UK) supplementiert mit Stammlösungen an 10 mg/l Amino- und 2 g/l Nukleinbasen entsprechend der gewünschten Selektionswirkung (je 2 ml Histidin, Methionin und Tryptophan, sowie 3 ml Lysin oder Leucin und jeweils 10 ml Uracil und Adenin-Sulfat); 2% (w/v) Glukose) und Gal-induzierte Genexpression wurde unter Selektionsdruck auf entsprechendem Selektivmedium mit 2% Galaktose (SGal) vorgenommen. Das Kanamycin-Derivat Geneticin G418 (250 µg/ml) fand Verwendung für die Selektion von deletionsalleltragenden, kanamycinresistenten Hefezellen. Für die Herstellung von Medienplatten wurde den oben angegebenen Medien 2% (w/v) Agar-Agar zugesetzt. Die Standard-Kultivierungstemperatur betrug 30°C. Kolben und Reagenzgläser wurden unter Schütteln (150 rpm) inkubiert.

2.2.3 Wachstumsanalysen

2.2.3.1 Semiquantitative Wachstumstests zur Erfassung des *MDM33*-Überexpressionseffekts

Um für eine große Anzahl an Hefestämmen einen Überblick über das Wachstumsverhalten bei Überexpression von *MDM33* zu ermöglichen, wurden semiquantitative Wachstumstests durchgeführt. Dazu wurde jeweils die gleiche Menge an Zellmaterial strichförmig auf SGal-Platten ausgebracht. Für jeden zu untersuchenden Deletionsstamm wurden Kontroll- (pYX223) und Überexpressionsplasmid (pYX223-GAL-*MDM33*) enthaltende Transformanten zum Vergleich nebeneinander aufgetragen. Nach 2tägiger Inkubation bei 30°C wurde das Wachstum aller Stämme mit und ohne Überexpression von *MDM33* in die vier Stufen +++, ++, + und – eingeteilt, wobei +++ das stärkste und – kein Wachstum kennzeichnete. Als Referenz wurde jeweils parallel der transformierte Wildtypstamm BY4742 bewertet.

2.2.3.2 Erfassung des Wachstumsverhaltens mittels Tüpfel-Test

Tüpfel-Tests (=drop dilution test) dienen zur Erfassung des Wachstumsverhaltens bei Überexpression von *MDM33* oder möglicher respiratorischer Defekte. Im ersten Fall wurden SD- und zur Induktion der Überexpression SGal-Platten benötigt. Die zweite Fragestellung konnte mit Hilfe von YPD- und YPG-Platten untersucht werden. In beiden Fällen stellten die glukosehaltigen Medien eine stammspezifische Referenz dar.

Die zu untersuchenden Stämme wurden in 1,5 ml SD- oder YPD-Flüssigmedium üN bei 30°C angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) abgetrennt, zur Beseitigung von Medienresten in 1 ml ddH₂O gewaschen und schließlich in 1 ml ddH₂O resuspendiert. Von der erhaltenen Zellsuspension wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzschritten bis 10⁻⁴ hergestellt. 5 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf SD- und SGal-, bzw. YPD- und YPG-Platten getropft. Pro Platte wurden 4 bis 5 Stämme aufgetragen, wobei stets eine Wildtypkontrolle mit inbegriffen war. Die Platten wurden zwei (YPD und SD) bis vier Tage (YPG und SGal) bei 30°C inkubiert.

2.2.3.3 Erfassung des Wachstumsverhaltens mit Wachstumskurven

Für das Erstellen von Wachstumskurven wurden 10 bis 15 ml Medium (YPD, YPG, SD, SGal) mit einer entsprechenden 1,5 ml üN-Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1-0,2 inokuliert. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 30°C inkubiert. In 60-Minuten-Schritten wurde die OD₆₀₀ bis zur stationären Phase gemessen. Durch halblogarithmische Auftragung der logOD gegen die Zeit t in min ergab sich die Wachstumskurve. Aus dem linearen Bereich der Kurve ließ sich mit Gleichung 1 die Generationszeit g berechnen.

Gleichung 1:
$$g = \frac{\log 2 \times t}{\Delta \log OD_{600}}$$

2.2.4 Übertragung von genetischem Material in *S. cerevisiae*-Zellen

2.2.4.1 Standard Hefetransformation und verwendete Plasmide

Um Plasmid-DNA in Hefezellen einzubringen wurde das „Quick and Easy TRAF0 Protocol“ (<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Quick.html>) verwendet. Die zu transformierenden Hefestämme wurden jeweils auf einem etwa 1 cm² umfassenden Areal auf

YPD- oder Selektivmediumplatten ausgestrichen und üN bei 30°C inkubiert. Das dadurch erhaltene, frische Zellmaterial wurde in 1 ml ddH₂O gewaschen (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Parallel dazu wurde die als Carrier eingesetzte Heringsspermien-DNA (2 mg/ml in ddH₂O; Sigma, Taufkirchen) durch 10-minütiges Kochen denaturiert. Zur Durchführung der Transformation wurden die gereinigten Zellen mit folgenden Komponenten in der angegebenen Menge und Reihenfolge durch Auf- und Abpipettieren gemischt: 240 µl 50% (w/v) PEG 4000, 36 µl 1,0 M LiAc, 50 µl gekochte ss-Carrier-DNA (2 µg/ml) und 1 µg Plasmid-DNA enthalten in 34 µl ddH₂O. Der Gesamtansatz wurde durch Vortexen gemischt und 60-90 min bei 42°C inkubiert. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 180 min erhöhte bei einigen Stämmen die Transformationseffizienz um eine Zehnerpotenz. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) vom Transformationsmix abgetrennt und in 1 ml ddH₂O resuspendiert. 300 µl der Lösung wurden auf geeigneten SD-Selektivmediumplatten verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen bei 30°C wurden transformante Kolonien sichtbar, die zur weiteren Reinigung im Dreistrichverfahren auf frische Selektivmediumplatten überführt wurden. Alle verwendeten Plasmide sind Tab. 2-4 zu entnehmen.

Tabelle 2-4: Verwendete Plasmide

Name	Selektionsmarker	Verwendung	Referenz
pVT100U-mtGFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Westermann & Neupert (2000)
pVT100U-mtRFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Mark Dürr (Institut für Zellbiologie, Uni Bayreuth)
pYX113-mtGFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Westermann & Neupert (2000)
pYX142-mtGFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Westermann & Neupert (2000)
pRS416-mtRFP	<i>URA3</i>	Markierung von Mitochondrien	Mozdy <i>et al.</i> (2000)
pYX223	<i>HIS3</i>	Negativkontrolle bei Überexpression von <i>MDM33</i>	Novagen (Darmstadt)
pYX223-GAL- <i>MDM33</i>	<i>HIS3</i>	Überexpression von <i>MDM33</i>	Messerschmitt <i>et al.</i> (2003)
pRS416	<i>URA3</i>	Klonierungszwecke	Sikorski & Hieter (1989)
pRS416- <i>MSS2</i>	<i>URA3</i>	plasmidale Expression von <i>MSS2</i>	diese Arbeit
pRS416- <i>COX16</i>	<i>URA3</i>	plasmidale Expression von <i>COX16</i>	diese Arbeit
pG19/T4	<i>LEU2</i>	plasmidale Expression von <i>COX10</i>	Nobrega <i>et al.</i> (1990)
pG188/T1	<i>URA3</i>	plasmidale Expression von <i>COX19</i>	Nobrega <i>et al.</i> (2002)

2.2.4.2 Übertragung mitochondrialer DNA durch Cytoduktion

Die Cytoduktion stellt eine Methode zum Transfer von Biomolekülen von einer Donor- auf eine Akzeptorzelle dar. Grundlage für diese Technik ist die unvollständige Paarung zweier Hefezellen. Dabei lässt der Kernfusionsdefekt (*kar1Δ15* Mutation) eines Paarungspartners lediglich die Vermischung des Cytoplasmas einschließlich aller darin enthaltenen Moleküle sowie Organellen, nicht aber die Verschmelzung der Zellkerne zu. Infolgedessen bilden sich keine diploiden, sondern dikaryote Zellen. Dieser Status ist instabil, sodass im Verlauf der weiteren Vermehrung einer der Kerne verloren geht. Die dadurch entstandenen Zellen weisen nun ein gemischtes Cytoplasma (Heteroplasmon) auf. Gezielte Selektion gegen die verbliebenen Donorkerne und möglicherweise sporadisch entstandene diploide Zellen wurde durch die Auswahl der verwendeten Stämme möglich. Die Akzeptorzellen waren Uracil-auxotroph (*ura3*), wohingegen der verwendete Donorstamm so konstruiert war, dass auf jedem Chromosom eine Kopie des Gal-überexprimierbaren *URA3*-Gens vorlag. Durch das kodierte Genprodukt wird 5-FOA in ein toxisches Produkt umgewandelt, sodass alle Zellen mit wildtypischem *URA3*-Gen getötet werden (vgl. Abbildung 2-1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cytoduktion zur Übertragung von intakten Mitochondrien und damit mtDNA verwendet. Das zugrunde liegende Protokoll und der Donorstamm J1361 (Lettier *et al.*, 2006) wurden von Robert Reid (Dept. of Genetics & Development, Columbia Univ. College of Physicians and Surgeons, USA) zur Verfügung gestellt.

Der Donorstamm wurde in Form eines Rasens und die Akzeptorstämme punktförmig \approx 1 cm auf getrennten Medienplatten angezogen. Für die Paarung wurden der Donorrasen mit Hilfe eines Samtstempels und die Rezipienten mittels Stempelwerkzeug auf eine gemeinsame YPD-Platte übertragen. Nach achtstündiger Inkubation bei 30°C erfolgte der Transfer der gepaarten Zellen mittels Stempelwerkzeug auf SGal-Selektionsplatten, die 2 Tage bei 30°C inkubiert wurden. Danach wurde eine weitere Übertragung auf SGal-Platten mit anschließender zweitägiger Inkubation bei 30°C durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen auf SGal-5-FOA-Platten (0,69% (w/v) *Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Formedium, Norwich, UK)* supplementiert mit 2 ml *Histidin-* sowie je 3 ml *Lysin- und Leucin-Stammlösung; 50 mg/l Uracil; 0,1% (w/v) 5-FOA; 2% (w/v) Galaktose; 2% (w/v) Agar-Agar*) überstempelt und weitere 2-3 Tage inkubiert. Die resultierenden Zellareale enthielten nun ausschließlich Zellen mit Rezipientengenom, was mit Hilfe von geeigneten Selektivmediumplatten überprüft wurde.

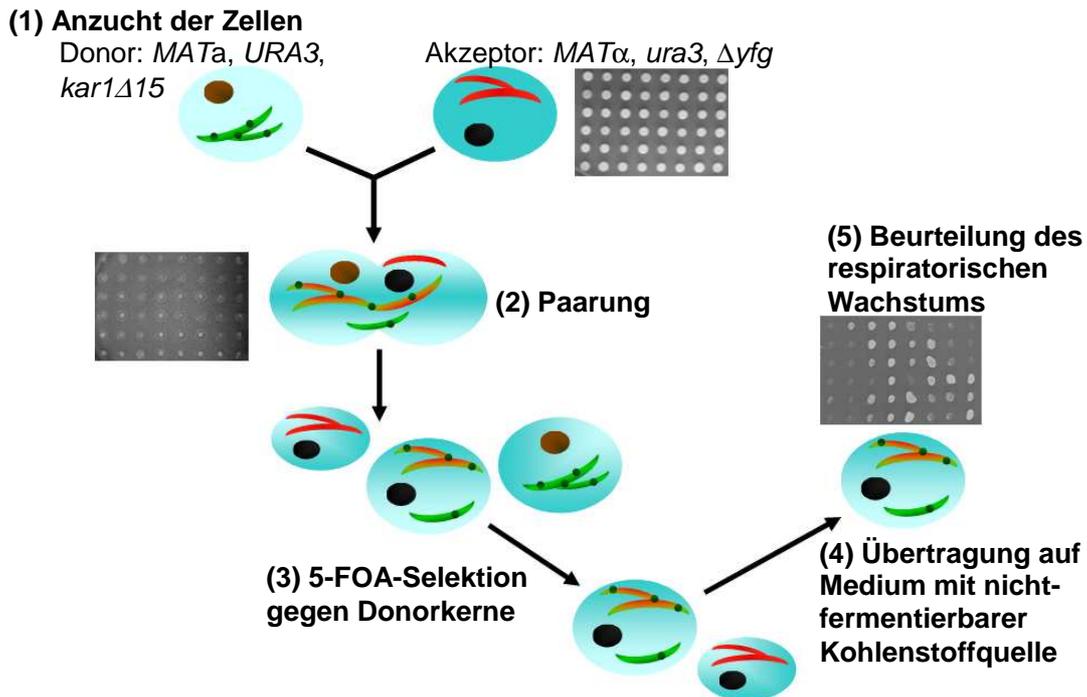


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der Cytoduktion. (1) Anzucht von Donorzellen mit intakten Mitochondrien (grün) und intakter mtDNA (dunkelgrüne Punkte) sowie von Akzeptorzellen (hier mit funktionsunfähigen, DNA-freien Mitochondrien in rot). (2) Donor und Akzeptorzelle bilden im Zuge einer unvollständigen Paarung ein Heteroplasmon (gemischtes Cytoplasma) aus und übertragen cytoplasmatische Komponenten, u. a. Mitochondrien. Parallel kann es zu mitochondrialen Fusionsereignissen kommen, während denen funktionsfähige Moleküle und auch mtDNA ausgetauscht werden (orangefarbene Organellen). (3) Aufgrund des wildtypischen *URA3*-Gens, dessen kodiertes Protein 5-FOA in ein Zelltoxin umsetzt, sterben alle Zellen mit Donorkernen (braun). (4) Die Zellen werden abschließend auf YPG-Platten transferiert, um auf wieder gewonnene respiratorische Kompetenz zu testen (5).

2.2.5 Komplementations-Test

Dieser Test beruht auf der Herstellung diploider Zellen und ermöglicht es, das Vorhandensein bzw. den Verlust von mtDNA direkt zu erfassen. Die zu untersuchenden Stämme wurden analog 2.2.7.1 mit dem mtDNA-defizienten Stamm $\Delta mip1$ (mitochondriale DNA-Polymerase; Foury, 1989) gekreuzt. Nach Überstempeln auf YPG-Platten wurde das Wachstum der diploiden Klone beurteilt. Im diploiden Zustand sollte das $\Delta mip1$ -Genom die Deletion des Eltern-Teststammes komplementieren (und umgekehrt). Besaß dieser nun mtDNA, so war Wachstum auf YPG möglich. Das Erscheinen von Kolonien ließ somit einen direkten Rückschluss auf die Präsenz von mtDNA im Eltern-Teststamm zu.

2.2.6 Hefe Adaptionsversuch

Die identifizierten *pet*-Stämme wurden auf YPD-Platten angezogen, seriell auf zwei YPG-Platten mit 0,1% (w/v) Glukose überstempelt und jeweils 2 d bei 30°C inkubiert. Der

zusätzliche Anteil an fermentierbarer Kohlenstoffquelle im YPG-Medium ermöglichte ein erleichtertes Anwachsen der Stämme und die langsame Anpassung an die Notwendigkeit zu Atmen. Dadurch wurde es möglich, innerhalb der *pet*-Kulturen auf Individuen mit rudimentärer Atmungskompetenz zu selektieren. Abschließend wurden die Stämme auf reine YPG-Platten überführt und ihr Wachstum nach 3 d bei 30°C erfasst. Als „trainierbar“ wurden Deletionsstämme eingestuft, bei denen mindestens eine Kolonie zu beobachten war.

2.2.7 Herstellung von Doppelmutanten

2.2.7.1 Herstellung diploider Hefestämme

Um über Tetradenanalysen Doppelmutanten herzustellen, wurden zunächst diploide Stämme benötigt, die über Kreuzung der entsprechenden Haploiden entgegengesetzten Paarungstyps erzeugt wurden. Dafür wurden die haploiden Zellen strichförmig auf zwei verschiedene YPD-Platten ausgebracht, üN bei 30°C inkubiert und für die Paarung über Kreuz auf eine frische YPD-Platte überstempelt. Nach einer weiteren üN-Inkubation wurden die Zellen auf Selektivmediumplatten überführt, deren Supplementation ausschließlich das Wachstum diploider Zellen zuließ (im Fall von BY-Kreuzungen also SD mit Histidin, Leucin und Uracil). Diese waren nach 1-2 d bei 30°C deutlich an der Kreuzungsstelle zu sehen und wurden im Reinigungsausstrich auf frische SD-Platten überführt und 2-3 d bei 30°C angezogen.

2.2.7.2 Sporulation und Tetradendisektion

Da diploide Hefezellen des BY-Stammhintergrunds in der Regel nur mäßig sporulieren, wurde das speziell dafür entwickelte GNA-Protokoll von Riles & Curtis (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/spo_riles) verwendet. Zunächst wurden durch Kreuzung hergestellte, diploide Zellen auf zwei aufeinanderfolgenden GNA-Platten (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*) jeweils üN bei 30°C inkubiert. Danach wurden 2 ml Flüssig-Sporulationsmedium (1% (w/v) *Kaliumacetat*; 0,005% (w/v) *Zinkacetat*; ¼ der normalerweise hinzugefügten *Aminosäure-Menge*) mit den Zellen beimpft und zunächst 5 d bei RT und anschließend 3 d bei 30°C geschüttelt. Nach dieser Zeit wurde der Anteil an Tetraden lichtmikroskopisch überprüft. Waren nur wenig sporulierende Zellen (< 10%) vorhanden, wurde die Inkubation bei 30°C um weitere 2 d verlängert. Bei ausreichender Anzahl wurden 270 µl der Sporulationskultur mit 30 µl Zymolyase 20T-Lösung (10 mg/ml; Seikagaku

Corporation, Tokio, Japan) gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Jeweils 100 µl der Suspension wurden strichförmig auf YPD-Platten aufgetragen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (Schuett Labotechnik, Göttingen; Nikon Eclipse 50i; Nikon Instruments, Düsseldorf) wurden Tetraden dissektiert und die Platten etwa 3 d bis zum Erscheinen von Kolonien bei 30°C bebrütet. Zur Vermehrung der Zellmasse wurden die vier gekeimten Sporen jeder Tetrade auf frischen YPD-Platten angezogen. Die Identität der Tetraden wurde über YPD-G418- und SD-Platten (ohne Methionin bzw. Lysin) überprüft. Bei Tetraden mit Doppelmutanten war auf allen Testplatten ein 2:2-Aufspaltungsverhältnis zu erwarten. Mögliche Doppelmutanten wurden zusätzlich durch PCR-Nachweise der deletierten Gene verifiziert.

2.2.8 Herstellung von Glyzerin-Stocks

Zellen wurden bis zu zwei Monate bei 4°C auf Medienplatten aufbewahrt. Für eine längere Lagerung wurden Hefe- und Bakterienstocks in 15% (v/v) Glyzerin mit frischen Kulturen von Medienplatten oder aus Flüssigmedium hergestellt. Im ersten Fall wurden 1,5 ml einer 15%igen (v/v) Glyzerinlösung in geeigneten Schraubröhrchen vorgelegt und von Platte entnommenes Zellmaterial (etwa 1 cm² Zellen) darin resuspendiert. Alternativ wurden 750 µl 30%ige (v/v) Glyzerinlösung und 750 µl Flüssigkultur gemischt. Die so vorbereiteten Stocks wurden bei -20°C vorgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3 Methoden der Zellbiologie

2.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

2.3.1.1 Anzucht von Hefezellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchenden Hefezellen wurden in 1,5 ml des entsprechenden Flüssigmediums (YPD, YPG, YPGal, SD, SGal) üN bei 30°C angezogen, mit frischem Medium verdünnt und weitere 3-4 h bei 30°C inkubiert. Dabei sollte eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 nicht überschritten werden, um den Übergang in die stationäre Phase zu verhindern. Bei verlängerten Generationszeiten, wie sie häufig in YPG- und SGal-Flüssigmedium auftreten, wurden die Zellen in 1,5 ml Medium angeimpft und direkt ohne weiteres Verdünnen nach etwa 15-stündiger Inkubation mikroskopiert.

Alternativ wurden die Zellen nicht lebend mikroskopiert, sondern zunächst mit Formaldehyd fixiert. Hierfür wurden Zellen aus 1 ml Kultur durch Zentrifugation geerntet (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124), in 1 ml PBS (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM

Kaliumchlorid, 19 mM Na_2HPO_4 , 1,7 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) mit 4% (v/v) Formaldehyd (37%ige Stammlösung) resuspendiert und 30 min bei 30°C inkubiert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) und in 1 ml frischem PBS resuspendiert.

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

Färbung von Mitochondrien

Eine permanente, intrinsische Mitochondrienfärbung in lebenden Zellen wurde durch GFP und RFP mit vorgeschalteten mitochondrialen Präsequenzen erreicht. Plasmide, die für entsprechende Proteinvarianten kodieren (Tab. 2-4), wurden mittels Transformation (2.2.4.1) in die zu untersuchenden Hefezellen eingebracht. GFP oder RFP wurde entsprechend des plasmideigenen Promotors konstitutiv oder induzierbar (z.B. durch Galaktose) exprimiert.

Alternativ können Mitochondrien auch durch den rot-fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin-B-Hexylester (Molecular Probes, Eugene, USA) angefärbt werden. Dieser wird membranpotentialabhängig in die Mitochondrien aufgenommen und kann so zur selektiven Detektion dieser Organellen genutzt werden. Für die Färbung wurden pro 1 ml logarithmischer Zellkultur 7 µl einer wässrigen Rhodamin-B-Hexylester-Lösung (frische 1:100-fache Verdünnung aus 1 mM Stocklösung) zugegeben. Das Gemisch wurde vor der Mikroskopie 5 min bei RT auf dem Drehrad inkubiert.

Färbung mitochondrialer DNA mittels DAPI (Jones & Fangman, 1992)

Der fluoreszierende Nukleinsäureinterkalator DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) wird in der Zellbiologie zur Markierung von DNA verwendet. Vorbereitend wurden die aus 1 ml üN-Kulturen geernteten Zellen (1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124) durch 5-minütige Inkubation in 700 µl Methanol fixiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Für die eigentliche Färbung wurde das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen, mit 1 µl DAPI-Stammlösung (1 mg/ml in ddH₂O) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Darauf folgten vier Waschschrte mit jeweils 1 ml PBS, wobei die Zellen jeweils durch einminütige Zentrifugation bei RT und 13.000 rpm (Sigma 1-15, Rotor 12124) wieder gewonnen wurden. Die fixierten und gefärbten Zellen wurden abschließend in 500 µl PBS resuspendiert und entweder sofort mikroskopiert oder bis zu 1 Woche bei 4°C gelagert.

Erfassung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) mittels DHR-Färbung

Dihydrorhodamin-123 (DHR; Molecular Probes, Eugene, USA) ist ein membranständiger Farbstoff, der durch ROS zu grün fluoreszierendem Rhodamin-123 oxidiert wird. Für die Färbung wurden 500 µl Hefekultur mit 1 µl DHR-Lösung (2,5 mg/ml in DMSO) versetzt und 2 h bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (*1 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124*), in 1 ml PBS gewaschen und in 50 µl PBS resuspendiert. Als Positivkontrolle einer vollständigen Färbung wurden H₂O₂-behandelte Wildtypzellen (dreistündige Vorinkubation der Zellen in YPD mit 10 mM H₂O₂) wie beschrieben gefärbt.

2.3.1.3 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchung verschiedener struktureller und physiologischer Eigenschaften von Hefezellen wurde die Fluoreszenzmikroskopie als wichtiges Hilfsmittel eingesetzt. Zu untersuchende Zellen wurden dabei in 0,5% (w/v) „Low Melting Point-Agarose“ auf dem Objektträger immobilisiert. Die Mikroskopie wurde an einem Axioplan 2 Mikroskop mit Plan-Neofluar 100x/1,30 NA Ph3 Öl-Objektiv (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) und HBO100 Quecksilberdampfampe durchgeführt. Digitale DIC- und Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Evolution VF Mono Cooled-Kamera (Intas, Göttingen) aufgenommen und mit der Software „Image ProPlus 5.0“ sowie „ScopePro 4.5“ (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) bearbeitet. Alle verwendeten Fluorophore und die damit sichtbar gemachten Ziele sind Tab. 2-5 zu entnehmen. Des Weiteren sind die entsprechenden Filtersätze (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) angegeben. Die zugrunde liegenden Färbeprotokolle sind im vorangehenden Kapitel 2.3.1.2 beschrieben.

Tabelle 2-5: Verwendete Fluorophore mit dazugehörigen Zielen und Filtern

Ziel	Fluorophor	Filtersatz
Mitochondrion	mtGFP	Nr.09 (Anregung: 450-490 nm; Emission: >515 nm)
	mtRFP/ dsRed	Nr.15 (Anregung: 534-558 nm; Emission: >590 nm)
	Rhodamin-B-Hexylester	Nr.15
(mitochondriale) DNA	DAPI	Nr.01 (Anregung: 365/12 nm; Emission: 397 nm)
ROS	DHR	Nr.09

2.3.2 Elektronenmikroskopie

2.3.2.1 Anzucht der Hefezellen für die Elektronenmikroskopie

Hefezellen wurden in 1 ml Vorkulturen des entsprechenden Mediums (YPD, YPG oder SD) 8 h über Tag bei 30°C inkubiert und abends zum Beimpfen von 50 ml Hauptkulturen eingesetzt. Diese wurden üN unter Schütteln bei 30°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 inkubiert und anschließend für die Elektronenmikroskopie präpariert (2.3.2.2).

Bei der Verwendung von Zellen aus SGal-Medium für die Überexpression von *MDM33* wurde die Vorgehensweise leicht abgeändert, um die gewünschte Zelldichte zu erreichen. Zunächst wurden Vor- und Hauptkultur wie oben beschrieben in SD-Medium hergestellt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 wurden die Zellen pelletiert, zweimal mit SGal gewaschen (5 min; RT; 4.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) und schließlich in 50 ml frischem SGal aufgenommen. Für die vollständige Induktion des *GAL*-Promotors und die Ausbildung des Überexpressionsphänotyps (Wildtyp als Referenz) war eine weitere Inkubation von 10-14 h erforderlich.

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

Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (5 min; 4°C; 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) geerntet, mit 10 ml PBS gewaschen und durch 30-minütige Inkubation bei 4°C in 10 ml Fixierungspuffer (2% Glutaraldehyd, 1 mM CaCl₂ in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2) Aldehyd-fixiert. Nach drei Waschschritten mit jeweils 10 ml Cacodylat-Puffer (0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,2), wurde die Zellwand für eine bessere Zugänglichkeit für Kontrastmittel abgelöst. Dazu wurden die Hefezellen mediumabhängig 10 bis 30 min bei Raumtemperatur 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) inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min; 4°C; 5.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) vom Überstand abgetrennt und zweimal mit 10 ml Cacodylat-Puffer gewaschen. Der dritte Waschschriff wurde zur Volumenreduktion mit nur 2 ml Cacodylat-Puffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt (5 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Für die anschließende OsO₄-Fixierung wurde das Zellpellet zunächst in 0,5 ml 0,5% (w/v) Osmiumtetroxid gelöst, danach mit 0,5 ml 0,8% (w/v) Kaliumferrocyanid in ddH₂O versetzt und für 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 1 ml ddH₂O gewaschen (5 min; RT; 13.000 rpm; Sigma 1-15, Rotor 12124). Diese

Vorgehensweise wurde für eine vollständige Stabilisierung der Membranstrukturen und Färbung der Membranlipide wiederholt.

Die fixierten und gereinigten Zellen wurden für die Einbettung in Agarose im Verhältnis 1:1 (v/v) mit 2% (w/v) Agarose Typ IX versetzt. Das gehärtete Agarose-Zell-Gemisch wurde mit einer Rasierklinge in 1 mm³ große Blöckchen geschnitten, die in einem Reaktionsgefäß mit 2 ml 1% (w/v) Uranylacetat-Lösung überschichtet und 90 min bei Raumtemperatur oder üN bei 4°C inkubiert wurden. Nach Waschen mit 2 ml ddH₂O wurde die Zellen mit Hilfe eines Acetongradienten entwässert, indem die Blöckchen jeweils 15 min in 2 ml 25%, 50%, 70% und 96% Aceton (v/v in ddH₂O) und dreimal 20 min in 100% entwässertem Aceton p.a. inkubiert wurden. Für die darauffolgende Durchtränkung mit Spurr-Harz (40 ml bestehen aus: 26 g Nonenylsuccinicanhydrid (NSA), 10 g ERL-4221D, 6 g D.E.R. 736 und 0,4 g 2-Dimethylaminoethanol) wurden 1:3, 1:1 und 3:1 Spurr:Aceton-Gemische hergestellt. Die Inkubationszeit in der 1:3- und 3:1-Mischung betrug je 3-4 h. Dazwischen erfolgte ein üN Inkubationsschritt in Spurr:Aceton = 1:1. Danach wurden die Blöckchen zweimal für 3-4 h und üN in purem Spurr eingelegt. Zum Abschluss der Einbettung wurden die vorbereiteten Blöckchen in mit Spurr gefüllte Beam-Kapseln (BAL-TEC, Witten) gegeben, 3-4 h bei 40°C vorpolymerisiert und zur vollständigen Polymerisation 2-3 d bei 50°C im Trockenschrank inkubiert. Die ausgehärteten Harzstücke wurden aus den Plastikkapseln entnommen und wie unter 2.3.2.3 beschrieben weiter verarbeitet.

2.3.2.3 Trimmen, Schneiden und Nachkontrastierung

Mittels Diamantfräse und Trimmergerät EM TRIM (Leica, Bensheim) wurde überschüssiges Harz von den Hefezellen enthaltenden Blöcken entfernt. Anschließend wurden mit einem Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) im Ultramikrotom Leica Ultracut UCT (Leica, Bensheim) 50 nm-dicke Segmente abgetrennt und als Bänder von 4-5 Schnitten mit befilmten Kupfer-Lochgrids („slot grids“, 2x1 mm; Plano, Wetzlar) aufgenommen.

Die Nachkontrastierung der Proben erfolgte nach Reynolds (1963). Hierfür wurden die getrockneten Lochgrids für 10 min in 2% (w/v) Uranylacetat-Lösung, dreimal 1 min in ddH₂O, 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 weitere dreimal 1 min in ddH₂O inkubiert. Anschließend wurden die Grids mindestens 4 h auf einem Filterpapier getrocknet.

2.3.2.4 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Proben erfolgte bei 80 kV an einem EM 902 A Transmissions-Elektronenmikroskop mit Plattenkamera (Carl Zeiss SMT, Oberkochen). Die erhaltenen Negative (Kodak, Stuttgart) wurden entwickelt und mit 300 dpi mit einem ScanMaker i900 (Mikrotek, Overath) eingescannt.

2.3.2.5 Befilmen von Kupfer-Lochgrids

Für die Bildung eines gleichmäßigen Films wurden staubfreie Objektträger in 1%ige Pioloformlösung ((w/v) in Chloroform) gelegt und anschließend an der Luft getrocknet. Der Film wurde auf eine Wasseroberfläche überführt, mit Kupfer-Lochgrids („slot grids“, 2x1 mm; Plano, Wetzlar) belegt und mit Parafilm von der Oberfläche abgenommen. Nach dem Trocknen wurden die befilmten Lochgrids analog 2.3.2.3 verwendet.

2.4 Methoden der Proteinbiochemie

2.4.1 In vivo Markierung mitochondrialer Translationsprodukte

Das mitochondriale Translationsprofil verschiedener Hefedeletionsstämme wurde nach Westermann *et al.* (2001) erfasst. Hierbei wurden mitochondrial synthetisierte Proteine bei Hemmung der cytosolischen Translation selektiv radioaktiv markiert. Die zu untersuchenden Stämme wurden in 1,5 ml SD- oder SR-Medium (*S-Minimalmedium mit 2% (w/v) Raffinose*) 20 h üN bei 30°C inkubiert und danach zum Beimpfen von 50 ml-Hauptkulturen eingesetzt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-2,0 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4°C; 10 min; 4.000 rpm; Eppendorf Centrifuge 5804R, Rotor A-4-44) und mit frischem Medium auf eine OD₆₀₀ von 3,0 eingestellt. 250 µl dieser Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zum Stoppen der cytosolischen Translationsaktivität mit 10 µl einer frisch hergestellten Cycloheximidlösung (7,5 mg/ml in Ethanol) versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 30°C wurden 8 µl Aminosäurelösung (2 mg/ml jeder Aminosäure außer Methionin) sowie 2 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml; Hartmann Analytics, Braunschweig) hinzugefügt und der Reaktionsansatz 30 min bei 30°C geschüttelt. Danach wurde die radioaktive Markierung durch Zugabe von 0,5 mg/ml Chloramphenicol (65 mg/ml in Ethanol) mit 10-minütiger Inkubation bei 30°C beendet. Zusätzlich wurde davor 5 min mit 4,4 M „kaltem“ Methionin inkubiert, um radioaktive Abbruchfragmente zu komplettieren, die störendes Hintergrundsignal verursachen könnten. Die Zellen wurden durch Zentrifugation

(15 min; 4°C; 12.000 rpm; Hettich Mikrorapid/K, Rotor 1395) vom Reaktionsmix abgetrennt und in 500 µl ddH₂O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 75 µl Lyselösung (1,85 M NaOH; 7,5% (v/v) 2-Mercaptoethanol) versetzt, gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Proteine mittels TCA-Fällung abgetrennt. Dafür wurden die lysierten Zellen mit 600 µl 50% (w/v) TCA-Lösung gemischt und 30 min auf Eis inkubiert und 30 min zentrifugiert (4°C; 12.000 rpm; Hettich Mikrorapid/K, Rotor 1395). Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 50 µl 1x Probenpuffer (2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 2% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 60 mM Tris-HCl, pH 6,8) durch 30 min Schütteln bei RT aufgenommen. Jeweils 20 µl Probe wurden für die gelelektrophoretische Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.4.2) verwendet.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von radioaktiv markierten, mitochondrial exprimierten Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Für die Herstellung der Sammelgele (10 x 150 x 1 mm) wurden 5% (w/v) Acrylamid, 0,033% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) verwendet. Die Trenngele der Größe 90 x 150 x 1 mm bestanden aus 16% (w/v) Acrylamid, 0,1% (w/v) Bisacrylamid, 385 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS und 0,035% (v/v) des Polymerisationsstarters TEMED (Westermann *et al.*, 2001). Die Elektrophorese erfolgte in einer senkrechten Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer (0,1% SDS, 192 mM Glycin, 25 mM Tris) bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen übertragen (2.4.3).

2.4.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran (Western-Blot) und Autoradiographie

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden im „semi-dry“-Blotverfahren (Towbin *et al.*, 1979) auf Nitrocellulosemembranen (Hybond; Amersham Biosciences, Piscataway, USA) übertragen, um sie für die Autoradiographie zugänglich zu machen. Dafür wurden die Nitrocellulosemembran und sechs Whatman-Filterpapiere für 20 min in Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) getränkt. Drei der angefeuchteten Filterpapiere wurden auf die untere Graphitelektrode (Anode) gelegt. Darauf

folgten die Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel und die verbleibenden drei Whatman-Papiere. Für die Übertragung wurde Strom der Stärke $1,5 \text{ mA/cm}^2$ für 1,5 h angelegt. Zur Kontrolle der Transfereffizienz und zur Markieren des Standards wurden die Proteine durch 2-minütige Inkubation der Membran in Poncaeu S-Lösung (*0,5% (w/v) Ponceau S, 18 mM TCA*) sichtbar gemacht. Eine selektive Detektion der radioaktiv markierten Proteinspezies wurde mittels Autoradiographie erreicht. Die aufgelegten Röntgenfilme (Fuji medical X-ray film Super RX; Fuji, Düsseldorf) wurden nach 2-5tägiger Exposition entwickelt und ausgewertet.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Genetische Basis von respiratorischem Wachstum, mitochondrialem Genom-Erhalt und mitochondrialer Proteinsynthese in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Gewinnung von Energie über die oxidative Phosphorylierung ist die Grundlage des höheren eukaryotischen Lebens und wurde deshalb eingehend erforscht. Als besonders geeigneter Modellorganismus erwies sich die Bäckerhefe *S. cerevisiae*, weil sie als fakultativer Anaerobier in der Lage ist, ihren Energiebedarf ausschließlich über Fermentation zu decken. Dadurch sind respiratorisch inkompetente Mutanten lebensfähig, solange fermentierbare Kohlenstoffquellen (z. B. Glukose) zur Verfügung stehen. Allerdings bilden sie bereits bei Limitierung fermentierbarer Kohlenstoffquellen kleinere Kolonien aus als Wildtypzellen, was mit dem Begriff *petite* (*pet*) beschrieben wird (Ephrussi *et al.*, 1949). Entsprechende respiratorisch inkompetente Mutanten werden deshalb als *pet*-Mutanten und beteiligte Gene als *pet*-Gene bezeichnet. Durch Hefestudien konnten bereits Ende des letzten Jahrhunderts mehr als 100 atmungsrelevante Gene gefunden werden (Tzagoloff & Dieckmann, 1990; Contamine & Picard, 2000). Die Verfügbarkeit kommerziell erwerblicher Deletionsbibliotheken, die Deletionsmutanten fast aller 4800 nicht-essentieller Hefegene enthalten, eröffnet heute die Möglichkeit, durch genomweite Analysen ein umfassendes Bild atmungsrelevanter Gene und Prozesse zu erhalten.

3.1.1 Durchmusterung einer Hefedeletionsbibliothek nach Mutanten mit Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle

3.1.1.1 Vergleichende Gendeletionsanalyse

In zwei vorangegangenen Arbeiten wurden käuflich erwerbliche Deletionsbibliotheken nicht-essentieller Hefegene verwendet, um *pet*-Mutanten bzw. *pet*-Gene umfassend zu identifizieren. Durch Dimmer *et al.* (2002) wurden so 341 *pet*-Mutanten innerhalb der homozygot diploiden Bibliothek gefunden. Luban *et al.* (2005) isolierten 355 *pet*-Mutanten aus der *MATa*-Deletionsbibliothek. Obwohl beide Stammsammlungen aus den praktisch isogenen Stämmen BY4743 bzw. BY4741 (Brachmann *et al.*, 1998) konstruiert worden waren, stimmten die gewonnenen Datensätze nur partiell überein: Nur etwa 2/3 (240) der *pet*-Gene waren in beiden zu finden (Abb. 3-1 A). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb ein dritter Datensatz gewonnen werden, um die beobachteten Abweichungen und ihre

molekularen Grundlagen in weiterführenden Experimenten zu untersuchen. Hierfür wurde die ~4800 Hefestämme umfassende *MAT* α -Deletionsbibliothek (BY4742; ebenfalls isogen zu den beiden anderen verwendeten Bibliotheken; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006) analog zu den beiden vorangegangenen Durchmusterungen auf Vollmediumplatten mit Glycerin als Kohlenstoffquelle (YPG) ausgebracht. Nach 6 d wurde die Fähigkeit zu respiratorischem Wachstum beurteilt. In der *MAT* α -Deletionsbibliothek waren demnach 319 respiratorisch inkompetente Mutanten enthalten, was 319 *pet*-Genen entspricht (Tab. A1).

Durch einen Vergleich mit den Ergebnissen von Dimmer *et al.* (2002) und Luban *et al.* (2005) wurden 176 Gene ermittelt, die in allen drei Durchmusterungsverfahren als *pet*-Gene identifiziert wurden (Abb. 3-1 B). Hierbei handelt es sich offensichtlich um *pet*-Gene, deren Deletionen stets zur respiratorischen Inkompetenz führen. Im Folgenden werden diese als hoch penetrant bezeichnet. Darüber hinaus waren 125 Gene in zwei von drei Datensätzen bzw. 237 Gene in nur einem Datensatz zu finden. Dabei ist zu beachten, dass 19 der Gene aus den beiden letztgenannten Gruppen nicht in allen, sondern nur in einer oder zwei der durchmusterten Bibliotheken enthalten waren.

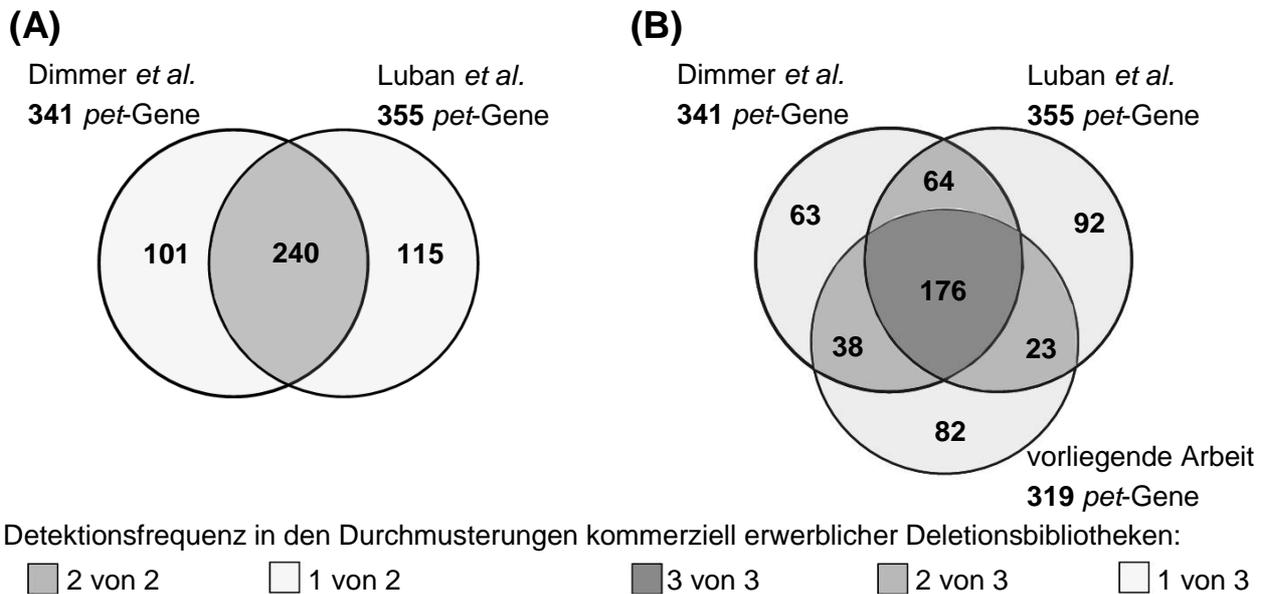


Abbildung 3-1: Verteilung nukleärer *pet*-Gene in den untersuchten Deletionsbibliotheken. (A) Die im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Durchmusterungen von Deletionsbibliotheken nach *pet*-Mutanten (Dimmer *et al.*, 2002 und Luban *et al.*, 2005) zeigen eine Übereinstimmung von nur 2/3. (B) Unter Einbeziehung des im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Datensatzes wird eine noch größere phänotypische Plastizität deutlich. Gleichzeitig lässt sich eine Gruppe von 176 Genen als hoch penetrante *pet*-Gene erfassen, deren Deletion in allen Fällen zur Ausprägung eines *pet*-Phänotyps führt (nach Merz & Westermann, 2009).

Um einen besseren Einblick in die molekularen Grundlagen der respiratorischen Inkompetenz zu erhalten, wurden alle hier identifizierten 319 *pet*-Gene gemäß ihres Auftretens in den drei

pet-Screens sowie der intrazellulären Lokalisation und Funktion ihrer Genprodukte gruppiert (Tab. A2). Hierfür wurden Daten aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder aus manuellen Annotationen verwendet. Abb. 3-2 fasst die Ergebnisse graphisch zusammen. 73,3% der hoch penetranten *pet*-Gene (129 von 176) kodieren mitochondrial lokalisierte Proteine. Im Fall der zwei- von dreimal detektierten Gene ist der Anteil an mitochondrial lokalisierten Genprodukten auf 52,1% reduziert. Eine noch deutlichere Senkung des Anteils auf 14,7% ist für die nur in einer Durchmusterung identifizierten *pet*-Gene zu verzeichnen (Abb. 3-2 A). Es besteht also eine deutliche Korrelation zwischen der Penetranz des *pet*-Phänotyps und der mitochondrialen Funktion.

Unter Berücksichtigung der Funktionen der durch die 176 hoch penetranten *pet*-Gene kodierten Proteine wird deutlich, dass ein Großteil für den Erhalt und die Expression des mitochondrialen Genoms (78) sowie die Assemblierung der Atmungskette (24) benötigt wird (Abb. 3-2 B). 13 ORFs sind vermutlich nicht proteinkodierend, weil sie mit anderen bekannten Genen überlappen. Damit beträgt die Anzahl der proteinkodierenden hoch penetranten *pet*-Gene *de facto* 163.

Acht der hoch penetranten *pet*-Gene (*YDR065w*, *YGR150c*, *YJL046w*, *YLL033w*, *YLR091w*, *YMR293c*, *YOR305w* und *YPR116w*) kodieren für bisher uncharakterisierte Proteine. Außerdem wurden zwei zusätzliche ORFs (*YNL213c* und *YJL062w-a*) identifiziert, die nur in der vorliegenden *MAT α* -Bibliothek enthalten waren, aber durch anderweitige Studien (Wysocki *et al.*, 1999; Kastenmayer *et al.*, 2006) als *pet* bestätigt sind. Alle zehn entsprechenden Deletionsstämme wurden mittels PCR verifiziert. Damit wurde eine Gruppe von zehn interessanten Genen identifiziert, die *RRG1* bis *RRG10* genannt wurden. Bei ihren Produkten handelt es sich um neue Faktoren, die für den Erhalt der respiratorischen Kompetenz benötigt werden (*required for respiratory growth*).

Annähernd alle hier identifizierten Deletionsmutanten hoch penetranter *pet*-Gene (95%) zeigten auch in anderen Analysen des gesamten Genpools an Hefedeletionsmutanten (Steinmetz *et al.*, 2002; Prokisch *et al.*, 2004) reduzierte Fitness auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Im Unterschied zu Steinmetz *et al.* (2002), wo ein vergleichsweise großer Satz an potentiell atmungsrelevanten Genen gefunden wurde (466 Gene; 43,1% mit mitochondrialen Genprodukten), ist die hier vorgenommene vergleichende Gendeletionsanalyse wesentlich selektiver (176 Gene; 73,3% mit mitochondrialen Genprodukten).

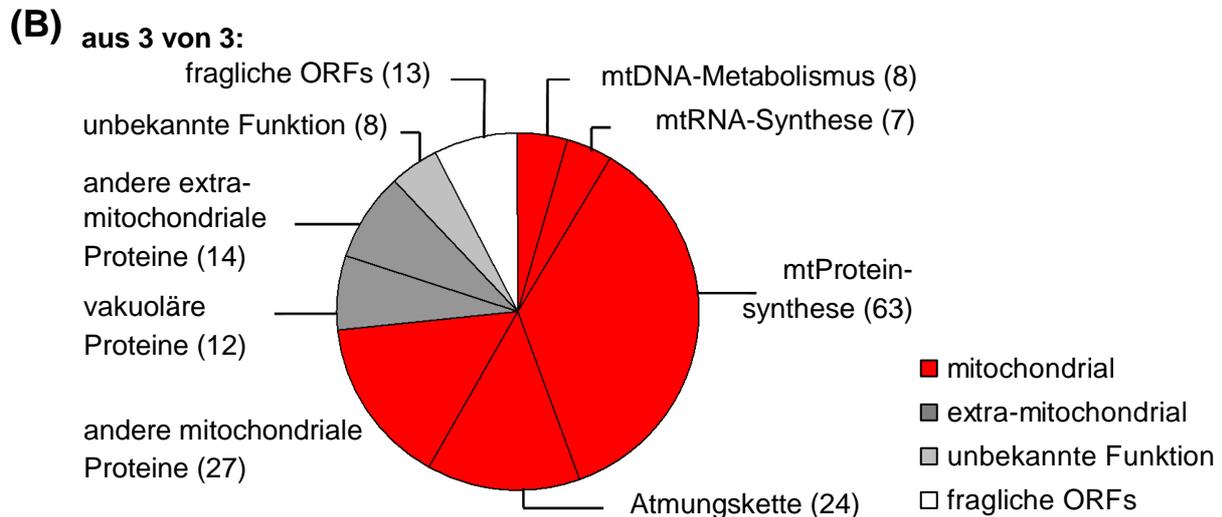
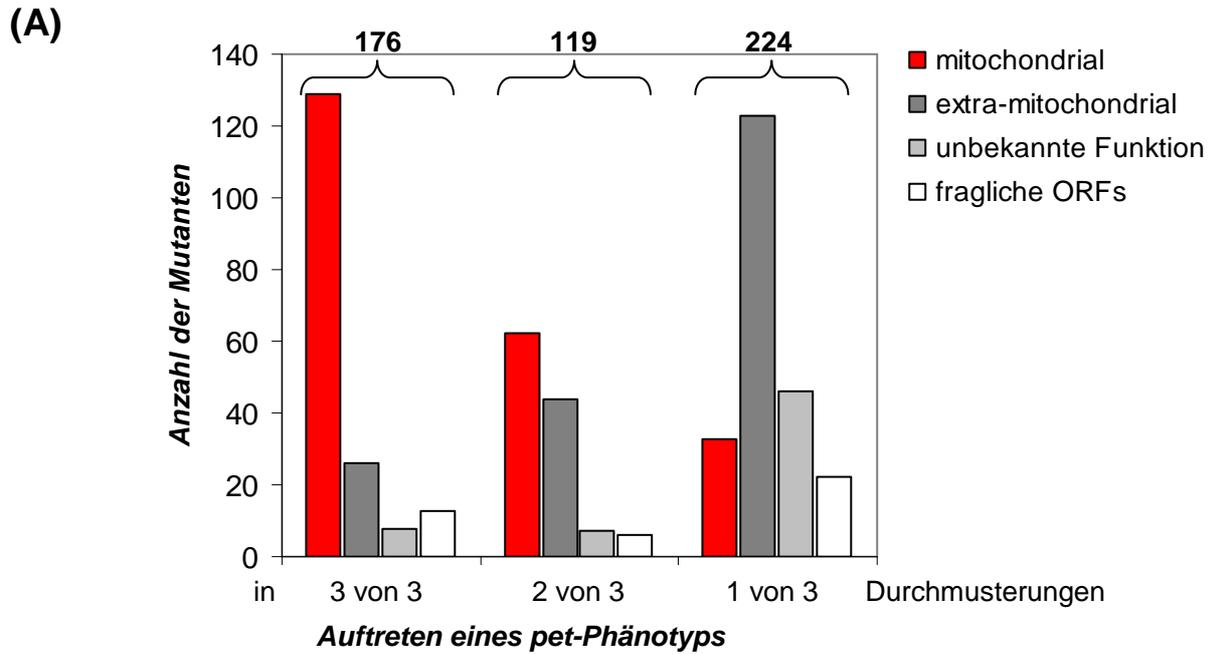


Abbildung 3-2: Funktionelle Gruppierungen der nukleären *pet*-Gene. (A) Die intrazelluläre Lokalisation der von *pet*-Genen kodierten Proteine wurde mit dem Auftreten ihrer Gene in den drei Durchmusterungen der Deletionsbibliotheken ins Verhältnis gesetzt (vgl. Tab. A2). Dadurch wird eine Korrelation zwischen mitochondrialer Funktion und Häufigkeit der Detektion deutlich. Der Anteil an mitochondrialen Proteinen ist innerhalb der Gruppe der hoch penetranten *pet*-Gene (3/3) am größten. **(B)** Überblick über die zellulären Funktionen der von hoch penetranten *pet*-Genen kodierten Proteine. Die zugrundeliegenden Daten entstammen der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) und manuellen Annotationen (nach Merz & Westermann, 2009).

3.1.1.2 Aussagekraft der Ergebnisse

Die vergleichenden Untersuchungen lieferten 163 proteinkodierende, hoch penetrante *pet*-Gene und spiegeln zudem eine erstaunliche Plastizität des *pet*-Phänotyps wider. Für die zugrundeliegenden Unterschiede im Wachstumsverhalten von Deletionsstämmen aus verschiedenen Bibliotheken sind grundsätzlich zwei verschiedene Ursachen denkbar. Zum

einen können Bibliotheken falsche Stämme enthalten (wie teilweise von uns und anderen Arbeitsgruppen beobachtet). Zum anderen könnten einige Deletionsstämme über die Zeit auch Eigenschaften erwerben bzw. Funktionen verlieren. Um dies zu unterscheiden, wurden als Stichprobe die Genotypen von 39 Mutanten aus der *MAT α* -Bibliothek mittels PCR überprüft. Generell ist es wahrscheinlicher, dass ein spezifischer Phänotyp verdeckt wird, als dass er zufällig neu entsteht. Inkorrekte Mutanten sollten deshalb besonders häufig innerhalb der Gruppe von Stämmen zu finden sein, die in zwei von drei Bibliotheken *pet* sind. Demzufolge waren 19 der 39 zufällig ausgewählten Mutanten solche, die in der *MAT α* -Bibliothek respiratorisch kompetent waren, aber in der homozygot diploiden und der *MAT α* -Bibliothek *pet*. Sechs davon (*Δ yal012w*, *Δ ybl038w*, *Δ ydl202w*, *Δ ydr268w*, *Δ yor205c*, *Δ ypl029w*) besaßen ausschließlich das Wildtypgen, sieben (*Δ ydr231c*, *Δ ydr332w*, *Δ yjl036w*, *Δ yjr090c*, *Δ ymr066w*, *Δ ypr047w*, *Δ ypr124w*) trugen sowohl Wildtyp- als auch Deletionsallel und weitere sechs Mutanten (*Δ yal047c*, *Δ ybr163w*, *Δ ydr323c*, *Δ ykl148c*, *Δ yml081c-a*, *Δ yml129c*) wiesen den korrekten Deletionsgenotyp auf. Zusätzlich wurden auch zehn Mutanten überprüft, deren *pet*-Phänotyp nur in der *MAT α* -Bibliothek, nicht aber in den beiden anderen zu detektieren war und weitere zehn Mutanten, die in allen drei Screens *pet* waren. Alle 20 Deletionsstämme besaßen den korrekten Genotyp. Das heißt, dass jedes Mal, wenn eine falsche Deletion detektiert wurde, der *pet*-Phänotyp durch die Präsenz des Wildtypallels verdeckt wird. Im Gegensatz dazu waren alle getesteten, respiratorisch inkompetenten Mutanten genotypisch richtig. Daraus kann gefolgert werden, dass ein gewisser Anteil an Unstimmigkeiten zwischen den *pet*-Screens bzw. den zugrundeliegenden Bibliotheken tatsächlich auf falsche Stämme zurückzuführen ist. Gleichzeitig zeigt sich aber deutlich, dass eine relativ große Anzahl an bewiesenermaßen korrekten Mutanten Wachstumsunterschiede aufweist. Die vorgenommenen PCR-Analysen demonstrieren also eine phänotypische Plastizität von *pet*-Mutanten. Des Weiteren ist die beobachtete Korrelation zwischen *pet*-Phänotyp und mitochondrialer Lokalisation ein klarer Hinweis darauf, dass die Variabilität nicht nur aufgrund falscher Stämme zustande kommt, sondern biologische Prozesse widerspiegelt.

3.1.2 Charakterisierung der identifizierten *pet*-Stämme durch funktionelle Tests

Ziel der Arbeit war nicht nur die Erfassung von *pet*-Genen, sondern auch das Herausarbeiten der molekularen Basis der respiratorischen Kompetenz. Im nächsten Schritt wurden deshalb alle 319 *pet*-Mutanten aus der *MAT α* -Bibliothek funktionellen Tests unterzogen. Dadurch

wurden die Mutanten funktionell gruppiert, was Aufschluss über die Beteiligung bestimmter Gene an fundamentalen Prozessen, wie z. B. dem Erhalt der mtDNA oder der mitochondrialen Translation lieferte. Abb. 3-3 bietet einen Überblick über die durchgeführten Experimente und eine Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse. Erklärungen und Interpretationen sind dem folgenden Text zu entnehmen.

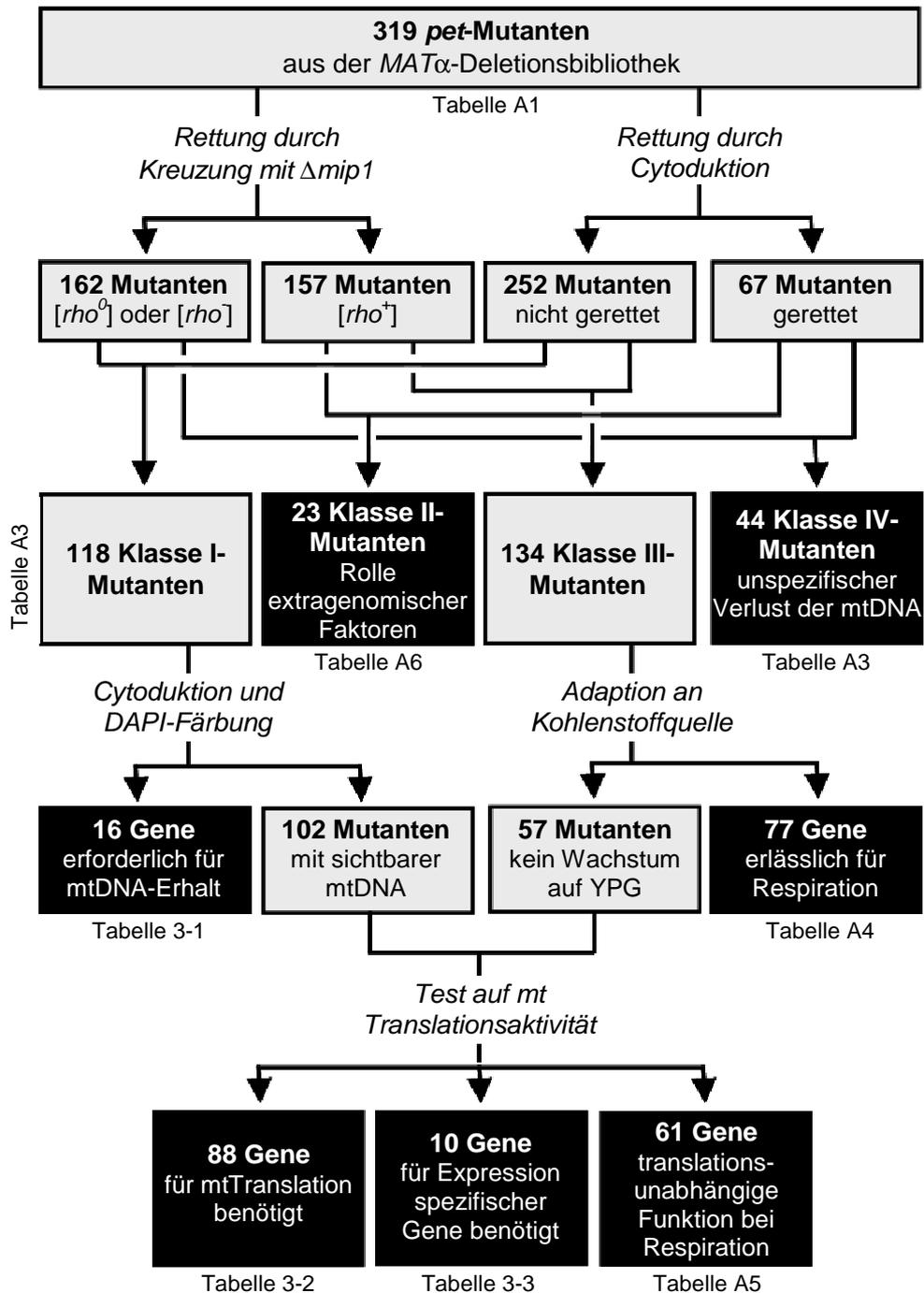


Abbildung 3-3: Zusammenfassung der systematischen funktionellen Analyse der aus der MAT α -Bibliothek isolierten 319 *pet*-Mutanten. Graue Felder stellen Gruppen an Mutanten dar, die weiter analysiert wurden, und schwarze Felder enthalten den letzten Schritt der Auflösung der funktionellen Analysen. Detaillierte Beschreibungen sind dem folgenden Text zu entnehmen. Die Tabellen A1-5 sind im Anhang zu finden (nach Merz & Westermann, 2009).

3.1.2.1 Wiedergewinnung der respiratorischen Aktivität durch Kreuzung mit $\Delta mip1$ und/oder Cytoduktion

Ein *pet*-Phänotyp wird häufig durch kompletten [rho^0] oder partiellen [rho^-] Verlust der mtDNA verursacht (Contamine & Picard, 2000). Deshalb sollte über einen Komplementationstest zunächst der Status der mtDNA in den *pet*-Mutanten erfasst werden. Hierfür wurden die zu untersuchenden Stämme mit dem Stamm $\Delta mip1$ gekreuzt, in dem das Gen für die mitochondriale DNA-Polymerase deletiert ist und deshalb keine mtDNA vorliegt (Foury, 1989). Im diploiden Zustand werden die Deletionen beider Ausgangsstämme durch das jeweilige Partnergenom komplementiert. Wachstum auf YPG erfolgt aber trotzdem nur dann, wenn der *pet*-Paarungspartner intakte mtDNA zur Verfügung stellt. Dies ermöglicht eine direkte Aussage über die mtDNA-Situation im Teststamm. Nach der Kreuzung wurde für 157 heterozygot diploide Stämme eine wiedererlangte respiratorische Kompetenz festgestellt, sodass die entsprechenden parentalen *pet*-Stämme als [rho^+] identifiziert werden konnten. 162 Stämme waren auch nach der Paarung nicht in der Lage auf Glycerin zu wachsen. Die entsprechenden *pet*-Stämme stellten demnach keine intakte mtDNA bereit, waren also [rho^0] oder [rho^-].

Über den Komplementationstest war nun zwar der momentane Status der mtDNA bekannt, allerdings lieferte er keinen Aufschluss darüber, ob ein *pet*-Gen-kodiertes Protein direkt am Erhalt der mtDNA beteiligt ist, oder ob es im Laufe der Zeit zu einem spontanen Verlust der mtDNA kam. Um dies zu unterscheiden, wurden die 319 *pet*-Mutanten mittels Cytoduktion mit [rho^+]-Mitochondrien versorgt. Grundlage dieses Experiments ist die unvollständige Paarung zweier Hefezellen, wobei der Kernfusionsdefekt (*kar1 Δ 15* Mutation) des [rho^+]-Donors lediglich die Vermischung des Cytoplasmas einschließlich aller darin enthaltenen Moleküle sowie Organellen zulässt, nicht aber die Verschmelzung der Zellkerne. Nach gezielter Selektion gegen das Donorgenom wurde das Wachstum der haploiden Nachkommen auf YPG untersucht. Für 67 *pet*-Mutanten wurde ein Wiedererhalt der respiratorischen Kompetenz nach der Cytoduktion beobachtet. Die restlichen 252 Stämme zeigten nach wie vor kein Wachstum auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle.

Durch Kombination der Ergebnisse aus $\Delta mip1$ -Kreuzung und Cytoduktion ließen sich vier Klassen von *pet*-Mutanten unterscheiden (Abb. 3-4 und Tab. A3). Klasse I-Mutanten wurden weder durch Cytoduktion noch durch $\Delta mip1$ -Kreuzung gerettet, wohingegen Klasse II-Mutanten in beiden Experimenten ihre respiratorische Kompetenz wieder erlangten. Als Klasse III definierte Mutanten wurden nur durch $\Delta mip1$ -Kreuzung und Klasse IV-Mutanten schließlich nur durch Cytoduktion gerettet.

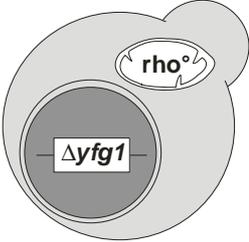
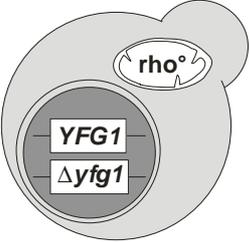
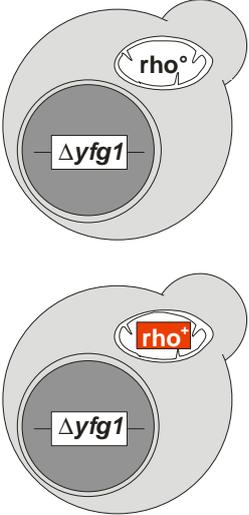
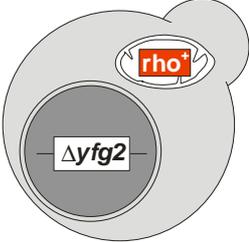
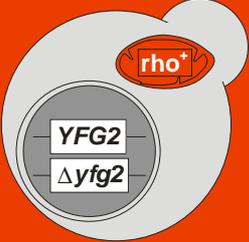
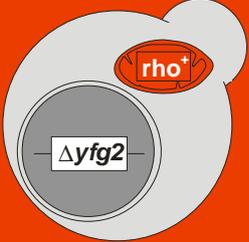
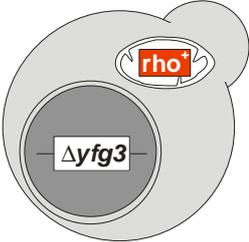
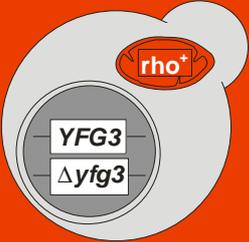
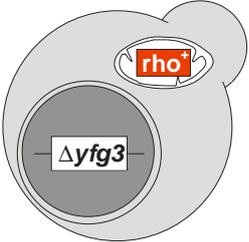
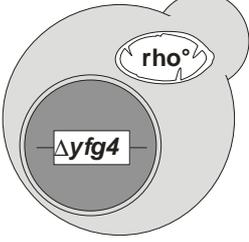
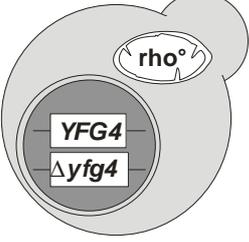
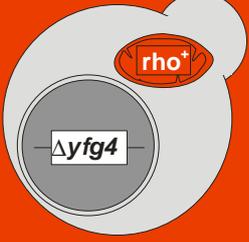
	parentale <i>pet</i> -Mutante	Kreuzung mit $\Delta mip1$	Cytoduktion
Klasse I			
Klasse II			
Klasse III			
Klasse IV			

Abbildung 3-4: Klassen an *pet*-Mutanten. Die Spalte „parentale *pet*-Mutante“ gibt den Genotyp der haploiden *pet*-Mutante aus der *MAT α* -Deletionsbibliothek an. Die spezifische Deletion im Kerngenom ist dabei mit $\Delta yfg1$ bis 4 („*your favourite gene*“) benannt und der Status der mtDNA ist durch [*rho*⁺] (wildtypähnliches mitochondriales Genom; rot markiert) oder [*rho*⁰] (keine mtDNA; alternativ auch mit Schäden in der mtDNA [*rho*⁻]) gekennzeichnet. Die Spalte „Kreuzung mit $\Delta mip1$ “ beschreibt den Genotyp der heterozygot diploiden Stämme nach dem Komplementationstest. In der Spalte „Cytoduktion“ sind die Genotypen der haploiden Deletionsmutanten nach Übertragung von [*rho*⁺]-Mitochondrien durch Cytoduktion angegeben. Respiratorisch kompetente Mitochondrien sind in rot und respiratorisch kompetente Hefezellen mit rotem Hintergrund dargestellt, respiratorisch inkompetente Mitochondrien und Zellen analog dazu in weiß. Klasse I-Mutanten besitzen nach der Cytoduktion entweder [*rho*⁺], [*rho*⁰] oder [*rho*⁻] Mitochondrien (nach Merz & Westermann, 2009).

Im Folgenden wurden die verschiedenen Klassen an *pet*-Mutanten mittels funktioneller Tests weiter charakterisiert. Alle 319 Deletionsstämme wurden nach Anpassung an die nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle durch YPG-Platten mit geringen Mengen an Glukose in zusätzlichen Wachstumsanalysen auf YPG untersucht (Adaptionsversuch). Zusätzlich wurden z. T. DAPI-Färbungen direkt nach der Cytoduktion vorgenommen, um auf Anwesenheit von mtDNA zu testen, und in einigen Fällen wurde die mitochondriale Proteintranslationsaktivität durch Markierung Cycloheximid-behandelter Zellen mit [³⁵S]-Methionin, SDS-PAGE und Autoradiographie erfasst. Indikationen für die Durchführung der beiden letztgenannten Testverfahren sind im jeweiligen Kapitel beschrieben.

3.1.2.2 Gene, die für den Erhalt der mtDNA benötigt werden

Die 118 Mutanten aus Klasse I waren [*rho*⁰] oder [*rho*⁻] und blieben auch nach dem Erhalt intakter Mitochondrien über Cytoduktion respiratorisch inkompetent. In dieser Gruppe befanden sich vermutlich Deletionsmutanten, denen essentielle Komponenten des mtDNA-Erhalts fehlen. Zusätzlich waren aber auch solche Mutanten enthalten, deren Deletionen einen primär mtDNA-unabhängigen *pet*-Phänotyp bedingen, aber gleichzeitig zu einem graduellen Verlust der mtDNA führen. Für eine Unterscheidung dieser beiden Subgruppen innerhalb der Klasse I-Mutanten wurden DAPI-Färbungen direkt nach der Cytoduktion durchgeführt, um auf Anwesenheit von mtDNA zu testen. In wildtypischen Zellen sind normalerweise 15-20 mtDNA-Nukleotide enthalten (Abb. 3-5 A). Abweichungen davon wurden erfasst. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen wurden auch die Resultate aus dem Adaptionsversuch und der Analyse der mitochondrialen Translationsaktivität berücksichtigt.

Eine bekannte essentielle Komponente des mtDNA-Erhalts ist die mitochondriale DNA-Polymerase Mip1 (Foury, 1989). Bei Deletion des entsprechenden Gens waren nach der Cytoduktion >95% der DAPI-gefärbten Zellen ohne mtDNA und in den übrigen Zellen waren weniger als 5 Nukleotide enthalten (vergleichbar mit den in Abb. 3-5 B und C dargestellten Zellen). Dieser Phänotyp zeigte somit die Situation bei einem unmittelbaren Verlust der mtDNA und wurde als Definition für Gene herangezogen, die essentiell für den Erhalt der mtDNA sind. Zusätzlich sollten die entsprechenden Deletionsmutanten auch nach Adaption nicht auf YPG wachsen können und keine mtDNA-kodierten Proteine synthetisieren. Insgesamt entsprachen 16 Mutanten diesen Kriterien (Tab. 3-1). Die fehlenden Genprodukte wurden damit als wichtig für den Erhalt der mtDNA identifiziert.

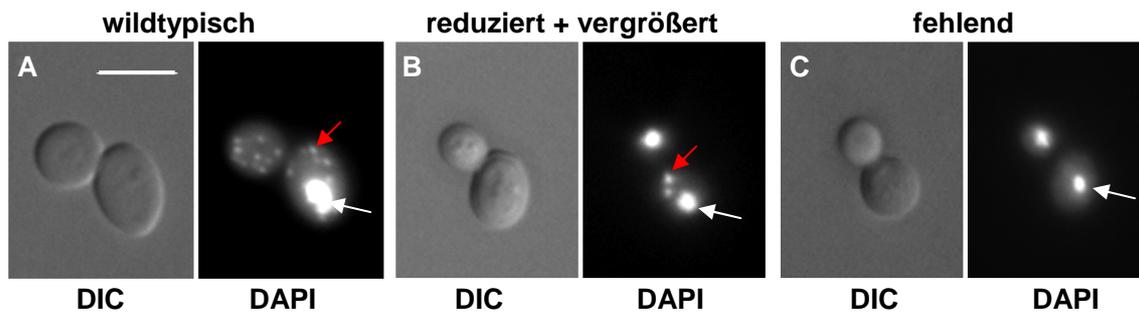


Abbildung 3-5: Exemplarische Darstellung wildtypischer, reduzierter und fehlender mitochondrialer DNA. Exemplarisch sind DAPI-gefärbte Wildtyp- (A), $\Delta mrp14$ - (B) und $\Delta fzo1$ -Zellen (C) abgebildet. Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und anschließend mit DAPI behandelt. Durch die Interkalation des Farbstoffs können das Kerngenom (weißer Pfeil) und die mtDNA-Nukleotide (roter Pfeil) fluoreszenzmikroskopisch erfasst werden. Zusätzlich zu den Fluoreszenzaufnahmen (DAPI) sind Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahmen (DIC) dargestellt. Der abgebildete Größenbalken entspricht 5 µm. In Wildtypzellen sind zwischen 15-20 mtDNA Nukleotide pro Zelle enthalten. Die abgebildete $\Delta mrp14$ -Deletionszelle (B) besitzt hingegen nur 2 Nukleotide, die im Vergleich zu wildtypischen Nukleotiden jedoch deutlich vergrößert sind, und in der gezeigten $\Delta fzo1$ -Zelle (C) fehlt die mtDNA völlig.

Unter den 16 Deletionsstämmen waren erwartungsgemäß solche, denen Komponenten mit bekannter Beteiligung am mtDNA-Metabolismus fehlen: die mitochondriale DNA-Polymerase Mip1 (Foury, 1989), die mitochondrialen DNA-Helikasen Hmi1 (Sedman *et al.*, 2000) und Pif1 (Lahaye *et al.*, 1991), Apn1, ein DNA-Reparaturprotein mit Aktivität im Zellkern und in den Mitochondrien (Vongsamphanh *et al.*, 2001), sowie Aconitase (Aco1), ein Enzym des Citratzyklus, das außerdem am mtDNA-Erhalt beteiligt ist (Chen *et al.*, 2005).

Sofortiger Verlust von mtDNA trat zudem in Zellen auf, denen die mitochondrialen Transkriptions- und Translationskomponenten Mrp137, Mtf1, Mtg2, Rsm24 und Slm5 fehlen und in der Deletionsmutante des ORFs *YKL091w*, der mit *MRPL38* (kodiert ein mitochondriales Ribosomenprotein) überlappt. Bereits 1985 beobachteten Myers *et al.*, dass eine Blockierung der mitochondrialen Proteinsynthese den Verlust der mtDNA bedingen kann. Die Mechanismen dafür sind auch heute noch unklar. Die hier gesammelten Ergebnisse untermauern aber die Wichtigkeit der Proteinsynthesemaschinerie für den mtDNA-Erhalt.

Auch in der $\Delta atp4$ -Deletionsmutante, der die ATPase-Untereinheit b fehlt, erfolgte ein schneller Verlust der mtDNA. Dieser Befund stimmt mit früheren Ergebnissen überein (Paul *et al.*, 1989), wobei auch hier die molekulare Basis noch nicht verstanden ist (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006). Des Weiteren führte das Fehlen von Pet100, einem Faktor der Cytochrom *c* Oxidase-Assemblierung, zu einem Verlust der mtDNA. Die Tatsache, dass in allen diskutierten Deletionsstämmen ein ebenso schneller Verlust der mtDNA wie in der $\Delta mip1$ -Mutante erfolgt, lässt auf eine aktive Unterdrückung der mtDNA-Replikation oder -Vererbung in diesen Stämmen schließen. Atp4, Mrp137, Mtf1, Mtg2, Pet100, Rsm24 und Slm5 käme demnach eine aktive Rolle in der Regulation des mtDNA-Erhalts in Hefe zu.

Andere Faktoren der mtDNA-Vererbung sind die Proteine Mgm1, Doc1 und das neu identifizierte Protein Rrg5. Mgm1 ist ein dynaminähnliches Protein, das über seine Rolle als mitochondriale Fusionskomponente den mtDNA-Erhalt beeinflusst (Jones & Fangman, 1992; Merz *et al.*, 2007). Doc1 ist als ein Prozessivitätsfaktor an der Cyclin-Proteolyse beteiligt. In diesem Prozess wird das Protein für die Ubiquitinierungsaktivität des *Anaphase Promoting Complex* (APC) benötigt (Carroll & Morgan, 2002). Interessanterweise wurde Doc1 auch im mitochondrialen Proteom gefunden (Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006). Möglicherweise verknüpft Doc1 die mtDNA-Replikation und/oder Vererbung mit dem Zellzyklus. Das *RRG5*-Gen (*YLR091w*) kodiert für ein Protein unbekannter Funktion und ohne Homologien zu charakterisierten Proteinen. Da Rrg5 wahrscheinlich in Mitochondrien vorliegt (Huh *et al.*, 2003; Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006), könnte es sich dabei um einen neuen Faktor handeln, der essentiell für den Erhalt von mtDNA ist.

Tabelle 3-1: Für den Erhalt mitochondrialer DNA erforderliche Gene.

Systematischer Name	Standardname	Zelluläre Funktion des Genprodukts
Kodierend für bekannte Komponenten des mtDNA-Metabolismus		
<i>YKL114c</i>	<i>APN1</i>	in Nukleus und Mitochondrien an der DNA-Reparatur beteiligt
<i>YLR304c</i>	<i>ACO1</i>	Aconitase; zusätzlich für den Erhalt mitochondrialer DNA benötigt
<i>YML061c</i>	<i>PIF1</i>	in Nukleus und Mitochondrien aktive DNA-Helikase
<i>YOL095c</i>	<i>HMI1</i>	an der mitochondrialen Innenmembran lokalisierte DNA-Helikase
<i>YOR330c</i>	<i>MIP1</i>	katalytische Untereinheit der mitochondrialen DNA-Polymerase
Kodierend für bekannte Komponenten der mitochondrialen Transkription und Translation		
<i>YBR268w</i>	<i>MRPL37</i>	mitochondriales Ribosomenprotein
<i>YCR024c</i>	<i>SLM5</i>	mitochondriale Asparaginyl-tRNA Synthetase
<i>YDR175c</i>	<i>RSM24</i>	mitochondriales Ribosomenprotein der kleinen Untereinheit
<i>YHR168w</i>	<i>MTG2</i>	assoziiert mit mitochondrialen Ribosomen; mögliche Rolle in deren Assemblierung
<i>YKL169c</i>		<i>dubious</i> ORF; überlappt partiell mit <i>MRPL38</i>
<i>YMR228w</i>	<i>MTF1</i>	mitochondrialer RNA-Polymerase Spezifitätsfaktor
Kodierend für Komponenten der oxidativen Phosphorylierung		
<i>YDR079w</i>	<i>PET100</i>	Faktor der Cytochrom c Oxidase-Assemblierung
<i>YPL078c</i>	<i>ATP4</i>	Untereinheit b der mitochondrialen F1Fo-ATP-Synthase
Andere Gene		
<i>YGL240w</i>	<i>DOC1</i>	nötig für die Ubiquitierungsaktivität des <i>Anaphase Promoting Complex</i>
<i>YLR091w</i>	<i>RRG5</i>	unbekannte Funktion
<i>YOR211c</i>	<i>MGM1</i>	mitochondriale GTPase; beteiligt an der Fusion von Mitochondrien

Die Auflistung enthält systematische und Standardnamen von Genen, die für den Erhalt neu eingebrachter mtDNA in Klasse I *pet*-Mutanten benötigt werden. Angaben zu zellulären Funktionen der Genprodukte stammen aus der *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) oder manuellen Annotationen (nach Merz & Westermann, 2009).

essentiell. Diese Gruppe beinhaltet 32 Gene, die für bekannte mitochondriale Proteine kodieren. Der Großteil davon wird für die Assemblierung der Atmungskette benötigt. 18 Gene kodieren bekannte extra-mitochondriale Proteine, wobei die Hälfte in Verbindung zur Vakuolenfunktion steht (Tab. A5). Darüber hinaus sind erstaunlich viele Mutationen von Genen, die für V-ATPase Untereinheiten kodieren, hoch penetrant (Abb. 3-2 B und Tab. A2). Deshalb ergibt sich die Frage, wie die Funktion der Vakuolen mit der respiratorischen Kompetenz zusammenhängt. Drei Erklärungsansätze sind dabei denkbar. Zunächst stellt die Vakuole einen Speicher für Metabolite dar und sorgt für cytosolische Ionen- und pH-Homöostase (Klionsky *et al.*, 1990; Kane, 2006). Bei Fehlfunktionen in diesen wichtigen Prozessen könnte es zur Störung des mitochondrialen Metabolismus kommen. Darüber hinaus macht der Verlust der V-ATPase-Aktivität die Zellen hypersensitiv gegenüber oxidativem Stress (Thorpe *et al.*, 2004; Kane, 2007; Milgrom *et al.*, 2007). Diese Empfindlichkeit könnte sich ebenfalls negativ auf die mitochondriale Funktion auswirken. Als dritte Erklärung kann die Funktion der Vakuole als terminales Kompartiment des Autophagiestoffwechsels angeführt werden. Da in Hefe auch Mitochondrien durch Autophagie abgebaut werden (Kissova *et al.*, 2007), ist es möglich, dass die Vakuole eine entscheidende Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle und im mitochondrialen *turnover* einnimmt. Die hohe Anzahl an *pet*-Mutanten, denen die V-ATPase fehlt, deckt eine wichtige, bisher noch nicht voll verstandene funktionelle Beziehung zwischen Vakuolen und Mitochondrien auf.

Einen Translations- und primär mtDNA-unabhängigen *pet*-Phänotyp entwickelten außerdem elf Deletionsmutanten uncharakterisierter ORFs. Fünf dieser ORFs überlappen mit bekannten proteinkodierenden Genen (vier sind ebenfalls in dieser Gruppe enthalten; die fünfte Gendeletion zeigte keinen *pet*-Phänotyp) und sind deshalb wahrscheinlich nicht kodierend. Die verbleibenden sechs (*YDL129w*, *YDL133w*, *YDL033w/RRG4*, *YNL213c/RRG9*, *YOL071w* und *YOL083w*) hingegen kodieren vermutlich neue Proteine mit Beteiligung am Erhalt der respiratorischen Aktivität. Mögliche Funktionen von Rrg4 und Rrg9 werden im Folgenden diskutiert.

3.1.2.5 Neue Komponenten, die essentiell für die respiratorische Kompetenz sind

Die durchgeführten Untersuchungen bringen alle im Rahmen dieser Arbeit erfassten, bisher uncharakterisierten *RRG*-Gene klar mit der mitochondrialen Funktion in Beziehung. Die funktionellen Eigenschaften der entsprechenden Deletionsmutanten sind in Tab. 3-4 zusammengefasst. Auch publizierte Lokalisationsstudien deuten auf eine mitochondriale Rolle hin. Die Proteine Rrg1, Rrg2 und Rrg5 bis Rrg10 wurden in Hochdurchsatzstudien

Das Protein Rrg2 besitzt ein Pentatricopeptid-Motiv (PPR-Motiv). Proteine, die ein solches Motiv tragen, sind zumeist in Plastiden und Mitochondrien lokalisiert, wo sie an verschiedenen Punkten der Genexpressionskontrolle beteiligt sind (Andrés *et al.*, 2007). Ein Fehlen mitochondrialer Translationsaktivität und ein früher Verlust der mtDNA, wie sie hier beobachtet wurden, stimmen mit einer Rolle von Rrg2 in der Kontrolle der mitochondrialen Genexpression überein.

$\Delta rrg3$ ist eine Klasse III *pet*-Mutante, die ein mitochondriales [*rho*⁺]-Genom aufrecht erhalten und vollständige mitochondriale Proteinsynthese betreiben kann. Rrg3 weist eine hohe Homologie zu Mitgliedern der Lipoat-Proteinligase Familie (Morris *et al.*, 1994) auf. Deshalb ist denkbar, dass dieses Protein die Anbindung von Liponsäure-Kofaktoren an mitochondriale Multienzymkomplexe wie die Pyruvat-Dehydrogenase, die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, die Glycin-Decarboxylase oder andere vermittelt. Zudem ist die Lipoat-Proteinligaseaktivität wichtig für die Reifung des mitochondrialen tRNA-prozessierenden Enzyms RNase P (Schonauer *et al.*, 2008). Es wäre interessant zu untersuchen, ob Rrg3 in diesem Prozess eine spezifische Rolle spielt.

Die Mutante $\Delta rrg4$ wurde kürzlich als eine von 86 Deletionsmutanten identifiziert, die eine erhöhte Assemblierung von Rad52 aufweisen. Dieses Protein ist eine Schlüsselkomponente der nukleären DNA-Reparatur über homologe Rekombination, weshalb das *RRG4*-Gen als *IRC19* (*increased recombination centers*) bezeichnet wurde (Alvaro *et al.*, 2007). Alvaro *et al.* (2007) identifizierten auch andere Gene mit Bezug zur mitochondrialen Funktion (u. a. *CBT1*, *COX16*, *MRP17*, *MRPL1*, *MRPS16* und *YMR31*) und schlugen vor, dass eine erhöhte oxidative Schädigung aufgrund beeinträchtigter Atmungskettenfunktion spontane DNA-Läsionen im Kern stimulieren könnte. Dadurch bestünde eine funktionelle Verbindung zwischen mitochondrialer Atmung und DNA-Reparaturprozessen im Kern.

Aktuelle Ergebnisse stellen eine genetische Beziehung zwischen *RRG5* und den Prohibitinen her (Osman *et al.*, 2009). Die Prohibitine Phb1 und Phb2 sind zwei homologe Proteine, die in multimeren, hochmolekularen ringförmigen Komplexen in der mitochondrialen Innenmembran vorliegen und regulatorische Funktionen im Rahmen der Zellproliferation sowie der Dynamik und Funktion von Mitochondrien einnehmen. Darüber hinaus wurde in der entsprechenden Deletionsmutante $\Delta ylr091w$ eine veränderte Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen beobachtet, wobei insbesondere der Anteil an Cardiolipin (CL) und Phosphatidylethanolamin (PE) reduziert war (Osman *et al.*, 2009). Beides sind Phospholipide mit großer Bedeutung für die mitochondriale Struktur und Integrität (Osman *et al.*, 2009). Eine veränderte Lipidzusammensetzung kann sowohl die

Stabilität der Atmungskettensuperkomplexe (Pfeiffer *et al.*, 2003) als auch die Prozessierung der Fusionskomponente Mgm1 und damit die mitochondriale Fusion beeinträchtigen (Osman *et al.*, 2009). Beides – vollständige Assemblierung der ATP-Synthase und mitochondriale Fusion – sind Prozesse, die für eine Aufrechterhaltung der mtDNA benötigt werden (Paul *et al.*, 1989; Westermann, 2008). Möglicherweise handelt es sich also bei Rrg5 um eine Komponente des mitochondrialen Lipidstoffwechsels, die dadurch eine entscheidende Funktion für den Erhalt der mitochondrialen DNA einnimmt.

Das *RRG6*-Gen wurde kürzlich in einem Screen nach Komponenten mit Beteiligung an der ER-Formgebung identifiziert und *HER2* (*Hmg2-induced ER remodelling*) genannt. Seine Rolle und molekulare Funktion in diesem Prozess ist bisher unbekannt (Federovitch *et al.*, 2008). Da Rrg6 sowohl in GFP-Fusionsstudien als auch Proteomanalysen mitochondrial lokalisiert wurde (Huh *et al.*, 2003; Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006), ist es wahrscheinlicher, dass seine primäre Funktion in Beziehung zum Erhalt der respiratorischen Kompetenz steht. Das Protein zeigt hohe Homologien zur bakteriellen Glutamyl-tRNA-Amidotransferase und eine Rolle in der mitochondrialen Proteinsynthese stimmt mit der Beobachtung überein, dass die mitochondriale Translation blockiert ist (Tab. 3-2).

Δ *rrg7* ist eine Klasse II-Mutante, die ihre respiratorische Inkompetenz vermutlich unabhängig vom Genotyp erwirbt. Das *RRG7*-Gen kodiert für ein mitochondriales Protein (Huh *et al.*, 2003), das Homologe in Pilzen und anderen niedrigen Eukaryoten besitzt. Seine Funktion in der mitochondrialen Biosynthese ist gegenwärtig unklar.

Bei Δ *rrg10* handelt es sich um eine Klasse III *pet*-Mutante, die in der Lage ist, ihr mitochondriales [*rho*⁺]-Genom aufrecht zu erhalten. Das *RRG10*-Gen kodiert für ein kleines Protein von nur 85 Aminosäuren. Die Analyse des mitochondrialen Translationsmusters zeigte eine Reduktion von Cox1, was vermuten lässt, dass Rrg10 eine spezifische Rolle in der Transkription oder Reifung der mitochondrialen mRNA und/oder der Translation oder Assemblierung dieses mitochondrialen Genprodukts spielt.

3.1.2.6 Der Einfluss extragenomischer Faktoren

Die respiratorische Inkompetenz von 23 *pet*-Mutanten wurde sowohl durch Kreuzung mit Δ *mip1* als auch durch Cytoduktion gerettet (Klasse II; Tab. A3). Diese Mutanten besitzen ein mitochondriales [*rho*⁺]-Genom, was durch die Kreuzung mit Δ *mip1* gezeigt wurde, und können nach Erhalt von frischem cytosolischem Material durch Cytoduktion auch ohne genbasierte Deletionskomplementation – zumindest für einige Generationen – wieder Atmung betreiben. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die respiratorische Kompetenz

nicht ausschließlich vom mitochondrialen oder vom Kerngenom abhängt, sondern möglicherweise zusätzlich von extragenomischen Faktoren bestimmt wird. Dazu sind grundsätzlich zwei verschiedene Wirkmechanismen denkbar. Zum einen kann der Ausgleich der Deletion während der Cytoduktion auf Proteinebene erfolgen. Während der unvollständigen Paarung bildet sich ein gemischtes Cytoplasma, in dem durch den Donor wildtypische Konzentrationen aller Proteine vorliegen. Diese können entweder frei, gebunden in prä-assemblierten Komplexen oder in intakten Organellen übertragen werden. Den entstehenden Zellen und Nachkommen steht damit – solange bis die Proteine abgebaut und/oder durch Zellteilung ausgedünnt werden – ein wildtypischer Proteinpool zur Verfügung. Die Rettung im Cytoduktionsexperiment wäre demnach ein transienter Zustand, der durch die Geschwindigkeit des Proteinabbaus limitiert wird. Im zweiten Fall hängt die respiratorische Kompetenz nicht (nur) vom Proteinmangel ab, sondern möglicherweise von erworbenen Eigenschaften der Zellen, wie sekundäre Schädigung von Biomolekülen. Hierbei leistet die Cytoduktion nicht (nur) die Kompensation des Proteinmangels, sondern auch das unerlässliche Auffrischen der gesamten Zellbestandteile. In diesem Fall wäre die Rettung zwar auch transient, aber evtl. stabiler als bei Ausgleich eines Proteinmangels, da die Akkumulation von Schäden vermutlich langsamer voranschreitet als der Proteinabbau.

In zehn der Klasse II-Mutanten fehlen bekannte mitochondriale Proteine ($\Delta coq5$, $\Delta coq10$, $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$, $\Delta mct1$, $\Delta mss2$, $\Delta nfu1$, $\Delta slm3$, and $\Delta som1$). Darunter sind vier Assemblierungsfaktoren der Cytochrom *c* Oxidase (COX-Komplex). Cox10 ist für die Synthese des Häm A-Kofaktors erforderlich (Nobrega *et al.*, 1990; Tzagoloff *et al.*, 1993), Cox19 ist ein Metallochaperon, das Kupfer auf den COX-Komplex überträgt (Nobrega *et al.*, 2002), Mss2 wird für die Membrantranslokation des C-Terminus des mitochondrial kodierten Cox2-Proteins benötigt (Broadley *et al.*, 2001), und Cox16 trägt auf bisher unbekannte Weise zur Assemblierung des COX-Komplexes bei (Carlson *et al.*, 2003). Alle vier Proteine werden für die Assemblierung des COX-Komplexes auf post-translationaler Ebene benötigt. Wo in vorangegangenen Arbeiten ausschließlich der respiratorische Defekt der $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$, and $\Delta mss2$ Mutanten erfasst wurde (Nobrega *et al.*, 1990; Broadley *et al.*, 2001; Nobrega *et al.*, 2002; Carlson *et al.*, 2003), liefert die vorliegende Arbeit darüber hinaus einen Hinweis darauf, dass auch extragenomische Faktoren eine Rolle für den Verlust der respiratorischen Kompetenz spielen könnten. Deshalb wurden diese Deletionsmutanten (COX-Assemblierungs-Mutanten) im Folgenden weiter untersucht.

3.1.3 Funktionelle Untersuchung der COX-Assemblierungs-Mutanten

3.1.3.1 Plasmidale Komplementation der Gendelektionen

Die COX-Assemblierungs-Mutanten konnten sowohl nach Cytoduktion, als auch durch Kreuzung mit $\Delta mip1$ wieder Atmung betreiben. Nachdem beide Experimente auf Paarung von Zellen basieren, liegt es nahe, dass extragenomische Bestandteile den Schlüssel der Rettung darstellen. Deshalb sollte zunächst getestet werden, ob im Fall der COX-Assemblierungs-Mutanten eine Übertragung frischer Zellbestandteile während der Cytoduktion bzw. $\Delta mip1$ -Kreuzung obligat für die Rettung ist. Hierzu wurden Transformationsexperimente durchgeführt. Die genomischen Deletionen der Mutanten wurden mit Plasmiden ausgeglichen, die Wildtypkopien der entsprechenden Gene unter dem endogenen Promotor kodieren. Prinzipiell erfolgt hierbei wie in der Kreuzung mit $\Delta mip1$ -Zellen eine Komplementation. Im Gegensatz zur Kreuzung aber, wo auch intakte zelluläre Komponenten vom Kreuzungspartner zur Verfügung gestellt werden, kommt es im Zuge der Transformationen tatsächlich nur zu einem Ausgleich des Proteinmangels. Die Vorgehensweise deckt also irreversible vom Proteinlevel unabhängige Schäden auf.

In drei unabhängigen Experimenten wurde das Wachstum von jeweils mindestens 100 transformanten Klonen pro Deletionsmutante auf YPG analysiert. Trotz Anzucht auf plasmiderhaltendem Selektivmedium blieb eine deutliche Anzahl an Transformanten (9-30%) auch nach der Komplementation mit dem entsprechenden Wildtypgen respiratorisch defizient (Abb. 3-8). Das Auftreten respiratorisch inkompetenter Klone wurde nicht durch die Transformationsprozedur an sich hervorgerufen, weil Transformationen von Wildtypzellen mit den gleichen Plasmiden 100% respiratorisch kompetente Klone hervorbrachten. Um zu testen, ob $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$ und $\Delta ms2$ Klone ihre für die respiratorische Kompetenz benötigten Eigenschaften im Laufe der Zeit verlieren, wurden die Mutanten chronologischer Alterung unterzogen (Kaeberlein *et al.*, 2007). Dafür wurden die Zellen auf glukosehaltigen Platten für mehrere Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mit komplementierenden Plasmiden transformiert wurden. Unter diesen Bedingungen war der Anteil an Klonen, die nicht gerettet werden konnten, auf 60-81% erhöht, wohingegen nur 6% gealterter Wildtypzellen nach der Transformation respiratorisch inkompetent waren (Abb. 3-8).

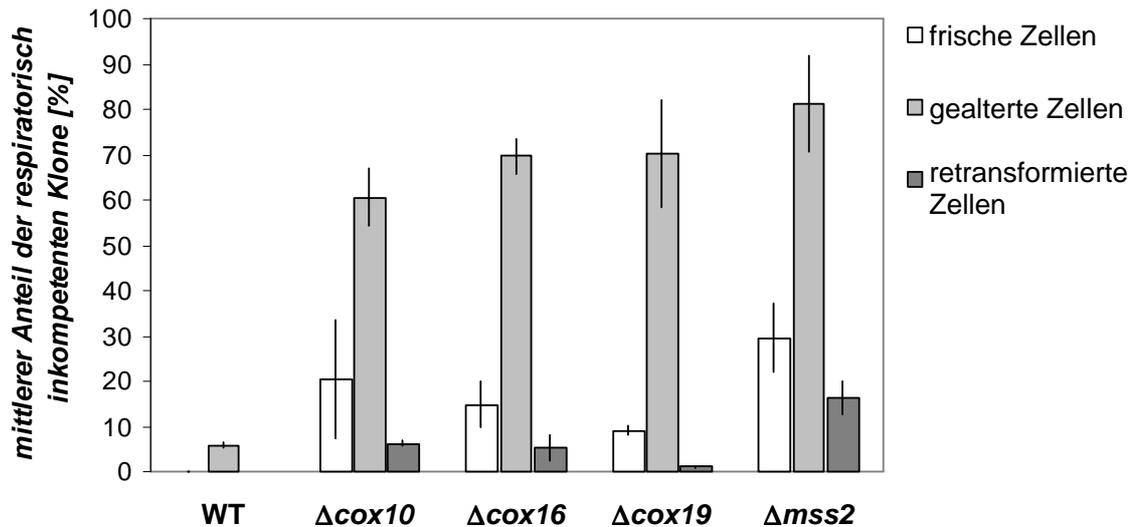


Abbildung 3-8: Plasmidale Komplementation der Gendelektionen. Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 -Zellen aus der $\text{MAT}\alpha$ -Deletionsbibliothek wurden mit Plasmiden transformiert, die das jeweils komplementierende Wildtypallel unter Kontrolle des endogenen Promotors tragen. Wildtypzellen wurden mit leeren Plasmiden transformiert. Frische Zellen wurden über Nacht bei 30°C auf YPD-Medium gezogen (weiß). Gealterte Zellen wurden 14-28 Tage bei Raumtemperatur auf YPD-Platten inkubiert, bevor sie auf frische Medienplatten übertragen und nach einer 1h-Inkubation bei 30°C mit den komplementierenden Plasmiden transformiert wurden (hellgrau). Für die Re-Transformation wurden respiratorisch kompetente Klone aus der Transformation frischer Zellen 24 h in flüssigem YPD-Medium kultiviert, auf YPD-Medienplatten ausgebracht und Einzelkolonien auf frische YPD-Platten überführt. Vor erneuter Transformation (dunkelgrau) mit den komplementierenden Plasmiden wurde durch Überstempeln auf geeignete Selektivmediumplatten der Plasmidverlust und durch parallele Δmip1 -Kreuzung die Unversehrtheit der mtDNA überprüft. Der Anteil an respiratorisch inkompetenten Zellen beträgt im Fall von frischen und retransformierten Wildtypzellen 0% und ist deshalb in der Grafik nicht sichtbar. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die Transformationsexperimente zeigen eine Akkumulation irreversibler Schäden, die bereits in logarithmisch wachsenden Zellen eintritt und durch Alterung beschleunigt wird.

Ein Erwerb des respiratorischen Defekts sollte in Re-Transformationsexperimenten weiter nachvollzogen werden. Hierfür wurden nach der ersten Transformation respiratorisch kompetente Klone nach Plasmidverlust erneut mit dem jeweils komplementierenden Plasmid re-transformiert. Für den Plasmidverlust wurden respiratorisch kompetente Klone aus der ersten Transformation frischer Zellen 24 h in flüssigem YPD-Medium kultiviert, auf YPD-Medienplatten ausgebracht, und Einzelkolonien auf frische YPD-Platten überführt. Durch Überstempelung auf geeignete Selektivmediumplatten wurde der Plasmidverlust und durch parallele Δmip1 -Kreuzung die Unversehrtheit der mtDNA überprüft. Im Gegensatz zu den chronologisch gealterten Zellen des vorangehenden Experiments befanden sich diese Zellen stets in der logarithmischen Wachstumsphase. Zudem waren die hier verwendeten Klone – wie durch die erfolgte Rettung im primären Transformationsexperiment und den zusätzliche Δmip1 -Kreuzungen bestätigt (Daten nicht gezeigt) – ursprünglich mit allen Voraussetzungen für eine respiratorische Kompetenz (inklusive intakter mtDNA) ausgestattet. Nach der

zweiten Transformation konnten jedoch erneut respiratorisch inkompetente Klone identifiziert werden (5-16%). Innerhalb des kurzen Zeitfensters zwischen Plasmidverlust und Re-Transformation kam es also wieder zu einer irreversiblen Schädigung. Die Re-Transformationsexperimente belegen einen spontanen Erwerb respiratorischer Inkompetenz in logarithmisch wachsenden Zellen. Einzig im Fall der Δcox19 -Mutante konnte mit einem Anteil von 1,1% an respiratorisch inkompetenten Zellen keine nennenswerte Verschlechterung festgestellt werden. Zusammen mit den ebenfalls vergleichsweise niedrigen Startwerten transformierter frischer Zellen aus der ersten Transformation und der Existenz respiratorisch kompetenter Δcox19 -Zellen in der *MATa*-Bibliothek (Luban *et al.*, 2005) deutet dieses Ergebnis auf ein deutlich langsames Voranschreiten der Schädigung in logarithmisch wachsenden Δcox19 -Zellen hin.

Insgesamt zeigen alle vorgenommenen Transformationsexperimente, dass die Mitochondrien in Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 -Zellen mit der Zeit irreversibel geschädigt werden, was eine respiratorische Inkompetenz hervorruft, die nicht mehr ausgeglichen werden kann. Diese Schädigung wird schon während des logarithmischen Wachstums induziert und während chronologischer Alterung stark beschleunigt. In den untersuchten COX-Stämmen (und möglicherweise auch in anderen Klasse II-Mutanten) wird der respiratorische Defekt also zusätzlich durch erworbene Faktoren begünstigt.

Um nachzuvollziehen auf welcher Ebene die Schädigung der Zellen erfolgt (mtDNA oder andere Makromoleküle), wurden Kreuzungen von respiratorisch inkompetenten Transformanten nach der Starttransformation mit Δmip1 -Zellen durchgeführt, die aufgrund ihrer Deletion [*rho*⁰] sind (Foury, 1989). Dadurch wurden alle Zellbestandteile außer der mtDNA erneuert. Das Wachstum der erzeugten Diploiden auf YPG-Medienplatten wurde erfasst. Ein Großteil davon war nicht in der Lage respiratorisch zu wachsen, was zeigt, dass die parentalen, respiratorisch inkompetenten Transformanten keine intakte mtDNA besaßen. Die mtDNA scheint also das primäre Angriffsziel der schädigenden Einflüsse zu sein. Das Ausgangspostulat, dass die respiratorische Kompetenz in Klasse II-Mutanten nicht vom mitochondrialen Genom abhängt, sollte deshalb mit nicht ursprünglich eingeschränkt werden. Allerdings beweist die sporadische Detektion (1%) von respiratorisch kompetenten Klonen nach der Δmip1 -Kreuzung (Abb. 3-9), dass die Schäden nicht ausschließlich auf die mtDNA beschränkt sind, sondern auch andere, in der Kreuzung ersetzbare Makromoleküle, wie z. B. Lipide oder Proteine, betreffen können.

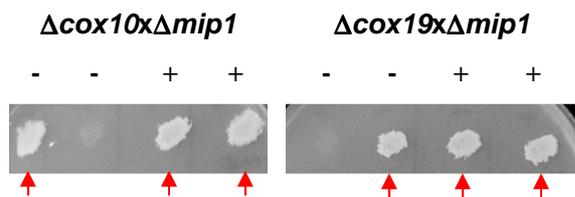


Abbildung 3-9: Überprüfung der mtDNA durch Kreuzung mit $\Delta mip1$. Nach der Starttransformation wurden respiratorisch kompetente (+) und inkompetente (-) Klone mit $\Delta mip1$ -Zellen gekreuzt und das Wachstum der entstandenen Diploiden auf YPG-Medium erfasst. Alle getesteten (+) Klone und je ein (-) Klon enthielten mtDNA (roter Pfeil).

3.1.3.2 Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Was aber sind die Faktoren, die die Akkumulation von Schäden hervorrufen? Eine häufige Ursache gravierender zellulärer Schädigung sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (HO^{\bullet}), die unvermeidlich als Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung entstehen (Meissner, 2007). Die Hauptproduzenten von ROS in Hefezellen sind dabei die rotenoninsensitiven NADH-Dehydrogenasen, die als Alternative zum klassischen NADH-Dehydrogenase-Komplex vorliegen, und der Cytochrom *bc1*-Komplex (Herrero *et al.*, 2008) (vgl. Abb. 1-1). Übersteigt die Produktionsrate die natürliche Entgiftungskapazität, kommt es zur verstärkten oxidativen Schädigung von Makromolekülen (Semenza, 2007; Hoye *et al.*, 2008). Verschiedene Hinweise deuten darauf hin, dass auch in den Deletionsstämmen $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$ und $\Delta mss2$ ROS eine Rolle spielen könnten. Zum einen scheint speziell die mtDNA von den Schädigungen betroffen zu sein. Aufgrund ihrer räumlichen Nähe zur Atmungskette und der ungeschützten histonfreien Struktur ist sie oft primäres Ziel von ROS (Balaban *et al.*, 2005). Zum anderen erfolgt in $\Delta cox16$ -Zellen eine vermehrte Assemblierung von DNA-Reparaturkomplexen im Zellkern, die vermutlich durch eine erhöhte oxidative Schädigung induziert wird (Alvaro *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnten Barros *et al.* (2003) bereits in $\Delta cox10$ - sowie $\Delta cox11$ - und $\Delta cox15$ -Deletionsmutanten, denen ebenfalls COX-Assemblierungsfaktoren fehlen, eine erhöhte ROS-Produktion nachweisen. Die zelluläre ROS-Akkumulation in den $\Delta cox10$, $\Delta cox16$, $\Delta cox19$ und $\Delta mss2$ -Mutanten sollte deshalb mittels DHR-Färbung (Dihydrorhodamin-123) untersucht werden. DHR ist ein nicht-fluoreszierender, membrandiffusibler Farbstoff, der durch ROS zu grün fluoreszierendem, nicht-diffusiblem Rhodamin-123 oxidiert wird. Die Fluoreszenz von Zellen ist damit ein direkter Indikator für die Anwesenheit von ROS.

Die Akkumulation von ROS wurde zeitabhängig verfolgt. Hierfür wurden die für die Färbungen verwendeten Kulturen zum Zeitpunkt 0 h frisch beimpft und zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots für die DHR-Behandlung entnommen. Die Probennahmen erfolgten nach 8 h in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen und in der stationären Phase

nach 24, 32, 56 und 80 h. Der Anteil fluoreszierender Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch erfasst (Abb. 3-10 A). Diese Vorgehensweise wurde jeweils in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

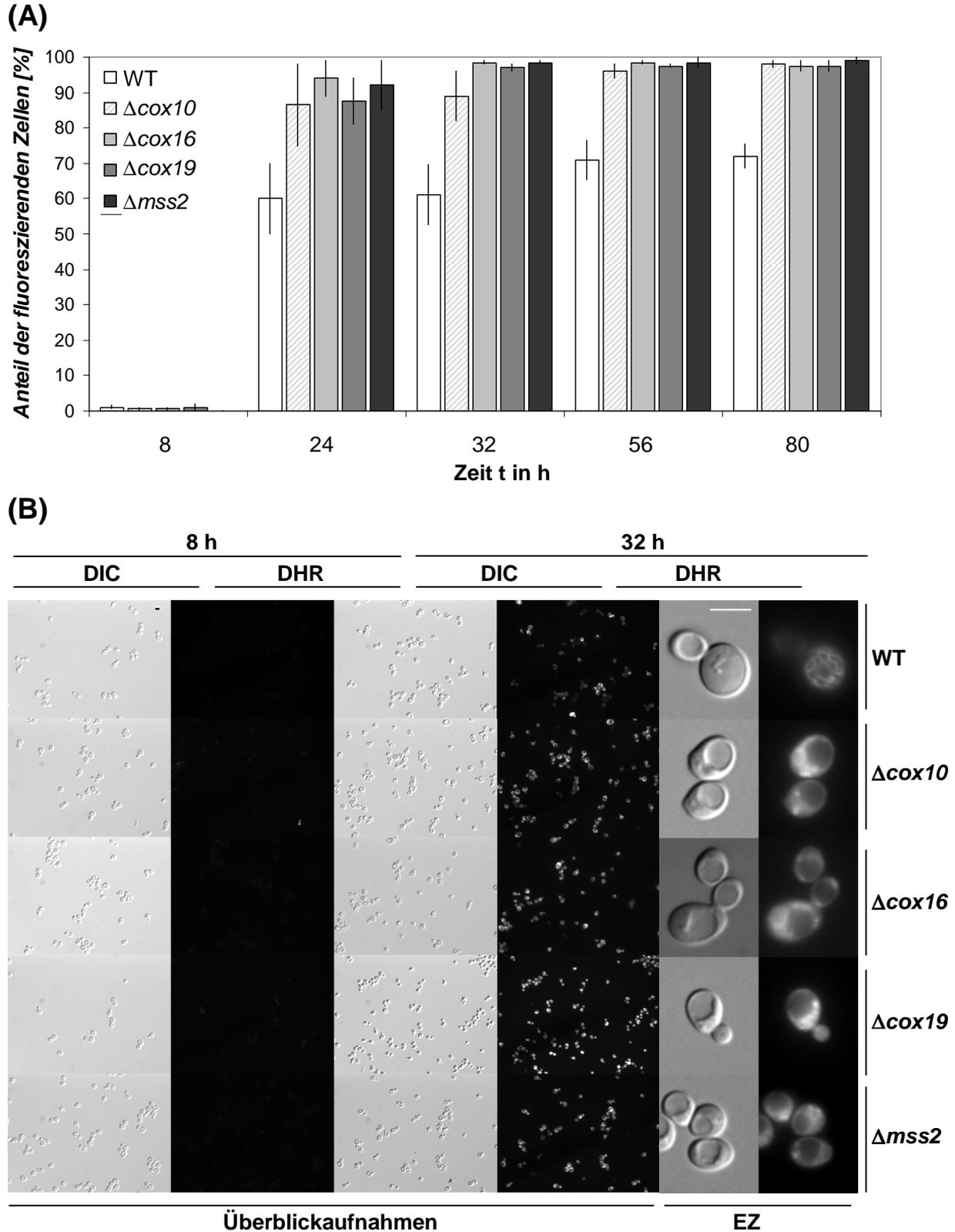


Abbildung 3-10: Stationäre COX-Assemblierungs-Mutanten akkumulieren verstärkt ROS.
 Bildbeschreibung siehe S. 69.

Abbildung 3-10: Stationäre COX-Assemblierungs-Mutanten akkumulieren verstärkt ROS. Zellkulturen wurden in flüssigem YPD-Medium bei 30°C gezogen. 1 ml Aliquots wurden nach 8, 24, 32, 56 und 80 h Inkubationszeit entnommen und für fluoreszenzmikroskopische Analysen und Quantifizierungen mit DHR (Dihydroρhodamin-123) gefärbt. **(A)** Zeitlicher Verlauf der ROS-Akkumulation. Aufgetragen sind Mittelwerte des Anteils an fluoreszierenden Zellen aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils n=100) mit Standardabweichungen gegen den Zeitpunkt der Probennahme in h. Bereits mit dem Übergang der Kulturen in die stationäre Phase kommt es nach 24 h zu einem deutlichen Anstieg der ROS-produzierenden, grün fluoreszierenden Zellen, wobei deren Anteil in mutanten Kulturen (grau) etwa ein Drittel höher ist als in den Wildtypkulturen (weiß). **(B)** DHR-gefärbte COX-Deletionsmutanten weisen eine breitere und intensivere Fluoreszenz auf als parallel untersuchte Wildtypzellen. Überblicksaufnahmen wurden mit 40facher Vergrößerung und Einzelaufnahmen (EZ) mit 100facher Vergrößerung erstellt. Die Einzelaufnahmen sind im Vergleich zu den Überblicksaufnahmen vergrößert dargestellt. Jedes Bildpaar besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und einer Fluoreszenz-Aufnahme (DHR). Die jeweils abgebildeten Größenbalken entsprechen 5 µm und gelten für alle Aufnahmen. In der logarithmischen Wachstumsphase (8 h) ist nur Autofluoreszenz vorhanden, wohingegen Zellen aus der stationären Phase (32 h) eine deutliche DHR-Fluoreszenz zeigen, die mit ROS-Akkumulation gleich zu setzen ist.

Sowohl in den Wildtyp- als auch in den mutanten Kulturen fluoreszierten nach 8 h <2% der Zellen. Bereits nach 24 h war der Anteil der fluoreszierenden Zellen auf durchschnittlich 50% in Wildtyp- und 86,5 bis 92% in den mutanten Kulturen angestiegen. Zum Zeitpunkt 56 h fluoreszierten annähernd 100% der mutanten Zellen und 71% der Wildtypzellen. Dabei war die Fluoreszenzintensität in den mutanten Zellen insgesamt stets höher als die in Wildtypzellen. Mit dem Eintritt in die stationäre Phase kam es also zu einem detektierbarem Anstieg der ROS-Produktion, der in den Deletionsstämmen deutlich verstärkt war (Abb. 3-10 A). Zusätzlich war die Fluoreszenz in den Deletionsmutanten über die gesamte Zelle verteilt, wohingegen in den Wildtypzellen beinahe eine selektive Färbung der Mitochondrien beobachtet wurde (Abb. 3-10 B). Die ROS sind in den Mutanten also nicht nur vermehrt, sondern auch zusätzlich breiter verteilt, sodass eine umfassende Schädigung der gesamten Zelle erfolgen kann.

Der Grad der Fluoreszenz in den Wildtypkulturen spiegelt die natürliche ROS-Konzentration wider, die primär durch die Atmungskette und weitere oxidative Prozesse (in z. B. den Peroxisomen und im ER) erzeugt wird. In der logarithmischen Phase (8 h) fermentieren die Hefezellen die vorliegende Glukose. Es werden nur wenige ROS gebildet, weil die zelluläre Atmung reprimiert wird und weniger Mitochondrienmasse vorliegt (Cabiscol *et al.*, 2000). Der sprunghafte Anstieg mit Übergang in die stationäre Phase kann durch physiologische Änderungen erklärt werden. In diesem Stadium kommt es zu einer Limitierung der Kohlenstoffquelle Glukose, die zu einem transienten Wachstumsarrest führt (*metabolic transition*). In diesem Stadium verringert sich zum einen zunächst der Energiebedarf (Bonawitz *et al.*, 2006), sodass weniger O₂ verbraucht wird. Der intrazelluläre O₂-Level steigt also kurzfristig, was möglicherweise die monoelektronische Reduktion von

Sauerstoff zu $O_2^{\bullet-}$ begünstigt (Trancíková *et al.*, 2004). Zum anderen entfällt die Glukoserepression und die Zellen exprimieren zur Adaption an den respiratorischen Metabolismus verstärkt Gene, die für Proteine der mitochondrialen Genexpression und der Atmungskette kodieren (Traven *et al.*, 2001). Durch respiratorische Verstoffwechslung des vorher gebildeten Ethanol werden im Folgenden verstärkt ROS gebildet. So tragen also zwei basale Prozesse zu einer natürlichen Erhöhung der ROS-Konzentration in Hefezellen bei. Durch gleichzeitige Induktion des antioxidativen Systems werden diese jedoch abgebaut und die schädigenden Einflüsse in Wildtypzellen minimiert. Die deutlich erhöhten ROS-Konzentrationen in den Mutanten weisen auf eine Störung dieses Gleichgewichts hin.

Die Befunde aus den Transformationsexperimenten (vgl. 3.1.3.1) stehen scheinbar im Widerspruch zu den Ergebnissen der DHR-Färbungen. Obwohl die Transformationsexperimente ein Fortschreiten der irreversiblen Schädigungen während des logarithmischen Wachstums demonstrieren, sind in den entsprechenden Flüssigkulturen über DHR-Färbungen keine ROS nachweisbar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die ROS-Konzentrationen in den logarithmisch wachsenden Zellen unter der Nachweisgrenze der Färbetechnik liegen. Um dies zu überprüfen, wurden sensitivere Messungen der ROS-Konzentrationen an Mitochondrien, die aus logarithmisch wachsenden Zellen isoliert worden waren, durch Sebastian Longen (Universität Kaiserslautern, Lehrstuhl für Zellbiologie) vorgenommen. Dieses Verfahren beruht darauf, dass das farblose Substrat Amplex® Red bei Anwesenheit von H_2O_2 zu hoch fluoreszente Resorufin umgesetzt wird (Zhou *et al.*, 1997). Die Resorufin-Bildung wird fluorimetrisch verfolgt (Anregung: 544 nm; Emission: 590 nm). So kann H_2O_2 bis zu einer Untergrenze von 100 nM nachgewiesen werden (Produktinformation Invitrogen).

Exemplarische Messungen wurden für die Δcox10 -Deletionsmutante durchgeführt. Dadurch konnte im Vergleich zu Wildtypzellen eine Verdopplung der ROS-Konzentration in den mutanten Zellen festgestellt werden. Die Ergebnisse stimmen mit vorangegangenen Studien von Barros *et al.* (2003) überein und beweisen die erhöhte Produktion von ROS auch in logarithmisch wachsenden Zellen. Das analoge Verhalten von Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 in den bisher vorgenommenen Untersuchungen legt nahe, dass auch in diesen Stämmen in der logarithmischen Phase eine erhöhte ROS-Produktion erfolgt. Um dies jedoch zu bestätigen, sind exakte Messungen (Amplex® Red-Methode) unerlässlich.

3.1.3.3 Modell zur Entstehung der respiratorischen Inkompetenz in den COX-Assemblierungs-Mutanten

Anhand der durchgeführten Experimente konnten erste Hinweise auf einen zusätzlichen Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies gewonnen werden. Das Beispiel der COX-Assemblierungs-Mutanten zeigt damit, dass die Entwicklung eines *pet*-Phänotyps oft nicht eindimensional erfolgt und durch extragenomische Faktoren verstärkt werden kann. Zusammen mit den übrigen Untersuchungsergebnissen kann folgendes Modell zur Phänotypentstehung in COX-Assemblierungs-Mutanten vorgeschlagen werden: In der Startsituation (direkt nach der Cytoduktion) besitzen die Zellen ungeschädigtes Zellmaterial und intakte, assemblierte Cytochrom *c* Oxidase (COX)-Komplexe. Diese scheinen zunächst auch im Deletionshintergrund voll funktionsfähig zu sein, zumal entsprechende Zellen nach der Cytoduktion auf YPG-Platten wachsen. Die fehlenden Proteine sind also nicht für die Funktionalität bestehender Komplexe erforderlich. Durch Proteinabbau und Ausdünnung während der Zellteilung liegen nach und nach immer weniger intakte Komplexe vor und aufgrund der Deletionen können keine neuen mehr gebildet werden. Die Atmungsaktivität sinkt sukzessive und erliegt schließlich. Die primäre Konsequenz der Deletion ist also zunächst – gemäß der beschriebenen Proteinfunktionen – der COX-Assemblierungsdefekt, der letztendlich eine fehlende COX-Aktivität hervorruft.

Die Deletionen beziehungsweise die resultierende COX-Fehlfunktion scheinen sich zudem sekundär auszuwirken. So wurde eine verstärkte Bildung von ROS in den DHR-Färbungsexperimenten beobachtet (3.1.3.2 DHR-Färbungen). Dies stimmt mit der Annahme überein, dass eine unausgewogene Produktion oder Assemblierung von Atmungskettenkomplexen den *vicious cycle of oxidative stress* induziert (Bonawitz *et al.*, 2006). Die um 1/3 erhöhte ROS-Produktion in den Mutanten resultiert vermutlich direkt aus der gestörten Elektronentransportkette. Barros *et al.* (2003) konnten zeigen, dass Antimycin A³-behandelte Wildtypzellen und Cytochrom *bc1*-Komplex-Mutanten ROS akkumulieren. Künstliche Inhibition scheint also den gleichen Effekt wie intrinsische Manipulation durch Deletion auf die Atmungskette zu haben. Deshalb liegt es nahe, dass es in den hier untersuchten Mutanten bei Erliegen der COX-Aktivität – analog zu einer Cytochrom *c* Oxidase-Inhibition durch Cyanide (Sipos *et al.*, 2003) – gewissermaßen zu einem Elektronenstau kommt. Die Atmungskettenkomplexe *upstream* liegen reduziert vor und besitzen damit ein erhöhtes Reduktionspotential, wodurch die ROS-Produktion durch Übertragung einzelner Elektronen auf O₂ begünstigt wird (Johnson & DeMars, 2004). In den COX-Assemblierungs-Mutanten

³ Antimycin A: Inhibitor des Cytochrom *bc1*-Komplexes.

erfolgt also als direkte Konsequenz der COX-Fehlfunktion stete ROS-Produktion, die bereits innerhalb kurzer Zeit zu einer gravierenden Schädigung von Proteinen, Lipiden und auch mtDNA führen kann (siehe 3.1.3.1 Re-Transformationsexperimente). Dadurch kommt es zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Atmungskette, die eine weitere Verstärkung der ROS-Produktion mit weiterer Schädigung bedingt. Ein sich selbstverstärkender Kreislauf wird gestartet (*vicious cycle theory*; Bandy & Davison, 1990). Die produzierten ROS-Mengen sind schließlich so groß, dass sie aus den Mitochondrien austreten und die gesamte Zelle schädigen (siehe 3.1.3.2).

Obwohl Hefe ihren Energiebedarf bei Anwesenheit von Glukose hauptsächlich über Fermentation deckt, ist auch unter diesen Bedingungen eine elektronentransportabhängige ROS-Produktion möglich. Denn trotz Glukoserepression bleibt eine Restaktivität der Atmungskette (~10%) bestehen (Rosenfeld & Beauvoit, 2003), die aufgrund des COX-Defekts ausschließlich ROS bildet. Zusätzlich erfolgt durch Glukose eine Repression vieler Komponenten des antioxidativen Systems (z. B. Superoxiddismutase, Catalase und Glutathionperoxidase; Martínez-Pastor *et al.*, 1996), was wiederum eine mitochondriale ROS-Akkumulation begünstigt. Das bedeutet, dass COX-Assemblierungs-Mutanten auch unter fermentierbaren Bedingungen permanent oxidativem Stress ausgesetzt sind.

Bei Limitierung der Kohlenstoffquelle Glukose (am Übergang in die stationäre Phase) ist dieser Prozess sogar drastisch beschleunigt. Im Prinzip greifen hier die gleichen beiden Mechanismen wie im Wildtyp (vgl. 3.1.3.2). Primäre Ursache einer vermehrten ROS-Produktion ist der Wegfall der Glukoserepression (Gancedo, 1998) mit Umstellung des Stoffwechsels auf oxidative Phosphorylierung (*diauxic shift*). Dafür werden verstärkt Proteine des respiratorischen Programms – insbesondere Atmungskettenkomplexe – gebildet, die aufgrund fehlerhafter COX in den Mutanten nur die ROS-Produktion beschleunigen. Darüber hinaus erliegt in dieser Phase der physiologischen Veränderung auch in den Mutanten der Stoffwechsel, aufgrund des niedrigeren Energiebedarfs wird weniger O₂ verbraucht und die zelluläre O₂-Konzentration steigt (vgl. 3.1.3.2). Allerdings ist dies aufgrund der respiratorischen Inkompetenz anders als in den Wildtypkulturen kein transienter Zustand, was permanent die Wahrscheinlichkeit monoelektronischer Reduktion von Sauerstoff und die Rate der ROS-Produktion zusätzlich erhöht.

Interessanterweise üben in den Mutanten bereits die in der logarithmischen Phase gebildeten geringen Mengen an ROS stark negative Effekte aus. Obwohl die ROS-Konzentrationen nur etwa doppelt so hoch sind wie im Wildtyp (vgl. 3.1.3.2; AmplexRed-Messung) scheinen die

mutanten Zellen deutlich anfälliger für ROS-bedingte Schädigungen zu sein und es entsteht ein höherer Anteil an Zellen mit irreversibler Schädigung (Transformationsexperimente). Diese Tendenz setzt sich auch in den stationären Kulturen fort. In Analogie dazu wurde für respiratorisch inkompetente $\Delta\text{cox6-}$, $[\text{rho}^0]$ - und wildtypische Antimycin A-behandelte Zellen eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber extern zugegebenem H_2O_2 experimentell nachgewiesen (Grant *et al.*, 1997; Trancíková *et al.*, 2004). Erklärungsansätze für diese stärkere Anfälligkeit liefern Trancíková *et al.* (2004) und Grant *et al.* (1997): Sie gehen davon aus, dass die Entgiftung und Reparatur ROS-geschädigter Moleküle zahlreiche energieverbrauchende Schritte beinhaltet. Diese Energie kann jedoch aufgrund der mitochondrialen Fehlfunktion nicht ausreichend bereit gestellt werden, sodass das Ungleichgewicht zwischen ROS-Produktion und -Abbau weiter verstärkt wird. Funktionelle Mitochondrien stellen also selbst das basale Level der ROS-Resistenz dar (Grant *et al.*, 1997). Auf alle Arten des oxidativen Stress, egal ob extern oder intern entstanden, erfolgt die gleiche zelluläre Antwort. Deshalb liegt es nahe, dass dieses Modell auch auf die ROS-Produktion in den COX-Assemblierungs-Mutanten übertragbar ist. Neben der vermehrten Produktion kommt so möglicherweise auch eine beeinträchtigte Entgiftung zum tragen, die den oxidativen Stress weiter erhöht.

Ebenfalls sekundär zu den Deletionen könnte es in den COX-Assemblierungs-Mutanten auch zu einer Veränderung des Intermediärmetabolismus kommen. In Microarrayanalysen wurde für Antimycin A-behandelten Wildtyphefzellen und $[\text{rho}^0]$ -Zellen bereits gezeigt, dass aufgrund einer respiratorischen Inkompetenz eine Veränderung des Metabolismus eintritt. Dieser Prozess wird als retrograde Antwort bezeichnet, weil sich der funktionelle Zustand der Mitochondrien direkt auf nukleäre Prozesse auswirkt (Butow & Avadhani, 2004). Insbesondere Gene, die peroxisomale Proteine kodieren, wurden verstärkt exprimiert, was eine vermehrte Peroxisomenbiogenese zur Folge hatte (Epstein *et al.*, 2001). Dies stimmt mit früheren Untersuchungen überein, die als Antwort auf respiratorische Defekte eine 30-40fach erhöhte Expression der peroxisomalen Citratsynthase Cit2 zeigten (Liu & Butow, 1999). Bei einem Defekt der Atmungskette erliegt auch der Tricarbonsäurezyklus (Succinat kann nicht zu Fumarat oxidiert werden) und es fehlen Metabolite, die unter anderem für die Aminosäure- und Nukleotidbiosynthese benötigt werden (z. B. Oxalacetat, α -Ketoglutarat). Die induzierten peroxisomalen Stoffwechselwege, insbesondere Enzyme des Glyoxylat-Zyklus, sollen diesen Mangel ausgleichen (Epstein *et al.*, 2001; Butow & Avadhani, 2004). Inwieweit diese Prozesse die zelluläre ROS-Akkumulation verstärken ist unklar. Ein zusätzlicher Beitrag zur

ROS-Produktion ist jedoch unwahrscheinlich, da ansonsten alle [*rho*⁰]-Stämme erhöhte ROS-Konzentrationen aufweisen müssten, was nicht der Fall ist. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass das notwendige Übergewicht an metabolischer Tätigkeit in den Peroxisomen möglicherweise die peroxisomale Antwort auf die in der gesamten Zelle entstehenden ROS (Schrader & Fahimi, 2006) leicht beeinträchtigt. Bei gleichzeitig mitochondrialer ROS-Produktion, wie in den vorliegenden COX-Assemblierungs-Mutanten, könnte dies ausreichen, um wiederum das Ungleichgewicht zwischen Produktions- und Abbaurate zu verschieben.

Die primäre Ursache der beobachteten respiratorischen Inkompetenz in den vorliegenden Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 ist die Cytochrom *c* Oxidase-Fehlfunktion, durch die der Elektronentransport gestört wird. Sekundär entstehen dadurch vermehrt ROS, deren Produktion sich selbst verstärkt. Parallel beeinträchtigt der durch den respiratorischen Defekt bestehende Energiemangel den ROS-Abbau. So kommt es zu einer verstärkten ROS-Akkumulation, die gravierende zelluläre Schädigungen hervorruft.

3.2 Studien zur mitochondrialen Morphogenese

Mitochondrien sind Schlüsselkomponenten zahlreicher physiologischer Prozesse. Deshalb beinhaltet die mitochondriale Biogenese nicht nur die Bildung und den Erhalt einer funktionellen Atmungskette, die im vorangehenden Kapitel beschrieben sind. Eine zentrale Rolle nimmt auch die mitochondriale Morphogenese ein, die eine Anpassung der Mitochondrien an die jeweiligen zellulären Gegebenheiten ermöglicht. Teilbereiche dieses Prozesses wurden im Folgenden untersucht.

3.2.1 Identifizierung von Wechselwirkungspartnern der mitochondrialen Innenmembranteilungskomponente Mdm33

Als einzige Komponente der mitochondrialen Innenmembranteilung wurde bisher Mdm33 identifiziert (Messerschmitt *et al.*, 2003). Über genetische Interaktion sollten Wechselwirkungspartner dieses Proteins gefunden werden. Die Überexpression von *MDM33* führt in Wildtyphefenzellen zu Letalität und Fragmentierung von Mitochondrien (Messerschmitt *et al.*, 2003). Wenn wichtige Interaktionspartner, z. B. durch Deletion, fehlen, sollten die Letalität und die mitochondriale Fragmentierung aufgrund einer unterbrochenen Mdm33-Wirkkaskade abgeschwächt oder verhindert werden. *MDM33* wurde deshalb in Deletionsstämmen überexprimiert. Positive Stämme wurden anhand von Lebensfähigkeit und Erhalt wildtypischer mitochondrialer Strukturen identifiziert.

Für die Durchmusterung wurde ausgehend von der ~4800 Hefestämme umfassenden *MAT α* -Deletionsbibliothek (BioCat, Heidelberg; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006) eine Auswahl an Mutanten zusammengestellt. Von Interesse waren dabei hauptsächlich Stämme, deren deletierte Gene für Proteine mit mitochondrialer Lokalisation und unbekannter Funktion kodieren. Als Grundlage für die Auswahl dienten die Ergebnisse der LCMS-basierenden mitochondrialen Proteomanalyse von Sickmann *et al.* (2003) und die Datenbanken *Saccharomyces* Genome Database (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) und Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD; Güldener *et al.*, 2005). So wurden 123 Proteine mit mitochondrialer Lokalisation und unbekannter Funktion ausgewählt. Zusätzlich wurden sieben Komponenten mit unbekannter Funktion und Lokalisation, sowie 19 mitochondriale Proteine mit bekannter Funktion ausgesucht. Dabei wurden hauptsächlich Innenmembrankomponenten verwendet, die sich in räumlicher Nähe zu Mdm33 befinden sollten. Des Weiteren wurden 15 Morphologiekomponenten hinzugefügt, um die Überexpression von *MDM33* in die Prozesse der mitochondrialen Fusion, Teilung und

Tubulation einzuordnen. Insgesamt wurden 164 Stämme für die Überexpressionsanalyse ausgewählt (Tab. A7) und zusammen mit dem isogenen Wildtypstamm BY4742 untersucht.

Nach Transformation mit dem galaktoseinduzierbaren Überexpressionsplasmid pYX223-GAL-MDM33 (Messerschmitt *et al.*, 2003) bzw. dem leeren Referenzplasmid pYX223 (Novagen, Darmstadt) und dem Plasmid pVT100U-mtGFP (Westermann & Neupert, 2000) wurden sowohl das Wachstumsverhalten als auch die mitochondriale Morphologie aller Stämme auf SGal-Medium (Minimalmediumplatten mit Galaktose als Kohlenstoffquelle) untersucht.

3.2.1.1 Beurteilung des Wachstums bei Überexpression von *MDM33*

Die galaktoseinduzierte Überexpression von *MDM33* führt in Wildtypzellen zu einem Wachstumsarrest (Messerschmitt *et al.*, 2003; siehe auch Abb. 3-12 A). Ein erster Überblick über ihren Einfluss auf das Wachstumsverhalten der 164 Testkandidaten sollte durch semiquantitative Wachstumsanalysen gewonnen werden. Hierzu wurden jeweils gleichbleibende Mengen Zellmaterial strichförmig auf SGal-Platten ausgebracht und das Wachstum nach drei Tagen Inkubation in die vier Stufen +++, ++, + und --- (Abb. 3-11) eingeteilt, wobei +++ das stärkste und --- das schwächste vorkommende Wachstum beschrieb. Für jede Mutante wurden mit dem leeren und dem Überexpressionsplasmid transformierte Varianten verwendet und deren relatives Wachstum zueinander beurteilt. Dabei wurde unterschieden zwischen (1) Wachstumsverschlechterung durch Überexpression, (2) Wachstumsdefekt auf SGal bereits mit leerem Plasmid und (3) gleichbleibendem Wachstum trotz Überexpression. Als „positiv“ gewertet wurden Stämme der dritten Gruppe. Insgesamt konnten dadurch 14 Deletionsmutanten als überexpressionstolerant identifiziert werden (Tab. A8).

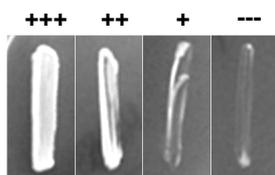


Abbildung 3-11: Semiquantitative Analysen zur Erfassung des Wachstums bei Überexpression von *MDM33*. Das Wachstum der Hefezellen wurde in die vier Stufen +++, ++, + und --- eingeteilt, wobei +++ das stärkste und --- das schwächste vorkommende Wachstum beschreibt.

Um die Ergebnisse für die potentiell interessanten Kandidaten zu verifizieren, wurden Tüpfeltests durchgeführt. Dadurch sollte die Kompensationsintensität genauer erfasst werden. Hierzu wurden serielle Verdünnungen von Zellkulturen mit leerem und Überexpressionsplasmid auf SD- (Minimalmediumplatten mit Glukose als Kohlenstoffquelle) und SGal-Platten getropft (Abb. A1). Die ersten Befunde aus den semiquantitativen Vortests konnten

durch die Tüpfeltests nur bedingt bestätigt werden. Keine der untersuchten Mutanten zeigte bei Überexpression gleichbleibend gutes oder verbessertes Wachstum. Gemäß ihres Wachstumsverhaltens mit dem leeren Plasmid wurden die Stämme $\Delta ydr493w$, $\Delta yer017c$, $\Delta yil157c$ und $\Delta ynl168c$ deshalb als allgemein wachstumsbeeinträchtigt auf SGal (Gruppe 2) identifiziert und die verbleibenden fünf Stämme wurden Gruppe (1) – Wachstumsverschlechterung bei Überexpression – zugeordnet.

Allerdings konnten mit $\Delta ybr039w$, $\Delta ydr061w$, $\Delta ygl080w$, $\Delta ylr091w$ und $\Delta yml030w$ fünf Stämme detektiert werden, bei denen die überexprimierenden Zellen zumindest eine Stufe besser wuchsen als entsprechende Wildtypzellen (Abb. 3-12 A). Unter zusätzlicher Berücksichtigung der Tüpfeltests ergab sich aus den semiquantitativen Wachstumsanalysen bei Überexpression von *MDM33* die in Abb. 3-12 B dargestellte Gesamtverteilung. Für den Großteil der untersuchten Stämme (143 = 87%) wurde ein wildtypanaloger Wachstumsdefekt festgestellt und 10% der Stämme (=16) wiesen einen allgemeinen Defekt auf SGal-Medium auf. Die fünf Deletionen $\Delta ybr039w$ ($\Delta atp3$), $\Delta ydr061w$, $\Delta ygl080w$, $\Delta ylr091w$ und $\Delta yml030w$ bewirkten eine leichte Kompensation des Wachstumsdefekts bei Überexpression von *MDM33* und stellen damit mögliche genetische Interaktionspartner von Mdm33 dar (Tab. 3-5).

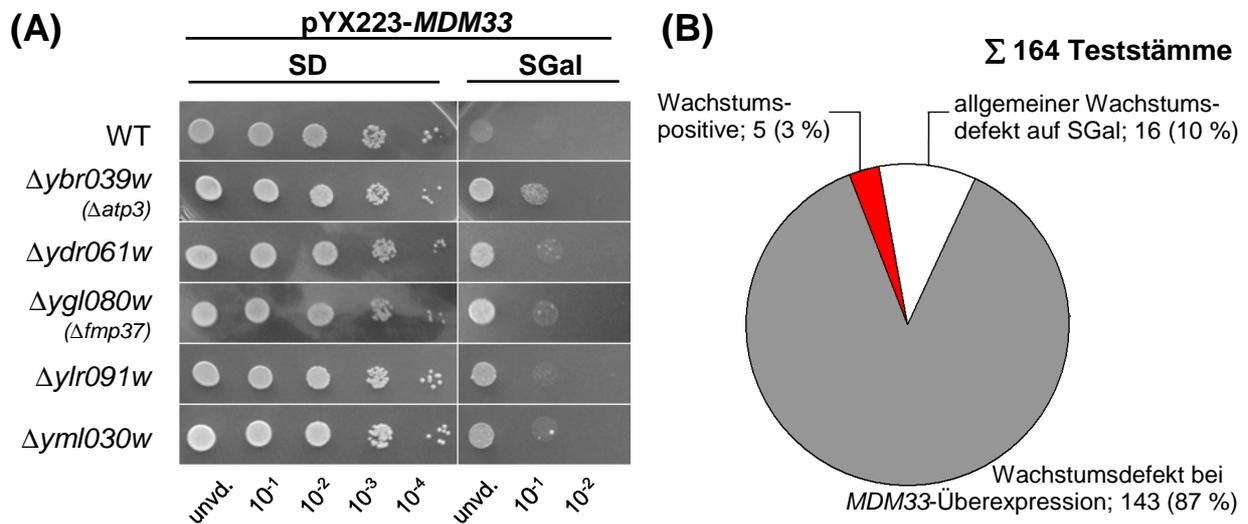


Abbildung 3-12: Wachstum bei Überexpression von *MDM33*. (A) Analyse des Wachstums mittels Tüpfeltests. Von Zellkulturen, die über Nacht in SD-Medium bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 angezogen worden waren, wurden serielle Verdünnungen auf SD- und SGal-Platten aufgetropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. Fünf Deletionsstämme zeigen bei Überexpression von *MDM33* leicht besseres Wachstum als der überexprimierende Wildtyp. (B) Gesamtverteilung der Wachstumsphänotypen. Erfasst wurden eine Verschlechterung des Wachstums bei Überexpression (grau), ein allgemeiner Wachstumsdefekt auf SGal (weiß) und verbessertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp bei Überexpression (rot).

Die Detektion der Deletionsmutante $\Delta atp3$ ($\Delta ybr039w$) ist wahrscheinlich nicht die Folge einer spezifischen Interaktion von Atp3 und Mdm33, sondern eines sekundären Effekts. Atp3

ist die γ -Untereinheit des F_1 -Sektors der ATP-Synthase und stellt zusammen mit der Untereinheit ϵ als *central stalk* die Verbindung zwischen dem F_0 - und dem F_1 -Sektor her. In $\Delta atp3$ -Mutanten wurde eine gravierende Destabilisierung des gesamten F_1 -Sektors beobachtet (Paul *et al.*, 1994), was zum Verlust der ATPase-Funktion führt. In Abwesenheit einer funktionellen Elektronentransportkette und/oder eines funktionellen ATP-Synthasekomplexes wird das essentielle elektrische Potential der inneren Mitochondrienmembran durch den Austausch von ATP gegen ADP mittels Adenin Nukleotid Translokator aufgebaut. Der entscheidende Schritt dieses Prozesses ist die Umwandlung von ATP zu ADP in der mitochondrialen Matrix, wobei wahrscheinlich der F_1 -Sektor der ATP-Synthase benötigt wird (Smith & Thorsness, 2005). In der vorliegenden $\Delta atp3$ -Deletionsmutante ist dieser Vorgang deshalb stark beeinträchtigt. Die mangelnde Energetisierung der Membran wiederum wirkt sich negativ auf den mitochondrialen Proteinimport (Truscott *et al.*, 2001) und auch die mitochondriale Fusion aus (Meeusen *et al.*, 2004). Dadurch kommt es zu einer gravierenden Fehlstrukturierung und Fehlfunktion der Mitochondrien (fluoreszenzmikroskopisch ist eine Fragmentierung sichtbar; Tab. A10), die möglicherweise auch durch die *MDM33*-Überexpression nicht weiter verschlechtert werden kann. Allerdings gelangt auch *Mdm33* aufgrund des Importdefekts eventuell nur eingeschränkt in die Mitochondrien, sodass der überexpressionsspezifische Wachstumsdefekt vermindert eintritt. Aufgrund der deletionsbedingten Defekte ist das Wachstum der Mutante $\Delta atp3$ auf SGal von vorne herein auch ohne Überexpression stark beeinträchtigt (nur +) und die Überexpression kann nur bedingt einen zusätzlichen negativen Einfluss auf das Wachstum ausüben. Das Wachstum nimmt nur leicht ab. Dadurch aber erscheint das Wachstum bei Überexpression im Vergleich zum Wildtyp verbessert, wo ein Wachstumsarrest eintritt.

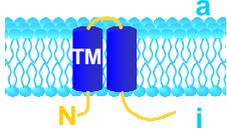
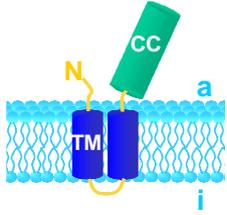
Als potentielle Wechselwirkungspartner von *Mdm33* bleiben also die vier uncharakterisierten Proteine *Ydr061w*, *Ygl080w*, *Ylr091w* und *Yml030w*, die laut GFP-Fusionsstudien (Huh *et al.*, 2003) und Proteomanalysen (Sickmann *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2006) mitochondrial lokalisiert sind (Tab. 3-5). Für ein besseres Verständnis wurden Datenbankrecherchen und bioinformatische Analysen vorgenommen. Die Kandidatenproteine sind zwischen ~15 und 61 kDa groß (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) und bilden mit Ausnahme von *Ygl080w* vermutlich Coiled-coil-Strukturen aus (Lupas *et al.*, 1991). Über diese Motive wären Wechselwirkungen mit anderen Proteinen inklusive *Mdm33* denkbar. Durch Hydrophathieanalysen (Hofmann & Stoffel, 1993) wurden für *Ygl080w* und *Yml030w* jeweils zwei Transmembranbereiche vorhergesagt, sodass es sich bei ihnen wahrscheinlich um integrale

Membranproteine handelt. Ydr061w besitzt darüber hinaus eine nukleotid-bindende Domäne (NBD) mit Ähnlichkeit zu einem ABC-Motiv (Finn *et al.*, 2008). Allerdings fehlen Transmembrandomänen, wie sie in klassischen ABC-Transportern zu finden sind. Damit ähnelt Ydr061w den transmembranbereichslosen ABC-Motiv-Proteinen Yef3 bzw. Gcn20, die im Cytosol als Translationselongationsfaktor bzw. Translationsregulator fungieren (Bauer *et al.*, 1999). Eine wichtige Rolle von Ydr061w in der mitochondrialen Translation ist jedoch unwahrscheinlich, zumal die Deletionsmutante respiratorische Kompetenz aufweist. Rückschlüsse auf die Funktion von Ydr061w sind also nicht möglich.

Ylr091w wurde im ersten Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit als Komponente identifiziert, die essentiell für den Erhalt mitochondrialer DNA ist, und als Rrg5 (*required for respiratory growth*) bezeichnet (3.1.2.2). Die doppelte Detektion im Rahmen dieser Arbeit zeigt eine große Bedeutung dieses Proteins für die mitochondriale Biogenese. Darüber hinaus wurde *YLR091w* kürzlich in einem Screen nach genetischen Interaktionspartnern der Prohibitine erfasst (Osman *et al.*, 2009). Die Prohibitine Phb1 und Phb2 sind zwei homologe Proteine, die in multimeren, hochmolekularen ringförmigen Komplexen in der mitochondrialen Innenmembran vorliegen und regulatorische Funktionen im Rahmen der Zellproliferation sowie der Dynamik und Funktion von Mitochondrien einnehmen. Weiterführende Untersuchungen zur Δ *ylr091w*-Mutante zeigten eine veränderte Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen und insbesondere der Anteil an Cardiolipin (CL) und Phosphatidylethanolamin (PE) war deutlich reduziert. Beides sind Phospholipide mit großer Bedeutung für die mitochondriale Struktur und Integrität (Osman *et al.*, 2009). Dementsprechend wurden in der Deletionsmutante veränderte Mitochondrien beobachtet (fluoreszenzmikroskopisch war eine Fragmentierung sichtbar; Tab. A10). Mdm33 ist ein integrales Innenmembranprotein und seine mögliche Rolle als Innenmembranteilungskomponente (Messerschmitt *et al.*, 2003) erfordert eine Umstrukturierung der Membran. Möglicherweise beeinträchtigt die veränderte Lipidzusammensetzung und die damit veränderten Eigenschaften der Membran die Funktionalität von Mdm33.

Die in Tab. 3-5 enthaltenen schematischen Darstellungen fassen die vorhergesagten Strukturmodelle zusammen. Ylr091w ist pilzspezifisch, zu den anderen drei Proteinen existieren Homologe in Pflanzen und/oder Tieren (PSI-BLAST über SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002). Eine Zusammenfassung der Datenbankrecherchen und Strukturvorhersagen ist Tab. A9 zu entnehmen.

Tabelle 3-5: Fünf Hefestämme zeigten eine leichte Kompensation des Wachstumsdefekts bei Überexpression von *MDM33*.

Systematischer Name	Standardname und zelluläre Funktion des Genprodukts	Bioinformatisch vorhergesagte Struktur motive
<i>YBR039w</i>	<i>ATP3</i> , Untereinheit γ des F_1F_0 -ATP-Synthase	nicht dargestellt
<i>YDR061w</i>	mitochondriales ^{1,3} Protein unbekannter Funktion	
<i>YGL080w</i>	<i>FMP37</i> , mitochondriales ^{1,2,3} Protein unbekannter Funktion	
<i>YLR091w</i>	<i>RRG5</i> , mitochondriales ^{1,2,3} Protein; mögliche Beteiligung am mtDNA-Erhalt	
<i>YML030w</i>	<i>AIM31</i> , mitochondriales ^{1,2,3} Protein unbekannter Funktion	

Angegeben sind der systematische und der Standardname der entsprechenden deletierten Gene sowie Funktionen der Genprodukte und durch bioinformatische Analysen erhaltene Struktur motive der bisher uncharakterisierten Proteine, wie Coiled-coil-Domänen (CC; Lupas *et al.*, 1991), Transmembrandomänen (TM; Hofmann & Stoffel, 1993) und die in *Ydr061w* enthaltene ABC-Transporterdomäne (Finn *et al.*, 2008). Die wahrscheinliche Membranorientierung ist durch a (Membranaußenseite) und i (Membraninnenseite) gekennzeichnet. Es ist unbekannt in welcher der beiden mitochondrialen Membranen die Proteine lokalisiert sind. Die N-Termini sind mit N markiert. Mitochondrial: Aussage aus GFP-Fusionsstudien nach ¹Huh *et al.* (2003) und/oder aus Proteomanalysen nach ²Sickmann *et al.* (2003) und ³Reinders *et al.* (2006). AIM: *altered inheritance rate of mitochondria*; FMP: *found in mitochondrial proteome*; RRG: *required for respiratory growth*.

3.2.1.2 Mitochondriale Morphologie bei Überexpression von *MDM33*

Zusätzlich zur Wachstumsbeeinträchtigung tritt bei Überexpression von *MDM33* auch eine Zerstörung des mitochondrialen Netzwerkes auf. In Wildtyp- und $\Delta mdm33$ -Zellen bewirkt die galaktoseinduzierte Überexpression von *MDM33* eine Fragmentierung und Aggregation von Mitochondrien (Messerschmitt *et al.*, 2003; vgl. Abb. 3-14 A). Auch hier sollte das Fehlen eines *Mdm33*-Wechselwirkungspartners zur Kompensation des Überexpressionsdefekts führen. Deshalb wurde als weiterer Parameter die Mitochondrienmorphologie der Teststämme untersucht. Für die Beurteilung der Organellenmorphologie wurden Stämme verwendet, die

neben pYX223 bzw. pYX223-*GAL-MDM33* auch mit pVT100U-*mtGFP* transformiert waren. Dieses Plasmid exprimiert GFP mit mitochondrialer Präsequenz und ruft damit eine stabile mitochondriale Fluoreszenzfärbung hervor. Die Anzucht der Zellen erfolgte unter Selektionsdruck auf SGal-Minimalmedium, um einen Verlust des Überexpressionsplasmids zu verhindern. Die mitochondriale Morphologie mit und ohne Überexpression wurde für jeden Stamm im Vergleich zueinander beurteilt. Dabei wurde unterschieden zwischen (1) Fragmentierung/Aggregation durch Überexpression, (2) bereits mit leerem Plasmid überexpressionsähnliche Mitochondrien und (3) Präsenz wildtypischer Mitochondrien trotz Überexpression. Jeder Stamm wurde für ein zuverlässiges Ergebnis in mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten untersucht. Daraus ergab sich die in Abb. 3-13 dargestellte Gesamtverteilung.

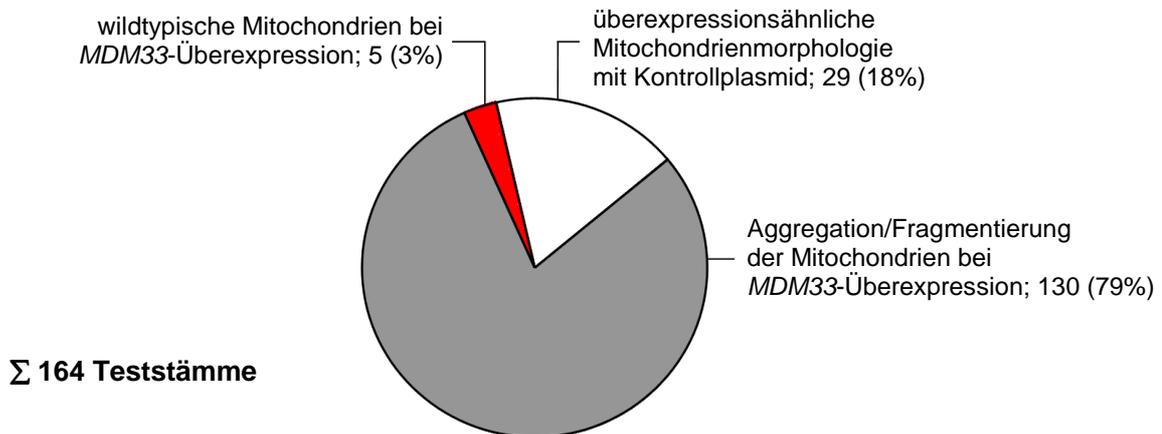


Abbildung 3-13: Verteilung der mitochondrialen Morphologie bei Überexpression von *MDM33*. Unterschieden wurden überexpressionsähnliche Mitochondrienmorphologie (=fragmentiert, aggregiert oder sphärisch) bereits mit Kontrollplasmid, d.h. ohne Überexpression von *MDM33* (weiß), *MDM33*-überexpressionsbedingte Fragmentierung/Aggregation von Mitochondrien (grau) und partieller Erhalt wildtypischer, tubulärer Mitochondrien bei *MDM33*-Überexpression (rot).

Der Großteil der 164 Teststämme verhielt sich analog zum Wildtyp bzw. zur $\Delta m d m 3 3$ -Mutante und zeigte eine überexpressionsbedingte Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien (Abb. 3-14 A und B). Darunter waren auch Deletionsmutanten mitochondrialer Morphologiekomponenten, bei denen ein Übergang von netz- (z. B. $\Delta f i s 1$) oder nestartigen (z. B. $\Delta n u m 1$), tubulären Strukturen zum Überexpressionsphänotyp erfolgte (Abb. 3-14 C).

Darüber hinaus besaßen 18% der Stämme (=29) bereits ohne Überexpression fragmentierte, aggregierte oder sphärische, also überexpressionsähnliche Mitochondrien (Abb. 3-14 D). Für sieben Deletionen war dies bereits bekannt, zumal die jeweils fehlenden Proteine der mitochondrialen Fusions- bzw. Tubulationsmaschinerie zuzuordnen sind: Fzo1

(Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998), Mdm30 (Fritz *et al.*, 2003), Mgm1 (Wong *et al.*, 2000) bzw. Mmm1 (Burgess *et al.*, 1994), Mdm12 (Berger *et al.*, 1997), Mdm31 und Mdm32 (Dimmer *et al.*, 2005) (Übersicht in Okamoto & Shaw, 2005; Merz *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Durch weiterführende Analysen (Daten nicht gezeigt) konnten für die übrigen 22 Deletionsmutanten sekundäre Effekte als Ursachen der mitochondrialen Fragmentierung ermittelt werden.

Als „positive“ Kandidaten gewertet wurden wiederum Stämme der dritten Gruppe, die nach Überexpression zu einem höheren Prozentsatz als der Wildtyp (>6,2%) tubuläre Mitochondrien aufwiesen. Mit $\Delta ybr163w$, $\Delta yer004w$, $\Delta mdv1$, $\Delta ylr356w$ und $\Delta yml030w$ wurden fünf Kandidaten identifiziert, die mit einem Anteil von 16,3% bis 50,2% dieses Kriterium erfüllten (Abb. 3-14 E bis I; Tab. 3-6). Darunter waren auch der Deletionsstamm $\Delta yml030w$, der bereits in den Wachstumsanalysen bei Überexpression gefunden wurde, und der Deletionsstamm $\Delta mdv1$, dem eine Komponente der mitochondrialen Teilungsmaschinerie fehlt. In einer zweiten Transformation der fünf Stämme konnten die mitochondrialen Befunde reproduziert werden. Es handelt sich also um spezifische Effekte.

Tabelle 3-6: Fünf Deletionsstämme können die Überexpression von *MDM33* teilweise kompensieren und besitzen zu einem vermehrten Prozentsatz wildtypische Mitochondrien.

Systematischer Name	Standardname und zelluläre Funktion des Genprodukts	mt Morphologie; Anteil der Zellen in (%)	
		tubulär	fragm.-aggr.
<i>YBR163w</i>	<i>DEM1</i> ; mitochondriales Protein unbekannter Funktion	16,7	83,3
<i>YER004w</i>	<i>FMP52</i> ; mitochondriales ⁴ Außenmembranprotein unbekannter Funktion	16,3	83,7
<i>YJL112w</i>	<i>MDV1</i> ; peripheres mitochondriales Außenmembranprotein; mitochondriale Teilung und Erhalt der mitochondrialen Morphologie	50,2	49,8
<i>YLR356w</i>	mitochondriales ¹ Protein unbekannter Funktion	19,0	81,0
<i>YML030w</i>	<i>AIM31</i> ; mitochondriales ^{1,2,3} Protein unbekannter Funktion	23,9	76,1
Wildtyp BY4742	Kontrollauszählung	6,2	93,8

Angegeben sind systematische und Standardnamen der entsprechenden Gene sowie Funktionen der Genprodukte und die quantitative Erfassung der Mitochondrienmorphologie nach Überexpression von *MDM33*. Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C in SGal-Medium angezogen. Auszählungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten vorgenommen, wobei jeweils n>100 Zellen bewertet wurden. Ohne Überexpression lagen in allen Fällen ~95% tubuläre, wildtypische Mitochondrien bzw. für $\Delta mdv1$ die deletonsspezifischen engmaschigen Netze vor. Im Fall von $\Delta mdv1$ sind in „tubulär“ auch 13,9% der deletonsspezifischen engmaschigen Netze enthalten. Mitochondrial: Aussage aus GFP-Fusionsstudien nach ¹Huh *et al.* (2003) und Proteomanalysen nach ²Sickmann *et al.* (2003), ³Reinders *et al.* (2006) und ⁴Zahedi *et al.* (2006). AIM: *altered inheritance rate of mitochondria*; DEM: *defects in morphology*; FMP: *found in mitochondrial proteome*; fragm.-aggr.: fragmentiert-aggregiert; MDV: *mitochondrial division*.

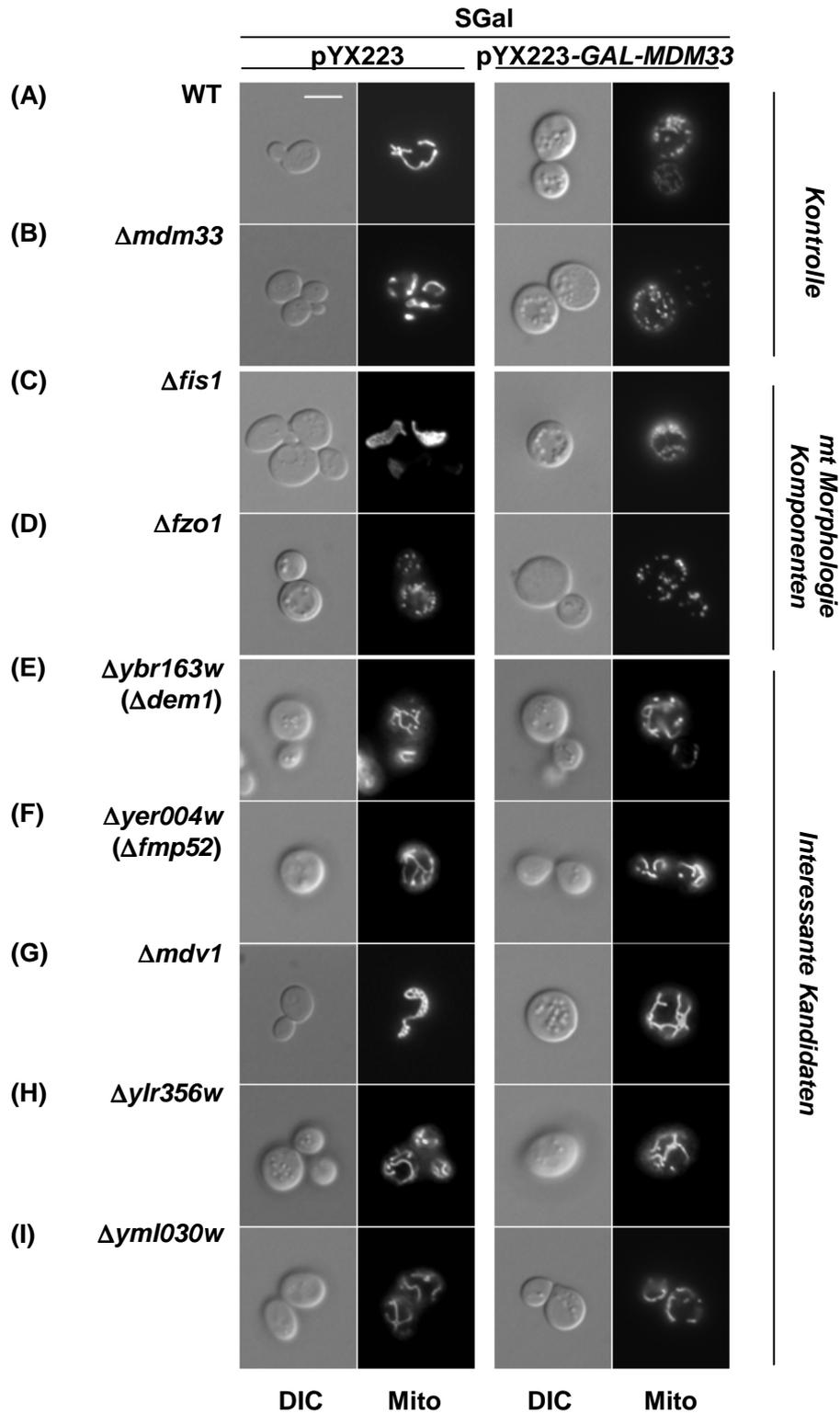


Abbildung 3-14: Mitochondriale Morphologie mit und ohne Überexpression von *MDM33*. Mit pYX223 bzw. pYX223-GAL-MDM33 und pVT100U-mtGFP transformierte Zellen wurden über Nacht bei 30°C in flüssigem SGal-Medium bis zur log arithmetischen Wachstumsphase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Jedes Bildpaar besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und einer Fluoreszenzaufnahme der mtGFP-gefärbten Mitochondrien (Mito). Der Größenbalken stellt 5 µm dar. In WT- und $\Delta mdm33$ -Zellen (A und B) kommt es, ebenso wie in der Teilungsmutante $\Delta fis1$ (C), zu einer überexpressionsbedingten Fragmentierung der Mitochondrien. In mt-fusionsinkompetenten $\Delta fzo1$ -Zellen (D) liegen bereits mit dem leeren Plasmid die mutationsspezifischen Mitochondrienfragmente vor. Die als interessant eingestuft Kandidatenstämme (E-I) weisen auch bei Überexpression zu einem bestimmten Anteil wildtypische Strukturen auf.

Durch die Analyse der mitochondrialen Morphologie bei Überexpression von *MDM33* wurden also insgesamt vier bisher uncharakterisierte Proteine (Ybr163w, Yer004w, Ylr356w und Yml030w) als mögliche funktionelle oder direkte Interaktionspartner von Mdm33 gefunden. Eine funktionelle Charakterisierung der entsprechenden Deletionsmutanten (siehe 3.2.2) sollte tiefere Einblicke in diese Beziehungen liefern.

Als *MDM33*-überexpressionstolerant wurde zudem die Deletionsmutante $\Delta mdv1$ identifiziert. Dieser Stamm zeigte mit 50,2% die deutlichste Kompensation der überexpressionsspezifischen Mitochondrienfragmentierung. Das fehlende Protein Mdv1 ist zwar aufgrund seiner Lage an der cytoplasmatischen Seite der Außenmembran sicherlich kein direkter Wechselwirkungspartner von Mdm33. Da es sich aber hierbei um eine Komponente der mitochondrialen Außenmembranteilungsmaschinerie handelt, kann ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Mdm33-Funktion und der Außenmembranteilung hergestellt werden. Dies stimmt mit Ergebnissen aus Doppeldeletionsstudien überein, in denen eine epistatische Beziehung von $\Delta mdm33$ zu $\Delta fis1$ gezeigt wurde, einem Gen, das ebenfalls für eine Komponente der Außenmembranteilungsmaschinerie kodiert (Messerschmitt *et al.*, 2003). Die Blockierung der Mdm33-Wirkung im vorliegenden $\Delta mdv1$ -Stamm legt nahe, dass die Tätigkeit der Außenmembranteilungsmaschinerie in die überexpressionsspezifische Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien involviert ist. Dieser Phänotyp ist charakteristisch für eine Verschiebung des Fusions-Teilungs-Gleichgewichts in Richtung Teilung und könnte durch eine Mdm33-stimulierte, vermehrte Aktivität der Außenmembranteilungsmaschinerie zustande kommen. Dies entspräche dem bestehenden Wirkmodell von Mdm33 als Innenmembranteilungskomponente, die *upstream* der Außenmembranteilungsmaschinerie durch Teilung und/oder *Constriction* der inneren Mitochondrienmembran eine Teilung der Außenmembran ermöglicht (Messerschmitt *et al.*, 2003). Eine vermehrte Expression von *MDM33* erhöht also die Frequenz der Innenmembranteilung/Bildung von *Constrictions* und zieht damit eine vermehrte Außenmembranteilung nach sich.

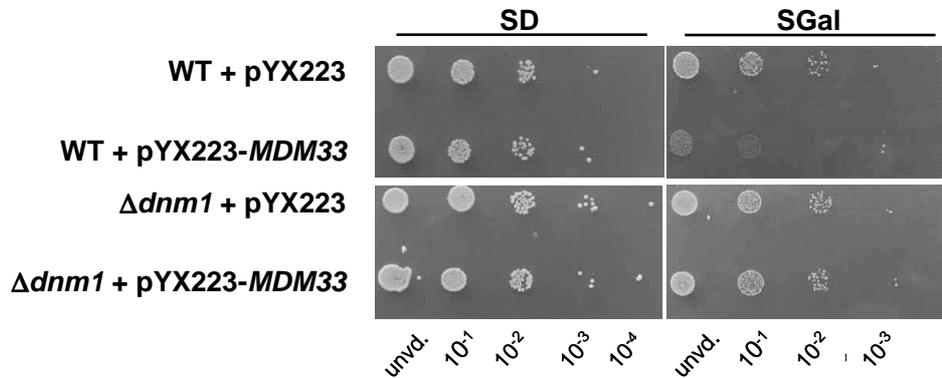
Die mitochondriale Außenmembranteilungsmaschinerie besteht aus dem Membrananker Fis1, den orthologen Adapterproteinen Mdv1 und Caf4 und der dynaminähnlichen GTPase Dnm1 (vgl. 1.6.2). Teilung wird letztendlich durch die Bildung mitochondrienumschließender Dnm1-Spiralen und mechanochemische Abschnürung des Mitochondrientubulus vermittelt (Ingerman *et al.*, 2005). Dafür ist die Aktivierung der Teilungskomplexe erforderlich, die vermutlich durch Mdv1 erfolgt (Naylor *et al.*, 2006). Die große *MDM33*-Überexpressionstoleranz von $\Delta mdv1$ -Mutanten lässt sich durch ein Fehlen dieser Aktivierung erklären. Die beobachtete Restteilungsaktivität (in 50% der Zellen Fragmentierung) wird

möglicherweise durch das Mdv1-Orthologe Caf4 vermittelt. Im Normalfall besitzen Caf4-enthaltende Teilungskomplexe keine Teilungsaktivität (Griffin *et al.*, 2005). Im Zusammenspiel mit der übermäßigen Mdm33-Funktion könnte jedoch trotzdem eine Dnm1-Spiralisierung mit anschließender Teilung möglich sein.

Auch die Deletionsstämme $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ wurden im Rahmen dieser Arbeit auf Überexpressionstoleranz hin untersucht. In beiden Fällen erfolgte keine Kompensation der Überexpression, was zunächst widersprüchlich erscheint. Im Fall von $\Delta fis1$ -Zellen findet allerdings eine stabile mitochondriale Restbindung von Mdv1 und Dnm1 statt (Jakobs *et al.*, 2003a). Im Überexpressionszustand könnte diese möglicherweise ausreichen, um eine mitochondriale Teilung und damit den beobachteten Überexpressionsphänotyp auszubilden. Überraschend war allerdings, dass bei Fehlen der Hauptteilungskomponente Dnm1 eine *MDM33*-überexpressionsbedingte Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien eintrat. Dies widerspricht dem bisherigen Verständnis der Teilungsmaschinerie. Denkbar ist, dass der zunächst verwendete Bibliotheksstamm falsch ist. Die Tatsache, dass bereits ohne Überexpression fragmentierte Mitochondrien vorlagen (Tab. A10), deutet darauf hin, zumal Mitochondrien in $\Delta dnm1$ -Zellen im Normalfall charakteristische engmaschige Netze ausbilden. Deshalb wurde ergänzend eine weitere $\Delta dnm1$ -Mutante (BY4743; homozygot diploid) bei Überexpression von Mdm33 untersucht. In Tüpfeltests wuchsen diese Zellen sowohl mit dem leeren Kontrollplasmid als auch mit dem Überexpressionsplasmid auf SGal-Medium bis zur letzten Verdünnungsstufe (Abb. 3-15). Darüber hinaus wurden auch im Überexpressionsfall annähernd 100% der deletionspezifischen, fischernetzähnlichen Mitochondrien erfasst (Abb. 3-15). Die Deletion der Teilungsschlüsselkomponente *DNM1* bewirkt also eine vollständige Kompensation der *MDM33*-Überexpressionswirkung und ist damit noch effektiver als die im Screen deutlichste Kompensationsleistung der $\Delta mdv1$ -Mutation (50% der Zellen mit tubulären Strukturen bei Überexpression). Dies stimmt mit dem essentiellen Charakter von Dnm1 in der Außenmembranteilung und der teilweise funktionellen Redundanz von Mdv1 und Caf4 überein. Die neuen Ergebnisse mit der zusätzlichen $\Delta dnm1$ -Mutante untermauern damit die im Zusammenhang mit Mdv1 diskutierten Punkte: (1) Der fluoreszenzmikroskopisch sichtbare *MDM33*-Überexpressionsphänotyp entsteht letztendlich durch vermehrte Aktivität der Außenmembranteilungsmaschinerie. (2) Die Funktion von Mdm33 beeinflusst also die Aktivität der Außenmembranteilungsmaschinerie, was (3) mit dem aktuellen Wirkmodell (Messerschmitt *et al.*, 2003) übereinstimmt. In Kapitel 3.2.3 wurden deshalb weitere Untersuchungen

vorgenommen, um den Einfluss von Mdm33 auf die Außenmembranteilungsmaschinerie zu erfassen.

(A)



(B)

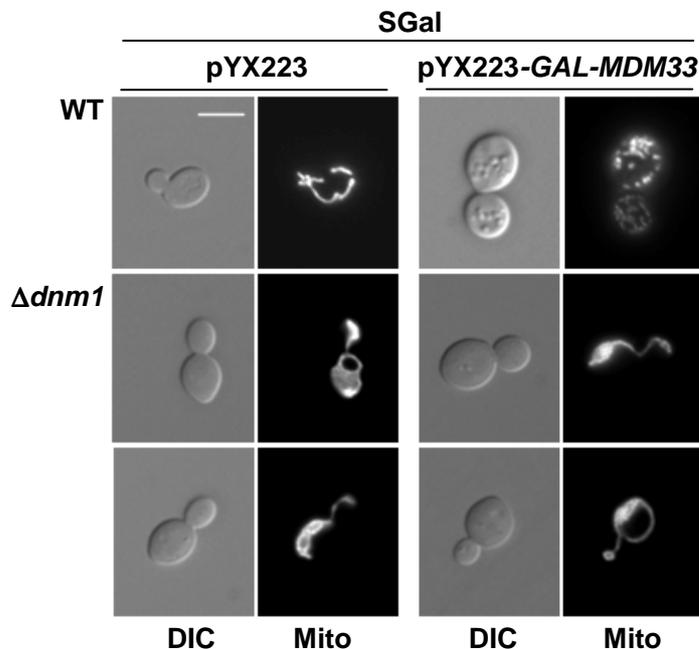


Abbildung 3-15: Die homozygot diploide $\Delta dnm1$ -Mutante kompensiert die *MDM33*-Überexpressionsdefekte. (A) Das Wachstum mit und ohne Überexpression auf SGal-Platten wurde mittels Tüpfeltests erfasst. Von Zellkulturen, die über Nacht in SD-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 1,0 angezogen worden waren, wurden serielle Verdünnungen auf SD- und SGal-Platten aufgetropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. Die Mutante zeigt im Gegensatz zum Wildtyp mit und ohne Überexpression gleichgutes Wachstum. **(B)** Mitochondriale Morphologie der Zellen mit und ohne Überexpression von *MDM33*. Jedes Bildpaar besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast- (DIC) und einer Fluoreszenzaufnahme der mtGFP-gefärbten Mitochondrien (Mito). Der Größenbalken stellt 5 μ m dar. Bei Überexpression von *MDM33* in Wildtypzellen (pYX223-GAL-*MDM33*) werden die tubulären Netzwerke zerstört und es entstehen fragmentiert-aggregierte Mitochondrien. Die Deletion von *DNM1* unterbricht die Mdm33-Wirkkaskade, sodass sowohl vor als auch nach Überexpression die deletionsspezifischen fischernetzähnlichen Strukturen vorliegen.

Unter Berücksichtigung der Wachstumsanalysen und der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lieferte der gesamte überexpressionsbasierende Screen sieben bisher

uncharakterisierte Gene mit genetischer Beziehung zu *MDM33* (vier bei Beurteilung des Wachstums und vier bei Beurteilung der Mitochondrienstruktur, wobei ein Deletionsstamm in beiden Herangehensweisen detektiert werden konnte). Damit wurden vielversprechende Kandidaten für eine mögliche Interaktion mit der Innenmembranteilungskomponente Mdm33 gefunden. Über Mdv1 (und Dnm1) konnte darüber hinaus erneut ein Zusammenhang mit der Außenmembranteilungsmaschinerie hergestellt werden. Die überschaubare Anzahl an Positiven (<5% der untersuchten Stämme) beweist die Stringenz, und die Detektion von $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ die Spezifität des vorgenommenen genetischen Screens.

3.2.2 Untersuchung der *MDM33*-überexpressionstoleranten Stämme mit partiellem Erhalt von Wildtypmitochondrien

Durch die Wachstums- und Mitochondrienuntersuchungen bei Überexpression von *MDM33* wurden sieben bisher uncharakterisierte Gene identifiziert, die in genetischer Beziehung zu *MDM33* stehen und damit einen Wechselwirkungspartner der mitochondrialen Innenmembranteilungsmaschinerie kodieren könnten. Da sich im Zuge der mitochondrialen Analysen eine deutlichere Kompensation des *MDM33*-Überexpressionsdefekts zeigte, wurden zunächst diese Kandidatenstämme ($\Delta ybr163w$, $\Delta yer004w$, $\Delta ylr356w$ und $\Delta yml030w$) näher untersucht.

3.2.2.1 Besteht ein Zusammenhang zwischen der Kompensation des überexpressionsspezifischen Wachstums- und Mitochondriendefekts?

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Kompensation des Wachstums- und des Mitochondriendefekts bei Überexpression von *MDM33* besteht. Für den Deletionsstamm $\Delta yml030w$ scheint dies der Fall zu sein, da er sowohl bei Analyse des Wachstums als auch der Mitochondrienmorphologie bei Überexpression von *MDM33* gefunden wurde. Die übrigen Stämme mit partiell wildtypischen Mitochondrien bei Überexpression von *MDM33* zeigten in den bisher vorgenommenen semiquantitativen Analysen keine Verbesserung des Wachstums. Um dies noch einmal zu überprüfen, wurden serielle Verdünnungen von Transformanten mit leerem und Überexpressionsplasmid auf SD- und SGal-Platten getropft (Abb. 3-16).

Auf SD-Medium wuchsen der Wildtyp und alle Deletionsmutanten unabhängig vom enthaltenen Plasmid bis zur letzten Verdünnungsstufe. Das Gleiche galt unter induzierenden Bedingungen (SGal) für alle Stämme mit dem leeren Kontrollplasmid. Bei Überexpression von *MDM33* trat der spezifische Wachstumsarrest ein. Dieser war beim Wildtyp am stärksten

ausgeprägt. Wie bereits in den ersten durchgeführten Tüpfeltests (vgl. Abb. 3-12 A) zeigte $\Delta yml030w$ erneut eine leichte Kompensation und konnte um eine Verdünnungsstufe besser wachsen als der Wildtyp. Interessanterweise waren die übrigen getesteten Stämme $\Delta ybr163w$, $\Delta yer004w$ und $\Delta ylr356w$ im gleichen Maße in der Lage, die *MDM33*-Überexpression zu tolerieren. Auch für $\Delta mdv1$, der als weiterer Deletionsstamm mit WT-Mitochondrien bei Überexpression gefunden wurde, konnte eine entsprechende Wachstumskompensation detektiert werden (Abb. 3-16).

Die Wachstumsexperimente deuten darauf hin, dass ein partieller Erhalt der wildtypischen Mitochondrienstruktur auch eine Wachstumsverbesserung begünstigt. Der Umkehrschluss, dass alle Wachstumspositiven auch wildtypische Mitochondrien aufweisen, ist hingegen nicht gültig. In allen entsprechenden Deletionsstämmen lagen die Mitochondrien fragmentiert vor, was bei $\Delta ygl080w$ erst bei Überexpression und bei den anderen drei ($\Delta atp3$, $\Delta ydr061w$, $\Delta ylr091w$) schon vorher zu beobachten war (Tab. A10).

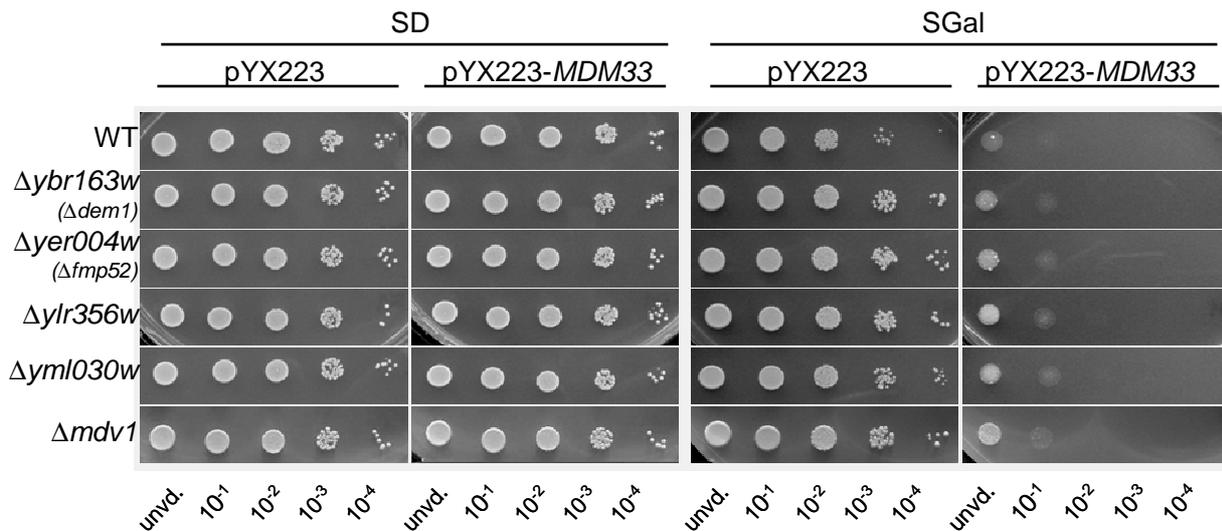


Abbildung 3-16: Die identifizierten Mutanten kompensieren bei *MDM33*-Überexpression zusätzlich zur mitochondrialen Fragmentierung auch den spezifischen Wachstumsarrest. Für das Erstellen von Tüpfeltests wurden von Zellkulturen, die über Nacht in SD-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 1,0 angezogen worden waren, serielle Verdünnungen auf SD- und SGal-Platten aufgetropft und zwei bzw. vier Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.2.2 Bioinformatische Analysen und Datenbankrecherchen

Strukturvorhersagen, Sequenzvergleiche und Datenbankrecherchen sollten erste Informationen über die in den Deletionsmutanten fehlenden mitochondrialen Proteine liefern. Daraus ging hervor, dass die Proteine zwischen ~18 und 68 kDa groß sind (SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002) und alle über mindestens eine Transmembrandomäne verfügen (Hofmann & Stoffel, 1993). Bei Lokalisation in der Innenmembran würde also eine räumliche Nähe zu

Mdm33 bestehen. Zudem könnten Yml030w und Ybr163w durch mögliche Coiled-coil-Strukturen (Lupas *et al.*, 1991) Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen (Abb. 3-17; Tab. A9). Zu Yer004w und Ylr356w existieren ausschließlich Pilzhomologe, wohingegen für Ybr163w und Yml030w auch Verwandte in Pflanzen und Tieren vorkommen (PSI-BLAST über SGD; Issel-Tarver *et al.*, 2002). Für ein tieferes Verständnis der Proteinfunktionen wurde im Folgenden eine funktionelle Charakterisierung der entsprechenden Deletionsstämme vorgenommen.

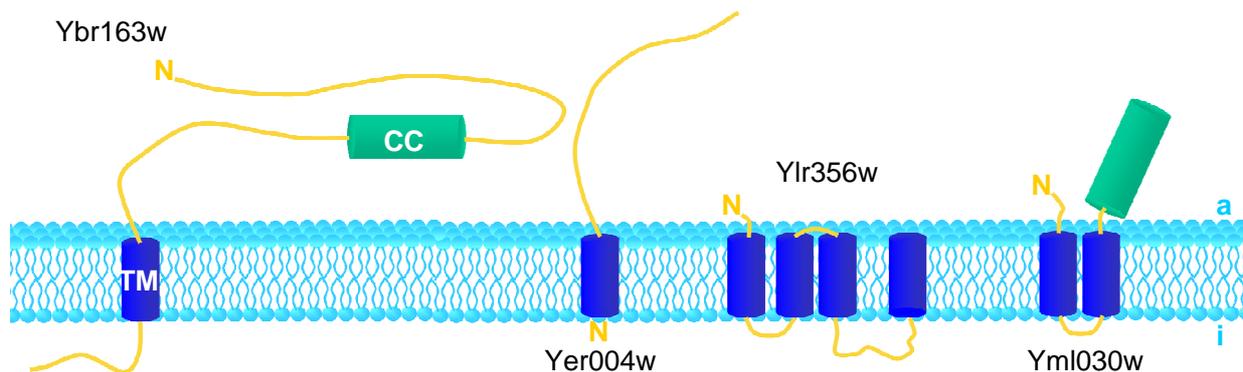


Abbildung 3-17: Strukturelle Eigenschaften der identifizierten Kandidatenproteine gemäß Vorhersage. Angegeben sind Strukturmodule, wie Coiled-coil-Domänen (CC; Lupas *et al.*, 1991) und Transmembrandomänen (TM; Hofmann & Stoffel, 1993). Die Membranorientierung ist durch a (Membranaußenseite) und i (Membraninnenseite) gekennzeichnet. Yer004w liegt in der Außenmembran (Zahedi *et al.*, 2006). Für die übrigen Proteine ist unbekannt, in welcher der beiden mitochondrialen Membranen sie lokalisiert sind.

3.2.2.3 Funktionelle Charakterisierung

Erfassung der mitochondrialen Morphologie auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Bei Deletion von *MDM33* kann das mitochondriale Netzwerk nicht mehr aufrechterhalten werden und es entstehen ring- und hohlkugelnähnliche Organellen. Im Zuge der Überexpressionsstudien zeigten die Deletionsstämme ohne Überexpression auf SGal-Medium keine veränderte mitochondriale Morphologie. Um dies umfassend zu klären, wurden mtGFP-exprimierende Zellen in Vollmedium auf drei verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose, Galaktose und Glycerin) fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Tab. 3-7). Als Hauptphänotyp waren dabei, unabhängig von der Kohlenstoffquelle, stets zwischen 94% und 99% tubuläre, wildtypische Mitochondrien vorhanden. Die übrigen morphologischen Ausprägungen können mit <3%, wie sie auch in Wildtypkulturen auftreten, als unauffällig vernachlässigt werden. Ring- oder Hohlkugelstrukturen wurden nie gefunden.

In Wildtypzellen konnten hierbei neben dem Zellkern (Abb. 3-19; weißer Pfeil) jeweils 10-20 mtDNA-Nukleotide detektiert werden (Abb. 3-19; roter Pfeil). Auch Zellen der untersuchten Deletionsstämme wiesen ausschließlich (>95%) wildtypisch erscheinende mtDNA auf. Sowohl hinsichtlich der Form, als auch der Größe und Verteilung der Nukleotide konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3-19). Die beobachteten respiratorischen Defekte sind also nicht auf einen Verlust oder eine Verminderung der mtDNA zurückzuführen. Allenfalls partielle Schädigungen oder Mutationen könnten als Ursache auf mtDNA-Ebene noch vorliegen. Diese wären durch Kreuzungsexperimente mit *Δmip1* (*mitochondrial DNA-polymerase*)-Zellen erfassbar (siehe 3.1). Alternativ könnte auch eine mögliche Fehlstrukturierung der Innenmembran und speziell der Cristae die dort lokalisierte Atmungskette beeinträchtigen. Aussagen darüber sollten über elektronenmikroskopische Studien gewonnen werden.

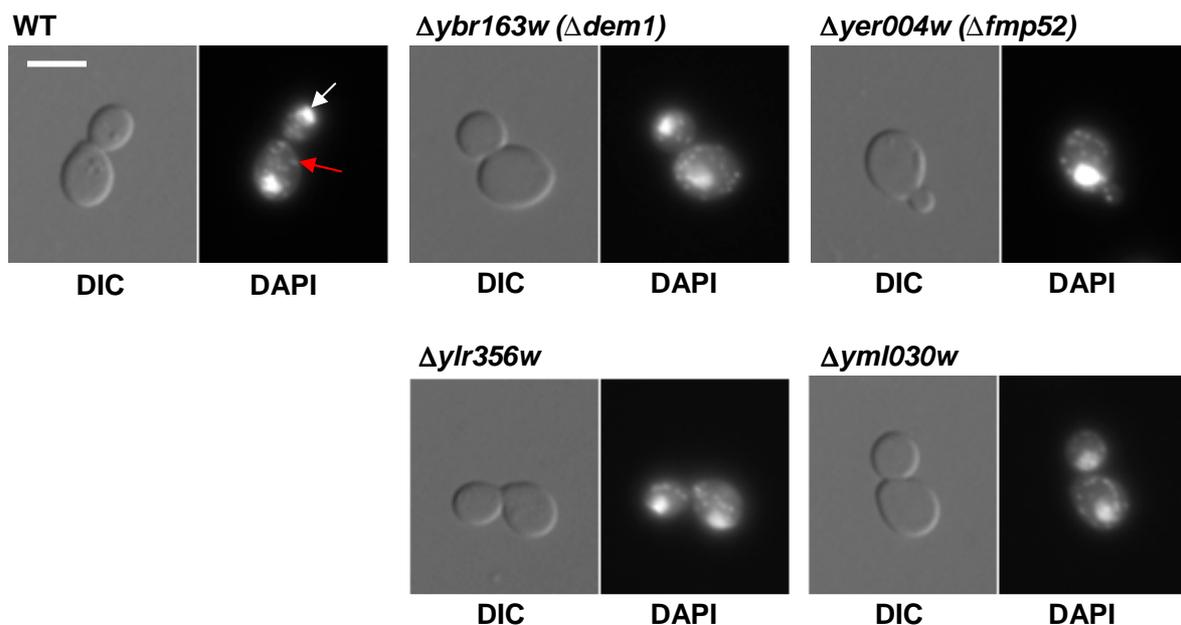


Abbildung 3-19: Alle Deletionsstämme besitzen wildtypisch strukturierte mtDNA. Zellen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und anschließend mit DAPI behandelt. Durch die Interkalation des Farbstoffs können das Kerngenom (weißer Pfeil) und die mtDNA-Nukleotide (roter Pfeil) fluoreszenzmikroskopisch erfasst werden. Zusätzlich zu den Fluoreszenzaufnahmen (DAPI) sind Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahmen (DIC) dargestellt. Der Größenbalken entspricht 5 µm. Alle mutanten Zellen besitzen ebenso wie der Vergleichswildtyp 10-20 Nukleotide.

3.2.2.4 Elektronenmikroskopische Erfassung der mitochondrialen Innenmembranstruktur ohne und mit Überexpression von *MDM33*

Neben der Klärung des respiratorischen Defekts existieren zwei weitere Indikationen, die elektronenmikroskopische Analysen notwendig machten. Zum einen liegen in den hohlkugel-

und ringähnlichen Mitochondrien von $\Delta mdm33$ -Zellen verlängerte Ausdehnungen der mitochondrialen Innen- und Außenmembran vor (Messerschmitt *et al.*, 2003). Diese ultrastrukturellen Besonderheiten könnten auch auftreten, wenn mögliche Mdm33-Wechselwirkungspartner fehlen. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten die identifizierten Deletionen alleine zwar keinerlei bzw. nur geringen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie, dennoch konnte damit nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass ultrastrukturelle Parallelen – eventuell in abgeschwächter Form – zum möglichen Wechselwirkungspartner vorliegen. Zum anderen führt die Überexpression von *MDM33* in Wildtypzellen zu veränderten Innenmembranstrukturen wie Septen oder Innenmembranvesikeln und zum Verlust der Cristae (Messerschmitt *et al.*, 2003). Bei einer durch Deletion des möglichen Wechselwirkungspartners blockierten Innenmembranteilung treten diese strukturellen Auffälligkeiten möglicherweise nicht oder nur in vermindertem Maße auf.

Für die Untersuchungen wurden Zellen der Deletionsstämmen verwendet, die neben pYX223 bzw. pYX223-*GAL-MDM33* auch mit pVT100U-mtGFP transformiert waren. Aufgrund des eintretenden Wachstumsarrests bei Überexpression von *MDM33* war es nötig, die Zellen bis zur erforderlichen Zelldichte von $OD_{600} = \sim 1,0$ in SD-Medium anzuziehen und erst danach für die Induktion in SGal-Medium zu überführen. Die Kulturen wurden 8-10 h induziert und nach fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle des Phänotyps (Überexpressionsphänotyp in Wildtypzellen als Referenz) in Kunstharz eingebettet. Ultradünnschnitte wurden elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 3-20).

In Wildtypzellen mit dem leeren Kontrollplasmid waren die Mitochondrien über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 3-20 A1) und wiesen reguläre Cristae- und Doppelmembranstrukturen auf (Abb. 3-20 A2 und 3; schwarze Pfeile). Auch in den untersuchten Deletionsstämmen mit Kontrollplasmid konnten keine aberranten Strukturen festgestellt werden. In allen Fällen lagen gleichmäßig verteilte Mitochondrien (exemplarisch für $\Delta ybr163w$ und $\Delta yml030w$ gezeigt; Abb. 3-20 C1 und G1) mit regelmäßigen Doppelmembranen und Cristae vor (Abb. 3-20 C2 und 3, E1 bis 3, F1 bis 3 und G2 bis 4). Bei Überexpression von *MDM33* entstanden in Mitochondrien von Wildtypzellen Septen und vesikuläre Innenmembraneinschlüsse (Abb. 3-20 B1 bis 3; rote und gelbe Pfeile). Auch in allen Deletionsmutanten kam es im gleichen Ausmaß zur Ausprägung dieses überexpressionsspezifischen Phänotyps. Exemplarisch sind für $\Delta ybr163w$ - und $\Delta yml030w$ -Zellen fehlstrukturierte Organellen mit mehrfachen Septen (rote Pfeile) gezeigt (Abb. 3-20 D1 bis 3 und H1 und 2).

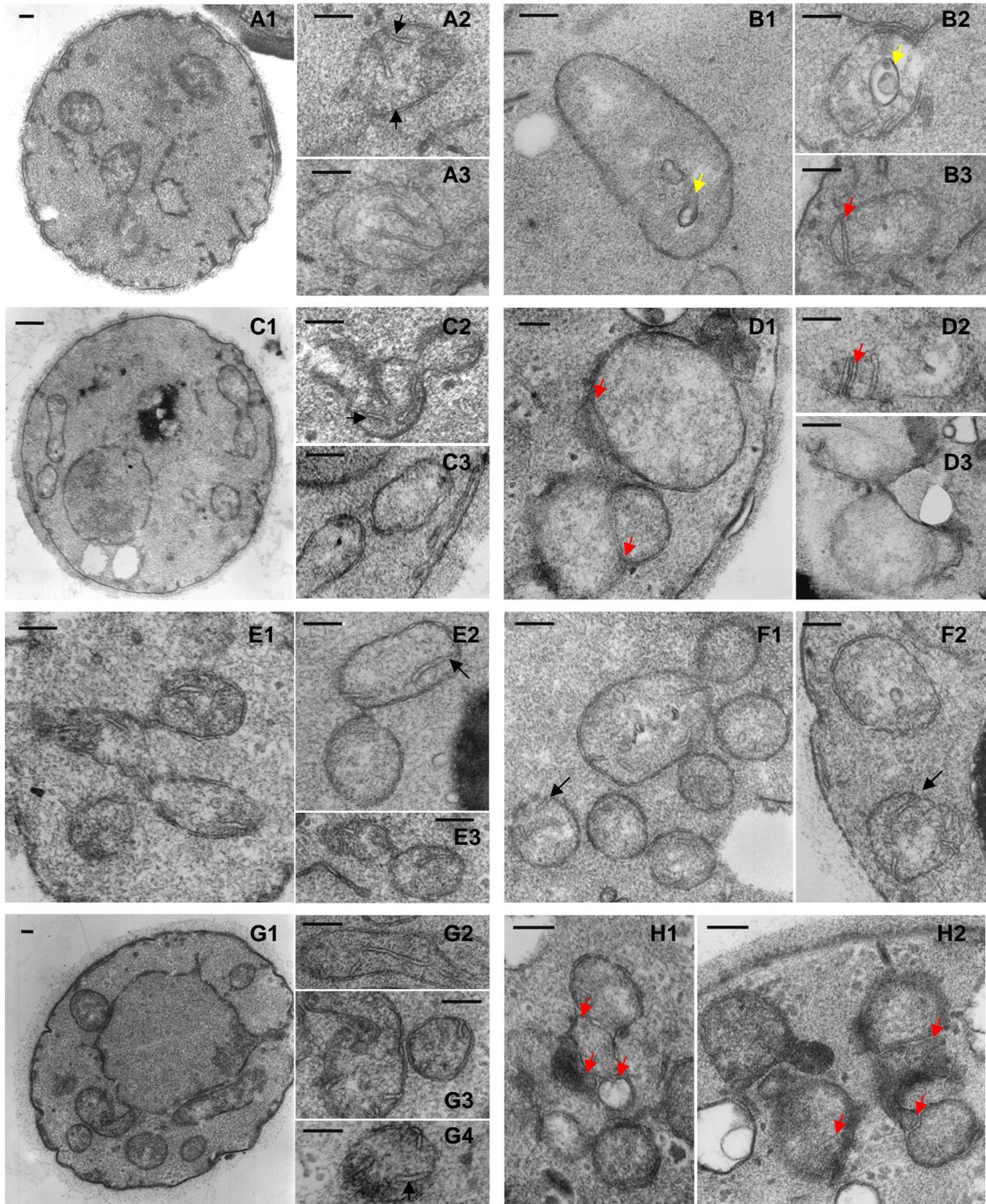


Abbildung 3-20: Die Mutanten verhalten sich vor und bei Überexpression von *MDM33* wie der Wildtyp. Hefezellen wurden bis zu einer OD_{600} von $\sim 1,0$ in SD-Medium angezogen und für die Induktion in SGal-Medium aufgenommen. Nach fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle des Phänotyps wurden die Zellen fixiert (Bauer *et al.*, 2001) und in Kunstharz eingebettet (Spurr, 1969). Ultradünnschnitte wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Vor Überexpression liegen gleichmäßig in der Zelle verteilte Mitochondrien mit Doppelmembran- und Cristaestrukturen vor (schwarze Pfeile). Bei Überexpression von *MDM33* bilden sich Innenmembranvesikel (gelbe Pfeile) und Septenstrukturen (rote Pfeile). **(A)** Wildtyp vor Überexpression. **(B)** Wildtyp bei Überexpression von *MDM33*. **(C)** $\Delta ybr163w$ ($\Delta dem1$) vor Überexpression. **(D)** $\Delta ybr163w$ ($\Delta dem1$) bei Überexpression von *MDM33*. **(E)** $\Delta yer004w$ ($\Delta fmp52$) vor Überexpression. **(F)** $\Delta ylr356w$ vor Überexpression. **(G)** $\Delta ymi030w$ vor Überexpression. **(H)** $\Delta ymi030w$ bei Überexpression von *MDM33*.

Sowohl vor als auch nach Überexpression von *MDM33* verhielten sich die Deletionsstämme ähnlich wie der Wildtyp. Die Gendeletionen alleine bewirkten keine Fehlstrukturierung der Innenmembran. Dies bestätigt die Befunde aus der Fluoreszenzmikroskopie, wo auch die äußere Struktur des Organells weitgehend unverändert war. Damit spielen die entsprechenden Proteine, anders als ihr möglicher Wechselwirkungspartner Mdm33, keine wichtige Rolle für die Innenmembran- und die allgemeine Mitochondrienmorphogenese. Allerdings ist es angesichts der Stringenz und Spezifität der vorliegenden Herangehensweise und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unwahrscheinlich, dass die identifizierten Kandidaten funktionell nicht mit Mdm33 in Verbindung stehen. Möglicherweise handelt es sich bei den identifizierten Proteinen zwar um spezifische, aber untergeordnete regulatorische Faktoren der Innenmembranteilung. Berücksichtigt werden sollte auch, dass Deletionen von Morphologiekomponenten nicht automatisch die mitochondriale Struktur verändern. So sind wildtypische Netzwerke vorhanden, wenn die verifizierte Teilungskomponente Caf4 ausgeschaltet ist (Griffin *et al.*, 2005). In diesem Fall liegt sehr wahrscheinlich eine funktionelle Redundanz zu Mdv1 vor. Möglicherweise ist dies – trotz der unterschiedlichen Strukturen – auch für die detektierten Kandidatenproteine der Fall.

Zudem zeigten die Mitochondrien der Mutanten analog zum Wildtyp überexpressions-spezifische Innenmembransepten und -vesikel und verloren ihre Cristae. Der primäre Effekt der *MDM33*-Überexpression ist also nicht blockiert. Die Kompensation der fluoreszenzmikroskopisch erkennbaren mitochondrialen Fragmentierung und Aggregation bei Überexpression findet möglicherweise in einem späteren Schritt der Phänotypentwicklung statt. Die identifizierten Proteine könnten zum Beispiel als Adapter zwischen Innen- und Außenmembran fungieren und ihr Fehlen eine verschlechterte Koordination zwischen den Membranteilungsereignissen hervorrufen. Damit könnte eine übermäßige Mdm33-vermittelte Innenmembranteilung, die in Vesikeln und Septen resultiert, bis zu einem gewissen Grad ohne eine Veränderung der Gesamtorganellen erfolgen, was den fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Anteil an Wildtypmitochondrien in den Mutantenkulturen erklärt würde.

Die Tatsache, dass ausschließlich untergeordnete Faktoren identifiziert wurden, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Mdm33 tatsächlich die Hauptkomponente der Innenmembranteilung darstellt und diesen Prozess relativ eigenständig vermittelt. Ein Argument hierfür wären die einzigartigen ring- und hohlkugelförmigen Mitochondrien der $\Delta m d m 3 3$ -Deletionsmutante. In allen Bereichen der mitochondrialen Formgebung wurden bei Deletion der gleichberechtigten Hauptkomponenten der jeweiligen Prozesse einheitliche Phänotypen

beobachtet: Engmaschige mitochondriale Netze bei Störung der Teilung, Fragmente und Aggregate bei fehlender Fusionsfähigkeit und große Sphären im Fall eines Tubulationsdefekts (Zusammenfassung in Merz *et al.*, 2007). In genomweiten Screens nach sowohl nicht-essentiellen, als auch essentiellen Faktoren (Dimmer *et al.*, 2002; Altmann & Westermann, 2005), die die mitochondriale Morphologie beeinflussen, konnten keine Mutationen aufgedeckt werden, die gleichartige Strukturen wie $\Delta mdm33$ hervorbringen.

Eine umfassende Klärung, ob Mdm33 alleine wirkt oder Wechselwirkungspartner vorliegen ist unerlässlich für das Verständnis seiner Funktion und für das allgemeine Verständnis der mitochondrialen Teilung. Deshalb müssen in Zukunft weitere Versuche unternommen werden, um gleichberechtigte Interaktionspartner von Mdm33 zu finden oder definitiv auszuschließen. Auch die übrigen hier identifizierten, positiven Deletionsstämme aus den Wachstumsanalysen ($\Delta ydr061w$, $\Delta ygl080w$ und $\Delta ylr091w$) sollten funktionell weiter charakterisiert werden, um einen möglichen Zusammenhang der fehlenden Proteine mit der Innenmembranteilung zu erfassen.

3.2.3 Untersuchung des Einflusses von Mdm33 auf die mitochondriale Außenmembranteilungsmaschinerie

In Doppeldeletionsstudien wurde gezeigt, dass sich $\Delta mdm33$ epistatisch zu $\Delta fis1$ verhält, wobei *FIS1* eine Außenmembranteilungskomponente kodiert (Messerschmitt *et al.*, 2003). Das Ergebnis, dass ~50% der $\Delta mdv1$ -Zellen und sogar ~100% der $\Delta dnm1$ -Zellen bei Überexpression von *MDM33* tubuläre Mitochondrien besitzen, stellt eine weitere Beziehung zwischen der Mdm33-Funktion und der mitochondrialen Außenmembranteilung her (vgl. 3.2.1.2). Um deshalb den Einfluss von Mdm33 auf diesen Prozess näher zu untersuchen, wurde die Verteilung der Außenmembranteilungs-Schlüsselkomponente Dnm1 in der Deletionsmutante verfolgt. Dnm1 liegt als cytosolische Dimere vor (Ingerman *et al.*, 2005) und assoziiert an den Mitochondrien, wobei es über die Adapterproteine Mdv1/Caf4 und den Membrananker Fis1 gebunden wird (Übersicht in Okamoto & Shaw, 2005; Merz *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Hier liegt es in punktförmigen Komplexen mehrerer Untereinheiten vor, die mittels GFP-Fusion fluoreszenzmikroskopisch sichtbar sind (Fekkes *et al.*, 2000; Mozdy *et al.*, 2000; Schauss *et al.*, 2006; vgl. auch Abb. 3-21). Zwischen den beiden Proteinpools an freiem und gebundenem Protein besteht ein Gleichgewicht von Mitochondrienassoziation und -dissoziation (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Das Fehlen der Außenmembranteilungskomponenten Fis1, Mdv1 oder Caf4 beeinflusst dieses Dnm1-Gleichgewicht an der

Mitochondrienoberfläche (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu & Nunnari, 2000; Griffin *et al.*, 2005; Schauss *et al.*, 2006). Mit Hilfe des Stamms $\Delta mdm33DNMI-GFP$, der neben der Gendeletion eine genomische *GFP*-Fusion an *DNMI* trägt, wurde untersucht, ob sich die Deletion von *MDM33* ebenfalls auf die mitochondriale Dnm1-GFP-Assemblierung auswirkt. Als Referenz wurde der entsprechende als „Wildtyp“ zu betrachtende Stamm $WT(DNMI-GFP)$ ⁴ verwendet. Die Zellen wurden auf YPD-, YPG- und YPGal-Medium angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Parallel zur Mitochondrienmorphologie (Visualisierung mittels mtRFP) wurden Dnm1-GFP-Punkte quantifiziert.

3.2.3.1 Quantitative Erfassung der mitochondrialen Morphologie

Zunächst wurde die mitochondriale Morphologie der Zellen untersucht, um zum einen die Auswirkungen des *GFP-tags* an Dnm1 und zum anderen den Fitnesszustand der verwendeten Kulturen zu erfassen. Der als Kontrolle verwendete Stamm $WT(DNMI-GFP)$ besaß auf allen Kohlenstoffquellen zum Großteil tubuläre, wildtypische Mitochondrien (Tab. 3-8), die auf YPGal und YPG aufgrund der metabolisch erforderlichen höheren Mitochondrienleistung stärker verzweigt waren (Abb. 3-21). Daneben waren vereinzelt (<3%) fragmentierte bis aggregierte Mitochondrien vorhanden. Dies entsprach in etwa den Ergebnissen für den GFP-freien Vergleichswildtyp. Die beobachteten Abweichungen von ~6-13% waren einem steigenden Anteil von $\Delta dnm1$ -spezifischen netzartigen Mitochondrien zuzuschreiben. In den entsprechenden Zellen war die mitochondriale Teilungsaktivität offenbar durch den *GFP-tag* beeinträchtigt. Da aber im Großteil der Zellen die Funktionalität des Dnm1-GFP-Fusionsprodukts vollständig erhalten war, konnte der $WT(DNMI-GFP)$ -Stamm als wildtypisch behandelt werden.

In Zellen des $\Delta mdm33DNMI-GFP$ -Stamms waren auf allen Kohlenstoffquellen vorwiegend (79% bis 91,3%) ring- und lassoförmige Mitochondrien vorhanden, die auf YPD klein und auf YPGal und YPG groß ausgeprägt waren (Abb. 3-21). Auffällig war, dass in einigen der Ringe diffus fluoreszierende Innenbereiche vorlagen, bei denen es sich möglicherweise um dünn ausgezogene Matrixbereiche handeln könnte. Damit besteht eine Ähnlichkeit zu den netzartigen Strukturen, wie sie in Teilungsmutanten ($\Delta dnm1$, $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$) auftreten. Alternativ könnten diese Strukturen auch Hohlkugeln darstellen. Mittels Epifluoreszenzmikroskop ist eine Unterscheidung jedoch nicht möglich. Deshalb wurden ergänzend konfokale Aufnahmen mit dem *laser scanning* Mikroskop Leica TCS-SP. Die

⁴ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stefan Jakobs (Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)

Bei graphischer Auftragung der Dnm1-GFP-Cluster-Anzahl wurde für Zellen des Deletionsstamms eine negative Verschiebung der Verteilung deutlich (Abb. 3-22). Während der Großteil der Wildtypzellen auf YPD-Medium zwischen acht und zehn Dnm1-GFP-Cluster aufwies, waren in mutanten Zellen meist sechs bis sieben Proteinassoziate zu erkennen. Im Durchschnitt verringerte sich die Anzahl um zwei Dnm1-GFP-Cluster von 9,8 auf 7,8 (Tab. 3-9). Bei Anzucht auf YPGal- und YPG-Medium war die gleiche Tendenz zu beobachten. Einziger Unterschied zum YPD-Experiment waren die aufgrund der größeren Mitochondrienmasse auf diesen Kohlenstoffquellen höheren Haupt- und Durchschnittswerte der Cluster-Anzahl (11,8 und 11,2 für den WT bzw. 9,4 und 9,2 für die Mutante). Eine leichte Abweichung zwischen WT und Mutante wurde also auf allen Kohlenstoffquellen erfasst.

Tabelle 3-9: Gesamtdurchschnitte an Dnm1-GFP-Punkten pro Mutterzelle.

Stamm	Gesamtdurchschnitt an Dnm1-GFP-Punkten in Mutterzellen		
	auf YPD	auf YPGal	auf YPG
WT (<i>DNM1-GFP</i>)	9,8	11,8	11,2
Δ <i>mdm33</i> <i>xDNM1-GFP</i>	7,8	9,4	9,2

Der jeweilige Gesamtdurchschnitt ergab sich aus den drei Auszählungen pro Kohlenstoffquelle (n=300) (vgl. Abb. 3-22).

Mdm33 ist nicht essentiell für die Assemblierung von Dnm1-GFP an der Mitochondrienoberfläche. Die Anzahl der Proteincluster sinkt jedoch um durchschnittlich 20%. Dies ist eine konstante Auswirkung, die unabhängig von der Kohlenstoffquelle in gleichem Maße eintritt. Hierfür sind grundsätzlich direkte und indirekte Ursachen denkbar. Zum einen könnte ausschließlich die ungünstige Form der Mitochondrien (Hohlkugeln oder Schüsseln) eine Ausbildung von Dnm1-Komplexen erschweren. Ähnliche sterische Effekte wurden für die großen, sphärischen Mitochondrien der Δ *mdm10*-Mutante⁵ beobachtet, wo eine reduzierte Dnm-GFP-Clusteranzahl mitochondrial vorlag (Otsuga *et al.*, 1998). Allerdings trat die reduzierte Dnm-GFP-Assemblierung auch an ring- und lassoähnlichen Mitochondrien ohne diffus fluoreszierende Innenbereiche auf. Hier sind Tubuli normalen Durchmessers vorhanden, an denen – zumindest aus sterischer Sicht – eine wildtypische Dnm1-GFP-Assemblierung möglich sein sollte. Somit ist eine direkte Auswirkung der Deletion wahrscheinlicher.

⁵ Mdm10: *mitochondrial distribution and morphology*; Komponente der mitochondrialen Tubulation mit zusätzlicher Beteiligung am mitochondrialen Import (Meisinger *et al.*, 2004).

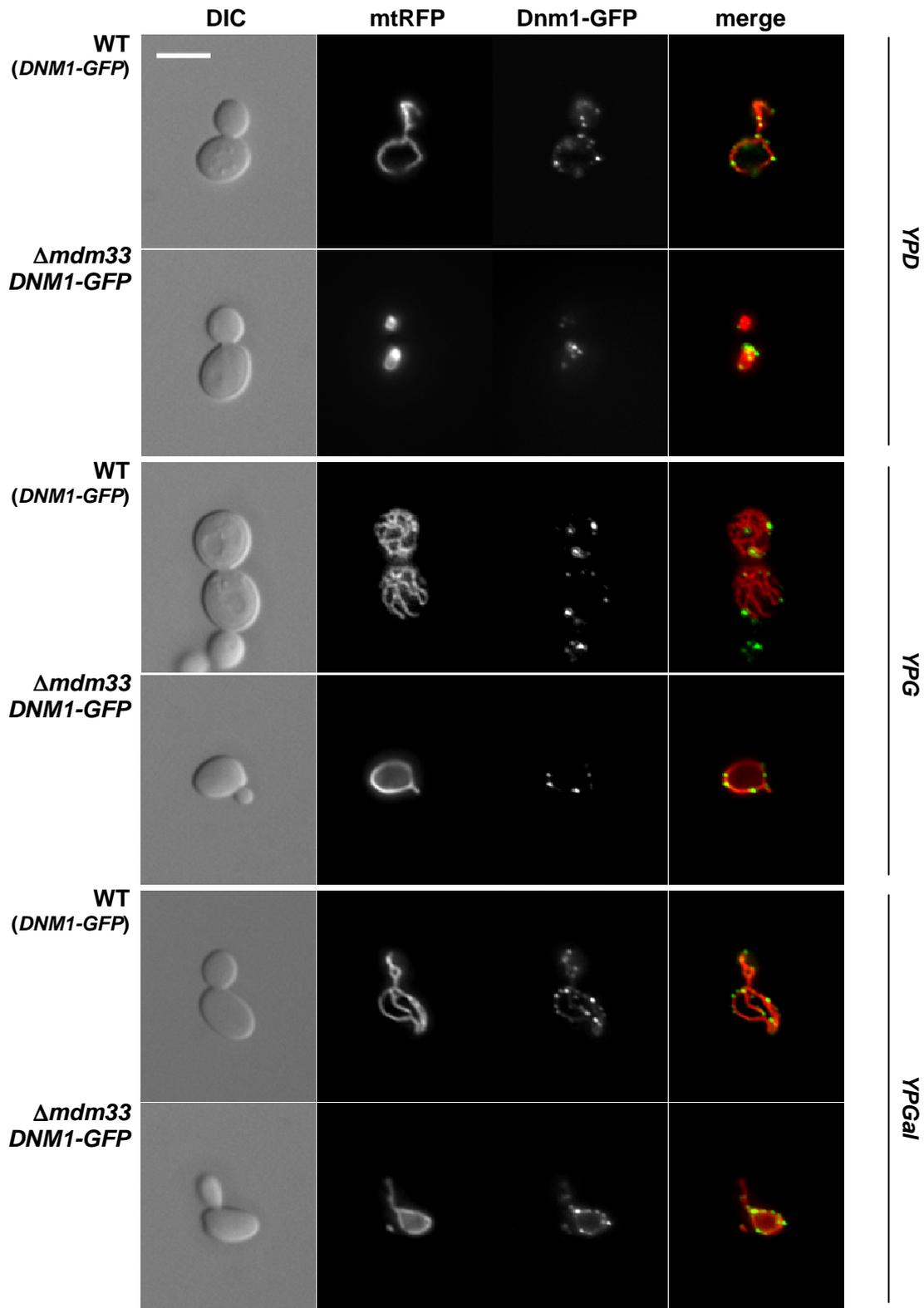


Abbildung 3-21: Mitochondriale Morphologie und Lokalisation von Dnm1-GFP-Punkten in Wildtyp- und Δ *mdm33*-Zellen. Zellen wurden über Nacht bei 30°C in YPD-, YPG- oder YPGal-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Jede Bilderserie besteht aus einer Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahme (DIC), jeweils einer Fluoreszenzaufnahme der mtRFP-gefärbten Mitochondrien (mtRFP) und der Dnm1-GFP-Punkte (Dnm1-GFP) sowie einer Überlagerung der beiden Fluoreszenzaufnahmen (merge). Der Größenbalken entspricht 5 μ m. Wildtypzellen enthalten tubuläre Mitochondrien, Organellen der Δ *mdm33*-Mutante sind ringförmig. Die Dnm1-GFP-Cluster sind unabhängig von der Kohlenstoffquelle sowohl in WT- als auch in Δ *mdm33*-Zellen zumeist (>98%) mitochondrial lokalisiert.

Die Ergebnisse könnten damit zum anderen als Bestätigung des bestehenden Mdm33-Wirkmodells gewertet werden. Dieses schlägt vor, dass Mdm33 auf entgegengesetzten Seiten der mitochondrialen Innenmembran über homotypische Wechselwirkungen im Matrixraum die Einschnürungen von Mitochondrientubuli (= *Constrictions*) und/oder die vollständige Innenmembranteilung hervorruft (Messerschmitt *et al.*, 2003). Laut Legesse-Miller *et al.* (2003) sind solche *Constrictions* die Voraussetzung für mitochondriale Teilungsereignisse. Sie konnten zeigen, dass an Mitochondrien in zwei voneinander unabhängigen Prozessen ständig Einschnürungen des Mitochondrientubulus entstehen und Dnm1-Cluster assemblieren. Nur dann aber, wenn Einschnürung und Assemblierung gleichzeitig erfolgen, kommt es tatsächlich zur Bildung mitochondrienumschließender Dnm1-GFP-Spiralen und zur Teilung. In den meisten Fällen lösen sich die Cluster wieder auf, bevor sie neu entstehen (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Da in Δmdm33 -Zellen gemäß dem Wirkmodell keine *Constrictions* bzw. Innenmembranteilungsereignisse möglich sind, sollten nur unproduktive Dnm1-GFP-Assemblierungen gebildet werden. Interessanterweise haben in Teilungsereignisse involvierte Dnm1-Cluster eine längere Verweildauer an den Mitochondrien (30-90 s) als davon unabhängige (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Berücksichtigt man die längere Verweildauer und die Tatsache, dass bis zu 2,5 Teilungen pro Minute und Zelle stattfinden (Nunnari *et al.*, 1997; Jakobs *et al.*, 2003b), so könnte die hier beobachtete Reduktion um durchschnittlich zwei Cluster tatsächlich das Fehlen der teilungsinvolvierten Dnm1-Spiralen widerspiegeln. Auch das Fehlen von freien Schlauchenden in Δmdm33 -Zellen, die als Teilungsendprodukte entstehen, stimmt mit einer fehlenden Teilungsaktivität und der Hypothese überein, dass der Mdm33-spezifische Phänotyp durch eine reduzierte Teilungsaktivität bei gleichzeitig fortschreitender dreidimensionaler Fusion zustande kommt (Messerschmitt *et al.*, 2003).

4 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Voraussetzung, um Prozesse zu verstehen, die grundlegend für die Funktion und die Vererbung von Organellen sind, ist die Identifizierung und Charakterisierung der involvierten molekularen Komponenten (Dimmer *et al.*, 2002). Im postgenomischen Zeitalter stellen Deletionsbibliotheken dafür ein wertvolles Hilfsmittel dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von der ~4800 Deletionsmutanten nicht-essentieller Hefegene umfassenden *MAT α* -Deletionsbibliothek Screens durchgeführt, um das Verständnis zweier wichtiger Teilbereiche der mitochondrialen Biogenese zu verbessern, dem Erhalt der Atmungsfähigkeit und der mitochondrialen Teilung als zentraler Bestandteil der Morphogenese.

4.1 Genetische Basis von respiratorischem Wachstum, mitochondrialem Genom-Erhalt und mitochondrialer Proteinsynthese in *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung von Mutanten mit Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle

Um Gene zu finden, die für die respiratorische Kompetenz in Hefe benötigt werden, wurde die gesamte *MAT α* -Deletionsbibliothek (BioCat, Heidelberg; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006) (~4800 Stämme) nach Mutanten mit letalem Wachstumsdefekt auf glyzerinhaltigem Medium (YPG) durchsucht (=pet-Stämme). Dadurch wurden insgesamt 319 *pet*-Stämme identifiziert, wobei eine deutliche Korrelation zwischen *pet*-Phänotyp und mitochondrialer Lokalisation der fehlenden Genprodukte besteht, die die biologische Relevanz widerspiegelt. Die ermittelten *pet*-Gene wurden mit bestehenden Datensätzen nach Dimmer *et al.* (2002) und Luban *et al.* (2005) verglichen und anhand weiterer Experimente funktionell gruppiert. Diese weiterführenden Analysen gaben Aufschluss über die Funktionen der jeweils deletierten Gene. Mittels Cytoduktion, ergänzenden DAPI-Färbungen und Komplementationstest wurde der Status der mtDNA erfasst. Die radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprodukte ermöglichte zudem eine selektive Analyse der Proteinexpression des Organells und zusätzliche Adaptionsversuche lieferten Informationen über den Einfluss der Katabolitrepression.

Die vergleichenden Gendelektionsanalysen ermöglichten durch stringente Kriterien einen definierten Satz an 163 proteinkodierenden Genen zu ermitteln, die obligat für den respiratorischen Metabolismus in Hefe benötigt werden. Darunter waren auch zehn weitgehend uncharakterisierte Gene, die *RRG1* bis *RRG10* genannt wurden. Diese Daten können als Positivliste an Genen dienen, die für respiratorisches Wachstum, den Erhalt mitochondrialer DNA und mitochondrialer Proteinsynthese benötigt werden. Es muss jedoch betont werden, dass einige Komponenten fehlen könnten, die durch redundante Gene kodiert werden oder deren Deletionsstämme in der Bibliothek fehlerhaft waren. Außerdem könnten einige Gene speziell für andere respiratorische Kohlenstoffquellen als Glycerin (z. B. für Laktat oder Ethanol) oder in bestimmten genetischen Stammhintergründen benötigt werden.

Durch die vergleichenden Analysen wurden einige Deletionen gefunden, die in verschiedenen Versionen der Bibliotheken unterschiedliche Phänotypen erzeugten (*pet* und nicht-*pet*). PCR-Analysen machten deutlich, dass diese Unterschiede nicht alleine auf falsche Stämme zurückzuführen sind, sondern dass vielmehr eine Plastizität des *pet*-Phänotyps zugrunde liegt. Zwei weitere Beobachtungen untermauern, dass diese phänotypische Plastizität viel größer ist, als bisher angenommen: Zum einen kann die respiratorische Inkompetenz durch ein Aufheben der Katabolitrepression revertiert werden, und zum anderen ist eine Anzahl von [*rho*⁺] Stämmen durch Cytoduktion rettbar. Es ist eine Herausforderung in Zukunft den Beitrag von Umweltfaktoren, Nährstoffversorgung, Alterung und mögliche epigenetische Faktoren auf die phänotypische Plastizität zu untersuchen.

Die funktionelle Gruppierung der *pet*-Mutanten identifizierte 16 Gene, die für den Erhalt der mtDNA, und 98 Gene, die für die mitochondriale Proteinsynthese erforderlich sind (88 für die allgemeine und zehn für die Translation spezifischer Produkte). In jeder Kategorie wurden mehrere, jeweils schon bekannte Komponenten dieser Prozesse erfasst, was die Aussagekraft der Ergebnisse demonstriert.

Die Studien zum mtDNA-Erhalt verdeutlichen erneut den von Myers *et al.* (1985) beschriebenen Einfluss der Proteinsynthese auf den mtDNA-Erhalt. Auf bisher unbekannter Art und Weise führt eine Blockierung der mitochondrialen Genexpression zum Verlust der mtDNA. Ein besonders interessanter Kandidat unter den Faktoren, die für den mtDNA-Erhalt benötigt werden, ist Rrg5. Dieses Protein ist weitgehend uncharakterisiert und wurde erst kürzlich mit dem mitochondrialen Lipidstoffwechsel in Verbindung gebracht. Bei Deletion von *RRG5* sinken die Cardiolipin- und Phosphatidylethanolamin-Konzentrationen der

mitochondrialen Membranen (Osman *et al.*, 2009). Wie genau sich ein veränderter Lipidhaushalt auf den Erhalt der mtDNA auswirkt, muss zukünftig untersucht werden.

Die durchgeführten Analysen zeigen darüber hinaus, dass mtDNA auch spontan verloren werden kann und viele Faktoren nur indirekt am Erhalt der respiratorischen Aktivität beteiligt sind. 44 Mutanten, die nach mehreren Generationen auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle keine mtDNA mehr besaßen, konnten nach der Cytoduktion ihre mtDNA stabil erhalten. Die Tatsache, dass 77% dieser Stämme nicht in den Datensätzen von Dimmer *et al.* (2002) und Luban *et al.* (2005) enthalten waren, zeigt eine Möglichkeit auf, wie die beobachtete phänotypische Plastizität zustande kommen kann.

Von den 98 Genen, die essentiell für die mitochondriale Proteinsynthese sind, kodieren 88 für Komponenten, die für die allgemeine mitochondriale Translation benötigt werden. In Übereinstimmung mit ihrer Funktion wurden innerhalb dieser Gruppe hauptsächlich mitochondriale Ribosomenuntereinheiten, mitochondriale Transkriptions- und Translationsfaktoren sowie mitochondriale tRNA-Synthetasen identifiziert. Darüber hinaus wurden aber auch unbekannte Proteine, z. B. Rrg1, Rrg2, Rrg6 und Rrg8, erfasst. Durch Datenbankrecherchen und strukturelle Eigenschaften lassen sich für Rrg2 und Rrg6 direkte Zusammenhänge mit der mitochondrialen Proteinexpression herstellen. So besitzt das Protein Rrg2 ein Pentatricopeptid-Motiv (PPR-Motiv). Proteine, die ein solches Motiv tragen, sind zumeist in Plastiden und Mitochondrien lokalisiert, wo sie an verschiedenen Punkten der Genexpressionskontrolle beteiligt sind (Andrés *et al.*, 2007). Das Protein Rrg6 zeigt hohe Homologien zur bakteriellen Glutamyl-tRNA-Amidotransferase, die für die prä-translationale Aminosäuremodifikation essentiell ist (Oshikane *et al.*, 2006). Für Rrg1 und Rrg8 sind anhand von Proteinsequenzen oder Homologien keinerlei Anhaltspunkte vorhanden. Für alle vier Proteine wird es in Zukunft wichtig sein, ihre Funktion bei der mitochondrialen Translation herauszuarbeiten.

Die verbleibenden zehn essentiellen Faktoren der mitochondrialen Proteinexpression sind für die Synthese spezifischer mitochondrialer Genprodukte verantwortlich. Für sechs Komponenten, spezifische Translations- und Splicingfaktoren, war dies bereits beschrieben. Darüber hinaus wurden vier Proteine erstmals mit der mitochondrialen Proteinexpression in Verbindung gebracht. Besonders interessant ist dieser neue Zusammenhang für Cyc3 und Rrg10. Cyc3 ist die mitochondriale Cytochrom *c* Häm-Lyase, die im Intermembranraum den Häm-Kofaktor an Apo-Cytochrom *c* bindet (Dumont *et al.*, 1987). In der Deletionsmutante wurde eine starke Reduktion an Cox1 sowie Cytochrom *b* und eine zusätzliche Proteinbande

unbekannter Identität oberhalb von Cox3 beobachtet. Cyc3 könnte also auch für die Biogenese anderer mitochondrialer Proteine von Bedeutung sein. Als weiterer Schritt wäre es sinnvoll, die Identität der zusätzlichen Bande zu klären, indem das Protein z. B. aus dem Gel extrahiert und über Massenspektrometrie/Sequenzierung identifiziert wird. Dadurch wären weitere Informationen über die Funktion von Cyc3 bei der mitochondrialen Proteinexpression möglich. Bei Rrg10 handelt es sich um ein bisher uncharakterisiertes mitochondriales Protein von nur 85 Aminosäuren, das möglicherweise eine spezifische Rolle in der Expression oder Assemblierung des mitochondrialen *COXI*-Genprodukts spielt. Interessanterweise besitzt dieses Protein gemäß Vorhersage eine Transmembrandomäne (Hofmann & Stoffel, 1993). Die Membraninsertion hydrophober, mitochondrial synthetisierter Proteinen, wie Cox1, wird co-translational durch Oxa1 vermittelt (Mokranjac & Neupert, 2009). Wie diese Prozesse in Membrannähe koordiniert werden, ist bisher nicht voll verstanden. Falls Rrg10 direkt an der Transkription, der Reifung der mRNA und/oder der Translation von Cox1 beteiligt ist, so könnte seine Membranverankerung ein Hinweis sein, wie Proteinsynthese und Membraninsertion gekoppelt werden.

Im Rahmen der funktionellen Gruppierung wurden als eine weitere Gruppe Gene erfasst, die die respiratorische Kompetenz unabhängig von mtDNA-Erhalt und mitochondrialer Proteinexpression beeinflussen. Viele davon stehen in Verbindung zur Vakuolenfunktion. Außerdem sind viele Gene, die für V-ATPase Untereinheiten kodieren, hoch penetrant. Diese Befunde spiegeln eine wichtige, bisher noch nicht voll verstandene funktionelle Beziehung zwischen Mitochondrien und Vakuolen wider. Vakuoläre Fehlfunktionen führen unter anderem zu einer gestörten Ionen- und pH-Homöostase (Klionsky *et al.*, 1990; Kane, 2006), können Zellen hypersensitiv gegenüber oxidativem Stress machen (Thorpe *et al.*, 2004; Kane, 2007; Milgrom *et al.*, 2007) und beeinträchtigen den Autophagiestoffwechsel, über den auch Mitochondrien abgebaut werden (Kissova *et al.*, 2007). Durch alle drei Prozesse wird die mitochondriale Funktion beeinflusst. Zukünftig sollte speziell die Rolle der Vakuole in der mitochondrialen Qualitätskontrolle und im mitochondrialen *turnover* ausführlich untersucht werden.

Besonders interessant wird als nächster Schritt die Funktionsanalyse der bisher uncharakterisierten, für die respiratorische Kompetenz essentiellen Proteine Rrg1 bis 10. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erste Anhaltspunkte erarbeitet, an welchen Prozessen diese Proteine beteiligt sein könnten. Die Klärung ihrer genauen Funktionen und

ein umfassendes mechanistisches Verständnis der molekularen Prozesse, die zur respiratorischen Aktivität beitragen, erfordern noch weitere entscheidende Experimente. Die hier gezeigte systematische, funktionelle *large-scale* Analyse der *pet*-Mutanten stellt allerdings einen ersten Schritt zur Erfassung der vollen Anzahl an Genen dar, die für den Erhalt der mtDNA und der mtTranslation benötigt werden. Zusammen mit umfassenden genomischen und proteomischen Herangehensweisen (Prokisch *et al.*, 2004) und bestehenden Protein-Interaktionsnetzwerken (Perocchi *et al.*, 2006) wird es dazu beitragen, das System Mitochondrion mit ständig zunehmender Auflösung zu verstehen.

4.1.2 Der *pet*-Phänotyp in den COX-Assemblierungs-Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2

Als besonders interessante Gruppe wurden 23 *pet*-Mutanten identifiziert, deren respiratorische Inkompetenz sowohl durch Kreuzung mit Δmip1 als auch durch Cytoduktion revertiert wurde. Diese Mutanten besitzen gemäß Kreuzung mit Δmip1 ein mitochondriales [*rho*⁺]-Genom und können nach Erhalt von frischem cytosolischem Material durch Cytoduktion wieder Atmung betreiben. Die respiratorische Kompetenz hängt in diesen Mutanten also möglicherweise nicht ausschließlich vom mitochondrialen oder vom Kerngenom ab, sondern wird zusätzlich von extragenomischen Faktoren bestimmt. Unter den 23 Stämmen waren auch vier Cytochrom *c* Oxidase (COX)-Assemblierungsfaktoren, die weiter untersucht wurden. Durch plasmidale Komplementation konnten irreversible Schäden der Mitochondrien aufgedeckt werden, deren Entstehung während des logarithmischen Wachstums induziert und während chronologischer Alterung stark beschleunigt wurde. Diese Schädigungen waren primär auf mtDNA-Ebene zu beobachten, betrafen aber auch andere Makromoleküle, wie möglicherweise Lipide oder Proteine. Als wahrscheinliche Ursache dieser Schäden wurde eine verstärkte Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) identifiziert.

Zusammenfassend entstand folgendes Bild der Phänotypentstehung der COX-Assemblierungs-Mutanten: Primäre Ursache der beobachteten respiratorischen Inkompetenz in den Mutanten Δcox10 , Δcox16 , Δcox19 und Δmss2 ist die Fehlfunktion der Cytochrom *c* Oxidase, die den Elektronentransport in der Atmungskette stört. Dadurch entstehen sekundär vermehrt ROS. Parallel beeinträchtigt der durch den respiratorischen Defekt bestehende Energiemangel möglicherweise den ROS-Abbau. So kommt es zu einer verstärkten ROS-Akkumulation, die gravierende zelluläre Schädigungen hervorruft.

In Zukunft sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um die Art der Schäden und speziell den Beitrag verschiedener Prozesse zur ROS-Akkumulation zu erfassen. Für die

gezielte Analyse mtDNA-unabhängiger Schäden wurden Stämme mit selektierbarer mtDNA hergestellt. Diese könnten in Zukunft eingesetzt werden, um Mutanten mit anderweitiger Schädigung anzureichern und über direkte Nachweisverfahren die modifizierten Lipide oder Proteine zu charakterisieren. Eine Untersuchung des Wachstums der Mutanten auf H₂O₂-haltigem Medium ermöglicht, die Empfindlichkeit gegenüber ROS zu testen. Dadurch könnten Informationen über eine möglicherweise reduzierte Entgiftungsrate gewonnen werden, die weiterführend in direkten Messungen der Superoxiddismutase-, Catalase- und Peroxidase-Aktivität der Mutanten quantitativ erfassbar wäre. Interessant wäre auch die Durchführung von Microarrayanalysen, mit denen Veränderungen im Expressionsmuster sichtbar wären, wie sie für [*rho*⁰]-Zellen bereits gezeigt wurden (Epstein *et al.*, 2001). Die COX-Assemblierungs-Mutanten könnten dadurch als Modellsystem für die atmungskettenabhängige ROS-Produktion dienen.

4.2 Studien zur mitochondrialen Morphogenese

4.2.1 Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Wechselwirkungspartnern der mitochondrialen Innenmembranteilungskomponente Mdm33

Die mitochondriale Dynamik wird durch ständige Fusions- und Teilungsereignisse bestimmt. Die intensive Forschung der letzten Jahre, speziell am Modellorganismus *S. cerevisiae*, entschlüsselte die entscheidenden Komponenten dieser Prozesse (Zusammenfassung in: Merz *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Im Fall der Fusion wurden zwei koordiniert arbeitende Maschinerien in der Außen- und Innenmembran identifiziert (Hoppins *et al.*, 2007). Im Fall der Teilung ist bisher ausschließlich die Maschinerie der Außenmembranteilung charakterisiert. Dennoch gibt es bereits Anhaltspunkte, die auf eine separat ablaufende Innenmembranteilung hindeuten. Beispielsweise schreitet in *C. elegans* die Innenmembranteilung weiter voran, wenn die Außenmembranteilung durch Verlust der Drp1-Funktion blockiert ist (Labrousse *et al.*, 1999). Durch Messerschmitt *et al.* (2003) schließlich konnte mit Mdm33 eine mögliche Komponente der mitochondrialen Innenmembranteilung in Hefe identifiziert werden. Über genetische Wechselwirkung sollten im Rahmen dieser Arbeit Interaktionspartner dieser Komponente gefunden werden. Das Verfahren beruhte dabei auf der Überexpression von *MDM33* in Hefedeletionsmutanten, die in Wildtypzellen zu einem Wachstumsarrest und einer Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks führt (Messerschmitt *et al.*, 2003). Aufgrund einer unterbrochenen Wirkkaskade sollte bei Fehlen eines

Wechselwirkungspartners durch Gendeletion dieser negative Überexpressionseffekt auf das Wachstum und/oder die Mitochondrienmorphologie eliminiert werden. Deshalb wurden diese beiden Parameter in einer Vorauswahl von 164 Deletionsmutanten untersucht, in denen vor allem mitochondriale Proteine mit unbekannter Funktion fehlen.

Die Suche nach genetischen Wechselwirkungspartnern der Innenmembranteilungskomponente Mdm33 lieferte als vielversprechende Kandidaten insgesamt sieben bisher uncharakterisierte Proteine. Darüber hinaus wurden die Deletionsstämme $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$, denen Komponenten der mitochondrialen Außenmembranteilungsmaschinerie fehlen, als überexpressionstolerant erfasst. Durch Doppeldeletionsanalysen war bereits im Vorfeld eine funktionelle Beziehung zwischen der Mdm33-Wirkung und der Außenmembranteilung bekannt (Messerschmitt *et al.*, 2003). Die Detektion von $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ beweist deshalb die Spezifität des vorgenommenen genetischen Screens, und die überschaubare Anzahl an identifizierten Kandidaten die Stringenz. Vier der sieben bisher uncharakterisierten Deletionsstämme konnten durch eine weiterführende funktionelle Charakterisierung als wahrscheinlich untergeordnete, regulatorische Komponenten der Innenmembranteilung eingestuft werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen und die EM-Experimente lieferten keinen Hinweis auf eine wichtige Rolle in diesem Prozess, da sowohl die äußere Gestalt, als auch die Innenmembran im Deletionsfall weitgehend wildtypisch strukturiert war. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass Mdm33 tatsächlich die Hauptkomponente der Innenmembranteilung darstellt und diesen Prozess relativ eigenständig vermittelt. Übereinstimmend dazu weist die $\Delta mdm33$ -Deletionsmutante einen ring- und hohlkugelähnlichen mitochondrialen Phänotyp auf, der bisher in keiner anderen Mutante beobachtet werden konnte. In genomweiten Screeningverfahren mit Mutanten essentieller und nicht-essentieller Gene wurden keine vergleichbaren mitochondrialen Strukturen entdeckt (Dimmer *et al.*, 2002; Altmann & Westermann, 2005).

Allerdings sind auch andere Gründe für eine mangelnde Detektion gleichberechtigter Wechselwirkungspartner denkbar. (1) Zum einen interagiert Mdm33 möglicherweise – in Analogie zu Caf4 und Mdv1 in der Außenmembranteilungsmaschinerie – mit redundanten Komponenten. Dadurch könnte bei Einzeldelation der jeweils andere Partner die Mdm33-vermittelte Überexpression ermöglichen. Entsprechende Kandidaten würden durch die vorliegende Herangehensweise nicht erfasst. (2) Unter Umständen liegt das Problem in der Vorauswahl der Stämme. Aufgrund der zeitaufwändigen Transformationsprozedur konnte nur eine begrenzte Anzahl an Deletionsmutanten (164) berücksichtigt werden. Im

mitochondrialen Proteom sind aber ~1000 Proteine enthalten. Hier wurden zunächst vor allem Mutanten untersucht, in denen Gene deletiert sind, die für bisher uncharakterisierte Proteine mit wahrscheinlich mitochondrialer Lokalisation kodieren. Vor allem bereits funktionell charakterisierte mitochondriale Komponenten wurden nicht berücksichtigt. Allerdings könnten auch Proteine mit dualen Funktionen bei der Innenmembranteilung eine Rolle spielen. Deshalb wäre es sinnvoll, die Überexpressionsstudien zumindest auf alle nicht-essentiellen mitochondrialen Proteine auszuweiten. (3) Problematisch ist außerdem, dass durch das gewählte *GAL*-Überexpressionssystem eine Anzucht auf Minimalsektivmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle erfolgen muss. Im Laufe des Screens zeigte sich jedoch, dass einige Stämme bereits mediumsbedingte Wachstumsdefekte erleiden, aufgrund des dadurch hervorgerufenen verfrühten Übergangs in die stationäre Wachstumsphase fragmentierte oder aggregierte Mitochondrien ausbilden und deshalb nicht hinsichtlich einer überexpressionsbedingten Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien untersucht werden können. Die grundsätzliche genetische Herangehensweise, die Mdm33-Funktion durch das Fehlen wechselwirkender Faktoren stark zu beeinträchtigen oder sogar auszuschalten, ist jedoch sinnvoll. Deshalb wäre es eventuell ratsam, mit einem anderen induzierbaren System zu arbeiten. In Zusammenarbeit mit Tobias Reichenbach (Universität Bayreuth, Institut für Zellbiologie; Diplomarbeit 2008) wurde deshalb ein funktionelles Plasmid mit Cu^{2+} -induzierbarem *MDM33* hergestellt, das in weiteren Studien Anwendung finden könnte.

Eine umfassende Klärung, ob Mdm33 alleine wirkt oder essentielle Wechselwirkungspartner vorliegen, ist unerlässlich für das Verständnis seiner Funktion und für das allgemeine Verständnis der mitochondrialen Teilung. Deshalb müssen in Zukunft weitere Versuche unternommen werden, um gleichberechtigte Interaktionspartner von Mdm33 zu finden oder definitiv auszuschließen. Zum einen sollten die diskutierten Verbesserungsvorschläge vorgenommen werden, um weitere genetische Interaktionen zu erfassen. Zum anderen sollten alternative Strategien verfolgt werden. Eine Möglichkeit wären Two-Hybrid-Analysen, mit denen auch spezifische Wechselwirkungen verschiedener Mdm33-Domänen erfasst werden könnten. Darüber hinaus bieten sich Pulldown-Experimente mit anschließender Massenspektrometrie an, um die genaue Zusammensetzung des hochmolekularen Mdm33-Komplexes (Messerschmitt *et al.*, 2003) zu entschlüsseln.

4.2.2 Der Einfluss von Mdm33 auf die mitochondriale Außenmembran-teilungsmaschinerie

Die Außenmembranteilungsmaschinerie in Hefe besteht aus den vier Proteinen Fis1, Mdv1, Caf4 und Dnm1. Dabei wirkt Fis1 als mitochondrialer Membrananker, die Orthologen Mdv1 und Caf4 als Adapter und Dnm1 als die Teilungsschlüsselkomponente, die durch Bildung von Spiralen die Abschnürung des Mitochondrientubulus bewerkstelligt.

Im Rahmen des *MDM33*-Überexpressionsscreens wurden die teilungsdefizienten Mutanten $\Delta mdv1$ und $\Delta dnm1$ als überexpressionstolerant identifiziert. 50% bzw. 100% der Zellen mit Deletion von *MDVI* bzw. *DNMI* waren in der Lage, die überexpressionsbedingte Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien zu kompensieren und wiesen tubuläre Strukturen auf. Die Entstehung des fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Überexpressionsphänotyps kann also durch eine Blockierung der Außenmembranteilungsmaschinerie verhindert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die überexpressionsbedingte äußere Fragmentierung/Aggregation der Mitochondrien durch eine verstärkte Aktivität der Teilungsmaschinerie entsteht. Die bei Überexpression vermehrte Mdm33-Funktion zieht also vermehrte Außenmembranteilung nach sich, was das Modell einer Wirkung von Mdm33 *upstream* der Außenmembranteilungsmaschinerie (Messerschmitt *et al.*, 2003) bestätigt. Wenn mehr Mdm33 mehr Teilung bedeutet, dann sollte auch der Umkehrschluss gültig sein, d. h. bei Deletion sollte eine verringerte Aktivität vorliegen. Indirekt ist das ein weiteres Indiz dafür, dass die ring- und hohlkugelförmigen Mitochondrien der $\Delta mdm33$ -Deletionsmutante – wie von Messerschmitt *et al.* (2003) vorgeschlagen – tatsächlich durch eine reduzierte Teilungsaktivität bei voranschreitender Fusion entstehen.

Mdm33 moduliert also die Teilungsaktivität der Mitochondrien. Grundsätzlich sind zwei Möglichkeiten denkbar, wie eine veränderte Teilungsrate erreicht wird: (1) veränderte mitochondriale Assemblierung der Teilungsschlüsselkomponente Dnm1 oder (2) veränderte Aktivierung der assemblierten Teilungskomplexe. Um diese beiden Fälle zu unterscheiden, wurde durch eine Auszählung von Dnm1-GFP-Clustern die mitochondriale Assemblierung von Außenmembranteilungsmaschinerie-Komplexen verfolgt. Für den Überexpressionsfall war dies jedoch problematisch, da der Phänotyp mit dem verwendeten *GAL*-System sprunghaft und ohne Zwischenstufen entsteht. Dadurch können ausschließlich die mitochondrialen Fragmente/Aggregate als Endpunkt der Phänotypentwicklung analysiert werden, wobei in diesem Stadium die Reaktion bereits abgeschlossen ist. Deshalb wurde wiederum eine Übertragung auf den stabileren Deletionzustand vorgenommen, in dem vermutlich eine verringerte Teilungsaktivität vorliegt. Die Quantifizierung der mitochondrial

lokalisierten Dnm1-GFP-Cluster in der Deletionsmutante zeigte, dass kein großer Einfluss auf die Assemblierung besteht. Im Vergleich zum Wildtyp waren nur 20% weniger Dnm1-Cluster an den Mitochondrien vorhanden, was unabhängig von der Kohlenstoffquellen war. Die Deletion beeinflusst also nicht primär die Assemblierung der Teilungsmaschinerie, sondern möglicherweise *post-targeting* die Ausbildung teilungsaktiver Komplexe. Nach heutigem Wissenstand ist für eine Aktivierung zum einen die Tätigkeit von Mdv1 (Naylor *et al.*, 2006) und zum anderen die Ausbildung von Tubuluseinschnürungen (*Constrictions*) nötig (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Eine Beteiligung von Mdm33 an der Bildung von *Constrictions* würde dem bestehenden Mdm33-Wirkmodell entsprechen. Dieses geht davon aus, dass Mdm33 über homotypische Wechselwirkungen seiner matrixständigen Coiled-coil-Domänen α -helikale Bündel ausbildet und dadurch entgegengesetzte Innenmembranbereiche in räumlich Nähe bringt, wodurch eine Einschnürung des Tubulus erfolgt und eine Fusion der Innenmembranen (= *de facto* Teilung) möglich wird.

Im Rahmen der Arbeit wurden also zusätzliche Anhaltspunkte für das bestehende Wirkmodell von Mdm33 während der mitochondrialen Teilung gefunden. Es sind jedoch noch weitere Schritte erforderlich, um die Funktion von Mdm33 endgültig zu klären. Sinnvoll wäre zum Beispiel *time-lapse* Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit *3D image reconstruction* (analog Legesse-Miller *et al.*, 2003). Dadurch könnte zum einen untersucht werden, ob in der Δ *mdm33*-Deletionsmutante noch *Constrictions* gebildet werden (vollständige Innenmembranteilungsereignisse können über Fluoreszenzmikroskopie nicht aufgelöst werden). Ist dies nicht der Fall, wäre ein direkter Beweis für die Beteiligung von Mdm33 an diesem Prozess erbracht. Unter Verwendung einer Mutante mit reprimierbarer *MDM33*-Expression (z. B. durch Doxycyclin) könnte dieser Prozess nicht nur am Endpunkt der Phänotypentstehung, sondern auch in deren Verlauf erfasst werden. Zum anderen könnte mit dieser Mutante parallel die Entstehung des mitochondrialen Δ *mdm33*-Phänotyps verfolgt werden. Dadurch wären Zwischenschritte erkennbar, die möglicherweise weitere Aussagen über die mechanistischen Grundlagen liefern würden. Auch eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Deletionsstämme Δ *mdv1* und Δ *dnm1* bei Überexpression von *MDM33* könnte hilfreiche Aussagen liefern. In den $\geq 50\%$ verbleibenden tubulären Strukturen sollte die Ausbildung von Septen und Vesikeln verfolgt werden. Sind nach wie vor diese Mdm33-vermittelten Strukturen vorhanden, wäre damit der Beweis einer Außenmembranteilungsmaschinerie-unabhängig fortschreitenden Innenmembranteilung erbracht. Durch Kombination mit Immunogold-Markierung könnte Mdm33 möglicherweise

an den Septen lokalisiert werden, um die spezifische Proteinfunktion innerhalb dieses Prozesses zu beweisen. Diese und weitere Experimente könnten zukünftig helfen, die mechanistischen Details der Mdm33-Funktion herauszuarbeiten, und letztendlich das Modell der mitochondrialen Teilung zu komplettieren.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Ackerman, S.H., Gatti, D.L., Gellefors, P., Douglas, M.G. und Tzagoloff, A. (1991). *ATP13*, a nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* essential for the expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase. *FEBS Lett* 278, 234-238.
- 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.
- Altmann, K. und Westermann, B. (2005). Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16, 5410-5417.
- Andrés, C., Lurin, C. und Small, I.D. (2007). The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiol Plant* 129, 14-22.
- Alvaro, D., Lisby, M. und Rothstein, R. (2007). Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS Genet* 3, e228.
- Attardi, G. und Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4, 289-333.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. und Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Bandy, B. und Davison, A.J. (1990). Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med* 8, 523-539.
- Barros, M.H., Netto, L.E. und Kowaltowski, A.J. (2003). H₂O₂ generation in *Saccharomyces cerevisiae* respiratory *pet* mutants: effect of cytochrome *c*. *Free Radic Biol Med* 35, 179-188.
- Bauer, B.E., Wolfger, H. und Kuchler, K. (1999). Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461, 217-236.
- 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.H., Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1997). Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol* 136, 545-553.
- Bhar, D., Karren, M.A., Babst, M. und Shaw, J.M. (2006). Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *J Biol Chem* 281, 17312-17320.
- Birnboim, H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100, 243-255.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- 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.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.
- Bonawitz, N.D., Rodeheffer, M.S. und Shadel, G.S. (2006). Defective mitochondrial gene expression results in reactive oxygen species-mediated inhibition of respiration and reduction of yeast life span. *Mol Cell Biol* 26, 4818-4829.
- Boveris, A. und Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716.
- 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.
- Broadley, S.A., Demlow, C.M. und Fox, T.D. (2001). Peripheral mitochondrial inner membrane protein, Mss2p, required for export of the mitochondrially coded Cox2p C tail in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 7663-7672.
- Burgess, S.M., Delannoy, M. und Jensen, R.E. (1994). *MMM1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol* 126, 1375-1391.

- Burke, D., Dawson, D. und Stearns, T. (2000) Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Butow, R.A. und Avadhani, N.G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14, 1-15.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. und Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 27393-27398.
- Carlson, C.G., Barrientos, A., Tzagoloff, A. und Glerum, D.M. (2003). COX16 encodes a novel protein required for the assembly of cytochrome oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 3770-3775.
- Carroll, C.W. und Morgan, D.O. (2002). The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase-promoting complex. *Nat Cell Biol* 4, 880-887.
- Cervený, K.L., McCaffery, J.M. und Jensen, R.E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol Biol Cell* 12, 309-321.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E. und Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160, 189-200.
- Chen, X.J., Wang, X., Kaufman, B.A. und Butow, R.A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307, 714-717.
- Claros, M.G. und Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241, 779-786.
- Contamine, V. und Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 281-315.
- Costanzo, M.C. und Fox, T.D. (1986). Product of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene *PET494* activates translation of a specific mitochondrial mRNA. *Mol Cell Biol* 6, 3694-3703.
- Costanzo, M.C., Seaver, E.C. und Fox, T.D. (1989). The *PET54* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of a nuclear gene encoding a mitochondrial translational activator and subcellular localization of its product. *Genetics* 122, 297-305.
- Davidson, J.F. und Schiestl, R.H. (2001). Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 8483-8489.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 847-853.
- Dimmer, K.S., Jakobs, S., Vogel, F., Altmann, K. und Westermann, B. (2005). Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J Cell Biol* 168, 103-115.
- Dumont, M.E., Ernst, J.F., Hampsey, D.M. und Sherman, F. (1987). Identification and sequence of the gene encoding cytochrome *c* heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 6, 235-241.
- Duvezin-Caubet, S., Rak, M., Lefebvre-Legendre, L., Tetaud, E., Bonnefoy, N. und di Rago, J.P. (2006). A "petite obligate" mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F₁-ATPase. *J Biol Chem* 281, 16305-16313.
- Egner, A., Jakobs, S. und Hell, S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3370-3375.
- Ephrussi, B., Hottinguer, H. und Tavlitzi, J. (1949). Action de l'acriflavine sur les levures II. Étude génétique du mutant "petite colonie". *Ann Inst Pasteur* 76, 419-442.
- Epstein, C.B., Waddle, J.A., Hale, W.t., Dave, V., Thornton, J., Macatee, T.L., Garner, H.R. und Butow, R.A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* 12, 297-308.
- Espinet, C., de la Torre, M.A., Aldea, M. und Herrero, E. (1995). An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest. *Yeast* 11, 25-32.
- Fang, J. und Beattie, D.S. (2003). External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34, 478-488.

- Zahedi, R.P., Sickmann, A., Boehm, A.M., Winkler, C., Zufall, N., Schonfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell* 17, 1436-1450.
- Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R.L., Fox, T.D., Tzagoloff, A. und Barrientos, A. (2007). Aberrant translation of cytochrome *c* oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18, 523-535.
- Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P.S. and Butow, R.A. (1995) An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *EMBO J* 14, 3268-76.
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. und Haugland, R.P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* 253, 162-168.

YOR375C GDH1, NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase

ORFs encoding unknown proteins

YBL100C Dubious open reading frame, overlaps the 5' end of ATP1

YDL129W Unknown function

YDL133W Unknown function

YLL033W RRG4, IRC19, Unknown function

YLR202C Dubious ORF, overlaps with COQ9

YMR151W Dubious ORF, overlaps with IMP1

YNL213C RRG9, Unknown function; protein is detected in highly purified mitochondria

YNR042W Dubious ORF, overlaps with COQ2

YOL071W Unknown function

YOL083W Unknown function

YPR123C Dubious ORF, overlaps with CTR1

Im Rahmen der Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Dürr, M., Escobar-Henriques, M., Merz, S., Geimer, S., Langer, T., 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*, 3745-55.

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

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

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.

Sandra Merz-Jakob

Bayreuth, den 28.04.2009