

**Die Rolle des Proteins Fc₁ und der Untereinheiten Su_e/Su_g der
F₁F₀-ATP-Synthase bei der Entstehung von Cristae und Crista
Junctions in Mitochondrien**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Regina Steck
geb. Rabl

aus
Gunzenhausen

München
2010

*Meinem Mann Matthias
und unserer Tochter Klara*

Dissertation eingereicht am: 02.06.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Soll

2. Gutachter: Prof. Dr. Vothknecht

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Neupert

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mitochondrien – ein Überblick	1
1.2	Mitochondriale Morphologie und Dynamik	2
1.3	Mitochondriale Ultrastruktur.....	5
1.4	Die Crista Junction	6
1.5	Subkompartimentalisierung der mitochondrialen Innenmembran	7
1.6	Dynamische Veränderungen der mitochondrialen Innenmembran.....	8
1.6.1	Cristae-Morphologie und Bioenergetik.....	10
1.6.2	Die Atmungskette.....	10
1.6.3	Die mitochondriale F_1F_0 -ATP-Synthase.....	11
1.6.4	Supramolekulare Organisation der F_1F_0 -ATP-Synthase	12
1.7	Die Entstehung der Crista Junctions	14
1.7.1	Mitofilin	16
1.7.2	Mitofilin-ähnliches Protein in <i>S. cerevisiae</i>	17
1.7.3	Die Deletion von Fcj1 führt zur Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur	19
1.7.4	Das Fehlen von Fcj1 beeinträchtigt nicht die oxidative Phosphorylierung	21
1.8	Zielsetzung	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.1.1	DNS-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.1.2	Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen	24
2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	24
2.1.4	Isolierung von genomischer DNS aus <i>S. cerevisiae</i>	25
2.1.5	Konzentrationsbestimmung von DNS.....	26
2.1.6	Restriktionsverdau.....	26
2.1.7	Ethanol-fällung	26
2.1.8	Agarosegelelektrophorese	27
2.1.9	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	27
2.1.10	Ligation von DNS-Fragmenten	27
2.1.11	Präparation transformationskompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	28
2.1.12	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNS	28
2.1.13	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmid-DNS oder PCR-Fragmenten	28
2.1.14	DNS-Sequenzierung.....	29
2.1.15	Verwendete Vektoren.....	30
2.1.16	Verwendete Plasmide	31
2.1.17	Klonierungsstrategien.....	31
2.2	Methoden der Hefegenetik	32

2.2.1	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	32
2.2.2	Methoden der Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	32
2.2.3	Deletion von <i>FCJ1</i> in haploiden Hefestämmen	33
2.2.4	Überprüfung eines Rekombinationsereignisses in <i>S. cerevisiae</i>	33
2.2.5	Analyse des Wachstumsphänotyps	34
2.2.6	Bestimmung des Anteils an rho ^{0/-} -Zellen	34
2.3	Zellbiologische Methoden	34
2.3.1	Präparation von Gesamtzellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	34
2.3.2	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	35
2.3.3	Anreicherung isolierter Mitochondrien mittels diskontinuierlichem Saccharosegradienten	36
2.3.4	Generierung von Mitoplasten durch osmotische Schwellung	37
2.3.5	AMS-Markierungsexperiment	37
2.3.6	Fluoreszenzmikroskopie	38
2.3.7	Chemische Fixierung von Hefezellen	38
2.3.8	Elektronenmikroskopie	39
2.3.9	Cryopräparation isolierter Mitochondrien	40
2.3.10	EM-Tomographie	40
2.4	Proteinchemische Methoden	41
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	41
2.4.2	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	41
2.4.3	Gelelektrophorese	41
2.4.4	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF-Membranen (Western-Blot)	44
2.4.5	Coomassie-Färbung	44
2.4.6	In-Gel-ATPase Aktivität	45
2.4.7	Solubilisierungstest	45
2.4.8	Dichtegradientenzentrifugation	45
2.4.9	Größenausschlusschromatographie	46
2.4.10	Proteinreinigung	47
2.4.11	N-terminale Proteinsequenzierung durch Edman–Abbau	48
2.5	Immunologische Methoden	48
2.5.1	Erzeugung polyklonaler Antikörper	48
2.5.2	Kovalente Kopplung synthetischer Peptide an Sulfolink Coupling Gel® (Pierce)	48
2.5.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern	49
2.5.4	Immundetektion von Proteinen	49
2.6	Kulturmedien	51
2.7	Chemikalien und Geräte	52
2.7.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	52
2.7.2	Geräte	54

3	ERGEBNISSE	57
3.1	Charakterisierung von Fcj1	57
3.1.1	Fcj1 ist im Bereich der Crista Junctions angereichert.....	57
3.1.2	Die Aminosäuresequenz von Fcj1 enthält mehrere Motive, die an einer Protein-Protein-Interaktion beteiligt sein könnten	59
3.1.3	Fcj1 ist Teil eines Proteinkomplexes	60
3.1.4	Fcj1 geht homotypische Interaktionen ein	63
3.2	Einfluss von Fcj1 auf die mitochondriale Architektur	65
3.2.1	Mitochondriale Morphologie von $\Delta fcj1$ -Zellen	65
3.2.2	Fcj1 hat direkten Einfluss auf die Architektur der Crista Junctions	66
3.2.3	Bilden Cristae in $\Delta fcj1$ ein isoliertes Kompartiment?	70
3.3	Die Rolle von Fcj1 und Su e/Su g bei der Bildung der Cristae und Crista Junctions ..	73
3.3.1	In Abwesenheit von Fcj1 bildet die F_1F_0 -ATP-Synthase ‚reißverschlussähnliche‘ Strukturen	73
3.3.2	Fcj1 beeinträchtigt die Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP-Synthase	77
3.3.3	Fcj1 interagiert genetisch mit den Dimerisierungsuntereinheiten Su e und Su g der F_1F_0 -ATP-Synthase.....	80
3.3.4	Die Deletion von Su e und Su g führt zu strukturellen Veränderungen in der mitochondrialen Innenmembran	82
4	DISKUSSION	85
4.1	Fcj1 und die Entstehung von CJs	85
4.1.1	Die Existenz der CJs hängt von Fcj1 ab.....	85
4.1.2	Die Eigenschaften von Proteinen der Mitofilin-Familie	86
4.1.3	Mögliche Funktionen von Proteinen der Mitofilin-Familie	87
4.1.4	Interaktionspartner von Fcj1/Mitofilin	88
4.2	Dynamik der mitochondrialen Innenmembran in $\Delta fcj1$	89
4.3	Die Architektur der mitochondrialen Innenmembran – Molekulare Grundlagen	90
4.3.1	Welche Voraussetzungen erfordert die Krümmung von biologischen Membranen?	90
4.3.2	Welchen Beitrag leistet Fcj1 zur Modulation der Innenmembran?	92
4.3.3	Einfluss der F_1F_0 -ATP-Synthase auf die Topologie der Cristaemembran	93
4.3.4	Modell zur Bildung von Crista Junctions und Cristae in Mitochondrien	94
4.4	Ausblick	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	SUMMARY	101
7	LITERATURVERZEICHNIS	103
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	119
	Danksagung	122
	Lebenslauf	124

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien – ein Überblick

Vor etwa 120 Jahren wurden die Mitochondrien aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung im Lichtmikroskop als ‚Fadenkörner‘ beschrieben, was dem Griechischen ‚*Mitos*‘ (Faden) und ‚*Chondros*‘ (Korn) entspricht [Scheffler, 2007]. Der Endosymbiontentheorie zufolge war der Vorläufer der Mitochondrien ein aerob lebendes α -Proteobakterium, welches vor etwa 1,5 Milliarden Jahren von einer anaeroben proto-eukaryontischen Zelle aufgenommen wurde [Gray, 1992; Margulis, 1971]. Ein Hinweis darauf ist der Aufbau der Mitochondrien aus einer äußeren und einer inneren Membran. Letztere umschließt die mitochondriale Matrix, welche dem Zytoplasma der Bakterienzelle entspricht. Mitochondrien besitzen außerdem ihr eigenes genetisches Material [Nass und Nass, 1963]. Im Laufe der Evolution gingen die meisten Gene des Endosymbionten verloren oder wurden in den Kern der Wirtszelle ausgelagert [Andersson *et al.*, 1998; Karlberg *et al.*, 2000]. Heute variieren die Größe der mitochondrialen DNA (mtDNA) und auch die Anzahl der darauf verbliebenen Gene je nach Organismus stark [Burger *et al.*, 2003].

Bis auf sehr wenige Ausnahmen besitzen alle eukaryontischen Zellen Mitochondrien, die neben der Energiegewinnung aus der oxidativen Phosphorylierung [Hatefi, 1985] weitere essentielle Funktionen übernommen haben. Dazu zählen die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Zentren [Lill und Mühlenhoff, 2006], Teile des Lipidstoffwechsels und des Aminosäuremetabolismus [Scheffler, 2007] sowie Schlüsselrollen im Calcium-Haushalt [Pozzan *et al.*, 1994] und in der Regulation des programmierten Zelltods [Bernardi *et al.*, 1999]. Nur ein geringer Bruchteil der Gene des mitochondrialen Proteoms befindet sich auf der mtDNA.

Schätzungsweise 99 % der rund 1000-2000 Proteine, die an Aufbau und Funktion der Mitochondrien beteiligt sind, werden von der genomischen DNA kodiert und an zytosolischen Ribosomen translatiert. Für den anschließenden Transfer in die Mitochondrien ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Proteinkomplexe in den mitochondrialen Membranen verantwortlich [Mokranjac und Neupert, 2009]. Den Transport fast aller Proteine über und in die mitochondriale Außenmembran vermittelt der TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane of mitochondria*). Eine Ausnahme bilden carboxyterminal verankerte Proteine der Außenmembran, deren Insertion unabhängig von den bisher bekannten Translokasen zu erfolgen scheint [Kemper *et al.*, 2008; Setoguchi *et al.*, 2006]. Im Inter-

membranraum, dem Bereich zwischen Außen- und Innenmembran, werden alle Proteine, die nicht direkt über den TOM-Komplex in die Außenmembran inseriert wurden, je nach Bestimmungsort an weitere Komponenten der Import-Maschinerie übergeben.

Chaperone des Intermembranraums und der TOB-Komplex (*translocase of mitochondrial outer membrane β -barrel proteins*) in der Außenmembran bewerkstelligen die Insertion von β -barrel-Proteinen in die mitochondriale Außenmembran [Paschen *et al.*, 2005; Waizenegger *et al.*, 2003; Waizenegger *et al.*, 2004]. Für die Oxidation und Faltung löslicher Proteine des Intermembranraums mit konservierten Cystein-Motiven ist das Disulfidbrücken-Transfer-System mit den Komponenten Mia40 und Erv1 zuständig [Grumbt *et al.*, 2007; Mesecke *et al.*, 2005]. Die TIM23-Translokase (*translocase of the inner membrane of mitochondria*) vermittelt Membranpotential- und ATP-abhängig der Transport von Vorläuferproteinen mit aminoterminalen Sortierungssignal in die Matrix [Jensen und Dunn, 2002] oder, sofern dem Sortierungssignal eine hydrophober Bereich folgt, die Insertion in die mitochondriale Innenmembran [Glick *et al.*, 1992; Jensen und Dunn, 2002]. Proteine mit mehreren Transmembrandomänen und einem internen Sortierungssignal werden aufgrund ihrer Hydrophobizität von Chaperonen durch den Intermembranraum zum TIM22-Komplex geleitet und von diesem membranpotentialabhängig in die Innenmembran inseriert [Adam *et al.*, 1999; Jensen und Dunn, 2002]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Insertion in die Innenmembran ausgehend von der Matrix über die Innenmembrankomponente Oxa1. Davon betroffen sind sowohl mitochondrial kodierte als auch kernkodierte Proteine, die zuvor über die Komplexe TOM und TIM23 die Matrix erreichten [Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001]. Dieser Prozess ähnelt der Insertion von Proteinen in die bakterielle Innenmembran und wird daher in Anlehnung an die mitochondrialen Vorläufer als ‚konservativer‘ Sortierungsweg bezeichnet [Baumann *et al.*, 2002].

1.2 Mitochondriale Morphologie und Dynamik

Die Morphologie von Mitochondrien variiert zwischen verschiedenen Organismen und Zelltypen stark [Frey und Mannella, 2000]. Anders als in Lehrbüchern meist dargestellt, sind Mitochondrien keine statischen isolierten Strukturen, sondern sehr dynamische Organellen. In *S. cerevisiae* durchziehen sie die Zelle unterhalb des Zellkortex in Form eines tubulären Netzwerks [Egner *et al.*, 2002]. Dieses wird von ständig stattfindenden Fusions- und Teilungsvorgängen aufrechterhalten [Nunnari *et al.*, 1997]. Ein Übermaß an Teilung führt zur

Fragmentierung des Netzwerks, während unverhältnismäßig viel Fusion die Ausbildung netzartiger Strukturen zur Folge hat [Sesaki und Jensen, 1999] (Abbildung 1).

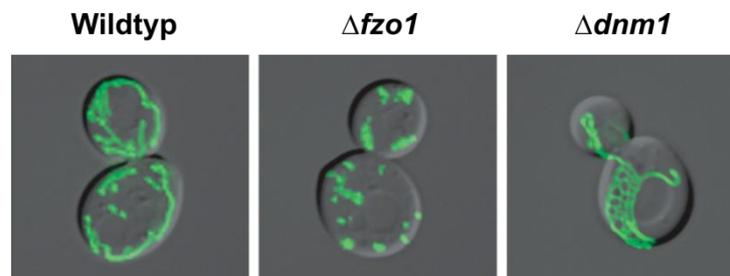


Abbildung 1: Mitochondriale Morphologie in *S. cerevisiae*. Gezeigt ist das mitochondriale Netzwerk des Wildtyps, einer Fusionsmutante ($\Delta fzo1$) und einer Teilungsmutante ($\Delta dnm1$). Als mitochondrialer Marker dient Matrix-dirigiertes GFP. Modifiziert nach Okamoto und Shaw, 2005.

Für die Teilung essentiell ist die Dynamamin-ähnliche GTPase Dnm1/DRP1 [Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999]. In Hefe wird Dnm1 von dem mitochondrialen Protein Fis1 mit Hilfe der Adapterproteine Mdv1 und Caf4 [Mozdy *et al.*, 2000; Griffin *et al.*, 2005] oder Fis1-unabhängig über Num1 [Cervený *et al.*, 2007] vom Zytosol zu zukünftigen Teilungsorten an der mitochondrialen Oberfläche rekrutiert. Dort assembliert es mit anderen Dnm1-Molekülen und bildet unter GTP-Hydrolyse spiralförmige Strukturen um die mitochondrialen Tubuli. Man vermutet, dass eine Verengung der Dnm1-Helix die Abschnürung einzelner Fragmente vom mitochondrialen Netzwerk bewirkt [Ingelman *et al.*, 2005]. Der detaillierte Teilungsmechanismus und insbesondere die Funktionen der nicht-essentiellen Komponenten Caf4 und Num1 bei der Rekrutierung von Dnm1 sind bisher nicht bekannt. Ebenfalls unklar ist, ob die Aktivität von Dnm1 ausreicht, um auch die Innenmembran zu durchtrennen, oder ob diese Membran eine separate Teilungsmaschinerie besitzt [Westermann, 2008].

Die Fusion zweier Doppelmembranen stellt hohe Anforderungen an die beteiligten Komponenten, da unter Wahrung der Integrität der dazwischenliegenden Kompartimente die Fusionsreaktionen von vier Lipiddoppelschichten koordiniert werden müssen. Die Vereinigung der Außenmembranen und der darunter befindlichen Innenmembranen zweier mitochondrialer Fragmente laufen als voneinander trennbare Prozesse mit unterschiedlichen energetischen Anforderungen ab [Meeusen *et al.*, 2004]. In Hefe besteht die Fusionsmaschinerie aus Fzo1 und Ugo1 in der Außenmembran und der Dynamamin-ähnlichen GTPase Mgm1 im Intermembranraum. Die Deletion jeder dieser Komponenten resultiert in der Fragmentierung der Mitochondrien und dem Verlust der mtDNA [Herlan *et al.*, 2003;

Hermann *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 2001; Sesaki *et al.*, 2003a]. Die beiden GTPasen Fzo1 und Mgm1 sind für das Andocken der äußeren respektive inneren Membranen zuständig und vermutlich auch für die anschließende Durchmischung der fusionierenden Lipiddoppelschichten [Meeusen *et al.*, 2004; Meeusen *et al.*, 2006]. Ugo1 wurde in einem Proteinkomplex mit Fzo1 und Mgm1 gefunden, und man vermutet man eine Rolle bei der Koordination von Außen- und Innenmembranfusion [Hoppins *et al.*, 2009; Sesaki und Jensen, 2004; Wong *et al.*, 2003].

Für das hohe Maß an mitochondrialer Dynamik werden verschiedene Funktionen postuliert: Da Mitochondrien nicht *de novo* entstehen können, gewährleistet ihre Teilung im Rahmen der Zellteilung die gleichmäßige Verteilung auf die Tochterzellen. Bei der Fusion zweier Hefezellen dient die mitochondriale Fusion zur Durchmischung der parentalen mtDNA [Berger und Yaffe, 2000]. Fusion und Teilung ermöglichen zudem die Komplementation mitochondrialer Genprodukte in Zellen, die geschädigte mtDNA enthalten [Sato *et al.*, 2006]. Schäden der mtDNA gelten als eine Ursache der Zellalterung, gegen welche die mitochondriale Dynamik möglicherweise als Schutzmechanismus dient [Scheffler, 2007]. Einem anderen Denkansatz zufolge könnte die mitochondriale Dynamik eine Rolle bei der Qualitätskontrolle von Mitochondrien spielen. Dass geschädigte Mitochondrien nicht mehr mit dem mitochondrialen Netzwerk fusionieren, könnte ihrer räumlichen Isolation und dem anschließenden Abbau dienen [Duvezin-Caubet *et al.*, 2006; Herlan *et al.*, 2004]. Ein intaktes Netzwerk ermöglicht auch die Übertragung von Energie in Form des mitochondrialen Membranpotentials in der gesamten Zelle [Amchenkova *et al.*, 1988]. Unabhängig vom Ort der Substrateinspeisung ist somit in Zellregionen mit gesteigertem Energiebedarf die Synthese von ATP möglich. Auch bei Zelldifferenzierungsprozessen ist die intrazelluläre Verteilung von Mitochondrien von Bedeutung. So hängt in Neuronen Ausbildung und Dichte von Synapsen von einem intakten mitochondrialen Netzwerk in den Dendriten ab [Li *et al.*, 2004]. Schließlich ist eine Aktivierung der mitochondrialen Teilungsprozesse auch an der Ausführung des programmierten Zelltods beteiligt. Eine Inhibition der Teilung kann die Empfänglichkeit der Zelle für apoptotische Stimuli reduzieren [Frank *et al.*, 2001; Karbowski und Youle, 2003; Lee *et al.*, 2004]. Der Zusammenhang von mitochondrialer Fragmentierung mit anderen proapoptischen Prozessen wie der Freisetzung von Cyt c und der Aktivierung von Bax sind Gegenstand kontroverser Diskussionen [Cheung *et al.*, 2007].

1.3 Mitochondriale Ultrastruktur

Erste Einblicke in die mitochondriale Architektur verdanken wir den elektronenmikroskopischen Pionierarbeiten von Palade und Sjöstrand in den 1950er Jahren [Palade, 1953; Palade, 1952; Sjöstrand, 1953]. Mitochondrien werden von zwei Membranen, der Außenmembran und der Innenmembran, umgeben. Beide begrenzen den dazwischenliegenden Intermembranraum. Innerhalb der Innenmembran differenziert man zwischen der parallel zur Außenmembran verlaufenden inneren Grenzmembran und der Cristaemembran. Die Cristaemembran besteht aus Einstülpungen der inneren Grenzmembran in die Matrix.

Je nach Gewebe, physiologischem Zustand und Entwicklungsstadium ist die mitochondriale Ultrastruktur extrem variabel. So wurden tubuläre, vesikuläre, lamellenförmige und sogar dreieckige Cristae beschrieben [Fawcett, 1981; Munn, 1974; Revel *et al.*, 1963] (Abbildung 2).

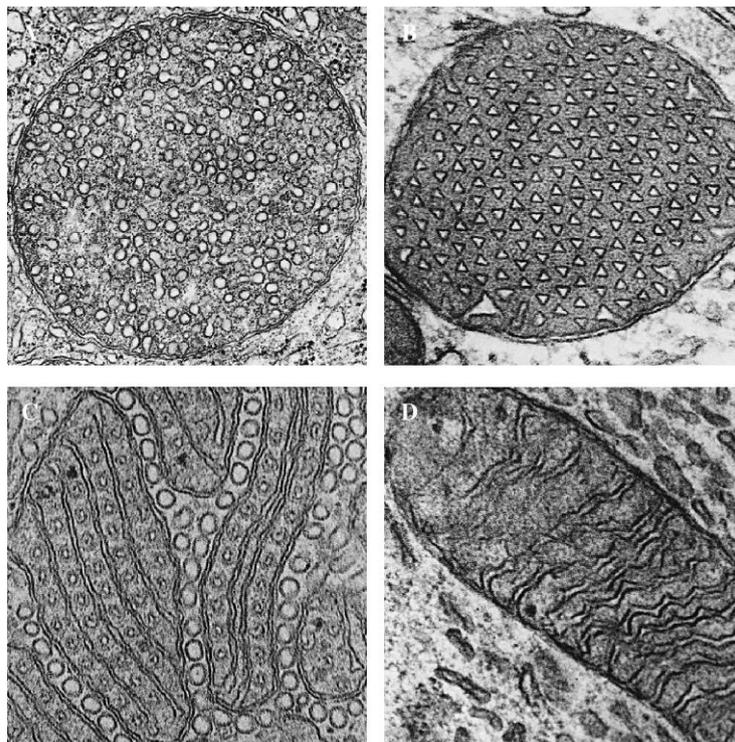


Abbildung 2: Variabilität mitochondrialer Innenmembranarchitektur. Dargestellt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Cristae aus verschiedenen Zelltypen. (A) Nierenkortex. (B) Astrocyt. (C) Pseudobranchus eines Fisches. (D) Ventrikulärer Herzmuskel. Aus Fawcett, 1981.

Eine Beteiligung an der Organisation der Cristaemembran konnte für mehrere Proteine gezeigt werden. Das Fehlen der mitochondrialen Fusionskomponente Mgm1 aus Hefe äußert sich in einer reduzierten Cristaemenge [Sesaki *et al.*, 2003b], während die Herunterregulie-

rung ihres humanen Orthologs OPA1 eine Desorganisation der Cristae einschließlich Vesikelbildung und Vergrößerung des intracristalen Raums zur Folge hat [Olichon *et al.*, 2003]. Innenmembranvesikel in Kombination mit Innenmembransepten entstehen auch, wenn das an der Ausbildung des Protonenkanals der F_1F_0 -ATP-Synthase beteiligte Protein Atp6 aus *S. cerevisiae* (siehe 1.6.3) fehlt [Rak *et al.*, 2007]. Ohne das Hefeprotein Mmm1 kollabiert die Innenmembran und bildet anstelle tubulärer Cristae außergewöhnlich lange Membranlamellen oder ringförmige Strukturen [Hobbs *et al.*, 2001]. Auch mit Erkrankungen des Menschen stehen zahlreiche Veränderungen der mitochondrialen Architektur in Zusammenhang. Im Fall der Alzheimer-Krankheit treten atypische Cristae in Form konzentrischer und paralleler Innenmembranstapel in Kombination mit mitochondrialen Einschlüssen auf [Baloyannis, 2006]. Desweiteren lassen sich eine Vergrößerung des intracristalen Raums und insbesondere der Cristaspitzen in einem Mausmodell für die Kupferstoffwechselstörung Morbus Wilson [Roberts *et al.*, 2008] oder die starke Reduktion der Cristae in Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit anführen [Beal, 2007; Exner *et al.*, 2007].

1.4 Die Crista Junction

Die Interpretation der ersten elektronenmikroskopischen Bilder gestaltete sich aufgrund der komplexen Struktur der Mitochondrien und ihrer Größe von mehreren 100 μm nicht immer leicht. Für die elektronenmikroskopische Analyse werden dünne Schnitte von einer Stärke zwischen 5 und 100 nm hergestellt, so dass die daraus resultierenden Bilder keine realistische Einsicht in die dreidimensionale Struktur des mitochondrialen Membransystems liefern können. Erst die Methode der Elektronentomographie ermöglichte die dreidimensionale Rekonstruktion größerer Raumvolumina. Daher wurden in den vergangenen Jahrzehnten kontroverse Diskussionen bezüglich der Innenmembranorganisation der Mitochondrien geführt. Auf Palade geht das *baffle*-Modell zurück, demzufolge die *cristae mitochondriales* als Einstülpungen der Innenmembran mit großen Öffnungen zum Intermembranraum gelten [Palade, 1953; Palade, 1952]. Sjöstrand interpretierte die gleichen Innenmembranstrukturen als durchgängige Septen (*septa*-Modell) [Sjöstrand, 1953]. Mit der transmissionselektronenmikroskopischen Analyse sehr dünner Serienschnitte identifizierten Daems und Wisse 1966 kleine tubuläre Strukturen zwischen Cristae und innerer Grenzmembran, die sie als *pediculi cristae* („Cristae-Füße“) bezeichneten [Daems und Wisse, 1966]. Akzeptanz fand dieses Modell allerdings erst Jahre später, als es von Mannellas elektronentomographischen Analysen isolierter Rattenlebermitochondrien gestützt wurde

[Mannella *et al.*, 1997; Mannella *et al.*, 1994]. Zwischenzeitlich belegen mehrere Studien, dass die Cristae mit der inneren Grenzmembran über schmale tubuläre Öffnungen, die ‚Crista Junctions‘ (CJs), in Kontakt stehen. Mittlerweile wurden CJs in den Mitochondrien verschiedenster Organismen und Geweben wie Hühner-, Ratten und Mausneuronen [Perkins *et al.*, 1997; Perkins *et al.*, 2003], *N. crassa* [Nicastro *et al.*, 2000], braunem Fettgewebe [Perkins *et al.*, 1998], humanen Lymphoblasten [Acehan *et al.*, 2007] und *S. cerevisiae* [Rabl, Soubannier *et al.*, 2009] nachgewiesen (Abbildung 3).

Auffällig ist, dass bei aller Varianz innerhalb der Cristae die Form und Größe der CJs sehr einheitlich ist. Der Durchmesser der tubulären oder schlitzförmigen Strukturen reicht von 12 bis 40 nm [Frey und Mannella, 2000; Nicastro *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 2003]. Ihre Länge beträgt meist zwischen 30 und 50 nm, im Fall von *N. crassa* wurden aber auch 150 bis 200 nm gemessen [Nicastro *et al.*, 2000].

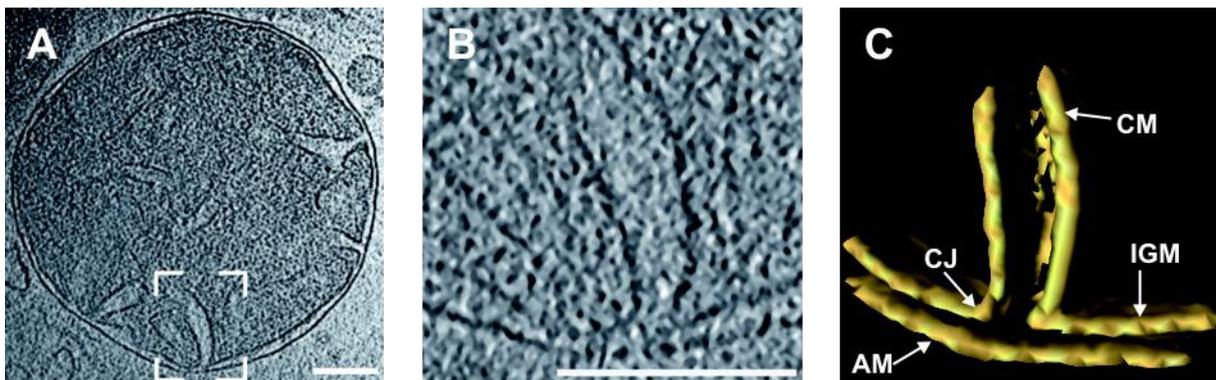


Abbildung 3: Crista Junctions verbinden die innere Grenzmembran mit der Cristaemembran. Cryo-EM-Tomogramm einer typischen Crista Junction in *S. cerevisiae*. (A) Schnitt durch das Tomogramm eines isolierten Wildtyp-Mitochondriums. (B) Vergrößerung des markierten Ausschnitts aus A. (C) Oberflächengerenderte Ansicht einer Crista Junction. Größenmarker 100 nm. AM, Außenmembran; CJ, Crista Junction; CM, Cristaemembran; IGM, Innere Grenzmembran. Modifiziert nach Rabl, Soubannier *et al.*, 2009.

1.5 Subkompartimentalisierung der mitochondrialen Innenmembran

Eine mögliche Funktion der CJ ist die Ausbildung mitochondrialer Subkompartimente [Mannella *et al.*, 1997; Mannella *et al.*, 1994]. Als Diffusionsbarrieren zwischen Inter-membranraum und intracristalem Raum könnten sie die Verteilung von Protonen oder ADP kontrollieren und folglich regulativ auf die oxidative Phosphorylierung Einfluss nehmen [Mannella *et al.*, 1994; Mannella *et al.*, 2001]. Auch die Verteilung von Membranproteinen zwischen innerer Grenzmembran und Cristaemembran könnte über die CJs reguliert werden. Insbesondere oligomere Proteinkomplexe des Proteinimports oder der Atmungskette könnten

in ihrer lateralen Diffusion in die Cristae oder aus den Cristae eingeschränkt sein [Frey *et al.*, 2002; Perkins *et al.*, 1997; Reichert und Neupert, 2002].

Die Idee der Subkompartimentalisierung existiert bereits, seit die Elektronenmikroskopie die morphologische Unterscheidung von innerer Grenzmembran und Cristaemembran ermöglichte, sie erfuhr jedoch erst kürzlich erneut experimentelle Unterstützung: Wurm und Jakobs bestimmten mittels Fluoreszenzmikroskopie die mitochondriale Lokalisierung verschiedener GFP-markierter Innenmembranproteine. Wegen des begrenzten Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops arbeiteten sie mit Hefemutanten, die vergrößerte Mitochondrien besitzen [Wurm und Jakobs, 2006]. Proteine der oxidativen Phosphorylierung färbten das Mitochondrieninnere und somit die Cristae an, während Komponenten des Proteinimports sich in der Peripherie befanden und folglich der inneren Grenzmembran zugeordnet wurden [Wurm und Jakobs, 2006]. In einer weiteren Studie wurden 20 repräsentative Proteine der mitochondrialen Innenmembran mittels quantitativer Immun-Elektronenmikroskopie lokalisiert. Je nach Zugehörigkeit zu den verschiedenen in Mitochondrien ablaufenden Prozesse wie oxidativer Phosphorylierung oder Proteintranslokation waren die Proteine ungleich zwischen innerer Grenzmembran und Cristaemembran verteilt [Vogel *et al.*, 2006].

1.6 Dynamische Veränderungen der mitochondrialen Innenmembran

Vogel und Kollegen zeigten nicht nur, dass die bevorzugte Lokalisierung mitochondrialer Innenmembranproteine von ihrer Funktion innerhalb der Mitochondrien abhängt, sondern auch, dass je nach physiologischer Situation eine dynamische Umverteilung von Proteinen zwischen den Cristae und der inneren Grenzmembran möglich ist. Dies wurde unter anderem für die essentielle Import-Komponente Tim23 demonstriert. Unter physiologischen Bedingungen befindet sich Tim23 größtenteils in der inneren Grenzmembran. Eine Steigerung der Importaktivität durch die Überexpression eines mitochondrialen Proteins führt zur verstärkten Anreicherung von Tim23 in der inneren Grenzmembran, während die Inhibierung des Proteinimports durch den Stop der zytosolischen Proteinsynthese eine teilweise Umverteilung von Tim23 in die Cristae zur Folge hat [Vogel *et al.*, 2006]. Somit muss eine Art Barriere existieren, die die Aufrechterhaltung dieser Proteingradienten ermöglicht, die aber je nach Situation eine flexible Neuverteilung erlaubt.

Dass die Cristae auf äußere Einflüsse mit dynamischen Veränderungen reagieren, beobachtete Hackenbrock bereits im Jahr 1966. Er definierte in isolierten Rattenmitochondrien zwei morphologische Zustände, die sich in der Ausdehnung von Matrix und Cristaeraum voneinander unterscheiden: In ‚kondensierten‘ Mitochondrien bilden die Cristae ein einziges großes Kompartiment mit langen tubulären Verbindungen zueinander und zur inneren Grenzmembran, während die Matrix auf ein geringes Volumen kondensiert ist. Bei einer Ausdehnung des Matrixvolumens in ‚orthodoxen‘ Mitochondrien bilden sich kurze tubuläre oder flache Cristae, die über jeweils ein oder zwei CJs mit der inneren Grenzmembran in Verbindung stehen [Hackenbrock, 1966]. Computersimulationen sagen vorher, dass der kondensierte Zustand auf Dauer die Depletion von ADP zur Folge hat, da über die langen tubulären Segmente die Diffusion der Metaboliten erschwert ist. Ein Abfall der lokalen ATP-Produktion wäre die Folge [Mannella, 2006]. Tatsächlich beobachtete Hackenbrock morphologische Übergänge vom ‚kondensierten‘ zum ‚orthodoxen‘ Zustand in isolierten Rattenmitochondrien [Hackenbrock, 1966; Hackenbrock, 1968]. Nach Mannellas Modell könnte diese Veränderung der Cristaemorphologie bei zytosolischem ADP-Mangel die ATP-Produktion optimieren, indem sie die Verfügbarkeit von ADP in den Mitochondrien verbessert.

In Anpassung an den zunehmenden Druck der sich ausdehnenden Matrix sind die CJ-Durchmesser in ‚orthodoxen‘ Mitochondrien im Durchschnitt um 4 nm schmaler als in ‚kondensierten‘ Mitochondrien [Frey *et al.*, 2002]. Im Gegensatz dazu führt die Kondensation der Matrix in isolierten Mitochondrien aus *Xenopus laevis* oder Rattenleber zu einer Erweiterung der CJs in dem Ausmaß, dass sie letztlich kaum noch als definierte Strukturen erkennbar sind [Frey *et al.*, 2002; Hackenbrock, 1966]. Auch die konservierte Struktur der CJ reagiert also auf Umstrukturierungen der Innenmembran flexibel.

Neben ihrer Schlüsselrolle im Energiemetabolismus nehmen Mitochondrien auch in der Regulation des programmierten Zelltods eine zentrale Funktion ein. Dabei ist die Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) aus dem Intermembranraum ein wichtiger Schritt [Yang *et al.*, 1997]. In isolierten Mitochondrien aus Mausleber löst die Inkubation mit einer trunkierten Form des pro-apoptotischen Proteins Bid die Umkehr der Membrankrümmung in den Cristae aus. In Verbindung damit entsteht innerhalb der Cristae ein labyrinthartiges Netzwerk, der Durchmesser der CJs nimmt zu und Cyt c wird ausgeschüttet [Scorrano *et al.*, 2002]. Obwohl mehr als 85 % des Cyt c im Intracristalraum gespeichert ist [Bernardi und Azzone, 1981], scheint die Freisetzung vollständig zu sein [Goldstein *et al.*, 2005; Goldstein *et al.*, 2000]. Die Permeabilisierung der Außenmembran dagegen erlaubt lediglich die Freisetzung des Cyt c-

Anteils aus dem Intermembranraum (15 %) [Scorrano *et al.*, 2002]. Computersimulationen zufolge stellen CJs allerdings keine unüberwindbare Diffusionsbarriere für die Freisetzung von Cyt c dar [Manor *et al.*, 2006]. Experimentell gestützt wird dieser Gedanke von der Beobachtung, dass es bereits vor den typischen apoptotischen Umstrukturierungen im Bereich der Cristae zur effektiven Freisetzung von Cyt c kommt [Sun *et al.*, 2007]. Die Frage nach der physiologischen Bedeutung der Cristae-Umstrukturierung ist Gegenstand aktueller Diskussion. Dennoch scheint eine grundlegende Umgestaltung der Cristaemembran und insbesondere der CJs ein notwendiger Schritt im Ablauf der Apoptose zu sein.

1.6.1 Cristae-Morphologie und Bioenergetik

Bereits in den 1950er Jahren formulierte Palade den Gedanken, dass die Einstülpungen der mitochondrialen Innenmembran der Oberflächenvergrößerung dienen und somit die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung erhöhen könnten [Palade, 1953]. Dazu passt das ungewöhnlich hohe Protein zu Lipid Verhältnis (~75:25) der mitochondrialen Innenmembran [Scheffler, 2007]. Der Großteil dieser Proteine besteht aus Komponenten der oxidativen Phosphorylierung.

1.6.2 Die Atmungskette

Die erwähnten Komponenten der oxidativen Phosphorylierung setzen sich aus den Atmungskettenkomplexen I bis IV und der F_1F_0 -ATP-Synthase in der mitochondrialen Innenmembran zusammen. In Hefe wird Komplex I allerdings von NADH-Dehydrogenasen in der Innen- und Außenmembran ersetzt.

Die Proteinkomplexe der Atmungskette übertragen Elektronen ausgehend von Reduktionsäquivalenten aus katabolen Reaktionen schrittweise über mehrere Redoxreaktionen auf molekularen Sauerstoff: Die beim Elektronentransport im elektrochemischen Potentialgefälle freiwerdende Energie wird zum Transport von Protonen gegen das Konzentrations- und Ladungsgefälle aus der Matrix in den Intermembranraum genutzt [Saraste, 1999]. Die Energie dieses von Peter Mitchell als ‚Chemiosmotische Hypothese‘ bezeichneten Vorgangs treibt die Generierung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat über die F_1F_0 -ATP-Synthase an [Mitchell, 1961]. Dabei gelangen die Protonen zurück in den Matrixraum.

Die Gesamtorganisation der einzelnen Atmungskettenkomponenten in der inneren Mitochondrienmembran ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Der traditionellen Sicht

entspricht das *fluid state*-Modell, wonach sich alle Komplexe unabhängig voneinander frei in der Lipiddoppelschicht bewegen. Der Elektronentransport ist dabei diffusionsabhängig [Hackenbrock *et al.*, 1986]. Den Gegenentwurf dazu bildet das *solid state*-Modell, das von einer hochgradigen Organisation und stabilen physischen Interaktion der Atmungskettenkomplexe innerhalb der Membran ausgeht. Dadurch wäre eine direkte und effiziente Elektronenweiterleitung gewährleistet [Chance und Williams, 1955]. Dieses Modell aus dem Jahr 1955 erfuhr in den letzten Jahren Unterstützung vor allem struktureller Art durch die Isolation supermolekularer Strukturen („Respirasomen“) aus Hefe, Pflanzen und Säugerzellen [Cruciat *et al.*, 2000; Dudkina *et al.*, 2006a; Schägger und Pfeiffer, 2000; Stroh *et al.*, 2004]. Möglicherweise ist die Ausbildung dieser respiratorischen Superkomplexe auch nur ein erster Schritt in der Assemblierung übergeordneter supramolekularer Strukturen, welche als *respiratory strings*, also kettenförmige Aneinanderreihungen mehrerer Respirasomen, bezeichnet werden [Wittig *et al.*, 2006]. Ob die hochorganisierte Anordnung der Atmungskette nur der Stabilität und enzymatischen Effizienz dient, oder ob sie auch auf die Form und Gestalt der Cristaemembran Einfluss nimmt, ist bisher unbekannt.

1.6.3 Die mitochondriale F_1F_0 -ATP-Synthase

Die von F_1F_0 -ATP-Synthasen vermittelte Generierung von ATP ist ein fundamentaler biochemischer Prozess in Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien. Der dafür verantwortliche etwa 600 kD große Proteinkomplex [Rubinstein *et al.*, 2003] besteht in Hefemitochondrien aus mindestens 17 verschiedenen Untereinheiten [Velours und Arselin, 2000]. In seiner Hauptfunktion dient er als Protonen-getriebene ATP-Synthase, in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten kann er unter ATP-Hydrolyse aber auch Protonen gegen das Konzentrationsgefälle pumpen. Dies dient der Aufrechterhaltung des Membranpotentials, das dann als Triebkraft für den Proteinimport und Transport von Metaboliten zur Verfügung steht [Capaldi und Aggeler, 2002; Devenish *et al.*, 2000].

F_1F_0 -ATP-Synthasen bestehen aus zwei funktionellen Bestandteilen. Der katalytische F_1 -Komplex befindet sich bei Mitochondrien in der Matrix und der Oligomycin-sensitive F_0 -Komplex, der als Protonenkanal fungiert, in der Innenmembran. Ersterer setzt sich in allen Organismen aus den Untereinheiten α , β , γ , δ und ϵ im Verhältnis 3:3:1:1:1 zusammen. Das globuläre Kopfstück, in dem die Proteine α und β in alternierender Folge angeordnet sind, umgibt die zentrale Achse aus γ , δ und ϵ -Untereinheiten, die F_1 mit F_0 verbindet. Sowohl α als auch β besitzen ADP/ATP-Bindungsstellen, jedoch sind nur die β -Untereinheiten

katalytisch aktiv [Abrahams *et al.*, 1994]. Die Zusammensetzung von F_0 variiert je nach Organismus und ist in Eukaryonten um einiges komplexer als in Prokaryonten. In Hefe besteht F_0 aus einem Ring aus 10 Monomeren der Untereinheit 9 (Su 9) [Stock *et al.*, 1999], der mit je einer Untereinheit 6 und 8 und der hydrophoben Domäne von Untereinheit 4 (Atp4) assoziiert ist. Die Proteine OSCP, 4, d, h, f, 8 und i bilden den peripheren Steg, der ebenfalls Teil der F_0 -Untereinheit ist. Der periphere Steg steht über die δ -Untereinheit mit dem Kopfstück in Kontakt. Alle diese Komponenten sind für die Enzymaktivität unentbehrlich [Velours und Arselin, 2000]. Die Untereinheiten e (Su e), g (Su g), i/j und k durchspannen die Innenmembran an der Verbindungsstelle von Su 9-Ring und peripherem Steg und sind bis auf i/j für die Enzymaktivität nicht essentiell [Arnold *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 1999].

Die Protonen-Translokation durch den hydrophoben Teil der F_1F_0 -ATP-Synthase führt zur Rotation des Su 9-Rings und der zentrale Achse. Dabei dreht sich die γ -Untereinheit im α,β -Hexamer und bewirkt dadurch Konformationsänderungen in den β -Untereinheiten des globulären Kopfteils, welche die ATP-Synthese vorantreiben [Senior *et al.*, 2002]. Die Rotation der katalytischen Untereinheiten wird durch die Assoziation mit dem peripheren Steg verhindert [Duncan *et al.*, 1995].

1.6.4 Supramolekulare Organisation der F_1F_0 -ATP-Synthase

Dafür, dass die F_1F_0 -ATP-Synthase in der mitochondrialen Innenmembran nicht als Monomer vorliegt, gibt es eine Vielzahl von Evidenzen. Der erste biochemische Nachweis dimerer Formen in Hefe stammt von Arnold und Kollegen [Arnold *et al.*, 1998]. Inzwischen wurden Dimere und Oligomere auch aus verschiedenen anderen Organismen isoliert [Arselin *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2005; Schägger und Pfeiffer, 2000]. Die Dimere, für deren Stabilisierung die Untereinheiten Su e und Su g verantwortlich sind [Arnold *et al.*, 1998], gelten als Grundbaueinheiten höherer Oligomere [Krause *et al.*, 2005; Wittig und Schägger, 2005]. Chemische Quervernetzungsexperimente führten zur Identifikation von e-e und g-g Homodimeren und e-g Heterodimeren an den Berührungsflächen der F_1F_0 -ATP-Synthase-Dimere und -Oligomere [Arselin *et al.*, 2003; Brunner *et al.*, 2002; Bustos und Velours, 2005]. Die Deletion oder Herunterregulierung von Su e oder Su g oder die Mutation des GXXXG-Dimerisierungsmotivs in der Transmembrandomäne einer dieser beiden Komponenten hat den Verlust der Dimere und Oligomere der F_1F_0 -ATP-Synthase, aber keine Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität zur Folge. Allerdings fehlen die bekannten Cristae-Strukturen. Stattdessen wird die Innenmembrananordnung der Deletionsstämme als

zwiebelartig beschrieben [Arselin *et al.*, 2003; Arselin *et al.*, 2004; Bustos und Velours, 2005; Giraud *et al.*, 2002; Paumard *et al.*, 2002b] (Abbildung 4A). Einen ähnlichen Phänotyp wie die Deletion von Su e und Su g verursacht die Deletion der ersten Transmembrandomäne von Su 4 [Soubannier *et al.*, 2002]. Auch die Untereinheiten h und i wurden in chemischen Quervernetzungsexperimenten an den Berührungsflächen zweier Monomere der F₁F₀-ATP-Synthase nachgewiesen [Fronzes *et al.*, 2003; Fronzes *et al.*, 2006; Paumard *et al.*, 2002a]. Als mögliche Hauptdimerisierungskomponente wurden kürzlich jedoch Untereinheit a vorgeschlagen, deren Dimere über ihre Transmembrandomänen zwei Su 9-Ringe verbinden könnten. Die Protein-Interaktionen der Untereinheiten e, g, 4, i und h hätten in diesem Szenario eine stabilisierende Funktion [Wittig *et al.*, 2008]. Welche Komponenten für die Ausbildung oder Stabilisierung der höheren Oligomere verantwortlichen sind, ist bisher kaum bekannt [Wittig und Schägger, 2008].

In Anbetracht der Auswirkung, die die Zerstörung der oligomeren Formen auf die mitochondriale Ultrastruktur hat, geht man seit einigen Jahren davon aus, dass die F₁F₀-ATP-Synthase neben ihrer Enzymaktivität auch für die Cristae-morphologie eine wichtige Rolle spielt. Die supramolekulare Anordnung dieses Enzymkomplexes scheint zur Tubulation der Innenmembran zu führen [Allen, 1995]. Dafür verantwortlich könnte die V-förmige Anordnung der beiden F₀-Domänen innerhalb eines Dimers sein, die zur lokalen Beugung der Membran führt (Abbildung 4B).

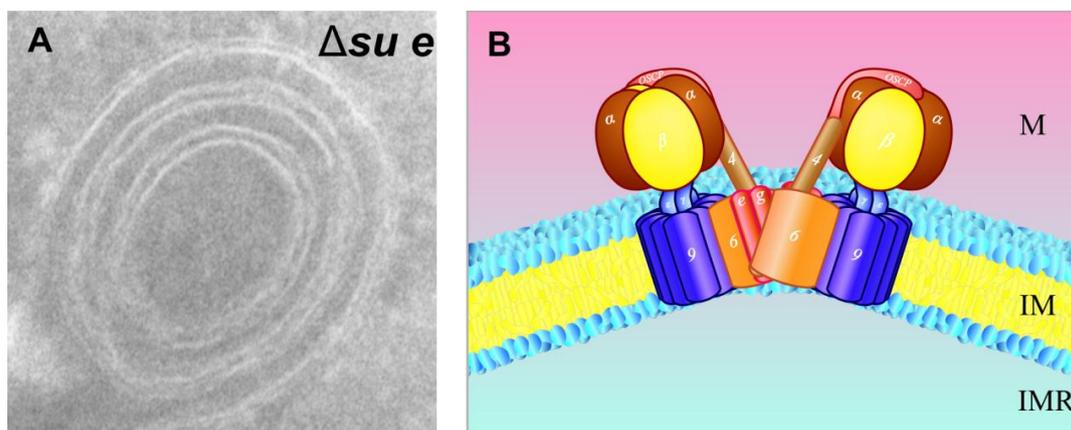


Abbildung 4: Bedeutung der Dimerisierung und Oligomerisierung der F₁F₀-ATP-Synthase für die Cristae-Morphologie. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondriums aus einer chemisch fixierten Hefezelle, in der die Untereinheit Su e der F₁F₀-ATP-Synthase deletiert wurde ($\Delta su e$). Dimere und Oligomere der F₁F₀-ATP-Synthase fehlen in diesem Stamm, und die Cristae zeigen die typische zwiebelähnliche Struktur. (B) Modell für die von Dimeren der F₁F₀-ATP-Synthase induzierte Krümmung der mitochondrialen Innenmembran. Gezeigt ist ein Dimer der F₁F₀-ATP-Synthase aus *S. cerevisiae* in Seitenansicht. IM, Innenmembran; IMR, Intermembranraum; M, Matrix. Modifiziert nach Zick *et al.*, 2009.

In Übereinstimmung damit hat die Quervernetzung von Monomeren der F_1F_0 -ATP-Synthase über ihren F_1 -Teil die Beeinträchtigung ihres nativen räumlichen Anordnungswinkels und damit den Verlust der normalen Cristae-Strukturen zur Folge [Gavin *et al.*, 2004]. Die Bestimmung der dreidimensionalen Anordnung in der Membran einschließlich der Neigungswinkel der monomeren Komplexe zueinander ist Gegenstand aktueller Forschung [Dudkina *et al.*, 2006b; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005].

Neben der Ausbildung homooligomerer Strukturen wurde auch von Interaktionen der F_1F_0 -ATP-Synthase mit dem ADP/ATP-Transporter und dem Phosphattransporter berichtet [Chen *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2003]. In diesem als ‚ATP-Synthasom‘ bezeichneten Superkomplex könnten die Synthese von ATP und der Austausch von ADP und Phosphat gegen ATP als hoch koordinierte Prozesse ablaufen und damit die Effizienz der Zellatmung erhöhen.

1.7 Die Entstehung der Crista Junctions

Über die Entstehung von CJs und insbesondere die daran beteiligten Komponenten ist wenig bekannt. Einerseits könnte es sich um thermodynamisch stabile Membranstrukturen handeln. Nach einem Modell von Renken und Kollegen ergeben sich Form und Größe der CJs aus dem Volumen der umgebenden Matrix und dem Druck, der durch deren Begrenzung durch die Außenmembran erzeugt wird [Renken *et al.*, 2002]. Die Beugungsenergie, die zur Erzeugung der mit 90° sehr starken Membrankrümmung aufgewendet werden muss, würde dabei durch den hohen Anteil des ‚*nonbilayer*‘-Lipids Phosphatidylethanolamin in der Innenmembran reduziert. Renken und Kollegen postulieren daher eine Rolle der ‚*nonbilayer*‘-Lipide in der Ausbildung komplexer Membrantopologien, wie sie im Bereich der CJ auftreten [Renken *et al.*, 2002]. Der Gedanke, dass diese Strukturen spontan auftreten, wird von der Beobachtung gestützt, dass experimentelles Schwellen der Matrix (‚orthodoxer‘ Zustand) in isolierten Hefe-Mitochondrien das Auftreten von CJs induziert, die im vorherigen ‚kondensierten‘ Zustand fehlten. Da dies reversibel ist, wurde eine dynamische Bildung der CJs vorgeschlagen [Mannella *et al.*, 2001].

Alternativ könnte die Membrankrümmung im Bereich der CJ durch Strukturproteine hervorgerufen werden. Die Innenmembranfusionskomponente Mgm1 liegt in zwei Isoformen vor, einer langen (l-Mgm1) und einer kurzen (s-Mgm1), welche sich beide im Intermembranraum befinden. S-Mgm1 ist membranassoziiert und geht durch proteolytische Spaltung aus der in der Innenmembran verankerten Variante l-Mgm1 hervor [Herlan *et al.*, 2003]. Homotypische Interaktionen von Mgm1 gelten als kritisch für die Innenmembrandynamik

und Aufrechterhaltung der Cristaestrukturen. Einem Modell von Meeusen und Kollegen zufolge könnten trans-Interaktionen im Intermembranraum die Aneinanderheftung benachbarter Innenmembranflächen vermitteln [Meeusen *et al.*, 2006]. Dabei könnten auch die Strukturen der CJs geformt werden.

Die Dynamin-ähnliche GTPase OPA1 ist das humane Ortholog zu Mgm1. Sie besitzt mehrere lange und kurze Isoformen, die durch alternatives Spleißen und proteolytische Spaltung entstehen, und ist wie Mgm1 für die Fusion der mitochondrialen Innenmembran und die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Netzwerks essentiell. Wird OPA1 in HeLa-Zellen herunterreguliert, so erscheinen die Cristae verkürzt und ballonförmig. Begleiterscheinungen sind die Freisetzung von Cyt c und eine erhöhte Sensitivität der Zellen für apoptotische Vorgänge [Olichon *et al.*, 2003]. Scorrano und Kollegen zeigten, dass die Freisetzung von Cyt c mit der Fusion der Cristae zu einem einzigen großen Kompartimenten und der Erweiterung der CJs einhergeht [Scorrano *et al.*, 2002]. Der molekulare Mechanismus dieser Veränderungen ist unbekannt, als einer der beteiligten Komponenten wird jedoch OPA1 diskutiert: Die Überexpression dieses Proteins verhindert die im Wildtyp durch cBID induzierbare Vergrößerung des CJ-Durchmessers [Frezza *et al.*, 2006]. Dies wird auf homotypische Interaktionen zwischen einer innenmembranständigen und einer im Intermembranraum befindlichen OPA1-Form zurückgeführt [Frezza *et al.*, 2006]. Demnach könnte OPA1 die Weite des CJ-Durchmessers über das Zusammenspiel seiner langen und kurzen Isoformen regulieren.

Die Prohibitine sind eine evolutionär konservierte Familie von Membranproteinen, deren mitochondrialen Vertretern PHB1 und PHB2 Funktionen im Rahmen von Zellproliferation, Cristae-Morphogenese und funktioneller mitochondrialer Integrität zugeschrieben werden [Merkwirth und Langer, 2009]. Eine mögliche Verbindung zwischen CJs und den Prohibitinen beruht auf deren inhibitorischem Einfluss auf die proteolytische Prozessierung von OPA1. In Abwesenheit der Prohibitine ist der Abbau der langen Isoformen von OPA1 zu den kurzen beschleunigt [Merkwirth *et al.*, 2008]. Der Vorschlag einer direkten Beeinflussung der Cristaemorphologie und speziell der CJs durch die Prohibitine geht auf die Beobachtung zurück, dass der isolierte Prohibitin-Komplex in Hefe eine ringförmige Struktur in der mitochondrialen Innenmembran bildet. Dessen Außenmaße von 27x20 nm ähneln denjenigen des CJ-Durchmessers [Tatsuta *et al.*, 2005]. Somit könnten sowohl OPA1/Mgm1 als auch die Prohibitine Einfluss auf die Gestalt der CJs zu haben. Da die Deletion oder Herunterregulierung der genannten Proteine allerdings nicht zur Abwesenheit der CJs führt, können beide Komponenten nicht essentiell für die Entstehung der CJs sein. Dieser

Zusammenhang ist bisher nur für Proteine der Mitofilin-Familie bekannt. Diesen Proteinen widmen sich die folgenden Kapitel.

1.7.1 Mitofilin

Wegen der hohen Abundanz seiner messenger-RNA in Herzgewebe wurde Mitofilin ursprünglich HMP (*heart muscle protein*) genannt [Icho *et al.*, 1994]. Molekulare Charakterisierungen wiesen es als integrales Protein der mitochondrialen Innenmembran aus, dessen carboxyterminaler Hauptanteil in den Intermembranraum ragt [Gieffers *et al.*, 1997; Odgren *et al.*, 1996]. Der Name Mitofilin geht auf seine Co-Lokalisierung mit Filament-ähnlichen Mitochondrien in Fibroblasten zurück [Odgren *et al.*, 1996]. Basierend auf Sequenzanalysen, die auf eine mögliche ATP-Bindedomäne und eine lange α -helikale Anordnung von Aminosäure-Resten hindeuten, wurde zunächst eine Funktion als Kinesin-ähnliches Motorprotein vorgeschlagen [Icho *et al.*, 1994]. Dagegen sprechen jedoch die subzelluläre Lokalisierung, die für Motorproteine ungewöhnliche Resistenz gegenüber der Extraktion mit Detergenzien und die Tatsache, dass die mögliche ATP-Bindedomäne mit der mitochondrialen Signalsequenz überlappt. Stattdessen spekulierten Odgren und Kollegen über eine mögliche Beteiligung an der Verknüpfung mitochondrialer Kontaktstellen mit dem Zytoskelett. Als Gründe führten sie die Lokalisierung in der mitochondrialen Peripherie und die Detergenz-resistente Verknüpfung zwischen Mitochondrien und zytoskeletalen Elementen auf [Odgren *et al.*, 1996].

Herunterregulierungsstudien in HeLa-Zellen und elektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass das Fehlen von Mitofilin die Anordnung der mitochondrialen Innenmembran grundlegend verändert [John *et al.*, 2005]. An die Stelle tubulärer oder vesikulärer Cristae treten eng gepackte Membranstapel, die ein labyrinthartiges Netzwerk ausbilden (Abbildung 5). Im Verhältnis zur Außenmembran ist der Anteil der Innenmembranen deutlich erhöht. CJs wurden nicht nachgewiesen. Die Zellproliferation ist leicht verringert. Erhöht sind dagegen die Apoptoserate, die ROS-Produktion und das Membranpotential. Dies könnte auf eine Beeinträchtigung des Ionen- und Metabolit-Austauschs in den dicht gepackten Innenmembranen zurückzuführen sein. Alles in allem gilt Mitofilin als kritischer Organisator der mitochondrialen Cristaemorphologie [John *et al.*, 2005].

Mitofilin wurde mehreren Berichten zufolge mit pathologischen Situationen in Zusammenhang gebracht. Bei Wüstenrennmäusen korreliert eine Aminosäuresubstitution in einer konservierten Domäne von Mitofilin mit der Anfälligkeit für epileptische Anfälle

[Omori *et al.*, 2002]. Beim fötalen Downsyndrom ist die Menge dieses Proteins um fast 50 % erniedrigt [Myung *et al.*, 2003]. Im Gegensatz dazu ist die Menge an Mitofilin in alternden Rattenskelettmuskeln erhöht [O'Connell und Ohlendieck, 2009]. Desweiteren treten Veränderungen des Proteins in Zusammenhang mit oxidativem Stress auf. Dies äußert sich sowohl in oxidationsbedingten Modifikationen von Cystein- und Tryptophan-Seitenketten [Suh *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2003] als auch in einer Reduktion der Proteinmenge [Magi *et al.*, 2004]. Auch die Exposition von isolierten Rattenhirnmitochondrien mit dem reaktiven Dopaminchinon führt zu reduzierten Proteinmengen von Mitofilin [Van Laar *et al.*, 2008] sowie zu kovalenten Modifikationen des Proteins, die seine Funktion beeinträchtigen könnten [Van Laar *et al.*, 2009].

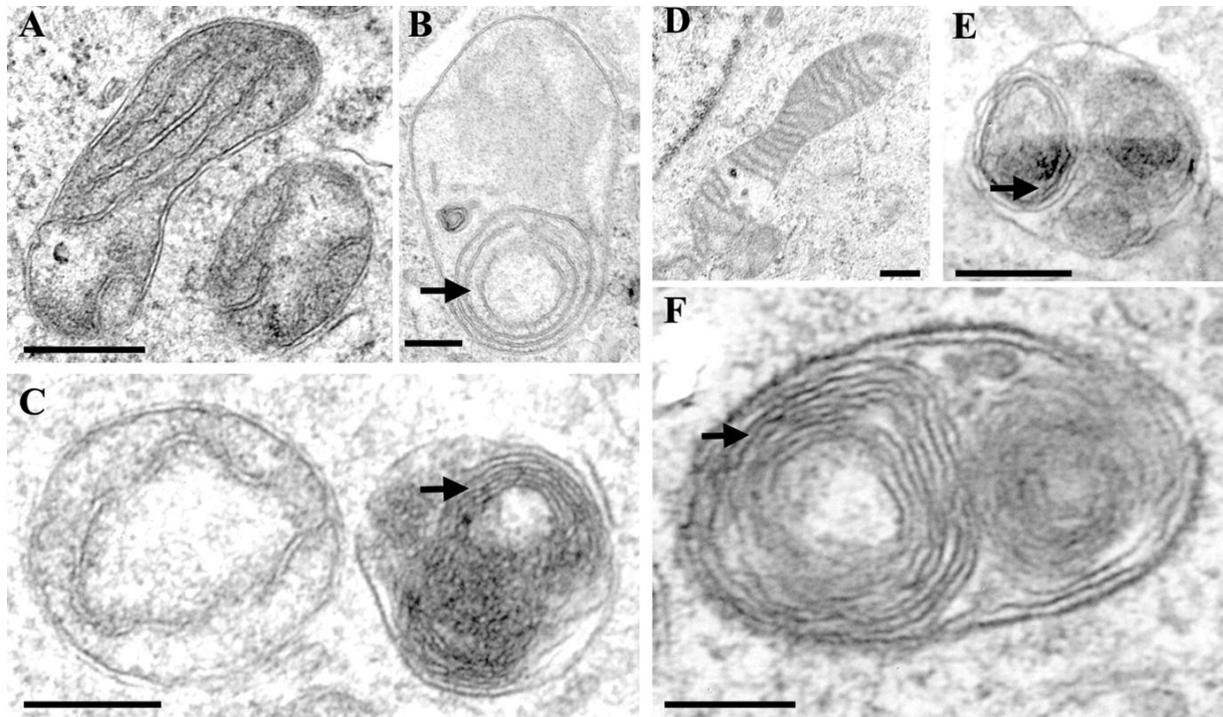


Abbildung 5: Die Abwesenheit von Mitofilin führt zu grundlegenden Veränderungen der mitochondrialen Ultrastruktur. Elektronenmikroskopische Bilder der Kontrolle (A und D) und von Mitofilin-siRNA-behandelten HeLa-Zellen (B,C,E und F) nach einer ersten (A-C) und zweiten (D-F) Transfektionsrunde. Pfeile weisen auf die zahlreichen Innenmembranschichten hin. Größenmarker 250 nm. Aus John *et al.*, 2005.

1.7.2 Mitofilin-ähnliches Protein in *S. cerevisiae*

Mitofilin wurde bisher in humanem Gewebe, Maus und Ratte nachgewiesen [Odgren *et al.*, 1996]. Auch die Bäckerhefe besitzt ein Protein, das Mitofilin entfernt in seiner Amino-

säuresequenz, vor allem aber in der aminoterminalen Lage der Transmembrandomäne, der *Coiled coil*-Region und einer konservierten carboxyterminalen Domäne ähnelt (Abbildung 6).

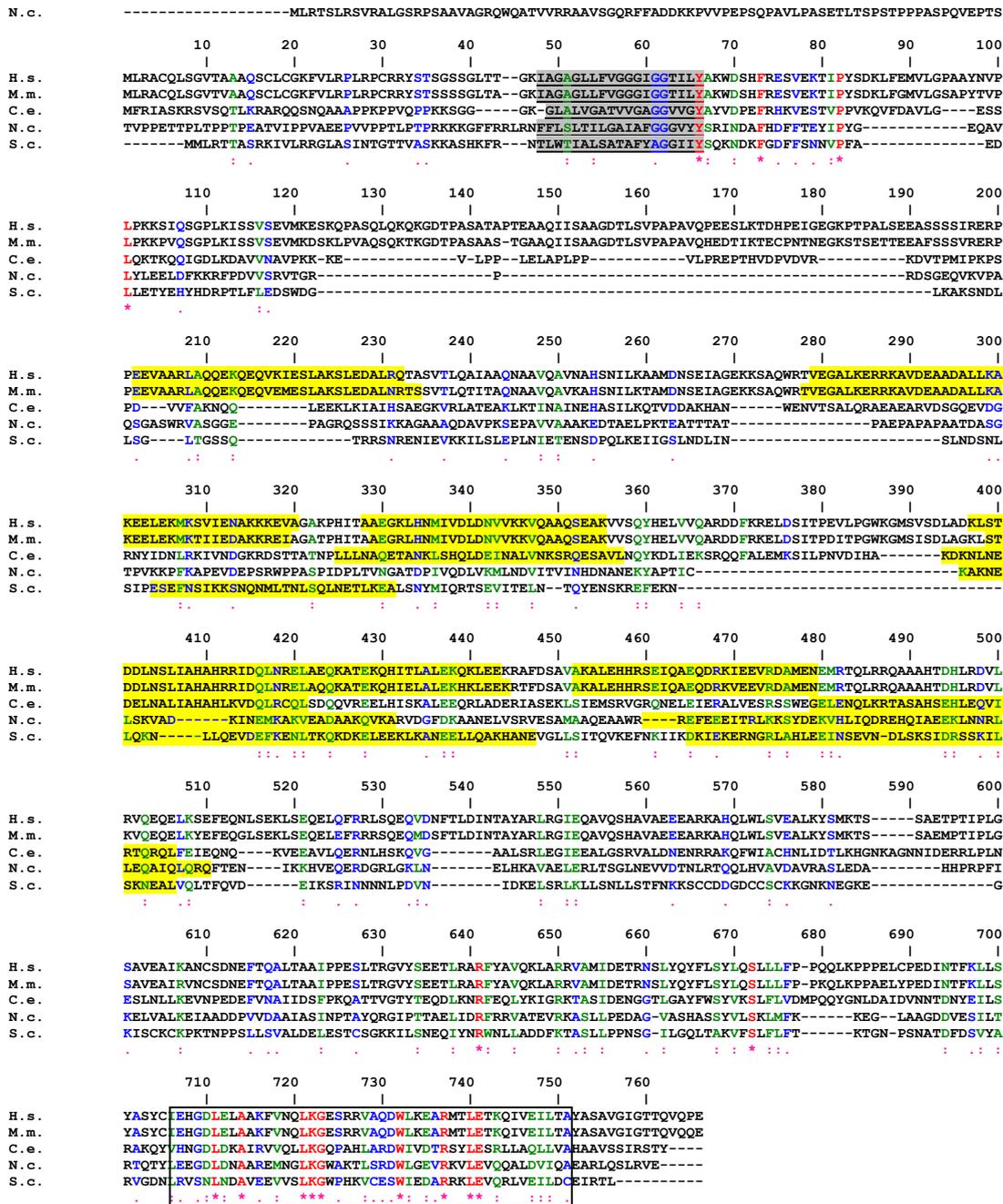


Abbildung 6: Sequenzvergleich von Mitofilin-ähnlichen Proteinen verschiedener Organismen. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen Q16891 (*Homo sapiens*; H. s.), Q8CAQ8 (*Mus musculus*; M. m.), Q22505 (*Caenorhabditis elegans*; C. e.), Q7SFD8 (*Neurospora crassa*; N. c.) und von Fcj1 (*Saccharomyces cerevisiae*; S. c.). Die Lage der in allen Spezies vorhergesagten Transmembrandomäne ist unterstrichen und grau markiert, vorhergesagte *coiled coil*-Regionen sind gelb markiert. Eine konservierte carboxyterminale Domäne ist schwarz umrahmt. Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des Programms ClustalW [Thompson *et al.*, 1994] durchgeführt. Markiert wurden identische Aminosäuren (*) sowie konservative (:) und semi-konservative (.) Substitutionen. [Rabl, Soubannier *et al.*, 2009].

Die Sequenzübereinstimmung mit humanem Mitofilin und Maus-Mitofilin beträgt 13 bzw. 12 %. Für dieses bisher uncharakterisierte Protein kodiert der offene Leserahmen YKR016w (FMP13, AIM28). Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten wird es im Folgenden als *formation of crista junction protein 1* (Fcj1) bezeichnet. Die Basischarakterisierung wurde kürzlich in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Vincent Soubannier durchgeführt: Zellfraktionierungs-Experimenten zufolge befindet sich Fcj1 ausschließlich in den Mitochondrien (Abbildung 7A). Wie humanes Mitofilin handelt es sich um eine Komponente der mitochondrialen Innenmembran, deren carboxyterminaler Hauptteil in den Intermembranraum ragt (Abbildung 7B und C).

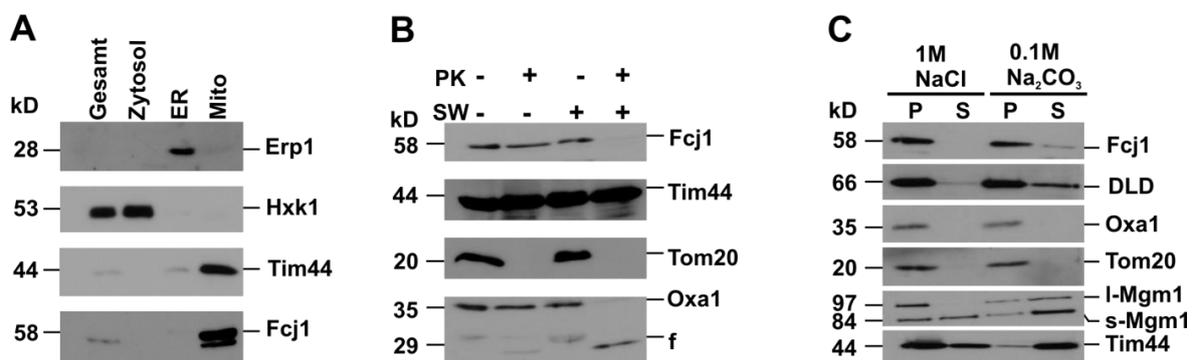


Abbildung 7: Fcj1 ist ein Protein der mitochondrialen Innenmembran. (A) Subzelluläre Fraktionierung von Wildtyp-Hefezellen. In gleichen Proteinmengen (50 µg) von Hefezellen (Gesamt), Zytosol, Mikrosomen (ER) und Mitochondrien (Mito) wurden mittels Western Blot die folgenden Proteine nachgewiesen: Erp1 (ER), Fcj1, Hxk1 (Zytosol) und Tim44 (Mito). (B) Submitochondriale Lokalisierung von Fcj1. In Wildtyp-Mitochondrien und durch osmotisches Schwellen erzeugten Mitoplasten (SW) wurden nach Behandlung mit Proteinase K (PK) mittels Western Blot die Proteine Fcj1, Oxa1, Tim44 und Tom20 nachgewiesen. f, spezifisches Abbaufragment von Oxa1. (C) Membranassoziation von Fcj1. Isolierte Hefemitochondrien des Wildtyps wurden mit Natriumchlorid (NaCl) oder Natriumkarbonat (Na₂CO₃) extrahiert. In den membran- (P) und löslichen Proteinfraktionen (S) wurden mittels Western Blot die angegebenen Markerproteine nachgewiesen. Aus Rabl, Soubannier *et al.*, 2009. Durchführung Dr. Vincent Soubannier.

1.7.3 Die Deletion von Fcj1 führt zur Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur

Die Deletion von Fcj1 äußert sich in einer drastischen Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur: Dr. Soubanniers Analysen elektronenmikroskopischer Aufnahmen zufolge ist zwar die mitochondriale Fläche im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht, jedoch ist die Fläche pro mitochondrialem Querschnitt in der Mutante verdoppelt. Verdoppelt ist auch der Anteil der Innenmembranen relativ zur Außenmembran. Dies ist auf die Akkumulation isolierter Cristaevesikel zurückzuführen. Die Cristae sind häufig in Form konzentrischer dicht gepackter Membranstapel arrangiert. CJs fehlen vollständig (Abbildung 8).

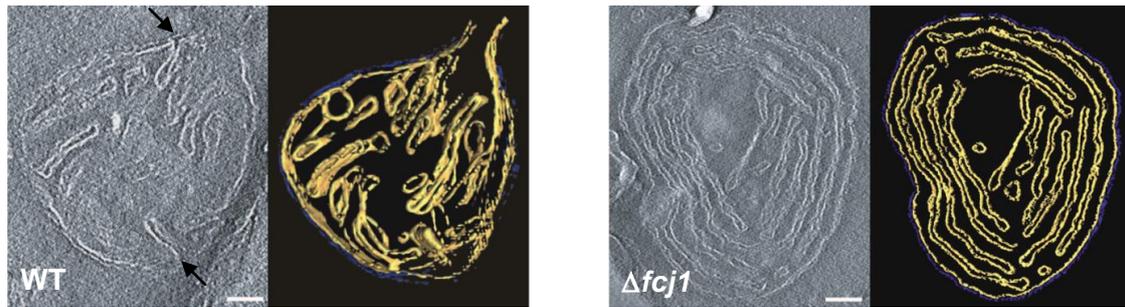


Abbildung 8: Die Deletion von Fcj1 äußert sich im Fehlen von CJs und in grundlegenden Veränderungen der mitochondrialen Ultrastruktur. EM-Tomogramme chemisch fixierter Hefezellen. Dargestellt ist jeweils ein Schnitt durch das Tomogramm (links) und eine oberflächengerenderte Ansicht (rechts) eines Wildtyp (WT)- oder $\Delta fcj1$ -Mitochondriums. Die Außenmembranen wurde blau eingefärbt und die Innenmembranen gelb. Pfeile weisen auf Crista Junctions im Wildtyp hin. Aus Rabl, Soubannier *et al.*, 2009. Durchführung Dr. Vincent Soubannier und Dr. Marek Cyrklaff.

Neben Fcj1 äußert sich auch die Deletion der Untereinheiten Su e und Su g der F_1F_0 -ATP-Synthase in einer veränderten Christaemorphologie. Dr. Soubannier zeigte, dass die ungewöhnliche mitochondriale Ultrastruktur von $\Delta fcj1$ ebenso wenig auf veränderte Proteinmengen von Su e oder Su g zurückzuführen ist, wie die Deletionen von Su e oder Su g die Proteinmenge von Fcj1 beeinflussen. Weiterhin sind auch die Mengen anderer mitochondrial kodierter und kernkodierter Proteine, die an der Aufrechterhaltung verschiedener mitochondrialer Funktionen wie der Teilung und Fusion, der oxidativen Phosphorylierung oder dem Proteinimport beteiligt sind, in keiner dieser drei Mutanten beeinträchtigt (Abbildung 9).

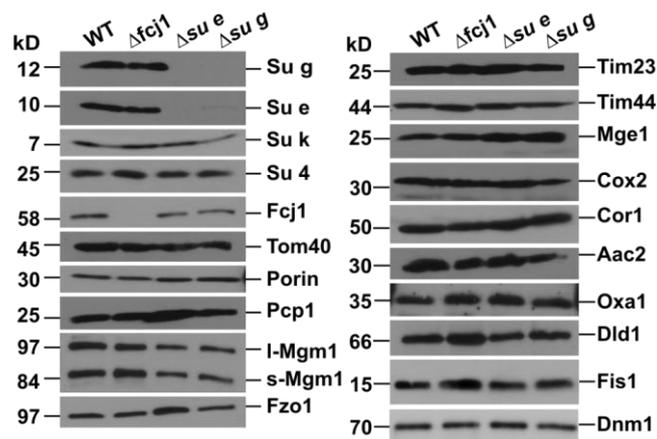


Abbildung 9: Die Deletionen von Fcj1, Su e und Su g haben keinen Einfluss auf die Mengen anderer mitochondrialer Proteine. In den Gesamtzellextrakten von Wildtyp (WT), $\Delta fcj1$, $\Delta Su e$ und $\Delta Su g$ wurden die angegebenen Antikörper mittels Western Blot nachgewiesen. Aus Rabl, Soubannier *et al.*, 2009. Durchführung Dr. Vincent Soubannier.

1.7.4 Das Fehlen von Fcj1 beeinträchtigt nicht die oxidative Phosphorylierung

Neben der Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur hat die Deletion von Fcj1 auch einen erhöhten Verlust an mtDNA zur Folge, der je nach Zelldichte und Wachstumsmedium zwischen 15 und 40 % variiert. In isolierten Mitochondrien der Mutante beobachtete Dr. Soubannier zudem eine rund 30 %ige Reduktion der Respirationsrate sowohl in Gegenwart von ADP (Status III) als auch ohne ADP (Status IV) im Vergleich zum Wildtyp. Auch die maximale Entkopplungsrate ist um etwa 30 % reduziert. Anders als für die Herunterregulierung von Mitofilin in HeLa-Zellen beschrieben [John *et al.*, 2005], ist auch das Membranpotential $\Delta\Psi$ leicht reduziert (Tabelle 1). Die Kopplung von Atmungskette und F_1F_0 -ATP-Synthase (Status III/Status IV) ist jedoch vergleichbar mit derjenigen des Wildtyps. Somit sind Respirationsdefizite der Mutante eher auf den sekundären Effekt des mtDNA-Verlusts als auf primäre Defekte der oxidativen Phosphorylierung zurückzuführen. Zusammenfassend hat Fcj1 nur eine geringe Sequenzähnlichkeit mit humanem Mitofilin. Sein struktureller Aufbau und der Deletionsphänotyp weisen es dennoch als Mitofilin-Ortholog aus.

Bioenergetische Eigenschaften	WT	$\Delta fcl1$
Entkoppelte Atmung (nmol Sauerstoff/ min/mg Protein)	248.5 \pm 41.27 (n=3)	174.6 \pm 30.9 (n=3) (70 % des WT)
Atmungskontrollrate (Status III/ Status IV)	3.01 \pm 0.23 (n=3)	2.93 \pm 0.09 (n=3)
Membranpotential $\Delta\Psi$ ($\Delta F/F$)	0.285 \pm 0.019 (n=3)	0.221 \pm 0.032 (n=3) (78 % des WT)
ATPase -Aktivität (nmol P_i /min/mg Protein)		
- Oligomycin	1393 \pm 231 (n=3)	1264 \pm 121 (n=3) (91 % des WT)
+ Oligomycin	275 \pm 93 (n=3)	256 \pm 102 (n=3) (93 % des WT)

Tabelle 1: Bioenergetische Charakterisierung der Hefestämme Wildtyp (WT) und $\Delta fcl1$. Die Bestimmung der bioenergetischen Eigenschaften wurde an isolierten Mitochondrien aus Zellen, die bei 30 °C auf Laktatmedium angezogen worden waren, durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (\pm) aus n Messungen. F, Fluoreszenz. P_i , anorganisches Phosphat. Nach Rabl, Soubannier *et al.*, 2009. Durchführung Dr. Vincent Soubannier.

1.8 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den molekularen Mechanismus zu untersuchen, der der Entstehung von Cristae und Crista Junctions in Mitochondrien zugrundeliegt. Konkret galt das Interesse der Rolle von Fcj1 bei der Ausbildung von Crista Junctions im Modellorganismus *S. cerevisiae*. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass Fcj1 ein Protein der mitochondrialen Innenmembran ist, aber nicht, welche Aufgabe es dort erfüllt.

Daher galt es zunächst, die Lokalisierung von Fcj1 in der mitochondrialen Innenmembran zu bestimmen. Zudem sollte untersucht werden, ob Fcj1 die Fähigkeit zur Ausbildung von Proteinkomplexen und zur Interaktion mit anderen Proteinen besitzt.

Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen war die Beobachtung, dass die Cristae in elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Stammes $\Delta f cj 1$ keine Verbindung zum Intermembranraum besitzen. Somit stellte sich die Frage, ob die Cristae in dieser Mutante tatsächlich ein abgeschlossenes Subkompartiment bilden.

Um herauszufinden, inwieweit sich Manipulationen der Proteinmenge von Fcj1 auf die mitochondriale Ultrastruktur auswirken, sollten die Phänotypen von Überexpression und Herunterregulierung charakterisiert werden. Desweiteren galt es, die Folgen der Überexpression und Deletion von Fcj1 auch auf biochemischer Ebene zu analysieren.

Ein besonderer Schwerpunkt lag auf dem potentiellen Zusammenhang zwischen Fcj1 und der F_1F_0 -ATP-Synthase. Man geht davon aus, dass die Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP-Synthase an der Bildung der Cristae beteiligt sind. Bei der Analyse des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus lag das Augenmerk auf den Untereinheiten Su e und Su g. Es galt die Frage zu beantworten, ob diese Untereinheiten auch an der Entstehung und Gestalt der CJs Anteil haben.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 DNS-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNS-Fragmenten *in vitro* [Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988]. Mit Hilfe einer DNS-Polymerase und spezifischer einzelsträngiger Oligonukleotide werden ausgewählte DNS-Fragmente amplifiziert, welche in den darauffolgenden PCR-Zyklen als Ausgangsmaterial zur exponentiellen Vervielfältigung dienen. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt 1-100 ng der DNS-Matrize (Plasmid- oder genomische DNS), 75 pmol der beiden Oligonukleotide, je 200 μ M der vier Desoxynukleotide, 2-3 U einer thermostabilen DNS-Polymerase und 10 μ l des vom Hersteller der DNS-Polymerase mitgelieferten zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers in einem Gesamtvolumen von 100 μ l. Je nach Art der Anwendung kamen die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Promega) oder die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (New England BioLabs) zum Einsatz: Wegen ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*proofreading*), die die Fehlerrate bei der DNS-Synthese deutlich verringert, wurde bei der Amplifikation von Klonierungsfragmenten die langsamere *Pfu*-Polymerase verwendet, während die *Taq*-Polymerase, die keine *proofreading*-Aktivität, jedoch eine höhere Prozessivität besitzt, zu analytischen Zwecken eingesetzt wurde. Ein typischer Reaktionsverlauf im *Mastercycler gradient* der Firma Eppendorf begann mit einer dreiminütigen Vorinkubation bei 95 °C zur Denaturierung der doppelsträngigen Matrize. Es folgten 25 Reaktionszyklen, die sich aus Denaturierung der Matrizenstränge (1 min bei 95 °C), Anlagerung der spezifischen Oligonukleotide an die Matrize (1 min bei 45-60 °C, je nach Nukleotidzusammensetzung und Länge der homologen Bereiche von Matrize und Oligonukleotiden) und DNS-Synthese (1-6 min bei 72 °C, je nach Länge des Matrizenstrangs) zusammensetzten. Die Temperatur zur Anlagerung der Oligonukleotide an die Matrize wurde nach der ‚2+4-Regel‘ (2 °C pro A und T, 4 °C pro C und G) ermittelt. Für die Dauer der DNS-Synthese galten 30 s pro 1 kb für die *Taq*-Polymerase und 2 min pro 1 kb für die *Pfu*-Polymerase als Richtwerte. Die PCR-Reaktion endete mit einer zehnminütigen Inkubation bei 72 °C zur Vervollständigung unvollständig synthetisierter DNS-Stränge. Die Größe des entstandenen PCR-Produkts wurde auf einem Agarosegel kontrolliert. Vor der Weiterverwendung wurde das DNS-Fragment über ein Mikrozentrifugationssäulchen (siehe 2.1.2) oder ein präparatives Agarose-Gel (siehe 2.1.9) gereinigt.

2.1.2 Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen

Die Reinigung und Entsalzung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des *E.Z.N.A. Gel Extraction Kits* der Firma PEQLAB. Dazu wurde das PCR-Produkt mit dem gleichen Volumen an XP2-Bindepuffer verdünnt. Die Lösung wurde auf ein Mikrozentrifugationssäulchen geladen und dieses für 1 min bei 9000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulchen mit 0,3 ml Bindepuffer inkubiert und wie beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde die Membran mit 0,6 ml SPW-Waschpuffer inkubiert, welcher nach einem zweiminütigen Inkubationsschritt durch Zentrifugieren entfernt wurde. Erneute Zentrifugation nach dem Verwerfen der Waschlösung stellte die vollständige Entfernung der Waschlösung und des darin enthaltenen Ethanol sicher. Zur Elution der DNS wurde die Säulenmatrix mit 30-50 µl sterilem Wasser versetzt und nach 1 min durch Zentrifugation in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert.

2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Die Extraktion von Plasmid-DNS aus Bakterienzellen beruhte auf dem Prinzip von Birnboim und Doly (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979): Die alkalische Lyse der Bakterien führt zur Denaturierung aller Nukleinsäuren und Proteine, während bei der anschließenden Neutralisierung nur Plasmid-DNS korrekt renaturiert und somit in Lösung bleibt. Chromosomale DNS und Proteine aggregieren und fallen aus.

Zur Isolierung kleine Mengen an Plasmid-DNS (Minipräparation) wurden *E. coli*-Zellen in LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, über Nacht angezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 16000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Der Rest der Kultur wurde zur möglichen späteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Bakterien wurden in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 lysiert. Nach einem fünfminütigen Inkubationsschritt auf Eis wurden die Ansätze mit 150 µl Lösung 3 neutralisiert, kurz geschüttelt und nochmals während 5-10 min auf Eis inkubiert. Ausgefällene Proteine, chromosomale DNS und Zelltrümmer wurden für 10 min bei 16000 g bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die darin befindliche Plasmid-DNS durch Ethanol fällung gereinigt (siehe 2.1.7). Die getrocknete DNS wurde in 50 µl sterilem Wasser mit 50 µg/ml Ribonuklease A aufgenommen.

Lösung 1	50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl; pH 8,0
Lösung 2	0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS
Lösung 3	3 M Natriumacetat; pH 4,8

Die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNS mit höherer Reinheit (Midipräparation) erfolgte mit dem *PureYieldTM Midipreparation Kit* der Firma Promega nach dem mitgelieferten Protokoll: 50-100 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur wurden während 5 min bei 3000 g in einem JA20-Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 6 ml *Cell Resuspension Solution* aufgenommen. Eine dreiminütige Inkubation mit 6 ml *Cell Lysis Solution* führte zur Lyse der Bakterienzellen. Vorsichtiges Mischen mit 10 ml *Neutralization Solution* und ein erneuter dreiminütiger Inkubationsschritt führten zur Fällung von chromosomaler DNS und Proteinen. Der durch Zentrifugation für 15 min bei 15000 g gewonnene Überstand wurde durch das Anlegen eines Vakuums nacheinander durch zwei im Kit enthaltene Säulen (*Clearing Column* und *Binding Column*) gesaugt, wobei erstere der Reinigung und letztere der Bindung der DNS an eine Silica-Membran diente. Nachdem auch 20 ml *Column Wash Solution* durch die zweite Säule gesaugt worden waren, wurde das Vakuum zum Trocknen der Membran für weitere 30-60 s aufrechterhalten. Zur Elution der DNS wurden 600 µl Nuklease-freies Wasser durch die Membran zentrifugiert (5 min bei 3000 g) und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt.

<i>Cell Resuspension Solution</i>	10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl; pH 7,5
<i>Cell Lysis Solution</i>	0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS
<i>Neutralization Solution</i>	759 mM Kaliumacetat; 2,12 M Essigsäure; 4,09 M Guanidiniumhydrochlorid; pH 4,8
<i>Column Wash Solution</i>	60 % (v/v) Ethanol; 60 mM Kaliumacetat; 0,04 mM EDTA; 8,3 mM Tris/HCl; pH 7,5

2.1.4 Isolierung von genomischer DNS aus *S. cerevisiae*

Zur Gewinnung genomischer DNS aus *S. cerevisiae* wurden Zellen des entsprechenden Hefestammes über Nacht in einem geeigneten Kulturmedium (siehe 2.2.2) angezogen. Die Zellen aus 1,5 ml Suspension wurden durch Zentrifugation für 30 s bei 16000 g in einer Tischzentrifuge geerntet und in 200 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 0,3 g Glaskugeln (Durchmesser 0,45 mm) und 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und für 3 min auf einem Vortex-Schüttler kräftig durchmischt, um die Zellen aufzuschließen. Durch Zentrifugation während

15 min bei 16000 g wurden die Phasen getrennt. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde die darin befindliche DNS mit Ethanol gefällt (siehe 2.1.7) und in 30 µl Wasser aufgenommen.

Aufschlusspuffer 100 mM NaCl; 1% SDS; 1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl; pH 8,0

2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentration von DNS-Lösungen wurde in einem Spektralphotometer durch Messung der Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Um eine Messung im linearen Bereich (OD_{260} 0,1-1) zu gewährleisten, wurden die Lösungen gegebenenfalls mit Wasser verdünnt. Eine OD_{260} von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNS. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Somit konnte über das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} die Reinheit der DNS abgeschätzt werden. Als rein galt eine DNS-Lösung mit einem Quotienten von etwa 1,8.

2.1.6 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von Plasmid-DNS und PCR-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen der Firma New England BioLabs. Ein Restriktionsansatz mit 1 µg DNS enthielt neben 1-2 U des Restriktionsenzym auch die vom Hersteller mitgelieferten zehnfach konzentrierten Puffer. Die Ansätze wurden für mindestens zwei Stunden oder über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

2.1.7 Ethanolfällung

Mit Hilfe der Ethanolfällung wurde DNS wurde aufkonzentriert oder von Salzen befreit. Die wässrige DNS-Lösung wurde mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung gemischt. Zur Fällung der DNS wurde dieser Ansatz mit 2,5 Volumina eiskaltem Ethanol versetzt und für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 18000 g und 4 °C wurde das Präzipitat mit eiskaltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut pelletiert. Schließlich wurde die DNS getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen.

2.1.8 Agarosegelelektrophorese

Die größenabhängige Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 1-2 % (w/v) Agarose durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und bis zur Verwendung bei 65 °C gelagert. Das der Detektion der DNS dienende Etidiumbromid wurde den Gelen vor der Polymerisierung in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die DNS-Proben wurden mit fünffach konzentriertem Auftragspuffer versetzt, auf ein Agarosegel mit der geeigneten Porengröße aufgetragen und bei einer Feldstärke von 15 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNS-Banden in einem UV-Transilluminator (GDS-7900 System, UVP) sichtbar gemacht. Zur Größenabschätzung der DNS-Fragmente dienten Größenstandards der Firma New England BioLabs (DNA Ladder 1 kb und DNA Ladder 100 bp).

TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat; 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,5
Auftragspuffer	6 % (w/v) Glycerol; 1 mM EDTA; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 0,01 % (w/v) Xylencyanolblau; pH 8,0 (Endkonzentrationen)

2.1.9 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNS-Fragmenten wurden diese zunächst über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, wobei die UV-Exposition zur Vermeidung von DNS-Schäden möglichst kurz gehalten wurde. Die Extraktion der DNS erfolgte mit dem *E.Z.N.A Gel Extraction Kit* der Firma PEQLAB. Dabei wurde das Agarosestück mit einem der Masse entsprechenden Volumen an XP2-Bindepuffer versetzt (z.B. 0,3 ml für ein Gelstück von 0,3 g) und unter gelegentlichem Schütteln bis zur Auflösung der Agarose bei 55-60 °C inkubiert. Das weitere Verfahren entspricht dem unter 2.1.2 beschriebenen.

2.1.10 Ligation von DNS-Fragmenten

Zur Ligation zweier DNS-Fragmente wurden deren Mengen zunächst über ein Agarosegel abgeschätzt. Pro Ligationsansatz wurden 50-200 ng des linearisierten Vektors und ein 3-7facher molarer Überschuss des zu inserierenden DNS-Fragments eingesetzt. Ein 20 µl-Ansatz enthielt außerdem 0,5 U T4-DNS-Ligase (New England BioLabs), 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers und die entsprechende

Menge an deionisiertem Wasser. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C oder während 1 h bei 37 °C.

Reaktionspuffer 50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 25 µg/ml BSA; pH 7,5
(Endkonzentrationen)

2.1.11 Präparation transformationskompetenter Zellen von *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 2 l LB-Medium mit 50 ml einer Vorkultur des *E. coli*-Stamms XL1-blue auf eine OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von etwa 0,5 geschüttelt. Ab dem folgenden Schritt wurden alle verwendeten Behältnisse und Lösungen bei 4 °C vorgekühlt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend während 15 min bei 2700 g und 4 °C im JA10-Rotor pelletiert. Das Zellpellet wurde nacheinander mit 1000 ml, 500 ml und 100 ml 10 % (v/v) Glycerol gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde für 15 min bei 2700 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstands wurden die Bakterien in 1 ml 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert und in Portionen von je 60 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.12 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNS

Die Einschleusung rekombinanter Plasmid-DNS in *E. coli*-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Pro Transformationsansatz wurde ein Aliquot elektrokompetenter Zellen (siehe 2.1.11) auf Eis aufgetaut und mit 0,5 µl Plasmid-DNS oder 1 µl einer Plasmid Mini- oder Midipräparation (siehe 2.1.3) versetzt. Die Suspension wurde in eine sterile eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt und in einem Elektroporationsgerät mit Spannungspulsen transformiert (2,5 kV; 400 Ω; 25 µF). Im Anschluss wurde die Zellsuspension schnell in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Ausbildung der Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin für 30-60 min bei 37 °C geschüttelt. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.13 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNS oder PCR-Fragmenten

Die Präparation kompetenter Hefezellen für die Transformation mit Plasmid-DNS oder PCR-Fragmenten erfolgte nach einem Protokoll von Gietz [Gietz *et al.*, 1995]. Eine Kultur

des entsprechenden Hefestamms wurden über Nacht bei 30 °C in geeignetem Kulturmedium angezogen (siehe 2.2.2), am nächsten Morgen auf eine OD₅₇₈ von etwa 0,15 in 50 ml verdünnt und weiter kultiviert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ zwischen 0,4 und 1 wurden die Zellen in einem sterilen Zentrifugationsröhrchen bei 3000 rpm für 5 min sedimentiert, mit sterilem Wasser gewaschen, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und in ein 1,5-ml Reaktionsgefäß überführt. Alternativ wurden Zellen von einer Agarplatte mit einer Impföse in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, einmal mit sterilem Wasser gewaschen, durch 30 s bei 9000 g in einer Tischzentrifuge sedimentiert und nach Abnahme des Überstands in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen. Die geernteten Zellen wurden in der Tischzentrifuge pelletiert, erneut in 400 µl 100 mM Lithiumacetat suspendiert und sofort für die Transformation eingesetzt. Pro Transformationsansatz wurde ein 50 µl-Aliquot der kompetenten Zellen wie beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurden in genau dieser Reihenfolge mit 240 µl PEG 3350 (50 % (w/v)), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl einzelsträngiger Lachsspermien-DNS (10 mg/ml), 80 µl sterilem Wasser und der zu transformierenden DNS (5-10 µl einer Plasmid-Midipräparation oder 20 µl eines gereinigten PCR-Ansatzes für die Transformation mit einer Rekombinationskassette) versetzt. Die Negativkontrolle enthielt alle Komponenten außer der DNS. Die Ansätze wurden während 1 min kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei 30 °C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 20 min bei 42 °C. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen sofort durch Zentrifugation sedimentiert, in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf Platten mit dem entsprechenden Selektivmedium plattiert. Die Selektion auf positive Klone erfolgte über die entsprechenden Auxotrophiemarker.

2.1.14 DNS-Sequenzierung

Mit der Sequenzierung von DNS-Fragmenten nach der Kettenabbruchmethode von Sanger [Sanger *et al.*, 1977] wurde die Firma Medigenomix (Martinsried) beauftragt. Die DNS in Form von Mini- oder Midi-Präparationen ebenso wie die benötigten Oligonukleotide wurden der Firma zur Verfügung gestellt. Die erhaltenen DNS-Sequenzen wurden mit den Programmen DNAMAN (Version 4.22, Lynnon BioSoft., Pointe-Claire, Kanada) und Chromas (Version 1.45, Conor McCarthy, Southport, Australien) ausgewertet.

2.1.15 Verwendete Vektoren

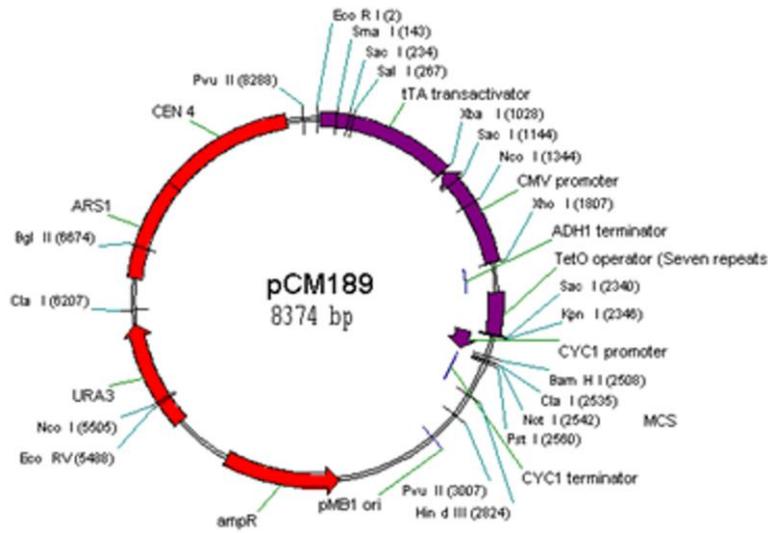


Abbildung 10: Schematische Darstellung von pCM189 [Gari *et al.*, 1997]

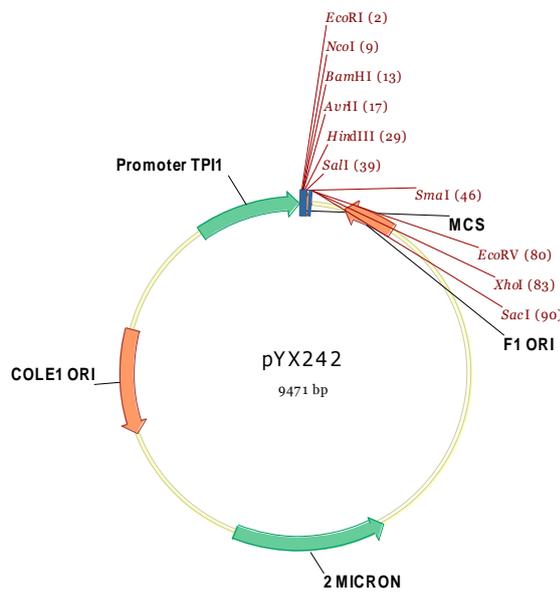


Abbildung 11: Schematische Darstellung von pYX242 (Novagen)

2.1.16 Verwendete Plasmide

Name	Kodiertes Protein	Details	Ausgangsvektor	Referenz
pYX242-Fcj1-FL	Fcj1	Überexpression von Fcj1	pYX242	Diese Arbeit
pYX242-Fcj1-His6	Fcj1-His6	Carboxyterminal His-markierte Variante von Fcj1	pYX242	Diese Arbeit
pYX242-Fcj1-His12	Fcj1-His12	Carboxyterminal His-markierte Variante von Fcj1	pYX242	Diese Arbeit
pCM189-Fcj1	Fcj1	Doxyzyklin-regulierbare Überexpression von Fcj1	pCM189	Diese Arbeit
pVT100U-mtGFP	GFP	Matrix-dirigierte Variante von GFP	pVT100U	[Westermann und Neupert, 2000]
pYX232-mtGFP	GFP	Matrix-dirigierte Variante von GFP	pYX232	[Westermann und Neupert, 2000]

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

2.1.17 Klonierungsstrategien

Klonierung von pCM189-Fcj1

Der offene Leserahmen (OLR) von *FCJI* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden Fcj1fo und overFcj1rev aus genomischer DNS des Wildtyp-Hefestamms W303 α amplifiziert. Das resultierende DNS-Fragment wurde über die im Oligonukleotidpaar enthaltenen Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* in den Vektor pCM189 [Gari *et al.*, 1997] kloniert.

Fcj1fo 5'- CCC CCC ATG GCA ATG CGA AGA ACT ACT GCC TCA CG -3'

overFcj1rev 5'- CCC CGC GGC CGC TCA CAA CGT CCT TAT TTC ACA GTC TTC -3'

Klonierung von pYX242-Fcj1-FL, pYX242-Fcj1-His6 und pYX242-Fcj1-His12

Zur Generierung des Plasmids pYX242-Fcj1-FL wurde der OLR von *FCJI* mittels PCR mit den Oligonukleotiden Fcj1FLfo und Fcj1FLrev aus genomischer DNS des Wildtyp-Hefestamms W303 α amplifiziert. Das resultierende DNS-Fragment wurde über die im Oligonukleotidpaar enthaltenen Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* in den Vektor pYX242 (Novagen) kloniert. Die Erzeugung der Plasmide pYX242-Fcj1-His6 und pYX242-Fcj1-His12 erfolgte analog, anstelle von Fcj1FLrev wurden jedoch die Oligonukleotide Fcj1His6rev und Fcj1His12rev verwendet.

Fcj1FLfo	5'-CCC CCC ATG GCA ATG CTA AGA ACT ACT GCC TCA CG-3'
Fcj1FLrev-	5'- CCC CCT CGA GTC ACA ACG TCC TTA TTT CAC AGT CTT C-3'
Fcj1His6rev	5'- CCC CCT CGA GTC AGT GAT GGT GAT GGT GAT GCA ACG TCC TTA TTT CAC AGT CTTC -3'
Fcj1His12rev	5'- CCC CCT CGA GTC AGT GAT GGT GAT GGT GAT GGT GAT GGT GAT GGT GAT GCA ACG TCC TTA TTT CAC AGT CTT C-3'

2.2 Methoden der Hefegenetik

2.2.1 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Referenz
W303 α	<i>MATα, ade2-1, his3-1,1,15 leu2,112 trp1 ura23-53, kan1-100</i>	[Rothstein und Sherman, 1980]
BY4741	<i>Mat a his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Euroscarf
Fcj1-TAP (BY4741)	<i>Mat a his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, FCJ1-TAP-HIS3MX6</i>	Open Biosystems
Δ fcj1 (W303)	<i>MATα, ade2-1, leu2,112 trp1 ura23-53, can1-100, FCJ1::his3MX6</i>	Diese Arbeit
Δ fcj1 (BY4741)	<i>Mat a, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, FCJ1::HIS3MX6</i>	Euroscarf
Δ su e	<i>Mat a his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, SU E::KANMX</i>	Open Biosystems
Δ su g	<i>Mat a his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, SU G::KANMX</i>	Open Biosystems
Δ fcj1/ Δ su e	<i>Mat a his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, FCJ1::HIS3MX6, SU E::KANMX</i>	Diese Arbeit
Δ fcj1/ Δ su g	<i>Mat a his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, FCJ1::HIS3MX6, SU G::KANMX</i>	Diese Arbeit

Tabelle 3: verwendete Hefestämme

2.2.2 Methoden der Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefezellen erfolgte nach Standardprotokollen [Guthrie und Fink, 1991]. Als Standardmedien dienten Laktat-Medium (nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle) oder YPD (fermentierbare Kohlenstoffquelle) (siehe 2.6). Enthielten die kultivierten

Hefestämme Plasmide mit Auxotrophiemarkern, so wurden Selektivmedien mit den gleichen Kohlenstoffquellen verwendet, jedoch fehlten die entsprechenden Markeraminoacidsäuren. Flüssigkulturen wurden bei 140 rpm und 30 °C geschüttelt, Kulturen auf Agarplatten wurden bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Herstellung von Stammkulturen wurden Zellen von Agarplatten mit einer sterilen Impfföse in 15 % (v/v) Glycerol suspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zur Kultivierung bestimmter Hefestämme wurden Aliquots der Stammkulturen auf geeigneten Agarplatten plattiert und kultiviert, bevor sie in Flüssigkulturen überführt wurden.

2.2.3 Deletion von *FCJ1* in haploiden Hefestämmen

Zur Erzeugung der haploiden Stämme $\Delta fcj1$ (W303 Hintergrund), $\Delta fcj1/\Delta su e$ und $\Delta fcj1/\Delta su g$ wurde der OLR *FCJ1* in den Stämmen W303, $\Delta su e$ (BY4742-Hintergrund) und $\Delta su g$ (BY4742-Hintergrund) deletiert. Die Deletion erfolgte über homologe Rekombination einer Deletionskassette in den *FCJ1*-Lokus. Die Deletionskassette wurde mittels PCR mit Hilfe der Oligonukleotide Fcj1HIS3up und Fcj1HIS3rev erzeugt, als Matritze diente das Plasmid pFA6a-His3MX6 [Wach *et al.*, 1997]. Das entstandene DNS-Fragment wurde nach Reinigung über ein präparatives Agarose-Gel in den entsprechenden Hefestamm transformiert (siehe 2.1.13). Die Selektion erfolgte über Selektivmedium ohne Histidin.

Fcj1HIS3up 5'-AAA GGC ATA AGA ACG CAT TGA AAA GTC TAA AAA ACT AAT ATT CGT CGT
ACG CTG CAG GTC GAC-3'

Fcj1HIS3rev 5'-TTG AGG TGT AAT GAC GTA CAT CTC TTT TCT CTT TGT ATT ATT CTT ATC
GAT GAA TTC GAG CTC-3'

2.2.4 Überprüfung eines Rekombinationsereignisses in *S. cerevisiae*

Einzelkolonien positiver Klone wurden steril in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei RT mit 50 µl Zymolyase-Lösung (20 U/ml) inkubiert. Nach 1 min Zentrifugation bei 9000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand verworfen. Das Sediment wurde 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend mit einem PCR-Reaktionsansatz versetzt, welcher die Oligonukleotide Fcj1upstream und Fcj1downstream enthielt. Diese binden an homologe Bereiche *upstream* und *downstream* des ORLs *FCJ1*. Mittels PCR wurde ein DNS-Fragment erzeugt, dessen Länge in Anwesenheit des intakten ORLs 2,2 kb, nach erfolgreicher Disruption jedoch nur 2,0 kb beträgt.

Fc1upstream	5'-GGT AAT TTT CTT GCA TTT CC-3'
Fc1downstream	5'-TCT TCT TTA TTA AAG CCT CC-3'

2.2.5 Analyse des Wachstumsphänotyps

Die Analyse des Wachstumsphänotyps erfolgte mit dem sogenannten ‚Tüpfel-Test‘. Von einer exponentiell wachsenden Hefekultur wurde die OD₅₇₈ bestimmt und ein Aliquot von 1 OD entnommen. Die Zellen wurden für 1 min bei 9000 g zentrifugiert und nach Abnahme des Überstands in sterilem Wasser aufgenommen, so dass die OD 0,7 betrug. Von dieser Suspension und fünf aufeinanderfolgenden Zehnfach-Verdünnungen wurden jeweils 3 µl auf eine YPD- oder YPG-Platte getropft. Nach zwei (YPD) bis drei Tagen (YPG) bei 30 °C wurde das Wachstum der Zellen ausgewertet.

Alternativ wurde das Wachstum in Flüssigmedium untersucht. Die Zellen wurden in der logarithmischen Phase kultiviert und vor Beginn des Experiments mindestens dreimal verdünnt. Anschließend wurde in ein- bis zweistündigen Abständen die OD₅₇₈ während der frühen bis späten logarithmischen Wachstumsphase gemessen. Mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Office 2003) wurde ausgehend von der Geradensteigung die Generationszeit bestimmt. Pro Stamm wurde der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten ermittelt.

2.2.6 Bestimmung des Anteils an rho^{0/-}-Zellen

Von einer logarithmisch wachsenden Flüssigkultur wurde ein Aliquot abgenommen und 1 min bei 9000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in sterilem Wasser aufgenommen und unter der Annahme, dass 1 ml bei 1 OD₅₇₈ etwa 2,7 x 10⁷ Zellen enthält, auf 10³ Zellen/ml verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden etwa 200 Zellen auf YPG-Platten, die mit 0,1 % (w/v) Glukose supplementiert worden waren, ausgestrichen. Nach mindestens einer Woche Inkubation bei 30 °C wurde der Anteil der kleineren, helleren und regelmäßig geformten Kolonien an der Gesamtzahl der Hefekolonien bestimmt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Gesamtzellextrakten aus *S. cerevisiae*

Gesamtzellextrakte aus *S. cerevisiae* wurden durch alkalische Lyse gewonnen (modifiziert nach Yaffe und Schatz, 1984). 1-2 OD₅₇₈ einer exponentiell wachsenden Hefekultur wurden durch einminütige Zentrifugation bei 16000 g in einer Eppendorf-

Tischzentrifuge geerntet. Die Zellen wurden in 250 µl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und anschließend mit 50 µl Aufschlusspuffer versetzt und gut gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Proteine mit 220 µl 72 % (w/v) TCA gefällt wie unter 2.4.2 beschrieben und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Aufschlusspuffer 1,85 M NaOH; 7,4 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 20 mM PMSF

2.3.2 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Zur die Präparation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* wurden eine Hefekultur von einer frischen Agarplatte angeimpft und bei 30 °C geschüttelt. Die Vorkultur wurde mindestens dreimal auf eine OD₅₇₈ von 0,05-0,2 verdünnt, wobei das Gesamtvolumen der Kultur schrittweise erhöht wurde. Ein Übergang der Kultur in die stationäre Phase wurde vermieden. Die Hauptkultur (4-12 l) wurde je nach Generationszeit des jeweiligen Hefestamms auf eine OD₅₇₈ von 0,05-0,3 angeimpft und über Nacht bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,8-1,3 kultiviert. Generell wurden alle Hefestämme auf Laktatmedium angezogen. Zellen ohne Plasmid wurden auf Vollmedium kultiviert. Enthielten die Zellen ein Plasmid, wurde sie auf Selektivmedium, das mit 0,1 % Glukose supplementiert wurde, angezogen. Nur für atmungsdefiziente Stämme wurden Medien mit fermentierbarer Kohlenstoffquelle benutzt.

Die Isolation der Mitochondrien erfolgte im Wesentlichen nach einem Protokoll von Daum [Daum *et al.*, 1982]. Die Hefezellen wurden durch 5 min Zentrifugation in einem JLA 8.100 Rotor bei 4000 g geerntet, in Wasser resuspendiert und einem JA10-Rotor durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 g gewaschen. Nachdem das Nassgewicht der Zellen bestimmt worden war, wurden sie in 2 ml DTT-Puffer pro 1 g Nassgewicht resuspendiert und für 10 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1500 g zentrifugiert und in 4 ml Sorbitolpuffer pro 1 g Nassgewicht gewaschen. Das Zellsediment wurde erneut im gleichen Volumen Sorbitolpuffer resuspendiert. Diesem wurden pro 1 g Nassgewicht 6 g Zymolyase, welche zuvor in 1 ml Sobitolpuffer gelöst worden waren, zugefügt. Ein Inkubationsschritt von 30-60 min unter leichtem Schütteln bei 30 °C führte zur Zerstörung der Zellwände und damit zur Bildung von Spheroblasten, welche durch Sorbitol osmotisch stabilisiert werden. Die Spheroblastenbildung wurde kontrolliert, indem 10 µl dieser Zellsuspension in einer Küvette mit 1 ml entsalztem Wasser gemischt und anschließend sofort der Verlauf der OD₅₇₈ verfolgt wurde. Eine rasche Abnahme der OD₅₇₈ auf ca. 10-20 % des Ausgangswerts, welche auf die osmotische Lyse der Spheroblasten zurückzuführen ist, zeigt eine gute Sphaeroblastisierung an. Die Spheroblasten wurden im

JA10-Rotor für 5 min bei 1500 g sedimentiert und vorsichtig in 6 ml Homogenisierungspuffer pro 1 g Nassgewicht aufgenommen. Auch alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgt durch 15maliges Homogenisieren in einem Glashomogenisator. Die Anreicherung der Mitochondrien erfolgte durch differentielle Zentrifugation: nicht aufgeschlossene Zellen, Zellfragmente und Zellkerne wurden durch zweimalige Zentrifugation für 5 min bei 2000 g in einem JA20-Rotor entfernt. Durch Zentrifugation für 12 min bei 13000 g im JA20-Rotor wurden aus dem Überstand die Mitochondrien gewonnen. Ein erneuter Zentrifugationsschritt während 5 min bei 2000 g sollte die Reinheit der Mitochondrienpräparation erhöhen. Aus dem Überstand wurden die Mitochondrien erneut durch Zentrifugation für 12 min bei 12000 rpm im JA20-Rotor isoliert. Die so angereicherte mitochondriale Fraktion wurde in etwa 1 ml HS-Puffer aufgenommen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde die Mitochondrien mit HS-Puffer auf 10 mg/ml verdünnt, in Aliquots von 100 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

DTT-Puffer	10 mM DTT; 00 mM Tris/SO ₄ ; pH 9,4
Sorbitolpuffer	1,2 M Sorbitol; 20 mM KP _i ; pH 7,4
Homogenisierungspuffer	0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,2 % (w/v) fettsäurefreies BSA; pH 7,4
HS-Puffer	20 mM HEPES; 0,6 M Sorbitol; pH 7,4

2.3.3 Anreicherung isolierter Mitochondrien mittels diskontinuierlichem Saccharosegradienten

Sollte die Reinheit isolierter Mitochondrien erhöht werden, wurde bei der Mitochondrienpräparation nach dem ersten Zentrifugationsschritt bei 13000 g eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation eingeschoben. Dazu wurden in einem SW 41Ti-Zentrifugationsröhrchen eine hochmolekulare mit niedermolekularen Saccharoselösungen überschichtet. Ein Gradient bestand aus 1,75 ml 60 %iger, 1,75 ml 50 %iger, 4 ml 32 %iger, 1,75 ml 23 %iger und 1,5 ml 15 %iger Saccharoselösung. Die pelletierten Mikrosomen aus 10 l Hefekultur wurden in 3 ml kaltem HS-Puffer (siehe 2.3.2) aufgenommen. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde auf einen eisgekühlten Gradienten aufgetragen. Nach 2 h Zentrifugation bei 130000 g und 4 °C wurde die zwischen den beiden untersten Saccharosekissen befindliche Mikrosomenfraktion, die die Mitochondrien enthielt,

mit einer Pipette abgenommen und mit kaltem HS-Puffer verdünnt. Nach dieser Unterbrechung wurde die Mitochondrienisolation fortgeführt, wie unter 2.3.2 beschrieben.

Saccharoselösungen 15-60 % Saccharose; 1 mM EDTA; 20 mM HEPES; pH 7,4

2.3.4 Generierung von Mitoplasten durch osmotische Schwellung

Um die Außenmembran isolierter Mitochondrien selektiv durch osmotisches Schwellen aufzubrechen, wurden die in HS-Puffer gelagerten Mitochondrien mit kaltem H-Puffer fünfzigfach verdünnt. Die Inkubation mit 200 µg/ml Proteinase K auf Eis führte zum Verdau der Proteine des Intermembranraums. Nach 25 min wurde die Proteolyse durch Zugabe von 2 mM frisch angesetztem PMSF beendet. Nach einem weiteren Inkubationsschritt auf Eis für 5 min wurden die Mitoplasten durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in HS-Puffer aufgenommen. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Mitoplasten mit TCA gefällt (siehe 2.4.2). Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, 3 min bei 95 °C inkubiert und SDS-PAGE (siehe 2.4.3.1) und Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (siehe 2.4.4) mittels Western Blot (siehe 2.5.4) analysiert. Zur Kontrolle wurden auch Western Blot-Analysen von Proben, die in HS-Puffer verdünnt oder ohne Proteinase K behandelt wurden, durchgeführt.

HS-Puffer 0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES; pH 7,4

H-Puffer 20 mM HEPES; pH 7,4

2.3.5 AMS-Markierungsexperiment

Aufgrund ihrer Eigenschaft, Thioetherverbindungen mit freien Thiolgruppen einzugehen, wurde die Substanz 4-Acetamido-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonat (AMS) zur Modifikation von Proteinen verwendet. Zu isolierten Mitochondrien, die mit kaltem HS-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt worden waren (siehe 2.3.2), wurde AMS in einer Endkonzentration von 16 mM (Stammlösung: 200 mM in HS-Puffer) zugegeben. Die Ansätze wurden gemischt und im Dunklen auf Eis inkubiert. Nach erneutem Mischen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots entnommen, welche zum Stoppen der Modifikationsreaktion mit 100 mM DTT aus einer 1 M Stammlösung versetzt wurden. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde die Lösung mit HS-Puffer verdünnt und die Mitochondrien durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 g und 4 °C reisoliert. Das Sediment

wurde mit TCA gefällt (siehe 2.4.2), in SDS-Probenpuffer gelöst und 3 min bei 95 °C erhitzt, bevor die Proben nach SDS-PAGE (siehe 2.4.3.1) und Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (siehe 2.4.4) mittels Western Blot (siehe 2.5.4) analysiert wurden. Abhängig vom Bindungsverhalten der verwendeten Antikörper wurde eine Modifikation von Proteinen entweder durch eine Abnahme der Intensität des Western Blot-Signals (Cyt c) oder einen Mobilitätsshift in der SDS-PAGE (Hep1 und Porin) nachgewiesen.

2.3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte die Visualisierung der mitochondrialen Morphologie lebender Hefezellen, welche mitochondrial lokalisiertes GFP exprimierten. Das verwendete Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss war mit einem Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan Neofluar, 100X, numerische Apertur 1,3) ausgestattet. Die Analyse von mtGFP erfolgte mit dem Filtersatz No. 09 (Anregung 450-490 nm, Emission > 515 nm) [Heim und Tsien 1996]. Digitale Aufnahmen der bei RT mikroskopierten Zellen entstanden mit einer CCD-Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss). Mikroskop und Kamera wurden mit dem Programm AxioVision AC Software (Carl Zeiss) gesteuert. Die Auswertung der mitochondrialen Morphologien und die Digitalisierung repräsentativer Beispiele erfolgten ohne Kenntnis der Identität der untersuchten Hefestämme.

2.3.7 Chemische Fixierung von Hefezellen

Die elektronenmikroskopische Analyse von Hefezellen erforderte zunächst deren Fixierung. Dazu wurde von einer frischen Agarplatte eine Hefekultur in Laktatmedium angeimpft und bei 30 °C geschüttelt. Die Vorkultur wurde mindestens dreimal auf eine OD₅₇₈ zwischen 0,1 und 0,2 verdünnt, ein Übergang der Kultur in die stationäre Phase wurde vermieden. 50 ml Hauptkultur wurden bis zu einer OD₅₇₈ zwischen 0,5 und 0,8 kultiviert und durch Zentrifugation für 5 min bei 1700 g und 30 °C geerntet, nachdem der pH-Wert des Kulturmediums bestimmt worden war. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment vorsichtig in 10 ml auf 30 °C temperiertem Fixierungspuffer, dessen pH-Wert mit Natronlauge an denjenigen des Kulturmediums angepasst worden war, aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation bei 30 °C wurden die fixierten Zellen zweimal mit 10 ml Citratpuffer gewaschen, indem sie durch Schwenken im Puffer resuspendiert und dann für 5 min bei 3000 g zentrifugiert wurden. Schließlich wurden die Zellen in 1 ml Citratpuffer aufgenommen

und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde zur Vermeidung von Luftblasen randvoll mit Citratpuffer gefüllt und zur Pelletierung der Zellen 1 min bei 9000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C, der Transport bei RT.

Fixierungspuffer	50 mM Zitronensäure; 50 mM Natriumcitrat; 4 % Formaldehyd; 0,5 % Glutaraldehyd
Citratpuffer	50 mM Zitronensäure; 50 mM Natriumcitrat

2.3.8 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie von Cryoschnitten chemisch fixierter Hefezellen wurde von Dr. Frank Vogel durchgeführt und erfolgte nach der Methode von Tokuyasu [Tokuyasu, 1989]. Fixierte Zellen (siehe 2.3.7) wurden mit PBS gewaschen, für 1 h in Natriummetaperiodat inkubiert und für 2-3 h bei 30 °C mit 25 % Polyvinylpyrrolidon (K15/MW 10000) in 1,6 M Saccharose getränkt. Die Zellsuspension wurde auf Probenhalterungen aufgetragen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Cryoschnitte wurden bei -115 °C mit dem Ultramikrotom Ultracut S (Leica), das auf das Tieftemperaturschneidesystem EM FCS (Leica) montiert war, hergestellt. Ultradünne aufgetaute Cryoschnitte wurden mit Glas- oder Diamantmessern hergestellt und auf Formvar- oder Kohlenstoff-beschichtete Kupferblenden (200 Maschen, hexagonal) überführt. Die Markierung mit Primärantikörpern und mit 10 nm großen Goldpartikel gekoppelten Sekundärantikörpern (Dianova) erfolgte wie von Kärger beschrieben [Kärger *et al.*, 1996]. Die Blenden wurden zunächst 1 h in Primärantikörper in PBS inkubiert, anschließend viermal für 10 min mit PBS gewaschen, 1 h mit 1:40 in PBS verdünntem Sekundärantikörper inkubiert und erneut viermal für 10 min mit PBS gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten, indem die Blenden mit der beschichteten Seite nach unten auf Flüssigkeitstropfen platziert wurden. Abschließend wurden die Schnitte mit einer 1:1-Mischung aus 3 % Silicowolframat und 2,5 % Polyvinylalkohol kontrastiert und stabilisiert. Die Analyse erfolgte mittels Transmissions-EM.

Die quantitative Auswertung von Immun-EM-Aufnahmen erfolgte wie von Vogel [Vogel *et al.*, 2006] beschrieben. Dabei wurde die Lokalisierung von Goldpartikeln in mitochondrialen Schnitten mit deutlich erkennbaren Cristaemembranen, die über CJs mit der Inneren Grenzmembran verbunden waren, auf ein empirisch ermitteltes Modell übertragen. Zur Bestimmung der relativen Dichte eines Proteins entlang der Innenmembran wurden alle Goldpartikel innerhalb einer Distanz von 14 nm zur Innenmembran gezählt. Dazu wurde ein bewegliches Fenster *in silico* entlang der Innenmembran des Modells von unten nach oben

bewegt. CJ-Durchmesser in elektronenmikroskopischen Aufnahmen chemisch fixierter Hefezellen wurden bestimmt, indem die Abstände der Mittelpunkte der Innenmembranen auf beiden Seiten einer CJ an deren weitester Öffnung gemessen wurden.

2.3.9 Cryopräparation isolierter Mitochondrien

Die Cryopräparation isolierter Mitochondrien wurde von Dr. Marek Cyrklaff durchgeführt und erfolgte wie von Dubochet beschrieben [Dubochet *et al.*, 1988]. Frisch isolierte Mitochondrien wurden zunächst mit isotonischem HS-Puffer mit 1 mM EDTA auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml verdünnt. 3-5 μ l dieser Suspension wurden auf eine *Quantifoil-R2/2*-EM-Blende (Electron Microscopy Sciences) aufgetragen, welches an einem Tauchkolben, der mit einer nach Maß angefertigten Befeuchtungsvorrichtung [Cyrklaff *et al.*, 1990] ausgestattet war, befestigt wurde. Nach der Zugabe von 3-5 μ l Protein A-gekoppelten 3 nm-Goldpartikeln (Sigma) als Lokalisierungsmarker in isotonischem HEPES-Puffer wurde überschüssige Flüssigkeit entfernt, das Gitter in Ethan-*Slush* schockgefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.10 EM-Tomographie

EM-tomographische Analysen isolierter Mitochondrien wurden von Dr. Marek Cyrklaff durchgeführt. Die cryo-hydratisierten Proben wurden in einem Gatan 626 70 °-Cryo-Probenhalter (Gatan GmbH, Pleasanton, CA) befestigt und in einem Philips CM 300 Cryo-Elektronenmikroskop, das mit einem Feldemissionsstrahler, einem *post column* GIF 2002 Energiefilter (Gatan GmbH) und einer *slow-scan* CCD-Kamera mit 2048 x 2048 Pixel (Gatan GmbH) ausgestattet war. Serien mit geringer Elektronendosis (4000-5000 Elektronen/nm²), die typischerweise aus 60-70 Bildern bestanden, wurden mit dem Programm *Digital Micrograph package* (Gatan GmbH) in einem Neigungsbereich zwischen $\pm 60^\circ$ und $\pm 70^\circ$ mit Neigungsintervallen von 2° und einer 43000fachen (0,82 nm/Pixel) oder 52000fachen (0,68 nm/Pixel) nominalen Vergrößerung mit einem Objektivlinsendefokus von 6-10 μ m aufgenommen. Die Bilder einer Serie wurden mit Hilfe von Lokalisierungsmarkern aneinander ausgerichtet und in 3D-Rekonstruktionen mittels gewichteter Rückprojektion unter Zuhilfenahme der Programme *EM image processing* [Hegerl, 1996] und *TOM* [Nickell *et al.*, 2005] für die Post-Prozessierung übereinandergelegt. Die endgültige Dicke der EM-Tomogramme betrug zwischen 300 und 500 nm. Das Visualisierungsprogramm AMIRA

(Mercury Computer Systems) wurde sowohl für die Oberflächenrenderung von Membranen und Molekülen in den ursprünglichen Rekonstruktionen von Mitochondrien als auch für die Erstellung der Abbildungen verwendet.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford [Bradford, 1976]. Die Proben wurden mit 1 ml einer 1:5-Verdünnung des BioRad-Proteinassay-Reagenz (BioRad, München) in Wasser versetzt und mindestens 15 min bei RT inkubiert, bevor die Absorption bei 595 nm bestimmt wurde. Parallel dazu wurde mit dem Protein Immunglobulin G eine Eichreihe erstellt, anhand derer die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte.

2.4.2 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine wurden durch Zugabe von 72 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) bis auf eine Endkonzentration von 12 % (w/v) und mindesten 15 min Inkubation auf Eis präzipitiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine für 15 min bei 20000 g und 4 °C pelletiert und zur Entfernung der Lipide mit kaltem Aceton (-20 °C) gewaschen. Das Präzipitat wurde bei 37 °C getrocknet und in SDS-Probenpuffer (siehe 2.4.3.1), der 10 mM Tris/Base enthielt, aufgenommen, 5 min bei RT geschüttelt und 5 min bei 95 °C inkubiert.

2.4.3 Gelelektrophorese

2.4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung denaturierter Proteine entsprechend ihrer Größe erfolgte durch vertikale diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [Laemmli, 1970]. Gele von 1 mm Dicke wurden zwischen Glasplatten mit den Maßen 160 x 140 mm gegossen. Je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine variierte die Endkonzentration von Acrylamid/Bisacrylamid zwischen 8 %/0,13 % (w/v) und 16 %/0,23 % (w/v). Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftrag mit SDS-Probenpuffer versetzt und während 5 min bei 95 °C erhitzt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurden farblose (Fermentas) oder vorgefärbte (BioRad) Größenstandards

verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA bei RT bis zum Auslaufen der Blaufront aus dem Gel nach etwa 2,5-3 Stunden. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert oder in den Gelen mit Coomassie gefärbt.

Trenngel	8-16 % (w/v) Acrylamid; 0,13-0,23 % (w/v) Bisacrylamid; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,03 % (v/v) TEMED; 375 mM Tris/HCl; pH 8,8
Sammelgel	5 % (w/v) Acrylamid; 0,08 % (w/v) Bisacrylamid; 0,1 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) APS; 0,1 % (v/v) TEMED; 60 mM Tris/HCl; pH 6,8
Laufpuffer	380 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; 50 mM Tris/HCl; pH 8,3
SDS-Probenpuffer	2 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 10 % (v/v) Glycerol; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 60 mM Tris/HCl; pH 6,8

2.4.3.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Blaue Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) diente dazu, native Proteinkomplexe ihrer Größe entsprechend aufzutrennen [Schägger und von Jagow, 1991]. Lineare 3-8 % Gradientengele mit den gleichen Maßen wie für die SDS-PAGE beschrieben wurde am Tag ihrer Verwendung mit Hilfe eines Gradientengeießers hergestellt.

Pro Gelspur wurden 500 μ g isolierte Mitochondrien 30 min auf Eis in Solubilisierungspuffer 1 mit Digitonin im Verhältnis Digitonin/Protein (w/w) zwischen 0,5 und 2 inkubiert. Nicht-solubiliertes Material wurde durch Zentrifugation für 20 min bei 57000 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vor dem Auftrag mit einem Zehntel BN-Probenpuffer versetzt. Sollte im Anschluss die In-Gel-ATPase Aktivität der aufgetrennten Proteinkomplexe bestimmt werden, erfolgt die Elektrophorese über Nacht bei 15 mA, 65 V und 4 °C mit einem Kathodenpuffer, der 0,02 % Serva Blau G enthielt. War nach der Auftrennung der Transfer der Proteine auf PVDF-Membran vorgesehen, wurde die Elektrophorese während einer Stunde bei 100 V und 4 °C durchgeführt, bevor die Spannung auf 500 V (limitiert auf 15 mA) erhöht wurde. In diesem Fall wurde der Kathodenpuffer nach einem Drittel des Laufes gegen Puffer ohne Serva Blau G ausgetauscht. Beendet wurde die Elektrophorese jeweils, wenn der blaue Farbstoff aus dem Kathodenpuffer durch das gesamte Gel transferiert und vollständig in den Anodenpuffer übergegangen war.

3 %-Acrylamidlösung	2,9 % (w/v) Acrylamid; 0,1 % (w/v) Bisacrylamid; 500 mM 6-Aminocapronsäure; 0,03 % (v/v) APS; 0,3 % (v/v) TEMED; 50 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0 bei 4 °C
8 %-Acrylamidlösung	7,7 % (w/v) Acrylamid; 0,25 % (w/v) Bisacrylamid; 500 mM 6-Aminocapronsäure; 3 g Glycerol; 0,03 % (v/v) APS; 0,3 % TEMED; 50 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0 bei 4 °C
Kathodenpuffer	50 mM Tricin; 0,02 % Serva Blau G; 15 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0 bei 4 °C
Anodenpuffer	50 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0 bei 4 °C
BN-Probenpuffer	5 % (w/v) Serva Blau G; 750 mM 6-Aminocapronsäure
Solubilisierungspuffer 1	150 mM Kaliumacetat; 10% (v/v) Glycerol; 1 mM EDTA; 2 mM 6-Aminocapronsäure; 1 mM PMSF; 30 mM HEPES; pH 7,4

Auch die Clear Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese (CN-PAGE) ermöglicht die Separation nativer Proteinkomplexe [Wittig und Schägger, 2005]. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt bei dieser Methode vom isoelektrischen Punkt des jeweiligen Komplexes und dem aktuellen pH-Wert im Gel ab. Die verwendeten Gele und auch die Probenvorbereitung sind mit denjenigen der BN-PAGE identisch, jedoch enthalten der Kathodenpuffer und der Probenpuffer nicht den Farbstoff Serva Blau G.

Farbloser Kathodenpuffer	50 mM Tricin; 15 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0 bei 4 °C
CN-Probenpuffer	50 % (w/v) Glycerol; 0,1 % (w/v) Ponceau S

2.4.3.3 Tricin-SDS-PAGE

Die Tricin-SDS-PAGE nach Schägger [Schägger, 2006; Schägger und von Jagow, 1987] diente bei der Analyse von Proteinkomplexen zur Auftrennung der zweiten Dimension nach einer CN-PAGE. Zur Präparation der Gele wurde die Gelspur der ersten Dimension zunächst 15 min in 10 ml 1 % SDS-Lösung inkubiert und im Anschluss so auf dem auspolymerisierten Tricin-Trenngel platziert, dass die Proteine aus dem Gelstreifen während der Elektrophorese in das Trenngel einwandern konnten. Zur Sichtbarmachung der Lauffront wurde zu Beginn der Elektrophorese auf dem Gelstreifen der ersten Dimension etwa 1 ml blauer SDS-Probenpuffer verteilt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 15 mA bis zum Auslaufen der Blaufront. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert wie unter 2.4.4 beschrieben.

16 % Trenngel	16 % (w/v) Acrylamid; 0,2 % (w/v) Bisacrylamid; 333 mM HCl; 0,1 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 0,03 % (v/v) APS; 0,3 % TEMED; 1 M Tris/HCl; pH 8,45
Anodenpuffer	22,5 mM HCl; 100 mM Tris/HCl; pH 8
Kathodenpuffer	100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS; 100 mM Tris; pH ~ 8,25

2.4.4 Proteintransfer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen (Western-Blot)

Sollten Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachgewiesen werden, wurden sie entweder nach dem Halbtrockenverfahren oder nach dem Nassverfahren aus dem Gel auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen transferiert [Towbin *et al.*, 1979]. Vor dem Transfer wurden Gel, Membran und Whatman Filterpapier in Blot-Puffer äquilibriert. PVDF-Membranen wurden zuvor kurz in Methanol geschwenkt und anschließend mit entsalztem Wasser gewaschen.

Für das Halbtrockenverfahren wurde Graphitelektroden verwendet. Auf die untere Elektrode (Anode) wurden eine Lage Filterpapier, die Membran, das Gel und eine weitere Lage Filterpapier gestapelt. Letztere wurde mit der oberen Graphitelektrode (Kathode) abgedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte allgemein für 1,5 h bei 200 mA, für kleine Proteine mit einem Molekulargewicht unter 20 kD wurde der Transfer bereits nach 50 min gestoppt.

Für das Nassverfahren kam ein Tank-Blot (Hoefer) zum Einsatz. Der Aufbau auf dem Transferringitter erfolgte wie für das Halbtrockenverfahren beschrieben. Das geschlossene Gitter wurde anschließend in den mit Blotpuffer gefüllten Tank eingesetzt. Der Transfer erfolgt bei 400 mA für je 1,5 h.

Anschließend wurden die Membranen kurz in entsalztem Wasser geschwenkt. Die Färbung der Proteine erfolgte in Ponceau S-Färbelösung. Überschüssige Färbelösung wurde durch Waschen mit entsalztem Wasser entfernt. Die Membranen wurden an der Luft getrocknet.

Blot-Puffer	20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,02 % (w/v) SDS
Ponceau S-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA

2.4.5 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde angewandt, um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine im Acrylamidgel sichtbar zu machen. Die Gele wurden bis zur Blaufärbung nach etwa 1 h in Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurden sie mehrere Stunden in Entfärber

geschwenkt, bis der Hintergrund entfärbt war und die einzelnen Proteinbanden in der gewünschten Intensität sichtbar wurden.

Färbelösung 10 % (v/v) Essigsäure; 30 % (v/v) Methanol; 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250

Entfärber 10 % (v/v) Essigsäure; 40 % (v/v) Methanol

2.4.6 In-Gel-ATPase Aktivität

Zur Visualisierung nativer Komplexe der F_1F_0 -ATP-Synthase wurden BN-Gele nach der Elektrophorese in entsalztem Wasser gewaschen und 20 min unter leichtem Schütteln in Aktivitätspuffer geschwenkt. Nach Zugabe von 0,4 % (w/v) $CaCl_2$ wurden die Gele bis zum Erreichen der gewünschten Färbung (mindestens 1 h) weiter geschüttelt, bevor sie kurz in entsalztem Wasser geschwenkt und zur Dokumentation digitalisiert wurden.

Aktivitätspuffer 5 mM $MgCl_2$; 20 mM ATP; 50 mM Glycin/NaOH; pH 8,4

2.4.7 Solubilisierungstest

Um die Löslichkeit verschiedener Proteinkomplexe in Detergenz zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien während 30 min auf Eis in Solubilisierungspuffer 2 mit Digitonin im Verhältnis Digitonin/Protein (w/w) von eins solubilisiert. Ungelöstes Material wurde durch einen 10minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 g und 4 °C vom Überstand getrennt und in Solubilisierungspuffer 2 mit 1 % Triton X-100 resolubilisiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 g und 4 °C wurden Überstand und Pellet getrennt. Alle Fraktionen wurden in SDS-Auftragspuffer (siehe 2.4.3.1) aufgenommen.

Solubilisierungspuffer 2 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM PMSF; Complete Protease-inhibitorcocktail (Roche); 0,5 mM 1,10-Phenanthrolin; 100 µg/ml α -Macroglobulin; 2 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Pepstatin; 20 mM Tris/HCl; pH 8,0

2.4.8 Dichtegradientenzentrifugation

Die Herstellung eines kontinuierlichen Glycerolgradienten erfolgt mit Hilfe der *Gradient Station* der Firma Biocomp Instruments (Fredericton, Kanada). Ein SW60 Ti-Zentrifugationsröhrchen wurde zunächst mit jeweils einem halben Röhrchenvolumen der beiden 10- und 50 %igen Glycerolendpunktlösungen gefüllt, wobei die niederprozentige mit

der höherprozentigen Lösung unterschichtet wurde. Ein kontinuierlicher Gradient wurde durch Rotation des Zentrifugenröhrchens auf der geneigten Plattform der *Gradient Station* nach erzeugt. Dauer, Geschwindigkeit und der Neigungswinkel wurden dabei von einem Programm des Geräts vorgegeben. Die Solubilisierung von 1 mg isolierter Mitochondrien unter nativen Bedingungen mit Digitonin im Verhältnis Digitonin/Protein (w/w) von eins erfolgte wie unter 2.4.3.2 beschrieben. Der nach einem 20minütigen Zentrifugationsschritt bei 57000 g und 4 °C gewonnene Überstand wurde auf den eisgekühlten Glycerolgradienten aufgetragen. Die dichteabhängige Auftrennung des Proteingemischs erfolgte durch Zentrifugation in einer Optima L-90 K-Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) für 4 h bei 250000 g und 4 °C. Die Fraktionierung erfolgte mit Hilfe des Fraktionensammlers *Pharmacia LKB*Frac-100* eines *Liquid*, der Pumpen *Pump P-500* und eines *Chromatography Controller LCC-550* der Firma Pharmacia. Dabei wurde der Inhalt des Zentrifugationsröhrchens mit 2 M Saccharoselösung bei einer Flussrate von 1 ml/min durch ein Loch im Boden des Röhrchens gedrückt und in 500 µl-Fractionen gesammelt. Die in den Fractionen enthaltenen Proteine wurden mit TCA gefällt (siehe 2.4.2) und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Glycerolendpunktlösungen 10 % oder 50 % (w/v) Glycerol; 150 mM Kaliumacetat; 20 mM HEPES; pH 7,4

2.4.9 Größenausschlusschromatographie

Alternativ zur nativen Gelelektrophorese oder Dichtegradientenzentrifugation wurde die Größe von Proteinkomplexen mittels Größenausschlusschromatographie mit Hilfe des Chromatographiesystems Äkta Explorer (GE Healthcare) bestimmt. 1 mg isolierte Mitochondrien wurden mit einem Digitonin/Protein (w/w)-Verhältnis von eins solubilisiert wie unter 2.4.3.1 beschrieben. Gelöstes Material wurde auf eine Superose 6-Säule (GE Healthcare), die zuvor mit zwei Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Es wurden 500 µl-Fractionen gesammelt. Die darin enthaltenen Proteine wurden mit TCA gefällt (siehe 2.4.2) und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Laufpuffer 150 mM Kaliumacetat; 0,05 % (w/v) Digitonin; 20 mM HEPES; pH 7,4

2.4.10 Proteinreinigung

2.4.10.1 TAP-Affinitätsreinigung

Eine TAP-markierte Variante von Fc β 1 wurde über Tandem Affinitäts (TAP)-Reinigung aus isolierten Mitochondrien gewonnen [Puig *et al.*, 2001]. 25 μ l IgG Sepharose 6 Fast Flow-Matrix (GE Healthcare) wurden dreimal mit TBS, einmal mit 0,1 M Glycin, pH 2,5 und erneut dreimal mit TBS gewaschen und anschließend mit Solubilisierungspuffer 3, der 1 % Triton X-100 enthielt, äquilibriert. 1 mg isolierter Mitochondrien wurde 30 min auf Eis in 100 μ l Solubilisierungspuffer 3, der 1 % Triton X-100 enthielt, inkubiert. Ungelöstes Material wurde durch Zentrifugation für 20 min bei 57000 g und 4 °C vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde während 1 h unter Rotation bei 4 °C mit der vorbereiteten Sepharose-Matrix inkubiert. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit Solubilisierungspuffer 3, der 0,1 % Triton X-100 enthielt, gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (siehe 2.4.3.1) während 3 min bei 95 °C eluiert.

Solubilisierungspuffer 3 150 mM NaCl; *Complete* Proteaseinhibitorcocktail (Roche); 5 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,5 mM 1,10-Phenanthrolin; 2 μ g/ml Aprotinin; 1 μ g/ml Pepstatin; 10 mM Tris/HCl; pH 8,0

2.4.10.2 Ni-NTA-Affinitätsreinigung

Eine His₁₂-markierte Variante von Fc β 1 wurde über Ni-NTA-Affinitätsreinigung aus isolierten Mitochondrien gewonnen. 3 mg Mitochondrien wurden wie unter 2.4.10.1 beschrieben mit Solubilisierungspuffer 4, der 1 % Triton X-100 und 5 mM Imidazol enthielt, solubilisiert. Der Überstand wurde während 1 h bei 4 °C unter Rotation mit 30 μ l gewaschener Ni-NTA-Matrix (Novagen) inkubiert. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit Solubilisierungspuffer 4, der 0,1 % Triton X-100 und 30 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (siehe 2.4.3.1) während 3 min bei 95 °C eluiert.

Solubilisierungspuffer 4 150 mM NaCl; *Complete* Proteaseinhibitorcocktail (Roche); 1 mM PMSF; 0,5 mM 1,10-Phenanthrolin; 2 μ g/ml Aprotinin; 1 μ g/ml Pepstatin; 10 mM Tris/HCl; pH 8,0

2.4.11 N-terminale Proteinsequenzierung durch Edman–Abbau

Die aminoternale Sequenzierung von Proteinen erfolgte durch Edman-Abbau. Dazu wurden die zu analysierenden Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassieblau angefärbt (siehe 2.4.5). Zu analysierende Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Sequenzierreaktion wurde von Tobias Beckhaus und Prof. Dr. Michael Karas (Goethe Universität Frankfurt am Main) durchgeführt.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Erzeugung polyklonaler Antikörper

Die verwendeten Fc β 1-spezifischen Antikörper entstammten polyklonalen Antisera aus Kaninchen, die mit dem internen Peptid NTQYENSKREFEKN von Fc β 1 (Aminosäuren 214-226) immunisiert wurden. Zur Kopplung an eine Affinitätsmatrix trägt das Peptid einen zusätzlichen Cystein-Rest am Aminoterminus. Alle Schritte zur Erzeugung der Antisera von der Protein-Epitopanalyse über die Peptidsynthese und Kopplung des Peptids an den Proteincarrier *Keyhole limpet haemocyanin* bis zur Immunisierung der Kaninchen wurden von der Firma Pineda Antiköperservice (Berlin) durchgeführt.

2.5.2 Kovalente Kopplung synthetischer Peptide an Sulfolink Coupling Gel® (Pierce)

Zur Minimierung von Kreuzreaktionen im Western Blot wurden Fc β 1-spezifische Peptidantikörper einer Affinitätsreinigung unterzogen. Zu diesem Zweck wurden die zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten Peptide über ihren Cysteinrest am Aminoterminus an die Affinitätsmatrix Sulfolink Coupling Gel® (Pierce) gekoppelt. Zunächst wurde eine Säule, die 1 ml Gelbettvolumen dieser Matrix enthielt, mit 6 Säulenvolumina Bindepuffer äquilibriert. Das Säulenmaterial wurde anschließend in 1 ml Bindepuffer, in dem 10 mg des zu koppelnden Peptids gelöst waren, suspendiert. Die Kopplung erfolgte unter leichtem Schütteln für 1 h bei RT. Nachdem sich die Affinitätsmatrix während 30 min abgesetzt hatte, wurde die überschüssige Flüssigkeit abgelassen und die Säule mit 3 Säulenvolumina Bindepuffer gewaschen. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde das Säulenmaterial in 1 ml Bindepuffer, der 50 mM Cystein enthielt, resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur und Ablassen der überschüssigen Flüssigkeit wurde die Säule mit 16 Säulenvolumina 1 M NaCl und 16 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl pH 7,5

gewaschen. Vor der Lagerung wurde die Säule mit 4 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl pH 7,6 mit 0,02 % (w/v) Natriumazid gewaschen und in 0,5 ml dieser Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

Bindepuffer 50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; pH 8,5

2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Eine gelagerte Affinitätssäule wurde vor Gebrauch zur Entfernung eventueller Verunreinigungen nacheinander mit je 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM Glycin/HCl pH 2,5, 10 mM Tris/HCl pH 8,8 und 100 mM NaP_i pH 11,5 gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 äquilibriert. 5 ml des aufzureinigenden Antiserums wurden mit 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA und 1 mM PMSF versetzt. Zur Bindung der Antikörper an die Säulenmatrix wurde diese Lösung während 1 h bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einer Peristaltikpumpe über die Säule gepumpt. Nach Ablassen der überschüssigen Flüssigkeit wurde nacheinander mit 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und mit 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution in drei Schritten erfolgte zunächst mit 10 ml 100 mM Citratpuffer pH 4, dann mit 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5 und schließlich mit 10 ml 100 mM NaP_i pH 11. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt, deren pH-Wert sofort mit 1 M Tris-Base (Citrat- und Glycin-Elution) oder 1 M Glycin/HCl pH 2,5 (NaP_i-Elution) neutralisiert wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Fraktionen erfolgte nach Bradford (siehe 2.4.1). Die Antikörper eluierten gewöhnlich in den Fraktionen 2-4 der Elution mit Glycin/HCl pH 2,5. Diese Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Die Säule wurde zur Aufbewahrung mit 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 0,02 % (w/v) Natriumazid gewaschen, mit 0,5 ml dieser Lösung überschichtet und bis zur erneuten Benutzung bei 4 °C gelagert.

2.5.4 Immundetektion von Proteinen

Das folgende Protokoll galt für alle verwendeten Antikörper bis auf den käuflich erworbenen His-Antikörper der Firma Qiagen. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt: Nach dem Proteintransfer (siehe 2.4.4) wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 30 min in Blockpuffer 1 geschwenkt. Trockene PVDF-Membranen wurden zuvor durch kurzes Schwenken in Ethanol aktiviert. Nach einstündiger Inkubation mit einem spezifischen Antiserum oder einem affinitätsgereinigten Antikörper aus Kaninchen, die je nach Titer zwischen 1:250 und 1:5000 in Blockpuffer verdünnt wurden,

wurden die Membranen dreimal 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte über gegen Immunglobulin G aus Kaninchen gerichtete Zweitantikörper, an die Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war (Ziege anti-Kaninchen-HRP Konjugat, Biorad). Die Membranen wurden während 1 h mit 1:10000-Verdünnungen dieser Antikörper in Blockpuffer geschwenkt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die gebundenen Zweitantikörper über die Peroxidase mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham Biosciences) nachgewiesen. Die dafür benötigten Lösungen ECL1 und ECL2 wurden unmittelbar vor der Reaktion im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membranen wurden nach einer einminütigen Inkubation mit dieser Mischung auf Röntgenfilmen (Fuji) exponiert. Je nach Qualität der verwendeten Primärantikörper variierte die Expositionszeit zwischen wenigen Sekunden und mehreren Minuten.

Auch bei der Immundekoration mit dem käuflich erworbenem His-Antikörper (Qiagen) fanden alle Schritte bei RT statt: Die Blockierung unspezifischer Bindestellen auf der Nitrozellulosemembran erfolgte während 60 min in Blockpuffer 2. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 min in Waschpuffer und einmal 10 min in TBS-Puffer geschwenkt, bevor sie während 75 min mit den 1:1000 in Blockpuffer verdünnten His-spezifischen Immunglobulinen G aus Maus inkubiert wurde. Nach drei Waschschritten, die wie beschrieben abliefen, erfolgte während 60 min die Inkubation mit den gegen Immunglobulin G aus Maus gerichteten Sekundärantikörpern, an die Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen entfernt, bevor die Detektion wie für das allgemeine Western Blot-Protokoll beschrieben erfolgte.

TBS-Puffer	150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 7,5
Blockpuffer 1	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer
Blockpuffer 2	3 % (w/v) BSA in TBS-Puffer
Waschpuffer 2	20 mM Tris/Cl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween20; 0,2 % (v/v) Triton X-100
ECL1	100 mM Tris/HCl; 0,044 % (w/v) Luminol; 0,0066 % (w/v) p-Coumarinsäure; pH 8,5
ECL2	100 mM Tris/HCl; 0,024 % (w/v) H ₂ O ₂ ; pH 8,5

2.6 Kulturmedien

LB-Medium 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid.
Autoklavieren.

LB-Platten LB-Medium; 1,5 % (w/v) Agar
Autoklavieren.

Für LB^{Amp}-Medium sowie -Platten wurde nach dem Autoklavieren
100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

YP-Medium 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Bacto-Pepton.
pH 5 mit HCl einstellen; autoklavieren.
2 % (w/v) Glukose (YPD) oder 2 % (w/v) Glycerol (YPG)
40 % (w/v) Stammlösungen von Glukose und Glycerol wurden separat
autoklaviert.

Laktat-Medium 3 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l Calciumchlorid; 0,5 g/l Natriumchlorid; 0,6 g/l
Magnesiumchlorid; 1 g/l Kaliumdihydrogenphosphat; 1 g/l Ammoniumchlorid; 3 mg/l Eisen-(III)-chlorid; 2 % (w/v) Laktat.
pH 6 mit NaOH einstellen; autoklavieren.

S-Medium 1,7 g/l *Yeast Nitrogen Base* ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat;
5 g/l Ammoniumsulfat; 2 % (w/v) Glukose (SD) oder 2 % (w/v)
Glycerol (SG).
Autoklavieren.
Auxotrophiemarker: 20 mg/l Adenin; 20 mg/l Uracil; 33 mg/l Histidin;
33 mg/l Leucin; 33 mg/l Lysin; 33 mg/l
Methionin; 33 mg/l Tryptophan
Stammlösungen der Auxotrophiemarker wurden separat autoklaviert.

Für die Herstellung von Kulturplatten für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurde vor dem
Autoklavieren zusätzlich zu den Inhaltsstoffen des entsprechenden Flüssigmediums 2 % (w/v)
Agar zugegeben.

2.7 Chemikalien und Geräte

2.7.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert, München

Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

AppliChem, Darmstadt

Tris, Ampicillin, Magermilchpulver

Beckton Dickenson, Heidelberg

Bacto-Trypton

Biorad, München

Proteinstandard und Reagenzien zur Proteinbestimmung, Meerrettich-Peroxidasegekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-Antikörper, Prestained Precision Plus Protein Standard

Braun, Melsungen

Kanülen, Spritzen

Dianova, Hamburg

10 nm Gold-markierter Anti-Kaninchen-Antikörper

Fuji, Düsseldorf

Medical X-ray Film Super RX 13 x 18 cm

GE Healthcare, München

Bacto-Pepton, IgG Sepharose 6 Fast Flow, Gel filtration HMW Calibration Kit

Gerbu, Gaiberg

Acrylamid, Ampicillin, DTT, HEPES

Greiner, Kremsmünster

15- und 50 ml Reaktionsgefäße

Fermentas, St. Leon-Rot

Molekulargewichts-Standards für SDS-PAGE

Invitrogen, Groningen (NL)

DH5 α , Yeast Nitrogen Base, AMS

Metabion, Martinsried

Oligonukleotide

New England BioLabs, Schwalbach

DNA Ladder 1 kb, DNA Ladder 100 bp, Restriktionsendonukleasen und 10 x Puffer für Restriktionsendonukleasen, Taq-DNS-Polymerase, Desoxynucleosidtriphosphate, T4-DNS-Ligase und dazugehöriger 10 x Puffer

peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Elektroporationsküvetten, E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit

Pierce, Rockford (USA)

Sulfolink® Coupling Gel

Pineda Antikörper Service, Berlin

Antikörper gegen synthetisches Peptid von Fc γ 1

(Aminosäuren 214-226: CNTQYENSKREFEKN [Rabl *et al.*, 2009])

Promega, Heidelberg

Pfu-DNS-Polymerase. Pure Yield Plasmid Midi Prep System

Qiagen, Hilden

Monoklonaler Anti-His-Antikörper

R&D Systems, Abingdon (UK)

pYX-Vektoren

Roche Applied Sciences, Mannheim

Proteinase K, Proteaseinhibitor Complete, EDTA-free

Carl Roth, Karlsruhe

Roti®-PVDF-Membran, Saccharose

Sarstedt, Bad Homburg

Reaktionsgefäße, Petrischalen, Pipettenspitzen

Schleicher & Schüll, Kassel

Protan Nitrozellulosemembran BA83, Whatman Filterpapiere, Faltenfilter, Sterilfilter

Seikagaku, Tokyo (Japan)

Zymolyase 20T

Serva, Heidelberg

Acrylamid, Agar-Agar. Agarose, Bisacrylamid, Bis-Tris, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Hefeextrakt, Lysozym, PMSF, Polyvinylpyrrolidon K15/MW 10000, Ponceau S, SDS, Serva Blau G, TEMED

Sigma, München

Aminosäuren, Ammoniumperoxodisulfat, BSA Grade VIII (fettsäurefrei), Bromphenolblau, Coumarsäure, DMSO, Ethidiumbromid, Glycerol, Kieselwolframsäurehydrat, Lachsspermien-DNS, Luminol, β -Mercaptoethanol, Molekulargewicht-Kit für BN/CN-PAGE, Polyvinylpyrrolidon (K15/MW 10000), Protein A-gekoppelte 3 nm-Goldpartikel, Tricin, Triton X-100

Thermo Fisher Scientific, Rockford, (USA)

DSS, DSG, MBS, Sulfolink® Coupling Gel, YKO MATa Strain Collection Hefestammsammlung

Alle übrigen Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.7.2 Geräte

Autoklav

Varioclav® 400E ; H + P Labortechnik, Oberschleißheim

Brutschränke, Inkubatoren

Heraeus Christ, Osterode

CCD-Kamera für Fluoreszenzmikroskop

AxioCam MRm; Carl Zeiss, Jena

Chromatographiesäule

Superose 6; GE Healthcare, München

Chromatographiesystem

Äkta Explorer; GE Healthcare, München

Elektroporationssystem

Gene Pulser; BioRad, München

Entwicklermaschine

Curix 60®; Agfa-Gevaert, München

Feinwaagen

Sartorius, Mainz

Fluoreszenzmikroskopo

Axioplan 2; Carl Zeiss, Jena

Fraktionensammler

Liquid Chromatography Controller LCC-500, Pharmacia Erlangen

Pharmacia LKB * Frac-100, Pharmacia, Erlangen

Pump P-500, Pharmacia, Erlangen

Gelkammern

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad, München

Gradienten-Station für Zentrifugenröhrchen

Gradient Station; BioComp Instruments Inc, Fredericton, NB (Kanada)

Gradientenkammer für Nativgele

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Kolbenhubpipetten

Abimed, Düsseldorf

Magnetrührer

MR 3001 K; Heidorph Multipette Eppendorf, Hamburg

Peristaltische Pumpe

P-1; Amersham Biosciences, Freiburg

Photometer

Ultrospec 10 Amersham Biosciences, Freiburg

BioPhotometer Eppendorf, Hamburg

Quarzküvetten

Hellma

Reinstwasseranlagen

PureLab Plus; ELGA Berkefeld GmbH, Celle

Halbtrocken Blotapparatur

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Software Fluoreszenzmikroskop

Axiovision AC; Carl Zeiss, Jena

Spannungsquellen

Electrophoresis Power Supply EPS 600; Amersham Biosciences, Freiburg

Sterilbank

BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Tank-Blot

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Thermocycler

Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg

Thermomixer

Thermomixer compact; Eppendorf, Hamburg

Tieftemperaturschneidesystem

EM FCS; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Transiluminator

GDS-7900 System, Modell LM-26E; UVP, Upland (USA)

Überkopfschüttler

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Ultramikrotom

Ultracult S; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Ultraschallgerät

Branson Sonifier B-15; G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Vortex-Mixer

Bender und Hobein, München

Wärmeschränke

Memmert, Hannover

Zentrifugen

Allegra X-22 R, Avanti J-20 XP, Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld

Zentrifugen (Ultrazentrifugen)

Optima L8-M, Optima L-90K, Optima LE-80K, Beckman Coulter, Krefeld

Zentrifugen (Tischzentrifugen)

5415D, 5810R, Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen (Kühlzentrifuge)

3K30, Sigma, München

Microfuge® 22R Centrifuge, Beckman Coulter, Krefeld

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Fcj1

3.1.1 Fcj1 ist im Bereich der Crista Junctions angereichert

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass Fcj1 ein Protein der mitochondrialen Innenmembran ist, aber nicht, welche Aufgabe es dort erfüllt. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Vincent Soubannier und Dr. Frank Vogel mittels quantitativer Immun-Elektronenmikroskopie zunächst die submitochondriale Lokalisierung von Fcj1 bestimmt. Cryoschnitte chemisch fixierter Wildtyp-Zellen wurden zunächst mit Fcj1-spezifischen Primärantikörpern und dann mit Sekundärantikörpern, die mit 10 nm großen Goldpartikeln markiert waren, behandelt. Anschließend wurde elektronenmikroskopisch die Verteilung der Goldpartikel in den Mitochondrien analysiert. Die Spezifität der gereinigten Primärantikörper wurde zuvor mit Western Blot geprüft (Abbildung 12A). Zur Kontrolle wurden auch Cryoschnitte chemisch fixierter $\Delta fcj1$ -Zellen der für den Wildtyp beschriebenen Prozedur unterzogen. In $\Delta fcj1$ beträgt die Anzahl der gebundenen Goldpartikel pro Flächeneinheit im Vergleich zum Wildtyp weniger als 10 % (Abbildung 12B).

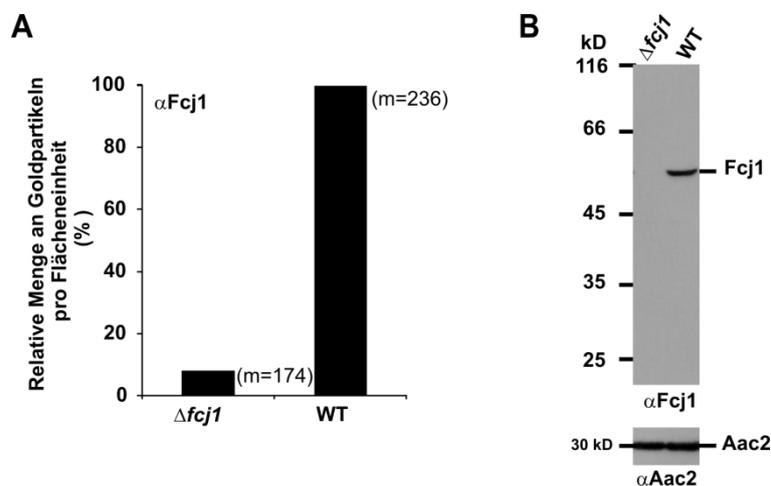


Abbildung 12: Spezifität der gegen Fcj1 gerichteten Antikörper. (A) Western Blot. In vergleichbaren Mengen isolierter Mitochondrien aus Wildtyp (WT) und $\Delta fcj1$ wurden Fcj1 und Aac2 nachgewiesen. (B) Quantifizierung von Goldpartikeln in mitochondrialen Querschnitten chemisch fixierter Zellen von Wildtyp (WT) und $\Delta fcj1$ nach Inkubation mit Fcj1-spezifischen Primärantikörpern und goldmarkierten Sekundärantikörpern. Die Anzahl der Goldpartikel pro Flächeneinheit im Wildtyp wurde 100 % gleichgesetzt. m, Anzahl der mitochondrialen Schnitte. Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel.

Um den Anteil unspezifischer Immunreaktionen möglichst gering zu halten, wurden ausreichend hohe Verdünnungen des Fcj1-Antikörpers eingesetzt. Dies resultierte in der

Markierung nur weniger Fcj1-Moleküle pro mitochondrialem Schnitt (Abbildung 13A). Die Goldpartikel aus einer Vielzahl von Cryoschnitten des Wildtyps wurden auf ein bereits beschriebenes Cristae-Modell [Vogel *et al.*, 2006], das Außenmembran, innere Grenzmembran, Cristaemembran und eine CJ enthält, projiziert (Abbildung 13B).

Ein großer Anteil von Fcj1 befindet sich in der Region der CJ und damit in einem Bereich, der bei früheren Messungen allenfalls durch eine geringe Dichte der zu lokalisierenden Proteine aufgefallen war. Auch in der übrigen Cristaemembran wurden, mit Ausnahme einer begrenzten Region, die als Crista-„Hals“ bezeichnet wird, viele Goldsignale detektiert. Ein geringer Anteil der Goldpartikeln befindet sich im Bereich der inneren Grenzmembran. Der Begriff Crista-„Hals“ bezieht sich auf das Erscheinungsbild der tubulären Eintrittsöffnungen der Cristae in dreidimensionalen Rekonstruktionen nach EM-Tomographie. Während es sich bei der CJ um ein schmales Membransegment im Übergangsbereich zwischen innerer Grenzmembran und Cristaemembran mit einem hohen Anteil an negativer Membrankrümmung handelt, überwiegt in der angrenzenden tubulären „Hals“-Region die positive Krümmung. Stellt man sich diesen Bereich als Griff eines Tennisschlägers vor, so entspricht das daran anschließende Crista-„Blatt“ dessen Schlagfläche. Hier erweitert sich der intracristale Bereich derart, dass neben positiven und negativen Membrankrümmungen auch ebene Membranflächen auftreten, die erst in der Crista-„Spitze“ wieder in eine positive Krümmung übergehen.

Zur quantitativen Darstellung der submitochondrialen Verteilung von Fcj1 wurden mit Hilfe eines beweglichen Fensters alle Goldpartikel entlang der Innenmembran gezählt, die sich innerhalb einer Distanz von 14 nm zur Membran befanden. Diese Messung wurde neben Fcj1 als Kontrolle auch für die Innenmembranproteine Cox2, Su e und Su g durchgeführt (Abbildung 13C und D). Während sich die höchste Dichte an Fcj1 im Bereich der CJ befindet, weist dieser Bereich nur wenig Cox2 auf. Als Atmungskettenprotein befindet sich Cox2 vor allem in den Cristae. Auch das Verteilungsmuster der F₁F₀-ATP-Synthase-Untereinheiten Su e und Su g zeigt keine Präferenz für die CJ. Beide Proteine sind deutlich im Bereich der Crista-„Spitze“ angereichert. Damit unterscheidet sich die beobachtete Anreicherung von Fcj1 an den CJs von allen anderen bisher untersuchten Proteinen (vgl. Vogel *et al.*, 2006).

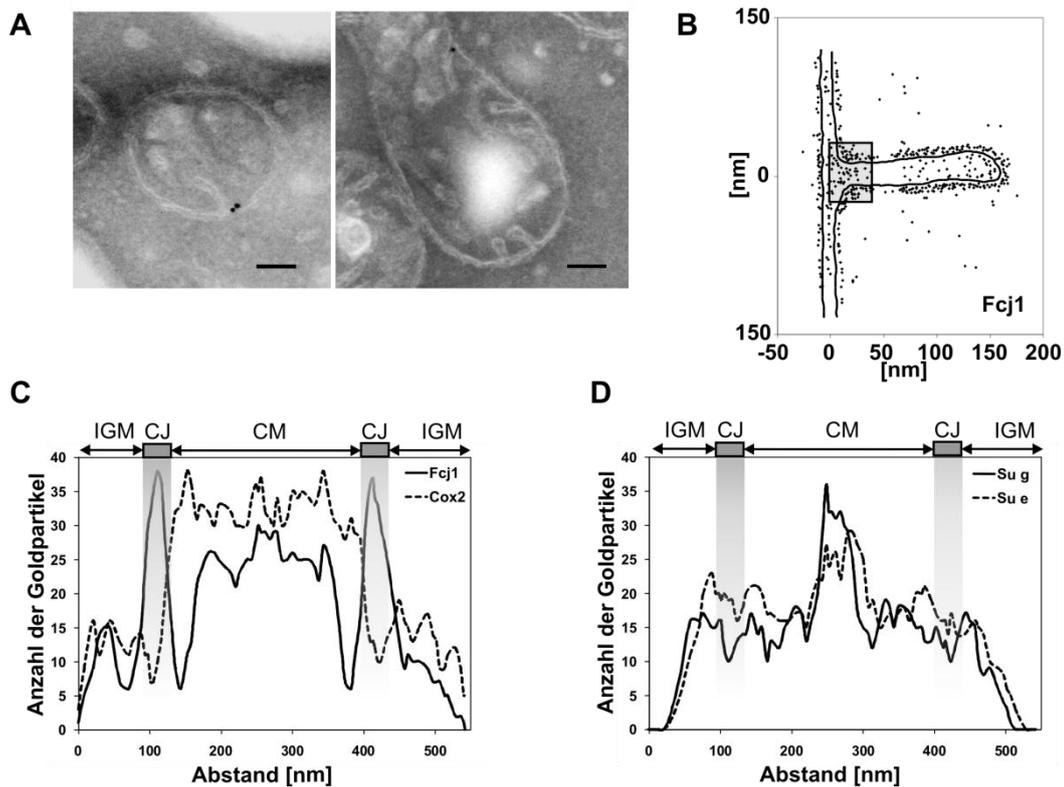


Abbildung 13: Fcj1 ist an der Crista Junction angereichert. (A) Immungold-Markierung von Fcj1 in Wildtyp-Zellen. (B) Lokalisation Fcj1-spezifischer Goldpartikel in einem empirischen Crista Junction-Modell (vgl. Vogel *et al.*, 2006). (C und D) Profile spezifischer Proteindichten in der Innenmembran. Dargestellt sind die Proteindichten von Fcj1 und Cox2 (C) und von Su e und Su g (D). Die Anzahl der Goldpartikel innerhalb einer 14 nm-Distanz zur Innenmembran wurde *in silico* mit Hilfe eines von oben nach unten entlang dieser Membran bewegten Fensters im unter (B) dargestellten Modell bestimmt. Die Rohdaten entstammen Abbildung 13B und [Vogel *et al.*, 2006]. Graue Kästen markieren den Bereich der Crista Junction. CJ, Crista Junction; CM, Cristaemembran; IGM, Innere Grenzmembran. Zusammenarbeit mit Dr. Vincent Soubannier und Dr. Frank Vogel.

3.1.2 Die Aminosäuresequenz von Fcj1 enthält mehrere Motive, die an einer Protein-Protein-Interaktion beteiligt sein könnten

Der offene Leserahmen YKR016w kodiert für 540 Aminosäurereste (AS). Davon stellen die ersten 24 AS die mitochondriale Signalsequenz dar, die nach dem Import abgespalten wird. Im verbleibenden Rest können mehrere Domänen unterschieden werden (Abbildung 14). So enthält Fcj1 ein aminoterminal Transmembransegment (AS 39-56), das ein AXXXG-Dimerisierungsmotiv besitzt. Dieses Motiv weist auf eine Interaktion mit einer anderen Transmembranhelix hin [Eilers *et al.*, 2002]. Auch die Coiled coil-Region (AS 239-330), die in den Intermembranraum ragt, stellt eine potentielle Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar. Coiled coil-Domänen sind α -helikale Struktur motive, die

beispielsweise die Dimerisierung von Tropomyosin oder α -Keratin vermitteln [Pauling und Corey, 1953; Sodek *et al.*, 1972]. Am höchsten konserviert ist der carboxyterminale Bereich von Fc1 (AS 490-533). Dort lässt sich zwar kein bisher bekanntes Sequenzmotiv erkennen, es kann jedoch von einer wichtigen Domäne für die Funktionalität von Fc1 ausgegangen werden. Insgesamt besitzt Fc1 mehrere Domänen, die an einer Protein-Protein-Interaktion beteiligt sein könnten.

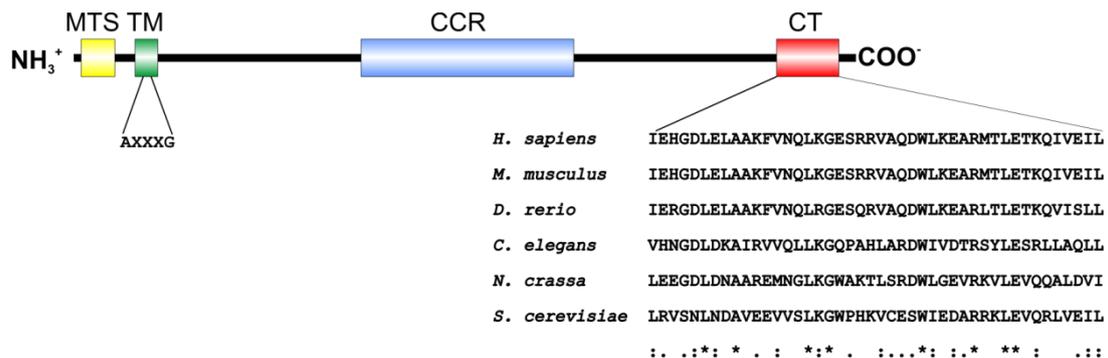


Abbildung 14: Schematischer Überblick über mögliche Protein-Protein-Interaktionsdomänen von Fc1. Dargestellt sind die mitochondriale Signalsequenz (MTS; gelb), die Transmembrandomäne (TM; grün) mit einem vergrößerten Ausschnitt des Dimerisierungsmotivs AXXXG, die Coiled coil-Region (CCR; blau) und der konservierte Carboxyterminus (CT; rot) von Fc1. Die Größe und Lage alle Domänen und der dazwischen befindlichen Bereiche entsprechen deren tatsächlichen Proportionen im Protein. Angaben zu den Aminosäurepositionen befinden sich im Text. Für den Carboxyterminus ist ein Sequenzvergleich von Fc1 aus *S. cerevisiae* mit Mitofilin-ähnlichen Proteinen anderer Organismen dargestellt. Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des Programms ClustalW [Thompson *et al.*, 1994] durchgeführt. Markiert wurden identische Aminosäuren (*) sowie konservative (:) und semi-konservative (.) Substitutionen.

3.1.3 Fc1 ist Teil eines Proteinkomplexes

Um zu unterscheiden, ob Fc1 unter nativen Bedingungen als Monomer oder als Teil eines Proteinkomplexes vorliegt, wurden die Proteinkomplexe solubilisierter Mitochondrien über BN-PAGE aufgetrennt. Fc1 wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Da die gegen Fc1 gerichteten Antikörper nach der BN-PAGE kein spezifisches Signal lieferten, wurde eine His-markierte Fc1-Variante (Fc1-His₆) verwendet. Unabhängig vom eingesetzten Detergenz (Digitonin, Triton X-100 oder n-Dodecyl- β -maltosid) und selbst unter Verwendung großer Detergenzmengen erscheint der Hauptanteil von Fc1-His₆ als Teil eines sehr hochmolekularen Proteinkomplexes, der nur in geringem Maß in die Gelmatrix eintritt (Abbildung 15). Lediglich in Gegenwart von Triton X-100 wandert ein gewisser Anteil, dessen Molekularmasse größer als diejenige von Thyreoglobulin (669 kD) ist, weiter in die Gelmatrix ein. Um auszuschließen, dass die beobachtete Komplexgröße auf die His-Markierung

und das Überexprimieren der verwendeten Fcj1-Variante zurückzuführen ist, wurde auch der endogene FCJ1-Komplex aus Wildtyp-Mitochondrien, die in Digitonin solubilisiert wurden, untersucht. An eine CN-PAGE wurde als zweite Dimension eine denaturierende Tricin-SDS-PAGE angeschlossen, welche den Nachweis mit Fcj1-spezifischen Antikörpern ermöglicht. Zur Größenabschätzung dient die F_0 -Untereinheit Atp4, mit deren Hilfe sich sowohl das Monomer als auch das Dimer der F_1F_0 -ATP-Synthase detektieren lassen. Beide Formen laufen schneller als die Haupt-Population von Fcj1 (Abbildung 16).

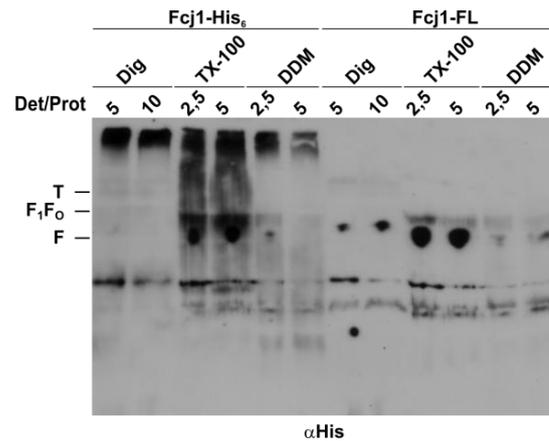


Abbildung 15: In der BN-PAGE verhält sich eine His-markierte Fcj1-Variante wie ein Teil eines hochmolekularen Proteinkomplexes. Mitochondrien aus Zellen, die eine His-markierte (Fcj1-His₆) oder eine unmarkierte Variante von Fcj1 (Fcj1-FL) exprimieren, wurden mit Digitonin (Dig), Triton X-100 (TX-100) oder n-Dodecyl- β -maltosid (DDM) mit dem angegebenen Verhältnis von Detergenz zu Protein (Det/Prot; w/w) solubilisiert. Nach BN-PAGE und Proteintransfer auf PVDF-Membran wurde die His-Markierung mit Western Blot nachgewiesen. Als Größenmarker dienen Ferritin (F; 474 kD), das Monomer der F_1F_0 -ATP-Synthase (F_1F_0 ; 600 kD) und Thyreoglobulin (T; 669 kD).

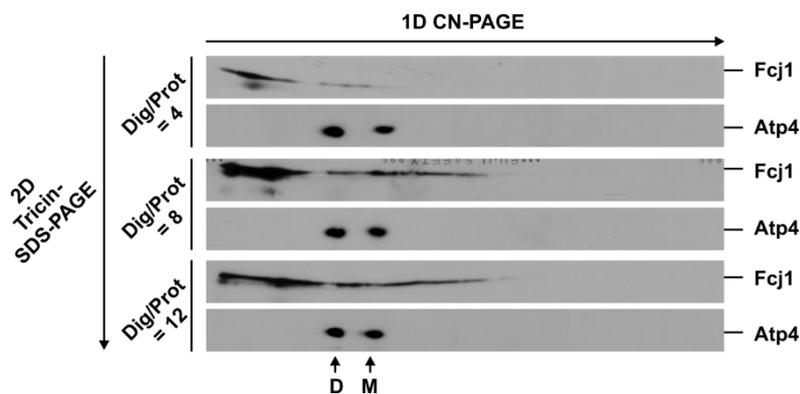


Abbildung 16: Wildtyp-Fcj1 verhält sich im 2D-Gel wie ein Teil eines hochmolekularen Proteinkomplexes. Wildtyp-Mitochondrien wurden nach Solubilisierung mit dem angegebenen Verhältnis von Digitonin zu Protein (Dig/Prot) und Auftrennung mittels 3-8 %iger CN-PAGE einer Tricin-SDS-PAGE unterzogen. Nach Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran wurden Fcj1 und Atp4 mit Western Blot nachgewiesen. Pfeile markieren die Laufrichtung der ersten (1D) und der zweiten Dimension (2D). Als Größenmarker dienen das Monomer (M; 600 kD) und das Dimer (D; 1,2 MD) der F_1F_0 -ATP-Synthase.

Dass die Wanderungsgeschwindigkeit von Fcj1 in der ersten Dimension sich von der Art des Detergenz (Abbildung 15) und dessen Menge (Abbildung 16) beeinflussen lässt, spricht gegen die Möglichkeit der Proteinaggregation. Die Ergebnisse aus BN-PAGE und 2D-Gel lassen somit den Schluss zu, dass Fcj1 Teil eines sehr großen Proteinkomplexes ist.

Eine alternative Methode zur Größenbestimmung von Proteinkomplexen ist die Dichtegradientenzentrifugation. Mit dieser Technik kann das Größenlimit, das BN- und CN-PAGE aus technischen Gründen haben, umgangen werden. Die Proteinkomplexe aus mit Digitonin solubilisierten Wildtyp-Mitochondrien wurden über einen kontinuierlichen Glycerolgradienten aufgetrennt. Nach der Fraktionierung des Gradienten wurden die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. S-Mgm1 (120 kD, [Shepard und Yaffe, 1999]) Tob55 als Untereinheit des TOB-Komplexes (350 kD, [Habib *et al.*, 2005]), Atp4 als Untereinheit der F₁F₀-ATP-Synthase (monomere Form 600 kD, [Schägger und Pfeiffer, 2000]) und Phb2 als Untereinheit des Prohibitin-Komplexes (1,2 MD [Tatsuta *et al.*, 2005]) dienten als Größenmarker. Das Fcj1-Signal verteilt sich über einen breiten Größenbereich. Dabei ist Signalintensität in denjenigen Fraktionen am höchsten, deren Größen vergleichbar mit denjenigen des TOB-Komplexes und des Monomers der F₁F₀-ATP-Synthase sind (Abbildung 17).

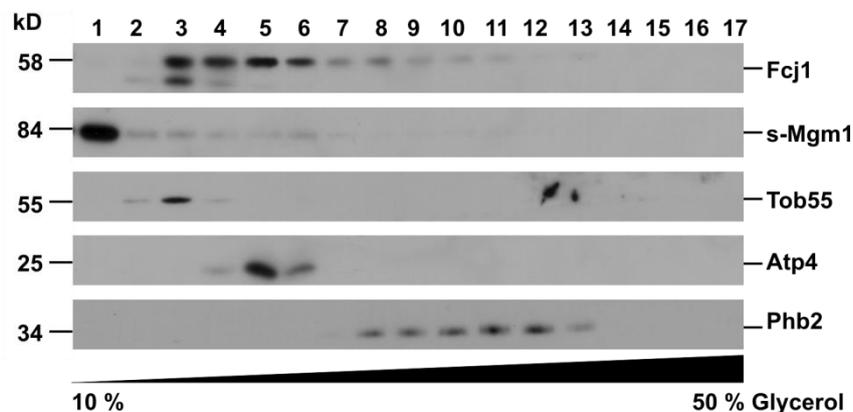


Abbildung 17: Nach Auftrennung mittels Dichtegradientenzentrifugation tritt Fcj1 in zwei Subpopulationen auf, deren Größen denjenigen des TOB-Komplexes und des Monomers der F₁F₀-ATP-Synthase entsprechen. Isolierte Wildtyp-Mitochondrien wurden mit Digitonin im Verhältnis 2:1 (Digitonin/Protein) solubilisiert und über einen kontinuierlichen 10-50 %igen Glycerolgradienten aufgetrennt. Der Gradient wurde ausgehend von der niederprozentigen Glycerolkonzentration in 500 µl-Schritten fraktioniert (Fraktionen 1–17). Der Nachweis von Fcj1, s-Mgm1, Tob55, Atp4 und Phb2 in den einzelnen Fraktionen erfolgte nach SDS-PAGE und Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran mittels Immundekoration.

Insgesamt verhält sich Fcj1 wie ein Teil eines weniger großen Komplexes, als die Nativ-PAGE-Experimente vermuten ließen. Möglicherweise zerfällt der Fcj1-Komplex

während der Dichtegradientenzentrifugation, denn auch die F_1F_0 -ATP-Synthase lässt sich unter den gewählten Bedingungen reproduzierbar nur in der monomeren Form nachweisen, worauf eine einzige Population von Atp4 hindeutet. Die Verteilung von Fcj1 über einen breiten Größenbereich legt die Möglichkeit verschiedener Fcj1-Subpopulationen nahe. Deren unterschiedliches Sedimentationsverhalten könnte sich aus der jeweiligen Anzahl der Fcj1-Monomere oder aus der Assoziation mit unterschiedlichen Interaktionspartnern ergeben.

Zusammenfassend verhält sich Fcj1 zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen zufolge als Teil eines größeren Proteinkomplexes, dessen definitive Größe noch zu bestimmen bleibt. Das Molekulargewicht beträgt nach Solubilisierung mit Digitonin mindestens 350 kD, könnte aber für bestimmte Subpopulationen sogar im Bereich > 1 MD liegen.

3.1.4 Fcj1 geht homotypische Interaktionen ein

Um zu testen, ob Fcj1 mit sich selbst interagiert, wurden zwei unterschiedlich markierte Varianten von Fcj1, Fcj1-His₆ und Fcj1-TAP, koexprimiert. Wenn Fcj1 aus den in Triton X-100 solubilisierten Mitochondrien über TAP-Affinitätsreinigung isoliert wird, lässt sich in der Elutionsfraktion auch die His-markierte Variante von Fcj1 detektieren (Abbildung 18).

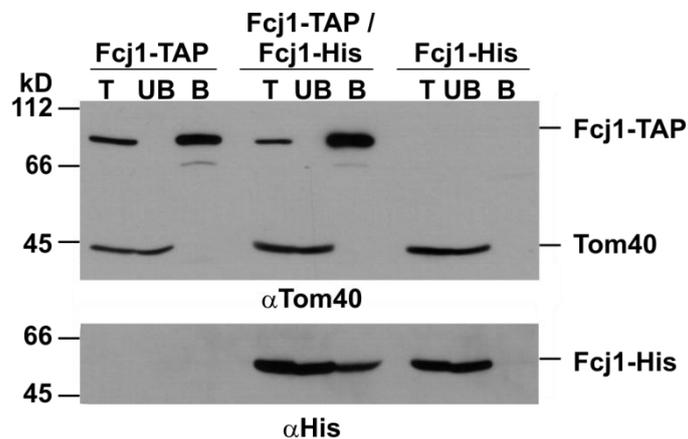


Abbildung 18: Fcj1 geht homotypische Interaktionen ein. Mitochondrien aus Zellen, die eine His-markierte (Fcj1-His₆) oder eine TAP-markierte (Fcj1-TAP) Fcj1-Variante oder beide exprimieren, wurden einer TAP-Affinitätschromatographie unterzogen. Das Ausgangsmaterial (T; 10 %), die ungebundene (UB; 10 %) und die gebundene Fraktion (B; 100 %) wurden nach SDS-PAGE und Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran mittels Western Blot mit Antikörpern, die Tom40 oder die His-Markierung erkennen, analysiert. Tom40 und Fcj1-TAP wurden gleichzeitig mit einem gegen Tom40 gerichteten Antikörper, der auch an die Protein A-Region der TAP-Markierung bindet, nachgewiesen.

Zur Kontrolle wurde das Experiment parallel mit Mitochondrien, die nur Fcj1-His₆ oder nur Fcj1-TAP enthielten, durchgeführt. In Abwesenheit von Fcj1-His₆ lässt sich in der Elutionsfraktion Fcj1-TAP nachweisen, in Abwesenheit von Fcj1-TAP enthält die Elutionsfraktion keine Variante von Fcj1. Somit geht Fcj1 *in vivo* homotypische Interaktionen ein.

Um zu klären, ob neben Fcj1 weitere Proteine an der Ausbildung des FCJ1-Komplexes beteiligt sind, wurde Fcj1-His₁₂ mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus mit Triton X-100 solubilisierten Mitochondrien isoliert. Zur Kontrolle wurde das Experiment parallel mit einer unmarkierten Variante von Fcj1 durchgeführt. Unbekannte Interaktionspartner sollten nach SDS-PAGE und Coomassiefärbung massenspektrometrisch identifiziert werden. Neben Fcj1 und dessen 30 kD großem Abbaufragment, das mittels Western Blot identifiziert wurde, waren jedoch alle detektierbaren Proteinbanden auch in der Elutionsfraktion der Kontrolle zu finden (Abbildung 19).

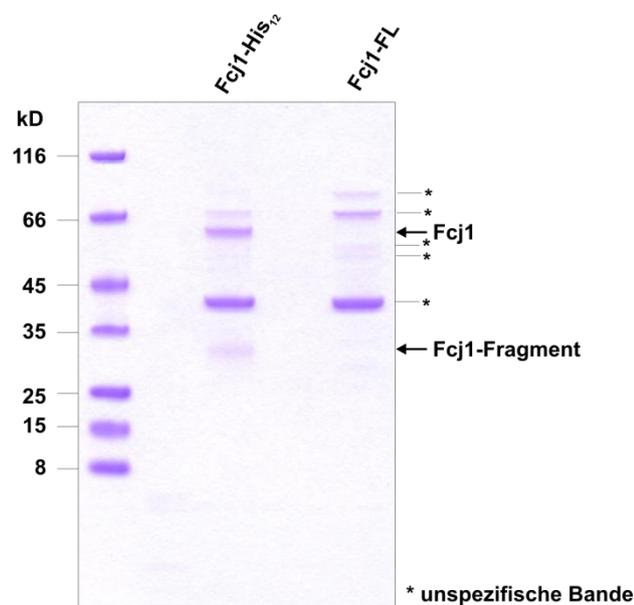


Abbildung 9 Ni-NTA-Affinitätschromatographie führt nicht zur Identifikation eines Fcj1-spezifischen Interaktionspartners. Mitochondrien aus Zellen, die eine His-markierte (Fcj1-His₁₂) oder die Wildtyp-Variante (Fcj1-FL) von Fcj1 exprimieren, wurden nach Solubilisierung mit Triton X-100 einer Ni-NTA-Affinitätsreinigung unterzogen. Die Elutionsfraktionen wurden nach Auftrennung mittels SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt. Fcj1 und dessen Abbaufragment sind mit einem Pfeil markiert. *, unspezifische Proteinbanden, die in beiden Elutionsfraktionen auftreten.

Somit wurde mit dieser Methode bisher kein Interaktionspartner von Fcj1 identifiziert. Dafür können folgende Gründe verantwortlich sein: Möglicherweise ist die verwendete carboxyterminal markierte Variante von Fcj1 nicht voll funktionsfähig. Zwar komplementiert sie den Wachstumsphänotyp von $\Delta f c j 1$ und das Fehlen von CJs (Daten nicht gezeigt), der

konserverte Carboxyterminus von Fcj1 könnte jedoch an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein, die durch das Anfügen der His-Markierung gestört werden. Alternativ wäre vorstellbar, dass der markierte Bereich von Fcj1 im intakten FCJ1-Komplex für die Bindung an die Ni-NTA-Matrix nicht zugänglich ist. Somit würden nur solche Fcj1-Moleküle angereichert werden, deren Carboxytermini aufgrund der Zerstörung des Komplexes und damit des Verlusts von Interaktionspartnern an die Matrix binden können. Letztlich könnte auch die möglicherweise transiente Art der von Fcj1 eingegangenen Bindungen deren Identifikation erschweren.

Zusammenfassend konnten homotypische Interaktion zwischen zwei Fcj1-Molekülen, jedoch keine weiteren Wechselwirkungen zwischen Fcj1 und anderen Proteinen nachgewiesen werden.

3.2 Einfluss von Fcj1 auf die mitochondriale Architektur

3.2.1 Mitochondriale Morphologie von $\Delta fcj1$ -Zellen

Um zu untersuchen, inwieweit sich das Fehlen von Fcj1 auf die mitochondriale Morphologie auswirkt, wurde in Hefezellen des Wildtyps und des Stamms $\Delta fcj1$ ein GFP-Konstrukt exprimiert, das von seiner Signalsequenz in die mitochondriale Matrix dirigiert wird. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Morphologie der Mitochondrien beider Stämme verglichen (Abbildung 20).

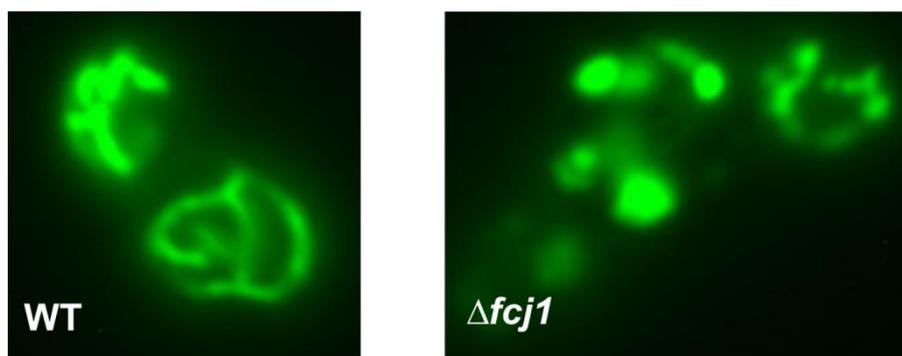


Abbildung 20: Die mitochondriale Morphologie von $\Delta fcj1$ -Zellen unterscheidet sich von derjenigen von Wildtyp-Zellen. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hefezellen des Wildtyps (WT; BY4741; links) oder von $\Delta fcj1$ (rechts). Die Zellen wurden in Laktat-Vollmedium kultiviert und in der frühen logarithmischen Phase mikroskopiert. Als mitochondrialer Marker dient Matrix-dirigiertes GFP.

In Wildtyp-Zellen bilden die Mitochondrien ein Netzwerk aus tubulären Strukturen, das gleichmäßig über das gesamte Zellvolumen verteilt ist. $\Delta fcj1$ -Zellen besitzen ebenfalls ein mitochondriales Netzwerk, welches sich allerdings in mehreren Punkten von demjenigen des Wildtyps unterscheidet. Die Mitochondrien der Mutante sind ungewöhnlich groß, möglicherweise geschwollen. Dies ist in Einklang mit den großen mitochondrialen Querschnitten, die bei der elektronenmikroskopischen Analyse chemisch fixierter $\Delta fcj1$ -Zellen auffielen (siehe 1.7.3). Im fluoreszenzmarkierten mitochondrialen Netzwerk von $\Delta fcj1$ -Zellen ist weiterhin der Anteil tubulärer Strukturen verringert, stattdessen treten häufig globuläre Strukturen auf, die sich bevorzugt in der Peripherie der Zelle befinden. Teilweise scheinen diese runden Strukturen sogar einen Hohlraum in ihrem Inneren zu umgeben.

3.2.2 Fcj1 hat direkten Einfluss auf die Architektur der Crista Junctions

Im Folgenden wurde die Auswirkung von erhöhten Fcj1-Mengen auf Hefezellen und Mitochondrien untersucht. Im Zuge dessen wurde Fcj1 mit Hilfe eines doxzyklin-regulierbaren Promotors etwa 10fach überexprimiert. Das Wachstum dieses Hefestamms unterscheidet sich nicht von dem des Wildtyps (Daten nicht gezeigt). Auch die Analyse der mitochondrialen Morphologie zeigt keinerlei Auffälligkeiten des mitochondrialen Netzwerks (Abbildung 21).

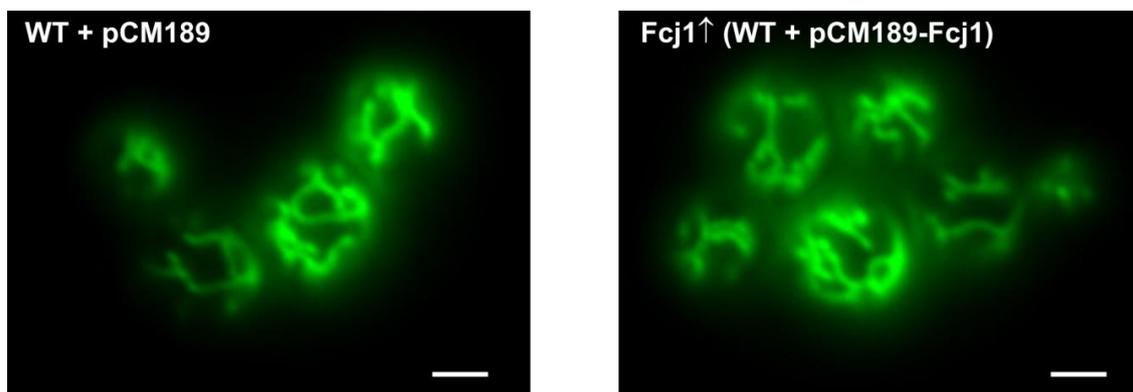


Abbildung 21: Die mitochondriale Morphologie von Fcj1-überexprimierenden Zellen entspricht derjenigen des Wildtyps. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Wildtyps (WT; W303 + pCM189; links) und von Fcj1-überexprimierenden (Fcj1 \uparrow ; WT + pCM189-Fcj1; rechts) Hefezellen. Die Zellen wurden in respiratorischem Medium (SLac + 0,1 % Glukose) kultiviert und in der frühen logarithmischen Phase mikroskopiert. Als mitochondrialer Marker dient Matrix-dirigiertes GFP.

Die Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von chemisch fixierten Hefezellen deckt hingegen Unterschiede in der Ultrastruktur von Mitochondrien des Fcj1-

überexprimierenden Stamms und denjenigen des Wildtyps auf (Tabelle 4 und Abbildung 22). Im Vergleich zum Wildtyp ist die Anzahl der mitochondrialen Querschnitte verdoppelt und die Anzahl der CJs pro Zelle zwei- bis dreifach erhöht. Zudem treten Verzweigungen innerhalb der Cristae etwa 17mal häufiger als im Wildtyp auf (Abbildung 22A). Erhöhte Mengen an Fcjl führen desweiteren zur Vergrößerung des CJ-Durchmessers. Während der Durchmesser von Wildtyp-CJs mit 12 bis 17 nm relativ konstant ist, variiert er in Fcjl überexprimierenden Zellen mit 12,5 bis 35 nm stärker und ist im Durchschnitt auf 22 nm erweitert (Abbildung 22B). Insgesamt führt Fcjl zur vermehrten Bildung von CJs und verändert deren molekulare Struktur.

	Wildtyp	Fcjl↑
Anzahl ausgewerteter Zellen	13	15
Anzahl mitochondrialer Schnitte	20	49
Anzahl mitochondrialer Schnitte pro Zelle	1,5	3,3
Anzahl der Crista Junctions	54	169
Anzahl der Crista-Verzweigungen	3	58
Crista Junctions pro Zelle	4,2	11,3
Crista-Verzweigungen pro Zelle	0,23	3,9

Tabelle 4: Vergleich der mitochondrialen Ultrastruktur von Wildtyp und Fcjl-überexprimierenden Zellen. Ausgewertet wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen chemisch fixierter Zellen von Wildtyp und Fcjl überexprimierenden (Fcjl↑) Zellen. In Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel.

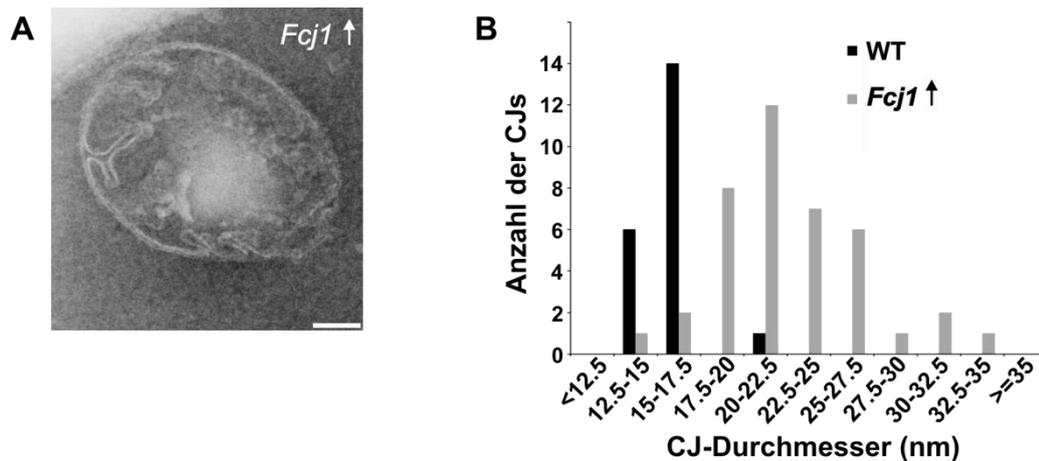


Abbildung 22: Die Überexpression von Fcj1 äußert sich in der Vergrößerung des Crista Junction-Durchmessers und in Verzweigungen der Cristae. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schnitts durch ein Mitochondrium einer Fcj1-überexprimierenden Hefezelle. (B) Verteilung der Crista Junction-Durchmesser in Mitochondrien des Wildtyps W303 mit Leerplasmid pCM189 (WT; n=21) oder Fcj1-Überexpressionplasmid pCM189-Fcj1 (Fcj1↑; n=40). Die chemische Fixierung der Hefezellen erfolgte nach Tokuyasu [Tokuyasu, 1989]. CJ, Crista Junction. Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel.

Mit dem folgenden Experiment wurde der Frage nachgegangen, ob die morphologischen Besonderheiten von Zellen mit veränderten Mengen an Fcj1 auf sekundäre Effekte zurückzuführen sind. Dazu wurde Fcj1 in $\Delta f cj 1$ -Zellen zunächst überexprimiert, bevor die Expression mit Hilfe eines doozyklinabhängigen Promtors reprimiert wurde. 13,5 h nach Doozyklinzugabe entspricht die Menge des ursprünglich etwa zehnfach überexprimierten Proteins dem endogenen Niveau und nimmt nach 23 h weiter ab (Abbildung 23A). Bis zum Ende des Experiments nach 47,5 h ist eine Restmenge an Fcj1 nachweisbar, die etwa einem Zehntel des Wildtyp-Niveaus entspricht. Dies ist auf eine unvollständige Reprimierung der Genexpression zurückzuführen. Mit sinkenden Fcj1-Mengen treten Veränderungen der mitochondrialen Ultrastruktur auf (Abbildung 23B). Bereits nach 13,5 h hat sich die Anzahl der CJs auf weniger als die Hälfte reduziert und nimmt im weiteren Verlauf bis auf etwa 20 % des Ausgangswertes ab. Der Anteil verzweigter Crista-Tubuli halbiert sich ebenso schnell und verschwindet in der Folge fast vollständig. Zu späteren Zeitpunkten (37,5 und 47,5 h) tritt die für $\Delta f cj 1$ typische stapelartige Anordnung der Innenmembranen auf. Die Bildung von $\rho^{0/-}$ -Zellen wurde während des gesamten Experiments nicht beobachtet.

Insgesamt zeigt dieses Experiment die direkte Beteiligung von Fcj1 an der Bildung der CJs. Dass die in Abwesenheit von Fcj1 auftretenden morphologischen Veränderungen sekundäre Effekt des mtDNA-Verlusts sind, kann somit ausgeschlossen werden.

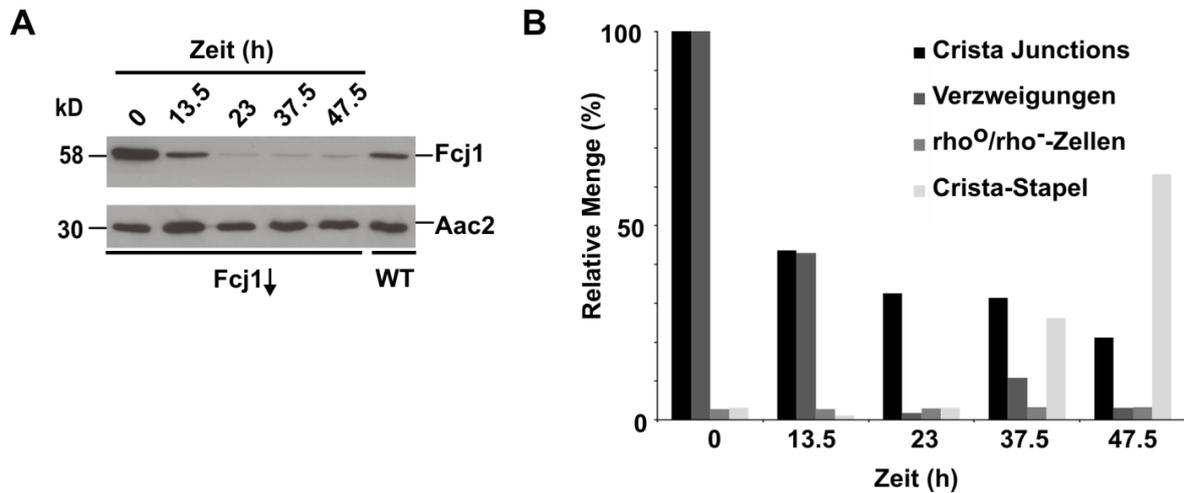


Abbildung 23: Reprimierung der Expression von Fcj1 führt zur Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur. In einem $\Delta fcl1$ -Stamm, der das doxyzyklinregulierbare Plasmid pCM189-Fcj1 enthielt, wurde die Expression von Fcj1 durch die Zugabe von Doxyzyklin reprimiert. (A) Western Blot. Gezeigt sind die Mengen von Fcj1 und Aac2 in Gesamtzellextrakten zu den angegebenen Zeitpunkten nach Doxyzyklin-Zugabe (Fcj1↓) oder im Wildtyp, der das Leerplasmid pCM189 enthielt (WT). (B) Phänotypische Analyse der Reprimierung von Fcj1. Die Anzahl der Crista Junctions und Crista-Verzweigungen pro mitochondrialem Schnitt ($m_{0h} = 26$, $m_{13.5h} = 69$, $m_{23h} = 49$, $m_{37.5h} = 66$, $m_{47.5h} = 57$; m , Anzahl der ausgewerteten mitochondrialen Schnitte) und der Anteil an Crista-Stapel-enthaltenden Zellschnitten entstammen der elektronenmikroskopischen Analyse von Zellen, die zu den angegebenen Zeitpunkten nach Doxyzyklinzugabe chemisch fixiert wurden. Die Anzahl der Crista Junctions und der Crista-Verzweigungen pro mitochondrialem Schnitt vor der Herunterregulierung wurde mit 100 % gleichgesetzt. Der Anteil der rho⁰-Zellen und der Crista-Stapel enthaltenden Zellen bezieht sich auf die Gesamtzellzahl zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Auswertung aller Parameter erfolgte in Unkenntnis der Identität der jeweiligen Probe. Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel.

Um zu klären, ob die Menge an Fcj1 mit der Häufigkeit von CJs korreliert, wurden isolierte Mitochondrien mit unterschiedlich stark ausgeprägten Cristastrukturen miteinander verglichen.

Das Ausmaß der Cristaebildung in Hefezellen hängt von der jeweiligen Kohlenstoffquelle ab. Auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen erfolgt die Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung in der mitochondrialen Innenmembran. Unter diesen Bedingungen sind Cristae und CJs stärker ausgeprägt als in Gegenwart von Glukose, wo ATP hauptsächlich über die zytosolisch stattfindende Glykolyse gewonnen wird. Noch stärker als die Anwesenheit von Glukose wirkt sich der Verlust der mtDNA auf die mitochondriale Ultrastruktur aus. Er äußert sich in Form einer fast vollständigen Abwesenheit von Cristae und CJs, da die Energiegewinnung ohne die mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe ausschließlich über die Glykolyse erfolgt.

Western Blot-Analysen deckten kaum Unterschiede im Fcj1-Gehalt zwischen Mitochondrien aus respiratorisch oder fermentativ kultivierten Zellen oder solchen, die keine mtDNA besitzen, auf. Die Mengen der Cristae-Proteine Cyt b2, Atp4 und Su e sind unter Bedingungen, die zu verminderter Cristaebildung führen, reduziert, während die Abundanz des Außenmembran-Proteins Tom40 und von Hep1 in der mitochondrialen Matrix unverändert ist. Die vollständige Abwesenheit des mitochondrial kodierten Proteins Cox2 bestätigt die Identität der Zellen ohne mtDNA (Abbildung 24). Interessanterweise ist die Menge an Fcj1 in den Mitochondrien somit unabhängig von der Abundanz der Cristae und der CJs, also der Strukturen, denen Fcj1 zugeordnet wurde.

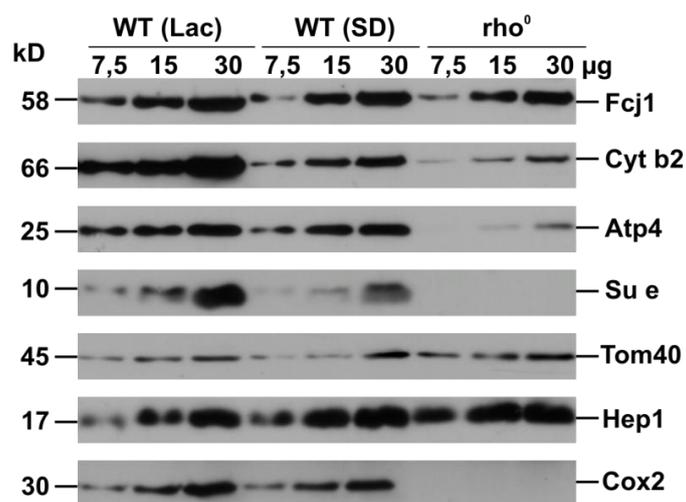


Abbildung 24: Die Proteinmenge von Fcj1 ist unabhängig von der Abundanz der Cristae und Crista Junctions. Western Blot-Analyse isolierter Mitochondrien aus Wildtypzellen (WT), die auf Laktat- (Lac) oder Glukosemedium (SD) kultiviert wurden oder eines auf Glukosemedium kultivierten Hefestamms ohne mitochondriale DNA (ρ^0). Angegebene Mengen der Mitochondrien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert, bevor mittels Immundekoration die Proteine Atp4, Cox2, Cyt b2, Fcj1, Tom40 und Su e nachgewiesen wurden.

3.2.3 Bilden Cristae in Δfcl ein isoliertes Kompartiment?

Da sich das Fehlen von Fcj1 in der völligen Abwesenheit von CJs manifestiert, stellt sich die Frage, ob die Cristae in dieser Mutante tatsächlich als isolierte Membranvesikel ohne jeglichen Kontakt zur inneren Grenzmembran vorliegen. Um dies zu testen, wurde die Zugänglichkeit des Intracristalraums von Δfcl -Mitochondrien für äußerlich zugegebene Substanzen untersucht.

Wird die Außenmembran isolierter Wildtyp-Mitochondrien durch Inkubation in hypotoner Lösung zerstört, so werden die Proteine der Innenmembran für Substanzen, die

sich in der umgebenden Lösung befinden, zugänglich. Es ist nicht im Detail bekannt, welche Vorgänge zum Aufbrechen der Außenmembran führen. Man vermutet jedoch, dass die Zunahme des Matrixvolumens zu einer Ausstülpung der Innenmembran führt, der die Außenmembran nicht folgen kann.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob Proteine, die sich überwiegend in den Cristae befinden, nach osmotischem Schwellen in $\Delta fcl1$ besser als im Wildtyp vor dem Verdau durch eine extern zugegebene Protease geschützt sind. In isolierten Mitochondrien wurde die Zugänglichkeit des Intermembranraumproteins Cytochrom b2, das sich als Teil der Atmungskette vor allem in den Cristae befindet, untersucht. Tatsächlich scheint Cytochrom b₂ in $\Delta fcl1$ resistenter gegenüber dem Abbau durch Proteinase K zu sein als im Wildtyp (Abbildung 25).

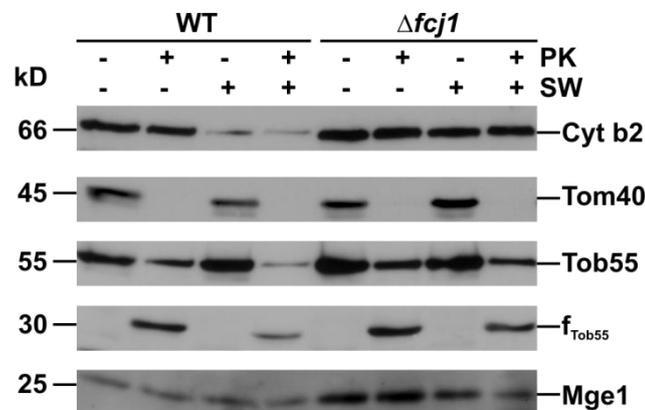


Abbildung 25: Verhalten von $\Delta fcl1$ -Mitochondrien in hypoosmotischer Umgebung. Mitochondrien des Wildtyps und von $\Delta fcl1$ und durch hypotones Schwellen (SW) generierte Mitoplasten beider Stämme wurden mit Proteinase K (PK) behandelt und anschließend nach SDS-PAGE, Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran mittels Immundekoration analysiert. Nachgewiesen wurden die Proteine Cytochrom b2 (Cyt b2), Mge1, Tom40, Tob55 und ein Abbaufragment von Tob55 (f_{Tob55}), das bei der Behandlung intakter Mitochondrien mit Proteinase K entsteht.

Mit dem Nachweis des Außenmembranproteins Tom40, das sich im Western Blot in Gegenwart von Proteinase K nicht mehr detektieren lässt, wurde eine vergleichbare Effizienz der Proteasebehandlung in beiden Hefestämmen sichergestellt. Ob der Schutz des Innenmembranproteins Cytochrom b2 in $\Delta fcl1$ auf ein unvollständiges Öffnen der mitochondrialen Außenmembran zurückzuführen ist, wurde folgendermaßen getestet: Zu intakten Mitochondrien zugegebene Protease verdaut den aus der Außenmembran herausragenden Teil des in der Außenmembran verankerten Proteins Tob55 und produziert damit ein 30 kD großes Fragment im Intermembranraum, das erst nach Öffnen der Außenmembran abgebaut wird [Habib *et al.*, 2005; Paschen *et al.*, 2003]. In $\Delta fcl1$ -

Mitochondrien bleibt im Vergleich zum Wildtyp ein größerer Anteil dieses Fragments auch in hypotonem Medium und Gegenwart von Proteinase K nachweisbar, was auf eine geringere Effizienz des Schwellens schließen lässt. Während das Matrixprotein Mge1 im Wildtyp resistent gegenüber proteolytischem Abbau unter hypoosmotischen Bedingungen ist, ist die Menge an Mge1 in $\Delta fcj1$ reduziert. In Abwesenheit von Fcjl führt osmotisches Schwellen offenbar nicht zur Ausstülpung, sondern zumindest bei einem Teil der Mitochondrien zum Aufbrechen der inneren Grenzmembran. Die Cristae-Proteine sind unter diesen Bedingungen vor proteolytischem Abbau geschützt. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Cristae in $\Delta fcj1$, anders als im Wildtyp, nicht mit dem Intermembranraum in Verbindung stehen.

Ob die Cristae in $\Delta fcj1$ tatsächlich ein abgeschlossenes Kompartiment bilden, sollte in einem unabhängigen experimentellen Ansatz bestätigt werden. In Wildtyp- und $\Delta fcj1$ -Mitochondrien wurde die Zugänglichkeit von Cyt c für die Substanz 4-Acetamido-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonat (AMS) verglichen. AMS modifiziert Proteine, indem es Thioetherbindungen mit freien Thiolgruppen einght. Mit 490 Dalton ist AMS klein genug, um, von außen zu isolierten Mitochondrien zugegeben, mittels freier Diffusion in den Intermembranraum der Mitochondrien zu gelangen.

In einem Zeitreihen-Experiment wurden isolierte Mitochondrien beider Hefestämme mit AMS inkubiert. Die Modifikation repräsentativer Proteine der verschiedenen submitochondrialen Kompartimente wurde mittels Western Blot analysiert (Abbildung 26). Während in den unbehandelten Kontrollen die Signalstärke des Intermembranraum-Proteins Cyt c in Wildtyp und $\Delta fcj1$ vergleichbar ist, nimmt die Signalintensität im Wildtyp in Gegenwart von AMS schnell ab. Da die verwendeten Cyt c-spezifischen Antikörper nur unmodifiziertes Protein erkennen, aber nicht dasjenige, das mit AMS markiert wurde, ist Cyt c nach 10 min nicht mehr detektierbar. Auch in $\Delta fcj1$ -Mitochondrien nimmt die Menge an unmarkiertem Cyt c in Gegenwart von AMS mit zunehmender Inkubationszeit ab. Allerdings findet die Modifikation in diesem Stamm langsamer statt. So entspricht der Anteil an nicht modifiziertem Cyt c nach 40 min demjenigen des Wildtyps nach 5 min. Der verbleibende Restanteil verschwindet in $\Delta fcj1$ Mitochondrien erst nach Solubilisierung der Mitochondrien mit SDS. Dass der Unterschied in der Markierungseffizienz von Cyt c nicht auf ungleiche Modifikationsbedingungen zurückzuführen ist, zeigt die in beiden Stämmen vergleichbar effiziente Markierung des Außenmembranproteins Porin bereits nach 1,25 min. Die Modifikation von Porin wird im Western Blot durch Erhöhung des Molekulargewichts der Porin-Bande um 0,5 kD sichtbar. Die Membranundurchgängigkeit von AMS wurde mit dem

Nachweis des Matrixproteins Hep1 kontrolliert, welches sich sowohl im Wildtyp als auch in $\Delta fcj1$ erst nach Zugabe von SDS modifizieren lässt. Die verwendeten Antikörper binden modifiziertes Hep1 nur eingeschränkt, so dass die AMS-Markierung sowohl durch die verzögerte Laufgeschwindigkeit in der SDS-PAGE als auch durch eine Abnahme der Signalintensität im Western Blot sichtbar wird.

Zusammenfassend beeinträchtigt die Abwesenheit von Fcj1 speziell die Zugänglichkeit von Cyt c für AMS. In $\Delta fcj1$ -Mitochondrien sind Proteine innerhalb der Cristae somit in stärkerem Ausmaß vor äußerlich zugegebenen Substanzen geschützt als im Wildtyp, liegen jedoch nicht vollständig isoliert vor. In Abwesenheit von Fcj1 bilden die Cristae offenbar ein mitochondriales Subkompartiment, welches mit dem Intermembranraum nur in begrenztem Ausmaß in Kontakt steht.

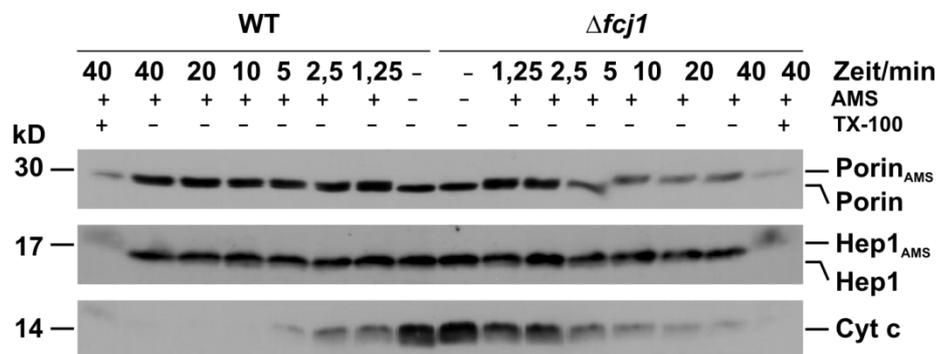


Abbildung 26: Die Abwesenheit von Fcj1 beeinträchtigt die Zugänglichkeit von Cytochrom c für die membranundurchgängige Substanz AMS. Isolierte Mitochondrien der Hefestämme Wildtyp (WT) und $\Delta fcj1$ wurden mit (+) oder ohne (-) AMS und mit (+) oder ohne (-) Triton X-100 (TX-100) inkubiert. Die AMS-Markierungsreaktion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von DTT gestoppt. Die Proben wurden nach SDS-PAGE und Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran mittels Immundekoration analysiert. Die AMS-Markierung von Porin und Hep1 wurde im Western Blot durch einen Mobilitätsshift in der SDS-PAGE sichtbar (Porin_{AMS} und Hep1_{AMS}). Modifiziertes Cytochrom c (Cyt c) wurde von den verwendeten Antikörpern nicht erkannt. Zunehmende Modifikation dieses Proteins äußert sich daher in einer Abnahme der Signalintensität. Die Intensitätsabnahme des Porin-Signals mit zunehmender Inkubationszeit in $\Delta fcj1$ ist nicht auf reduzierte Proteinmengen, sondern auf technische Probleme bei der Immundekoration zurückzuführen.

3.3 Die Rolle von Fcj1 und Su e/Su g bei der Bildung der Cristae und Crista Junctions

3.3.1 In Abwesenheit von Fcj1 bildet die F₁F₀-ATP-Synthase ‚reißverschlussähnliche‘ Strukturen

Die Ultrastruktur von $\Delta fcj1$ -Mitochondrien hat neben dem Fehlen von CJs und der stapelartigen Anordnung der mitochondrialen Innenmembran eine weitere Besonderheit: In

Cryo-EM-Tomogrammen isolierter Mitochondrien fallen in den schmalen Matrix-gefüllten Bereichen zwischen den Cristaemembranen Partikel von einheitlicher Form und Größe in regelmäßiger ‚reißverschlussähnlicher‘ Anordnung auf (Abbildung 27A-C). In der Aufsicht liegen diese Strukturen in kurzen linearen Komplexen oder in parallelen oder versetzten Doppelreihen vor (Abbildung 27D und E).

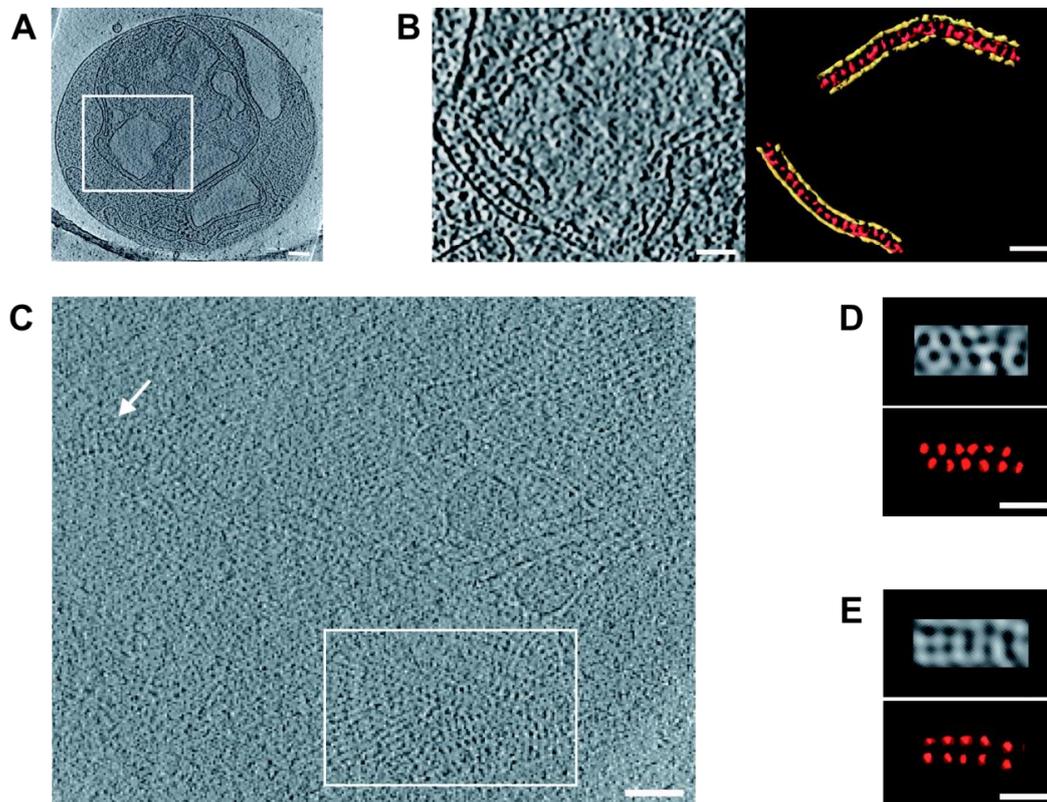


Abbildung 27: EM-Tomographie zeigt ‚reißverschlussähnliche‘-Strukturen in $\Delta fcj1$ -Mitochondrien. (A) Schnitt durch das Cryo-EM-Tomogramm eines $\Delta fcj1$ -Mitochondriums. (B) Vergrößerung des markierten Ausschnitts aus (A) (links) und oberflächengerenderte Ansicht der ‚reißverschlussähnlichen‘ regelmäßigen Anordnungen, die die Dimensionen des F_1 -Teils der F_1F_0 -ATP-Synthase besitzen (rechts). (C) 10 nm dicker Schnitt durch das Tomogramm eines $\Delta fcj1$ -Mitochondriums, in dem die regelmäßig angeordneten Partikel sowohl in Seitenansicht (Pfeil) als auch Obenaufsicht (Kasten) vorliegen. (D und E) Schnitte durch die Tomogramme (oben) und oberflächengerenderte Ansichten (unten) der mutmaßlichen F_1 -Partikel in doppelreihiger hexagonaler (D) und paralleler (E) Anordnung. Längenstandard, 100 nm (A, C) und 50 nm (B, D und E). Zusammenarbeit mit Dr. Vincent Soubannier und Dr. Marek Cyrklaff.

Die Dimensionen und Abstände dieser Strukturen entsprechen genau jenen des F_1 -Teils der F_1F_0 -ATP-Synthase ($\sim 10 \times 10 \times 10$ nm). Diese Art der Anordnung wurde in zahlreichen Studien den Dimeren oder Oligomeren der F_1F_0 -ATP-Synthase zugeschrieben [Allen *et al.*, 1989; Buzhynskyy *et al.*, 2007; Dudkina *et al.*, 2005; Dudkina *et al.*, 2006; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005].

Die Identität der mutmaßlichen F_1 -Partikel sollte mittels Immungold-Markierung der $F_1\beta$ -Untereinheit der F_1F_0 -ATP-Synthase bestätigt werden. Dazu wurden isolierte Mitochondrien mittels Ultraschall geöffnet, um die Innenmembran für die Antikörperbehandlung zugänglich zu machen. Die elektronenmikroskopische Auswertung ergab, dass etwa die Hälfte der entstandenen Membranvesikel sich mit Goldpartikeln markieren lassen. Dabei handelt es sich um diejenigen, deren Innenmembran nach außen orientiert war. Nicht sonifizierte Proben sind frei von Gold (Daten nicht gezeigt). Sowohl auf den sonifizierten Vesikeln des Wildtyps als auch auf jenen von $\Delta fcj1$ liegen die Goldpartikel in einer zufälligen Anordnung vor, in der sich auf den ersten Blick kein regelmäßiges Muster erkennen lässt (Abbildung 28A). Für einen quantitativen Vergleich wurde der Abstand einzelner Goldpartikel zu ihrem jeweiligen nächsten Nachbarn bestimmt. Die gemessenen Abstände befinden sich für beide Hefestämme im Bereich zwischen 2,5 und 35 nm mit einer Präferenz für Abstände zwischen 15 und 20 nm auf Membranvesikeln des Wildtyps (Median 18,9 nm; Mittelwert 20,5 nm) und 10 bis 15 nm auf jenen von $\Delta fcj1$ (Median 15,8 nm; Mittelwert 18 nm). Somit liegen die Goldpartikel, die die $F_1\beta$ -Untereinheit der F_1F_0 -ATP-Synthase markieren, in Abwesenheit von $Fcj1$ im Durchschnitt etwas näher (Abbildung 28B). Diese Tendenz steht in Einklang mit einer regelmäßigen Anordnung der F_1F_0 -ATP-Synthase-Monomere in $\Delta fcj1$, die Unterschiede sind jedoch nicht ausreichend, um die Frage nach der Identität der beobachteten 10 nm-Partikel abschließend zu klären.

Um die Identität der in $\Delta fcj1$ -Mitochondrien auftretenden mutmaßlichen F_1 -Partikel, abzusichern, wurden Hefestämme generiert, in denen zusätzlich zu $Fcj1$ die Untereinheiten $Su e$ oder $Su g$ der F_1F_0 -ATP-Synthase deletiert waren. Der Verlust dieser Untereinheiten beeinträchtigt die Dimerisierung und damit auch die Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP-Synthase. Tatsächlich sind die beschriebenen Strukturen weder in Cryo-EM-Tomogrammen von $\Delta fcj1/\Delta su e$ noch von $\Delta fcj1/\Delta su g$ in der von $\Delta fcj1$ -Mitochondrien bekannten regelmäßigen Anordnung arrangiert. Stattdessen sind sie gleichmäßig über die Innenmembran verteilt (Abbildung 29A und B). Für einen quantitativen Vergleich wurde der Abstand vieler Goldpartikel zu ihrem jeweiligen nächsten Nachbarn bestimmt. In $\Delta fcj1$ -Mitochondrien befindet sich der größte Teil der gemessenen Abstände im Bereich zwischen 14 und 16 nm, wohingegen die Verteilung in $\Delta fcj1/\Delta su g$ offensichtlich zufällig mit einer großen Bandbreite an gemessenen Abständen ist (Abbildung 29C). Bei den regelmäßigen Strukturen in $\Delta fcj1$ -Mitochondrien handelt es sich somit tatsächlich um Oligomere der F_1F_0 -ATP-Synthase, die nur in Gegenwart von $Su e$ und $Su g$ auftreten.

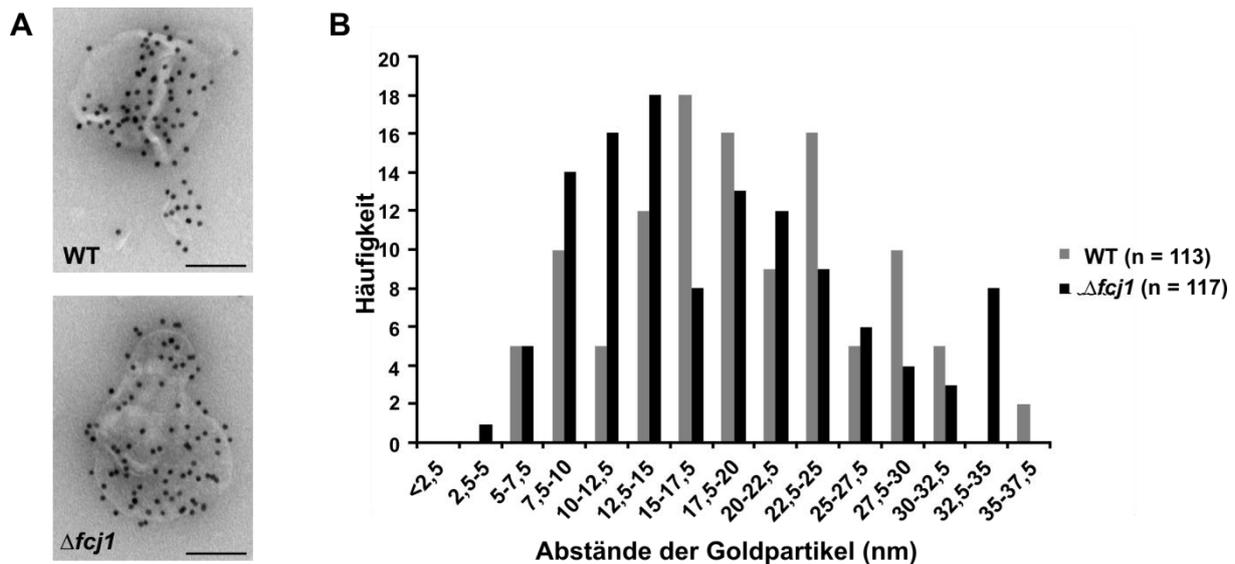


Abbildung 28: Nachweis von F_1 -Partikeln auf mit der Innenmembran nach außen orientierten Membranvesikeln isolierter Wildtyp- und Δfcj -Mitochondrien mittels Immungold-Markierung. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Membranvesikeln isolierter Mitochondrien aus Wildtyp (WT) und $\Delta fcj1$ -Zellen nach Ultraschallbehandlung und anschließender Inkubation mit $F_1\beta$ -spezifischem Antiserum und goldmarkierten Zweitantikörpern. (B) Häufigkeitsverteilung der Abstände zwischen zwei Goldpartikeln auf Membranvesikeln von Wildtyp (WT) (n = 113) und $\Delta fcj1$ -Mitochondrien (n = 117). Die Abstände wurden von der Mitte eines Partikels bis zur Mitte seines nächstgelegenen Nachbarn gemessen. Längenstandard, 100 nm. Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel.

In intakten Wildtyp-Mitochondrien wurden Superkomplexe der F_1F_0 -ATP-Synthase weder im Rahmen dieser Arbeit noch in anderen Studien beobachtet. Dies liegt vermutlich an der hohen Proteindichte der Matrix und dem daraus resultierenden mangelhaften Kontrast [Nicastro *et al.*, 2000]. Das vergrößerte Volumen von $\Delta fcj1$ -Mitochondrien führt möglicherweise zu einer reduzierten Proteindichte in der Matrix und erlaubt dadurch die Darstellung der supramolekularen Organisation der F_1F_0 -ATP-Synthase in intakten Mitochondrien. Für den Wildtyp gelang dies bisher nur in Membranfragmenten [Buzhynskyy *et al.*, 2007; Strauss *et al.*, 2008]. Insgesamt korreliert das Fehlen von $Fcjl$ neben der Abwesenheit von CJs auch mit dem Auftreten regelmäßig angeordneter Proteinkomplexe, die typisch sind für die F_1F_0 -ATP-Synthase.

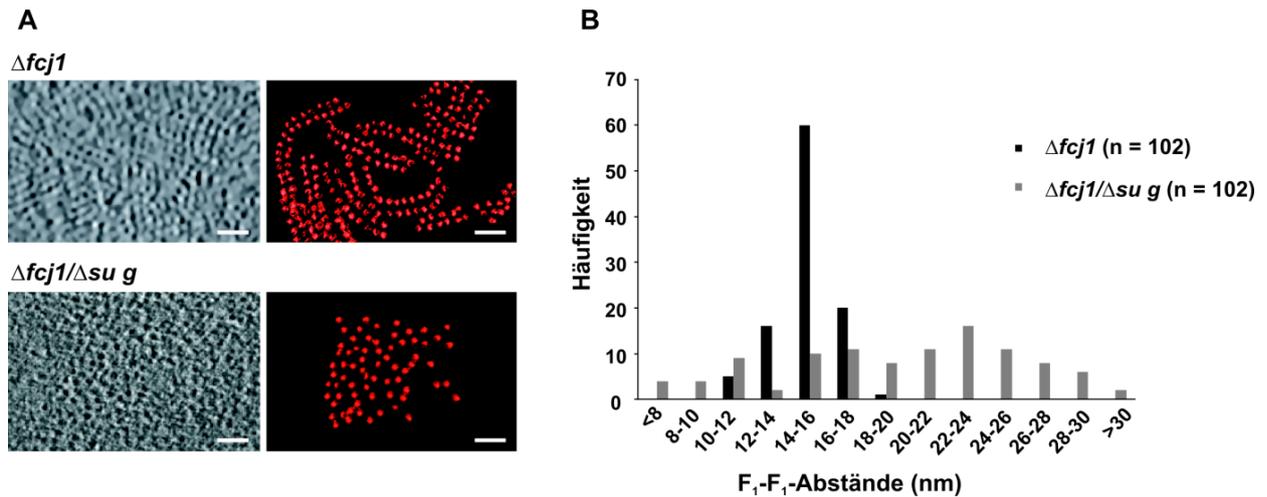


Abbildung 29: In *Δfcj1*-Mitochondrien auftretende ‚reißverschlussähnliche‘ Strukturen existieren nur in Gegenwart von *Su e* und *Su g*. (A) Cryo-EM-Tomogramme isolierter Mitochondrien. Obenaufsicht der mutmaßlichen F₁F₀-ATP-Synthase-Partikel in *Δfcj1* (oben; Vergrößerung des Kastens aus 27C) und *Δfcj1/Δsu g* (unten) (links) und oberflächengerenderte Darstellung (rechts). (B) Häufigkeitsverteilung der F₁-F₁-Abstände. Die Abstände von der Mitte eines F₁-Partikels zur Mitte seines nächsten Nachbarn wurden für die Cryo-EM-Tomogramme isolierter Mitochondrien der angegebenen Hefestämme bestimmt (n = 102 für beide Stämme). Längensstandard, 50 nm. Zusammenarbeit mit Dr. Marek Cyrklaff.

3.3.2 Fcj1 beeinträchtigt die Oligomerisierung der F₁F₀-ATP-Synthase

In Anbetracht der regelmäßigen Anordnung der F₁F₀-ATP-Synthase in *Δfcj1*-Zellen stellt sich die Frage, ob Fcj1 den Oligomerisierungszustand dieses Proteinkomplexes beeinflusst. Solubilisierungsexperimente sollten zeigen, ob die Löslichkeit der F₁F₀-ATP-Synthase von Fcj1 abhängt (Abbildung 30). Tatsächlich lässt sich die F₁F₀-ATP-Synthase mit dem milden Detergenz Digitonin umso besser solubilisieren, je mehr Fcj1 vorhanden ist. In isolierten Mitochondrien des *Δfcj1*-Stammes ist der unlösliche Anteil der F₁F₀-ATP-Synthase-Untereinheiten F1β und Atp4 am größten. Im Wildtyp ist er geringer, und der kleinste Anteil an nicht-solubilisierter F₁F₀-ATP-Synthase findet sich in Gegenwart von überexprimiertem Fcj1. Diese Abhängigkeit von Fcj1 tritt bei anderen Innenmembranproteinen wie Dld1 oder Aac2 nicht auf. Dass sich die in Digitonin unlöslichen Proteinanteile in Gegenwart von Triton X-100 vollständig solubilisieren lassen, spricht gegen eine Aggregation der Proteine. Somit bildet ein Teil der F₁F₀-ATP-Synthase einen Komplex, der sich in Abwesenheit von Fcj1 auffallend schlecht solubilisieren lässt.

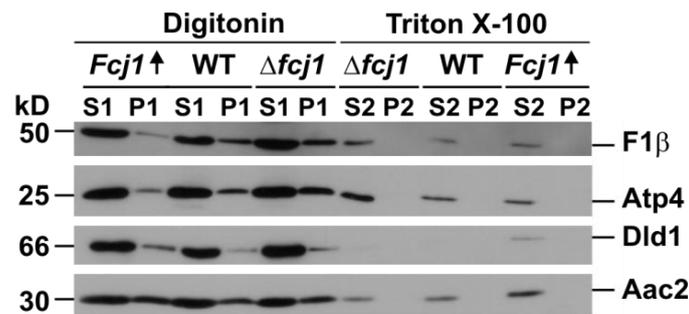


Abbildung 30: Die Abundanz von Fcj1 beeinflusst die Löslichkeit der F₁F₀-ATP-Synthase in Detergenz. Isolierte Mitochondrien aus $\Delta fcj1$, Wildtyp (WT) und einem Fcj1 überexprimierenden Hefestamm (Fcj1↑) wurden in Digitonin solubilisiert und zentrifugiert, um Überstand (S1) und Pellet (P1) voneinander zu trennen. Nichtsolubilisiertes Material (P1) wurde mit Triton X-100 behandelt und zur Trennung von Überstand (S2) und Pellet (P2) erneut zentrifugiert. In vergleichbaren Mengen aller Fraktionen wurden mittels Western Blot die Proteine Aac2, Atp4, Dld1 und F1β nachgewiesen.

Die Abhängigkeit der supramolekularen Organisation der F₁F₀-ATP-Synthase von Fcj1 wurde mittels BN-PAGE und anschließender Visualisierung der ATPase-Aktivität im Gel untersucht (Abbildung 31A). Monomere, Dimere und Tetramere der F₁F₀-ATP-Synthase finden sich in den Mitochondrien aller untersuchten Hefestämme. Höhere Oligomere dieses Proteinkomplexes lassen sich nur in $\Delta fcj1$ - und Wildtyp-Mitochondrien nachweisen, jedoch nicht bei Überexpression von Fcj1. Im Wildtyp sind diese supramolekularen Komplexe nur bei sehr geringem Digiton- zu Proteinverhältnis (0,5 w/w) sichtbar, in $\Delta fcj1$ hingegen in Gegenwart sämtlicher verwendeter Detergenzmengen mit gleicher Intensität. Auch die Tetramere sind in Mitochondrien dieses Stammes stabiler als im Wildtyp und vor allem als in Gegenwart erhöhter Mengen an Fcj1. In letzterem Stamm ist nicht nur die Menge der Tetramere geringer, sondern diese sind auch nur bei geringeren Detergenzmengen als in den anderen beiden Stämmen sichtbar. Bezüglich der Monomere oder Dimere der F₁F₀-ATP-Synthase gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Hefestämmen.

Auch die Methode der Größenausschlusschromatographie zeigt die Existenz eines gewissen Anteils höherer Oligomere der F₁F₀-ATP-Synthase in Abwesenheit von Fcj1 (Abbildung 31B). Dabei handelt es sich um eine Subpopulation des Enzymkomplexes, deren Hauptanteil wie auch im Wildtyp und dem Überexpressionsstamm in Form von Monomeren und Dimeren vorliegt. Der größte Teil von Fcj1 selbst befindet sich im Größenbereich dieser höheren Oligomere (> 2 MD). Dies gilt sowohl für den endogenen FCJ1-Komplex als auch für die Überexpression. Die Größe des FCJ1-Komplexes ist nach Auftrennung mittels

Größenausschlusschromatographie somit vergleichbar mit derjenigen, die mit der Methode der BN-PAGE ermittelt wurde (siehe 3.1.3).

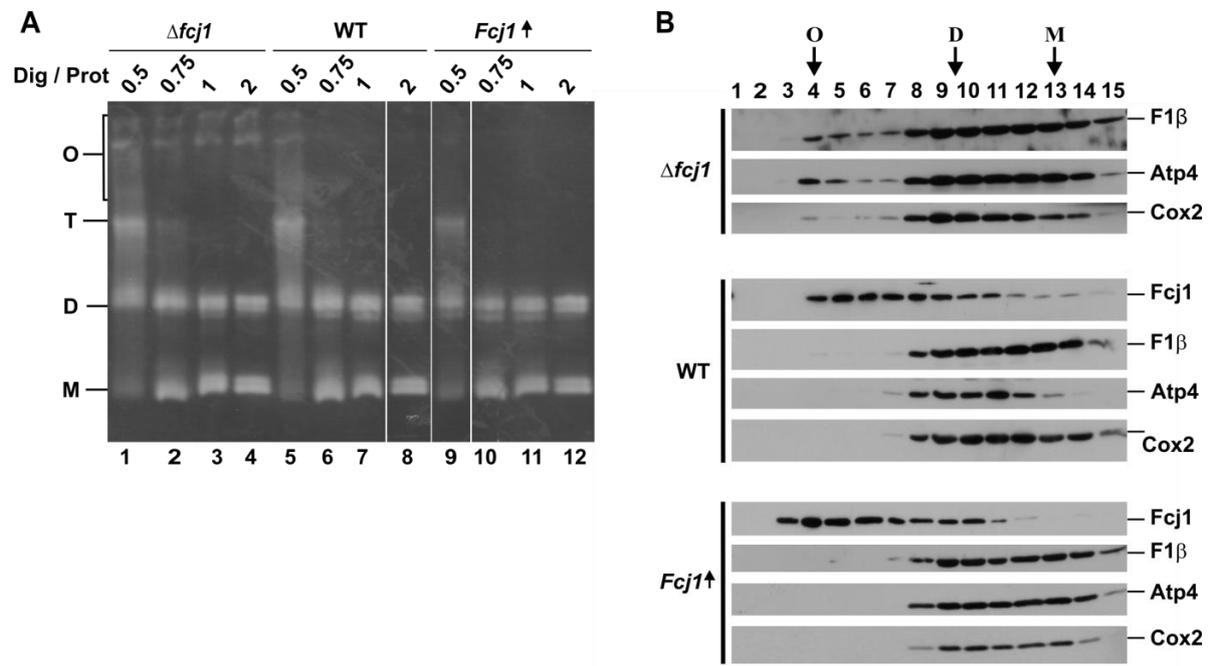


Abbildung 31: Die Abundanz von Fcj1 beeinflusst den Oligomerisierungszustand der F_1F_0 -ATP-Synthase.

(A) BN-PAGE. Isolierte Mitochondrien aus $\Delta fcj1$, Wildtyp (WT) und einem Fcj1 überexprimierenden Hefestamm ($Fcj1\uparrow$) wurden mit den angegebenen Verhältnissen von Digitonin zu Protein (Dig/Prot; w/w) solubilisiert und nach BN-PAGE einer in-Gel-Analyse der ATPase-Aktivität unterzogen. Alle Spuren entstammen demselben Gel und wurden mit identischen Parametern digitalisiert, lediglich die Reihenfolge der Spuren 8 und 9 wurden aus Gründen der Klarheit geändert. Zusammenarbeit mit Nadine Mendl. (B) Größenausschlusschromatographie. Isolierte Mitochondrien aus $\Delta fcj1$, Wildtyp (WT) und einem Fcj1 überexprimierenden Hefestamm ($Fcj1\uparrow$) wurden mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 1 (w/w) solubilisiert und mittels Größenausschlusschromatographie über eine Superose 6-Säule (GE Healthcare) aufgetrennt. Der Laufpuffer enthielt 150 mM Kaliumacetat, 0,05 % Digitonin und 20 mM HEPES; pH 7,4. In den Fraktionen wurden nach SDS-PAGE mit Western Blot die Proteine Atp4, Cox2 und F1 β nachgewiesen. Als Größenmarker dienen die oligomeren Formen der F_1F_0 -ATP-Synthase: O, Oligomere; T, Tetramere; D, Dimere; M, Monomere.

Zusammenfassend beeinflusst die Abundanz von Fcj1 den Anteil hochmolekularer Komplexe der F_1F_0 -ATP-Synthase. Dieses Ergebnis wurde mittels Elektronenmikroskopie, BN-PAGE und Größenausschlusschromatographie erzielt. Somit gibt es verschiedene Evidenzen – sowohl biochemischer als auch morphologischer Art – für den destabilisierenden Einfluss von Fcj1 auf den Oligomerisierungszustand der F_1F_0 -ATP-Synthase.

3.3.3 Fcj1 interagiert genetisch mit den Dimerisierungsuntereinheiten Su e und Su g der F₁F₀-ATP-Synthase

Der gezeigte Einfluss von Fcj1 auf die Stabilität der oligomeren Formen der F₁F₀-ATP-Synthase legt eine funktionelle Verbindung dieser Proteine nahe. Su e und Su g werden für die Stabilisierung der Dimere und die darauf aufbauende Oligomerisierung der F₁F₀-ATP-Synthase benötigt und sind für die Ausbildung der regulären Cristae-Morphologie essentiell. Um zu testen, ob eine genetische Interaktion zwischen Fcj1 und diesen Untereinheiten besteht, wurden die Generationszeiten der jeweiligen Einzel- und der entsprechenden Doppeldeletionsstämme in Laktat-Flüssigkultur bestimmt (Abbildung 32A). Mit einer Verdopplungszeit, die der 1,75fachen des Wildtyps entspricht, ist der Stamm Δf_{cj1} am stärksten in seinem Wachstum beeinträchtigt. Die zusätzliche Deletionen von Su e oder Su g führen zu einer signifikanten Reduktion der Generationsszeit. Die Zellen der Stämme $\Delta f_{cj1}/\Delta su e$ und $\Delta f_{cj1}/\Delta su g$ benötigen etwa die 1,45fache Zeit des Wildtyps um sich zu verdoppeln und wachsen damit deutlich schneller als diejenige von Δf_{cj1} und nur wenig langsamer als diejenigen der Einzeldelentionsstämme $\Delta su e$ und $\Delta su g$. Deren Generationszeiten entsprechen der 1,39- und 1,34fachen des Wildtyps. Damit können die zusätzlichen Deletionen von Su e oder Su g den Wachstumsphänotyp von Δf_{cj1} kompensieren.

Der gleiche Effekt tritt nach seriellen Verdünnungen von Kulturen der genannten Hefestämme auf Nährböden auf. Auf Laktat-Platten wachsen die Zellen der Doppeldeletionsstämme noch bei einer Verdünnungsstufe der Ausgangskultur, bei der Zellen des Stamms Δf_{cj1} kein Wachstum mehr zeigen (Abbildung 32B).

Zwischen Fcj1 und den Dimerisierungsuntereinheiten Su e und Su g der F₁F₀-ATP-Synthase besteht somit eine genetische Interaktion, die alle drei Proteine in den gleichen funktionellen Kontext stellt. Während Su e und Su g die Assemblierung der F₁F₀-ATP-Synthase fördern, hat Fcj1 einen gegensätzlichen Effekt.

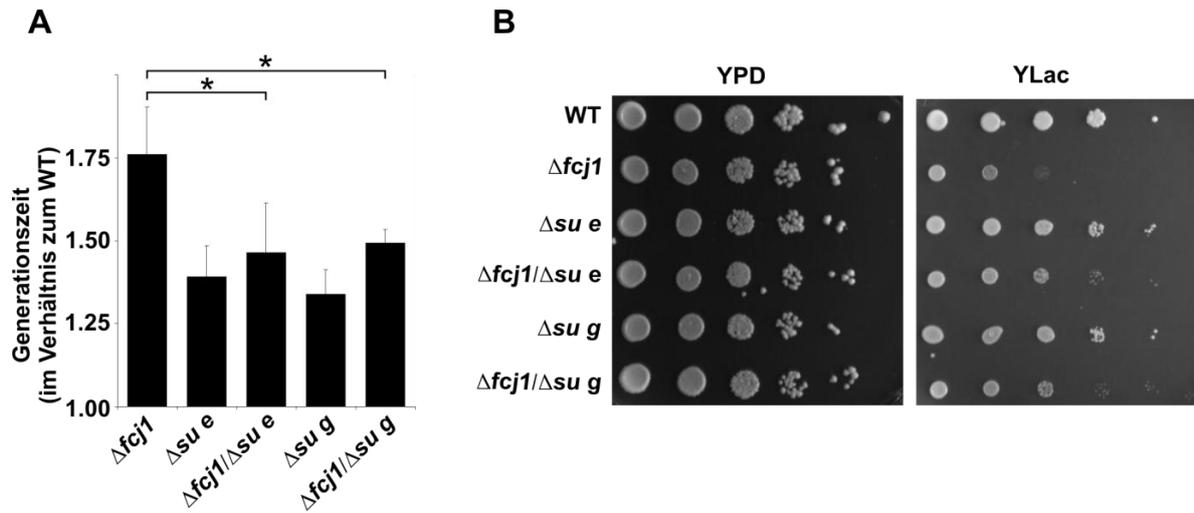


Abbildung 32: Die Deletion von Su e oder Su g komplementiert den Wachstumsphänotyp von $\Delta fcj1$. (A) Generationszeiten der angegebenen Hefestämme (BY4742-Hintergrund) in Flüssigkultur (Laktat-Vollmedium) während der exponentiellen Wachstumsphase bei 30 °C (n = 4). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Statistisch signifikante Unterschiede (*, $P < 0,05$) wurden mittels t-Test ermittelt. (B) Wachstum von seriellen 1:10-Verdünnungen der angegebenen Hefestämme (BY4742-Hintergrund) auf YPD- und YLac-Nährböden.

Der Oligomerisierungszustand der F_1F_0 -ATP-Synthase in den Doppeldeletionsstämmen $\Delta fcj1/\Delta su e$ und $\Delta fcj1/\Delta su g$ wurde mittels BN-PAGE und anschließender Visualisierung der ATPase-Aktivität im Gel untersucht. In den Mitochondrien beider Stämme liegen die Komplexe der F_1F_0 -ATP-Synthase überwiegend als Monomere vor, während der Anteil der Dimere stark reduziert ist und höhere Oligomere vollständig fehlen (Abbildung 33). Dies ist in Einklang damit, dass Su e und Su g dimere Formen der F_1F_0 -ATP-Synthase stabilisieren [Arnold *et al.*, 1998; Schägger und Pfeiffer, 2000], welche als Baueinheiten der höheren Oligomere gelten [Krause *et al.*, 2005; Wittig und Schägger, 2005]. Somit entspricht der Phänotyp der Doppeldeletionsstämme hinsichtlich des Oligomerisierungszustands der F_1F_0 -ATP-Synthase demjenigen der Einzeldelusionsstämme $\Delta su e$ und $\Delta su g$.

Alles in allem interagiert Fcj1 funktionell mit Su e und Su g.

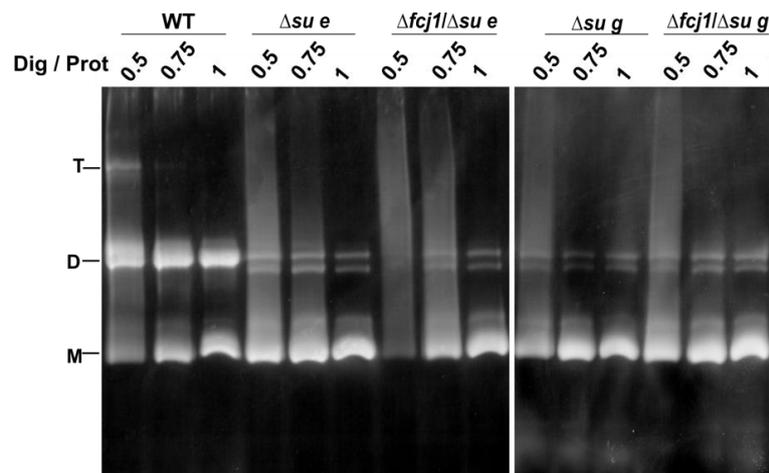


Abbildung 33: Der Oligomerisierungszustand der F_1F_0 -ATP-Synthase in Mitochondrien der Stämme $\Delta fcj1/\Delta su e$ und $\Delta fcj1/\Delta su g$ entspricht demjenigen von $\Delta su e$ und $\Delta su g$. BN-PAGE. Isolierte Mitochondrien aus Wildtyp (WT), $\Delta su e$, $\Delta fcj1/\Delta su e$, $\Delta su g$ und $\Delta fcj1/\Delta su g$ wurden mit den angegebenen Verhältnissen von Digitonin zu Protein (Dig/Prot; w/w) solubilisiert und nach BN-PAGE einer In-Gel-Analyse der ATPase-Aktivität unterzogen. T, Tetramere; D, Dimere; M, Monomere. Zusammenarbeit mit Nadine Mendl.

3.3.4 Die Deletion von *Su e* und *Su g* führt zu strukturellen Veränderungen in der mitochondrialen Innenmembran

Um den Oligomerisierungszustand der F_1F_0 -ATP-Synthase und die mitochondriale Ultrastruktur in Relation zu setzen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen chemisch fixierter Zellen verschiedener Deletionsstämmen miteinander verglichen. Es ist bekannt, dass die mitochondriale Ultrastruktur der Stämme $\Delta su e$ und $\Delta su g$ eine veränderte Anordnung und ungewöhnliche Länge der Cristaemembranen aufweist. Die Struktur und Häufigkeit der CJs wurde bislang nicht untersucht. Während CJs in $\Delta fcj1$ vollständig fehlen, sind sie in $\Delta su e$ und $\Delta su g$ geringfügig häufiger als im Wildtyp (Tabelle 5).

	Wildtyp	$\Delta fcj1$	$\Delta su e$	$\Delta su g$
Anzahl der mitochondrialen Schnitte	65	75	58	64
Anzahl der CJs	120	0	170	163
Anzahl der CJs pro mitochondrialem Schnitt	1.8	0	2.9	2.5
% der CJs, die mit anderen CJs verbunden sind	0	0	84.1	81.0
Anzahl der Crista-Enden	245	731	12	10
Anzahl der Crista-Enden pro mitochondrialem Schnitt	3.8	9.7	0.2	0.2

Tabelle 5: Vergleich der mitochondrialen Ultrastruktur von chemisch fixierten Zellen der Stämme Wildtyp, $\Delta fcj1$, $\Delta su e$ und $\Delta su g$. CJs, Crista Junctions. Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel.

Su e und Su g sind somit für die Ausbildung der CJs nicht essentiell. Allerdings stehen über 80 % der CJs über die Cristaemembranen mit anderen CJs in Verbindung (Abbildung 34A und B). Dieses Phänomen tritt im Wildtyp nur sehr selten auf und führt in $\Delta su e$ und $\Delta su g$ zu einem fast vollständigen Fehlen von Crista-Enden. Diese sind nur in 0,2 % aller mitochondrialen Schnitte sichtbar, sie sind somit fast 20fach seltener als im Wildtyp. Im Gegensatz dazu sind Crista-Enden in Abwesenheit von Fcj1 etwa 2,5mal häufiger als im Wildtyp. Eine weitere Besonderheit von $\Delta su e$ und $\Delta su g$ ist, dass die CJs in diesen Stämmen an der Basis erweitert sind (Abbildung 34C). Diese Erweiterung ist etwas weniger ausgeprägt als für die Überexpression von Fcj1 gezeigt und variiert in beträchtlichem Maß. Dass auch der korrespondierende Wildtyp bei dieser Messung einen etwas weiteren CJ-Durchmesser aufweist als in Abbildung 22, ist möglicherweise auf die unterschiedlichen genetischen Hintergründe (W303 oder BY4741) und Hefemedien (Vollmedium oder Selektivmedium) zurückzuführen.

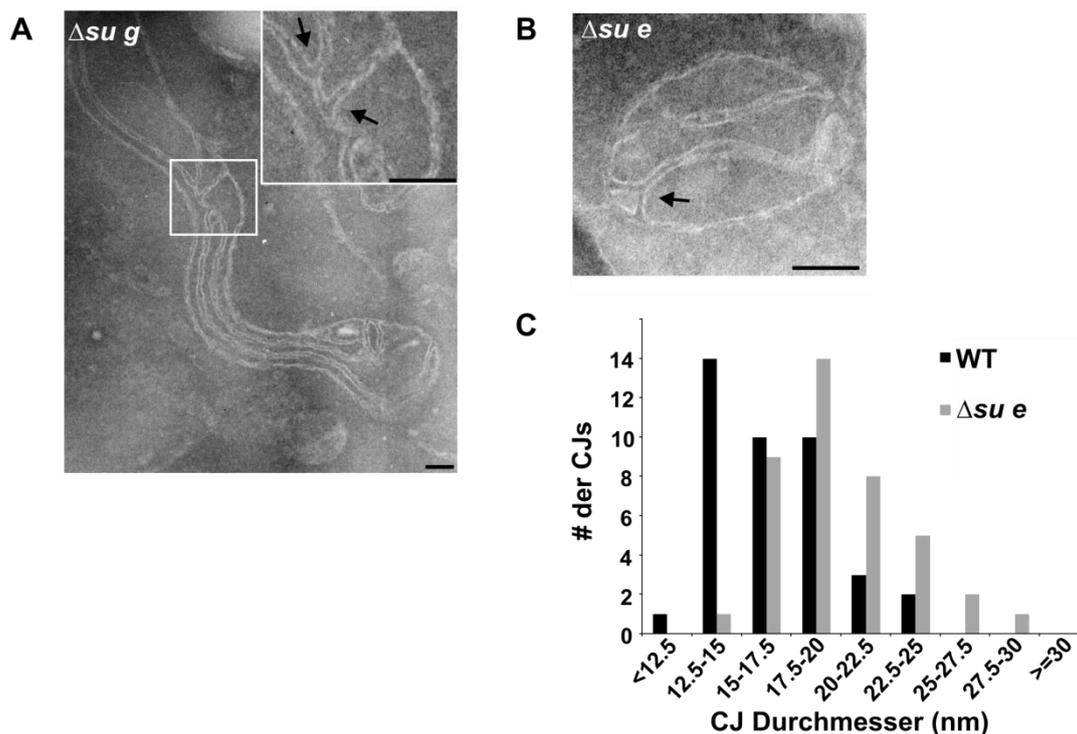


Abbildung 34: Die Deletion von Su e oder Su g hat die Erweiterung des Crista Junction-Durchmessers und Verzweigungen der Cristae zur Folge. (A und B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen chemisch fixierter Zellen der Stämme $\Delta su g$ (A) und $\Delta su e$ (B). Pfeile markieren die Verzweigungen der Cristae. In (A) wurde eine Vergrößerung der umrahmten Region eingefügt. (C) Häufigkeitsverteilung der Crista Junction-Durchmesser in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von chemisch fixierten Zellen der Stämme Wildtyp (WT) und $\Delta su e$ (m = 40 für beide Stämme; m, Anzahl der analysierten mitochondrialen Schnitte). Längensstandard, 100 nm. Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel.

Die mitochondriale Ultrastruktur der Doppeldeletionsstämme vereint Kennzeichen beider zugehörigen Einzeldelationen: Während CJs fast vollständig fehlen, ähnelt die konzentrische Anordnung der auffallend langen Cristaemembranen eher dem $\Delta su e/\Delta su g$ – Phänotyp. Auch Crista-Enden treten sehr selten auf (Abbildung 35).

Insgesamt fördern $Su e$ und $Su g$ die Ausbildung der Crista-Enden, während $Fcjl$ für die Bildung der CJs benötigt wird. Beide Arten von Membranproteinen interagieren funktionell miteinander und beeinflussen den Oligomerisierungszustand der F_1F_0 -ATP-Synthase in entgegengesetzte Richtungen.

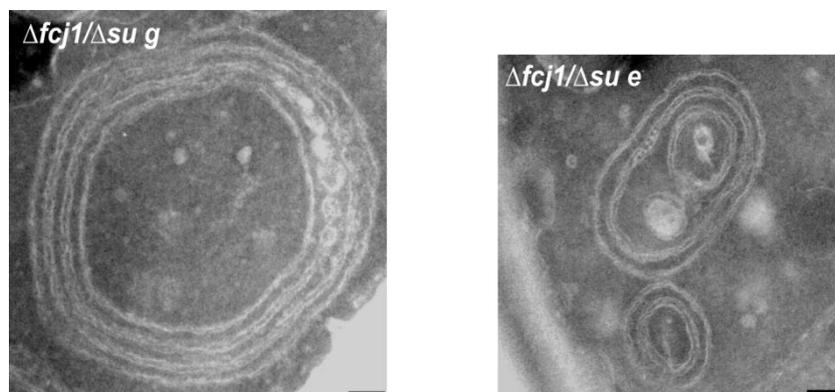


Abbildung 35: Die Ultrastrukturen von $\Delta fcj1/\Delta su e$ und $\Delta fcj1/\Delta su g$ vereinen die Merkmale der korrespondierenden Einzeldelationsstämme. Elektronenmikroskopische Aufnahmen chemisch fixierter Zellen der Stämme $\Delta fcj1/\Delta su g$ (links) und $\Delta fcj1/\Delta su e$ (rechts). Längenstandard, 100 nm. Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel.

4 Diskussion

4.1 Fcj1 und die Entstehung von CJs

4.1.1 Die Existenz der CJs hängt von Fcj1 ab

CJs sind tubuläre Strukturelemente der mitochondrialen Innenmembran, deren Erscheinungsbild in den verschiedenen Organismen weitgehend konserviert ist. Als Verbindungsstelle zwischen innerer Grenzmembran und Cristaemembran wird ihnen eine Rolle als Diffusionsbarriere zwischen Intracristal- und Intermembranraum zugeschrieben [Mannella *et al.*, 1994; Mannella *et al.*, 2001]. Der Nachweis ihrer tatsächlichen Funktion sowie die Identifikation von Komponenten, die für ihre Bildung verantwortlich sind, stehen noch aus. Die vorliegende Arbeit widmet sich Fcj1, dem ersten bekannten Protein in Hefe, das für die Ausbildung von CJs unentbehrlich ist.

Welche Gründe sprechen dafür, dass Fcj1 die Bildung der CJs vermittelt? Erstens ist Fcj1 Immun-EM-Analysen zufolge das bislang erste Protein, für das innerhalb der Mitochondrien eine Präferenz für CJs gezeigt werden konnte. Alle übrigen untersuchten Proteine sind in diesem Bereich eher unterrepräsentiert (siehe Vogel *et al.*, 2006). Zweitens ist die Anwesenheit von Fcj1 essentiell für die Existenz der CJs. Das Fehlen von Fcj1 äußert sich in morphologischen Veränderungen der mitochondrialen Innenmembran und der völligen Abwesenheit von CJs. Drittens hat die Menge an Fcj1 Einfluss auf die Anzahl der CJs. Während erhöhte Mengen an Fcj1 zur vermehrten Bildung von CJs führen, äußert sich die Herunterregulierung von Fcj1 in der Abnahme der Anzahl der CJs. Viertens wirkt sich die Menge an Fcj1 auch auf die Architektur der CJs aus. Die experimentelle Erhöhung der Mengen an Fcj1 hat eine kegelförmige Erweiterung der ursprünglich tubulären Basis der CJs zur Folge. Fünftens besitzt Fcj1 mit Mitofilin ein Pendant im Menschen, dessen Fehlen ebenfalls die Abwesenheit von CJs zur Folge hat [John *et al.*, 2005]. Fcj1 wurde in unserer Arbeitsgruppe als Ortholog von Mitofilin identifiziert und wurde inzwischen auch in der Literatur als solches vorgeschlagen [Olichon *et al.*, 2006]. Insgesamt belegen alle Daten zur Lokalisation und zur Manipulation der Proteinmenge von Fcj1 sowie der Deletionsphänotyp und die Konserviertheit des Proteins einheitlich, dass die Existenz der CJs in Hefe von Fcj1 abhängt.

4.1.2 Die Eigenschaften von Proteinen der Mitofilin-Familie

Mitofilin-ähnliche Proteine wurden in humanem Gewebe, Maus und Ratte nachgewiesen [Odgren *et al.*, 1996]. Dabei wurde humanes Mitofilin bislang am umfangreichsten charakterisiert [John *et al.*, 2005]. Inwieweit ähnelt Fcj1 seinem humanem Ortholog? Treten auch Unterschiede auf? Als Bestandteile der mitochondrialen Innenmembran besitzen beide Proteine ein Transmembransegment. Ein dort befindliches Dimerisierungsmotiv sowie eine Coiled coil-Region weisen auf Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Proteinen hin. Tatsächlich treten beide Proteine in größeren Proteinkomplexen auf und gehen homotypische Interaktionen ein. Für Mitofilin wurden zudem Interaktionen mit weiteren Proteinen nachgewiesen (siehe auch 4.1.4) [Weihofen *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2007]. Der Carboxyterminus ist zwischen Fcj1, humanem Mitofilin und weiteren Vertretern der Mitofilin-Familie konserviert. Übereinstimmung tritt weiterhin im Deletions- bzw. Herunterregulierungs-Phänotyp beider Proteine auf: Die Abwesenheit von Fcj1 oder humanem Mitofilin wirkt sich auf die Topologie der mitochondrialen Innenmembran aus und führt zum Fehlen von CJs. Die intramitochondriale Lokalisation von Mitofilin wurde wie für Fcj1 mittels Immungoldmarkierung untersucht. Die Auswertung erfolgte allerdings nicht quantitativ, wie für Fcj1 in dieser Arbeit beschrieben, und beschränkte sich auf die Zuordnung von Mitofilin an die Basis der Cristaemembran oder die innere Grenzmembran [John *et al.*, 2005; Odgren *et al.*, 1996]. Somit kann nur vermutet werden, dass auch dieses Protein im Bereich der CJs angereichert ist. Auch der Nachweis einer wie für Fcj1 demonstrierten direkten Beteiligung an der Ausbildung von CJs wurde für Mitofilin bisher nicht erbracht.

Anders als für humanes Mitofilin gezeigt, wurde Fcj1 in dieser Arbeit nach Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen mittels Dichtegradientenzentrifugation in zwei Fraktionen mit unterschiedlichen molaren Massen nachgewiesen. Dieser Befund und auch das Auftreten von Fcj1 sowohl an der CJ als auch im Bereich der Crista-Spitze könnten Hinweise auf die Existenz distinkter Fcj1-Subpopulationen sein, für welche bei humanem Mitofilin bisher jeder Anhaltspunkt fehlt. Weiterhin erscheinen die Cristae in Abwesenheit von Fcj1 als isolierte konzentrisch angeordnete Membranvesikel ohne erkennbare Verbindung zueinander. Im Gegensatz dazu wurden die Cristaemembranen in HeLa-Zellen, in denen Mitofilin herunterreguliert wurde, als labyrinthartig verbundenes Netzwerk beschrieben [John *et al.*, 2005]. Möglicherweise handelt es sich um Zelltyp-spezifische Unterschiede.

Insgesamt ähneln sich beide Proteine stark und unterscheiden sich nur in Details, deren Bedeutung sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht beurteilen lässt. Der Nachweis der Beteiligung von Mitofilin an der Ausbildung von CJs wurde im Gegensatz zu

Fcj1 noch nicht hinreichend erbracht. In Anbetracht der Ähnlichkeit beider Proteine kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich die Funktionen von Fcj1 und humanem Mitofilin bei der Bildung von CJs in Hefe und Mensch weitestgehend entsprechen.

4.1.3 Mögliche Funktionen von Proteinen der Mitofilin-Familie

Welche Schlüsse zur Funktion von Fcj1 und allgemein zu Proteinen der Mitofilin-Familie lassen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu?

Einerseits könnte Fcj1 als Strukturprotein die CJs formen. Experimentell gestützt wird dieser Gedanke von der Tatsache, dass Fcj1 Teil eines größeren Proteinkomplexes ist und homotypische Interaktionen eingeht.

Andererseits könnte die Funktion von Fcj1 auch in der Stabilisierung von CJs bestehen, deren Bildung und Lokalisierung unter dieser Annahme von anderen Protein- oder Lipidkomponenten abhängt. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist der Stoffaustausch zwischen Intermembranraum und Cristaekompartiment in Abwesenheit von Fcj1 zwar beeinträchtigt, jedoch nicht völlig unterbrochen. Möglicherweise stellen die CJs in diesem Szenario instabile Strukturen dar, so dass sie zwar der elektronenmikroskopischen Analyse entgehen, kurzlebige Verbindungen zwischen Cristaemembran und innerer Grenzmembran aber dennoch zustandekommen.

Darüber hinaus könnte Fcj1 die Verankerung von CJs in der Außenmembran vermitteln. Dafür spräche die beobachtete Veränderung der Architektur der CJs im Falle der Überexpression von Fcj1. Elektronenmikroskopische Analysen ergaben, dass erhöhte Mengen an Fcj1 neben einer Zunahme der Anzahl an CJs auch zu Verzweigungen der Cristae im Inneren der Mitochondrien führen, welche im Wildtyp nur sehr selten beobachtet werden. Hierbei könnte es sich um fehllokalisierte CJs handeln. Infolge der Überexpression von Fcj1 ist ein entsprechender Interaktionspartner in der Außenmembran möglicherweise nicht im nötigen Ausmaß vorhanden, um die Verankerung erhöhter Mengen an CJs zu gewährleisten.

Schließlich könnte Fcj1 auch die Membrankrümmung der mitochondrialen Innenmembran direkt beeinflussen. In Analogie zur F_1F_0 -ATP-Synthase, die der Cristaemembran ihre positive Krümmung vermutlich über die winkelige Anordnung ihrer F_0 -Domänen und den Raumbedarf ihrer globulären F_1 -Kopfstücke auf der Matrix-Seite auferlegt [Dudkina *et al.*, 2005], könnte Fcj1 mit Hilfe seiner Transmembrandomäne und dem Proteinhauptanteil im Intermembranraum die negative Membrankrümmung im Bereich der CJ einführen. Warum dieser Gedanke plausibel erscheint, wird unter 4.3 ausführlich erörtert.

Zusammenfassend sind unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit erlangten Daten verschiedene Möglichkeiten der Beteiligung von Fcj1 an der Bildung oder Stabilisierung von CJs vorstellbar. Dabei schließt ein Modell die genannten Alternativen nicht zwangsläufig aus.

4.1.4 Interaktionspartner von Fcj1/Mitofilin

Welche Hinweise auf die Funktion von Fcj1/Mitofilin liefern Interaktionspartner? Im Rahmen von Immunpräzipitationsexperimenten wurden gemeinsam mit Mitofilin sechs weitere Proteine aus humanen Herzmitochondrien isoliert [Xie *et al.*, 2007]. Während Funktion und Lokalisation der Kandidaten CHCHD3 und CHCHD6 noch unklar sind, wurden Metaxin 1 und 2, Sam50 in der mitochondrialen Außenmembran sowie das Matrixprotein DNAJC11 zuvor mit mitochondrialem Import in Zusammenhang gebracht. Die von den Autoren vorgeschlagene Rolle dieses Komplexes könnte daher in der Verknüpfung von mitochondrialem Import und mitochondrialer Struktur liegen [Xie *et al.*, 2007]. In Abwesenheit von Fcj1 oder Mitofilin ist der Anteil der mitochondrialen Innenmembranen im Verhältnis zur Außenmembran erhöht. Bisher ist nicht bekannt, wie die Membranproliferation in den Mitochondrien von sich teilenden Zellen abläuft. Vorstellbar wäre aber eine regulatorische Rolle von Fcj1/Mitofilin beim Weitertransport importierter Proteinen oder auch von Lipiden über die CJ in die Cristae.

Einer weiteren Studie zufolge interagiert Mitofilin physisch mit der Serin-Threonin-Kinase PINK1 [Weihofen *et al.*, 2009], die in mutierter Form einer der Auslöser der Parkinson-Krankheit ist [Cookson *et al.*, 2007]. Die Herunterregulierung des Proteins äußert sich in HeLa-Zellen unter anderem in der mitochondrialen Fragmentierung und in der Reduktion oder sogar völligen Abwesenheit der Cristae [Exner *et al.*, 2007]. Da PINK1 im mitochondrialen Intermembranraum nachgewiesen wurde [Exner *et al.*, 2007], wäre eine Interaktion mit Mitofilin grundsätzlich möglich.

Neben Mitofilin befinden sich in dem Multiproteinkomplex um PINK1 auch die GTPase Miro und das Adaptorprotein Milton [Weihofen *et al.*, 2009]. Beide Proteine spielen eine Rolle in der mitochondrialen Bewegung entlang der Mikrotubuli. Obwohl der mitochondriale Transport in Hefe entlang des Aktinzytoskeletts erfolgt, spielt auch hier das in der mitochondrialen Außenmembran verankerte Miro-Ortholog Gem1 eine Rolle. Gem1 ist für die Aufrechterhaltung der tubulären Morphologie und die mitochondrialen Vererbung beteiligt. Möglicherweise dient es als Sensor für Veränderungen des zytoplasmatischen Calciumspiegels [Frederick *et al.*, 2004], dessen Niveau die Verteilung von Mitochondrien in

der Zelle beeinflusst [Yi *et al.*, 2004]. Die kombinierte Deletion von Gem1 und verschiedenen anderen mitochondrialen Proteinen, darunter auch Fcj1, führt zu synthetischen Wachstumsdefekten in Hefe [Frederick *et al.*, 2008]. Somit gibt es bereits zwei Hinweise auf eine Verbindung zwischen Fcj1/Mitofilin und Gem1/Miro. In Anbetracht der Lokalisierung von Fcj1/Mitofilin im Intermembranraum und ihrer Bedeutung für die Organisation der mitochondrialen Innenmembran könnten diese Proteine als Mediatoren von extramitochondrialen Signalen ins Mitochondrieninnere dienen. Sie könnten die nötige Umgestaltung von Cristaemembranen und CJs im Rahmen von Vorgängen wie mitochondrialer Bewegung, Teilung und Vererbung, die je nach zellulärer Situation von außen gesteuert werden, vermitteln.

Insgesamt sind die genannten mutmaßlichen Interaktionspartner von Proteinen der Mitofilin-Familie an verschiedenen unabhängigen mitochondrialen Prozessen beteiligt. Welche dieser Interaktionen unter physiologischen Bedingungen tatsächlich von Bedeutung sind, müssen zukünftige Untersuchungen klären. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem die funktionelle Interaktion zwischen Fcj1 und zwei weiteren Proteinen bei der Bildung der CJs aufgedeckt. Wie die Untereinheiten $Su\ e/Su\ g$ der F_1F_0 -ATP-Synthase gemeinsam mit Fcj1 die mitochondriale Ultrastruktur modellieren könnten, wird unter 4.3 diskutiert.

4.2 Dynamik der mitochondrialen Innenmembran in $\Delta fcj1$

Zellen des Hefestamms $\Delta fcj1$ zeigen vermindertes Wachstum auf respiratorischem Medium, einen erhöhten Verlust der mtDNA und gravierende Veränderungen in der mitochondrialen Ultrastruktur. Ob diese Merkmale auf das Fehlen von CJs oder auf bisher unbekannte Funktionen des Proteins Fcj1 zurückzuführen sind, ist unklar. Insgesamt zeigt die Lebensfähigkeit des $\Delta fcj1$ -Stamms aber, dass Hefezellen auch ohne CJs existieren können. Damit tun sich viele Fragen auf: Wie gelangen in dieser Mutante kernkodierte Proteine ins Cristae-Kompartiment? Wie werden Cristaemembranen synthetisiert? Wie funktioniert der Metabolit-Austausch zwischen Cristae und Intermembranraum? Und ganz allgemein: was ist die Bedeutung der CJs? Um der Frage nach der Entstehung der Cristaemembranen nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die in den Mitochondrien von $\Delta fcj1$ -Zellen beobachteten Cristae-Vesikel isolierte Strukturen ohne Kontakt zur inneren Grenzmembran bilden. Protease-Schutz-Experimenten und Protein-Modifikationen zufolge ist der Stoffaustausch mit dem Intermembranraum stark beeinträchtigt, so dass die Cristae in der Mutante tatsächlich ein eigenes ‚Mikro-Kompartiment‘ zu bilden scheinen. Die Grundlagen

zur Entstehung der Cristae sind selbst für den Wildtyp bisher nur unzureichend bekannt (Vorschläge siehe Zick *et al.*, 2009). Vorstellbar wäre aber, dass die in Mitochondrien des Stammes *Δfcj1* beobachteten intracristalen Vesikel ursprünglich mit der inneren Grenzmembran in Kontakt standen und sich dann aufgrund fehlender Stabilität lösten. Somit könnten, Jahresringen eines Baumes ähnlich, die ältesten dieser Strukturen die am weitesten mittig in der mitochondrialen Matrix gelegenen sein. Aus der Akkumulation und ständigen Neusynthese von Cristaevesikeln könnte die ungewöhnliche Größe der mitochondrialen Querschnitte in *Δfcj1*-Zellen resultieren. Der Wachstumsphänotyp von *Δfcj1*-Zellen ist umso stärker ausgeprägt, je geringer die Temperatur ist. Bei 37 °C tritt hingegen nur noch ein geringer Unterschied im Vergleich zum Wildtyp auf (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ergibt sich die begrenzte Zugänglichkeit der Cristaevesikel in *Δfcj1* aus Fusions- und Teilungsprozessen zwischen Cristaemembran und innerer Grenzmembran, welche bei höherer Temperatur durch eine erhöhte Membranfluidität vereinfacht werden. In der Literatur werden dynamische Umstrukturierungen innerhalb der Cristae von Wildtyp-Zellen schon seit längerem diskutiert. Auf ultrastrukturelle Analysen verweisend argumentieren Mannella und Kollegen, dass der Übergang von orthodoxen zu kondensierten Mitochondrien nicht auf passiven Membranentfaltungsvorgängen allein beruhen kann. Die in den Cristae stattfindende Umorganisation von ursprünglich isoliert vorliegenden tubulärer Strukturen zu einem größeren Cristasegment erfordere zwangsläufig Fusionsvorgänge innerhalb der Innenmembranen [Mannella *et al.*, 2001]. Auch bei Umstrukturierungen der mitochondrialen Ultrastruktur im Kontext apoptotischer Vorgänge, die mit der Vereinigung der Cristae zu einem einzigen großen Kompartimenten einhergehen [Scorrano *et al.*, 2002], ist der Gedanke an Fusionsvorgänge innerhalb der Cristae naheliegend.

4.3 Die Architektur der mitochondrialen Innenmembran – Molekulare Grundlagen

4.3.1 Welche Voraussetzungen erfordert die Krümmung von biologischen Membranen?

Das charakteristische Erscheinungsbild aller Zellorganellen wird von der Morphologie der sie umgebenden Membranen bestimmt. Die Struktur dieser Lipiddoppelschichten wird von den chemischen Eigenschaften der darin befindlichen Lipide beeinflusst. Theoretischen Berechnungen zufolge wäre in stark gekrümmten Membranen mit dem Radius einiger zehn Nanometer allerdings eine zu große Asymmetrie in der Zusammensetzung beider

Lipideinzelschichten nötig, als dass dies über die Lipidzusammensetzung allein erreicht werden könnte [van Meer *et al.*, 2008; Zimmerberg und Kozlov, 2006]. Daher spielen bei der Formgebung von Zellorganellen auch Proteine eine wichtige Rolle. Proteine können biologische Membranen beeinflussen, indem sie als molekulare Motoren dienen, die Membranen deformieren, indem sie Membranen mit Hilfe eines Proteingerüsts in eine bestimmte Form drängen [Farsad *et al.*, 2001] oder indem sie über hydrophobe Insertion die Lipide einer Hälfte der Lipiddoppelschicht verdrängen und damit die Ausrichtung der Membran verändern [Zimmerberg und Kozlov, 2006]

Wie dies im Detail funktioniert, ist für die einzelnen Zellorganellen unterschiedlich gut untersucht: Viele Erkenntnisse darüber, wie Membranen geformt und modelliert werden, verdanken wir Studien zur Clathrin-vermittelten Endozytose. Adaptorproteine und akzessorische Proteine rekrutieren das triskelionförmige Clathrin zu Bereichen der Plasmamembran, die internalisiert werden sollen. Dort polymerisiert Clathrin zu käfigähnlichen Strukturen, welche aufgrund ihrer intrinsischen Krümmung ein Gerüst für sphärische Membraneinstülpungen bilden [Doherty und McMahon, 2009; Schmid *et al.*, 2006]. In den tubulären Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befinden sich zwei Familien von integralen Membranproteinen, die Reticulons und DP1/Yop1p. Beide besitzen hydrophobe Domänen, die Haarnadelstrukturen ausbilden können. Sie stabilisieren die extreme Krümmung der ER-Tubuli vermutlich dadurch, dass sie sich in der äußeren Membranschicht ‚verkeilen‘ [Shibata *et al.*, 2006; Voeltz *et al.*, 2006].

Dazu, wie Mitochondrien ihre Form erhalten, ist bisher wenig bekannt. Die Tatsache aber, dass in diesen Organellen zwei Membransysteme koordiniert werden müssen, lässt auf eine gewisse Komplexität schließen. Zwar wurden Proteine identifiziert, deren Fehlen zur mitochondrialen Tubulationsdefekten führt. So hat die Depletion der Außenmembranproteine Mmm1, Mdm10 und Mdm12 die Ausbildung riesiger sphärischer Mitochondrien zur Folge [Berger *et al.*, 1997; Boldogh *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994]. Auf welchen Mechanismen dies im Detail beruht, ist bisher unklar. Im Gespräch waren bereits Interaktionen mit dem Zytoskelett [Boldogh *et al.*, 2003] und die Beteiligung an der Assemblierung der mitochondrialen β -barrel-Proteine [Meisinger *et al.*, 2007]. Seit kurzem wird zudem eine Funktion in der Verbindung zwischen ER und Mitochondrien und dem interorganellären Phospholipidaustausch diskutiert [Kornmann *et al.*, 2009].

Ein weiteres Innenmembranprotein, die Acyltransferase Tafazzin, verknüpft die mitochondriale Ultrastruktur mit der Lipidzusammensetzung der Innenmembran. Mutationen im TAZ-Gen führen zum Barth Syndrom, welches von Herz- und Skelettmuskelmyopathien,

Neutropenien und Atmungskettendefekten gekennzeichnet ist [Barth *et al.*, 1983; Barth *et al.*, 1996]. Der Grund dafür sind Störungen im Lipidmetabolismus, die sich in einer Reduktion des in der Innenmembran angereicherten Cardiolipin äußern und sich auf dessen molekulare Zusammensetzung auswirken [Schlame, 2007]. Elektronenmikroskopische Analysen eines *Drosophila*-Modells und tomographische Rekonstruktionen der Lymphoblasten von Barth Syndrom-Patienten deckten vergrößerte Mitochondrien, kollabierte Cristae und aneinanderhaftende Cristaemembranen ohne durchgängiges Cristaevolumen auf [Acehan *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2006]. Auch wenn sich die Phänotypen des Fehlens von Tafazzin und Fcj1 nicht bis ins Detail ähneln, haben beide das Auftreten von Cristaemembranstackeln ohne Kontakt zur Inneren Grenzmembran gemeinsam. CJs werden in Abwesenheit von Tafazzin jedoch nach wie vor gebildet. Im Falle des Barth Syndroms könnte die durch das Fehlen von Cardiolipin bedingte Destabilisierung der Atmungskettenkomplexe [Brandner *et al.*, 2005] Ursache für die veränderte Cristaearchitektur sein. Den Beitrag von Fcj1 zur Modulation der mitochondrialen Innenmembran zu erfassen war Gegenstand dieser Arbeit.

4.3.2 Welchen Beitrag leistet Fcj1 zur Modulation der Innenmembran?

Fcj1 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Innenmembran, dessen größter Teil zum Intermembranraum hin exponiert ist. Es geht homotypische Interaktionen ein und ist mit etwa 5730 Molekülen pro Zelle relativ häufig [Ghaemmaghami *et al.*, 2003], aber weitaus seltener als der häufigste Bestandteil der Innenmembran, die F_1F_0 -ATP-Synthase. Von deren Untereinheiten $F_1\alpha$ und $F_1\beta$ findet man pro Zelle etwa 41500 bzw. 164000 Moleküle [Ghaemmaghami *et al.*, 2003]. Fcj1 ist im Bereich der CJs und der Crista-Enden angereichert. Die Deletion führt zum Verlust der CJs und dem normalen Erscheinungsbild der Cristaemembranen, während die Überexpression sich in internen Verzweigungen der Cristae und der Zunahme der Anzahl der CJs äußert. Dies alles deutet auf eine direkte Beteiligung von Fcj1 an der Ausbildung der CJs hin.

Dass die Formgebung der CJs über Gerüstproteine geschieht, ist wegen der hoch konservierten Struktur der CJs naheliegend. Die Menge an Fcj1 ist aber auch in Zellen ohne Cristae und CJs kaum beeinträchtigt. Folglich ist zur Ausbildung der CJs die Anwesenheit von Fcj1 alleine nicht hinreichend, sondern weitere Faktoren, möglicherweise in Form von Konformationsänderungen, Interaktionen mit anderen Proteinen oder Homooligomerisierung, sind erforderlich. Dass Fcj1 Interaktionsdomänen besitzt, *in vivo* mit sich selbst interagiert und Teil eines größeren Proteinkomplexes ist, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt.

Daher liegt die Idee der Gerüstbildung mehrerer Fcj1-Moleküle im Bereich der CJs zur Beugung der Cristaemembran nahe.

In Abwesenheit von Fcj1 fallen ungewöhnlich große Anordnungen der F₁F₀-ATP-Synthase in der Cristaemembran auf. Eine erhöhte Stabilität und ungewöhnliche Größe der F₁F₀-ATP-Synthase-Oligomere, die mit der Abwesenheit von Fcj1 korreliert, ließ sich auch mit biochemischen Methoden nachweisen, während die Überexpression von Fcj1 sich negativ auf den Oligomerisierungszustand der F₁F₀-ATP-Synthase auswirkt. Insgesamt kann von einem destabilisierenden Einfluss von Fcj1 auf die Superkomplexe der F₁F₀-ATP-Synthase ausgegangen werden. Neben dieser funktionellen Wechselwirkung interagiert Fcj1 mit den Dimerisierungsuntereinheiten Su e und Su g der F₁F₀-ATP-Synthase auch genetisch. In der vorliegenden Arbeit konnte somit der regulatorische Einfluss von Fcj1 auf einen weiteren Proteinkomplex, der selbst an der Modulation der Cristaemembran beteiligt ist, gezeigt werden.

4.3.3 Einfluss der F₁F₀-ATP-Synthase auf die Topologie der Cristaemembran

Es wurde gezeigt, dass die F₁F₀-ATP-Synthase neben der Erzeugung von ATP auch eine strukturelle Funktion ausübt. Bereits 1989 beschrieb Allen helikale Anordnungen von F₁-Partikeln, die die Cristae in mitochondrialen Membranfragmenten aus *Paramecium* umgeben. Der Großteil des Enzymkomplexes befindet sich dabei in den gekrümmten Bereichen von Lamellen und Tubuli [Allen, 1995]. Dass die Dimerisierung und Oligomerisierung des Enzymkomplexes für eine positive Membrankrümmung und damit die Formgebung der Cristae verantwortlich ist, geht mittlerweile aus mehreren Studien hervor [Dudkina *et al.*, 2005; Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005; Strauss *et al.*, 2008]. Mit der Methode der Atomkraftmikroskopie wurden erst kürzlich Reihen von Dimeren der F₁F₀-ATP-Synthase in Fragmenten nativer mitochondrialer Membranen aus Hefe nachgewiesen [Buzhynskyy *et al.*, 2007].

Für die Stabilisierung höhermolekularer Formen des Enzymkomplexes und die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Ultrastruktur sind die Dimerisierungsuntereinheiten Su e und Su g essentiell [Arnold *et al.*, 1998; Giraud *et al.*, 2002; Paumard *et al.*, 2002b]. Wie sich das Fehlen von Su e und Su g auf die Architektur der CJs auswirkt, wurde bislang nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte elektronenmikroskopische Analysen ergaben, dass die Abwesenheit von Su e und Su g zu einer Erweiterung der CJ-Basis führt und dass in

diesen Deletionsstämmen oft zwei oder mehr CJs über eine brückenähnliche Verbindung aus Cristaemembranen miteinander verbunden sind. Auch treten, vergleichbar mit dem Überexpressionsphänotyp von Fcjl, häufig Verzweigungen innerhalb der Cristae auf. Bei diesen im Wildtyp seltenen Strukturen könnte es sich um fehllokalisierte CJs handeln, denen die Verankerung in der Außenmembran fehlt. Erstaunlicherweise treten Crista-Enden in Abwesenheit von Su e und Su g nur sehr selten auf.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch das Auftreten durchgängiger Cristae, die über zwei CJs mit der inneren Grenzmembran verbunden sind und denen somit die Enden fehlen, in Mitochondrien aus braunem Fettgewebe. Tomographische Rekonstruktionen ergaben, dass die Cristae in diesen Adipocyten stets lamellenartig und nicht tubuläre sind [Perkins *et al.*, 1998]. In braunem Fettgewebe sind Atmungskette und ATP-Produktion entkoppelt. Entkopplerproteine in der Cristaemembran [Loncar, 1990] ermöglichen einen direkten Rückfluss der Elektronen, die über die Atmungskette in die Cristae gepumpt werden, so dass die Energie des Elektronentransports direkt in Wärme umgesetzt wird. Daher enthält braunes Fettgewebe extrem hohe Mengen an Atmungskettenenzymen, aber nur geringe Mengen der F₁F₀-ATP-Synthase [Cannon und Vogel, 1977; Lindberg *et al.*, 1967]. Auf diesen Mangel könnte der geringe Anteil an positiv gekrümmten Crista-Enden im Vergleich zu anderen Zelltypen zurückzuführen sein. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren für die auffällige Morphologie der beschriebenen Zellen verantwortlich sind, in Anbetracht der morphologischen Daten zur Ultrastruktur von $\Delta su e$ und $\Delta su g$ -Mitochondrien scheint ein Zusammenhang zwischen der speziellen mitochondrialen Ultrastruktur des braunen Fettgewebes und dem Oligomerisierungszustand der F₁F₀-ATP-Synthase jedoch plausibel.

4.3.4 Modell zur Bildung von Crista Junctions und Cristae in Mitochondrien

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen auf gegensätzliche Funktionen von Fcjl und Su e/Su g hin. Während Fcjl im Bereich der CJs essentiell ist, erfordert die Ausbildung der Cristaspitzen die Anwesenheit von Su e und Su g. Da die genannten Komponenten in verschiedenen Bereichen der Cristaemembran angereichert sind, beruht die Architektur der Cristastrukturen offensichtlich auf der relativen Verteilung von Fcjl und Su e/Su g innerhalb der Cristae. Dieser Gedanke soll anhand eines Modells veranschaulicht werden (Abbildung 36):

Die Cristaearchitektur basiert in den meisten Zellen und Organen auf wiederkehrenden Strukturelementen. Die Crista-Blätter bestehen aus zwei parallelen Membranen, die durch eine schmale Schicht des Intermembranraums voneinander getrennt sind. An den ‚Spitzen‘ oder ‚Rändern‘ der Cristae gehen beide Membranen ineinander über; sie sind in diesen Bereichen stark positiv gekrümmt. Den Übergang von den Cristae zur inneren Grenzmembran, die parallel zur mitochondrialen Außenmembran verläuft, bilden die CJs. Die Cristaemembranen verengen sich in diesem Bereich zu einer tubulären Struktur mit komplexer dreidimensionaler Architektur. Während der Tubulus selbst eine positive Krümmung aufweist, überwiegt im Bereich der Mündung in die innere Grenzmembran eine stark negative Membrankrümmung. Im Übergangsbereich zwischen CJ und Crista-Blatt und im Crista-Blatt selbst treten neben beiden Arten der Membrankrümmung auch ebene Bereiche auf.

Auf diese unterschiedlichen Membranausrichtungen nimmt Fcj1 Einfluss, indem es sich - direkt oder indirekt - störend auf die Bildung supramolekularer Strukturen der F_1F_0 -ATP-Synthase auswirkt und damit eine negative Beugung der Membran begünstigt. Auf diese Weise ermöglicht die Anwesenheit von Fcj1 die Ausbildung der CJs. In Membranbereichen, in denen die Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP-Synthase nicht beeinträchtigt ist, überwiegt eine positive Membrankrümmung. Dass der Proteinkomplex für die positive Membrankrümmung im Bereich der Crista-Enden und der Lamellenränder verantwortlich ist, wurde bereits im Rahmen anderen Studien vorgeschlagen [Dudkina *et al.*, 2005; Strauss *et al.*, 2008]. Neu ist die Erkenntnis, dass dieser Effekt auf die spezifische Verteilung von Su e und Su g in den Cristae zurückzuführen ist. Beide Proteine haben ihre größte Dichte in der Crista-Spitze, sind auch im Crista-Blatt vertreten, und im Bereich der CJs unterrepräsentiert. Fcj1 befindet sich außerhalb der CJ auch im Bereich des Crista-Blatts, aber kaum im Crista-Hals. Folglich entscheidet das relative Verhältnis von Fcj1 zu Su e/Su g über die Membrankrümmung in der jeweiligen Cristaeregion. Während die ebene Membranfläche im Crista-Blatt auf ein ausgeglichenes Verhältnis von sowohl Fcj1 als auch Su e/Su g zurückzuführen ist, bewirkt die Dominanz von Su e und Su g im Crista-Hals die Ausbildung einer tubulären Struktur und auch in der Crista-Spitze eine positive Membranorientierung. Die negative Krümmung der CJs geht auf den vorherrschenden Einfluss von Fcj1 in dieser Region zurück.

Ein ausgeglichenes Verhältnis der Antagonisten Fcj1 und Su e/Su g könnte auch für die Dynamik innerhalb der Cristae von Bedeutung sein. Die Möglichkeit intracristaler Teilungs- und Fusionsvorgänge wurde bereits in Kapitel 4.2 angesprochen. Sie bietet zugleich eine plausible Erklärung für das Auftreten der Fcj1-Subpopulation im Bereich der Crista-

Spitze. In diesem Bereich befindliche Proteine könnten bei der Fusion der Cristae mit der inneren Grenzmembran die Grundlage für die Ausbildung neuer CJs bilden. Möglicherweise geschieht dies, indem Fcj1 störende Oligomere der F₁F₀-ATP-Synthase aus ‚fusionskompatiblen‘ Membrandomänen fernhält. Die in Abwesenheit von Fcj1 auftretende ‚reißverschlussähnliche‘ Anordnung der F₁F₀-ATP-Synthase könnte das Fusionieren nebeneinanderliegender Cristaemembranen verhindern und damit für die Entstehung der für $\Delta fcj1$ typischen Innenmembranstapel verantwortlich sein. Ein ähnlicher Gedanke wurde letzthin in Zusammenhang mit der zwiebelförmigen Anordnung der Cristae von $\Delta su e$ und $\Delta su g$ -Mitochondrien geäußert. Velours und Kollegen schlugen vor, dass die für diese Mutanten typischen überlangen Cristaestrukturen aus der Fusion lamellenförmiger Cristae, welche im Wildtyp von den oligomeren Formen der F₁F₀-ATP-Synthase auf Distanz gehalten werden, entspringen [Velours *et al.*, 2009].

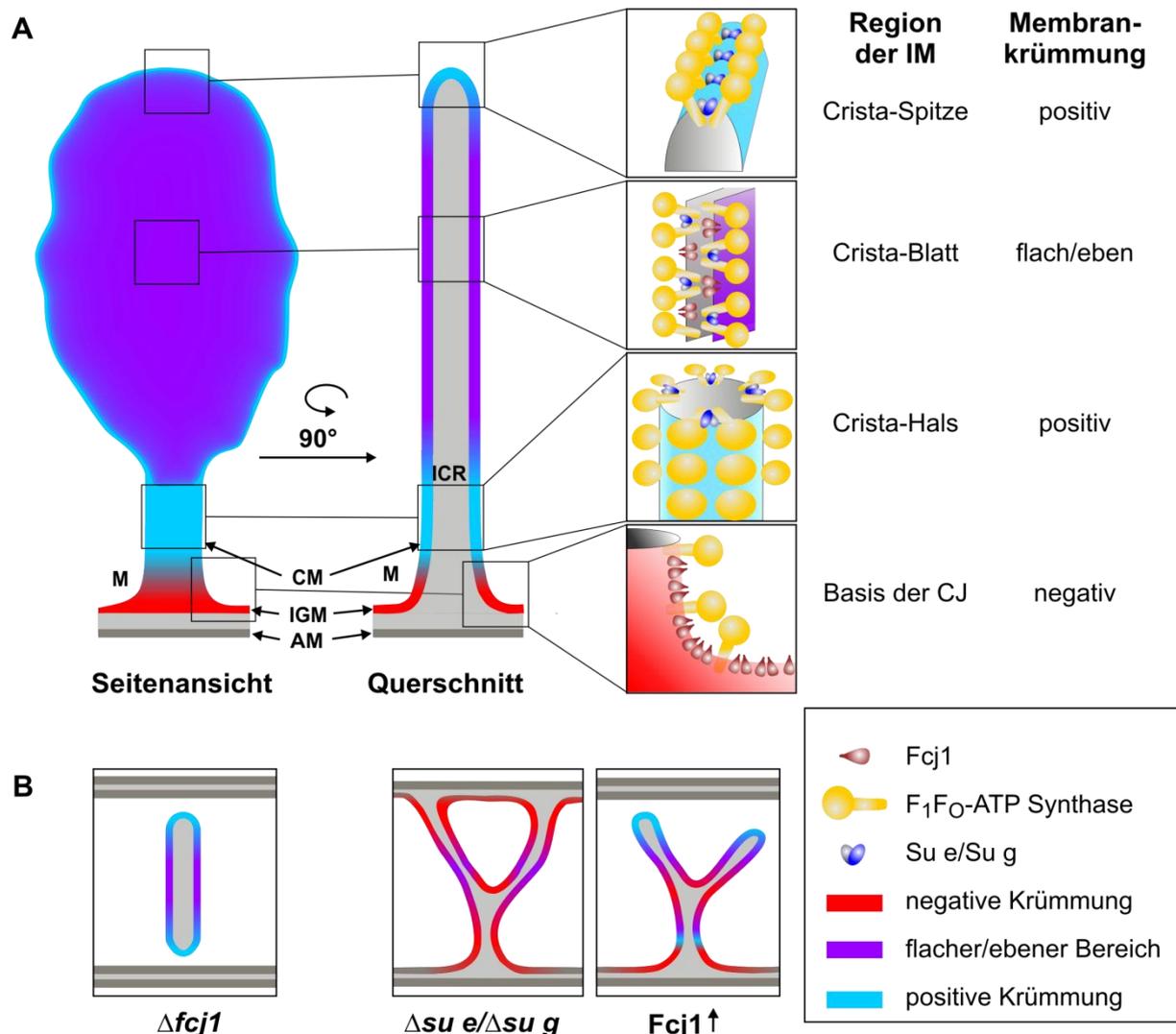


Abbildung 36: Modell zur Bildung der Cristae und Crista Junctions in Mitochondrien. (A) Schematische Darstellung der Membrankrümmung in verschiedenen Regionen der Cristaemembran und der sub-mitochondrialen Lokalisierung von Fcj1 und Su e/Su g in Wildtyp-Mitochondrien. Positive Membrankrümmungen sind blau markiert, negative Krümmungen rot und Regionen, in denen beide Arten der Krümmung auftreten oder die keine ersichtliche Krümmung aufweisen, violett. Einen Überblick über ein repräsentatives Crista-Blatt mit einer Crista Junction ist in Seitenansicht (links) oder im Querschnitt nach einer Drehung um 90° (Mitte) dargestellt. Vergrößerungen der umrahmten Bereiche zeigen in dreidimensionaler Ansicht die Anordnung von Fcj1, Su e/Su g und der F₁F₀-ATP-Synthase in den verschiedenen Regionen der Cristaemembran und den Einfluss dieser Proteine auf die Membrankrümmung (rechts). (B) Schematische Darstellung der Membrankrümmungen, die in den mitochondrialen Cristaestrukturen der angegebenen Hefestämme vor-herrschen. Nach Deletion von Fcj1 überwiegen negative Membrankrümmungen. Strukturen, die auf positiven Krümmungselementen basieren, fehlen. Das Fehlen von Su e/Su g äußert sich in der Abwesenheit positiver Membrankrümmungen, welche zu einer Vergrößerung des Crista Junction-Durchmessers, Verzweigungen innerhalb der Cristae und einer deutlichen Reduktion sichtbarer Crista-Enden führt. Einen ähnlichen Phänotyp ruft die Überexpression von Fcj1 hervor. Allerdings ist die Bildung der Crista-Enden in dieser Mutante nicht beeinträchtigt. AM, Außenmembran; CJ, Crista Junction; CM, Cristaemembran; IGM, innere Grenzmembran; IM, Innenmembran; ICR, Intracristalraum; M, Matrix.

4.4 Ausblick

Mit der vorgeschlagenen Hypothese zur Entstehung von Cristae und CJs lassen sich alle Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Doktorarbeit oder anderer thematisch relevanter Studien gewonnen wurden, in Einklang bringen.

Die Tatsache, dass CJs nur einen Bruchteil der mitochondrialen Innenmembran ausmachen, erschwert Untersuchungen zu diesen Strukturelementen. Die vorliegende Arbeit konnte erste Hinweise zur Regulierung der Membrankrümmung in den Cristae liefern, hinterlässt jedoch auch offene Fragen. So bleibt mit Hilfe zukünftiger Experimente zu klären, wie im Detail das Zusammenspiel von Fcjl und der F₁F₀-ATP-Synthase aussieht. Bisher ist beispielsweise noch unklar, ob die untersuchten Proteine eine Präferenz für bestimmte bereits existierende Membrankrümmungen besitzen, oder ob erst die Anwesenheit der Proteine distinkten Regionen ihre Krümmung auferlegt. Auch wurde noch nicht untersucht, ob die spezifische Anreicherung der übrigen F₁F₀-ATP-Synthase-Untereinheiten mit derjenigen von Su e und Su g korreliert, oder ob die F₁F₀-ATP-Synthase in Form von Monomeren gleichmäßig über die Membran gesamte Cristaemembran verteilt ist und erst die Anwesenheit von Su e und Su g die Modulation gewisser Membranabschnitte bewirkt. Die Beteiligung weiterer Komponenten, möglicherweise in Form eines CJ-Komplexes zum Zweck der Verankerung der CJs in der Außenmembran, ist nicht ausgeschlossen. Auch die Frage, inwiefern die Überexpression von Fcjl zur Erweiterung des CJ-Durchmessers führt, und wie dies mit der Beobachtung, dass erhöhte Mengen von Opa1 die Verengung von CJs bewirken, in Einklang steht, bleibt zu beantworten.

Letztendlich könnten künftige Untersuchungen an $\Delta fcjl$ auch Einblicke in die Prinzipien mitochondriale Biogenese verschaffen, da es dieser Mutante auch ohne offensichtliche Verbindung zwischen innerer Grenzmembran und Cristaemembran gelingt, Proteine und Lipidbestandteile aus dem Zytosol in die Cristae zu transportieren.

5 Zusammenfassung

Die Crista Junction, ein Strukturelement der mitochondrialen Innenmembran, stellt eine tubuläre Verbindung zwischen innerer Grenzmembran und Cristaemembran dar. Die molekularen Grundlagen ihrer Entstehung waren bisher weitgehend unbekannt. Das Fehlen des mitochondrialen Innenmembranproteins Mitofilin führt in HeLa-Zellen zur Abwesenheit von Crista Junctions. Auch die Deletion von Fcj1, dem Mitofilin-Ortholog in *S. cerevisiae*, hat neben dem Auftreten konzentrisch gestapelter Cristae-Vesikeln die völlige Abwesenheit von Crista Junctions zur Folge. In der vorliegenden Arbeit galt es, die Funktion von Fcj1 sowie die molekulare Basis der Entstehung von Cristae und Crista Junctions im Modellorganismus *S. cerevisiae* zu untersuchen.

Fcj1 geht homotypische Interaktionen ein, welche zur Ausbildung eines stabilen oligomeren Proteinkomplexes führen. Innerhalb der Mitochondrien wurde Fcj1 mittels Immun-Elektronenmikroskopie an den Crista Junctions nachgewiesen. Alle anderen bisher untersuchten Proteine wie beispielsweise die Untereinheiten Su e und Su g der F₁F₀-ATP-Synthase sind in diesem Bereich dagegen eher unterrepräsentiert.

Die Überexpression von Fcj1 äußert sich in der Zunahme der Anzahl der Crista Junctions, der Erweiterung des Crista Junction-Durchmessers und im Auftreten interner Verzweigungen der Cristae. Wird die Expression von Fcj1 reprimiert, so nähert sich die mitochondriale Ultrastruktur in diesen Zellen mit zunehmender Repressionzeit immer mehr dem Deletionsphänotyp an. In Anbetracht der Tatsache, dass die Zahl der Crista Junctions während der Repression sehr früh abnimmt, scheint Fcj1 direkt an der Ausbildung der Crista Junctions beteiligt zu sein.

Um zu untersuchen, ob die Cristae in Abwesenheit von Crista Junctions tatsächlich ein abgeschlossenes Kompartiment bilden, wurde in isolierten Mitochondrien die Zugänglichkeit des Intracristalraums für die Protein-modifizierende Substanz AMS getestet. Im Vergleich zum Wildtyp erfolgt die Modifikation von Cytochrom c in $\Delta fcj1$ -Mitochondrien zeitverzögert und unvollständig. Ohne Crista Junctions ist ein Austausch zwischen Intracristalraum und Cristaeraum somit beeinträchtigt, aber dennoch eingeschränkt möglich. Dafür verantwortlich könnte ein geringes Maß an Fusions- und Teilungsvorgängen durch Protein- oder Lipid-austausch innerhalb der mitochondrialen Innenmembran sein.

In Cryo-EM-tomographischen Rekonstruktionen isolierter $\Delta fcj1$ -Mitochondrien fallen regelmäßige ‚reißverschlussähnliche‘ Anordnungen der F₁F₀-ATP-Synthase auf. Mit bio-

chemischen Methoden lässt sich ein inverses Verhältnis von Fcjl-Menge und Oligomerisierungsgrad der F_1F_0 -ATP-Synthase feststellen: In $\Delta fcj1$ -Mitochondrien haben die Oligomere der F_1F_0 -ATP-Synthase ein größeres Molekulargewicht und sind stabiler als im Wildtyp, in Fcjl-überexprimierenden Zellen hingegen verhält es sich umgekehrt.

Die Untereinheiten Su e und Su g sind für die Stabilisierung von Dimeren und Oligomeren der F_1F_0 -ATP-Synthase essentiell. Da ihr Einfluss auf die Bildung von Crista Junctions jedoch unklar war, wurde die mitochondriale Ultrastruktur beider Deletionsstämme diesbezüglich ausgewertet. Vergleichbar mit dem Überexpressionsphänotyp von Fcjl treten erweiterte Crista Junctions und interne Verzweigungen der Cristae auf. Zusätzlich fällt die fast vollständige Abwesenheit von Crista-Enden auf. Neben dieser funktionellen Interaktion konnte auch eine genetische Interaktion zwischen Fcjl und Su e/Su g gezeigt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Einblicke in die Rollen von Fcjl und von Su e/Su g lassen sich in einem Modell zusammenfassen, nach welchem die Modulation der mitochondrialen Innenmembran auf einem Antagonismus zwischen Fcjl und Su e/Su g beruht. Während Fcjl negative Membrankrümmungen induziert, möglicherweise indem es die Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP-Synthase beeinträchtigt, fördert die Anwesenheit von Su e/Su g über die Stabilisierung dimerer und oligomerer Formen der F_1F_0 -ATP-Synthase die positive Krümmung der Cristaemembran. Insgesamt beeinflusst das relative Verhältnis von Fcjl zu Su e/Su g lokal den Oligomerisierungszustand der F_1F_0 -ATP-Synthase und ermöglicht auf diese Weise die Entstehung von Crista Junctions und Crista-Enden.

6 Summary

The crista junction is a tubular element of the mitochondrial inner membrane connecting inner boundary membrane and cristae membrane. The molecular basis of its formation was so far largely unknown. The lack of the mitochondrial inner membrane protein mitofilin results in the absence of crista junctions in HeLa-cells. Moreover, deletion of Fcj1, the orthologue of mitofilin in *S. cerevisiae*, leads to concentric stacks of cristae membranes and the virtual absence of crista junctions. The aim of the present work was to investigate the function of Fcj1 as well as the molecular basis of the formation of cristae and crista junctions in *S. cerevisiae*.

Fcj1 undergoes homotypic interactions and is part of a stable oligomeric protein complex. Using immuno-EM, Fcj1 has been shown to be specifically enriched at crista junctions. All other proteins, which have been studied so far, such as subunits $Su e$ and $Su g$ of the F_1F_0 -ATP-Synthase, are rather underrepresented in this region.

Overexpression of Fcj1 increases the number of crista junctions, enlarges the crista junction diameter and leads to internal branching of cristae. Upon downregulation of Fcj1, the mitochondrial ultrastructure progressively changes reflecting the deletion phenotype more and more. Considering the fact that the decrease of the number of crista junctions occurs at an early time point, Fcj1 seems directly involved in the formation of crista junctions.

In order to investigate if cristae form a detached compartment in the absence of crista junctions, the accessibility of the intracristal space for the protein-modifying substance AMS was examined. In $\Delta fcj1$ mitochondria the modification of cytochrome *c* was temporally delayed and incomplete in comparison to wild-type. Hence, metabolite exchange between intracristal space and cristae space seems impaired though not entirely impossible in the absence of crista junctions. This might be due to some extent of fusion and fission tracing back to protein or lipid exchange within the inner membrane of mitochondria.

Cryo-EM tomograms revealed regular zipper-like arrangements of F_1F_0 -ATP-Synthase particles. An inverse correlation of the amount of Fcj1 and the oligomeric state of F_1F_0 -ATP-Synthase was observed upon biochemical analysis: in $\Delta fcj1$ mitochondria, F_1F_0 -ATP-Synthase oligomers have a higher molecular weight and are more stable than in wild-type mitochondria, whereas in mitochondria of cells overexpressing Fcj1 they are smaller and less stable.

Subunits Su e and Su g are essential for the stabilization of dimers and oligomers of the F₁F₀-ATP-Synthase. As the influence of Su e/Su g on the formation of crista junctions has not been investigated so far, the mitochondrial ultrastructure of both deletion strains was analyzed concerning this matter. Enlargement of crista junctions and internal branching of cristae similar to the overexpression phenotype of Fcj1 have been observed in both strains. Furthermore, crista tips are virtually absent. Apart from this functional interaction, Fcj1 and Su e/Su g have also been shown to interact genetically.

Based on the gained insights on the roles of Fcj1 and Su e/Su g in cristae formation the following model is proposed: the modulation of the inner membrane of mitochondria is based on an antagonistic behavior of Fcj1 and Su e/Su g. Fcj1 introduces negative membrane curvatures, possibly by impairing the oligomerisation of the F₁F₀-ATP-Synthase. The presence of Su e/Su g, in contrast, promotes positive curvatures of cristae membranes by stabilizing dimers and oligomers of the F₁F₀-ATP-Synthase. Taken together, relative amounts of Fcj1 and Su e/Su g locally modulate the oligomeric state of the F₁F₀-ATP-Synthase and thereby enable the formation of crista junctions and crista tips in mitochondria.

7 Literaturverzeichnis

Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE (1994): Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621-8.

Acehan D, Xu Y, Stokes DL, Schlame M (2007): Comparison of lymphoblast mitochondria from normal subjects and patients with Barth syndrome using electron microscopic tomography. *Lab Invest* 87:40-8.

Adam A, Endres M, Sirrenberg C, Lottspeich F, Neupert W, Brunner M (1999): Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo J* 18:313-9.

Allen RD (1995): Membrane tubulation and proton pumps. *Protoplasma* 189:1-8.

Allen RD, Schroeder CC, Fok AK (1989): An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J Cell Biol* 108:2233-40.

Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP, Zorov DB (1988): Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J Cell Biol* 107:481-95.

Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG (1998): The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396:133-40.

Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H (1998): Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP-Synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *Embo J* 17:7170-8.

Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H (1999): ATP-Synthase of yeast mitochondria. Isolation of subunit j and disruption of the ATP18 gene. *J Biol Chem* 274:36-40.

Arselin G, Giraud MF, Dautant A, Vaillier J, Brethes D, Coulary-Salin B, Schaeffer J, Velours J (2003): The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP-Synthase complex in the mitochondrial membrane. *Eur J Biochem* 270:1875-84.

Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brethes D, Velours J (2004): The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP-Synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* 279:40392-9.

Baloyannis SJ (2006): Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:119-26.

Barth PG, Scholte HR, Berden JA, Van der Klei-Van Moorsel JM, Luyt-Houwen IE, Van 't Veer-Korthof ET, Van der Harten JJ, Sobotka-Plojhar MA (1983): An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci* 62:327-55.

- Barth PG, Van den Bogert C, Bolhuis PA, Scholte HR, van Gennip AH, Schutgens RB, Ketel AG (1996): X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): respiratory-chain abnormalities in cultured fibroblasts. *J Inher Metab Dis* 19:157-60.
- Baumann F, Neupert W, Herrmann JM (2002): Insertion of bitopic membrane proteins into the inner membrane of mitochondria involves an export step from the matrix. *J Biol Chem* 277:21405-13.
- Beal MF (2007): Mitochondria and neurodegeneration. *Novartis Found Symp* 287:183-92; discussion 192-6.
- Berger KH, Sogo LF, Yaffe MP (1997): Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol* 136:545-53.
- Berger KH, Yaffe MP (2000): Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol* 8:508-13.
- Bernardi P, Azzone GF (1981): Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 256:7187-92.
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F (1999): Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264:687-701.
- Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23.
- Bleazard W, McCaffery JM, King EJ, Bale S, Mozdy A, Tieu Q, Nunnari J, Shaw JM (1999): The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* 1:298-304.
- Boldogh IR, Nowakowski DW, Yang HC, Chung H, Karmon S, Royes P, Pon LA (2003): A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell* 14:4618-27.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Brandner K, Mick DU, Frazier AE, Taylor RD, Meisinger C, Rehling P (2005): Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Mol Biol Cell* 16:5202-14.
- Brunner S, Everard-Gigot V, Stuart RA (2002): Structure of the yeast F1Fo-ATP-Synthase forms homodimers. *J Biol Chem* 277:48484-9.
- Burger G, Gray MW, Lang BF (2003): Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* 19:709-16.
- Burgess SM, Delannoy M, Jensen RE (1994): MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol* 126:1375-91.

- Bustos DM, Velours J (2005): The modification of the conserved GXXXG motif of the membrane-spanning segment of subunit g destabilizes the supramolecular species of yeast ATP-Synthase. *J Biol Chem* 280:29004-10.
- Buzhynskyy N, Sens P, Prima V, Sturgis JN, Scheuring S (2007): Rows of ATP-Synthase dimers in native mitochondrial inner membranes. *Biophys J*.
- Cannon B, Vogel G (1977): The mitochondrial ATPase of brown adipose tissue. Purification and comparison with the mitochondrial ATPase from beef heart. *FEBS Lett* 76:284-9.
- Capaldi RA, Aggeler R (2002): Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP-Synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci* 27:154-60.
- Cervený KL, Studer SL, Jensen RE, Sesaki H. (2007): Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical num1 protein. *Dev Cell*. 12:363-75.
- Chance B, Williams GR (1955): Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J Biol Chem* 217:429-38.
- Chen C, Ko Y, Delannoy M, Ludtke SJ, Chiu W, Pedersen PL (2004): Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP-Synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem* 279:31761-8.
- Cheung EC, McBride HM, Slack RS (2007): Mitochondrial dynamics in the regulation of neuronal cell death. *Apoptosis* 12:979-92.
- Cookson MR, Dauer W, Dawson T, Fon EA, Guo M, Shen J (2007): The roles of kinases in familial Parkinson's disease. *J Neurosci* 27:11865-8.
- Cruciat CM, Brunner S, Baumann F, Neupert W, Stuart RA (2000): The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* 275:18093-8.
- Cyrklaff M, Adrian M, Dubochet J (1990): Evaporation during preparation of unsupported thin vitrified aqueous layers for cryo-electron microscopy. *J Electron Microscop Tech* 16:351-5.
- Daems WT, Wisse E (1966): Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J Ultrastruct Res* 16:123-40.
- Daum G, Bohni PC, Schatz G (1982): Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 257:13028-33.
- Devenish RJ, Prescott M, Roucou X, Nagley P (2000): Insights into ATP-Synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim Biophys Acta* 1458:428-42.
- Doherty GJ, McMahon HT (2009): Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857-902.
- Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P (1988): Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* 21:129-228.

- Dudkina NV, Heinemeyer J, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (2005): Structure of dimeric ATP-Synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett* 579:5769-72.
- Dudkina NV, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP (2006a): Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci* 11:232-40.
- Dudkina NV, Sunderhaus S, Braun HP, Boekema EJ (2006b): Characterization of dimeric ATP-Synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett* 580:3427-32.
- Duncan TM, Zhou Y, Bulygin VV, Hutcheon ML, Cross RL (1995): Probing interactions of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP-Synthase beta and gamma subunits with disulphide cross-links. *Biochem Soc Trans* 23:736-41.
- Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, Chomyn A, Bauer MF, Attardi G, Larsson NG, Neupert W, Reichert AS (2006): Proteolytic Processing of OPA1 Links Mitochondrial Dysfunction to Alterations in Mitochondrial Morphology. *J Biol Chem* 281:37972-37979.
- Egner A, Jakobs S, Hell SW (2002): Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3370-5.
- Eilers M, Patel AB, Liu W, Smith SO (2002): Comparison of helix interactions in membrane and soluble alpha-bundle proteins. *Biophys J* 82:2720-36.
- Exner N, Treske B, Paquet D, Holmstrom K, Schiesling C, Gispert S, Carballo-Carbajal I, Berg D, Hoepken HH, Gasser T, Kruger R, Winklhofer KF, Vogel F, Reichert AS, Auburger G, Kahle PJ, Schmid B, Haass C (2007): Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27:12413-8.
- Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K, De Camilli P (2001): Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* 155:193-200.
- Fawcett DW (1981): Mitochondria. In Saunders WB (ed): "The Cell." Philadelphia.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001): The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1:515-25.
- Frederick RL, McCaffery JM, Cunningham KW, Okamoto K, Shaw JM (2004): Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol* 167:87-98.
- Frederick RL, Okamoto K, Shaw JM (2008): Multiple pathways influence mitochondrial inheritance in budding yeast. *Genetics* 178:825-37.
- Frey TG, Mannella CA (2000): The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25:319-24.

- Frey TG, Renken CW, Perkins GA (2002): Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 1555:196-203.
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L (2006): OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126:177-89.
- Fronzes R, Chaignepain S, Bathany K, Giraud MF, Arselin G, Schmitter JM, Dautant A, Velours J, Brethes D (2003): Topological and Functional Study of Subunit h of the F1Fo ATP-Synthase Complex in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 42:12038-12049.
- Fronzes R, Weimann T, Vaillier J, Velours J, Brethes D (2006): The peripheral stalk participates in the yeast ATP-Synthase dimerization independently of e and g subunits. *Biochemistry* 45:6715-23.
- Gari E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E (1997): A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:837-48.
- Gavin PD, Prescott M, Luff SE, Devenish RJ (2004): Cross-linking ATP-Synthase complexes in vivo eliminates mitochondrial cristae. *J Cell Sci* 117:2333-43.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003): Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425:737-41.
- Gieffers C, Koriath F, Heimann P, Ungermann C, Frey J (1997): Mitofilin is a transmembrane protein of the inner mitochondrial membrane expressed as two isoforms. *Exp Cell Res* 232:395-9.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995): Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355-60.
- Giraud MF, Paumard P, Soubannier V, Vaillier J, Arselin G, Salin B, Schaeffer J, Brethes D, di Rago JP, Velours J (2002): Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP-Synthase and the formation of cristae? *Biochim Biophys Acta* 1555:174-80.
- Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Muller S, Hallberg RL, Schatz G (1992): Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* 69:809-22.
- Goldstein JC, Munoz-Pinedo C, Ricci JE, Adams SR, Kelekar A, Schuler M, Tsien RY, Green DR (2005): Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ* 12:453-62.
- Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR (2000): The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2:156-62.
- Gray MW (1992): The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol* 141:233-357.

- Grumbt B, Stroobant V, Terziyska N, Israel L, Hell K (2007): Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* 282:37461-70.
- Guthrie C, Fink GR (1991): Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol* 194:1-270.
- Habib SJ, Waizenegger T, Lech M, Neupert W, Rapaport D (2005): Assembly of the TOB complex of mitochondria. *J Biol Chem* 280:6434-40.
- Hackenbrock CR (1966): Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30:269-97.
- Hackenbrock CR (1968): Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61:598-605.
- Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS (1986): The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18:331-68.
- Hatefi Y (1985): The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54:1015-69.
- Hegerl R (1996): The EM Program Package: A Platform for Image Processing in Biological Electron Microscopy. *J Struct Biol* 116:30-4.
- Hell K, Herrmann JM, Pratje E, Neupert W, Stuart RA (1998): Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2250-5.
- Hell K, Neupert W, Stuart RA (2001): Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Embo J* 20:1281-8.
- Herlan M, Bornhovd C, Hell K, Neupert W, Reichert AS (2004): Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol* 165:167-73.
- Herlan M, Vogel F, Bornhovd C, Neupert W, Reichert AS (2003): Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 278:27781-8.
- Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J, Shaw JM (1998): Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143:359-73.
- Hobbs AE, Srinivasan M, McCaffery JM, Jensen RE (2001): Mmm1p, a Mitochondrial Outer Membrane Protein, Is Connected to Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleoids and Required for mtDNA Stability. *J Cell Biol* 152:401-10.
- Hoppins S, Horner J, Song C, McCaffery JM, Nunnari J (2009): Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol* 184:569-81.

- Icho T, Ikeda T, Matsumoto Y, Hanaoka F, Kaji K, Tsuchida N (1994): A novel human gene that is preferentially transcribed in heart muscle. *Gene* 144:301-6.
- Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J (2005): Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170:1021-7.
- Jensen RE, Dunn CD (2002): Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta* 1592:25-34.
- John GB, Shang Y, Li L, Renken C, Mannella CA, Selker JM, Rangell L, Bennett MJ, Zha J (2005): The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell* 16:1543-54.
- Karbowski M, Youle RJ (2003): Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10:870-80.
- Kärgel E, Menzel R, Honeck H, Vogel F, Bohmer A, Schunck WH (1996): *Candida maltosa* NADPH-cytochrome P450 reductase: cloning of a full-length cDNA, heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and function of the N-terminal region for membrane anchoring and proliferation of the endoplasmic reticulum. *Yeast* 12:333-48.
- Karlberg O, Canback B, Kurland CG, Andersson SG (2000): The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast* 17:170-87.
- Kemper C, Habib SJ, Engl G, Heckmeyer P, Dimmer KS, Rapaport D (2008): Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J Cell Sci* 121:1990-8.
- Ko YH, Delannoy M, Hüllihen J, Chiu W, Pedersen PL (2003): Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP-Synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem* 278:12305-9.
- Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, Walter P (2009): An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325:477-81.
- Krause F, Reifschneider NH, Goto S, Dencher NA (2005): Active oligomeric ATP-Synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 329:583-90.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ (2004): Roles of the Mammalian mitochondrial fission and fusion mediators fis1, drp1, and opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15:5001-11.
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M (2004): The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119:873-87.

- Lill R, Muhlenhoff U (2006): Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:457-86.
- Lindberg O, de Pierre J, Rylander E, Afzelius BA (1967): Studies of the mitochondrial energy-transfer system of brown adipose tissue. *J Cell Biol* 34:293-310.
- Loncar D (1990): Immunoelectron microscopical studies on synthesis and localization of uncoupling protein in brown adipocytes: evidence for cotranslational transport of uncoupling protein into mitochondria. *J Struct Biol* 105:133-45.
- Magi B, Ettore A, Liberatori S, Bini L, Andreassi M, Frosali S, Neri P, Pallini V, Di Stefano A (2004): Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death Differ* 11:842-52.
- Mannella CA (2006): The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* 1762:140-7.
- Mannella CA, Marko M, Buttle K (1997): Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci* 22:37-8.
- Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J (1994): The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech* 27:278-83.
- Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC, Moraru, II, Slepchenko B, Loew LM, Hsieh CE, Buttle K, Marko M (2001): Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* 52:93-100.
- Manor JC, Salamon P, Nulton J, Mahaffy JM, Baljon AR, Frey TG (2006): Membrane Remodeling and Diffusion of Cytochrome C from a Geometrically Idealized Mitochondrial Crista. In Arabnia HR, Valafar H (eds): "The 2006 International Conference on Bioinformatics & Computational Biology." Las Vegas, USA: CSREA Press, pp 310-314.
- Margulis L (1971): Symbiosis and evolution. *Sci Am* 225:48-57.
- Meeusen S, DeVay R, Block J, Cassidy-Stone A, Wayson S, McCaffery JM, Nunnari J (2006): Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127:383-95.
- Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J (2004): Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305:1747-52.
- Meisinger C, Pfannschmidt S, Rissler M, Milenkovic D, Becker T, Stojanovski D, Youngman MJ, Jensen RE, Chacinska A, Guiard B, Pfanner N, Wiedemann N (2007): The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major beta-barrel assembly pathway of mitochondria. *Embo J* 26:2229-39.
- Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Lower B, Wunderlich FT, von Kleist-Retzow JC, Waisman A, Westermann B, Langer T (2008): Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev* 22:476-488.

- Merkwirth C, Langer T (2009): Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1793:27-32.
- Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM (2005): A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121:1059-69.
- Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, Garcia JJ (2005): Structure of dimeric mitochondrial ATP-Synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12356-8.
- Mitchell P (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-8.
- Mokranjac D, Neupert W (2009): Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta* 1793:33-41.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73.
- Munn EA (1974): "The structure of mitochondria." London, New York: Academic Press.
- Myung JK, Gulesserian T, Fountoulakis M, Lubec G (2003): Deranged hypothetical proteins Rik protein, Nit protein 2 and mitochondrial inner membrane protein, Mitofilin, in fetal Down syndrome brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49:739-46.
- Nass S, Nass MM (1963): Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *J Cell Biol* 19:613-29.
- Nicastro D, Frangakis AS, Typke D, Baumeister W (2000): Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria. *J Struct Biol* 129:48-56.
- Nickell S, Forster F, Linaroudis A, Net WD, Beck F, Hegerl R, Baumeister W, Plitzko JM (2005): TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography. *J Struct Biol* 149:227-34.
- Nunnari J, Marshall WF, Straight A, Murray A, Sedat JW, Walter P (1997): Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* 8:1233-42.
- O'Connell K, Ohlendieck K (2009): Proteomic DIGE analysis of the mitochondria-enriched fraction from aged rat skeletal muscle. *Proteomics* 9:5509-5524.
- Odgren PR, Toukatly G, Bangs PL, Gilmore R, Fey EG (1996): Molecular characterization of mitofilin (HMP), a mitochondria-associated protein with predicted coiled coil and intermembrane space targeting domains. *J Cell Sci* 109 (Pt 9):2253-64.
- Okamoto K, Shaw JM (2005): Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39:503-36.

- Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G (2003): Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278:7743-7746.
- Olichon A, Guillou E, Delettre C, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Daloyau M, Hamel C, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Lenaers G, Belenguer P (2006): Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim Biophys Acta* 1763:500-9.
- Omori A, Ichinose S, Kitajima S, Shimotohno KW, Murashima YL, Shimotohno K, Seto-Ohshima A (2002): Gerbils of a seizure-sensitive strain have a mitochondrial inner membrane protein with different isoelectric points from those of a seizure-resistant strain. *Electrophoresis* 23:4167-74.
- Palade G (1953): An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1:188-211.
- Palade GE (1952): The fine structure of mitochondria. *Anat Rec* 114:427-51.
- Paschen SA, Neupert W, Rapaport D (2005): Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem Sci.*
- Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W (2003): Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 426:862-6.
- Pauling L, Corey RB (1953): Compound helical configurations of polypeptide chains: structure of proteins of the alpha-keratin type. *Nature* 171:59-61.
- Paumard P, Arselin G, Vaillier J, Chaignepain S, Bathany K, Schmitter JM, Brethes D, Velours J (2002a): Two ATP-Synthases can be linked through subunits i in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 41:10390-6.
- Paumard P, Vaillier J, Coulary B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J (2002b): The ATP-Synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Embo J* 21:221-30.
- Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T (1997): Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* 119:260-72.
- Perkins GA, Ellisman MH, Fox DA (2003): Three-dimensional analysis of mouse rod and cone mitochondrial cristae architecture: bioenergetic and functional implications. *Mol Vis* 9:60-73.
- Perkins GA, Song JY, Tarsa L, Deerinck TJ, Ellisman MH, Frey TG (1998): Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions. *J Bioenerg Biomembr* 30:431-42.
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74:595-636.

- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Seraphin B (2001): The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24:218-29.
- Rak M, Tetaud E, Godard F, Sagot I, Salin B, Duvezin-Caubet S, Slonimski PP, Rytka J, di Rago JP (2007): Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP-Synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282:10853-64.
- Reichert AS, Neupert W (2002): Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1592:41.
- Renken C, Siragusa G, Perkins G, Washington L, Nulton J, Salamon P, Frey TG (2002): A thermodynamic model describing the nature of the crista junction: a structural motif in the mitochondrion. *J Struct Biol* 138:137-44.
- Revel JP, Fawcett DW, Philpott CW (1963): Observations on mitochondrial structure angular configurations of the cristae. *J Cell Biol* 16:187-95.
- Roberts EA, Robinson BH, Yang S (2008): Mitochondrial structure and function in the untreated Jackson toxic milk (tx-j) mouse, a model for Wilson disease. *Mol Genet Metab* 93:54-65.
- Rothstein RJ, Sherman F (1980): Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics* 94:871-89.
- Rubinstein JL, Walker JE, Henderson R (2003): Structure of the mitochondrial ATP-Synthase by electron cryomicroscopy. *Embo J* 22:6182-92.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7.
- Saraste M (1999): Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283:1488-93.
- Sato A, Nakada K, Hayashi J (2006): Mitochondrial dynamics and aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochim Biophys Acta* 1763:473-81.
- Schägger H (2006): Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1:16-22.
- Schägger H, Pfeiffer K (2000): Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 19:1777-83.
- Schägger H, von Jagow G (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-79.

- Schägger H, von Jagow G (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199:223-31.
- Scheffler (2007): "Mitochondria Second Edition." Viley-Liss.
- Schlame M (2007): Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res.*
- Schmid EM, Ford MG, Burtey A, Praefcke GJ, Peak-Chew SY, Mills IG, Benmerah A, McMahon HT (2006): Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* 4:e262.
- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ (2002): A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2:55-67.
- Senior AE, Nadanaciva S, Weber J (2002): The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP-Synthase. *Biochim Biophys Acta* 1553:188-211.
- Sesaki H, Jensen RE (1999): Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol* 147:699-706.
- Sesaki H, Jensen RE (2001): UGO1 Encodes an Outer Membrane Protein Required for Mitochondrial Fusion. *J Cell Biol* 152:1123-34.
- Sesaki H, Jensen RE (2004): Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* 279:28298-303.
- Sesaki H, Southard SM, Hobbs AE, Jensen RE (2003a): Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 308:276-83.
- Sesaki H, Southard SM, Yaffe MP, Jensen RE (2003b): Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 14:2342-56.
- Setoguchi K, Otera H, Mihara K (2006): Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *Embo J* 25:5635-47.
- Shepard KA, Yaffe MP (1999): The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J Cell Biol* 144:711-20.
- Shibata Y, Voeltz GK, Rapoport TA (2006): Rough sheets and smooth tubules. *Cell* 126:435-9.
- Sjostrand FS (1953): Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* 171:30-2.
- Sodek J, Hodges RS, Smillie LB, Jurasek L (1972): Amino-acid sequence of rabbit skeletal tropomyosin and its coiled-coil structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:3800-4.

- Sogo LF, Yaffe MP (1994): Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 126:1361-73.
- Soubannier V, Vaillier J, Paumard P, Couлары B, Schaeffer J, Velours J (2002): In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit 4(b), the yeast ATP-Synthase is functional but does not dimerize or oligomerize. *J Biol Chem* 277:10739-45.
- Stock D, Leslie AG, Walker JE (1999): Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP-Synthase. *Science* 286:1700-1705.
- Strauss M, Hofhaus G, Schroder RR, Kuhlbrandt W (2008): Dimer ribbons of ATP-Synthase shape the inner mitochondrial membrane. *Embo J* 27:1154-60.
- Stroh A, Anderka O, Pfeiffer K, Yagi T, Finel M, Ludwig B, Schägger H (2004): Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* 279:5000-7.
- Suh SK, Hood BL, Kim BJ, Conrads TP, Veenstra TD, Song BJ (2004): Identification of oxidized mitochondrial proteins in alcohol-exposed human hepatoma cells and mouse liver. *Proteomics* 4:3401-12.
- Sun MG, Williams J, Munoz-Pinedo C, Perkins GA, Brown JM, Ellisman MH, Green DR, Frey TG (2007): Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol* 9:1057-72.
- Tatsuta T, Model K, Langer T (2005): Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol Biol Cell* 16:248-59.
- Taylor SW, Fahy E, Murray J, Capaldi RA, Ghosh SS (2003): Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 278:19587-90.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80.
- Tokuyasu KT (1989): Use of poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinyl alcohol) for cryoultramicrotomy. *Histochem J* 21:163-71.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4.
- Van Laar VS, Dukes AA, Cascio M, Hastings TG (2008): Proteomic analysis of rat brain mitochondria following exposure to dopamine quinone: implications for Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 29:477-89.
- Van Laar VS, Mishizen AJ, Cascio M, Hastings TG (2009): Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis* 34:487-500.

- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008): Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112-24.
- Velours J, Arselin G (2000): The *Saccharomyces cerevisiae* ATP-Synthase. *J Bioenerg Biomembr* 32:383-90.
- Velours J, Dautant A, Salin B, Sagot I, Brethes D (2009): Mitochondrial F1F0-ATP-Synthase and organellar internal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1783-9.
- Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA (2006): A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* 124:573-86.
- Vogel F, Bornhövd C, Neupert W, Reichert AS (2006): Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175:237-47.
- Wach A, Brachat A, Alberti-Segui C, Rebischung C, Philippsen P (1997): Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:1065-75.
- Waizenegger T, Habib SJ, Lech M, Mokranjac D, Paschen SA, Hell K, Neupert W, Rapoport D (2004): Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep* 5:704-9.
- Waizenegger T, Stan T, Neupert W, Rapoport D (2003): Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. *J Biol Chem*.
- Weihofen A, Thomas KJ, Ostaszewski BL, Cookson MR, Selkoe DJ (2009): Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 48:2045-52.
- Westermann B (2008): Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem* 283:13501-5.
- Westermann B, Neupert W (2000): Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16:1421-7.
- Wittig I, Carozzo R, Santorelli FM, Schägger H (2006): Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1757:1066-72.
- Wittig I, Schägger H (2005): Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5:4338-46.
- Wittig I, Schägger H (2008): Structural organization of mitochondrial ATP-Synthase. *Biochim Biophys Acta* 1777:592-8.
- Wittig I, Velours J, Stuart R, Schägger H (2008): Characterization of domain-interfaces in monomeric and dimeric ATP-Synthase. *Mol Cell Proteomics*.
- Wong ED, Wagner JA, Scott SV, Okreglak V, Holewinski TJ, Cassidy-Stone A, Nunnari J (2003): The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 160:303-11.

Wurm CA, Jakobs S (2006): Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett* 580:5628-34.

Xie J, Marusich MF, Souda P, Whitelegge J, Capaldi RA (2007): The mitochondrial inner membrane protein Mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS Lett* 581:3545-9.

Xu Y, Condell M, Plesken H, Edelman-Novemsky I, Ma J, Ren M, Schlame M (2006): A *Drosophila* model of Barth syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11584-8.

Yaffe MP, Schatz G (1984): Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4819-23.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997): Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129-32.

Yi M, Weaver D, Hajnoczky G (2004): Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol* 167:661-72.

Zick M, Rabl R, Reichert AS (2009): Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1793:5-19.

Zimmerberg J, Kozlov MM (2006): How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:9-19.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Zick M, Rabl R, Reichert AS (2009): Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1793:5-19.

Rabl R, Soubannier V, Scholz R, Vogel F, Mendl N, Vasiljev-Neumeyer A, Korner C, Jagasia R, Keil T, Baumeister W, Cyrklaff M, Neupert W, Reichert AS (2009): Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. *J Cell Biol* 185:1047-63.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMS	4-Acetamido-4'-maleimidylstilben-2,2'-disulfonat
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BN-PAGE	Blau Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-amino- <i>tris</i> -(hydroxymethyl)-methan
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CCD	<i>charge coupled device</i>
CJ	Crista Junction
Cyt c	Cytochrom c
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnm	<i>dynamamin-related</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fcjl	<i>formation of crista junction protein 1</i>
Fzo	<i>fuzzy onions</i>
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HeLa-Zellen	Epithelzellen eines Zervixcarzinoms der Patientin Henrietta Lacks

HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HS	HEPES-Sorbitol
IM	Innenmembran
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
mA	Milliampère
MBS	m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester
MD	Megadalton
Mgm1	<i>mitochondrial genome maintenance protein 1</i>
min	Minute
µm	Mikrometer
mtDNA	mitochondriale DNA
nm	Nanometer
MW	<i>molecular weight</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
OD	Optische Dichte
OLR	Offener Leserahmen
OPA1	<i>optic atrophy 1</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PHB	Prohibitin
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rho ⁰	Zellen ohne mtDNA
Rho ⁻	Zellen, deren mtDNA Deletionen aufweist
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
ROS	<i>reactive oxygene species</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Su e	Untereinheit e der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
Su g	Untereinheit g der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase
T	Thymin
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIM	<i>translocase of the inner membrane of mitochondria</i>
TOB	<i>topogenesis of mitochondrial outer membrane β-barrel proteins</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Ugo	Japanisch für ‘Fusion’
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen. Ich habe an seinem Institut nicht nur auf wissenschaftlicher Ebene sehr viel gelernt. Sein Interesse an meiner Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft haben mich immer wieder motiviert und mir wertvolle Denkanstöße gegeben.

Prof. Dr. Jürgen Soll danke ich für seine Bereitschaft, meine Dissertation vor der Fakultät für Biologie zu vertreten.

Prof. Dr. Andreas Reichert danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und die gute Zusammenarbeit. Das interessante Projekt, das er mir überließ, die Freiheiten, die ich bei dessen Bearbeitung hatte, und meine vom ihm initiierten Aufenthalte in Frankfurt und Berlin zur Erweiterung meines Methodenspektrums trugen dazu bei, dass meine Promotionszeit immer abwechslungsreich blieb. Auch die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe hat mir großen Spaß gemacht.

Bei Gabriele Ludwig und Simone Grau möchte ich mich ganz herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Bearbeitung meines Projekts bedanken.

Meinen Kollegen Anja, Nadine, Carsten, Stéphane, Michael, Magdalena, Christian, Simone, Gabi, Christiane, Iris und Ilona aus dem Reichert-Labor und meiner Bench-Nachbarin Ulrike danke ich für eine gute Zeit im Labor und auch außerhalb, viel Spaß, die nette Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft. Ich habe mich bei Euch in der Arbeitsgruppe immer sehr wohlgefühlt. Bei Dr. Vincent Soubannier bedanke ich mich für die Einführung ins Ymf/Fcjl-Projekt. Ganz besonders danke ich Anja, Nadine und Bernadette für ihre Freundschaft und Unterstützung, unsere Tee-Pausen, fürs Zuhören, Verstehen und für ihre guten Ratschläge in Arbeits- und privaten Dingen.

Herzlichen Dank an das ganzen Neupert-Labor für die vielen netten Gespräche und wissenschaftlichen Diskussionen, durch die ich in den letzten Jahren viel gelernt habe. Bei Problemen jeder Art fand ich immer ein offenes Ohr und Menschen, die bereit waren, mir mit Erfahrungen, Ratschlägen und Arbeitsmaterialien weiterzuhelfen. Frau Hauck und ganz besonders Christine Werner gilt mein herzlicher Dank für ihre Hilfe und Unterstützung in

allen organisatorischen Dingen. Frau Reisenauer, Regina und Mariane danke ich für die Erleichterung des Laboralltags und den Luxus immer frisch gespülter Laborgefäße und Kaffeetassen. Peter Reiser und Gerd Fried danke ich für die Lösung von technischen Problemen jeder Art. Marica danke ich für ihre Unterstützung bei der Herstellung von Hefemedien und bei den vielen Mitopreps.

Insbesondere danke ich auch Dr. Frank Vogel für eine gute Zusammenarbeit, stapelweise EM-Bilder und dafür, dass er selbst im Ruhestand noch bereit war, mich in die Geheimnisse der Elektronenmikroskopie einzuführen.

Mein Dank für eine gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der EM-Tomographie gilt Dr. Marek Cyrklaff.

Bei Prof. Dr. Herrmann Schägger bedanke ich dafür, dass ich in seiner Arbeitsgruppe die Methode der Nativgel-Elektrophorese erlernen durfte; Dr. Ilka Wittig und Christian Bach danke ich für ihre Zeit, Begeisterung und Unterstützung während der beiden ‚Nativgel-Wochen‘ in Frankfurt.

Meinen Schwestern Christine und Sabine und meinen Freunden danke ich fürs Da-Sein und zeitweise für die Erinnerung, dass es noch ein Leben außerhalb des Labors gibt.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und ihren Glauben an mich. Ohne sie wäre ich nicht, wer ich jetzt bin.

Meinem Mann Matthias danke ich für seine Unterstützung in den letzten Jahren, seine Geduld und sein Verständnis, wenn es mal wieder später wurde und für überhaupt alles. Dir und unserer Tochter Klara widme ich diese Arbeit.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Regina Steck, geb. Rabl
geboren am 12. März 1979
in Gunzenhausen

SCHULBILDUNG

Besuch der Stephanie-Grundschule, Gunzenhausen	1985 – 1989
Besuch des Simon-Marius-Gymnasium, Gunzenhausen	1989 – 1998
Abitur am Simon-Marius-Gymnasium, Gunzenhausen	1998

HOCHSCHULBILDUNG

Studium der Biologie an der Universität Regensburg	1998 – 2004
Auslandsstudienjahr an der Universität Nantes, Frankreich	2000 – 2001
Diplomhauptprüfung	2003
Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Susanne Modrow am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Regensburg	2003 – 2004
Anstellung am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Regensburg	2004 – 2005
Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Reichert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München	2005