

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Charakterisierung von strukturgebenden  
Proteinen der Mitochondrien**

Christian Bruno Körner

aus Zwiesel

2011

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert betreut und von Herrn Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 28.10.2011

.....

Dissertation eingereicht am: 28.10.2011

1.Gutachter: Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner

2.Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Mündliche Prüfung am: 02.12.2011

**Meinen Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Mitochondrien – Funktion und Ursprung.....	1
1.2 Proteinimport in Mitochondrien.....	1
1.2.1 Die Translokasen der Außenmembran.....	2
2.2.2 Die Translokasen der Innenmembran.....	3
1.3 Lipidmetabolismus und interorganeller Kontakt: Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum (ER) .....	4
1.4 Morphologie und Dynamik von Mitochondrien .....	6
1.5 Kontaktstellen zwischen Innen- und Außenmembran.....	7
1.6 Architektur der Mitochondrien.....	9
1.7 Cristae-Morphologie und Bioenergetik.....	10
1.8 Einfluss der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP-Synthase auf die Architektur der Cristamembran .....	11
1.9 Mitofilin und Fcjl sind für die Ausbildung von Crista Junctions notwendig.....	12
1.10 Fcjl ist an den CJ angereichert und beeinflusst direkt die Ausbildung von CJs.....	15
1.11 Fcjl und Su <i>e/g</i> haben einen antagonistischen Effekt auf die Bildung von Cristae und CJ.....	16
1.12 Zielsetzung der Arbeit .....	17
2 Material und Methoden .....	18
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	18
2.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	19
2.1.3 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	20
2.1.4 Restriktionsverdau von DNA .....	21
2.1.5 Agarosegelelektrophorese .....	21
2.1.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	21
2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	22
2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren .....	22
2.1.9 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen .....	22
2.1.9.1 Präparation von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen .....	22
2.1.9.2 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation .....	23
2.1.10 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen .....	23

2.1.11 DNA-Sequenzierung .....	24
2.1.12 Verwendete Vektoren und Klonierungsstrategien .....	24
2.1.12.1 Verwendete Primer zur Klonierung des Vektors pGEX-6P-1-Fcj1473-540 zur Expression von Fcj1-Konstrukten in <i>E. coli</i> .....	25
2.1.12.2 Klonierungsstrategien für Vektoren zur Expression in <i>E. coli</i> .....	26
2.1.12.3 Verwendete Primer zur Klonierung von Plasmiden zur Expression von Fcj1- Mutanten in <i>S. cerevisiae</i> .....	26
2.1.12.4 Klonierungsstrategien für Vektoren zur Expression von Fcj1-Mutanten in <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> .....	27
2.2 Methoden der Hefegenetik .....	29
2.2.1 Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i> .....	29
2.2.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	30
2.2.3 Analyse des Wachstumsphänotyps auf fermentierbarer und nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle .....	30
2.3 Zellbiologische Methoden.....	30
2.3.1 Gesamtproteinpräparation aus <i>S. cerevisiae</i> durch alkalische Lyse.....	30
2.3.2 Präparation von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	31
2.3.3 Subfraktionierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	32
2.3.4 Digitoninfraktionierung von Hefemitochondrien.....	33
2.3.5 Alkalische Extraktion von Proteinen aus mitochondrialen Membranen.....	33
2.3.6 Membranflotation.....	34
2.3.7 Fluoreszenzmikroskopie.....	34
2.3.8 Chemische Fixierung von Hefezellen .....	35
2.3.8.1 Chemische Fixierung von Hefezellen zur cryoelektronenmikroskopischen Untersuchung .....	35
2.3.8.2 Chemische Fixierung von Hefezellen zur Einbettung in Kunstharz .....	36
2.3.9 Elektronenmikroskopie .....	36
2.3.9.1 Cryoelektronenmikroskopie .....	36
2.3.9.2 Elektronenmikroskopie von in Kunstharz eingebetteten Hefezellen .....	37
2.4 Methoden der Proteinbiochemie .....	37
2.4.1 Expression von GST-Fcj1473-540 in <i>E. coli</i> .....	37
2.4.2 Aufreinigung von GST-Fcj1473-540 .....	38
2.4.3 Größenausschlusschromatographie von GST-Fcj1473-540.....	38
2.4.4 Affinitätsreinigung an GST-Fcj1473-540 .....	39

2.4.5	Affinitätsfällung mittels Ni-NTA-Agarose .....	40
2.4.6	Größenausschlusschromatographie von lysierten Mitochondrien .....	40
2.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) .....	41
2.4.8	Coomassie-Färbung von Gelen .....	42
2.4.9	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen	42
2.4.10	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
2.4.11	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA).....	43
2.4.12	Immundetektion von Proteinen .....	43
2.4.13	Immundetektion von Proteinen mit käuflich erworbenem His-Antikörper .....	44
2.5	Puffer und Medien.....	45
2.6	Chemikalien und Geräte .....	46
2.6.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	46
2.6.2	Geräte .....	48
3	Ergebnisse .....	51
3.1	Funktionsanalyse einzelner Domänen des Fcj1-Proteins.....	51
3.1.1	Übersicht Konstrukte.....	51
3.1.2	Expression der Fcj1-Konstrukte.....	52
3.1.3	Lokalisation und Membranassoziation der Fcj1-Varianten .....	53
3.1.4	Die konservierte C-terminale-Domäne ist notwendig für Wachstum in nicht fermentierbarem Medium.....	56
3.1.5	Die Coiled-Coil-Domäne von Fcj1 und die C-terminale Domäne sind für die Ausbildung von CJs wichtig .....	57
3.1.6	Die C-terminale Domäne von Fcj1 ist für den dominant negativen Effekt verantwortlich, der bei Überexpression von Fcj1 in einer $\Delta su e$ Mutante beobachtet wird .....	59
3.1.7	Die Verankerung in der Innenmembran ist essentiell für die Funktion von Fcj1 ...	59
3.1.7.1	Fcj1 <sub>Cytb2</sub> wird von Imp1 prozessiert .....	59
3.1.7.2	Fcj1 <sub>Cytb2</sub> ist mit der Innenmembran assoziiert.....	61
3.1.7.3	Die Verankerung von Fcj1 in der Innenmembran durch die TMD ist wichtig für das Zellwachstum .....	62
3.1.7.4	Der Proteinlevel von Fcj1 <sub>Cytb2</sub> ist in Laktat-Medium vermindert.....	63
3.1.7.5	Einfluss von Fcj1 <sub>Cytb2</sub> auf die mitochondriale Ultrastruktur .....	64
3.1.8	Einfluss der Expression der untersuchten Fcj1-Varianten auf die mitochondriale Morphologie .....	64

3.2 Charakterisierung der C-terminalen Domäne (Aminosäurereste 473-540) von Fcj1 ....	67
3.2.1 Fcj1 <sup>473-540</sup> bildet Homooligomere .....	67
3.2.2 Die C-terminale Domäne von Fcj1 interagiert mit Tob55 .....	70
3.2.3 Die Proteinlevel von Fcj1 und Tob55 sind nicht voneinander abhängig .....	72
3.3 Fcj1 bildet stabile Kontaktstellen zur Außenmembran über Tob55.....	73
3.4 Der MICOS-Komplex .....	76
3.4.1 Kontaktstellenproteine bilden einen hochmolekularen Komplex .....	77
3.4.2 Bestimmung der Stöchiometrie von Fcj1 zu den Mcs-Proteinen.....	78
3.4.3 Mcs10 geht homotypische Interaktionen ein .....	79
3.4.4 Die Proteinlevel der Mcs-Proteine und Fcj1 sind voneinander abhängig.....	80
3.4.5 Deletion der einzelnen Mcs-Proteine und von Fcj1 führt zur Destabilisierung des MICOS I- und II-Komplexes .....	81
3.4.6 Deletion der einzelnen Komplexuntereinheiten führt zu Veränderung der mitochon- drialen Ultrastruktur .....	83
4 Diskussion .....	87
4.1 Funktionsanalyse der einzelnen Domänen von Fcj1 .....	87
4.2 Mögliche Bedeutung der Fcj1-TOB-Interaktion.....	89
4.3 Der MICOS-Komplex und die mitochondriale Architektur der Mitochondrien.....	92
5 Zusammenfassung .....	95
6 Literaturverzeichnis.....	97
7 Abkürzungsverzeichnis .....	108
Danksagung .....	112
Lebenslauf .....	114

## **1 Einleitung**

### **1.1 Mitochondrien – Funktion und Ursprung**

Die eukaryotische Zelle enthält eine Reihe von verschiedenen membranumschlossenen Kompartimenten (Organellen) zur Organisation unterschiedlicher Stoffwechselprozesse. Diese Organellen sind entweder von einer (z.B. endoplasmatisches Retikulum, Peroxisomen und Lysosomen) oder von zwei Membranen (Zellkern, Mitochondrium und in Pflanzen die Chloroplasten) umschlossen.

Mitochondrien sind für eine Vielzahl von verschiedenen Funktionen zuständig; eine wichtige davon ist die oxidative Phosphorylierung, bei der ATP, der Hauptträger für die Energie der meisten zellulären Prozesse, bereitgestellt wird (Saraste, 1999). Neben der ATP-Synthese spielt noch eine Vielzahl weiterer Stoffwechselprozesse in den Mitochondrien eine wichtige Rolle. Dazu zählen die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern (Muhlenhoff und Lill, 2000), der Abbau von Fettsäuren und die Häm-Biosynthese (Scheffler, 2001). In höheren Eukaryoten konnte ebenso eine Regulation des programmierten Zelltodes, der Apoptose, durch Mitochondrien beobachtet werden (Bernardi et al., 1999).

Die wahrscheinlichste Theorie, welche den Ursprung der Mitochondrien beschreibt, ist die Endosymbionten-Theorie (Gray et al., 1999): Nach dieser sind Mitochondrien durch Endosymbiose von gramnegativen Bakterien mit anaerob lebenden Vorläuferzellen entstanden. Diese Theorie wird insbesondere dadurch gestützt, dass Mitochondrien wie Bakterien eine Doppelmembran (Innen- und Außenmembran) besitzen. Außerdem sind Mitochondrien Träger einer DNA, die für die Codierung einiger weniger mitochondrialer Proteine zuständig ist. Diese DNA ist der Rest des ursprünglichen, bakteriellen Genoms. Im Laufe der Evolution wurde der Großteil der DNA in den Zellkern der Wirtszelle transferiert. Anhand dieses Restgenoms konnten durch Sequenzvergleich  $\alpha$ -Proteobakterien als mögliche Vorläufer der Mitochondrien identifiziert werden.

### **1.2 Proteinimport in Mitochondrien**

Nur ein sehr geringer Teil der mitochondrialen Proteine wird in den Mitochondrien selbst kodiert und in diesen durch ein eigenes Transkriptions- und Translationssystem synthetisiert. So sind nahezu alle der etwa 1000 mitochondrialen Proteinen aus *S. cerevisiae* im Zellkern und dagegen nur acht Proteine im Mitochondrium kodiert (Prokisch et al., 2004; Reichert und Neupert, 2004; Sickmann et al., 2003). Die außerhalb des Mitochondriums



synthetisierten Proteine werden je nach entsprechender Sublokalisierung nach der Translation an cytosolischen Ribosomen durch diverse Translokasen zu dem entsprechenden Zielsubkompartiment transportiert (Zur Übersicht siehe (Mokranjac und Neupert, 2009; Schmidt et al., 2010)). Bislang wurden sechs verschiedene Translokasen identifiziert: Zwei Translokasen sind in der Außenmembran lokalisiert: Zum einen der TOM-Komplex („*t*ranslocase of the *o*uter *m*embrane“), zum anderen der TOB-Komplex („*t*opogenesis of mitochondrial *o*uter membrane *b*eta-barrel proteins“). Drei Translokasen sind in der Innenmembran lokalisiert: Der TIM23 und der TIM22-Komplex („*t*ranslocases of the *i*nnner *m*embrane“) und der Oxa1-Komplex („*c*ytochrome *c*-*o*xidase *a*ssembly 1“). Außerdem wurde im Intermembranraum noch das Mia40 (*m*itochondrial *i*ntermembrane space import and *a*ssembly)/Erv1-System identifiziert.

### 1.2.1 Die Translokasen der Außenmembran

Am Import fast aller kernkodierter mitochondrialer Proteine ist der TOM-Komplex beteiligt, der in *S. cerevisiae* aus sieben bisher bekannten Untereinheiten besteht. Von der Kernkomponente Tom40 werden durch Homooligomerisation zwei bis drei Poren gebildet, die mit einem Durchmesser von ca 22Å groß genug sind, Proteine im entfalteten Zustand passieren zu lassen (Hill et al., 1998; Kunkele et al., 1998). Weitere Untereinheiten sind die Rezeptoren Tom70, Tom22 und Tom20 und die kleineren Proteine Tom5, Tom6 und Tom7 (Neupert und Herrmann, 2007; Schmidt et al., 2010). Vorstufenproteine mit N-terminalen Signalsequenzen werden von Tom20 erkannt, wohingegen hydrophobe Vorstufenproteine mit internen Signalsequenzen von Tom70 erkannt werden. Anschließend werden diese Vorstufenproteine an Tom22 übertragen, von wo sie dann dem TOM-Kernkomplex zugeführt und über die Außenmembran importiert werden. Die kleinen TOM-Proteine Tom5, Tom6 und Tom7 haben wahrscheinlich Assemblierungs- und Stabilisierungsfunktionen (Dembowski et al., 2001; Model et al., 2001; Schmitt et al., 2005).

Der TOB-Komplex, bestehend aus den Untereinheiten Tob55, Tob38 und Mas37, ist für die Insertion von  $\beta$ -Barrel-Proteinen in die Außenmembran zuständig (Ishikawa et al., 2004; Kozjak et al., 2003; Paschen et al., 2003; Waizenegger et al., 2004; Wiedemann et al., 2003). Die Komponente Tob55 ist selbst ein  $\beta$ -Barrel-Protein und homolog zu Omp85, dessen Funktion die Insertion von  $\beta$ -Barrel-Proteinen in die Außenmembran von gramnegativen Bakterien ist (Voulhoux et al., 2003). Die Vorstufen dieser  $\beta$ -Barrel-Proteine werden zuerst durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum transloziert, wo sie mit kleinen Tim-Proteinen interagieren, die eine Chaperon ähnliche Eigenschaft besitzen (Hoppins und

Nargang, 2004; Wiedemann et al., 2004). Anschließend gelangen die  $\beta$ -Barrel-Proteine zum TOB-Komplex, mit Hilfe dessen sie in die Außenmembran inseriert werden. Neben der Insertion von  $\beta$ -Barrel-Proteinen wurde der TOB-Komplex auch als Translokase für die Biogenese von  $\alpha$ -helikalen TOM-Untereinheiten diskutiert (Stojanovski et al., 2007).

Außer den drei Hauptkomponenten des TOB-Komplexes wurde in *S. cerevisiae* ein Einfluss auf die Assemblierung von  $\beta$ -Barrel-Proteinen durch vier weitere Proteine berichtet: Mdm12 und Mmm1 sind für die Assemblierung aller  $\beta$ -Barrels notwendig (Meisinger et al., 2007), während Mdm10 (Meisinger et al., 2004) und Mim1 (Ishikawa et al., 2004; Waizenegger et al., 2005) spezifisch an der Assemblierung von Tom40 beteiligt sind. Bislang konnte allerdings lediglich für Mdm10 eine direkte Interaktion mit dem TOB-Komplex nachgewiesen werden. Tom7, eine konservierte Untereinheit des TOM-Komplexes, löst die Interaktion von Mdm10 mit dem TOB-Komplex und hat somit regulatorische Eigenschaften in der Assemblierung von  $\beta$ -Barrel-Proteinen (Becker et al., 2011).

Ursprünglich wurden Mdm10, Mdm12 und Mmm1 als Proteine beschrieben, die notwendig für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie sind (Sogo und Yaffe, 1994). Hefezellen zeigen stark vergrößerte Mitochondrien, wenn eine dieser Komponenten deletiert ist. Dieser Phänotyp ist von einem Wachstumsdefizit begleitet. Nachgewiesen wurden diese drei Proteine als ein Komplex, der in die Segregation mitochondrialer DNA (mtDNA) involviert ist (Boldogh et al., 2003). Kürzlich wurden diese Komponenten zusammen mit dem mitochondrialen Außenmembranprotein Mdm34 als ein Komplex beschrieben, welcher für den Kontakt zwischen Mitochondrium und endoplasmatischem Retikulum notwendig ist (Kornmann et al., 2009) (siehe 1.3).

### **2.2.2 Die Translokasen der Innenmembran**

Der TIM23-Komplex transportiert Proteine, die für zwei verschiedene Zielkompartimente bestimmt sind: zum einen Matrixproteine und zum anderen Transmembranproteine mit nur einer Transmembrandomäne (TMD). Letztere weisen nach der Signalsequenz eine hydrophobe Sequenz auf, die den Transfer durch den TIM23-Komplex stoppt und für die anschließende laterale Insertion des Proteins in die Innenmembran verantwortlich ist. Dieser Prozess wird als Stop-Transfer-Prozess beschrieben (Glick et al., 1992). Der Transport über die Innenmembran in die Matrix ist abhängig vom Membranpotential. Außerdem ist für den kompletten Transport des Proteins der ATP abhängige Importmotor notwendig, dessen Hauptkomponente das in der Matrix lokalisierte Hsp70 (Ssc1 in *S. cerevisiae*) ist (Krayl et al., 2007; Martin et al., 1991; Neupert und Brunner, 2002). Polytope Innenmembranproteine, die

über mehrere hydrophobe Bereiche verfügen, werden über die TIM22 Translokase in Abhängigkeit vom Membranpotential in die Innenmembran der Mitochondrien inseriert (Rehling et al., 2003; Sirrenberg et al., 1996). Beispiele für TIM22-Substrate sind Carrier-Proteine sowie Tim17, Tim23 und Tim22 selbst (Endres et al., 1999; Jensen und Dunn, 2002; Sirrenberg et al., 1996). Die OXA-Translokase inseriert Membranproteine von der Matrixseite aus in die Innenmembran. Substrate sind sowohl kern- wie auch mitochondrial kodierte Proteine (Hell et al., 1998; Hell et al., 2001). Diese Translokase besteht aus dem konservierten Protein Oxa1, das in allen Organismen von Bakterien bis hin zu den höheren Eukaryoten vorkommt. (Herrmann et al., 1997). Kernkodierte Proteine werden zuerst wie oben beschrieben vom TIM23-Komplex in die Matrix transportiert und anschließend über die OXA-Translokase aus der Matrix heraus in die Innenmembran exportiert. Dieser Prozess gleicht demjenigen, der in Bakterien vom Oxa1-Homologen YidC vermittelt wird. Man spricht daher von einem konservierten Sortierungsweg (Dalbey und Kuhn, 2000; Herrmann und Neupert, 2000)

. Für den Import und die Faltung von Proteinen des Intermembranraums mit konservierten Cystein-Motiven wird das Mia40/Erv1-System benötigt (Mesecke et al., 2005). In Pilzen ist Mia40 mit einer N-terminalen Transmembrandomäne in die Innenmembran integriert; diese Verankerung fehlt allerdings in Säugerzellen.

### **1.3 Lipidmetabolismus und interorganeller Kontakt: Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum (ER)**

Zusätzlich zu dem oben beschriebenen Import von Proteinvorstufen in die Mitochondrien ist für die Biogenese von Mitochondrien auch die Aufnahme und der Einbau von Phospholipiden erforderlich. Phospholipide sind notwendig für den Aufbau der mitochondrialen Membranen und damit für zahlreiche Prozesse wie z.B. Fusion von Mitochondrien, Aktivität der Atmungskette, Stabilität des mitochondrialen Genoms, Aktivierung der Apoptose und Stabilisierung der Proteintranslokasen (Osman et al., 2011). Manche Phospholipide werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert. Andere Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin und Cardiolipin werden im Mitochondrium aus Vorstufen erzeugt, die zuerst im ER synthetisiert wurden. So wird Phosphatidylserin im ER hergestellt. Anschließend wird dieses Lipid über die Außenmembran in die mitochondriale Innenmembran importiert und dort unter Entstehung von Phosphatidylethanolamin decarboxyliert (Gaigg et al., 1995; Trotter et al., 1993).

Es ist weitgehend unbekannt, wie Phospholipide vom ER zum Mitochondrium transportiert werden. Im Gegensatz zu anderen Organellen scheint es keinen vesikulären Transport zwischen ER und Mitochondrien zu geben. Daher wurde über einen Phospholipidaustausch an Stellen diskutiert, an denen Mitochondrien und ER Kontaktstellen ausbilden (Kornmann et al., 2009). Kürzlich wurde der ERMES-Komplex (*endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria encounter structure*), bestehend aus den Komponenten Mdm10, Mdm12, Mmm1 und Mdm34, identifiziert. Über ERMES werden Kontaktstellen zwischen Mitochondrium und ER gebildet (Kornmann et al., 2009; Kornmann und Walter, 2010). Mdm10 ist ein  $\beta$ -Barrel-Protein und ebenso wie Mdm34 in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert. Der aminoterminal glycosylierte Bereich von Mmm1 ist höchstwahrscheinlich im ER lokalisiert, der carboxyterminale Hauptteil ragt in das Cytosol und kann so mit cytosolisch exponierten mitochondrialen Außenmembranproteinen interagieren. Mdm12 scheint abhängig von vorhandenen Interaktionspartnern sowohl mit dem ER als auch mit Mitochondrien assoziieren zu können. In Abwesenheit von Mdm10 und Mmm1 wurde eine Relokalisation zum ER, bei Fehlen von Mmm1 eine Relokalisation zu Mitochondrien beobachtet. In der Arbeit von Kornman et al. wurde gezeigt, dass der durch den ERMES-Komplex vermittelte ER-Mitochondrium-Kontakt für den Lipidaustausch notwendig ist (Kornmann et al., 2009). Zwischen dem ERMES- und dem TOB-Komplex wurde eine funktionelle Interaktion diskutiert, da die Untereinheit Mdm10 des ERMES-Komplexes auch mit TOB interagiert. Weiter wurde ein Einfluss von Mdm12 und Mmm1 auf den Import von von  $\beta$ -Barrel-Proteinen beobachtet. Die Komponente Mas37 des TOB-Komplexes wurde ursprünglich in einem Screen für Gene entdeckt, welche den mitochondrialen Phospholipidmetabolismus kontrollieren (Gratzer et al., 1995). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte ein Einfluss von Mas37 auf den Lipidtransport gezeigt werden (Dagley et al., 2011). Das bakterielle Homologe der Komponente Tob55 des TOB-Komplexes, Omp85, wurde ebenfalls mit dem Phospholipidmetabolismus in Verbindung gebracht. Herunterregulation von Omp85 in dem gramnegativen Bakterium *N. meningitidis* bewirkte eine Anreicherung von Phospholipiden in der Innenmembran, und eine Abreicherung in der Außenmembran (Genevrois et al., 2003). Allerdings konnte ein Sekundäreffekt nicht ausgeschlossen werden, der auf das Fehlen von Komponenten beruht, die für den Lipidmetabolismus wichtig sind. Auffällig ist auch, dass die Deletion von Komponenten des ERMES-Komplexes zu ähnlichen morphologischen Defekten führt wie die Deletion der TOB-Komplex-Untereinheiten Mas37 und Tob38 (Meisinger et al., 2007; Meisinger et al., 2004). Eine mögliche Ursache für die in diesen Deletionsmutanten

beobachteten vergrößerten Mitochondrien könnte in einer veränderten Lipidzusammensetzung der Membranen liegen.

### 1.4 Morphologie und Dynamik von Mitochondrien

Mitochondrien bilden meist ein tubuläres Netzwerk, das durch ständige Fusion und Teilung aufrechterhalten wird (Nunnari et al., 1997). Bei zwei zu unterscheidenden Arten von Störungen dieses Gleichgewichts können folgende Phänotypen unterschieden werden: Fragmentierung bzw. netzartige Struktur. Fragmentierung wird bei einem Übermaß an Teilung, Netzwerkbildung bei einem Übermaß an Fusion beobachtet (Sesaki und Jensen, 1999).

In Hefe ist für die Teilung von Mitochondrien das Dynamin-ähnliche Protein Dnm1 notwendig (Bleazard et al., 1999). Diese cytosolische GTPase wird durch zwei Partnerproteine, Fis1 (*mitochondrial fission*) und Mdv1 (*mitochondrial division protein 1*) an die mitochondriale Oberfläche gebunden (Mozdy et al., 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Fis1 ist mit einem C-terminalem Anker in der Außenmembran verankert und rekrutiert das Adapterprotein Mdv1 an die Außenmembran. Mdv1 interagiert mit Dnm1 in der GTP-gebundenen Form und induziert als Dynamin-Effektor die Assemblierung von Dnm1-GTP Oligomeren in einer spiralförmigen Struktur um die Tubuli, die mit Mitochondrien assoziiert sind. Durch Konformationsänderungen der Spiralen, die durch GTP-Hydrolyse induziert werden, könnten dann die Innen- und Außenmembran abgeschnürt werden (Ingberman et al., 2005). Dnm1 kann auch über das Mdv1-Paralogue Caf4 an Fis1 gebunden werden. Allerdings ist Caf4 für den Teilungsprozess nicht essentiell, und dessen genaue ist Funktion nicht bekannt (Westermann, 2010).

Die Fusion von Mitochondrien wird durch zwei voneinander getrennte, aber koordinierte Fusionsprozesse der Innen- und der Außenmembran gewährleistet (Meeusen et al., 2004). Durch die in der Außenmembran lokalisierte GTPase Fzo1 (*fuzzy onions*) wird das Aneinanderdocken zweier Außenmembranen gewährleistet. Die Dynamin-ähnliche GTPase Mgm1 ist für die Fusion der Innenmembran verantwortlich (Meeusen et al., 2006; Meeusen et al., 2004). Dass Fzo1 und Mgm1 essentielle Komponenten der Fusionsmaschinerie sind, wird durch diverse Beobachtungen gestützt. So sind zum einen in Fzo1- bzw. Mgm1-defizienten Hefestämmen die Mitochondrien fragmentiert (Herlan et al., 2003; Hermann et al., 1998; Rapaport et al., 1998; Wong et al., 2000). Weiterhin können Mitochondrien in diesen Deletionsstämmen den Inhalt der Matrix nicht mehr vermischen, was auf ein Fehlen von Fusionsprozessen hinweist (Cipolat et al., 2004; Hermann et al., 1998; Wong et al., 2000).

Das in der Außenmembran lokalisierte Protein Ugo1 ist ebenfalls für die Fusion von Mitochondrien notwendig (Sesaki und Jensen, 2001). Da Ugo1 sowohl mit Fzo1 wie auch mit Mgm1 interagiert, wird für dieses Protein eine Rolle in der Koordination der Außen- und Innenmembranfusion diskutiert (Westermann, 2010).

Warum Mitochondrien ein dynamisches Netzwerk bilden, ist Gegenstand diverser Diskussionen. Zum einen wird durch Teilung von Mitochondrien während der Zellteilung eine gleichmäßige Verteilung dieser Organellen auf die Tochterzellen gewährleistet. Ein weiterer Grund scheint die gleichmäßige Verteilung und Vererbung der mitochondrialen DNA zu sein, welche durch Fusionsprozesse gewährleistet wird (Berger und Yaffe, 2000). Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass bei Verlust der Fusion meist ein völliger oder teilweiser Verlust der mtDNA beobachtet wird (Nunnari et al., 1997; Westermann, 2003)..

### **1.5 Kontaktstellen zwischen Innen- und Außenmembran**

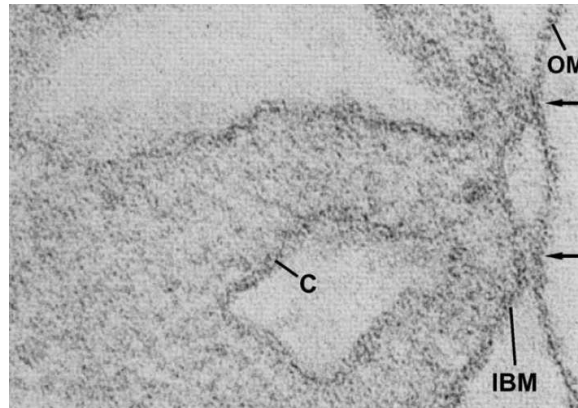
Außen- und Innenmembranen müssen von einer großen Anzahl von Molekülen passiert werden. Dazu gehören sowohl kleine Moleküle wie Metabolite als auch große Moleküle wie Proteine. Diese Transportprozesse werden in der Regel in zwei verschiedenen Schritten durch spezifische Transporter vermittelt. In einigen Fällen ist der Transport durch beide Membranen gekoppelt, weshalb an diesen Stellen Außen- und Innenmembran in nahem Kontakt treten müssen.

Es wurden verschiedene Arten von Kontaktstellen beschrieben (Reichert und Neupert, 2002):

1) Morphologische Kontakte, die mittels Elektronenmikroskopie beobachtet wurden. Im Gegensatz zur Außenmembran ist die Innenmembran für Ionen und die meisten kleinen Moleküle wie Wasser undurchlässig. Aus diesem Grund schrumpfen isolierte Mitochondrien in Flüssigkeit hoher Osmolarität und nehmen eine kondensierte Form ein (Hackenbrock, 1966). In solchen Mitochondrien kann eine Region, in der Innen- und Außenmembran sehr nahe aneinanderliegen, beobachtet werden. Diese wurden als Kontaktstellen („contact sites“) bezeichnet (Hackenbrock, 1968)(Abb.1. 1).

Diese Kontaktstellen werden durch Beschallung nicht zerstört und überleben in Form von Vesikeln, die Teile von beiden Membranen enthalten. Nach Auftrennung dieser Vesikel durch Dichtezentrifugation wurden neben Außen- und Innenmembranvesikel auch Vesikel intermediärer Dichte erhalten, die sowohl Außen- wie auch Innenmembranmarkerproteine enthielten (Pon et al., 1989). Mittels Elektronenmikroskopie konnten in dieser Fraktion „right-side-out“-Innenmembranvesikel beobachtet werden, welche an „inside-out“-Außenmembranvesikel angeheftet waren (Hackenbrock und Miller, 1975). Daher wird

vermutet, dass diese Vesikelfraktion mit Proteinen angereicht ist, die mit Kontaktstellen assoziiert sind.



**Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Mitochondrien aus Rattenleber.** Pfeile zeigen auf Kontaktstellen zwischen Innen- und Außenmembran. IBM, Innere Grenzmembran; OM, Außenmembran; C, Cristamembran (übernommen von (Hackenbrock, 1968)).

2) Kontaktstellen für den Metabolittransport. Der Transport von Metaboliten über die Außen- und Innenmembran erfolgt durch den Adenin-Nucleotid-Transporter (ANT), der mitochondrialen Kreatin-Kinase (mtCK) und Porin (*Voltage dependent anion channel*; VDAC) (Dolder et al., 2001). Möglicherweise ist mtCK zwischen dem Innenmembranprotein ANT und dem Außenmembranprotein Porin lokalisiert. Dieser Komplex wurde als ein Transport bzw. Austauschsystem für Phosphokreatin und Kreatin vorgeschlagen.

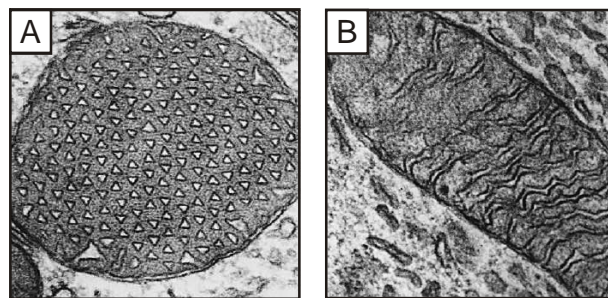
3) Kontaktstellen für den Proteintransport in die Mitochondrien. Die meisten mitochondrialen Proteine werden im Cytosol synthetisiert und über die entsprechenden Translokasen der Außen- und Innenmembran zu dem entsprechenden Zielsubkompartiment transportiert. Ob der Proteintransport über beide Membranen in zwei aufeinanderfolgenden oder in einem Schritt vollzogen wird, wurde schon früh diskutiert. Der erste Hinweis, dass der Proteintransport in die Mitochondrien in Verbindung mit Kontaktstellen zwischen Außen- und Innenmembran steht kam durch eine Beobachtung mittels Elektronenmikroskopie (Kellems et al., 1975): Dabei wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von Cycloheximid geblockt, wodurch die naszierende Proteinkette an den Ribosomen angeheftet blieb. Diese Ribosomen konnten in kondensierten Mitochondrien an Regionen gefunden werden, an denen Außen- und Innenmembran eng aneinander lagen.

Ein erster Hinweis auf einen Kontakt von TOM und TIM23 war die Beobachtung, dass der N-Terminus von Tim23 durch die Außenmembran ins Cytosol ragen kann (Donzeau et al., 2000). Ein weiterer Anhaltspunkt war die Beobachtung, dass die TIM23-Untereinheit Tim50 mit Vorstufenproteinen interagiert, die nur teilweise durch die TOM-Pore transloziert

wurden (Mokranjac et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Auch wurde eine Interaktion zwischen der TIM-Komponente Tim21 und dem IMS-exponiertem Abschnitt von Tom22 nachgewiesen (Mokranjac et al., 2005). Allerdings scheinen solche Kontaktstellen für den Import von Vorstufenproteinen flexibel zu sein, im Unterschied zu den morphologisch Kontaktstellen, welche sehr stabil sind.

### 1.6 Architektur der Mitochondrien

Mitochondrien sind von zwei Membranen begrenzt, der Außen- und der Innenmembran. Letztere wird in die „Innere Grenzmembran“ (IBM; „*inner boundary membrane*“) und die „Cristamembran“ (CM) unterteilt. Während die IBM an der Außenmembran anliegt, stellt die CM Einstülpungen in die Matrix dar. Abhängig von Gewebe, physiologischem Zustand und Entwicklungsstand konnten verschiedene Strukturen der CM wie z.B. tubuläre oder dreiecksförmige Cristae beobachtet werden (Abb. 1.2) (Mannella, 2006; Mannella et al., 2001; Perkins et al., 2001; Perkins et al., 1998).



**Abbildung 1.2: Variabilität der Struktur der Cristamembran.** Dargestellt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Cristae aus unterschiedlichen Zelltypen. A, Astrocyt; B, Ventrikulärer Herzmuskel. Aus Fawcett, 1981.

Es wurde längere Zeit diskutiert, wie die CM mit der IBM verbunden ist. Es konnte später gezeigt werden, dass die Cristae durch enge tubuläre Öffnungen, genannt Crista Junctions (CJs) mit der IBM verbunden sind. Die CM selbst weist verschiedene Strukturen auf; dagegen scheinen die CJs in der Größe und Form relativ ähnlich zu sein (Zick et al., 2009).

Möglicherweise werden durch CJs mitochondriale Subkompartimente voneinander abgegrenzt. Dadurch würde zwischen dem Intermembranraum und dem Intracristaeraum bzw. zwischen der IBM und der CM eine Diffusionsbarriere für bestimmte Metabolite wie Protonen und ADP aufgebaut (Frey et al., 2002; Perkins et al., 1997). Durch Regulation der



Diffusion von ADP könnte z.B. die Atmungskette durch CJs mitreguliert werden, da ADP ein limitierender Faktor in der oxidativen Phosphorylierung ist (Frey und Mannella, 2000; Mannella et al., 1994). Weiter könnte die Sublokalisierung von Proteinkomplexen innerhalb der Innenmembran durch CJs gesteuert werden. Dass es Proteine gibt, die bevorzugt entweder in der IBM oder in der CM lokalisiert sind, konnte durch Fluoreszenzmikroskopie in vergrößerten Mitochondrien bzw. durch Immunogoldexperimente nachgewiesen werden. So sind Komponenten der Atmungskette hauptsächlich in der CM zu finden. Komponenten der Proteintranslokasen dagegen in der IBM (Vogel et al., 2006; Wurm und Jakobs, 2006). Möglicherweise sind solche Barrieren dynamisch und regulierbar. Tim23 ist unter Normalbedingungen größtenteils in der IBM zu finden. Diese Anreicherung in der IBM kann durch Überexpression eines mitochondrialen Proteins noch erhöht werden. Dagegen kann ein höherer Anteil von Tim23 in der CM durch Inhibierung der cytosolischen Proteinsynthese erreicht werden (Vogel et al., 2006; Zick et al., 2009).

Im Menschen konnten Änderungen der mitochondrialen Struktur mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht werden. So wird das Barth-Syndrom durch Mutationen in dem Protein Tafazzin ausgelöst (Bione et al., 1996). In Lymphoblasten aus Patienten, die an dieser Störung leiden, sind die Mitochondrien vergrößert. Gleichzeitig ist die Oberfläche der mitochondrialen Innenmembran verringert (Acehan et al., 2007). Tafazzin ist an der Biosynthese des mitochondrialen Phospholipids Cardiolipin beteiligt. Dies deutet weiter darauf hin, dass zumindest einige spezifische Phospholipide notwendig sind, um die mitochondriale Ultrastruktur zu erhalten (Zick et al., 2009).

### **1.7 Cristae-Morphologie und Bioenergetik**

Schon in den 1950er Jahren wurde die Möglichkeit diskutiert, dass die Einstülpungen der mitochondrialen Innenmembran der Oberflächenvergrößerung dienen und dadurch die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung erhöht wird (Palade, 1953). Der Nachweis einer bevorzugten Lokalisation der Atmungskettenkomponenten in der CM unterstützte diese Theorie (Perotti 1983, Ohlendieck 1986, Gilkenson 2003, Vogel 2006). Während der oxidativen Phosphorylierung werden Elektronen von den beiden Reduktionsäquivalenten NADH und FADH<sub>2</sub>, die während der Glycolyse und des Citratcluses entstehen, in der mitochondrialen Matrix auf Atmungskettenkomponenten übertragen. Durch Übertragung dieser Elektronen zwischen diesen Komponenten und letztendlich auf Sauerstoff wird Energie frei, die in einen Protonengradienten umgesetzt wird, indem Protonen von der Matrix über die Innenmembran in den Intermembranraum gepumpt werden. Der Rückfluss von Protonen

durch die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase in die Matrix wird dann umgewandelt in Energie zur Phosphorylierung von ADP mit anorganischem Phosphat, also zur Synthese von ATP (Mitchell, 1961).

Ob die einzelnen Atmungskettenkomponenten unabhängig voneinander angeordnet sind oder durch stabile Interaktionen organisiert sind, wird kontrovers diskutiert. Im ersten Fall wäre der Elektronentransport zwischen den Komponenten diffusionsabhängig (Hackenbrock et al., 1986), im zweiten Fall wäre durch die Interaktion der Einzelkomponenten der Elektronenfluss gewährleistet (Chance und Williams, 1955). Ein supermolekularer Aufbau der Atmungskettenkomplexe konnte nachgewiesen werden (Eubel et al., 2004; Krause et al., 2004; Marques et al., 2007; Schagger und Pfeiffer, 2000; Wittig et al., 2006). Offen bleibt, ob diese Superkomplexe die Struktur der CM beeinflussen. Ein Einfluss auf die Stabilität der Superkomplexe durch Cardiolipin konnte nachgewiesen werden (Brandner et al., 2005; McKenzie et al., 2006; Pfeiffer et al., 2003). Unklar ist, ob Cardiolipin die Architektur der Innenmembran direkt beeinflusst. Möglich ist auch ein indirekter Einfluss durch Stabilisierung hochmolekularer Komplexe wie den Atmungskettenkomplexen durch Cardiolipin.

### **1.8 Einfluss der $F_1F_0$ -ATP-Synthase auf die Architektur der Cristamembran**

Die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase stellt einen Komplex mit einer molekularen Masse von ca. 600 kDa dar. Dieser besteht aus mindestens 17 verschiedenen Untereinheiten und ist bevorzugt in der CM lokalisiert (Rubinstein et al., 2003; Velours und Arselin, 2000). Neben der Funktion der ATP-Bildung wird seit einigen Jahren auch ein wichtiger Einfluss der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase auf die Form der CM diskutiert. Die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase bildet Dimere und Oligomere mit einer reißverschlussartigen Anordnung aus, welche die tubuläre Cristae von *Paramecium multimicronucleatum* umgeben (Allen et al., 1989). Daher wurde ein stabilisierender Einfluss auf die tubuläre Struktur der CM vorgeschlagen, wonach die regelmäßige Anordnung der ATP-Synthase als eine Art strukturellem Skelett dienen sollte (Zick et al., 2009).

Dimerisation und Oligomerisation der ATP-Synthase wurde nach diesen initialen Befunden von einfachen bis höheren Eukaryoten nachgewiesen (Arnold et al., 1998; Arselin et al., 2003; Krause et al., 2005). Für die Bildung der Dimere spielen die beiden Untereinheiten Su *e/g* eine wichtige Rolle. Dies wurde anhand der Beobachtung gezeigt, dass nach der Deletion von su *e* und su *g* keine Dimere bzw. höhere Oligomere mehr vorliegen (Arnold et al., 1998). Die Abwesenheit von höheren Oligomeren hatte aber keinen messbaren

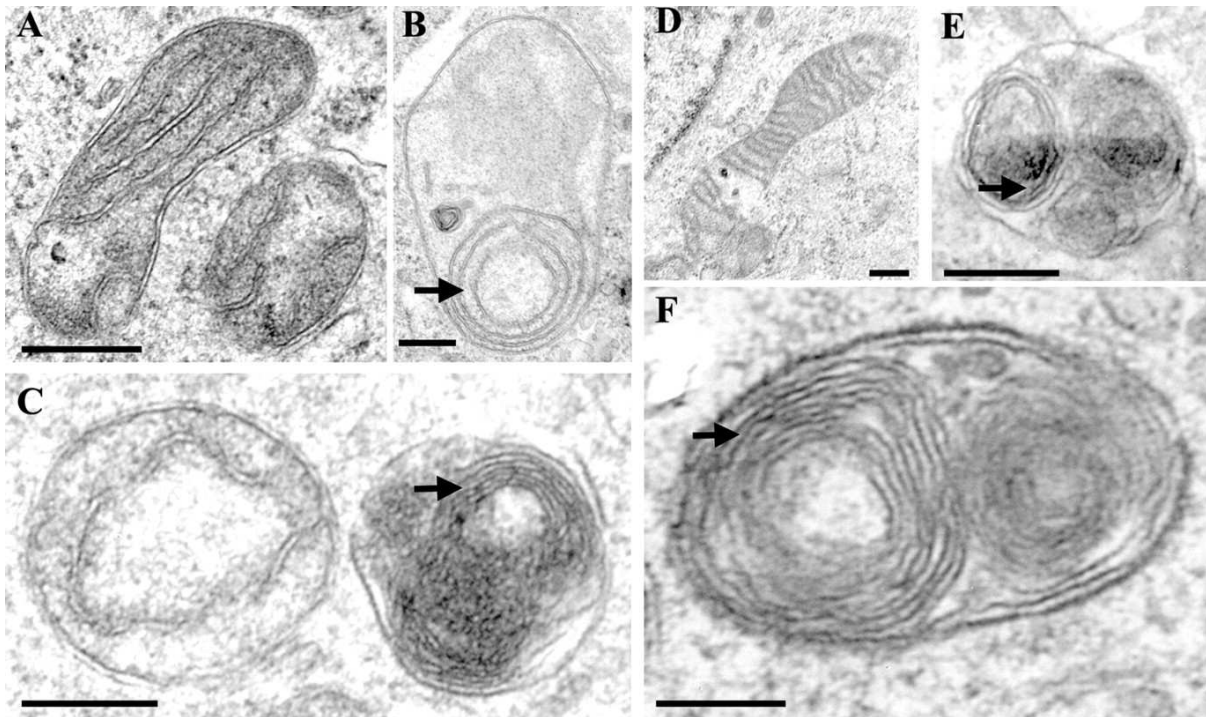
Einfluss auf die katalytische Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase. Ob Su e/g die Hauptkomponenten für die Dimerisierung oder nur stabilisierende Faktoren sind, ist noch nicht geklärt. So wurde z.B. auch die Untereinheit a als wichtigster Dimerisierungsfaktor vorgeschlagen (Wittig et al., 2008).

Bei der Hemmung der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase durch Deletion von Su e oder Su g war eine Veränderung der Ultrastruktur zu beobachten. Die Cristamembranen in diesen Deletionsstämmen waren in konzentrischen Ringen angeordnet, welche einer zwiebelartige Struktur ähneln (Bornhovd et al., 2006; Giraud et al., 2002; Paumard et al., 2002). Mutationen an der Untereinheit 4 in Hefe führten ebenfalls zu einer Destabilisierung der Dimere und Oligomere der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase und zu einer zwiebelartigen Struktur der CM in Mitochondrien (Soubannier et al., 2002; Weimann et al., 2008). Diese Ergebnisse wiesen auf die Bedeutung der Oligomerisation dieses Proteins für die Architektur der Innenmembran hin.

### **1.9 Mitofilin und Fcj1 sind für die Ausbildung von Crista Junctions notwendig**

Vor wenigen Jahren wurde das mitochondriale Protein Mitofilin beschrieben, in dessen Abwesenheit die Ultrastruktur von Mitochondrien stark verändert ist (John et al., 2005). Herunterregulieren von Mitofilin in HeLa Zellen führte zur nahezu vollständigen Abwesenheit von CJs. Die CM wies eine stark vergrößerte Oberfläche auf und war stapelförmig in der Matrix angeordnet. Weitere Effekte waren eine leichte Verringerung der Zellproliferation und eine Erhöhung der ROS-Produktion, des Membranpotentials sowie der Apoptoserate (John et al., 2005).

Ursprünglich entdeckt wurde Mitofilin als ein Protein, dessen messenger-RNA mit einer hohen Abundanz im Herzgewebe vorkommt (Icho et al., 1994). Mitofilin wurde ebenso in Mäusen, Ratten und *C.elegans* beschrieben. Dieses Protein wurde als ein integrales, mitochondriales Innenmembranprotein charakterisiert, dessen carboxyterminaler Hauptteil in den Intermembranraum ragt (Gieffers et al., 1997; Odgren et al., 1996). Die molekulare Wirkungsweise von Mitofilin auf die Ausbildung von CJs und auf die Struktur der Innenmembran blieb dagegen weitgehend unbekannt.



**Abbildung 1.3: 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).

In der Bäckerhefe wurde ein homologes Protein (Fcj1; *formation of crista junction*) identifiziert (Rabl et al., 2009). Fcj1 weist Homologien sowohl in Struktur als auch in der Aminosäuresequenz zu Mitofilin auf. Es kann in drei Bereiche unterteilt werden: Nahe dem N-Terminus liegt eine Transmembrandomäne, die ein Dimerisierungsmotiv (**A**X<sub>3</sub>**G**) enthält. Der carboxyterminale Hauptteil dieses Proteins ist wie bei Mitofilin im IMS lokalisiert und weist eine Coiled-Coil-Domäne und eine in der Aminosäuresequenz konservierte C-terminale Domäne auf. Die Vorstufe von Fcj1 trägt eine aminoterminal Targetingsequenz, die nach Import abgespalten wird, so dass ein kurzer, ca. 14 Aminosäure langer N-terminaler Rest auf der Innenseite der Innenmembran exponiert ist.

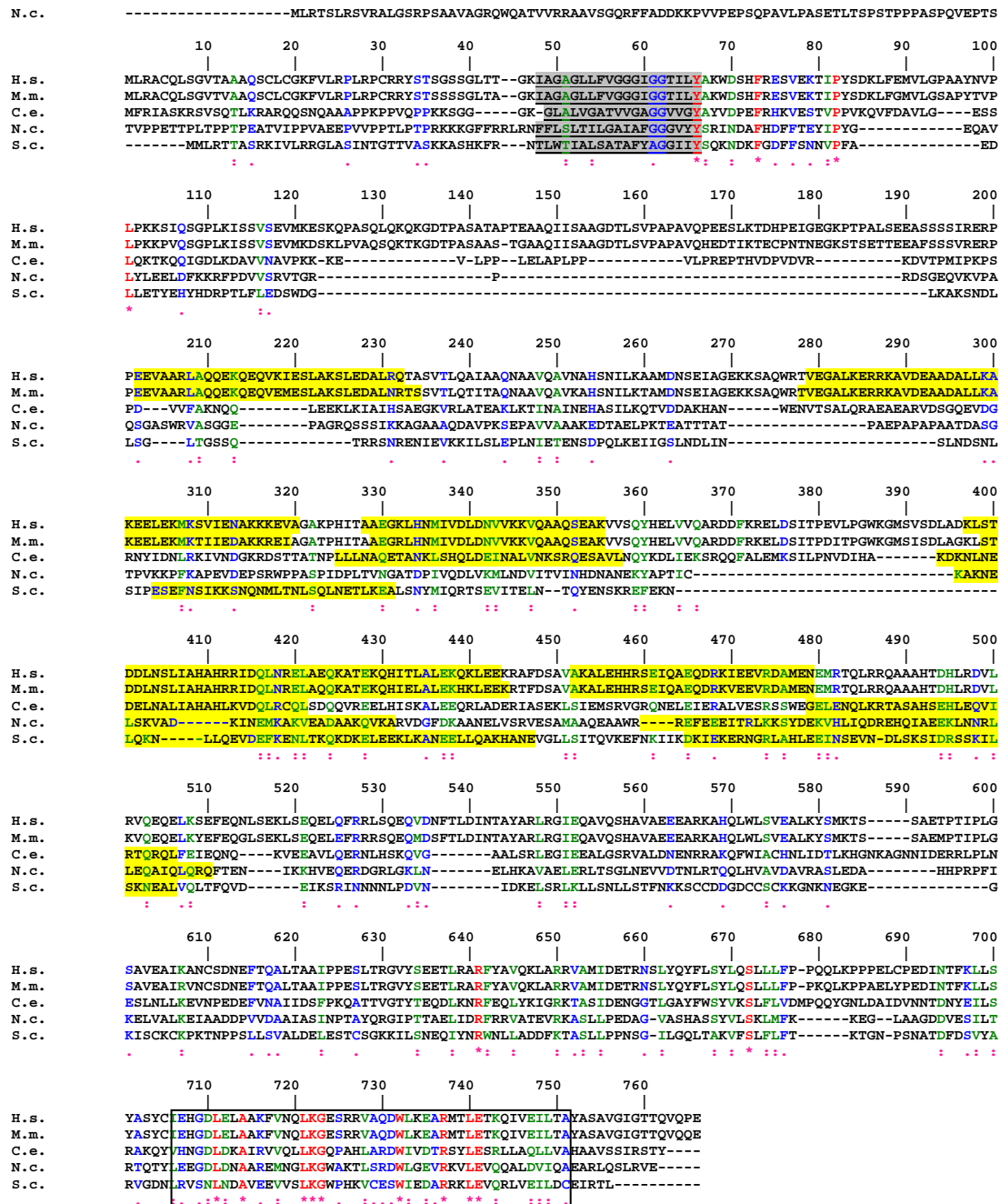


Abbildung 1.4: Sequenzvergleich von Fcjl aus *S. cerevisiae* und Mitofilin-ähnlichen Proteinen aus verschiedenen Organismen.

Aminosäuresequenzen Q16891 (*H. sapiens*; H. s.), Q8CAQ8 (*M. musculus*; M. m.), Q22505 (*C. elegans*; C. e.), Q7SFD8 (*N. crassa*; N. c.) und von Fcjl (*S. 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. Markiert wurden identische Aminosäuren (\*) sowie konservative (:) und semi-konservative (.) Substitutionen. Aus (Rabl et al., 2009).

**1.10 Fcj1 ist an den CJ angereichert und beeinflusst direkt die Ausbildung von CJs**

Die Deletion von Fcj1 in Hefe führt zu einem defizienten respiratorischen Wachstum. Die Mitochondrien sind im Vergleich zum Wildtyp-Stamm vergrößert. Auch wurde ein starker Verlust an mitochondrialer DNA (mtDNA) von 15 % bis 40 % der Zellen beobachtet. Auch konnte eine ca. 30 %ige Reduktion der Respirationsrate isolierter Mitochondrien sowohl in Gegenwart von ADP (Status III) als auch ohne ADP (Status IV) im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Weiter war das Membranpotential  $\Delta\Psi$  in  $\Delta f c j 1$ -Zellen - im Gegensatz zu der Herunterregulation von Mitofilin in HeLa-Zellen (John et al., 2005) - leicht reduziert. Da die Kopplung von Atmungskette und der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase vergleichbar zum Wildtyp war, wurde das schlechtere Wachstum der Deletionsmutante auf Sekundäreffekte durch mtDNA-Verlust zurückgeführt und nicht auf primäre Defekte in der oxidativen Phosphorylierung (Rabl et al., 2009).

Die Deletion von Fcj1 führte in Hefezellen zu einer ähnlichen Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur wie z.B. die Depletion von Mitofilin in humanen Zellen. CJs wurden nicht mehr beobachtet, ebenso war die Oberfläche der stapelförmig angeordneten CM stark vergrößert. Mittels Cryo-Immunogold-Elektronenmikroskopie wurde Fcj1 größtenteils an den CJs detektiert. Dies war deshalb bemerkenswert, da Fcj1 das erste Protein mit einer derartigen Sublokalisierung in der Innenmembran war. Zahlreiche bislang untersuchte Proteine traten dagegen an diesem Kompartiment der Innenmembran nur mit einer geringen Dichte auf. So ist z.B. Cox2, eine Untereinheit der Cytochrom *c* Oxidase hauptsächlich in der CM lokalisiert. In der IBM und den CJs ist dieses Protein dagegen nur zu einem geringen Anteil vorhanden, während die Untereinheiten der ATP-Synthase *Su e* und *Su g* hauptsächlich an den Cristapitzen zu finden sind. Die bevorzugte Lokalisation von Fcj1 und dessen Wirkung auf die Architektur der mitochondrialen Innenmembran legten einen direkten Einfluss dieses Proteins auf die Bildung von CJs nahe. Diese direkte Abhängigkeit der Bildung von CJs von Fcj1 wurde in einem Experiment nachgewiesen, in dem eine Korrelation der Anzahl der CJs mit der vorhandenen Fcj1-Menge gefunden wurde: Während bei Überexpression von Fcj1 sich die Anzahl der CJs signifikant erhöhte (2- bis 3-fach im Vergleich zum Wildtyp bei ca. 10 facher Überexpression), bewirkte Herunterregulation von Fcj1 eine rasch fortschreitende Abnahme von CJs. Zu diesem Zeitpunkt war noch kein Verlust von mtDNA zu beobachten. Daher war die veränderte mitochondriale Ultrastruktur nicht auf einen möglichen Sekundäreffekt zurückzuführen, der auf einen Verlust der mtDNA beruhen würde (Rabl et al., 2009).

### **1.11 Fcj1 und Su e/g haben einen antagonistischen Effekt auf die Bildung von Cristae und CJ**

Wie in Abschnitt 1.7 beschrieben wurde in Deletionsmutanten von Su *e/g* eine Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur beobachtet. Dies wurde auf den Oligomerisationszustand der ATP-Synthase zurückgeführt. Um zu ermitteln, ob die beobachteten strukturellen Änderungen in  $\Delta fcj1$ - und  $\Delta su e/g$ -Zellen in Zusammenhang miteinander stehen, wurde ein möglicher Einfluss von Fcj1 auf Su *e/g* und die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase untersucht (Rabl et al., 2009).

In  $\Delta fcj1$ -Zellen wurde keine Veränderung der Proteinmenge von Su *e/g* beobachtet. Daher konnte ein Sekundäreffekt in  $\Delta fcj1$ -Zellen bezüglich der mitochondrialen Ultrastruktur aufgrund einer veränderten Proteinmenge an Su *e/g* ausgeschlossen werden. Weiter war die Fcj1-Menge in  $\Delta su e/g$ -Zellen nicht verändert. Daher hat die veränderte Ultrastruktur in  $\Delta su e/g$ -Zellen nicht ihre Ursache in veränderten Gehalten an Fcj1. Ebenfalls waren die Proteinmengen von diversen kern- als auch mitochondrial- kodierter Proteine, für die eine wichtige Funktion für die Morphologie von Mitochondrien beschrieben wurde (z.B. Su *e/g* und Mgm1), im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

Fcj1 beeinflusst im Gegensatz zur Menge der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase deren Oligomerisationsgrad. Während im  $\Delta fcj1$ -Stamm höhere Oligomere der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase relativ stabil waren, sind diese Oligomere im Wildtyp im Vergleich zum  $\Delta fcj1$ -Stamm wesentlich instabiler. Überexpression von Fcj1 führt zu einer weiteren Destabilisierung der Oligomerisation der ATP-Synthase.

Weiter hat die Deletion dieser beiden Untereinheiten der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase in dem  $\Delta fcj1$ -Stamm einen positiven Einfluss auf das Wachstum auf nicht fermentierbarem Medium, was auf eine genetische Interaktion zwischen Su *e* bzw. Su *g* und Fcj1 hindeutet: Während  $\Delta fcj1$ -Zellen ein deutliches respiratorisches Defizit zeigten, konnte durch Deletion von Su *e* oder Su *g* in diesem Stamm das Wachstum verbessert werden. Wie in den Stämmen  $\Delta su e$  und  $\Delta su g$  wurden in diesen Doppelmutanten keine höheren Oligomere und kaum Dimere nachgewiesen.

Bekannt war weiterhin, dass die Deletion von Su *e* oder Su *g* zu einer zwiebelartigen Struktur und einer Erweiterung der Cristamembran führt (Paumard et al., 2002). Die Bildung von CJs in diesen Stämmen wurde bis zu diesem Zeitpunkt dagegen nicht untersucht. (Rabl et al., 2009) beobachteten eine geringfügige Erhöhung der Anzahl von CJs in  $\Delta su e$ - und  $\Delta su g$ -Mitochondrien. Demzufolge sind diese beiden Untereinheiten der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase nicht

für die Bildung von CJs notwendig. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigten diese Deletionsstämme eine um etwa 20-fache Erniedrigung der Zahl Cristaspitzen. Bemerkenswerter Weise liegen in den  $\Delta su e$  und  $\Delta su g$  Mutanten durchgängige, den gesamten Matrixraum daurchspannende Cristae vor. Gleichzeitig wurde eine signifikante Anzahl an Verzweigungen der CM (Branches) beobachtet (27% und 9% der elektronenmikroskopischen Mitochondrienprofile in  $\Delta su e$  bzw.  $\Delta su g$ ), die im Wildtyps nicht erkennbar waren. Im Gegensatz zur Deletion von  $Su e$  oder  $Su g$  führte die Deletion von  $Fc1$  zu einer ca. 2,5-fachen Erhöhung an Cristaspitzen. CJs fehlten dagegen vollständig. Somit ist  $Fc1$  einerseits für die Bildung von CJ notwendig, andererseits  $Su e$  und  $Su g$  für die Ausbildung von Cristaspitzen. Weiterhin beeinflussen die Deletionen von  $Fc1$  und von  $Su e$  oder  $Su g$  die Oligomerisation der  $F_1F_0$ -ATPase in einer antagonistischen Weise (siehe oben). Anhand dieser Beobachtungen wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem die Architektur der CM durch das Proteinlevel von  $Fc1$  sowie von  $Su e$  und  $Su g$  kontrolliert wird (Rabl et al., 2009):  $Su e$  und  $Su g$  beeinflussen die Ausbildung einer positiven Membrankrümmung an den Cristaspitzen. Das an den CJ lokalisierte  $Fc1$  verursacht dagegen eine negative Membrankrümmung.  $Fc1$  beeinflusst direkt oder indirekt die Oligomerisation der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase und somit die Ausbildung einer positiven Membrankrümmung. In Regionen, in denen die Oligomerisation der ATP-Synthase nicht beeinträchtigt ist, erfolgt eine positive Krümmung der Membran. Dagegen ist an den CJs, wo  $Su e/g$  und die hocholigomere  $F_1F_0$ -ATP-Synthase nur in einer geringen Menge vorkommt, die Membrankrümmung negativ. Zusammengefasst beeinflusst nach diesem Modell  $Fc1$  den Oligomerisationsgrad der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase und dadurch die Krümmung der Membran.

### **1.12 Zielsetzung der Arbeit**

Für die Bildung und Entstehung von CJs in *S. cerevisiae* ist das Mitofilin-Homologe  $Fc1$  notwendig. Die molekulare Wirkungsweise von  $Fc1$  und möglichen Interaktionspartnern war am Anfang dieser Arbeit nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es zum einen, Einsicht in die Funktionsweise von  $Fc1$  zu bekommen. Dazu sollten durch Mutationsanalyse der verschiedenen Bereiche von  $Fc1$  die einzelnen Domänen dieses Proteins untersucht werden. Zum anderen sollten Interaktionspartner identifiziert und deren Beitrag zur Architektur von Mitochondrien analysiert werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

##### *DNA-Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach Birnboim und Doly durchgeführt (Birnboim und Doly, 1979). Von dem *E. coli*-Stamm wurden aus einer LB<sub>Amp</sub>-Übernacht-Kultur 2 ml in einer Tischzentrifuge für 1 min (16000 g; RT) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl *E1-Puffer* resuspendiert und anschließend wurden die Zellen in 300 µl *E2-Puffer* 5 min bei RT lysiert. Durch Zugabe von 300 µl *E3-Puffer* wurde das Lysat danach neutralisiert. Nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt (16000 g; RT) wurde der Überstand, welcher die Plasmid-DNA enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 600 µl kaltem 100% Ethanol gefällt und nach Zentrifugation (16000 g; 10 min; 4°C) in 1 ml kaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (16000 g; 10 min; 4°C) wurde die Plasmid-DNA 10 min bei RT getrocknet und anschließend in 30 µl nucleasefreiem Wasser resuspendiert.

***E1-Puffer:*** 50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA; 7,5

***E2-Puffer:*** 0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS

***E3-Puffer*** 3,1 M KOAc; 2,5 M HAc

##### *DNA-Präparation im großen Maßstab (Midi-Präparation)*

Die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA (Midipräparation) wurde mit dem *PureYield<sup>TM</sup> Midipreparation Kit* der Firma Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt: 50-100 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur wurden abzentrifugiert (3000 g; 5 min; RT), der Überstand verworfen und das Zellpellet anschließend in 6 ml *Cell Resuspension* resuspendiert. Zugabe von 6 ml *Cell Lysis Solution* zu der Resuspension mit anschließender 3 minütiger Inkubation führte zur Lyse der Bakterienzellen. Durch Mischen mit 10 ml *Neutralization Solution* und erneuter 3 minütiger Inkubation wurde die chromosomale DNA und Proteine ausgefällt. Der durch 15 minütige Zentrifugation (15000 g; RT) gewonnene Überstand wurde durch das Anlegen eines Vakuums nacheinander durch zwei Säulen gesaugt, die im Kit enthalten waren. Die erste Säule diente der Reinigung und die zweite Säule der

Bindung der DNA an eine Silica-Membran. Anschließend wurde die zweite Säule mit 20 ml *Column Wash Solution* gewaschen und schließlich die Membran getrocknet, indem das Vakuum für weitere 30 s aufrechterhalten wurde. Die DNA wurde eluiert, indem 600 µl nuklease-freies Wasser durch die Membran zentrifugiert wurden (3000 g; 5 min; RT). Die gereinigte DNA wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt.

<i>Resuspension Solution</i>	50 mM Tris/HCl ;10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; 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>	8,3 mM Tris/HCl; 60 % (v/v) Ethanol; 60 mM Kaliumacetat; 0,04 mM EDTA; pH 7,5

### 2.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung genomischer DNA (Rose, 1990) wurde eine 10 ml Kultur des Wildtyp-Stammes W303α über Nacht in YPD-Medium bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation 5 min (4000 g; RT) in einer Avanti J-25-Zentrifuge (Beckman) mit dem Rotor JA-20 sedimentiert, anschließend mit 10 ml Wasser gewaschen und in 200 µl *Aufschlusspuffer* resuspendiert. Weitere 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1(v/v/v)) sowie ca. 100-300 mg Glaskugeln (mit 0,45 mm Durchmesser) wurden zugegeben. Anschließend wurden die Zellen durch 5-minütiges Vortexen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200 µl *TE-Puffer* wurden die Proben 5 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene DNA wurde mit Ethanol gefällt und in 200 µl sterilem Wasser gelöst. Die in den Proben enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 75 µg/ml RNase A und 5-minütiger Inkubation bei 37°C abgebaut. Nach erneuter Ethanol-fällung wurde die DNA in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen.

<i>Aufschlusspuffer</i>	2 % (w/v) Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0
<i>TE-Puffer</i>	10 mM Tris/HCl ; 1 mM EDTA; pH 8,0

### 2.1.3 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, bestimmte DNA-Abschnitte in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) zu amplifizieren. Eine PCR besteht aus der mehrfachen Wiederholung eines Reaktionszykluses welcher aus folgenden drei Schritten besteht:

- Trennung der Matrizenstränge
- Anlagerung von einzelsträngigen Oligonucleotiden (Primer) an den einzelsträngigen Matrizenstrang
- Verlängerung der Oligonucleotide durch eine thermostabile DNA-Polymerase

Durch das mehrfache Durchlaufen dieser Reaktionsschritte war eine exponentielle Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte möglich (Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985). Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt in dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer 1,5 U der thermostabilen DNA-Polymerase, je 100 µM der vier Desoxynukleosid-5'-triphosphate und ca. 50 ng genomische DNA bzw. 5ng Plasmid-DNA als Matrize. Als thermostabile Polymerase wurden die *Taq*-Polymerase (GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase; Promega) und die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* DNA Polymerase; Promega) verwendet. Von den beiden Polymerasen weist die *Taq*-Polymerase die höhere Prozessivität auf, aber mangels einer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität („proof-reading“) im Gegensatz zur *Pfu*-Polymerase eine höhere Fehlerrate. Durch Einsatz beider Polymerasen gleichzeitig kann bei einer verminderten Fehlerrate eine erhöhte Prozessivität erreicht werden. Bei einer typischen PCR wurde mit einem 5-minütigen Denaturierungsschritt, in der die beiden DNA-Stränge getrennt wurden, begonnen. Anschließend wurden meist 30 Reaktionszyklen (siehe oben) durchlaufen. Die Trennung der Matrizenstränge wurde bei 94°C und die Verlängerung der Oligonucleotide bei 72°C durchgeführt. Die Temperatur für die Anlagerung der Primer an den Matrizenstrang wurde nach der „4+2-Regel“ abgeschätzt ( $T_m = 4^\circ\text{C pro G/C} + 2^\circ\text{C pro A/T}$ ). Nach dem Abschluss aller Reaktionszyklen, wurde der Ansatz 10 min bei 72°C inkubiert, um unvollständig synthetisierte DNA-Stränge zu vervollständigen. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.1.5) analysiert und anschließend aus präparativen Agarosegelen extrahiert und somit gereinigt (siehe 2.1.6).

### 2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Um DNA an bestimmten Sequenzen spezifisch zu spalten, wurden Restriktionsendonucleasen in dem vom Hersteller (NEB, New England Biolabs) mitgelieferten Reaktionspuffer eingesetzt. Dabei wurden ca 1-2 U des entsprechenden Enzyms pro  $\mu\text{g}$  DNA verwendet. Für analytische Zwecke wurden die Ansätze 1 h, für präparative Zwecke 3-4 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (meist  $37^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Im Falle eines präparativen Ansatzes wurde die DNA über ein Agarosegel (siehe. 2.1.5) mit anschließender Gelextraktion (siehe. 2.1.6) aufgereinigt.

### 2.1.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-Proben wurden in horizontalen Agarosegelen (1%-2% (w/v) Agarose) elektrophoretisch nach Größe getrennt. Vor dem Gießen der Gele wurde die Agarose durch Aufkochen in *TAE-Puffer* gelöst. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde dem Agarosegel vor dem Erkalten  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid zugesetzt. Die Proben wurden in 5-fach *Auftragspuffer* aufgenommen. Nach dem Laden der Gele wurde die Elektrophorese in *TAE-Puffer* durchgeführt. Die dabei angelegte Spannung betrug je nach Gelgröße 80 – 150 V. Als Größenmarker wurde die 1kb bzw. die 100 Basenpaar (bp) DNA-Leiter von NEB (Beverly, USA) verwendet, um die Größe der DNA-Fragmente abzuschätzen.

*Auftragspuffer*            0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 5mM EDTA; 30 % (v/v) Glycerol pH 8,0

*TAE-Puffer*                40 mM Tris-Acetat; 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,5

### 2.1.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um die gewünschten DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu extrahieren, wurden die entsprechenden Banden mit einem in Ethanol gereinigten Skalpell ausgeschnitten und die Extraktion anschließend mit dem Gel-Extraktionskit *WizardSV Gel and PCR<sup>®</sup>Clean-UP System* (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt: Dazu wurde zu je 10 mg Gelgewicht in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß  $10 \mu\text{l}$  der mitgelieferten *Membrane Binding Solution* zugegeben, gevortext und anschließend bei  $50-65^\circ\text{C}$  unter Schütteln so lange inkubiert, bis sich das Agarosegelstück vollständig aufgelöst hatte. Die Lösung wurde in eine *SV Minicolumn* gegeben und nach einminütiger Inkubation bei 1 min ( $16.000 \text{ g}$ ; RT) abzentrifugiert. Anschließend wurde die an die *SV Minicolumn* gebundene DNA zweimal mit

700 µl bzw. 500 µl *Membrane Wash Solution* gewaschen, die Säule nach dem letzten Waschschrift mit einer einminütigen Zentrifugation (16.000 g; RT) getrocknet und die DNA mit 30 µl nucleasefreiem Wasser von der Säule eluiert.

### **2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentration von DNA wurde über die Absorbtion bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA.

### **2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren**

DNA- Fragmente (nach Restriktionsverdau; siehe 2.1.4) wurden in linearisierte Vektoren (nach Verdau mit den gleichen Enzymen) mit Hilfe von T4-DNA-Ligase ligiert. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden dabei 50-200 ng linearisierter Vektor und das zu inserierende DNA-Fragment in einem 2-4 molaren Überschuss in Ligationspuffer gegeben. Gewöhnlich wurde der Ansatz ca 2 h bei RT, aber auch ÜN bei 4°C inkubiert. Von diesem Ligationsansatz wurden dann ca. 1 µl für die Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen (siehe 2.1.9.2) verwendet.

*Ligationspuffer*      50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1 mM ATP; 5% (w/v) PEG 8000; pH 8,5

### **2.1.9 Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen**

#### **2.1.9.1 Präparation von elektrokompenten *E. coli* Zellen**

*E. coli* Zellen wurden zuerst über Nacht in flüssigem LB-Medium bei 37°C kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen 500 ml LB-Medium (Verdünnung: 1:100) angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen danach durch Zentrifugation für 15 min (4000 g; 4°C) geerntet. Anschließend wurden die Zellen zuerst in 500 ml, dann in 250 ml und in schließlich in 50 ml 10% Glycerin bei einer jeweils 15-minütigen Zentrifugation (4000 g; 4°C) gewaschen, in 500 µl 10% Glycerin resuspendiert und schließlich in 50 µl Aliquots bei -80°C weggefroren.

### 2.1.9.2 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation von *E. coli* Zellen wurden 1 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA mit 50 µl elektrokompetenter Zellen (siehe 2.1.9.1) gemischt. Anschließend wurden die Zellen in einer gekühlten Elektroporationsküvette mittels eines Elektroporationsapparates (Gene Pulser; Biorad) einem Stromstoß (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF) ausgesetzt (Dower et al., 1988; Miller et al., 1988). Anschließend wurde die Zellsuspension sofort in 1 ml LB-Medium verdünnt und die Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 30–45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.1.10 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Von dem zu transformierenden *S. cerevisiae*-Stamm wurde zuerst eine Vorkultur in entsprechendem Medium angeimpft und diese über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde diese auf eine OD<sub>595</sub> von 0,15 verdünnt und anschließend bei 30°C bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Aus dieser Kultur wurden 4 ml Zellen entnommen und in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 min (14000 g; RT) abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml H<sub>2</sub>O wurden die Hefezellen in 1 ml Lösung A resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 100 µl Lösung A resuspendiert; von dieser Zellsuspension wurden 50 µl für einen Transformationsansatz eingesetzt. Zu diesen 50 µl wurden 5 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) und die zu transformierende DNA (5-10 µl einer Plasmid-Midipräparation) zugegeben und dieser Ansatz in 300 µl Puffer B aufgenommen. Als Negativkontrolle wurden 5 µl H<sub>2</sub>O ohne DNA eingesetzt. Danach wurde der Ansatz durch Pipettieren gut gemischt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 42 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 30 sec bei 16000 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen auf entsprechende Selektivplatten plattiert. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert.

**LösungA**                    10 mM Tris; 100 mM LiAc; 1mM EDTA; pH 7,5

**LösungB**                    10 mM Tris; 100 mM LiAc; 1mM EDTA; 40% (w/v) PEG 4000; pH 7,5

### 2.1.11 DNA-Sequenzierung

Für die Bestimmung der Sequenz eines DNA-Fragments wurden entsprechende Mengen einer Plasmid-Midipräparation (siehe 2.1.1) und passender Oligonukleotide zu der Firma Medigenomix (Martinsried; Deutschland) verschickt. Diese führte die DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977) mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide durch. Die Programme DNAMAN (Version 4.22, Lynnon BioSoft., Pointe-Claire, Kanada) und Chromas (Version 1.45, Conor McCarthy, Southport, Australien) wurden zur Auswertung der erhaltenen DNA-Sequenzen verwendet.

### 2.1.12 Verwendete Vektoren und Klonierungsstrategien

In den Tabellen 2.1 und 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit einer kurzen Beschreibung und einer Referenz angegeben. Die Primer und Klonierungsstrategien zu den in dieser Arbeit klonierten Plasmide sind in den Unterpunkten 2.1.12.1. - 2.1.12.4 aufgeführt.

<b>Zur Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i></b>			
Name	Details	Ausgangsvektor	Referenz
pGEX-6P-1	Expression von GST in <i>E. coli</i>	pGEX-6P-1	GE Healthcare
pGEX-6P-1-Fcj1473-540	Zur Expression der N-terminal GST-getagten C-terminalen Domäne von Fcj1 in <i>E. coli</i>	pGEX-6P-1	Diese Arbeit

**Tabelle 2.1:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide-I

Name	Details	Ausgangsvektor	Referenz
<b>Zur Expression in <i>S. cerevisiae</i></b>			
pYX242-Fcj1 <sup>WT</sup>	Zur Expression von Fcj1 <sup>WT</sup>	pYX242	Diese Arbeit
pYX242-Fcj1 <sup>His12</sup>	Carboxyterminal His12-getagte Variante von Fcj1	pYX242	(Rabl et al., 2009)
pYX242-Fcj1 <sup>G52L</sup>	Punktmutation Glycin zu Leucin in der TMD von Fcj1	pYX242	Diese Arbeit
pYX242-Fcj1 <sup>Dld1-TM</sup>	Fcj1 mit TMD von Dld1	pYX242	Diese Arbeit
pYX242 Fcj1 <sup>Δ166-340His</sup>	Fcj1-Variante ohne Coiled Coil-Bereich	pYX242	Diese Arbeit
pYX242 Fcj1 <sup>1-472</sup>	Fcj1-Variante ohne C-terminaler Domäne	pYX242	Diese Arbeit
pYX142 Cytb21-167-Tim50132-476	Zur Klonierung von Cytb2-Fcj1 verwendet	pYX142	erhalten von M. Sichtung
pYX242 Fcj1 <sup>Cytb2</sup>	Zur Expression einer löslichen, im IMS lokalisierten Variante von Fcj1	pYX242	Diese Arbeit
pVT100U-mtGFP	Matrix-dirigierte Variante von GFP	pVT100U	(Westermann und Neupert, 2000)

**Tabelle 2.2:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide-II

**2.1.12.1 Verwendete Primer zur Klonierung des Vektors pGEX-6P-1-Fcj1473-540 zur Expression von Fcj1-Konstrukten in *E. coli***

Primer	Restrictionschnittstelle	Sequenz (5' - 3')
Fcj1473_fo	BamHI	CCC CGG ATC CCC TTC AAA TGC CAC GGA TTT CG
Fcj1_rev (XhoI)	XhoI	CCC CCT CGA GTC ACA ACG TCC TTA TTT CAC AGT CTT C

**Tabelle 2.3:** Primer für die Klonierung von Fcj1 (473-540) zur Expression in *E. coli*



2.1.12.2 Klonierungsstrategien für Vektoren zur Expression in *E. coli***Klonierung von pGEX-6P-1-Fcj1473-540**

Der DNA-Abschnitt für die Aminosäuren 473 bis 540 von Fcj1 wurden mittels PCR von pYX242-Fcj1<sup>His12</sup> (erhalten von Regina Steck) mit den Primern Fcj1\_473\_fo und Fcj1\_rev (XhoI) amplifiziert. Das resultierende PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pGEX-6P-1 (GE-Healthcare) kloniert.

2.1.12.3 Verwendete Primer zur Klonierung von Plasmiden zur Expression von Fcj1-Mutanten in *S. cerevisiae*

Primer	Restriktionsschnittstelle	Sequenz (5' - 3')
Fcj1_fo	NcoI	CCC CCC ATG GCA ATG CTA AGA ACT ACT GCC TCA CG
Fcj1_rev	XhoI	CCC CCT CGA GTC ACA ACG TCC TTA TTT CAC AGT CTT C
Fcj1His_rev	XhoI	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
Fcj1472_rev	XhoI	CCC CCT CGA GTC AAT TAC CTG TCT TTG TGA ATA AGA AAA GG
Fcj1His12_rev	XhoI	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
YMFDld_fo	-	CTA CTC TAT TCG GTT ATT TGT TCG CTT CGC AAA AAA ATG ACA AAT TTG GTG AC
YMFDld_rev	-	AGC GAA CAA ATA ACC GAA TAG AGT AGC TGA AGA GGC GAT GAC AGA GTA ATT GCG AAA TTT GTG CGA AGC C
YMFdCC_rev	HindIII	CCC CAA GCT TGA GGT TTG AGT CAT TTA GAC TGT TG
YMFdCC_fo	HindIII	CAA CAG TCT AAA TGA CTC AAA CCT CAA GCT TAA TAA CTT ACC CGA TGT GAA TAT CG
Fcj1N57_fo	BamHI	CCC CGG ATC CTC GCA AAA AAA TGA CAA ATT TGG TGA C
Fcj1G52L_fo	AvrII	CAG CGA CAG CTT TCT ACG CCC TAG GTA TCA TAT ATT CGC AAA AAA ATG
Fcj1G52L_rev	AvrII	CAT TTT TTT GCG AAT ATA TGA TAC CTA GGG CGT AGA AAG CTG TCG CTG

**Tabelle 2.4.:** Primer für die Klonierung von Fcj1-Konstrukte zur Expression in *S. cerevisiae*

### 2.1.12.4 Klonierungsstrategien für Vektoren zur Expression von Fcj1-Mutanten in *S. cerevisiae*

#### **Klonierung von Fcj1<sup>WT</sup> in pYX242**

Volllängen-Fcj1 wurde mittels PCR von pYX242-Fcj1<sup>His12</sup> (erhalten von Regina Steck) mit den Primern Fcj1<sub>fo</sub> und Fcj1<sub>rev</sub> amplifiziert. Das resultierende PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* in den Vektor pYX242 (Novagen) kloniert.

#### **Klonierung von Fcj1<sup>1-472</sup> in pYX242**

Fcj1<sup>1-472</sup> wurde mittels PCR von pYX242-Fcj1<sup>His12</sup> (erhalten von Regina Steck) mit den Primern Fcj1<sub>fo</sub> und Fcj1<sup>472</sup><sub>rev</sub> amplifiziert. Das resultierende PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* in den Vektor pYX242 (Novagen) kloniert.

#### **Klonierung von Fcj1<sup>G52L</sup> in pYX242**

Mit den Primern Fcj1<sub>fo</sub>/ Fcj1<sup>G52L</sup><sub>rev</sub> und Fcj1<sup>G52L</sup><sub>fo</sub>/ Fcj1<sub>rev</sub> und dem Plasmid pYX242-Fcj1<sup>wt</sup> (diese Arbeit) als Template wurden zuerst zwei DNA-Teilfragmente amplifiziert. Die Nucleotid-Sequenz von Fcj1 wurde in den beiden Primern Fcj1<sup>G52L</sup><sub>rev</sub> und Fcj1<sup>G52L</sup><sub>fo</sub> so verändert, dass zum einen an der Position 52 die Aminosäure Glycin mit Leucin getauscht, zum anderen durch stille Mutation eine zusätzliche AvrII-Schnittstelle eingefügt wurde. Die beiden Teilstücke wurden anschließend über die Restriktionsschnittstellen *NcoI*/AvrII bzw. AvrII/*XhoI* in den Vektor pYX242 (Novagen) kloniert.

#### **Klonierung von Fcj1<sup>Dld1-TM</sup> in pYX242**

Mit den Primern Fcj1<sub>fo</sub>/ YMF<sup>Dld</sup><sub>rev</sub> und YMF<sup>Dld</sup><sub>fo</sub>/ Fcj1<sub>rev</sub> wurden zuerst durch PCR auf genomischer DNA aus *S. cerevisiae* zwei DNA-Teilfragmente amplifiziert. In einer Fusions-PCR wurden die beiden DNA-Fragmente in gleichen Mengen als Template zusammen mit den beiden Primern Fcj1<sub>fo</sub> und Fcj1<sub>rev</sub> eingesetzt. Das entstehende Fragment wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen *NcoI*/*XhoI* in den Vektor pYX242 (Novagen) kloniert.

#### **Klonierung von Fcj1<sup>Δ166-340</sup> (=Fcj1<sup>ΔCoiledCoil</sup>) in pYX242**

Mit den Primern Fcj1<sub>fo</sub>/ YMF<sup>dCC</sup><sub>rev</sub> und YMF<sup>dCC</sup><sub>fo</sub>/ Fcj1<sup>His12</sup><sub>rev</sub> und dem Plasmid pYX242Fcj1<sup>His12</sup> (erhalten von Regina Steck) wurden zuerst die beiden DNA-

Teilfragmente Fcj1(1-165) und Fcj1(367-542) amplifiziert. Die beiden Teilstücke wurden anschließend nacheinander über die Restriktionsschnittstellen NcoI/HindIII bzw. HindIII/XhoI in den Vektor pYX242 (Novagen) kloniert.

### **Klonierung von Fcj1Cytb<sub>2</sub> in pYX242**

Das Teilfragment Cytb<sub>2</sub> 1-167 wurde aus dem Plasmid pYX142Cytb<sub>2</sub>1-167-Tim50132-476 mit den Restriktionsschnittstellen EcoRI/BamHI in den Vector pYX242 (Novagen) umklont. Anschließend wurde das DNA-Fragment Fcj1(57-540), amplifiziert mit den Primern Fcj1\_N57\_fo und Fcj1\_rev und genomischer DNA aus *S.cerevisiae* als Template, mit den Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in das Plasmid pYX242-Cytb<sub>2</sub> 1-167 kloniert.

**2.2 Methoden der Hefegenetik****2.2.1 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae***

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
W303 $\alpha$	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2-1, his3-11, 15 leu2, 112 trp1, ura23-53, can1-100</i>	(Rothstein und Sherman, 1980)
$\Delta$ <i>fcj1</i> (W303)	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2-1, leu2, 112 trp1 ura23-53, can1-100, FCJ1::his3MX6</i>	Regina Steck
$\Delta$ <i>su e</i> (W303)	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2-1, leu2, 112 trp1 ura23-53, can1-100, SU E::his3MX6</i>	Regina Steck
YPH499	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101 his3-<math>\Delta</math>200 leu2- <i>trp1</i>-<math>\Delta</math>63 <i>ura3-52 lys2-801</i></i>	(Sikorski und Hieter, 1989)
$\Delta$ <i>fcj1</i>	YPH499; <i>fcj1::His3</i>	(Harner et al., 2011)
$\Delta$ <i>mcs10</i>	YPH499, <i>ycl057c-a::His3</i>	(Harner et al., 2011)
$\Delta$ <i>mcs29</i>	YPH499, <i>ygr235c::His3</i>	(Harner et al., 2011)
$\Delta$ <i>mcs27</i>	YPH499, <i>ynl100w::His3</i>	(Harner et al., 2011)
$\Delta$ <i>mcs19</i>	YPH499, <i>yfr011c::His3</i>	(Harner et al., 2011)
$\Delta$ <i>mcs12</i>	YPH499, <i>ybr262c::His3</i>	(Harner et al., 2011)
Fcj1-3HA	YPH499; <i>fcj1::FCJ1-3HA-HIS3</i>	(Harner et al., 2011)
Mcs10-3HA	YPH499, <i>ycl057c-a::YCL027C-A -3HA-HIS3</i>	(Harner et al., 2011)
Mcs29-3HA	YPH499, <i>ygr235c::YGR235C-3HA-HIS3</i>	(Harner et al., 2011)
Mcs27-3HA	YPH499, <i>ynl100w::YNL100W-3HA-HIS3</i>	(Harner et al., 2011)
Mcs19-3HA	YPH499, <i>yfr011c::YFR011C-3HA-HIS3</i>	(Harner et al., 2011)
Mcs12-3HA	YPH499, <i>ybr262c::YBR262C-3HA-HIS3</i>	(Harner et al., 2011)
Mcs10 <sup>His6</sup> /McsWT	YPH501, <i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 lys2-801/lys2-801 ade2-101/ade2-101 trp1-<math>\Delta</math>63/trp1-<math>\Delta</math>63 his3-<math>\Delta</math>200/his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1/leu2-<math>\Delta</math>1 Mcs10His6-HIS3/-</i>	Diese Arbeit (D. Mokranjac)
GAL-His8-Tob38	YPH499, <i>tob55::HIS3-pGAL-His8-TOB55</i>	Waizenegger et al., 2004
GAL-His8-Tob55	YPH499, <i>tob38::HIS3-pGAL-His8-TOB38</i>	(Paschen et al., 2003)

**Tabelle 2.5.:** In dieser Arbeit verwendete Hefestämme von *S. cerevisiae*

### 2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefestämmen wurde im Wesentlichen nach Standardprotokollen (Guthrie und Fink, 1991) durchgeführt. Als Standardmedien für Flüssigkulturen wurden YPD als fermentierbare Kohlenstoffquelle und Laktat-Medium als nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle verwendet. Bei der Selektion auf Plasmide mit bestimmten Markergenen wurden Selektivmedien mit den gleichen Kohlenstoffquellen verwendet, jedoch fehlten die entsprechenden Markeraminosäuren oder Markerbasen. In Flüssigkultur wurden die Stämme bei 140 rpm und 30 °C bzw 24°C geschüttelt.

Die Glycerolstammkulturen wurden hergestellt, indem Zellen eines Stammes direkt von einer Agarplatte mit einer Impföse in sterilem 15 % (v/v) Glycerol suspendiert wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.3 Analyse des Wachstumsphänotyps auf fermentierbarer und nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle

Die Analyse des Wachstums wurde mit dem sogenannten Tüpfeltest durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme in nicht fermentierbarem Medium (meist SLac-Minimalmedium) über drei Tage hinweg mehrfach passagiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kultur eine OD<sub>578</sub> von 1,5 nicht überschritt. Die Kulturen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden anschließend auf eine OD<sub>578</sub> von 0,30 in Minimalmedium verdünnt und dann fünf 1:5 Verdünnungsschritte gemacht. Von den einzelnen Verdünnungsschritten wurden jeweils 3 µl auf die entsprechende Platte getropft. Nach zwei- bis dreitägiger Inkubation bei 24°C, wurde das Wachstum ausgewertet.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Gesamtproteinpräparation aus *S. cerevisiae* durch alkalische Lyse

Die Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe erfolgte durch alkalische Lyse. Dazu wurden aus Flüssigkultur Zellen entnommen, die einer OD<sub>578</sub> von 1-2 entsprachen. Die Hefezellen wurden sedimentiert und dann in 250 µl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 50 µl *Lysepuffer* versetzt, gevortext und anschließend 10 min auf Eis inkubiert (modifiziert nach (Yaffe und Schatz, 1984)). Durch Zugabe von 220 µl 72 % (w/v) TCA wurden die Proteine gefällt und nach einer Inkubation von 15 min auf

Eis in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (15 min; 16300 g; 4°C) sedimentiert. Das Präzipitat wurde mit 1 ml Aceton (-20°C) gewaschen, bei 30°C getrocknet, in Lämmli-Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95°C gekocht.

*Lysepuffer*                    1,85 M NaOH; 7,4 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 20 mM PMSF

### 2.3.2 Präparation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Für die Präparation von Mitochondrien aus Hefe wurde zuerst eine 50 ml Vorkultur in 30°C angesetzt. Stämme ohne Plasmid wurden in Lactat, mit Plasmid in Selektivmedium (SLac) hochgezogen. Für die Subfraktionierung von Mitochondrien (siehe 2.3.3) wurden die Stämme W303 $\alpha$  WT, und W303 $\alpha$   $\Delta Fcjl$  bei 24°C hochgezogen. Die Vorkultur wurde mehrmals auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 – 0,25 verdünnt und dabei das Volumen der Kultur stetig vergrößert. Die Hauptkultur hatte ein Volumen von 6 – 18 l und wurde über Nacht bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,75 - 1,3 bei 30°C inkubiert.

Die Mitochondrienpräparation erfolgte nach der Methode von Daum (Daum et al., 1982). Bei der gewünschten OD<sub>578</sub> wurden die Hefezellen zuerst in einem JLA8.1000-Rotor (Avanti J-20 XP Zentrifuge von Beckman) abzentrifugiert (4000 g; 5min; RT), das Zellpellet in Wasser resuspendiert und durch Zentrifugation in einem JA10-Zentrifugationsbecher (JA 10 Rotor, Avanti J-25 Zentrifuge von Beckman) (1500 g; 5min; RT) gewaschen. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes der Zellen wurden diese in 2 ml *DTT-Puffer* pro Gramm Zellen resuspendiert und anschließend unter leichtem Schütteln (130 rpm) 10 min bei 30°C inkubiert. Nach der Reisolation der Zellen (1500 g; 5 min) wurden diese in 1 ml *Sorbitolpuffer* je 0,15 g Zellen gewaschen. Um die Zellwände enzymatisch aufzuschließen, wurden die Zellen in *Zymolyase-Puffer* (3 mg Zymolyase pro g Feuchtgewicht) in einer Konzentration von 0,15 mg/ml pro Feuchtgewicht aufgenommen und unter leichtem Schütteln 30 – 60 min bei 30°C inkubiert. Die Sphäroblastenbildung wurde anschließend durch osmotische Lyse verfolgt.

Die folgenden Schritte erfolgten auf Eis: Zuerst wurden die Sphäroblasten mittels einer weiteren Zentrifugation (1500 g; 5 min; 4°C) reisoliert und in 1 ml *Homogenisierungspuffer* je 0,15 mg Frischgewicht resuspendiert. Die Sphäroplasten wurden mit einem Dounce-Homogenisator durch zehn Stöße geöffnet. Nicht geöffnete Zellen und Zelltrümmer wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (2000 g; 5 min) abgetrennt und die Mitochondrien durch Zentrifugation (17400 g; 12 min) sedimentiert und diese in 10 ml HS-Puffer resuspendiert. Um die Reinheit der Mitochondrien weiter zu verbessern, wurde noch einmal zentrifugiert

(2000 g; 5 min) und die Mitochondrien aus dem Überstand isoliert (17400 g; 12 min). Das Pellet wurde anschließend in einem kleinen Volumen HS-Puffer aufgenommen, die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt and schließlich in kleinen Portionen in Stickstoff weggefroren und bei -80°C gelagert.

<b>DTT-Puffer</b>	100 mM Tris/Base; 10 mM DTT
<b>Sorbitolpuffer</b>	1,2 M Sorbitol; 20 mM $KP_i$ ; pH 7,4
<b>Zymolyase-Puffer</b>	1,2 M Sorbitol; 20 mM Kaliumphosphat; pH 7,4
<b>Homogenisierungspuffer</b>	10 mM HEPES; 1 mM EDTA; 0,2 % (w/v) fettsäurefreies BSA; 1 mM PMSF; 0,6 M Sorbitol; pH 7,4

### 2.3.3 Subfraktionierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Um Vesikel aus reiner Außenmembran, reiner Innenmembran und Vesikel bestehend aus beiden zu generieren und anschließend aufzutrennen, wurde das Protokoll von Pon L. *et al.* (1989) modifiziert (Harner et al., 2011).

Die Hefezellen wurden bei 24°C kultiviert und die Mitochondrien nach deren Isolierung (siehe 2.3.2) in *SM-Puffer* resuspendiert. Frisch isolierten Mitochondrien wurden zuerst in *hypotonischem Puffer* 30 min auf Eis geschwollen. Anschließend wurden die Mitochondrien nach Zugabe von 5 ml 2,5 M Saccharose 15 min unter schwachem Rühren geschrumpft. Danach wurden die Proben auf Eis zur Bildung von Membranvesikeln sonifiziert (3 x 30 sek. mit 30 sekundiger Unterbrechung; Output Control: 0; Duty Cycle: 60%). Um noch intakte Mitochondrien und nicht vesikuläres Zellmaterial von den Membranvesikeln abzutrennen, wurde die Probe 20 min (20000 g; 4°C) zentrifugiert. Anschließend wurde davon der die Vesikel enthaltende Überstand über 200  $\mu$ l 2,5 molare Saccharose geschichtet und dann 100 min (118000 g; 4°C) zentrifugiert, um die Membranvesikel auf dem Saccharosekissen zu konzentrieren. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand davon vorsichtig bis knapp über die Membranvesikel abgenommen, die Vesikelfraktion resuspendiert und anschließend zur Homogenisation der Vesikel in einem Minipotter 10 mal gepottert. Die Saccharosekonzentration wurde nun mit einem Refraktometer bestimmt und anschließend mit 2,5 M Saccharose bzw. mit H<sub>2</sub>O auf eine Saccharosekonzentration von 1,3 M eingestellt. Dies wurde nun unter einen linearen Saccharose-Gradienten (0,8 M bis 1,25 M Saccharose; einschließlich 20 mM MOPS pH 7,4 und 0,5 mM EDTA) geschichtet und anschließend zentrifugiert (200.000 g; 24h; 4°C), um Membranvesikel nach der Dichte aufzutrennen.

Der Gradient wurde nun in 0,5 ml-Fractionen fraktioniert und von jeder Fraktion die Saccharosekonzentration bestimmt, um die Linearität des Gradienten zu überprüfen. Anschließend wurden die Proteine in den Fraktionen 2 Mal mit TCA gefällt (siehe 2.4.11). Zum Schluss wurden die Proben in 60 µl Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und gekocht. Die Proben wurden nach SDS-PAGE-Lauf und Blotting mittels Immundekoration analysiert.

### ***Hypotonischer Puffer***

*20 mM MOPS; 0,5 mM EDTA; 10 mM PMSF und Protease Inhibitor Cocktail (Roche); pH 7,4*

### **2.3.4 Digitoninfraktionierung von Hefemitochondrien**

Um die Sublokalisierung mitochondrialer Proteine zu ermitteln, wurden zuerst Mitochondrien aus dem entsprechenden Hefestamm isoliert (siehe 2.3.2). Zuerst wurden 2 mg Mitochondrien in 1800 µl HS-Puffer resuspendiert. Lösungen mit Digitoninkonzentrationen von 0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, bzw 0,1% (w/v) Digitonin wurden aus einer 10 % (w/v) Stammlösung und HS-Puffer hergestellt. Davon wurden jeweils 10 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Zu den Digitoninlösungen wurden jeweils 190 µl der zuvor hergestellten Mitochondrienresuspension und 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) gegeben und anschließend vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 25 min auf Eis inkubiert. Der Proteinabbau von Proteinase K wurde anschließend durch Zugabe von 5 µl 200 mM PMSF abgestoppt. Die Mitochondrien wurden nach einer Inkubation von 5 min durch Zentrifugation (13.000 g; 10 min; 4°C) pelletiert und in 300 µl HS-Puffer (+1 mM PMSF) gewaschen, ohne das Pellet zu resuspendieren. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Mitochondrien in 300µl HS-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 60 µl 72 % (w/v) TCA wurden die Proteine präzipitiert und anschließend wie unter 2.4.11 beschrieben weiter verfahren. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte nach SDS-PAGE (siehe 2.4.7) und Blotting (siehe 2.4.9) durch Immundekoration (siehe 2.4.12).

### **2.3.5 Alkalische Extraktion von Proteinen aus mitochondrialen Membranen**

Die Assoziation von Proteinen mit den mitochondrialen Membranen wurde durch alkalische Extraktion untersucht. 100 µg isolierter Mitochondrien wurden zuerst in HS-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und anschließend mit dem gleichen Volumen Natriumkarbonat (0,2 M) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben 30 min (91000 g; 4°C) in einem TLA45-Rotor (Beckman Optima Ultrazentrifuge)



zentrifugiert. Die sedimentierte Membran-Fraktion wurde in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Proteine im Überstand wurden mit TCA gefällt (siehe 2.4.11) und anschließend in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Gleiche Mengen von Membran-Fraktionen und löslichen Proteinen wurden mittels SDS-PAGE (siehe 2.4.7), Blotting (siehe 2.4.9) und Immundekoration (vgl. 2.4.12) analysiert.

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

### 2.3.6 Membranflotation

Die Membranassoziation von Proteinen wurde auch durch ein „Membraneflotations“-Experiment untersucht. Dazu wurden zuerst wie unter 2.3.5 beschrieben eine alkalische Extraktion durchgeführt und nach 30-minütiger Inkubation auf Eis die Probe mit einer 2,4 M Saccharoselösung (+ 20 mM HEPES) auf eine Saccharoseendkonzentration von 1,7 M verdünnt. Diese Probe wurde anschließend unter einen Saccharose-Stufengradienten geschichtet (20 mM HEPES pH 7,4 mit 1,4 M und 0,25 M Sacchrose) und 3 h (90000 g; 4°C) zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die Bodenfraktion (= Lösliche Fraktion) und die obersten 100 µl (Membranfraktion) abgenommen, TCA gefällt (siehe 2.4.11) und nach SDS-PAGE (siehe 2.4.7) und Blotting (siehe 2.4.9) mittels Immundekoration untersucht (siehe 2.4.12).

### 2.3.7 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Morphologie von Mitochondrien in lebenden Hefezellen zu untersuchen, wurden Hefestämme verwendet die mitochondrial lokalisiertes GFP (grün-fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*) exprimierten. Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme mit dem Plasmid pVT100U-mtGFP (siehe 2.1.12) transformiert und die Stämme in SLac-Selektivmedium einschließlich 0,2 % Glukose kultiviert. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop und dem dazugehörigen Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan-Neofluar, 100X, numerische Apertur 1,3) durchgeführt. Aufnahmen der untersuchten Zellen erfolgten mit einer CCD-Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss, Jena). Die Steuerung von Mikroskop und Kamera erfolgte mit Hilfe der AxioVision AC Software (Carl Zeiss, Jena). Für die Analyse von GFP wurde Filtersatz Nr. 38 HE angewandt (Anregung: 440 bis 470 nm, Emission: 525 bis 550 nm) (Heim and Tsien, 1996).

### 2.3.8 Chemische Fixierung von Hefezellen

In dieser Arbeit wurden Hefezellen mit zwei unterschiedlichen elektronenmikroskopischen Methoden untersucht: Zum Einen wurden chemisch fixierte Zellen cryoelektronenmikroskopisch, zum Anderen wurden die fixierten Zellen in Kunstharz eingebettet und nach Schneiden elektronenmikroskopisch untersucht.

#### 2.3.8.1 Chemische Fixierung von Hefezellen zur cryoelektronenmikroskopischen

##### Untersuchung

Vor der elektronenmikroskopischen Analyse von Hefezellen wurden diese zunächst fixiert. Von einer frischen Agarplatte wurde eine Hefekultur in Laktatmedium angeimpft und bei 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde mindestens zwei Tage kultiviert. Dabei wurde ein Übergang der Kultur in die stationäre Phase durch wiederholtes Verdünnen der Kultur vermieden. Anschließend wurde eine 50 ml Hauptkultur bis zu einer OD<sub>578</sub> zwischen 0,5 und 0,8 wachsen gelassen und der pH-Wert des Kulturmediums bestimmt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1700 g; 5min; 30°C) geerntet und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml auf 30°C temperiertem *Fixierungspuffer*, dessen pH-Wert mit Natronlauge an denjenigen des Kulturmediums angepasst worden war, aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation bei 30°C wurden die fixierten Zellen zweimal mit 10 ml *Citratpuffer* gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in *Citratpuffer* resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde zur Vermeidung von Luftblasen mit *Citratpuffer* komplett gefüllt und anschließend die Zellen 1 min in einer Tischzentrifuge (9000 g; 3 min RT;) zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C, der Transport bei RT.

<i>Fixierungspuffer</i>	50 mM Zitronensäure; 50 mM Natriumcitrat; 4 % Formaldehyd; 0,5 % Glutaraldehyd
<i>Citratpuffer</i>	50 mM Zitronensäure; 50 mM Natriumcitrat

### 2.3.8.2 Chemische Fixierung von Hefezellen zur Einbettung in Kunstharz

Dazu wurden Hefezellen wie unter Abschnitt 2.3.8.1 beschrieben kultiviert und 50 ml der Hauptkultur 5 min zentrifugiert (3000 g, RT). Das Zellpellet wurde in 10 ml 2,5%-iger Saccharoselösung gewaschen und anschließend in 1 ml, auf 30°C temperiertem *Fixierpuffer*, aufgenommen. Nach zweistündiger Inkubation bei 30°C wurden die fixierten Hefezellen einmal in 1 ml *DTT-Puffer* gewaschen und anschließend 10 min in demselben Puffer bei 30°C inkubiert. Die Hefezellen wurden in *Sorbitol-Puffer* gewaschen und schließlich 30 min in 0,5 ml desselben Puffers, dem Zymolyase (5 mg/ml) und Glucoronidase (0,05 mg/ml) zugegeben wurden, inkubiert, um die Zellwand zu öffnen. Schließlich wurden die Zellen einmal in 1 ml *Kakodylatpuffer* gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

<i>Fixierpuffer</i>	0,15 M Natriumkakodylat pH 6,8, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5% Saccharose, 3% Glutaraldehyd; pH 6,8
<i>DTT-Puffer</i>	100 mM Tris/HCl; 1,2 M Sorbitol 25 mM DTT; 5 mM Na <sub>2</sub> -EDTA; pH 8,0.
<i>Sorbitol-Puffer</i>	1,2 M Sorbitol; 0,1 M K-Phosphat/Zitronensäure pH 5,8
<i>Kakodylatpuffer</i>	0,15 M Natriumkakodylat, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5% Saccharose; pH 6,8

### 2.3.9 Elektronenmikroskopie

#### 2.3.9.1 Cryoelektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie von Cryoschnitten chemisch fixierter Hefezellen wurde zum einen von Dr. Frank Vogel (Berlin), zum anderen von Miguel Barrera und Katharina Eydt am Labor von Prof. Dr. Andreas Reichert in Frankfurt durchgeführt und erfolgte nach der Methode von Tokuyasu (Tokuyasu, 1989). Fixierte Zellen (siehe 2.3.8.1) wurden mit PBS gewaschen, anschließend 1 h in Natriummetaperiodat inkubiert und schließlich für 2-3 h bei 30 °C mit 25 % Polyvinylpyrrolidon (K15/MW 10000) in 1,6 M Saccharose getränkt. Die Zellsuspension wurde auf die Probenhalterungen aufgetragen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von den Zellen wurde bei -115 °C an dem Ultramikrotom Ultracut S (Leica) bzw. Leica EM UC6 Cryoschnitte hergestellt. Die ultradünne Cryoschnitte wurden mit Diamantmessern hergestellt und zum Schluss auf Formvar- oder Kohlenstoffbeschichtete

Kupferblenden (200 Maschen, hexagonal) überführt. Die Analyse erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

### **2.3.9.2 Elektronenmikroskopie von in Kunstharz eingebetteten Hefezellen**

Chemisch fixierte Zellen wie unter 2.3.8.2. beschrieben wurden 3 min (1000 g; RT) zentrifugiert und anschließend in 1 % Thiocarbohydrazid bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen zweimal in dH<sub>2</sub>O gewaschen und jeweils 6 min in 1 % OsO<sub>4</sub> und 1 % Kaliumferrocyanid bei RT gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen viermal in dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in aufeinanderfolgenden Waschschritten in Ethanol dehydriert, zweimal in Propylenoxid gewaschen und in Araldit (Araldit-Kit CY-212 (Serva)) eingebettet. Dünnschnitte mit einer Dicke von 45 nm wurden am Ultracut E (Fa. Reichert Jung) angefertigt und auf Kupfergrids überführt. Anschließend wurden die Schnitte durch aufeinanderfolgende jeweils 5-minütige Inkubation in Uranylacetat- und Bleinitratlösung kontrastiert. Die Analyse erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (CM 10, Philips bzw. EM 900, Zeiss).

## **2.4 Methoden der Proteinbiochemie**

### **2.4.1 Expression von GST-Fcj1473-540 in E. coli**

Nach der Transformation des Plasmids pGEX-6P-1-Fcj1473-540 in BL21 (DE3) pLysS-Zellen (Stratagene) wurden die frisch transformierten Zellen direkt in 50 ml LB-Medium, welches 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol enthielt, überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden 3 l LB<sub>Amp, Cam</sub> in einem Verhältnis von 1:60 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,3 geschüttelt. Anschließend wurden die Kolben in einen auf 24°C vortemperierten Schüttler gestellt, bis zu einer OD<sub>578</sub> von ca 0,55 geschüttelt und schließlich die Expression des GST-Fcj1-Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Nach einer Expressionsdauer von vier Stunden bei 24°C wurde die Kultur durch eine zehnminütige Zentrifugation (2580 g; 4°C) in geerntet, das Zellpellet gewaschen und nach einem weiteren 10 min Zentrifugationsschritt (2580 g; 4°C) schließlich weggefroren.



Aufgereinigtes Protein (siehe 2.4.2) wurde zuerst in einem Zentrikon (Millipore) mit einem MWCO von 10 kDa auf ein Volumen von 500µl aufkonzentriert und anschließend auf eine äquilibrierte (1,5 Säulenvolumen *Laufpuffer A*) Superdex 75-Säule (GE Healthcare) an einem Äkta-Chromatographie-System geladen.

*Laufpuffer A*                                20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7.0

### 2.4.4 Affinitätsreinigung an GST-Fcj1473-540

Um Interaktionspartner der C-terminalen Domäne von Fcj1 (Aminosäuren 473-540) zu identifizieren, wurden Mitochondrien in detergenzhaltigem Puffer solubilisiert. Anschließend wurde das Lysat mit GST-Fcj1473-540-Protein, das an GSH-Beads gekoppelt war (GSH-GST-Fcj1473-540), inkubiert. Als Negativkontrolle wurden lysierte Mitochondrien mit GSH-GST-Beads inkubiert.

Dazu wurden BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) aus einer 50 ml-Kultur, die GST bzw. GST-Fcj1473-540 exprimierten, in 1 ml *Puffer C* resuspendiert und anschließend mittels Sonifizierung geöffnet. Nach einem Zentrifugationsschritt (16.000 g; 4°C; 15 min) wurde der Überstand mit 50 µl GSH-Beads, äquilibriert mit 2 ml *Puffer D*, 30 min bei 4°C inkubiert und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt fünfmal in jeweils 1 ml *Puffer D* gewaschen.

1 mg Mitochondrien, isoliert aus dem Wildtyp bzw.  $\Delta fcj1$ -Stamm, wurden in einem Protein/ Detergenzverhältnis von 1/1 30 min in *Puffer Sol.* (Verhältnis Mitochondrien/Triton 1/1 (w/w)) auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand zu den äquilibrierten GSH-GST-Fcj1473-540-Beads gegeben und nach Zugabe von gleichem Volumen *Puffer C* (Endkonzentration Triton-X-100: 0,5%) 30 min unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads vier Mal mit je 1 ml *Puffer D* gewaschen und schließlich das Protein durch 5-minütiges Kochen (95°C) in Lämmli-Probenpuffer von den Beads eluiert. Das Ergebnis wurde nach SDS-PAGE (siehe 2.4.7) und Blotting (siehe 2.4.9) mittels spezifischer Antikörper (siehe 2.4.12) gegen ausgewählte Proteine analysiert.

*Puffer C*                                        30 mM HEPES; 150 mM KAc; 2 mM  $\epsilon$ -Caprionsäure; 1 mM PMSF; 0,5 mM EDTA; pH 7,4

*Puffer D*                                        30 mM HEPES; 150 mM KAc; 2 mM  $\epsilon$ -Caprionsäure; 1 mM PMSF; 0,5 mM EDTA; 0,05 % Triton-X-100; pH 7,4

**Puffer Sol.** 30 mM HEPES; 150 mM KAc; 2mM  $\epsilon$ -Caprionsäure; 1 mM PMSF; 0.5 mM EDTA; protease Complete Proteaseinhibitorcocktail (Roche); 1% TritonX-100; pH 7.4

### 2.4.5 Affinitätsfällung mittels Ni-NTA-Agarose

Isolierte Mitochondrien von Hefe-Stämmen, die His-getagte Varianten von mitochondrialen Proteinen exprimierten, wurden zur Kopräzipitation von Interaktionspartnern mittels Ni-NTA-Agarose-Beads verwendet. Dazu wurden 1 mg isolierte Mitochondrien 30 min auf Eis in triton- oder digitoninhaltigem (*Lysepuffer-T* bzw. *Lysepuffer-D*) solubilisiert, (Verhältnis Mitochondrien/Detergenz 1/1 (w/w)) und nicht vollständig solubilisiertes Material abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 5% zur Kontrolle abgenommen und in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen, das restliche Material 30 min bei 4°C mit 40 $\mu$ l Ni-NTA-Beads, welche zuvor mit *Puffer W-T* bzw. *Puffer W-D* äquilibriert wurden, inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose viermal mit *Puffer W* gewaschen und gebundenes Protein mit 2 x Lämmli-Probenpuffer (+ 300 mM Imidazol) eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE-Lauf, Blotting und Immundekoration analysiert.

**Lysepuffer-T** 30 mM HEPES ;150 mM KAc; 2 mM  $\epsilon$ -Caprionsäure; 1 mM PMSF; 1 % Triton-X-100; pH 7,4

**Puffer W-T** 30 mM HEPES; 150 mM KAc; 2 mM  $\epsilon$ -Caprionsäure; 1 mM PMSF; 0,05 % Triton-X-100; pH 7,4

**Lysepuffer-T** 50 mM K- KP<sub>i</sub>; 50 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 % Digitonin; pH 7,4

**Puffer W-T** 50 mM K- KP<sub>i</sub>; 50 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 % Digitonin; pH 7,4

### 2.4.6 Größenausschlusschromatographie von lysierten Mitochondrien

Um die Größe von Proteinkomplexen aus Hefe-Mitochondrien zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien aus Hefe in *Digitoninpuffer* 20 min auf Eis solubilisiert. In einem Zentrifugationsschritt (15 min; 16.000 g; 4°C) wurde nicht solubilisiertes und unlösliches Material abgetrennt und der Überstand auf eine Superose 6-Säule (GE) aufgetragen. Die Proteine wurden mit 1,2 Säulenvolumen *Laufpuffer B* eluiert Das Eluat wurde in 500  $\mu$ l-Fractionen gesammelt, TCA-gefällt (siehe 2.4.11) und nach anschließender PAGE (siehe 2.4.7) und Blotting (siehe 2.4.9) mittels Immun-dekorationen (siehe 2.4.12) analysiert.

**Digitoninpuffer**      30 mM HEPES; 100 mM KAc; 5 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1% Digitonin; pH 7,4.

**Laufpuffer B**      30mM Hepes; 150 mM KAc pH 7.4; 5 mM EDTA; 1mM PMSF, 0.1% Digitonin; pH 7,4

### 2.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)

Proteine wurden aufgrund ihrer Größe mittels einer vertikalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das Gel setzte sich dabei aus *Bodengel* (1 x 15 x 0,1 cm), *Trenngel* (9 x 15 x 0,1 cm) und *Sammelgel* (2 x 15 x 0,1 cm) zusammen. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel richtete sich dabei nach der Größe der zu trennenden Proteine.

**Bodengel:**              20% (w/v) Acrylamid,                      0,4% (w/v) Bisacrylamid,  
375 mM Tris-HCl, pH 8,8,                      0,1% (w/v) SDS,  
0,05% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS),  
0,25% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)

**Trenngel:**              8-16% (w/v) Acrylamid,                      0,16-0,33% (w/v) Bisacrylamid,  
380 mM Tris-HCl, pH 8,8,                      0,1% (w/v) SDS,  
0,05% (w/v) APS

**Sammelgel:**              5% (w/v) Acrylamid,                      0,1% (w/v) Bisacrylamid,  
60 mM Tris-HCl, pH 6,8,                      0,1% (w/v) SDS,  
0,05% (w/v) APS,                      0,1% (v/v) TEMED

**Elektrophorese-  
puffer:**                      384 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl; pH 8,3.

Die aufzutragenden Proben wurden in 1 x Lämmli-Probenpuffer gelöst und 5 min auf 95°C erhitzt. Bis zum Einlaufen der Lauffront in das Trenngel liefen die Gele bei 25 mA, anschließend bei 30 mA – 35 mA für ca. 1,5 bis 2 weitere Stunden. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine entweder mit Coomassie (siehe 2.4.8) gefärbt oder auf eine Nitrocellulose bzw PVDF-Membran transferiert (siehe 2.4.9).



*1 x Lämmli-Probenpuffer*      60 mM Tris-HCl; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 60 mM Tris-HCl; pH 6,8

### 2.4.8 Coomassie-Färbung von Gelen

Nach der SDS-PAGE wurde zuerst das Boden- und das Sammelgel von dem Trenngel entfernt. Anschließend wurde das Trenngel in einem *Färbebad* 30 min lang inkubiert. Schließlich wurde das Gel so lange in einem *Entfärberbad* unter Schütteln entfärbt, bis die Proteinbanden vor einem klaren Hintergrund sichtbar waren.

*Färbebad*                              0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250; 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure; 50 % (v/v) H<sub>2</sub>O

*Entfärberbad*                        30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 60% (v/v) H<sub>2</sub>O

### 2.4.9 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen

Proteine, aufgetrennt durch SDS-PAGE, wurden mittels Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran (Towbin et al., 1979) transferiert (Blotting).

Zuerst wurde ein in Blotpuffer getränktes Whatman Filterpapier auf die Graphitelektrode (Anode) platziert. Darauf wurde die Nitrocellulosemembran gegeben, die zuvor in Blotpuffer gelegt wurde. Anschließend wurde auf die Membran zuerst das Trenngel und dann ein weiteres in Blotpuffer getränktes Whatman Filterpapier gelegt. Zum Schluss wurde darauf dann die zweite Elektrode (Kathode) platziert. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde mit ca 1,5 mA/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Bei der Größe der verwendeten Gele entsprach dies etwa 200 mA.

Nach dem Proteintransfer wurden die Proteine in Ponceau-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde überschüssige Färbelösung durch Waschen mit entsalztem Wasser entfernt.

*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

### **2.4.10 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976). 1 ml des 1:5 verdünnten BioRad Bradford Reagenz wurde mit 1-10 µl der Proteinlösung gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Konzentration mit Hilfe einer Eichkurve, die mit definierten Mengen des Proteins IgG erstellt worden war, bestimmt.

### **2.4.11 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)**

Bei sehr niedriger Proteinkonzentration wurden die in der Probe enthaltenen Proteine mittels Zugabe von TCA (Endkonzentration 12% (w/v)) gefällt und damit aufkonzentriert. Nach einer 15-minütigen Inkubation des Protein-TCA Gemisches wurden die Proteine in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert (13000 g; 15 min; 4°C). Das Pellet wurde anschließend mit 1 ml Aceton (-20°C) gewaschen um die überschüssige TCA zu entfernen. Das Protein wurde 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 1 x Lämmli resuspendiert.

### **2.4.12 Immundetektion von Proteinen**

Das folgende Protokoll galt für alle Antikörper, die aus Kaninchenplasma gewonnen wurden. Alle durchgeführten Schritte wurden bei RT durchgeführt. Nach dem Proteintransfer (siehe 2.4.9) wurden die Membranen 30 min in *Blockpuffer 1* geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden die Membranen mit einem spezifischen Antiserum oder einem affinitätsgereinigten Antikörper aus Kaninchen inkubiert. Die Antikörper wurden je nach Titer zwischen 1:250 und 1:5000 in Blockpuffer verdünnt. Nach dreimaligem, 5-minütigem Waschen der Membranen in *TBS-Puffer* erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper über gegen Immunglobulin G aus Kaninchen gerichtete Zweitantikörper. An diese Zweitantikörper war Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt (Ziege anti-KaninchenHRP Konjugat, Biorad). Die Membranen wurden 1 h in Sekundärantikörper geschwenkt, welcher zuvor 1:10000 in *Blockpuffer 1* verdünnt worden war. Nach dreimaligem Waschen in *TBS-Puffer* wurden die gebundenen Zweitantikörper über die Peroxidase mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Sigma

Aldrich) nachgewiesen. Die beiden Lösungen *ECL1* und *ECL2* wurden unmittelbar vor der Zugabe auf die Membran im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach einer kurzen Inkubationszeit mit dieser Mischung wurden die Membranen auf Röntgenfilmen (Fuji) exponiert.

<b><i>TBS-Puffer</i></b>	<i>10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5</i>
<b><i>Blockpuffer</i></b>	<i>5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer</i>
<b><i>ECL1</i></b>	<i>100 mM Tris/HCl; 0,044 % (w/v) Luminol; 0,0066 % (w/v) p-Coumarinsäure; pH 8,5</i>
<b><i>ECL2</i></b>	<i>100 mM Tris/HCl; 0,024 % (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; pH 8,5</i>

### **2.4.13 Immundetektion von Proteinen mit käuflich erworbenem His-Antikörper**

Bei der Immundekoration mit dem käuflich erworbenen His-Antikörper der Firma Qiagen fanden alle Schritte ebenfalls bei RT statt. Unspezifische Bindestellen auf der Nitrozellulosemembran wurden durch 60-minütiges Schütteln in *Blockpuffer His* abgeblockt. Die Membran wurde anschließend zweimal 10 min mit *Waschpuffer* und einmal 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Die Membran wurde nun 75 min mit den His-spezifischen Antikörpern (aus Maus) inkubiert, welche zuvor 1:1000 in *Blockpuffer His* verdünnt wurden. Nach drei wie zuvor beschriebenen Waschschritten wurde die Membran 60 min mit Sekundärantikörpern, die gegen Immunglobulin G aus Maus gerichtet waren, inkubiert (1:5000 verdünnt in 10% (w/v) Magermilchpulver in TBS). Überschüssige Antikörper wurden durch viermaliges Waschen entfernt. Schließlich erfolgte die Detektion wie oben beschrieben (siehe 2.4.12).

<b><i>TBS-Puffer</i></b>	<i>10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5</i>
<b><i>Blockpuffer His</i></b>	<i>3 % (w/v) BSA in TBS-Puffer</i>
<b><i>Waschpuffer</i></b>	<i>20 mM Tris/Cl; 500 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween20; 0,2 % (v/v) Triton X-100; pH 7,5</i>

### 2.5 Puffer und Medien

LB-Medium: 10g/L Bacto-Trypton; 5g/L Hefeextrakt; 10g/L Natriumchlorid;  
Für LB<sub>Amp</sub> wurde nach dem Autoklavieren des Mediums  
100µg/ml, für LB<sub>Cam</sub> 30µg/ml Endkonzentration Antibiotikum  
zugegeben

LB-Platten: LB-Medium; 1,5 % (w/v) Agar  
Für LB<sub>Amp</sub>-Platten wurde nach dem Autklavieren 100 µg/ml  
Ampicillin zugegeben

S-Medium: 1,7 g/L *Yeast Nitrogen Base* ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/L Ammoniumsulfat; 2 % (w/v) Glukose (SD); 2 % (w/v) Galaktose (SGal); 2 % (w/v) Lactat (SLac) oder 2 % (w/v) Glycerol (SG)

Auxotrophiemarker:

Adenin 20 mg/L

Uracil 20 mg/L

Histidin 30 mg/L

Leucin 30 mg/L

Lysin 30 mg/L

Methionin 30 mg/L

Tryptophan 30 mg/L

Lämli-Probenpuffer: 60 mM Tris/HCl; 2 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 60 mM Tris/HCl; 10 % (v/v) Glycerol; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8

TBS-Puffer: 10 mM Tris/HCl; 150 mM Natriumchlorid; pH 7,5

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA; pH 8,0

- YP-Medium: 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Bacto-Pepton; mit HCl auf pH 5 einstellen und anschließend autoklavieren  
2 % (w/v) Glukose (YPD); 2 % (w/v) Galaktose (YPGal) oder 2 % (w/v) Glycerol (SG)  
Glukose, Galaktose und Glycerol wurden als 40 % (w/v) (Glukose und Glycerol) bzw. 30 % (w/v) (Galaktose) konzentrierte Stammlösungen separat autoklaviert.
- Lactat-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) Lactat; mit NaOH auf pH 5,5 einstellen

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

### 2.6 Chemikalien und Geräte

#### 2.6.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

*Agfa-Gevaert, München*

Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

*AppliChem, Darmstadt*

Tris, Ampicillin, Magermilchpulver, APS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*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

*Fuji, Düsseldorf*

Medical X-ray Film Super RX 13 x 18 cm

*GE Healthcare, München*

Bacto-Pepton, Glutathion-Sepharose

*Gerbu, Gaiberg*

Acrylamid, Ampicillin, DTT, HEPES, MOPS

*Greiner, Kremsmünster*

15- und 50 ml Reaktionsgefäße

*Fermentas, St. Leon-Rot*

Molekulargewichts-Standards für SDS-PAGE

*Invitrogen, Groningen (NL)*

DH5 $\alpha$ , Yeast Nitrogen Base, AMS

*Metabion, Martinsried*

Oligonukleotide

*Millipore, Bedford, MA, USA*

Amicon Ultra 10K, device

*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

*Promega, Heidelberg*

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

*Qiagen, Hilden*

Monoklonaler Anti-His-Antikörper, Ni-NTA-Agarose

*R&D Systems, Abingdon (UK)*

pYX242-Vektor

*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

### **2.6.2 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, Supedex 75;GE Healthcare, München

#### *Chromatographiesystem*

Äkta Explorer; GE Healthcare, München

Liquid Chromatography Controller LCC-500, Pharmacia Erlangen

Pump P-500, Pharmacia, Erlangen

#### *Elektroporationssystem*

Gene Pulser; BioRad, München

#### *Entwicklermaschine*

Curix 60®; Agfa-Gevaert, München

#### *Feinwaagen*

Sartorius, Mainz

#### *Fluoreszenzmikroskop*

Axioplan 2; Carl Zeiss, Jena

#### *Fraktionensammler*

Pharmacia LKB \* Frac-100, Pharmacia, Erlangen

Fraction collector Frac 100

### *Gelkammern*

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*

Ultracut S; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Ultracut E; Fa. Reichert-Jung,

### *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

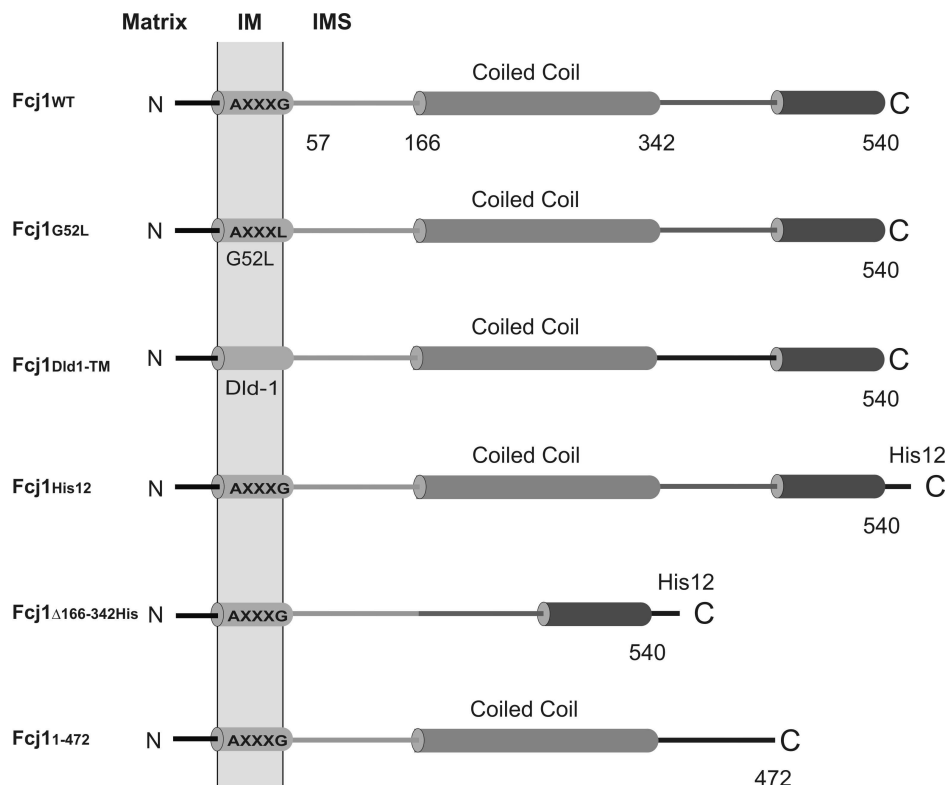
Microfuge® 22R Centrifuge, Beckman Coulter, Krefeld

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Funktionsanalyse einzelner Domänen des Fcj1-Proteins

#### 3.1.1 Übersicht Konstrukte

Über die molekulare Funktion von Fcj1 war am Anfang dieser Arbeit wenig bekannt. Zur Funktionsanalyse von Fcj1 wurden Mutanten in verschiedenen Bereichen dieses komplex aufgebauten Membranproteins erzeugt. Im Vordergrund der beobachteten Defekte von Hefezellen, in denen Fcj1 deletiert ist, steht die Abwesenheit von Crista Junctions (CJs), verminderte respiratorische Kompetenz und vergrößerte Mitochondrien. Zuerst sollte mittels Deletion bzw. Mutation einzelner Domänen, der Transmembran-domäne (TMD), der Coiled-Coil-Region und der konservierten C-terminalen Domäne der Einfluss der einzelnen Domänen auf die Funktionalität von Fcj1 untersucht werden (Abb. 3.1). Die Fcj1-Varianten wurden mittels Expression vom pYX242-Vektor auf Komplementation der Deletion von Fcj1 getestet.

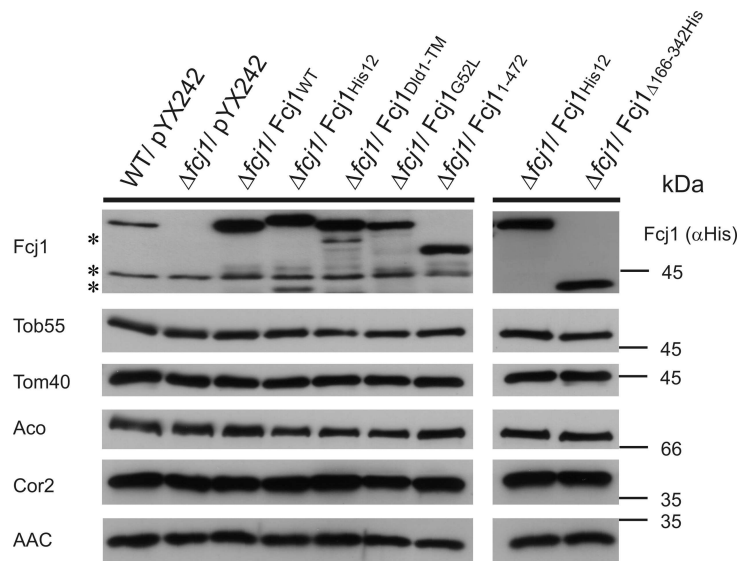


**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der verwendeten Fcj1-Varianten zur Expression in *S. cerevisiae*.** Fcj1-Konstrukte wurden in den pYX242-Vektor kloniert und in der Deletionsmutante  $\Delta f cj1$  (W303) exprimiert. TMD, Coiled-Coil-Domäne und C-terminale Domäne sind zylinderförmig dargestellt. IM, Innenmembran; IMS, Intermembranraum.

Das AX<sub>3</sub>G-Dimerisierungsmotiv der TMD wurde durch die Sequenz AX<sub>3</sub>L (G52L) ersetzt und somit zerstört. Zum anderen wurde die TMD von Fcj1 durch die TMD der D-Lactatdehydrogenase (Dld1-TM) aus *S. cerevisiae* ersetzt; diese weist ebenso wie Fcj1 ein Dimerisierungsmotiv in der Transmembranregion auf. In zwei weiteren Mutanten wurde der Coiled-Coil-Bereich (Aminosäurereste 166-342) und die konservierte C-terminale Domäne deletiert. Die  $\Delta$ Coiled-Coil ( $\Delta$ 166-342) Variante wurde C-terminal mit einem His12-Tag versehen (Fcj1 $\Delta$ 166-342His), da der zu Verfügung stehende Fcj1-Antikörper gegen ein Epitop in der Coiled-Coil-Region gerichtet ist. Als Positivkontrolle zur Fcj1 $\Delta$ 166-342His-Variante wurde C-terminal His12-getagtes Volllängen-Fcj1 verwendet (Fcj1His12).

### 3.1.2 Expression der Fcj1-Konstrukte

Zuerst wurde die Expression der einzelnen Fcj1-Varianten getestet. Dazu wurden gleiche Mengen an isolierten Mitochondrien der entsprechenden Stämme mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit einem spezifischen Fcj1- bzw. His-Antikörper untersucht (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2: Expressionslevel der Fcj1-Konstrukte.** Analyse von je 12,5  $\mu$ g isolierten Mitochondrien mittels SDS-PAGE, Blotting und anschließender Immundekoration mit Antikörpern gegen Fcj1. Zur Kontrolle wurden mitochondriale Proteine verschiedener Lokalisation analysiert. \*, Abbaubanden von Fcj1 und unspezifische Kreuzreaktionen; Aco, Aconitase; WT, Wildtyp.

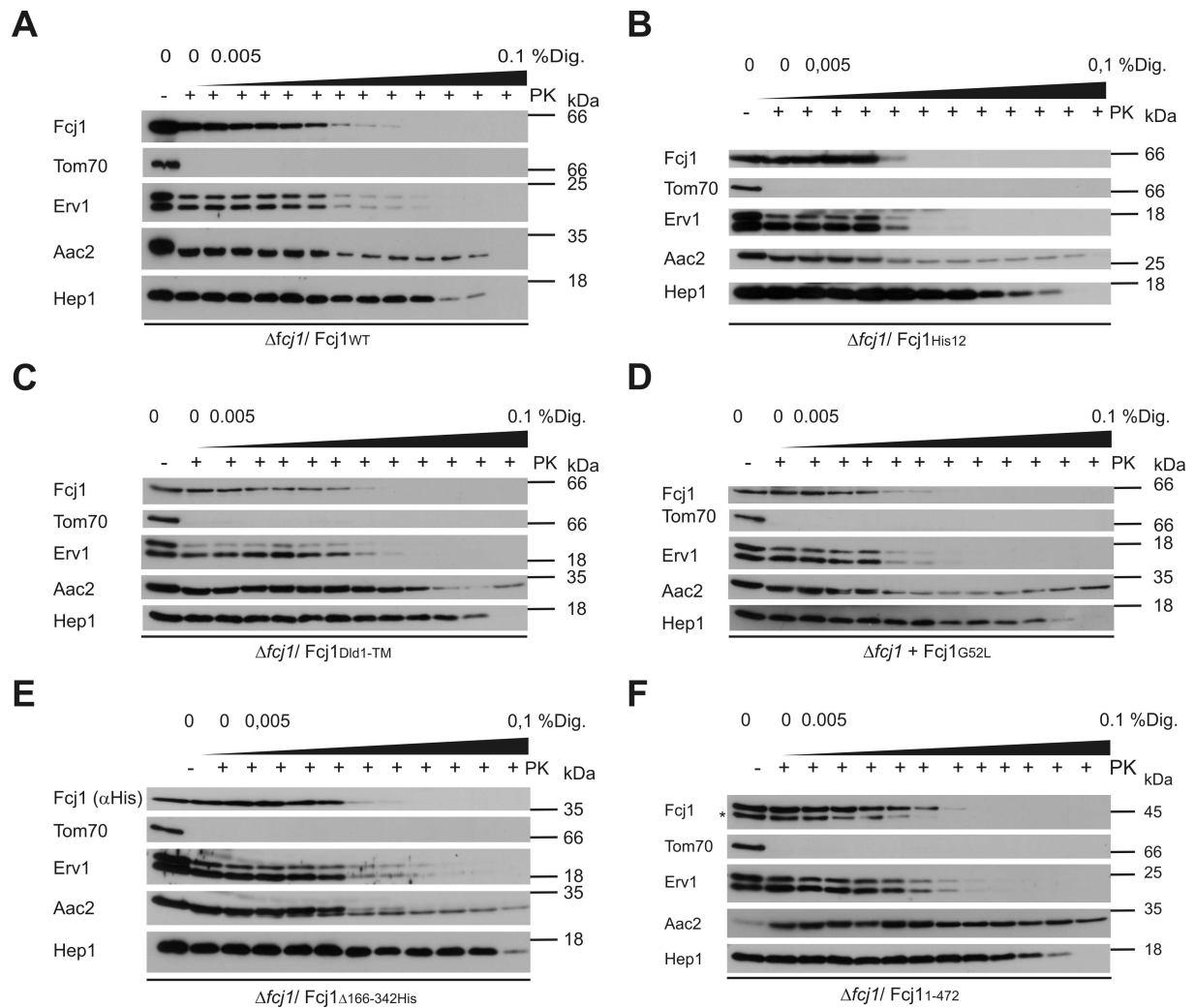
Bis auf Fcj1 $\Delta$ 166-342His konnten alle Konstrukte mit einem Fcj1-Antikörper nachgewiesen werden. Die Proteinlevel aller Fcj1-Varianten waren ca. vier bis achtfach höher als der Proteinlevel von Fcj1 im Wildtyp. Die Proteinlevel von Fcj1<sub>WT</sub>, Fcj1<sub>His12</sub>, Fcj1<sub>Dld1-TM</sub> und Fcj1<sub>1-172</sub> waren vergleichbar, der Proteinlevel von Fcj1<sub>G52L</sub> war etwas geringer. Über Nachweis des His-Tags mit einem spezifischen Antikörper wurde die relative Menge von

Fcj1 $\Delta$ 166-342His im Vergleich zu den anderen Varianten indirekt über Fcj1His12 bestimmt. Der Proteinlevel von Fcj1 $\Delta$ 166-342His ist vergleichbar mit demjenigen von Fcj1His12 und der anderen Fcj1-Varianten. Als Kontrolle wurden die Expressionslevel verschiedener mitochondrialer Proteine unterschiedlicher Sublokalisierung mit spezifischen Antikörpern mit untersucht. Die Level von untersuchten Außenmembranproteinen (Tom40, Tob55), Innenmembranproteinen (Aac2, Cor2) und löslichen Proteinen (Aconitase) waren im Vergleich zum Wildtyp unverändert.

### **3.1.3 Lokalisation und Membranassoziation der Fcj1-Varianten**

Fcj1 ist mit einer TMD in der Innenmembran verankert; der Hauptteil des Proteins, der die Coiled-Coil-Domäne enthält, ist im Intermembranraum (IMS) lokalisiert. Nun sollte die korrekte Lokalisation und Membranassoziation der Fcj1-Varianten überprüft werden.

Die Lokalisation der einzelnen Proteine wurde durch Behandlung der Mitochondrien mit Proteinase K (PK) und steigenden Konzentrationen Digitonin (zwischen 0 und 0,1 % w/v) analysiert (Abbildung 3.3). Die Aktivität der PK wurde durch Detektion des Außenmembranproteins Tom70, einer Komponente des TOM-Komplexes, untersucht. Tom70 wird von PK schon bei Vorliegen von intakten Mitochondrien abverdaut, da dessen Rezeptordomäne zum Cytosol hin orientiert ist. Die Zugänglichkeit der Protease zu Proteinen des IMS und der Innenmembran wurde durch Detektion von Erv1 bzw. des ADP/ATP-Transporters (Aac2) kontrolliert, die Zugänglichkeit zur Matrix durch Immundekoration des Matrixproteins Hep1. Ist die Außenmembran ab einer gewissen Digitoninkonzentration durchlässig für PK, wird Erv1 abgebaut. Von Aac2, das mit sechs Transmembranhelices die Innenmembran durchspannt, wird ein C-terminales Fragment abgespalten. Dadurch entsteht ein etwas kleineres Fragment, das mittels eines Antikörpers gegen Aac2 detektiert werden kann. Wird die innere mitochondriale Membran bei hohen Digitoninkonzentrationen durchlässig für PK, wird Hep1 abverdaut. In den durchgeführten Digitoninfraktionierungen wurden alle Fcj1-Varianten bei gleicher Digitoninkonzentration von der zugesetzten PK verdaut wie Aac2 und Erv1. Der C-terminale Hauptteil aller Fcj1-Varianten befindet sich demnach wie erwartet im IMS.

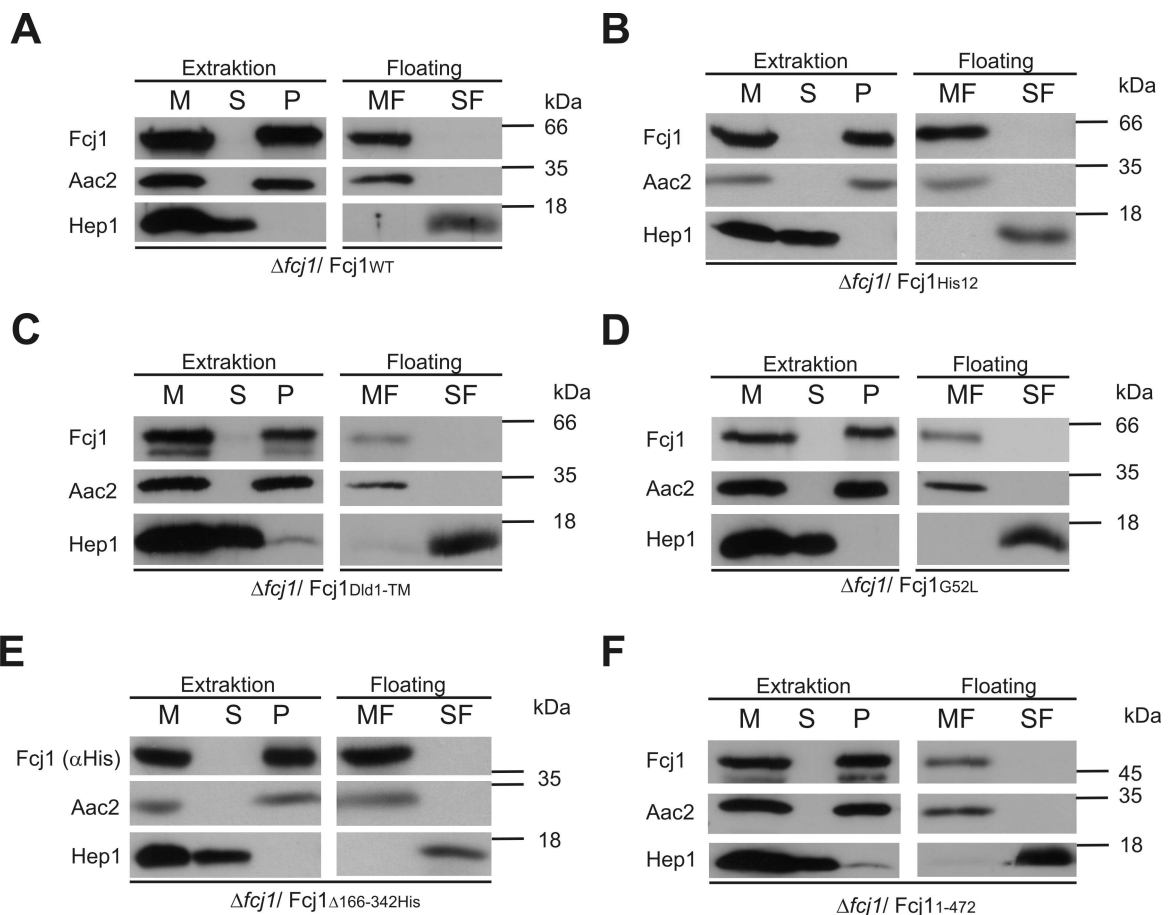


**Abbildung 3.3: Submitochondriale Lokalisation der Fcj1-Varianten.** Isolierte Mitochondrien der entsprechenden Stämme wurden mit Digitoninlösungen steigender Konzentration (0-0,1 % Digitonin (w/v)) und gleichen Mengen Proteinase K (PK) versetzt. Die Zugänglichkeit von PK zu Fcj1 in den verschiedenen Proben wurde mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Fcj1 (A - D und F) sowie gegen den His-Tag (E) analysiert. Als Kontrollen wurden das Matrixprotein Hep1, das IMS-Protein Erv1, das Innenmembranprotein Aac2 und das Außenmembranprotein Tom70 mittels spezifischer Antikörper analysiert. \*, Abbaubande von Fcj1 bzw. unspezifische Kreuzreaktion.

Die Membranassoziation der Fcj1-Varianten wurde durch zwei Experimente überprüft: Zum einen durch Karbonatextraktion, zum anderen durch Membran-Flotationszentrifugation. Bei der Karbonatextraktion wird die Extrahierbarkeit von Proteinen bei hohem pH aus der Membran bestimmt. Nach Inkubation und Zentrifugation bleiben lösliche und aus der Membran extrahierte Proteine in Lösung, während Membranproteine sedimentiert werden. Da es sich bei sedimentierten Proteinen im Fall von Konstrukten wie den Fcj1-Varianten auch um Aggregate handeln könnte, wurde die Membranassoziation mit einem Flotations-

Experiment getestet: nach Karbonatextraktion wurde die Probe unter einen Saccharose-Stufengradienten geschichtet. Lösliche Proteine und Aggregate verbleiben während der Zentrifugation am Boden des Zentrifugationsröhrchens. Dagegen steigen membranverankerte Proteine aufgrund der geringeren Dichte der Membran im Gradienten auf und sind nach Zentrifugation im oberen Bereich des Röhrchens zu finden. In beiden Fällen wurden nach SDS-PAGE und Western-Blot die entsprechenden Fraktionen mittels Immundekoration neben Fcj1 zur Kontrolle auch auf den in der Innenmembran lokalisierten Aac2 und das lösliche Matrixprotein Hep1 getestet.

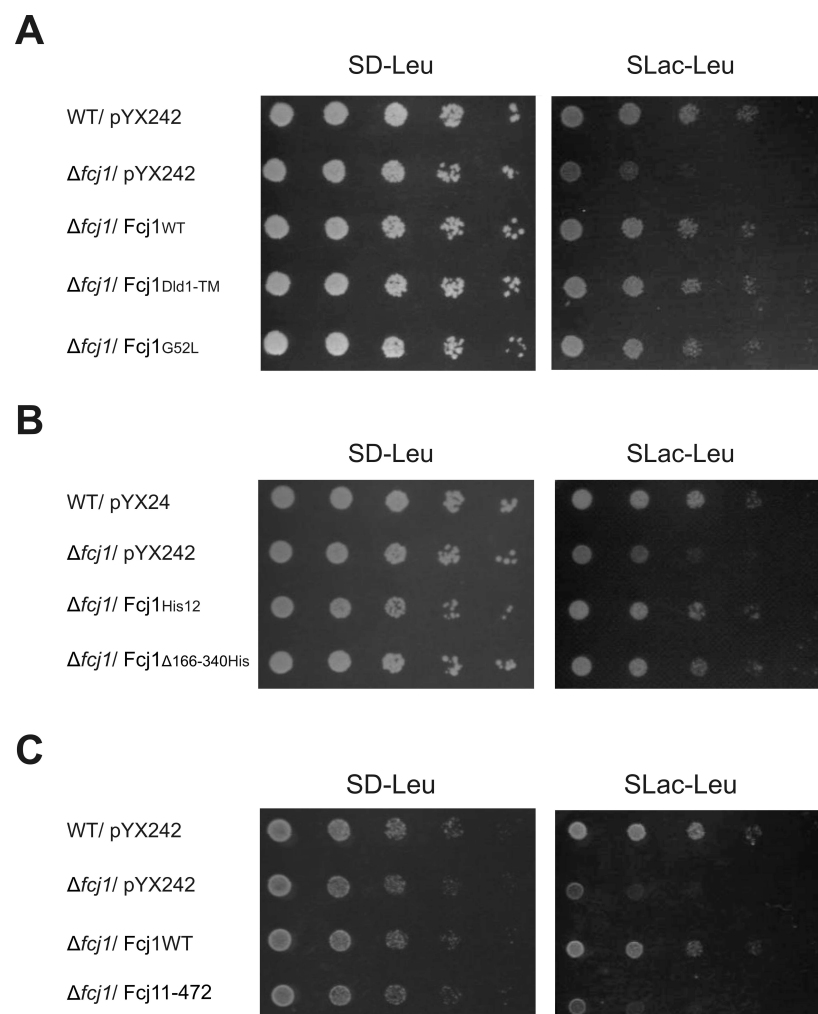
Für alle Fcj1-Varianten konnte die Membranverankerung gezeigt werden (Abb. 3.4). Während nach Karbonatextraktion alle Fcj1-Konstrukte zusammen mit Aac2 sedimentieren, stiegen alle Varianten zusammen mit Aac2 im Saccharosegradienten auf. Das lösliche Matrixprotein Hep1 verhielt sich in beiden Experimenten entgegengesetzt zu Fcj1 und Aac2.



**Abbildung 3.4: Fcj1-Konstrukte sind membranassoziiert.** Isolierte Mitochondrien (M) wurden mit 0,1 M Natriumkarbonat extrahiert. Linke Spalte: Durch Zentrifugation wurden die Membranfraktionen (P) von den löslichen Fraktionen (S) getrennt. Die Extrahierbarkeit der mitochondrialen Proteine wurde durch SDS-PAGE der Proben und Immundekoration ermittelt. Hierzu wurden Antikörper gegen Fcj1, Aac2, Hep1 verwendet. Rechte Spalte: Nach Natriumkarbonatextraktion wurde die Probe unter einen Saccharosestufengradienten geschichtet und zentrifugiert. Membranfraktionen (MF) und lösliche Fraktionen (SF) wurden durch SDS-PAGE und Immundekoration gegen Fcj1, Aac2 und Hep1 analysiert. Fcj1 <sup>$\Delta$ 166-342</sup> (E) wurde mit einem Antikörper gegen den His-Tag ( $\alpha$ His) detektiert.

### 3.1.4 Die konservierte C-terminale-Domäne ist notwendig für Wachstum in nicht fermentierbarem Medium

Die Fcj1-Varianten wurden auf ihre Fähigkeit auf Komplementation des Wachstumsphänotyps des  $\Delta fcj1$ -Stammes untersucht.  $\Delta fcj1$  Stämme, welche die entsprechenden Fcj1-Varianten exprimieren, wurden in nicht fermentierbarem Flüssigmedium (Laktat-Minimalmedium) kultiviert und anschließend in Verdünnungsreihen auf fermentierbarer (SD-Leu) und auf nicht fermentierbarer (SLac) Kohlenstoffquelle getüpfelt. Zur Kontrolle wurden sowohl der Wildtypstamm als auch der  $\Delta fcj1$ -Stamm mit pYX242-Leerplasmid untersucht. Abb. 3.5 (A-C) zeigt das Wachstumsverhalten der jeweiligen Stämme.



**Abbildung 3.5: Die konservierte C-terminale Domäne ist wichtig für Wachstum in nicht fermentierbarem Medium.** Die Stämme wurden bei 30 °C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase in SLac-Leu-Medium angezogen, aufeinander folgenden fünffachen Verdünnungsschritten unterzogen, auf SD-Leu- und SLac-Leu-Platten getüpfelt und bei 24°C zwei (SD) bzw. drei (SLac) Tage inkubiert.

Die beiden Positivkontrollen  $\Delta fcj1/ Fcj1^{WT}$  wie auch  $\Delta fcj1/ Fcj1^{His12}$  wuchsen auf nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle wie WT/ pYX242 (Abb. A-C). Während die Stämme  $\Delta fcj1/ Fcj1^{D1d1-TM}$  und  $\Delta fcj1/ Fcj1^{G52L}$  ebenfalls das Wachstum der Wildtypkontrolle erreichten (Abb. 3.5.A), führte die Expression der C-terminal deletierten Variante von Fcj1 (Fcj1<sup>11-472</sup>) in  $\Delta fcj1$  zu keiner Verbesserung der respiratorischen Kompetenz (Abb. 3.5.C). Expression von Fcj1 <sup>$\Delta$ 166-342His</sup> dagegen führte wieder zu einem gesteigerten Wachstum (Abb. 3.5.B). Alle untersuchten Stämme zeigten auf fermentierbarem Medium (Glukose) gleiches Wachstum. Zusammenfassend ist die C-terminale Domäne von Fcj1 essentiell für die Respirationskompetenz.

### **3.1.5 Die Coiled-Coil-Domäne von Fcj1 und die C-terminale Domäne sind für die Ausbildung von CJs wichtig**

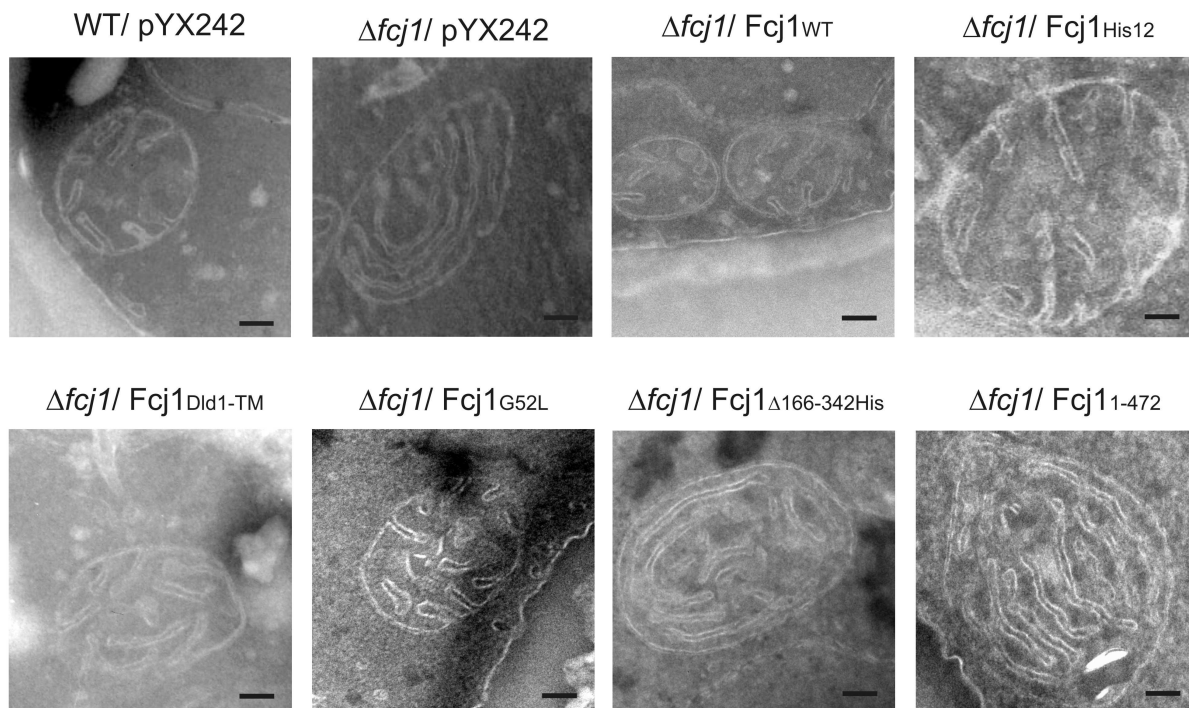
Die Bedeutung der einzelnen Domänen für die Ausbildung von CJs wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten untersucht. Dazu wurden Zellen der diversen Mutanten chemisch fixiert. Cryoschnitte der fixierten wurden Zellen angefertigt und mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert. Repräsentative Bilder sind in Abb. 3.6 dargestellt.

Die Überexpression der beiden Vollängen-Konstrukte Fcj1<sup>WT</sup> und Fcj1<sup>His12</sup> führte wieder zu Ausbildung von CJs. Deren Anzahl pro mitochondrialem Schnitt war, wie beschrieben (Rabl et al., 2009), im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle erhöht. Da die Expressionslevel der einzelnen Fcj1-Varianten vergleichbar mit Vollängen-Fcj1 waren (siehe 3.1.2), wurde die Anzahl der CJs pro mitochondrialem Schnitt in den Mutanten mit der Anzahl der CJs pro mitochondrialem Schnitt von  $\Delta fcj1/ Fcj1^{WT}$  verglichen (Tabelle 3.1).

Die Anzahl der CJs in  $\Delta fcj1/ Fcj1^{His12}$  war im Vergleich zu  $\Delta fcj1/ Fcj1^{WT}$  leicht reduziert. Dies kann auf eine geringe Störung der Funktionalität der C-terminalen Domäne durch den His-Tag hindeuten. In  $\Delta fcj1$ -Stämmen, welche Fcj1-Varianten mit einer Mutation der TMD (Fcj1<sup>D1d1-TM</sup> und Fcj1<sup>G52L</sup>) exprimierten, konnte eine signifikante Anzahl an CJs beobachtet werden. Diese war bei der Expression von Fcj1<sup>D1d1-TM</sup> im Vergleich zu Fcj1<sup>WT</sup> leicht reduziert. Expression von Fcj1<sup>G52L</sup> führte dagegen zu einer leichten Erhöhung der CJ-Anzahl. Weder die Sequenz der TMD noch das Dimerisierungsmotiv sind daher für die Ausbildung von CJ essentiell. Expression der Fcj1-Variante ohne Coiled-Coil-Domäne konnte den  $\Delta fcj1$ -Phänotyp dagegen kaum komplementieren: In  $\Delta fcj1/ Fcj1^{\Delta 166-342His}$  wurden kaum CJs beobachtet. Ebenso führte die Expression von Fcj1<sup>11-472</sup> nur in geringem Maße zur Ausbildung



von CJs. Zusammenfassend sind sowohl die konservierte C-terminale Domäne von Fcj1 wie auch der Coiled-Coil-Bereich für die Ausbildung von CJs wichtig.



**Abbildung 3.6: Die Coiled-Coil-Domäne und die C-terminale Domäne von Fcj1 sind wichtig für die Ausbildung von CJs.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen mitochondrialer Schnitte der angegebenen Fcj1-Stämme (W303). Als Kontrollen sind EM-Bilder des Wildtyp- und des  $\Delta fcj1$ -Stammes gezeigt; Größenbalken 100nm. In Zusammenarbeit mit Dr. Frank Vogel, Miguel Barrera und Katharina Eydt.

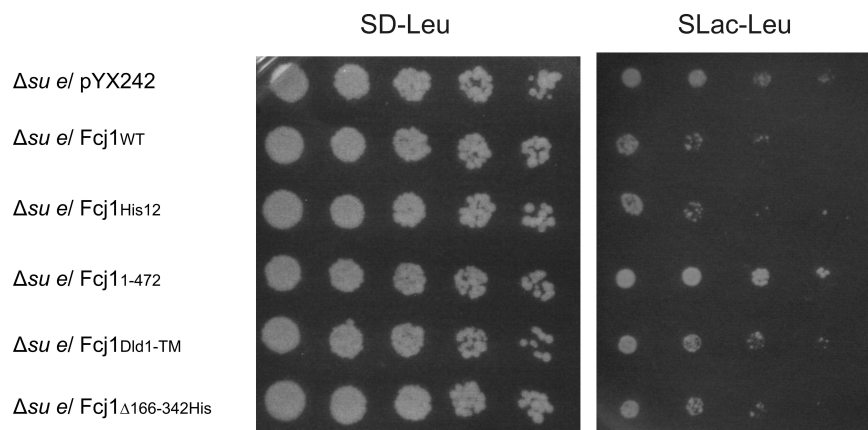
	$\Delta fcj1/$ Fcj1WT	$\Delta fcj1/$ Fcj1Dld1-TM	$\Delta fcj1/$ Fcj1G52L	$\Delta fcj1/$ Fcj1His12	$\Delta fcj1/$ Fcj1 $\Delta$ 166-342His	$\Delta fcj1/$ Fcj11-472
Relative Anzahl an CJs pro mitochondrialem Schnitt	1	0,68	1,24	0,8	0,04	0,09

**Tabelle 3.1: Quantitative Auswertung der Anzahl der CJs pro mitochondrialem Schnitt im Vergleich zu Fcj1WT.** Ausgewertet wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen chemisch fixierter Zellen der angegebenen Hefestämme. Die Anzahl der CJs pro mitochondrialem Schnitt wurde bestimmt und im Verhältnis zu der Anzahl der im Wildtyp vorhandenen CJs angegeben.

### **3.1.6 Die C-terminale Domäne von Fcj1 ist für den dominant negativen Effekt verantwortlich, der bei Überexpression von Fcj1 in einer $\Delta su e$ Mutante beobachtet wird**

Die Expression der Untereinheit Su e der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase begünstigt eine positive Membrankrümmung der Cristamembranen. Hingegen begünstigt die Expression von Fcj1 eine negative Membrankrümmung (Rabl et al., 2009). Dieser antagonistische Effekt wurde durch den Befund unterstrichen, dass die Deletion von Su e in einem  $\Delta fcj1$ -Stamm wieder zu einem gesteigerten respiratorischem Wachstum führt (Rabl et al., 2009).

Diese genetische Interaktion konnte durch die Beobachtung gestützt werden, dass die Überexpression von Fcj1 in einem  $\Delta su e$ -Stamm das Wachstum auf nicht fermentierbarem Medium vermindert (Abb.3.7). Dieser zufolge wurde die Expression von Fcj1-Varianten in  $\Delta su e$  untersucht. Nur die Expression der C-terminal deletierten Variante von Fcj1 im  $\Delta su e$ -Stamm führte nicht zu einem dominant negativen Effekt. Diese Beobachtung zeigt auch die maßgebliche Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Funktionalität von Fcj1.



**Abbildung 3.7: Die konservierte C-terminale Domäne ist für dominant-negativen Effekt von Fcj1 in  $\Delta su e$  verantwortlich.** Die Stämme wurden bei 30 °C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase in SLac-Leu-Medium angezogen, aufeinander folgenden fünffachen Verdünnungsschritten unterzogen, auf SD-Leu- und SLac-Leu-Platten getüpfelt und bei 24°C zwei (SD) bzw drei (SLac) Tage inkubiert.

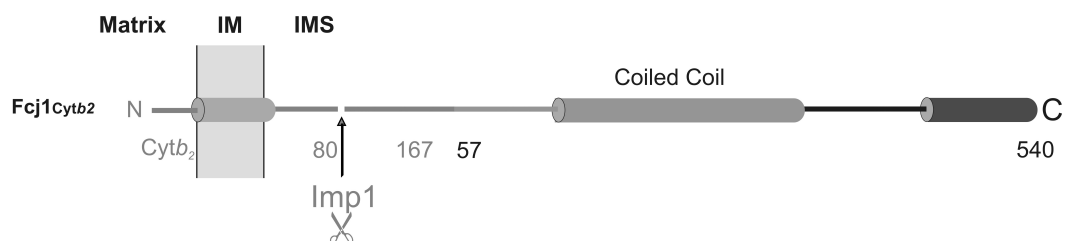
### **3.1.7 Die Verankerung in der Innenmembran ist essentiell für die Funktion von Fcj1**

#### **3.1.7.1 Fcj1<sub>Cytb2</sub> wird von Impl1 prozessiert**

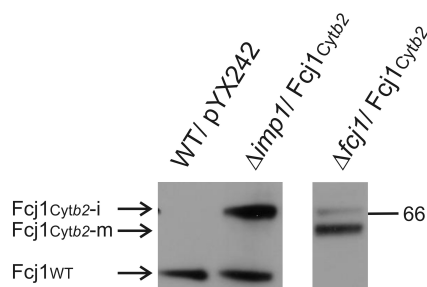
Die Aminosäuresequenz der TMD von Fcj1 ist für die Ausbildung von CJs nicht von essentieller Bedeutung. Dies folgte aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen und dem Wachstumsverhalten der beiden Stämme  $\Delta fcj1 / Fcj1^{Dld1-TM}$  und  $\Delta fcj1 / Fcj1^{G52L}$ . Ob die Verankerung von Fcj1 in der Innenmembran durch eine eigene TMD wichtig für dessen

Funktion ist, sollte nun mit einem löslichen, im IMS lokalisierten Fcj1-Konstrukt untersucht werden. Dazu wurden die N-terminalen Aminosäurereste 1-56 von Fcj1 gegen den N-terminalen Bereich von Cytochrom  $b_2$  (Cytb<sub>2</sub>; Aminosäurereste 1-167) ausgetauscht. Cytb<sub>2</sub> wird nach erfolgtem Import in die Innenmembran und der Abtrennung des Signalpeptids durch die Matrix-Prozessierungs-Peptidase (MPP) von der Protease Imp1 zwischen den Resten 80 und 81 gespalten. Die Spaltstelle ist auf der IMS-Seite der Transmembranregion der Cytochrom  $b_2$ -Vorstufe lokalisiert (Abb. 3.8.A). Dadurch entsteht eine Fcj1-Variante, die ohne TMD im IMS vorliegt. Da die Aminosäuren 81-167 von Cytb<sub>2</sub> am N-Terminus verbleiben, ist diese Fcj1-Variante größer als Fcj1<sup>WT</sup>.

A



B



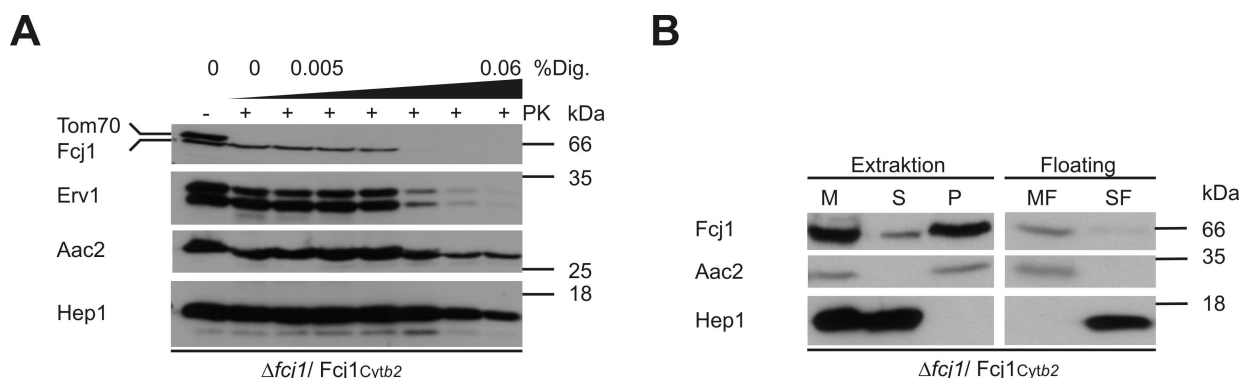
**Abbildung 3.8: Fcj1<sup>Cytb2</sup> wird von der Imp1-Protease prozessiert.** (A) Schematische Übersicht über die lösliche Fcj1-Variante zur Expression in *S. cerevisiae*. Details siehe Abb. 3.1 (B) Fcj1<sup>Cytb2</sup> wird von der Imp1-Protease prozessiert. Aus den angegebenen Hefestämmen wurde das Gesamtprotein durch alkalische Extraktion isoliert und gleiche Mengen an Protein mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit einem Antikörper gegen Fcj1 analysiert. WT, Wildtyp; Fcj1<sup>Cytb2</sup>-i, Fcj1<sup>Cytb2</sup> intermediär; Fcj1<sup>Cytb2</sup>-m, Fcj1<sup>Cytb2</sup> maturiert.

Zunächst wurde die Prozessierung von Fcj1<sup>Cytb2</sup> durch Imp1 überprüft. Dazu wurde dieses Konstrukt im  $\Delta fcj1$ -Stamm (W303) exprimiert und mittels Gesamtzellextraktion analysiert. Um die Größe der nicht von Imp1 prozessierten Form zu bestimmen, wurde zur Kontrolle Fcj1<sup>Cytb2</sup> auch im  $\Delta imp1$ -Stamm exprimiert (Abb. 3.8.B). Im Fall von  $\Delta imp1$ /Fcj1<sup>Cytb2</sup>-Zellen konnten zwei Fcj1-Formen detektiert werden: die Wildtyp-Form und die intermediäre, nur von MPP prozessierte Form von Fcj1<sup>Cytb2</sup>. Im  $\Delta fcj1$ /Fcj1<sup>Cytb2</sup>-Stamm

wurde die von Imp1 prozessierte maturierte Form von *Cytb<sub>2</sub>-Fcj1* (*Fcj1<sub>Cytb2-m</sub>*) mittels Immundekoration mit einem Anteil von mindestens 90% nachgewiesen. Ein kleiner Rest von *Fcj1<sub>Cytb2</sub>* bleibt ungespalten und somit weiterhin durch eine *Cyt b<sub>2</sub>-TMD* in der mitochondrialen Innenmembran verankert.

### 3.1.7.2 *Fcj1<sub>Cytb2</sub>* ist mit der Innenmembran assoziiert

Die Lokalisation und Membranassoziation von *Fcj1<sub>Cytb2</sub>* wurde durch Digitoninfraktionierung sowie durch Karbonatextraktion und Membraneflotation überprüft.

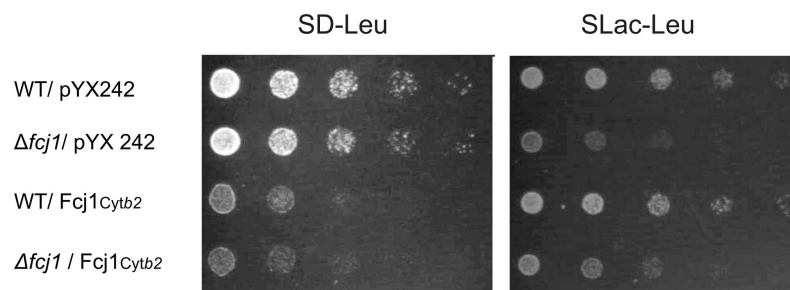


**Abbildung 3.9: *Fcj1<sub>Cytb2</sub>* ist im IMS lokalisiert und stark membranassoziiert.** (A) Digitoninfraktionierung: Isolierte Mitochondrien von *Fcj1<sub>Cytb2</sub>* exprimierenden Zellen wurden mit Digitonin in steigender Konzentration (0-0,1 % Digitonin (w/v)) und gleichen Mengen Proteinase K (PK) versetzt. Die Zugänglichkeit von PK zu *Fcj1* in den verschiedenen Proben wurde mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen *Fcj1* analysiert. Zum Vergleich wurden die gleichen Membranen mit Antikörpern gegen das Matrixprotein Hep1, das IMS-Protein Erv1, das Innenmembranprotein Aac2 und das Außenmembranprotein Tom70 dekoriert. (B) Karbonatextraktion (links) und Membraneflotation (rechts) (Details siehe Legende zu Abb. 3.1.4).

Mittels Fraktionierung der isolierten Mitochondrien wurde die korrekte Lokalisation von *Fcj1<sub>Cytb2</sub>* im IMS nachgewiesen (Abb. 3.9.A). Die Ergebnisse der Natriumkarbonatextraktion und des Flotations-Experimentes zeigten eine immer noch sehr starke Membranassoziation von diesem Konstrukt (Abb. 3.9.B). Nur ein sehr geringer Teil dieser *Fcj1*-Variante wurde wie Hep1 in der löslichen Fraktion detektiert. Wahrscheinlich ist für die beobachtete Membranassoziation eine starke Interaktion mit Membranproteinen die Ursache. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine Interaktion von *Fcj1<sub>Cytb2</sub>* mit der intermediären Form von *Fcj1<sub>Cytb2</sub>* sein, da *Fcj1* homotypische Interaktionen eingeht (Rabl et al., 2009). Diese Erklärung ist allerdings aufgrund des sehr geringen Anteiles der nicht prozessierten Form unwahrscheinlich. Denkbar ist auch eine Assoziation mit der Außen- und Innenmembran über unbekannte Interaktionspartner.

### 3.1.7.3 Die Verankerung von Fcj1 in der Innenmembran durch die TMD ist wichtig für das Zellwachstum

Der Stamm  $\Delta f cj 1 / Fcj 1_{Cytb 2}$  wurde auf Komplementation des Wachstumsphänotyps von  $\Delta f cj 1$  in nicht-fermentierbarem Medium (SLac-Leu) getestet. Zur Kontrolle wurde das Konstrukt auf fermentierbarem (SD-Leu) Medium analysiert. Die Expression von Fcj1<sub>Cytb2</sub> in  $\Delta f cj 1$  führte in Laktat-Medium nicht zur Steigerung der respiratorischen Kompetenz. Im Gegensatz zu den zuerst untersuchten Varianten von Fcj1 (siehe 3.1.4) war das Wachstum von  $\Delta f cj 1 / Fcj 1_{Cytb 2}$  auf fermentierbarem Medium im Vergleich zu WT/ pYX242 und  $\Delta f cj 1 / pYX242$  deutlich reduziert. Dies deutet auf einen dominant negativen Effekt dieses Konstrukts hin. Daher wurde das Wachstum von Fcj1<sub>Cytb2</sub> auch im Wildtyp-Hintergrund getestet: Hier zeigte die Expression von Fcj1<sub>Cytb2</sub> ebenfalls einen dominant negativen Effekt auf fermentierbarem Medium (Glukose). Dagegen war auf nicht fermentierbarem Medium (Laktat) das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp nicht vermindert. Die Verankerung von Fcj1 in der Innenmembran durch eine eigene TMD ist somit wichtig für die Funktionalität dieses Protein. Da Fcj1<sub>Cytb2</sub> fest membranassoziiert ist (siehe 3.1.7.2), könnte der dominant negative Effekt durch unreguliertes Binden an ein membranständiges Protein und der daraus resultierenden Inhibierung dieses Proteins seine Ursache haben.

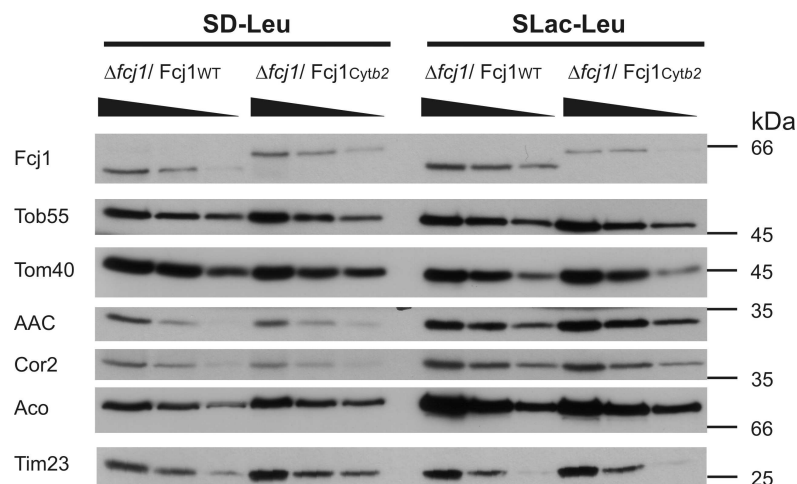


**Abb.3.10: Die Expression von Fcj1<sub>Cytb2</sub> kann in  $\Delta f cj 1$ -Stämmen die Respirationskompetenz nicht wieder herstellen und führt auf glukosehaltigem Medium zu einem dominant-negativen Effekt.** Die Stämme wurden bei 30 °C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase in SLac-Leu-Medium angezogen, aufeinander folgenden fünffachen Verdünnungsschritten unterzogen und auf SD-Leu- und SLac-Leu-Platten getüpfelt. Als Kontrollen wurde der korrespondierende Wildtyp- bzw.  $\Delta f cj 1$ -Stamm mit pYX242 Leerplasmid mit aufgetragen.

### 3.1.7.4 Der Proteinlevel von Fcj1<sub>Cytb2</sub> ist in Laktat-Medium vermindert

Das Wachstum von Fcj1<sub>Cytb2</sub> exprimierenden Zellen zeigte nur in glukosehaltigem Medium einen dominant negativen Effekt. Um zu untersuchen, ob die Proteinmenge dieser Fcj1-Variante unter verschiedenen Wachstumsbedingungen unterschiedlich ist, wurden der  $\Delta fcj1/$  Fcj1<sub>Cytb2</sub>-Stamm und als Kontrolle der  $\Delta fcj1/$  Fcj1<sub>WT</sub>-Stamm auf glukose- und auf laktathaltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden gleiche Mengen an isolierten Mitochondrien nach SDS-PAGE und Blotting mit einem Antikörper gegen Fcj1 untersucht. Zur Kontrolle wurden verschiedene mitochondriale Proteine unterschiedlicher Sublokalisierung mit analysiert.

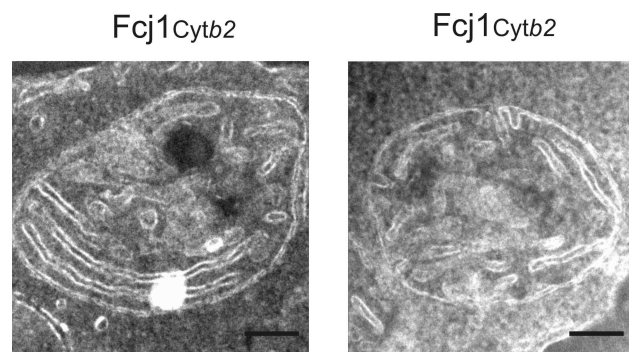
Die Menge von Fcj1<sub>Cytb2</sub> war nach Wachstum in laktathaltigem-Medium niedriger als in glukosehaltigem Medium (Abb. 3.11). Somit kann das Fehlen des dominant-negativen Effekts nach Wachstum von Fcj1<sub>Cytb2</sub> in Laktat-Medium mit einem verminderten Proteinlevel erklärt werden. Der niedere Proteinlevel der Fcj1<sub>Cytb2</sub>-Variante ist wahrscheinlich auf erhöhte Instabilität unter diesen Wachstumsbedingungen zurückzuführen, da auf Laktat der Proteinlevel von Fcj1<sub>Cytb2</sub> deutlich niedriger als das von Fcj1<sub>WT</sub> war und die Expression von Fcj1<sub>Cytb2</sub> und Fcj1<sub>WT</sub> unter der Kontrolle des gleichen Promotors (TPI) auf dem pYX242-Plasmid stehen.



**Abbildung 3.11: Der Proteinlevel von Fcj1<sub>Cytb2</sub> ist in Laktat-Medium vermindert.** Je 25  $\mu$ g, 12,5  $\mu$ g und 6,25  $\mu$ g isolierte Mitochondrien aus den angegebenen Hefestämmen wurden nach SDS-PAGE und Blotting mittels Immundekoration mit Antikörpern gegen Fcj1 und weitere mitochondriale Proteine analysiert.

### 3.1.7.5 Einfluss von Fcj1<sup>Cytb2</sup> auf die mitochondriale Ultrastruktur

Da sich die Aminosäuresequenz der TMD für die Ausbildung von CJs als nicht essentiell herausstellte, wurde die Bildung von CJs auch für den Stamm  $\Delta f cj 1 / Fcj 1^{Cytb 2}$  mittels Cryoelektronenmikroskopie von chemisch fixierten Hefezellen getestet. In diesem Stamm war das Verhältnis der Anzahl der CJs im Vergleich zum  $\Delta f cj 1 / Fcj 1^{WT}$ -Stamm um 55% erniedrigt (0,45). Die Bildung der CJs kann auf teilweise unprozessiertes Fcj1<sup>Cytb2</sup> zurückgeführt werden. Dies bestätigt das Ergebnis, dass die Aminosäuresequenz der TMD nicht entscheidend für das Entstehen von CJs ist. Trotz der Ausbildung von CJs konnten in diesem Stamm häufig stapelförmig angeordnete Cristamembranen wie im  $\Delta f cj 1$ -Stamm beobachtet werden (Abb. 3.12), was als weiteres Indiz für die Notwendigkeit einer eigenen TMD für Fcj1 interpretiert werden kann.



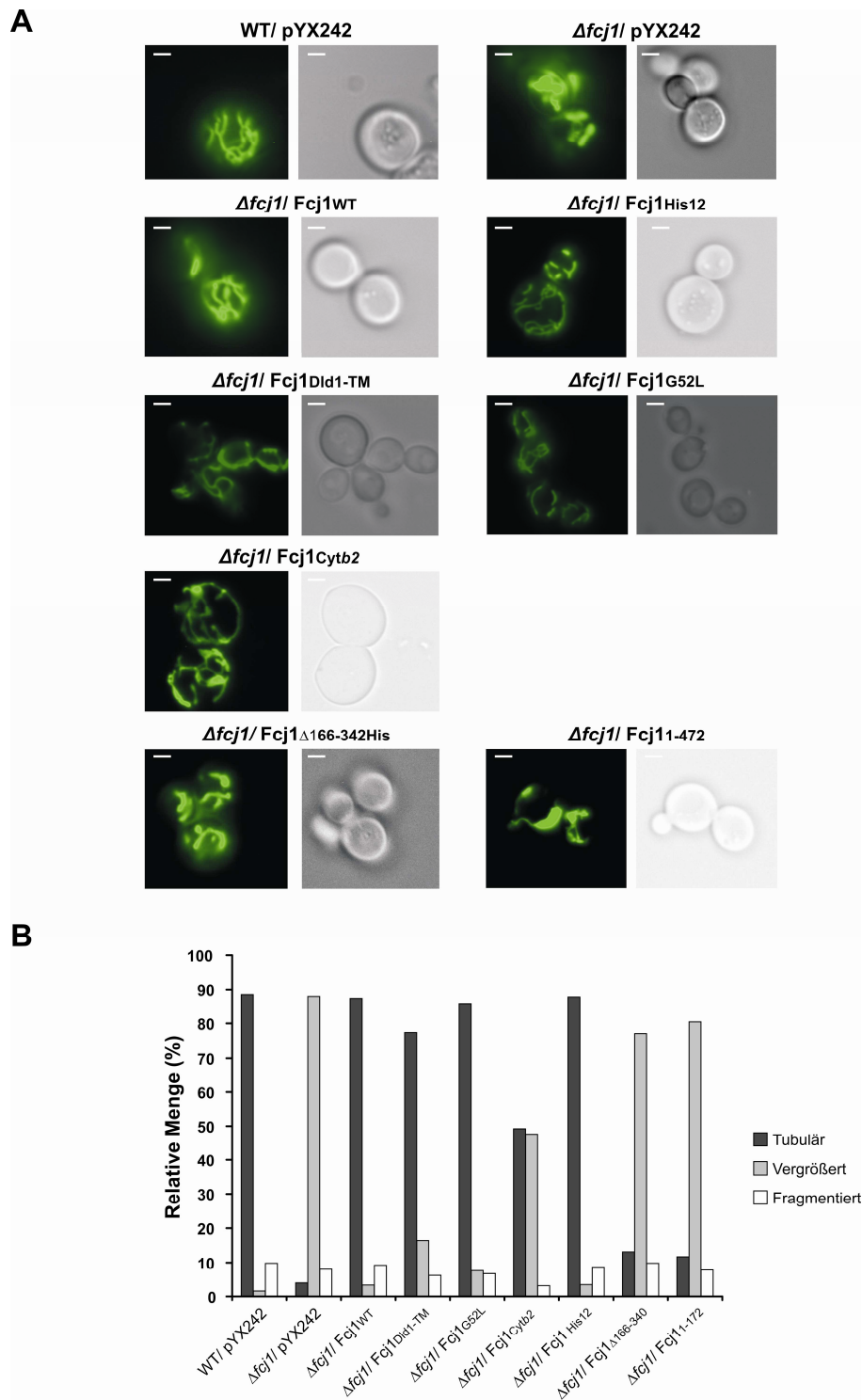
**Abbildung 3.12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten von Fcj1<sup>Cytb2</sup>-exprimierenden Zellen.** Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von dem Stamm  $\Delta f cj 1 / Fcj 1^{Cytb 2}$  (W303). Größenbalken 100nm.

### 3.1.8 Einfluss der Expression der untersuchten Fcj1-Varianten auf die mitochondriale

#### Morphologie

Deletion von Fcj1 führt neben der Abwesenheit von CJs auch zu einer veränderten Gestalt der Mitochondrien (Rabl et al., 2009). Der  $\Delta f cj 1$ -Stamm enthält zwar immer noch tubuläre Mitochondrien, diese sind aber im Vergleich zum Wildtyp vergrößert (Rabl et al., 2009). Die Rolle der einzelnen Domänen von Fcj1 wurde auch bezüglich der mitochondrialen Morphologie untersucht. Dazu wurden die oben beschriebenen Stämme zusätzlich mit einem Plasmid transformiert (pVT100U-mtGFP; siehe 2.3.7), welches die Expression von GFP und dessen Lokalisation in die mitochondriale Matrix ermöglicht. Diese Stämme wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Eine quantitative Auswertung der morphologischen Klassen tubulär, fragmentiert und vergrößert ist in Abb. 3.13.B dargestellt. Als nicht

fragmentiert wurden Mitochondrien klassifiziert, deren Länge mindestens dreimal größer war als ihr Durchmesser.



**Abbildung 3.13: Untersuchung der Rolle der verschiedenen Mutanten von *Fcj1* auf die mitochondriale Morphologie.** Die angegebenen Hefestämme, welche in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes GFP exprimieren, wurden in SLac-Minimalmedium kultiviert und die mitochondriale Morphologie mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Mindestens 100 Zellen wurden je Stamm gezählt und der Anteil an Zellen mit tubulären, fragmentierten und vergrößerten Mitochondrien bestimmt. (A) Repräsentative Fluoreszenzbilder (links) und Phasenkontrastbilder (rechts) der angegebenen Hefestämme; (B) Quantitative Analyse der angegebenen Morphologiephänotypen.



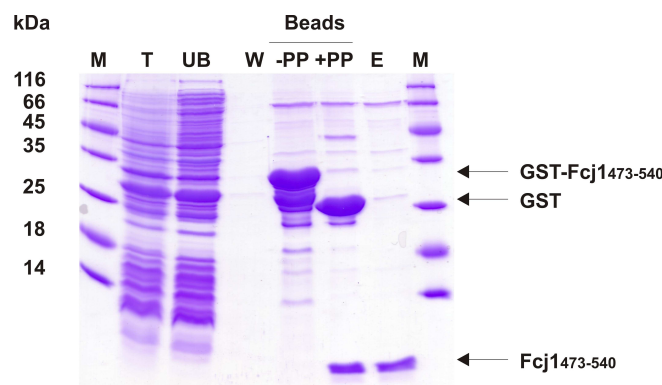
Die beiden Stämme  $\Delta fcj1/ Fcj1_{WT}$  und  $\Delta fcj1/ Fcj1_{His12}$  wiesen eine mitochondriale Morphologie auf, die von der des Wildtyps nicht zu unterscheiden war. Der Morphologie-Phänotyp des  $\Delta fcj1$ -Stammes konnte durch Expression der beiden Fcj1-Varianten Fcj1<sub>Did1-TM</sub> und Fcj1<sub>G52L</sub> weitestgehend komplementiert werden: Während im  $\Delta fcj1$ -Stamm 88 % der Mitochondrien vergrößert waren, so war dessen Anteil in  $\Delta fcj1/ Fcj1_{Did1-TM}$  und  $\Delta fcj1/ Fcj1_{G52L}$  mit nur noch 16,4 % beziehungsweise 6,8 % deutlich erniedrigt. Die Verankerung von Fcj1 mit einer eigenen TMD in der Innenmembran ist für die mitochondriale Morphologie wichtig; in dem  $\Delta fcj1/ Fcj1_{Cytb2}$ -Stamm wurde nur eine partielle Komplementation beobachtet. In diesem Stamm waren noch 47,6 % der Mitochondrien vergrößert. Die Expression von Fcj1 ohne Coiled-Coil-Domäne bzw. C-terminaler Domäne in  $\Delta fcj1$  erniedrigte den Anteil der morphologisch veränderten Mitochondrien nicht signifikant. In Fcj1 $\Delta$ <sub>166-342His</sub> und Fcj1<sub>1-472</sub> wurden noch 77,0 % bzw. 80,5 % vergrößerte Mitochondrien beobachtet.

### 3.2 Charakterisierung der C-terminalen Domäne (Aminosäurereste 473-540) von Fcj1

Die für die Funktion von Fcj1 als essentiell charakterisierte C-terminale Domäne wurde genauer untersucht. Dazu wurde die Aminosäurereste 473-540 umfassende Domäne (Fcj1<sub>473-540</sub>), als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in dem *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) exprimiert und anschließend daraus aufgereinigt.

#### 3.2.1 Fcj1<sub>473-540</sub> bildet Homooligomere

Nach Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation wurde das Zellextrakt zur Proteinbindung mit Glutathion-Sepharose-Beads (GSH-Beads) inkubiert. Das Entfernen des GST-Anhangs erfolgte an Beads durch Zugabe von PreScission Protease, die eine Sequenz zwischen GST und Fcj1<sub>473-540</sub> erkennt und schneidet. (Abb. 3.14). Da die PreScission-Protease ebenfalls einen GST-Tag besitzt, war diese an den Beads immobilisiert, während geschnittenes Fcj1<sub>473-540</sub> eluiert werden konnte.

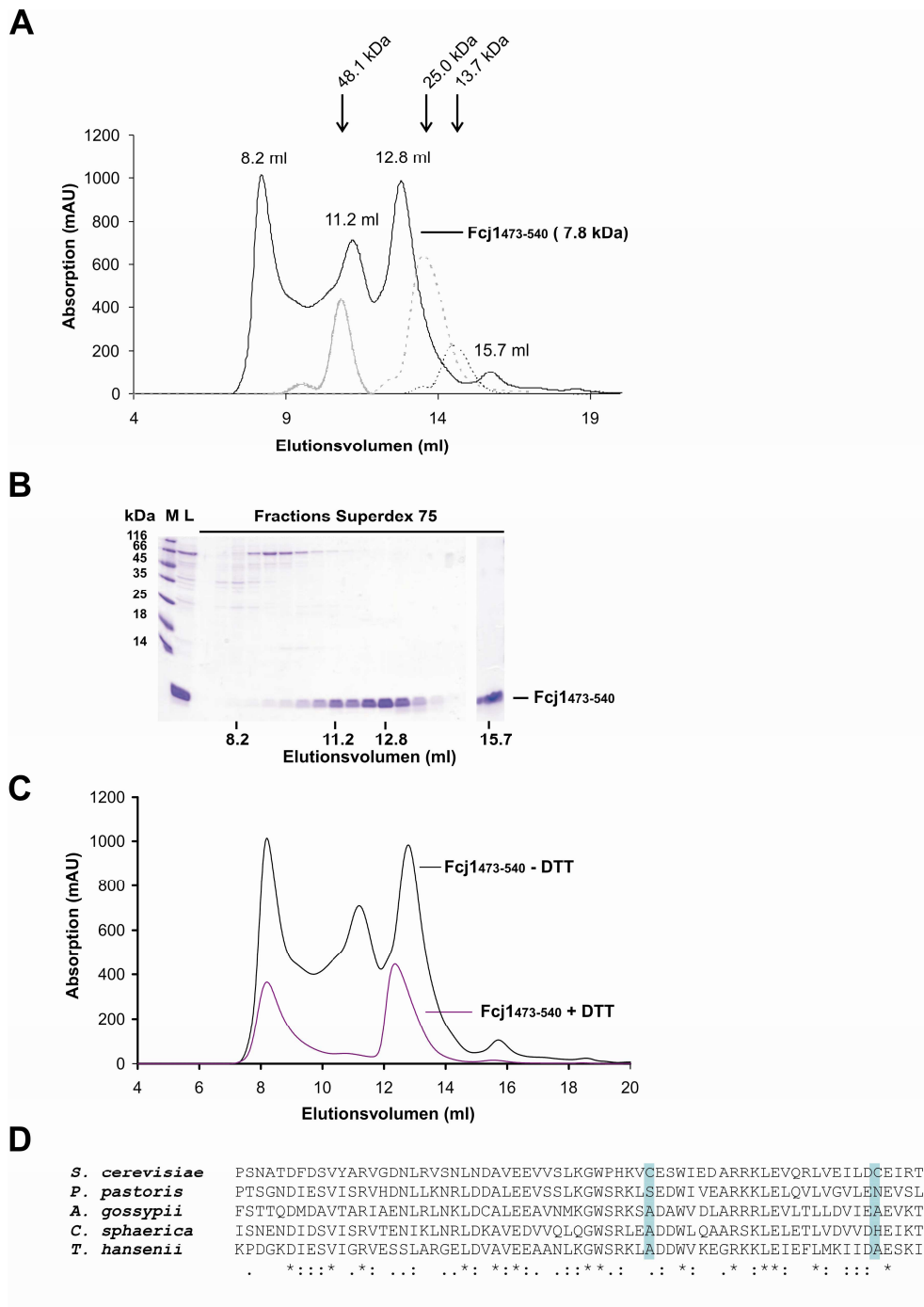


**Abbildung 3.14: Aufreinigung von Fcj1<sub>473-540</sub>.** Fcj1<sub>473-540</sub> wurde in dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) exprimiert. Nach Zellaufschluss (T) wurde 1 h mit GSH-Beads inkubiert. Nach Abtrennung von ungebundenem Protein (UB) und Waschen (W) wurde das an Beads gekoppelte GST-Fcj1<sub>473-540</sub>-Fusionsprotein (Beads -PP) mit PreScission Protease inkubiert, um den GST-Tag von Fcj1 abzuspalten (Beads +PP). Nicht-getagtes Fcj1<sub>473-540</sub> wurde anschließend von den Beads eluiert und gesammelt (E). M, Marker.

Anschließend wurde das aufgereinigte Protein einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Dazu wurde die Eluatfraktion (E in Abb. 3.14) auf eine Superdex 75-Säule (GE Healthcare) geladen und die Fraktionen durch Absorption bei 280 nm und mittels SDS-PAGE-Lauf mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Zur Größenbestimmung wurde die Säule mit den Markerproteinen Ribonuclease A (13,7 kDa),

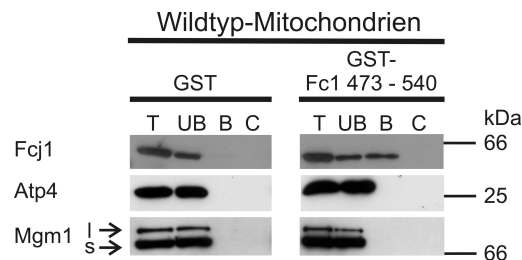
Chymotrypsinogen (25,0 kDa) und Ovalbumin (48,1 kDa) in jeweils eigenen Gelfiltrationsläufen über die proteinspezifische Absorption bei 280 nm kalibriert.

Das aufgereinigte Protein eluierte in vier Peakfraktionen (Abb. 3.15.A): Die erste Fraktion nahe dem Ausschlussvolumen bei 8,2 ml ist auf höhermolekulare Verunreinigungen zurückzuführen, wie mittels Coomassie-Färbung nachgewiesen wurde (Abb. 3.15.B). Fcj<sub>1473-540</sub> eluierte in drei Peakfraktionen mit einem Elutionsvolumen von 11,2 ml, 12,8 ml und 15,7 ml (Abb. 3.15.A/B). Der letzte Peak bei 15,7 ml entspricht dem Monomer mit einem Molekulargewicht von ca. 7,8 kDa. Die beiden mittleren Hauptpeaks entsprachen einem Molekulargewicht von ca. 48 bzw. 32 kDa. Wurde die Gelfiltration mit dem Reduktionsmittel DTT durchgeführt, so war Fcj1 nur bei einem Elutionsvolumen von ca. 12,8 ml detektierbar (Abb. Abb. 3.15.C). Dies läßt auf eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen Fcj<sub>1473-540</sub>-Molekülen für die Spezies mit einem Elutionsvolumen von 11,2 ml schließen. Die beobachteten Disulfidbrücken sind wahrscheinlich artifiziell, da die beiden in der C-terminalen Domäne von Fcj1 vorkommenden Cysteine in verschiedenen Hefestämmen nicht konserviert sind (Abb. 3.15.D). Daher wurde diese Beobachtung nicht weiter verfolgt. Da Fcj<sub>1473-540</sub> mit einem molekularen Gewicht von ca. 7,8 kDa in der Größenausschlusschromatographie mit einer scheinbaren Masse von ca. 32 kDa beobachtet wurde, scheint dieses Fragment Tetramere auszubilden. Dies stimmt mit einer früheren Beobachtung überein, dass Fcj1 homotypische Interaktionen eingeht (Rabl et al., 2009). Dimere und höhere Oligomere von Fcj1 wurden mittels Größenausschlusschromatographie von Mitochondrien, die in dem Detergenz Triton-X-100 solubilisiert wurden, beobachtet.



**Abbildung 3.15: Fcj1473-540 bildet Oligomere.** (A) Aufgereinigtes Fcj1473-540 (Fraktion E in Abb. 3.14) wurde einer Superdex75-Größenausschlusschromatographie unterzogen. Absorptionsprofil (280nm) von Fcj1473-540 nach Aufreinigung an GSH-Beads und Abspalten des GTS-Tags. (B) Die Eluatfraktionen wurden nach Auftrennung mittels SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt. Die Fraktion bei 15,7 ml wurde TCA-gefällt und die 10-fache Proteinmenge aufgetragen. M, Marker, L, Load (Fcj1473-540 nach Aufreinigung an GSH-Beads und Abspalten des GTS-Tags). Das Laufverhalten der Markerproteine Ovalbumin (48,1 kDa), Chymotrypsinogen (25,0 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa) wurden unter gleichen Bedingungen wie für Fcj1473-540 mittels Absorption bei 280 nm bestimmt. (C) Absorptionsprofil (280nm) von Fcj1 mit (violett) und ohne DTT (schwarz). (D) Sequenzvergleich der C-terminalen Domäne von Fcj1 mit dem homologen Abschnitt aus verschiedenen Hefe-Arten.

Die in der Größenausschlusschromatographie beobachtete Oligomerisationsbildung wurde in einem Affinitätsreinigungsexperiment überprüft. Dazu wurde das GST-Fcj1<sup>473-540</sup> Fusionsprotein sowie GST als Kontrolle an GSH-Beads gekoppelt. Anschließend wurden isolierte Mitochondrien aus dem Wildtyp-Stamm in Triton-X-100-haltigem Lysepuffer solubilisiert und das Lysat mit den zuvor präparierten Beads inkubiert. Aus Wildtyp-Mitochondrien konnte Vollängen-Fcj1 an GST-Fcj1<sup>473-540</sup> gebunden werden (Abb. 3.16). Im Gegensatz dazu wurde eine Bindung an GST alleine nicht beobachtet. Weitere untersuchte Innenmembranproteine wie Atp4 und Mgm1 interagierten nicht mit GST-Fcj1<sup>473-540</sup>. Zusammen mit der Gelfiltration zeigt dieses Ergebnis eine Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Ausbildung homotypischer Interaktionen von Fcj1.

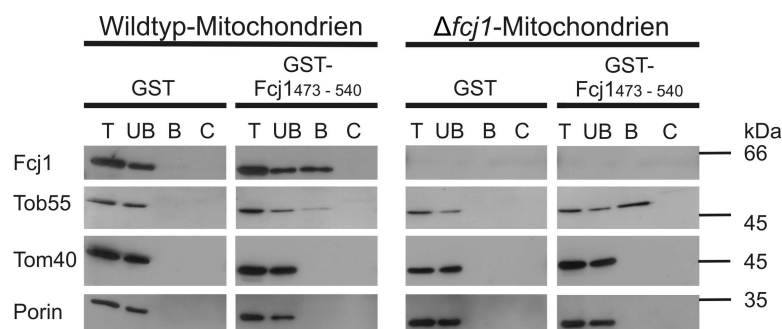


**Abbildung 3.16: Die C-terminale Domäne von Fcj1 bindet Fcj1. Die gereinigten Proteine GST-Fcj1<sup>473-540</sup> und GST-Protein wurden an GSH-Beads gebunden. Mitochondrien aus dem Wildtyp-Stamm wurden in Triton-X-100-haltigem Lysepuffer solubilisiert (T, 5%) und an die vorbereiteten Beads gebunden. Nach Waschen (UB, 5%) wurden die Beads pelletiert und in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen (B, 100%). Die Fraktionen wurden nach SDS-PAGE und Blotting mittels Immundekoration analysiert. WT, Wildtyp; C, GST-Fcj1<sup>473-540</sup> und GST ohne Inkubation mit Mitochondrienlysat (Kontrolle); Mgm1 l, große Isoform von Mgm1; Mgm1 s, kleine Isoform von Mgm1.**

### 3.2.2 Die C-terminale Domäne von Fcj1 interagiert mit Tob55

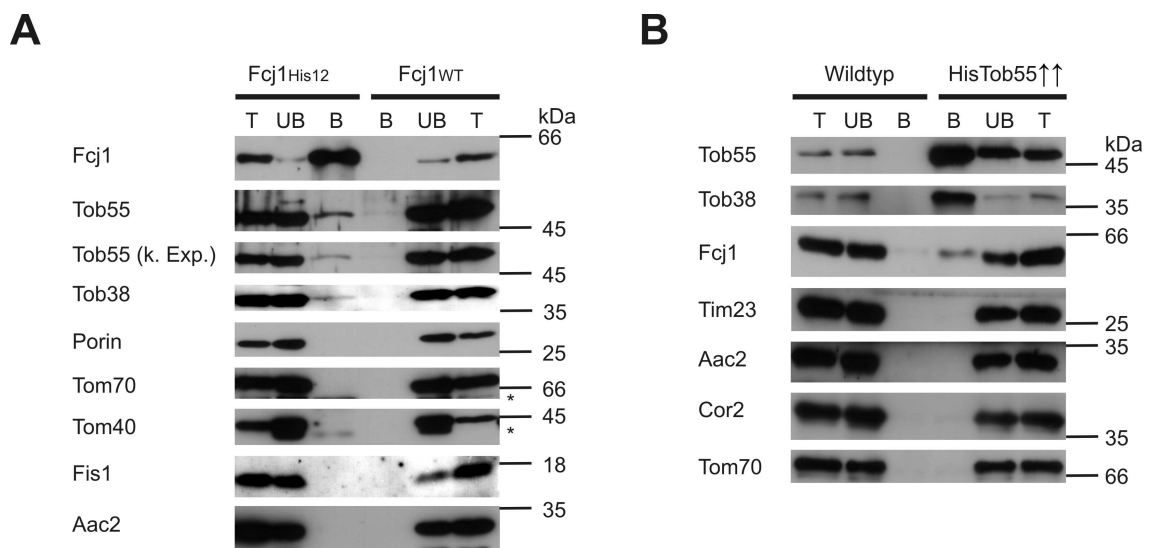
Zu Beginn dieser Arbeit waren Interaktionspartner von Fcj1 nicht bekannt. Um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, wurden die Eluatfraktionen der oben beschriebenen Affinitätsreinigung mit Antikörper analysiert, die gegen verschiedene mitochondriale Proteine gerichtet waren. Eine schwache, aber spezifische Bindung der Komponente Tob55 des TOB-Komplexes an GST-Fcj1<sup>473-540</sup> wurde beobachtet (Abb. 3.17). Der TOB-Komplex ist für die Insertion von  $\beta$ -Barrel-Proteinen in die Außenmembran verantwortlich. Tob55 ist selbst ein  $\beta$ -Barrel-Protein und somit ein Substrat des TOB-Komplexes. Da die C-terminale Domäne auch mit Vollängen-Fcj1 interagiert, wurden solubilisierete Mitochondrien aus dem  $\Delta$ fcj1-Stamm mit GSH-GST-Fcj1<sup>473-540</sup>-Beads inkubiert. Dies erfolgte, um eine indirekte Interaktion über eine andere Domäne von Fcj1 mit Tob55 auszuschließen. Unter diesen Bedingungen konnte

Tob55 mit einer höheren Effizienz als aus Wildtyp-Mitochondrien an Fcj1<sup>473-540</sup> gebunden werden. Zur Kontrolle wurden die beiden gleichfalls in der mitochondrialen Außenmembran lokalisierten  $\beta$ -Barrel-Proteine Porin sowie Tom40, eine Untereinheit des TOM-Komplexes, mit untersucht. In beiden Fällen war keine Interaktion mit GST-Fcj1<sup>473-540</sup> oder GST alleine zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt eine Interaktion der C-terminalen Domäne von Fcj1 mit dem Außenmembranprotein Tob55. Eine indirekte Interaktion von Fcj1<sup>473-540</sup> mit Tob55 über einen weiteren Interaktionspartner kann durch dieses Experiment allerdings nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.17: Die C-terminale Domäne von Fcj1 interagiert mit Tob55.** Die gereinigten Proteine GST-Fcj1<sup>473-540</sup> und GST-Protein wurden an GSH-Beads gebunden. Mitochondrien aus dem Wildtyp- bzw.  $\Delta fcj1$ -Stamm wurden in Triton-X-100 haltigem Lysepuffer solubilisiert (T, 5%) und an die vorbereiteten Beads gebunden. Nach Waschen (UB, 5%) wurden die Beads pelletiert und in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen (B, 100%) Die Fraktionen wurden nach SDS-PAGE und Blotting mittels Immundekoration analysiert. WT, Wildtyp, C, GST-Fcj1<sup>473-540</sup> und GST ohne Inkubation mit Mitochondrienlysat (Kontrolle).

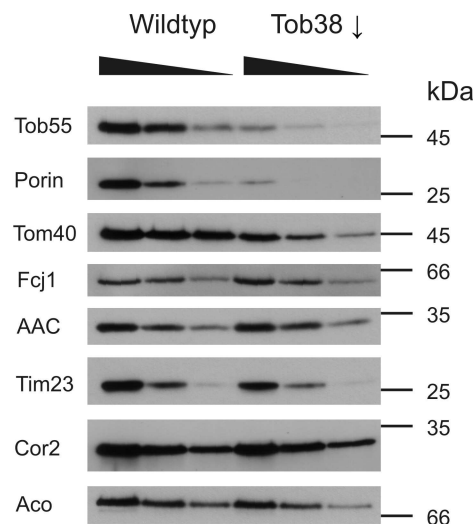
Um die beobachtete Interaktion von Fcj1 mit Tob55 zu bestätigen, wurden Ni-NTA-Affinitätsfällungen durchgeführt: Dazu wurden Mitochondrien aus Fcj1<sup>His12</sup>-Zellen in TritonX-100 haltigem Lysepuffer solubilisiert und mit Ni-NTA-Beads inkubiert. Ein geringer Anteil von Tob55 konnte zusammen mit Fcj1 präzipitiert werden (Abb. 3.18.A). Mit einer geringeren Effizienz wurde ebenso eine Koisolierung der Komponente Tob38 des TOB-Komplexes mit Fcj1 beobachtet. Das Experiment wurde mit isolierten Mitochondrien aus einem Hefestamm (YPH499) wiederholt, welcher Tob55 mit einem N-terminalen Octahistidinytag exprimiert (Paschen et al., 2003), durchgeführt: Auch hier wurde die Interaktion zwischen Fcj1 und Tob55 beobachtet (Abb. 3.18.B). Verschiedene Außen- und Innenmembranproteine, welche zur Kontrolle mit analysiert wurden, ließen keine Koreinigung mit Fcj1<sup>His12</sup> bzw. His<sup>8</sup>Tob55 erkennen. Dieses Ergebnis belegt eine spezifische Interaktion zwischen dem TOB-Komplex und Fcj1.



**Abbildung 3.18: Fcj1 interagiert mit Tob55.** (A) Mitochondrien aus Zellen, die eine His-getagte Fcj1-Variante (Fcj1<sup>His12</sup>) oder nicht-getagtes Fcj1 (Fcj1<sup>WT</sup>) exprimieren, wurden lysiert und einer Ni-NTA-Affinitätsreinigung unterzogen. Ausgangsmaterial (T; 5%), die nicht-gebundene (UB; 5%) und gebundene Fraktion (B; 100%) wurden nach SDS-PAGE und Blotting mit Immundekoration analysiert. k. Exp., kurze Exposition. (B) Mitochondrien aus Zellen (YPH499), die eine His-getagte Tob55-Variante (His<sup>8</sup>Tob55) exprimieren, und aus korrespondierenden Wildtyp-Zellen wurden einer Ni-Affinitätsreinigung unterzogen. Beschreibung siehe (A). \* unspezifische Kreuzreaktionen von Tom40 und Tom70.

### 3.2.3 Die Proteinlevel von Fcj1 und Tob55 sind nicht voneinander abhängig

Sind die Proteinlevel von Fcj1 abhängig von den Leveln des TOB-Komplex? Tob55 war weder bei der Deletion noch bei Überexpression von Fcj1 betroffen ist, wie bereits oben beschrieben (siehe 3.2). Um eine mögliche Abhängigkeit von Fcj1 vom TOB-Komplex zu überprüfen, wurde ein Hefestamm verwendet (YPH499), in dem Tob38 unter Kontrolle des GAL-10-Promoters stand. Herunterregulation von Tob38 in diesem Stamm (TOB $\downarrow$ ) durch Wachstum in glukosehaltigem Medium führt auch zu einer starken Reduktion des Tob55-Levels (Waizenegger et al., 2004). Mitochondrien aus Hefezellen dieses Stammes und des korrespondierenden Wildtyp-Stammes, die in 0,2 % Glukose enthaltendem Laktat-Medium kultiviert wurden, wurden mit SDS-PAGE und Immundekoration analysiert (Abb. 3.19). Während die TOB-Komplex-Substrate Tom40 und Porin in TOB $\downarrow$  im Vergleich zu Wildtyp stark reduziert waren, konnte im Fall von Fcj1 wie auch von diversen anderen mitochondrialen Proteine keine Veränderungen beobachtet werden.



**Abbildung 3.19: Die Proteinlevel von Fcj1 und Tob55 sind nicht voneinander abhängig.** Ein Hefestamm, in welchem Tob38 unter Kontrolle des GAL-10-Promoters stand, wurde in glukosehaltigem Laktatmedium kultiviert, um Komponenten des TOB-Komplexes herunterzuregulieren. Je 25 µg, 12,5 µg und 6,25 µg isolierte Mitochondrien aus diesem und dem unter gleichen Bedingungen kultivierten Wildtyp-Stamm wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit Antikörpern gegen Fcj1, Tob55 und weiteren mitochondrialen Proteinen analysiert.

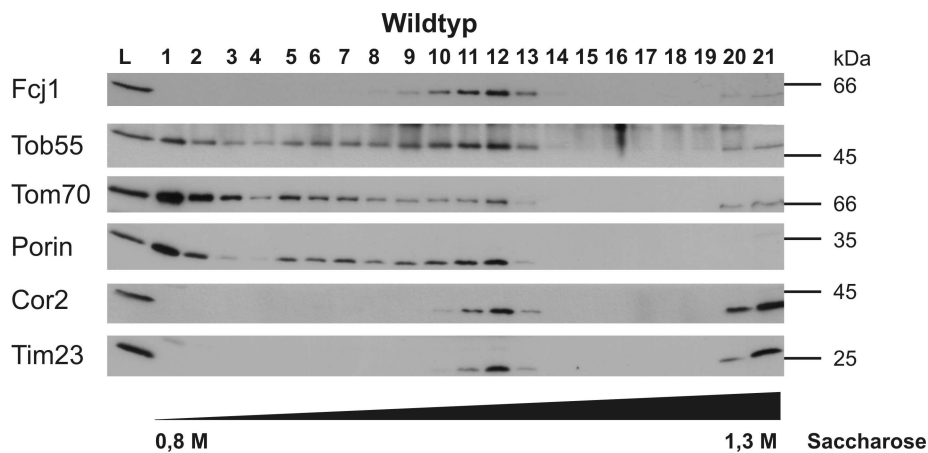
### 3.3 Fcj1 bildet stabile Kontaktstellen zur Außenmembran über Tob55

Im vorangegangenen Abschnitt konnte eine Interaktion zwischen dem Innenmembranprotein Fcj1 und dem in der Außenmembran lokalisierten Protein Tob55 gezeigt werden. Nun sollte überprüft werden, ob Fcj1 einen stabilen oder nur einen transienten Kontakt zur Außenmembran ausbildet. Dazu wurde ein Experiment ausgearbeitet, in dem durch Beschallung isolierter Mitochondrien Innen- und Außenmembranvesikel generiert wurden, die anschließend in einem linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt wurden (Harner et al., 2011). Dies ist möglich, da die mitochondriale Außenmembran ein geringeres Protein/ Lipid-Verhältnis und daher eine geringere Dichte als die Innenmembran aufweist. Falls stabile Kontaktstellen vorhanden sind, sollte aufgrund der Interaktion zwischen Innen- und Außenmembran Vesikel generiert werden, die sowohl aus Innenmembran- als auch aus Außenmembranvesikeln bestehen. Diese Vesikel sollten eine mittlere Dichte zwischen reinen Innen- und Außenmembranvesikeln aufweisen.

Abb. 3.20 zeigt das Ergebnis einer Dichtegradientenzentrifugation derart hergestellter isolierter mitochondrialer Membranvesikeln aus dem Wildtyp-Stamm hinsichtlich der Verteilung von Fcj1 und ausgewählten Außen- und Innenmembranproteinen. Die Proteine Tom70 des TOM-Komplexes und Porin als Marker für die Außenmembran wurden



größtenteils in Fraktionen mit niedriger Saccharosekonzentration (Fraktionen 1 und 2) detektiert. Nur zu einem geringen Anteil waren diese Proteine auch in der Mitte des Gradienten (Fraktionen 11/12) zu finden. Die beiden Innenmembranproteine Cor2 und Tim23 wurden dagegen in Fraktionen am Boden des Gradienten (Fraktionen 20 und 21) mit hoher Saccharosekonzentration und in kleiner Menge in der Mitte des Gradienten nachgewiesen. Fcj1, im Unterschied zu Cor2 und Tim23, wurde größtenteils in Fraktionen mit intermediärer Dichte detektiert. Weiter wurde das Profil des Außenmembranproteins und Interaktionspartners von Fcj1, Tob55, analysiert. Im Vergleich zu Tom70 und Porin war Tob55 mit einem wesentlich höheren Anteil am Gesamtprotein in der Mitte des Gradienten zu finden. Das Profil von Tob55 in der Mitte des Gradienten war nahezu identisch mit dem von Fcj1. Zusammenfassend wird über Fcj1 und Tob55 eine stabile Kontaktstelle zwischen der Innen- und der Außenmembran ausgebildet.

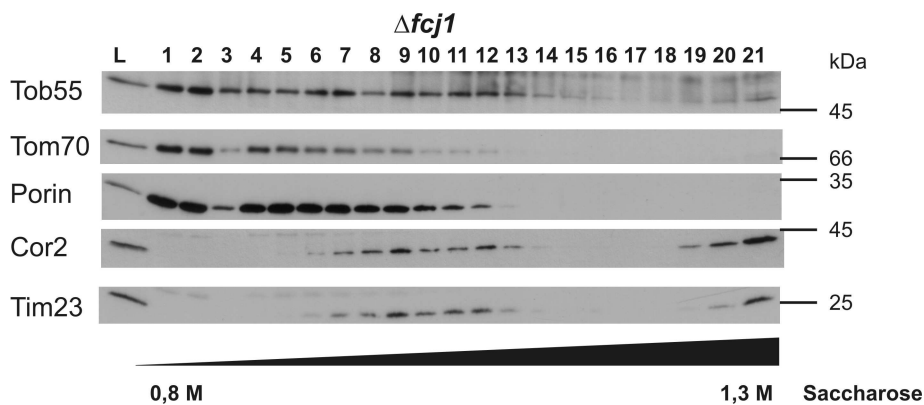


**Abbildung 3.20: Ein Teil von Tob55 liegt in Kontaktstellen mit der Innenmembran.** Membranvesikel aus frisch isolierten Mitochondrien des Wildtyp-Stammes wurden in einem linearen Saccharosegradienten durch Flotations-Zentrifugation aufgetrennt. Gradientenfraktionen wurden nach TCA-Präzipitation, SDS-PAGE und Blotting mittels Dekoration mit Antikörpern gegen die angezeigten Proteine analysiert.

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob Tob55 allein durch Interaktion mit Fcj1 Kontaktstellen zur Innenmembran ausbildet. Um dies zu überprüfen, wurden Mitochondrien aus dem  $\Delta f cj 1$ -Stamm einer Subfraktionierung unterzogen. Für Außenmembranproteine wie Tom70 und Porin wurde allgemein eine Verschiebung zu höherer Dichte beobachtet: In den Fraktionen 4 – 7 konnten diese mit nahezu identischer Signalstärke wie in den Fraktionen 1 und 2 nachgewiesen werden (Abb. 3.21). In diesem Bereich wurden Innenmembranproteine (Aac2, Cor2 und Tim23) nur in geringen Konzentrationen gefunden. Somit konnte eine unspezifische Hybridisierung von Innen- und Außenmembran während der Beschallung der  $\Delta f cj 1$  Mitochondrien als Ursache für das

veränderte Laufverhalten ausgeschlossen werden. Daher scheint die höhere Dichte der Außenmembran auf ein geringeres Lipid/ Protein-Verhältnis zu beruhen. In einer früheren Studie (Rabl et al., 2009) wurde für zahlreiche Außenmembranproteine keine Veränderung des Proteingehalts in  $\Delta fcl1$ -Zellen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Daher ist ein geringerer Lipidgehalt der Außenmembran die wahrscheinlichste Ursache für die veränderte Dichte.

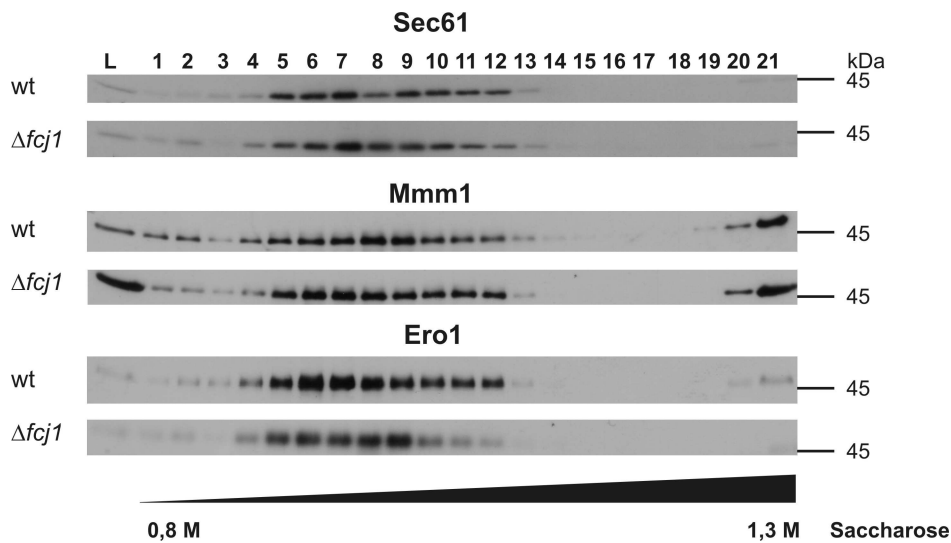
Tob55 war in Fcjl-defizienten Mitochondrien in der Mitte des Gradienten (Fraktionen 9-13) nur noch mit einem geringen Anteil am Gesamtprotein detektierbar. Dies lässt darauf schließen, dass durch Deletion von Fcjl die meisten Kontaktstellen von Tob55 zur Innenmembran zerstört wurden. Allerdings war Tob55 anders als Tom70 und Porin noch zu einem geringen Anteil in der Mitte des Gradienten beobachtbar und zeigte hier gleiches Laufverhalten wie Innenmembranproteine (gezeigt: Cor2 und Tim23). Daher scheinen auch in Mitochondrien aus Fcjl-defizienten Zellen noch wenige Kontaktstellen vorzuliegen.



**Abbildung 3.21: Tob55 bildet eine Subpopulation mit Kontaktstellen zur Innenmembran über TOB.** Membranvesikel aus frisch isolierten Mitochondrien des  $\Delta fcl1$ -Stammes wurden in einem linearen Saccharosegradienten durch Zentrifugation aufgetrennt. Fraktionen wurden nach TCA-Präzipitation, SDS-PAGE und Blotting mittels Dekoration mit Antikörpern gegen die angezeigten Proteine analysiert.

Manche Lipide werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und von dort durch einen noch unbekanntem Mechanismus zur Außenmembran der Mitochondrien transportiert. Da aufgrund des Laufverhaltens insbesondere der Außenmembran ein veränderter Lipidgehalt in  $\Delta fcl1$ -Mitochondrien plausibel erscheint, wurden auch diverse ER-Proteine aus Wildtyp und dem  $\Delta fcl1$ -Stamm auf ihr Laufverhalten im Gradienten analysiert (Abb. 3.22). Gezeigt sind hier die Profile der Untereinheit Sec61 der SEC-Translokase, der Oxidoreduktase Ero1 und von Mmm1, das an dem Kontakt zwischen ER und Mitochondrium mit beteiligt ist (Kornmann et al., 2009). Das Profil der untersuchten Proteine wies keine

auffälligen Unterschiede zwischen Mitochondrien aus dem Wildtyp-Stamm und Mitochondrien aus dem  $\Delta fcj1$ -Stamm auf.



**Abbildung 3.22: Analyse des ER in Wildtyp und  $\Delta fcj1$ .** Membranvesikel aus frisch isolierten Mitochondrien des Wildtyp- und des  $\Delta fcj1$ -Stammes wurden in einem linearen Saccharosegradienten durch Zentrifugation aufgetrennt. Fraktionen wurden nach TCA-Präzipitation, SDS-PAGE und Blotting mittels Immundekoration mit Antikörpern gegen die angezeigten Proteine analysiert.

### 3.4 Der MICOS-Komplex

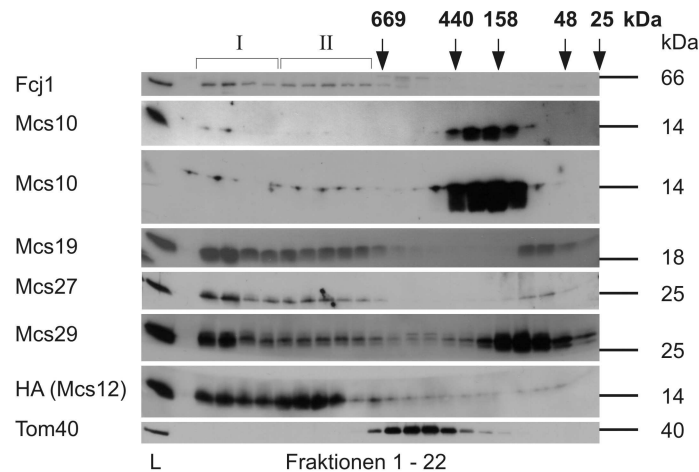
Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Interaktionspartner von Fcj1 bekannt. Mittels quantitativer Massenspektrometrie von Fraktionen der Subfraktionierung isolierter mitochondrialer Membranvesikel konnten Proteine identifiziert werden, die gleiches Laufverhalten wie Fcj1 zeigten (Daten nicht gezeigt; Harner et al., 2011) und aufgrund dessen Mcs-Proteine (*mitochondrial contact site proteins*) genannt wurden. Diese neu identifizierten Proteine waren die bislang uncharakterisierten Proteine Mcs10 (Ycl057c-a), Mcs27 (Ynl100w), Mcs29 (Ygr235c), Mcs 19 (Yfr011c) und Mcs12 (Ybr262c). Die Charakterisierung dieser Proteine wurde in Zusammenarbeit mit Max Harner durchgeführt.

### 3.4.1 Kontaktstellenproteine bilden einen hochmolekularen Komplex

Mittels Größenausschlusschromatographie wurde zunächst untersucht, ob die Mcs-Proteine zusammen mit Fcj1 einen gemeinsamen Komplex bilden. Dazu wurden Wildtyp-Mitochondrien (YPH499) nach Lyse in digitoninhaltigem Puffer auf eine Superose 6-Säule (GE Healthcare) geladen und der Verlauf der Proteine nach SDS-PAGE und Blotting mittels Immundekoration bestimmt. Der Verlauf von Mcs12 wurde mit einem Stamm untersucht, der eine chromosomal 3 x HA-getagte Variante dieses Proteins trug, da Mcs12 in den Eluatfraktionen mit einem spezifischen Antikörper nicht detektiert werden konnte. Stattdessen wurde ein weitaus stärkerer Antikörper gegen das HA-Epitop verwendet. Zur Größenbestimmung wurde die Säule mit den Proteinen Thyreoglobulin (664 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (48,1 kDa) und Chymotrypsinogen (25 kDa) über die proteinspezifische Absorption bei 280 nm kalibriert.

Fcj1 wurde hauptsächlich im hocholigomeren Bereich zwischen 0,7 MDa und 1,5 MDa detektiert (Abb. 3.23). Dies ist in Übereinstimmung zu einer früheren Untersuchung (Rabl et al., 2009). Der Verlauf der Untereinheit *su e* der ATP-Synthase, deren Größe und Oligomerisationsgrad bekannt ist, erlaubte eine Abschätzung der Größe des hocholigomeren Fcj1-Komplexes. Mcs19 und Mcs27 eluierten im hochmolekularen Bereich zusammen mit Fcj1. Weiter wurde ein relativ geringer Anteil dieser beiden Proteine im niedermolekularen Bereich (ca 75 – 100 kDa) detektiert. Auch für Mcs10, Mcs12, und Mcs29 wurde eine Kofraktionierung zusammen mit Fcj1 beobachtet. Der Anteil an niederoligomeren Komplexen mit einer Größe von ca 100 kDa – 300 kDa war hier unterschiedlich: So wurde Mcs10 nur zu einem sehr geringen Anteil im hochmolekularen Bereich gefunden. Ob es sich bei den beobachteten niedermolekularen Komplexen um funktionelle Subkomplexe oder Zerfallsprodukte handelt, kann mit diesem Ergebnis nicht gesagt werden. Weiter konnten im hochmolekularen Bereich Fcj1 und die Mcs-Proteine in zwei Peakfraktionen detektiert werden. Dies deutet auf die Existenz zweier Komplexe hin, die durch Fcj1 und den Mcs-Proteinen gebildet werden. Diese wurden MICOS I und MICOS II (*mitochondrial contact site*) genannt. Als Kontrolle wurde der Verlauf des TOM-Komplexes mittels Dekoration der Komponente Tom40 untersucht, dessen Größe mit einer molekularen Masse von ca. 400-500 kDa bestimmt wurde. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Kunkele et al., 1998).

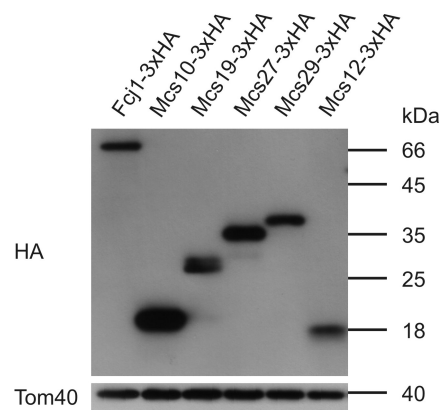
Das Resultat der Molekularmassenbestimmung zusammen mit Co-Isolierungsexperimenten (Harner et al., 2011) beweist die Organisation der Mcs-Proteine zusammen mit Fcj1 in einem gemeinsamen, hochmolekularen Komplex, dem MICOS-Komplex.



**Abb. 3.23: Die Mcs-Proteine bilden zusammen mit Fcj1 einen hochmolekulare Komplex.** Isolierte Wildtyp-Mitochondrien (YPH499) wurden in digitoninhaltigem Puffer lysiert und einer Größenausschlusschromatographie unterzogen (Superose 6-Säule (GE Healthcare)). Der Verlauf der einzelnen Proteine wurde nach SDS-PAGE und Blotting mittels Immundekoration untersucht. Für die Untersuchung von Mcs12 wurde das Experiment mit einem Hefestamm (YPH499), welcher chromosomal HA-getagtes Mcs trägt, durchgeführt. Proteinmarker zur Größenbestimmung wurden in Gelfiltrationspuffer gelöst und der Verlauf nach Auftrag auf die Säule mittels Detektion der proteinspezifischen Absorption bei 280 nm bestimmt. Größe der Markerproteine sind durch Pfeile gekennzeichnet; L, Load (10% des Gesamtlysats aufgetragen); I und II, MICOS-Komplex I und II.

### 3.4.2 Bestimmung der Stöchiometrie von Fcj1 zu den Mcs-Proteinen

Zur Ermittlung der stöchiometrischen Verhältnisse der Mcs-Proteine und von Fcj1 im MICOS-Komplex wurden Stämme (YPH499), welche chromosomal C-terminal HA-getagte Varianten der Mcs-Proteine trugen, in nicht fermentierbarem Medium (Laktat) kultiviert. Mitochondrien wurden isoliert und Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Immundekoration mit einem spezifischen Antikörper gegen den HA-Tag (Roche) wurden die relativen Signalintensitäten gemessen und damit die stöchiometrischen Verhältnisse der Mcs-Proteine und von Fcj1 abgeschätzt (Abb. 3.24). Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde das Außenmembranprotein Tom40 mit analysiert. Die vergleichbaren Signalintensitäten von Fcj1, Mcs12, Mcs19, Mcs27 und Mcs29 lassen auf einen ähnlichen stöchiometrischen Anteil dieser Proteine am MICOS-Komplex schließen. Die hohe Signalintensität von Mcs10 deutet auf einen höheren stöchiometrischen Anteil dieses Proteins am Komplex hin.



**Abb 3.24. Stöchiometrie der Mcs-Proteine und Fcj1 im MICOS-Komplex.** Mitochondrien der angegebenen Stämme wurden nach SDS-PAGE und Blotting mit Immundekoration mit einem HA-Antikörper gegen den 3 x HA-Tag des jeweiligen Proteins analysiert.

### 3.4.3 Mcs10 geht homotypische Interaktionen ein

Mcs10 weist ebenso wie Fcj1 ein Dimerisierungsmotiv (GX<sub>3</sub>G) in der TMD auf (Abb. 3.25.A), das von Hefe bis zum Menschen konserviert ist Um zu untersuchen, ob Mcs10 ebenfalls homotypische Interaktionen eingeht, wurde ein diploider Hefestamm generiert, der auf einem Allel die Wildtyp-Form und auf dem zweiten Allel eine chromosomal C-terminal His<sub>6</sub>-getagte Variante von Mcs10 trägt. Isolierte Mitochondrien aus diesem Stamm wurden nach Solubilisierung in digitoninhaltigem Puffer einer Ni-NTA-Affinitätsfällung unterzogen. Mittels SDS-PAGE und Immundekoration der gebundenen Fraktion wurde eine Kopräzipitation der Wildtyp Form von Mcs10 zusammen mit der His<sub>6</sub>-getagten Variante beobachtet (Abb 3.25.B). Die beiden Formen unterscheiden sich in ihrem Laufverhalten bei der Elektrophorese. Um sicherzustellen, dass es sich bei der schneller laufenden Spezies nicht um ein Abbauprodukt von Mcs10<sup>His6</sup> handelt, wurde das Experiment auch mit einer His<sub>6</sub>-getagten Variante aus einem haploiden Hefestamm durchgeführt. Hier konnte nur die langsamer laufende, His<sub>6</sub>-getagte Form beobachtet werden. Eine Koreinigung von Tom40, Tim23 und dem löslichen Matrixprotein Aconitase wurde nicht beobachtet. Als Positivkontrolle wurde die MICOS-Komponente Mcs27 mit analysiert. Im diploiden Stamm wurde hier die Interaktion zwischen Mcs10 und Mcs27 mit gleicher Effizienz wie im haploiden His<sub>6</sub>-getagten Stamm beobachtet. Zusammenfassend zeigt dieses Ergebnis das Vorliegen von homotypischen Interaktionen von Mcs10.

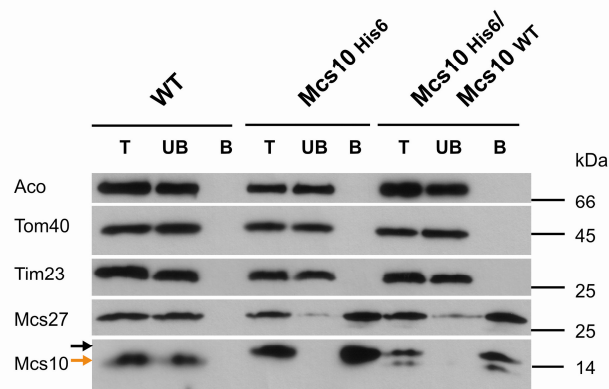
A

S.cerevisiae	MSEQAQTQQPAKSTPSKDSNKNSSVSTIILDTKWDIVLSNMLVKTAMGFGVGG
N.crassa	MSDST--SSPVAAAPSTAMTRPV--SEALLNEKWDRCLSNLLIKSTLGLGFG
M.musculus	MSE-----SELGRKWDRCMADTVVKLGTFGLG
H.sapiens	MSE-----SELGRKWDRCLADAVVKIGTGLG
**:	: * . *** : : : : * * : * . *

S.cerevisiae	VFTSVLFFKRRAFPVWLIGIGFVGRGYAEGDAIFRSSAGLR-----SSKV
N.crassa	VVFSVLIFKRRAWPAFVGVGFGAGRAYEECNTSLKQAAREI-----RAQA
M.musculus	IVFSLTFFKRRMWPLAFGSGVGLGMAYSNCQHDFQAPYLLHGKY--VKEQ
H.sapiens	IVFSLTFFKRRMWPLAFGSGMGLGMAYSNCQHDFQAPYLLHGKYVKEQEQ
. * : . * : : * * * * : * . * * . * * . * : : : : . :	

B



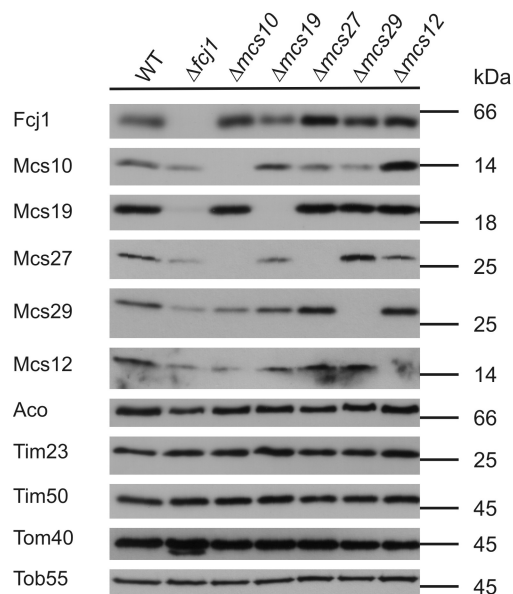
**Abb.3.25: Mcs10 geht homotypische Interaktionen ein.** (A) Sequenzvergleich von Mcs10-Homologen verschiedener Organismen. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von Mcs10 aus *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *M. musculus* und *H. sapiens*. Die TMD von Mcs10 und seinen Homologen ist schematisch als Zylinder dargestellt. Das konservierte Dimerisierungsmotiv  $GX_3G$  in der TMD ist rot/gelb gezeichnet. (B) Ein haploider Wildtyp-Stamm (WT; YPH499), ein haploider Stamm mit einer His<sub>6</sub>-getagten Variante von Mcs10 (Mcs10<sup>His6</sup>; YPH499) sowie ein diploider Hefestamm, welcher von einem Allel die Wildtyp- und von dem anderen eine His<sub>6</sub>-getagte Variante von Mcs10 exprimiert (Mcs10<sup>His6</sup>/Mcs<sup>WT</sup>; YPH501), wurden untersucht. Mitochondrien wurden in digitoninhaltigem Puffer lysiert und anschließend einer Ni-NTA-Affinitätsreinigung unterzogen. Die Proteine im Ausgangsmaterial (T, 5%), sowie im ungebundenen (UB, 5%) und gebundenen Material (B, 100%) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit Immunoblotting analysiert. Schwarzer Pfeil, His<sub>6</sub>-getagte Variante von Mcs10; oranger Pfeil; Wildtyp-Form von Mcs10; Aco, Aconitase.

### 3.4.4 Die Proteinlevel der Mcs-Proteine und Fcj1 sind voneinander abhängig

Interaktionen zwischen den Mcs-Proteinen und Fcj1 wurden durch Gelfiltration und Koisolierung nachgewiesen (Harner et al., 2011). Weiter sollte nun untersucht werden, ob die Expressionen der einzelnen Mcs Proteine und Fcj1 voneinander abhängig sind. Dazu wurden Aliquots isolierter Mitochondrien aus verschiedenen Deletionsstämmen (YPH499) und des Wildtyp-Stammes mittels SDS-PAGE und Immundekoration analysiert (Abb.3.27).

Deletion von Fcj1 führte zu einer starken Reduktion des Levels aller Mcs-Proteine, insbesondere von Mcs19 (Abb. 3.26). Die Deletion von Mcs10 resultierte in einer sehr starken Reduktion von Mcs27, das mittels Immundekoration nicht mehr nachgewiesen werden

konnte. Auch Mcs12 und Mcs29 waren in diesem Stamm stark reduziert, während Fcj1 und Mcs19 kaum oder nicht betroffen waren. Mcs29 sowie Fcj1 waren im  $\Delta mcs19$ -Stamm vermindert, wohingegen sie bei Deletion von Mcs27 leicht erhöht waren. Deletion von Mcs29 führte zu einer Abnahme der Proteinlevel von Mcs10 und zu einem Anstieg von Mcs27; dagegen war Mcs10 in dem Mcs12-Deletionsstamm deutlich erhöht. Neben den Kontaktstellenproteinen wurden andere mitochondriale Proteine wie die TOB-Komplex-Komponente Tob55, das Matrixenzym Aconitase und die Untereinheiten der TIM23-Translocase Tim50 und Tim23 untersucht. Diese waren bei keinem der Deletionsstämmen verändert. Das Ergebnis dieser Untersuchung deutet auf eine Verknüpfung der Expression der Mcs-Proteine und Fcj1 in einem regulatorischen Netzwerk hin.

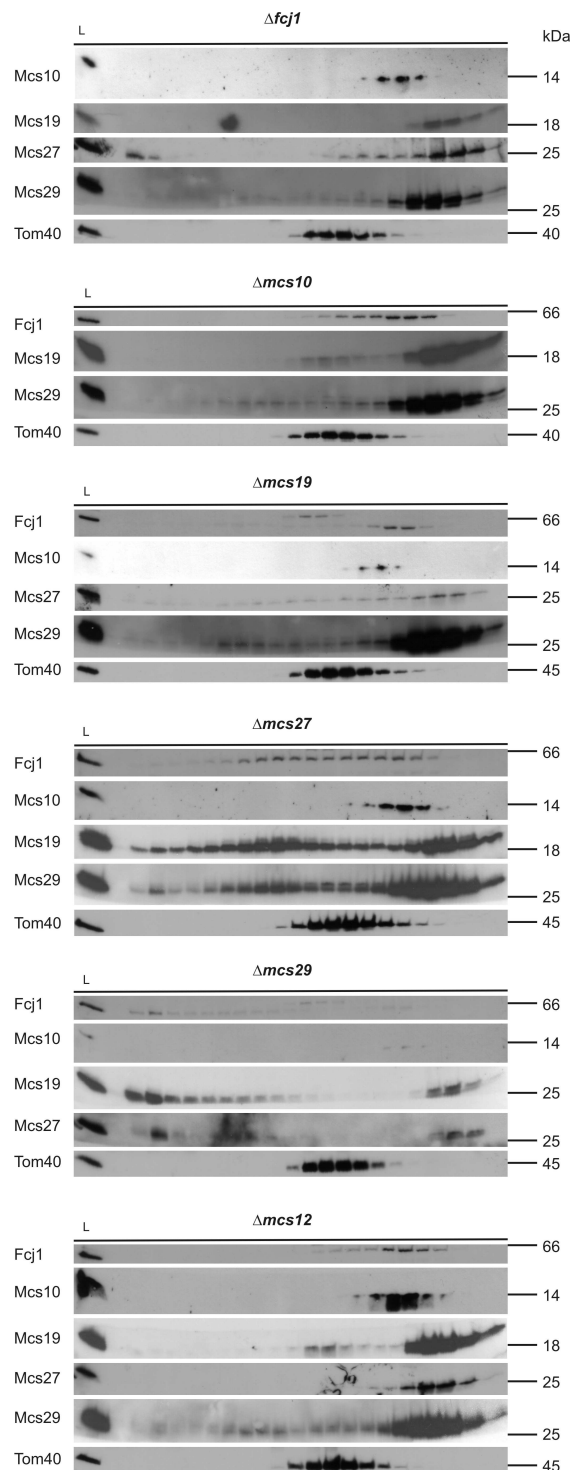


**Abb 3.26: Die Expression der Mcs-Proteine ist über ein regulatorisches Netzwerk miteinander verknüpft.** Aliquots von isolierten Mitochondrien wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit den angegebenen Antikörpern untersucht.

### 3.4.5 Deletion der einzelnen Mcs-Proteine und von Fcj1 führt zur Destabilisierung des MICOS I- und II-Komplexes

Weiter sollte nun mittels Größenausschlusschromatographie der Frage nachgegangen werden, welche Komponenten zur Bildung bzw. zur Stabilität der hochmolekularen Komplexe MICOS I und MICOS II beitragen. Dazu wurden aus den verschiedenen Einzeldelentionsstämmen (YPH499) Mitochondrien isoliert, in digitoninhaltigem Puffer lysiert und anschließend durch eine Superose 6-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) passiert (Abb. 3.29).





**Abb 3.27: Deletion einzelner Mcs-Proteine und Fcj1 führt zu einer Veränderung von MICOS I und II.** Isolierte Mitochondrien (YPH499) wurden in digitoninhaltigem Puffer lysiert und einer Größenausschlusschromatographie unterzogen (Superose 6-Säule (GE Healthcare)). Die Verteilung der einzelnen Proteine des MICOS-Komplexes wurde mit SDS-PAGE und Immundekoration untersucht. L, Load (10% des Gesamtlysats aufgetragen).

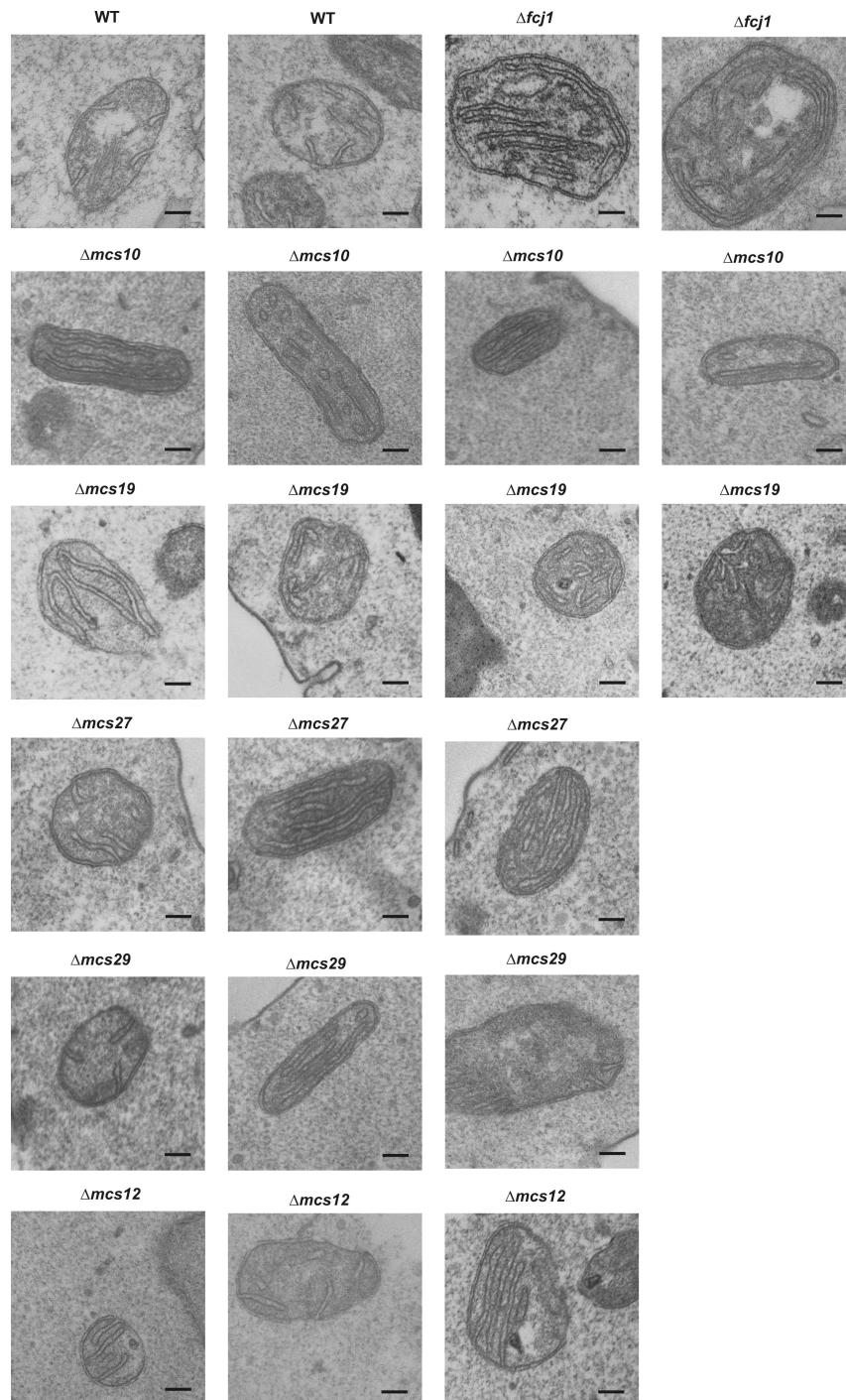
Alle Deletionsstämme zeigen Verschiebungen im Elutionsprofil der untersuchten Mcs-Proteine und von Fcj1. In  $\Delta fcj1$ -Mitochondrien war sowohl für Mcs19 wie auch für Mcs29 eine fast vollständige Verschiebung hin zu den niedermolekularen Komplexen beobachtbar,

während Mcs27 zu einem geringen Teil auch in Fraktionen, die nahe am Ausschlussvolumen eluierten, detektiert wurden. Dass es sich in letzterem Fall um Aggregate handelte, konnte nicht ausgeschlossen werden. Die Deletion von Mcs10, Mcs12 und Mcs19 führte zu einer fast vollständigen Abwesenheit von MICOS I und II. Gleichzeitig war die Signalintensität der niederoligomeren Komplexe durch Immundekoration stark erhöht. Die Deletion von Mcs27 führte zu einer Verschiebung von MICOS I zu MICOS II. Nach Deletion von Mcs29 hingegen konnte nur noch MICOS I und niederoligomere Komplexe detektiert werden. Zur Kontrolle wurde in allen Gelfiltrationsläufen Tom40 mit untersucht. Für dieses Protein wies das Elutionsprofil in allen Deletionsstämmen keinen Unterschied zum Wildtyp auf.

Folgende Schlussfolgerungen können gezogen werden: Die Stabilität bzw. die Zusammensetzung von MICOS I und II erfordert die Anwesenheit aller untersuchten Mcs-Proteine und von Fcj1, allerdings wirkte sich das Fehlen der einzelnen Proteine unterschiedlich aus. Während neben den niedermolekularen Komplexen in  $\Delta mcs27$ -Zellen hauptsächlich nur noch MICOS II und in  $\Delta mcs29$ -Zellen nur noch MICOS I beobachtet werden konnten, zeigten die Deletionen aller anderen Mcs-Proteine eine fast vollständige Verschiebung hin zu den niedermolekularen Komplexen. Fcj1, Mcs10, Mcs12 und Mcs19 leisten jeweils einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität bzw. Integrität sowohl von MICOS I als auch von MICOS II.

#### **3.4.6 Deletion der einzelnen Komplexuntereinheiten führt zu Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur**

Mit den Mcs-Proteinen wurden Proteine identifiziert, welche wie Fcj1 bevorzugt an CJs lokalisiert sind (Harner et al., 2011). Mittels elektronenmikroskopischer Studien wurde nun der Einfluss der Mcs-Proteine auf die mitochondriale Ultrastruktur analysiert. Dazu wurden die entsprechenden Hefezellen chemisch fixiert und in Kunstharz eingebettet. Dünnschnitte wurden anschließend mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert. Insbesondere wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Einzeldelentionsstämmen noch in der Lage sind, CJs auszubilden. Anhand der EM-Bilder wurden die Parameter Anzahl der CJs, Anzahl der Cristaspitzen, und die Anzahl der Verzweigungen der Cristamembran (Branches) bezogen auf jeweils 1 mitochondrialen Schnitt ausgewertet. Eine repräsentative Auswahl von Bildern mitochondrialer Schnitte ist in Abb. 3.30 gezeigt. Die quantitative Auswertung der einzelnen Parameter ist in Abb. 3.31 dargestellt.



**Abb. 3.28: Mcs-Proteine beeinflussen die mitochondriale Ultrastruktur-I.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrienschnitten von wt,  $\Delta fcj1$ ,  $\Delta mcs10$ ,  $\Delta mcs19$ ,  $\Delta mcs27$ ,  $\Delta mcs29$  und  $\Delta mcs12$ . Größenbalken 100nm.

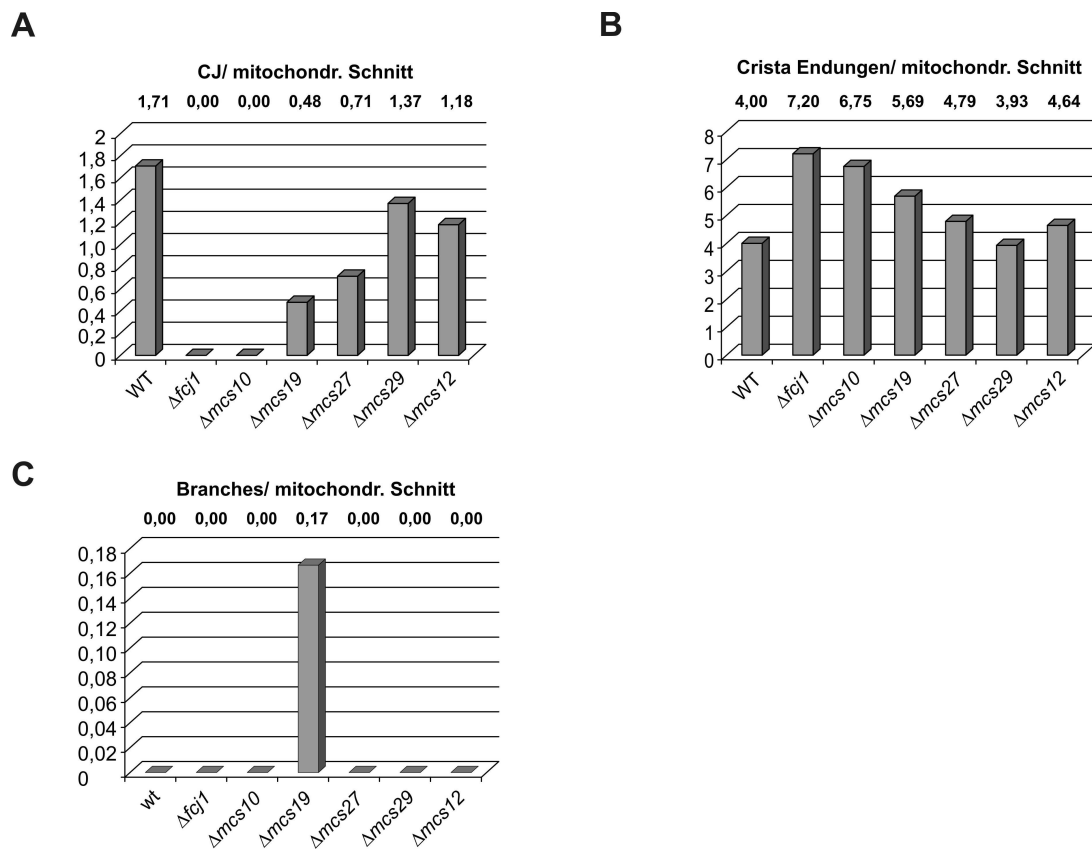
Wie in  $\Delta fcj1$ -Mitochondrien konnten in  $\Delta mcs10$ -Mitochondrien keine CJs mehr beobachtet werden, die Anzahl der Cristaspitzen (**C**rista **T**ips; CT) war mit einer durchschnittlichen Anzahl von 6,75 pro mitochondrialem Schnitt im Vergleich zum Wildtyp (4,00 CT pro mitochondrialem Schnitt) erhöht. Die Cristamembranen waren ebenfalls wie in  $\Delta fcj1$ -Mitochondrien häufig stapelförmig angeordnet. Die Deletion von Mcs19 führte zu einer drastischen Verringerung der Anzahl der CJ (0,48 CJ/ mitochondrialem Schnitt; WT: 1,71 CJ/

mitochondrialem Schnitt) und einer deutlichen Erhöhung der Cristaspitzen (5,69 CT/ mitochondrialem Schnitt); im Gegensatz zu  $\Delta fcj1$ - und  $\Delta mcs10$ -Mitochondrien konnten keine Crista Stapel beobachtet werden, dagegen war die Form mit häufigen „Knicken“ (Kinks) und Verzweigungen (Branches) aussergewöhnlich. Branches wurden u.a. in Hefestämmen die  $Fcjl$  überexprimieren, beobachtet (Rabl et al., 2009). Allerdings waren die verzweigten Cristae in  $\Delta msc19$ -Zellen häufig nicht durch CJs mit der IBM verbunden.

Die Deletionen von  $Mcs27$  und  $Mcs12$  führten beide zu einer Verringerung der Anzahl der CJs. Diese Reduktion fiel bei  $\Delta mcs27$ -Zellen mit einer durchschnittlichen Anzahl von 0,71 CJ pro mitochondrialem Schnitt deutlicher aus als bei  $\Delta mcs12$ -Zellen (1,18 CJ/ mitochondrialem Schnitt). Gleichzeitig konnten in beiden Stämmen häufig eine stapelförmige Anordnung der Cristamembran, ähnlich zu  $\Delta fcj1$ -Mitochondrien, beobachtet werden. Diese war im Gegensatz zu  $\Delta fcj1$  manchmal durch CJs mit der IBM verbunden. Die Häufigkeit der Cristaspitzen war in beiden Stämmen gegenüber Wildtyp leicht erhöht (4,79 CT/ mitochondrialem Schnitt in  $\Delta mcs27$ -Zellen und 4,64 CT/ mitochondrialem Schnitt in  $\Delta mcs12$ -Zellen).

Die Deletion von  $Mcs29$  führte mit einer durchschnittlichen Anzahl an CJ von 1,37 CJ/ mitochondrialem Schnitt zu der geringsten Erniedrigung und die Anzahl der Cristaspitzen war mit 3,93 CT/ mitochondrialem Schnitt mit der des Wildtyps vergleichbar.

Zusammenfassend ergaben die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, dass alle  $Mcs$ -Proteine die Architektur der mitochondrialen Innenmembran beeinflussen. Deletion von  $Mcs10$  bzw.  $Mcs19$  führten zu den drastischsten Auswirkungen auf die Ausbildung von CJs und die Form der Cristamembranen.



**Abb. 3.29: Mcs-Proteine beeinflussen die mitochondriale Ultrastruktur-II.** Quantifizierung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bzgl. (A) CJ/ mitochondrialem Schnitt (B) Cristaspitzen/ mitochondrialem Schnitt (C) Branches/ mitochondrialem Schnitt.

Stamm	Anzahl der mitochondrialen Schnitte	Anzahl der CJs	Anzahl der CJs pro mitochondrialem Schnitt
WT	24	41	1,71
$\Delta fcj1$	30	0	0,00
$\Delta mcs10$	28	0	0,00
$\Delta mcs19$	48	23	0,48
$\Delta mcs27$	28	20	0,71
$\Delta mcs29$	27	37	1,37
$\Delta mcs12$	39	46	1,18

Stamm	Anzahl der Cristaspitzen	Anzahl der Cristaspitzen pro mitochondrialem Schnitt	Anzahl der Branches	Anzahl der Branches pro mitochondrialem Schnitt
WT	96	4,00	0	0,00
$\Delta fcj1$	216	7,20	0	0,00
$\Delta mcs10$	189	6,75	0	0,00
$\Delta mcs19$	273	5,69	8	0,17
$\Delta mcs27$	134	4,79	0	0,00
$\Delta mcs29$	106	3,93	0	0,00
$\Delta mcs12$	181	4,64	0	0,00

**Tabelle 3.2.: Quantifizierung der Anzahl der CJs, Cristaspitzen und Branches in Mitochondrien in Wildtyp und den einzelnen Mcs-Deletionsstämmen**

## **4 Diskussion**

### **4.1 Funktionsanalyse der einzelnen Domänen von Fcj1**

Crista Junctions (CJs) verbinden die beiden Subkompartimente der Innenmembran, die Innere Grenzmembran (*inner boundary membrane* / IBM) und die Cristamembran (Zick et al., 2009)(Rabl et al., 2009). Diese stellen tubuläre Strukturelemente mit einer stark negativen Membrankrümmung dar. Über ihre Funktion, Entstehung und Dynamik ist noch wenig bekannt. Eine Rolle der CJs als Diffusionsbarriere für Metabolite zwischen Intermembranraum und Intracristaraum wird diskutiert (Mannella et al., 1994); auch erscheint ein regulatorischer Einfluss auf die laterale Verteilung von Innenmembranproteinen zwischen innerer Grenzmembran und Cristamembran möglich (Reichert und Neupert, 2002).

Deletion von Fcj1, einem Protein der Mitofilinfamilie führt zum Verlust der CJs. Dies wurde auch nach Depletion von Mitofilin in Säugerzellen beobachtet. Daher wurde dieser Proteinfamilie eine essentielle Rolle in der Ausbildung von CJs zugeschrieben (John et al., 2005; Rabl et al., 2009). Die molekulare Basis der Wirkungsweise von Fcj1 wurde einem antagonistischen Effekt zwischen Fcj1 und der Untereinheit *Su e* der ATP-Synthase zugeschrieben (Rabl et al., 2009). Demnach induzieren diese Proteine entgegengesetzte Membrankrümmungen. Fcj1, hauptsächlich an den CJs lokalisiert, ist für die negative, *Su e*, lokalisiert an den Cristaspitzen, ist für die positive Krümmung der Innenmembran verantwortlich. Die Membrankrümmung wird nach diesem Modell über die Oligomerisation der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase kontrolliert, die von Fcj1 und *Su e* beeinflusst wird. Fcj1 könnte als Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes (Rabl et al., 2009), als Gerüstprotein, die Membrankrümmung stabilisieren. Denkbar ist auch, dass Fcj1 Einfluss auf den Lipidmetabolismus hat. Fcj1 könnte durch Steuerung des Lipidmetabolismus indirekt auf die Stabilität hochmolekularer Komplexe einwirken, welche die Struktur der Membran beeinflussen. Dass die Deletion von Proteinen, die in den Lipidmetabolismus involviert sind, die Ultrastruktur von Mitochondrien verändern kann, ist bekannt. Zum Beispiel führen Mutationen in der Acyltransferase Tafazzin zu einer Reduktion von Cardiolipin in der Innenmembran; dies wiederum bewirkt eine abnormale Struktur der Cristamembran (Osman et al., 2011; Xu et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung verschiedener Bereiche von Fcj1 für die Funktionalität dieses Proteins durch Mutations- bzw. Deletionsanalyse verfolgt. Folgende Domänen von Fcj1 wurden untersucht: 1) Die Transmembrandomäne (TMD), die ein Dimeri-

sierungsmotiv beinhaltet, 2) die Coiled-Coil-Domäne und 3) die konservierte C-terminale Domäne.

1) Die Verankerung von Fcj1 in der Innenmembran durch eine TMD ist wichtig für dessen Funktion. Eine in dieser Arbeit untersuchte Fcj1-Variante ohne TMD konnte den Wachstumsphänotyp vom  $\Delta fcj1$ -Stamm auf nicht fermentierbarem Medium nicht komplementieren. Weiter führte dessen Überexpression auf fermentierbarem Medium zu einem dominant negativen Effekt. Welche Ursache dieser dominant negative Effekt hat bleibt offen. Die Expression dieser Variante konnte die mitochondriale Morphologie nur teilweise aufrechterhalten. Die Anzahl der CJs in diesem Stamm war deutlich reduziert.

Im Gegensatz zur Verankerung in der Innenmembran ist die Aminosäuresequenz der TMD von Fcj1 nicht entscheidend für dessen Funktionalität. Diese Schlussfolgerung beruht auf folgenden Beobachtungen: Weder die Zerstörung des Dimerisierungsmotivs noch der Austausch der TMD von Fcj1 gegen die TMD von Dld1 führten zu einer Reduktion der respiratorischen Kompetenz gegenüber Wildtyp. Die mitochondriale Morphologie dieser Mutanten war von der Morphologie des Wildtyps kaum zu unterscheiden. Die Expression dieser beiden Varianten in einem Fcj1-defizienten Stamm führte wieder zur Ausbildung von CJs, deren Anzahl allerdings unterschiedlich war. Daher könnte dieser Bereich einen regulatorischen Einfluss auf die Funktion von Fcj1 ausüben. Die Funktion des Dimerisierungsmotivs, das von Hefe bis zum Menschen konserviert ist, bleibt unklar.

2) Die Coiled-Coil-Domäne ist notwendig für die Ausbildung von CJs und die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie. Die Expression von Fcj1 ohne diesen Bereich konnte das Wachstumsdefizit des  $\Delta fcj1$ -Stammes zumindest teilweise komplementieren.

3) Die konservierte C-terminale Domäne ist für die Funktionalität von Fcj1 entscheidend. Dies zeigen verschiedene Ergebnisse. Die Expression einer Fcj1-Variante ohne diese Domäne in einem  $\Delta fcj1$ -Stamm verbesserte dessen respiratorische Kompetenz nicht. Die Abwesenheit dieser Domäne führte zu einer starken Reduktion der Anzahl an CJs. Die C-terminale Domäne ist notwendig für den dominant negativen Effekt, der bei Überexpression von Vollängen-Fcj1 in einem  $\Delta su e$ -Stamm beobachtet wurde. Dies legt nahe, dass der antagonistische Effekt zwischen  $Su e$  und Fcj1 von diesem Bereich abhängt. Die C-terminale Domäne bildet Homooligomere. Dies ist in Übereinstimmung mit früher gezeigten homotypischen Interaktionen von Vollängen-Fcj1 (Rabl et al., 2009). Eine Beteiligung weiterer Bereiche von Fcj1 an dessen oligomeren Struktur kann nicht ausgeschlossen werden.

Möglicherweise ist die Oligomerisation der C-terminalen Domäne und somit von Fcj1 die strukturelle Basis für die Rolle, die Fcj1 bei der Bildung von CJs einnimmt.

Die C-terminale Domäne von Fcj1 interagiert mit der Komponente Tob55 des TOB-Komplexes, der in der Außenmembran lokalisiert ist. Diese Domäne, fusioniert an GST, kann Fcj1 und Tob55 aus Wildtyp-Mitochondrien binden. Wenn  $\Delta f cj 1$ -Mitochondrien in gleicher Weise untersucht wurden, war die Bindung von Tob55 an die C-terminale Domäne noch stärker. Möglicherweise interagiert diese Domäne mit Fcj1 und Tob55 in einer kompetitiven Weise. Weitere Bereiche von Fcj1 sind offenbar nicht notwendig, um Tob55 zu binden. Co-Isolierungsexperimente bestätigten die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen. Die Komigration von Fcj1 und eines Teiles von Tob55, die bei Dichtegradientenzentrifugation mitochondrialer Membranvesikel beobachtet wurde, deutet darauf hin, dass die von Fcj1 und Tob55 ausgebildeten Kontaktstellen sehr stabil sind.

Es wurde schon früher spekuliert, ob Kontaktstellen zwischen der Außen- und der Innenmembran eine Rolle bei der Bildung und Stabilisierung von Cristae spielen (van der Klei et al., 1994). Die hier gezeigte Interaktion zwischen Fcj1, das hauptsächlich an den CJs lokalisiert ist (Rabl et al., 2009), und Tob55 ist ein Hinweis in diese Richtung. Da auch für das Fcj1-Homologe Mitofilin aus Säugerzellen Interaktion mit Tob55 beobachtet wurde (Darshi et al., 2011; Xie et al., 2007), scheint dies von Hefe bis zu Säugerzellen ein konserviertes Strukturmerkmal zu sein. Kürzlich wurde in *C.elegans* eine Interaktion zwischen dem Fcj1-Homologen Mitofilin und einem weiteren Außenmembranprotein, MOMA-1, beschrieben (Head et al., 2011). Dies unterstützt die Annahme, dass sich Kontaktstellen an den CJs befinden.

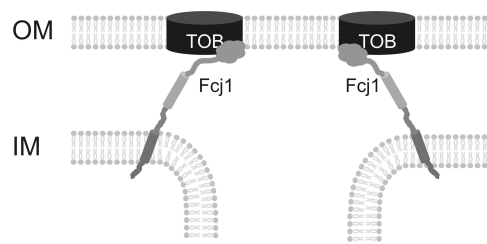
### **4.2 Mögliche Bedeutung der Fcj1-TOB-Interaktion**

Welche Funktion hat die Interaktion von Fcj1 mit Tob55? Importexperimente haben gezeigt, dass in  $\Delta f cj 1$ -Zellen der Import von  $\beta$ -Barrel-Proteinen über den TOB-Komplex nicht beeinträchtigt ist (Jovanna Dukanovic, Dissertation 2010, Tübingen). Daher ist eine Mitwirkung von Fcj1 am Import nicht wahrscheinlich.

Die Verteilung von Tob55 in Membranvesikeln aus isolierten Mitochondrien, die über einen Dichtegradienten aufgetrennt wurden, läßt die Existenz zweier Subpopulationen des TOB-Komplexes erkennen. Der größere Anteil war in der isolierten Außenmembran anwesend, ein kleinerer Anteil in Fraktionen, die gemischte Vesikel aus Außen- und Innenmembran enthielten. Die Interaktion der C-terminalen Domäne von Fcj1 mit Tob55 könnte dafür verantwortlich sein, dass CJs in der Außenmembran verankert und dadurch



stabilisiert werden (Abb.4.1). Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Deletion der C-terminalen Domäne von Fcj1 zu einer fast vollständigen Abwesenheit von CJs führte. Im Wildtyp befinden sich CJs nur an der Inneren Grenzmembran nahe der Außenmembran. Innere Verzweigungen der Cristamembran (Branches), wie sie bei der Überexpression von Fcj1 auftreten, sind im Wildtyp nicht vorhanden. Überexpression von Fcj1 führte nicht zur Hochregulation von Tob55. Somit könnte dieses Protein der limitierende Faktor für die Verankerung und Stabilisierung der CJs in der Außenmembran sein.



**Abb.4.1: Modell zur Verankerung der CJs durch Bindung von Fcj1 an Tob55.** Die C-terminale Domäne von Fcj1 interagiert mit der Komponente Tob55 des TOB-Komplexes. OM, Außenmembran; IM, Innenmembran.

Das Modell einer Stabilisierung von CJs über Kontaktstellen an der Außenmembran gibt eine mögliche Erklärung für die Phänotypen, die bei Expression einer Fcj1-Variante mit fehlender Coiled-Coil-Domäne beobachtet wurde. Die Deletion der Coiled-Coil Domäne führte zu einem fast vollständigen Verlust der Fähigkeit von Fcj1, CJs auszubilden. Dagegen resultierte die Expression dieser Fcj1-Variante in einer erhöhten respiratorischen Kompetenz im Vergleich mit dem  $\Delta f cj 1$ -Stamm. Möglicherweise hängt dieses verbesserte Wachstum mit einer etwas erhöhten Stabilität der CJs zusammen, die auf die Interaktion der C-terminalen Domäne mit Tob55 zurückzuführen ist. Wie Fcj1-defiziente Zellen überleben können bzw. wie Proteine der Atmungskette in Abwesenheit von CJs in die Cristamembran gelangen können wurde bereits früher diskutiert (Regina Steck, Dissertation, München 2010). Es wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass in  $\Delta f cj 1$ -Zellen die Zugänglichkeit zur Cristamembran durch Fusions- und Teilungsprozesse ermöglicht wird. CJs könnten in diesem Stamm zwar vorhanden, aber aufgrund fehlender Stabilität zu kurzlebig sein um detektiert werden zu können. Durch Expression der  $\Delta$ Coiled-Coil-Variante von Fcj1 könnte deren C-terminale Domäne mit verminderter Affinität mit Tob55 interagieren. Dadurch wäre die Stabilität der CJs etwas höher und könnte einen, wenn auch geringeren Fluss von Proteinen in die Cristamembran ermöglichen.

Die Interaktion des TOB-Komplexes mit Fcj1 könnte ihren Ursprung in einer gemeinsamen Rolle im Lipidtransport haben: Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Lipidtransport von der Außen- zur Innenmembran gestört ist. Die mitochondriale Außenmembran des  $\Delta fcl1$ -Stammes weist eine höhere Dichte auf als die Außenmembran des Wildtyp-Stammes. Dies ist ein Hinweis auf einen veränderten Lipidgehalt in der Außenmembran.

Die Herunterregulierung des prokaryotischen Homologen von Tob55, Omp85, führte zu einer Anreicherung von Lipiden in der Innenmembran und zu einer Abreicherung in der Außenmembran der Bakterien. Dies ist ein Hinweis, dass Omp85 in den Lipidtransport zwischen der bakteriellen Außen- und Innenmembran involviert ist (Genevrois et al., 2003). Die Untereinheit des TOB-Komplexes Mas37 wurde ursprünglich in einem Screen für Gene entdeckt, die den Phospholipidmetabolismus kontrollieren (Gratzer et al., 1995). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde ein Einfluss von Mas37 auf den Lipidtransport gezeigt (Dagley et al., 2011). Die Interaktion von Fcj1 und TOB hat sich möglicherweise im Lauf der Evolution der Mitochondrien entwickelt, um den Lipidtransport vom endoplasmatischen Retikulum in die Mitochondrien zu gewährleisten. Auch für einen weiteren Interaktionspartner des TOB-Komplexes, Mdm10, wird eine Rolle im Lipidtransport diskutiert: Mdm10, ist Bestandteil des ERMES-Komplexes (siehe 1.4), der in der Ausbildung von Kontaktstellen Mitochondrien und dem endoplasmatische Retikulum (ER) eine wichtige Rolle einnimmt (Kornmann et al., 2009; Kornmann und Walter, 2010). Nahezu alle Phospholipide bzw. deren Vorstufen werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und auf noch unbekanntem Weg zum Mitochondrium transportiert (Osman et al., 2011). Für den Lipidtransport zwischen Mitochondrien und ER wurde eine Beteiligung des ERMES-Komplexes diskutiert (Kornmann et al., 2009). Diese Lipide könnten weiter über die Kontaktstellen zwischen Außen- und Innenmembran transportiert werden, wobei deren Ziellokalisation, die Innere Grenzmembran und die Cristamembran, durch die CJs reguliert wird.

Die Deletion von Fcj1, Komponenten des TOB und Komponenten des ERMES-Komplexes führt zu ähnlichen Veränderungen der mitochondrialen Morphologie.  $\Delta fcl1$ -Zellen enthalten vergrößerten Mitochondrien. Dies wurde ebenso für Tob38- und Mas37-defiziente Zellen beobachtet (Meisinger et al., 2007; Meisinger et al., 2004). Auch führt die Deletion der Untereinheiten des ERMES-Komplexes (Mdm10, Mdm12, Mdm34 und Mmm1) zur Ausbildung von stark vergrößerten Mitochondrien (Berger et al., 1997; Boldogh et al., 2003). Für diesen Phänotyp kommt möglicherweise eine gemeinsame Ursache in Frage: Eine

Störung des Lipidtransportes könnte die Zusammensetzung der mitochondrialen Membranen ändern und somit die veränderte Morphologie verursachen.

### **4.3 Der MICOS-Komplex und die mitochondriale Architektur der Mitochondrien**

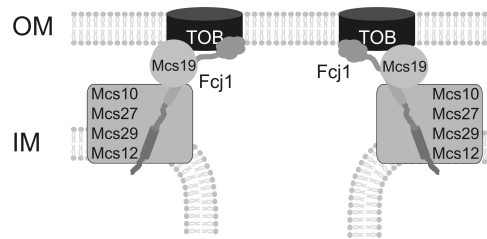
Hochmolekulare Komplexe spielen eine entscheidende Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung der Struktur der Mitochondrien. Erstmals wurde dies am Beispiel der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase beobachtet. Der hocholigomeren ATP-Synthase wird dabei eine stabilisierende Funktion der Cristamembranen zugeschrieben. Die Deletion der Untereinheiten *Su e* und *Su g*, die für die Dimerisierung und Oligomerisierung einzelner ATP-Synthase-Untereinheiten notwendig sind (Arnold et al., 1998), führten zu einer abnormalen Struktur der Cristamembran (Bornhovd et al., 2006; Giraud et al., 2002; Paumard et al., 2002). Weiterhin wird ein Einfluss der Superkomplexe der Atmungskettenkomplexe auf die Architektur der Innenmembran diskutiert (Zick et al., 2009). Bislang war *Fcj1* das einzige Protein, dem eine essenzielle Bedeutung für die Bildung von CJs zugeschrieben wurde (Rabl et al., 2009). In jener Arbeit wurde berichtet, dass *Fcj1* Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes ist. Allerdings konnten keine Interaktionspartner dieses Proteins gefunden werden. Mit den hier beschriebenen *Mcs*-Proteinen wurden Proteine identifiziert, die zusammen mit *Fcj1* die beiden hochmolekulare Komplexe MICOS I und MICOS II bilden. Die *Mcs*-Proteine sind ebenso wie *Fcj1* hauptsächlich in den CJs lokalisiert (Harner et al., 2011). Deletionen von einzelnen Komponenten des MICOS-Komplexes führten zu einer Destabilisierung von MICOS I und MICOS II. Diese Beobachtungen legten einen Einfluss der *Mcs*-Proteine auf die mitochondriale Ultrastruktur nahe. Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Untersuchungen decken eine enge Beziehung zwischen der Struktur der mitochondrialen Innenmembran und der Präsenz der einzelnen *Mcs*-Proteine auf. Die Deletion dieser *Mcs*-Proteine führt zu einer Reduktion der Anzahl der CJs. In den meisten Deletionsstämmen waren die Cristamembranen, wie in dem  $\Delta fcl1$ -Stamm, stapelförmig angeordnet.

Von den untersuchten *Mcs*-Proteinen sind zwei, *Mcs10* und *Mcs19*, besonders bemerkenswert.

Die Deletion von *Mcs10* führte ebenso wie die Deletion von *Fcj1* zu einer vollständigen Abwesenheit von beobachtbaren CJs. Weitere Gemeinsamkeiten im Phänotyp der Deletionen von *Fcj1* und *Mcs10* waren die stapelförmige Anordnung der Cristamembran und die beträchtliche Erhöhung der Anzahl der Cristaspitzen im Vergleich zum Wildtyp. Ob die beobachteten Effekte dieser beiden Proteine gemeinsame molekulare Ursachen haben, ist allerdings unklar. Auch ist offen, ob diese Phänotypen allein auf das Fehlen von *Mcs10*

zurückzuführen sind. Auch sind Sekundäreffekte in Betracht zu ziehen. So ist die Proteinmenge von Mcs27 in  $\Delta mcs10$  stark reduziert. Die Deletion von Mcs27 führte zwar nur zu einer moderaten Verringerung der Anzahl der CJs. Allerdings waren hier die Cristamembranen häufig stapelförmig angeordnet, wie es ebenfalls in  $\Delta fcj1$ - und  $\Delta mcs10$ -Zellen beobachtet wurde. Daher könnte der hier beobachtete Phänotyp auch auf eine Doppeldeletion von Mcs10 und Mcs27 beruhen.

Die Deletion von Mcs19 führte zu einer starken Reduktion der Anzahl an CJs und gleichzeitig zur Ausbildung von internen Verzweigungen der Cristamembran (Branches). Dies ist hinsichtlich der Architektur der mitochondrialen Innenmembran ein neuer Phänotyp. Bislang wurden Verzweigungen nur bei einem gleichzeitigen Anstieg von CJs beobachtet und wurden auf den Oligomerisationszustand der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase zurückgeführt, der von Fcj1 bzw. Su *e* kontrolliert wird. Was könnte die Ursache für die Veränderung der Ultrastruktur von Mitochondrien in  $\Delta mcs19$ -Zellen sein? Mcs19 interagiert ebenso wie Fcj1 mit Tob55 (Harner et al., 2011). Ob die beiden Komponenten direkt an TOB binden ist noch nicht geklärt. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde aufgrund von Coimmunopräzipitationsexperimenten postuliert, dass in der Maus Mitofilin über das Coiled-Coil-Helix Protein ChChd3 mit Tob55 interagiert (Darshi et al., 2011). Die Komponente des MICOS-Komplexes Mcs19 enthält ebenso wie ChChd3 ein Myristoylierungsmotiv am N-Terminus sowie ein konserviertes  $CX_{10}C$ -Motiv am C-Terminus. Die Verteilung von Mcs19 bei der Gradientenzentrifugation nach Subfraktionierung von Mitochondrien weist einen relativ hohen Anteil in der Außenmembranfraktion auf (Harner et al., 2011). Dies legt eine zumindest partielle Lokalisation, ähnlich wie ChChd3 an der Außenmembran nahe. Ob es sich bei ChChd3 um ein Protein handelt, das homolog zu Mcs19 ist, kann aber aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit nicht mit Sicherheit gesagt werden. Mcs19 könnte entweder eine direkte Interaktion zwischen Fcj1 und Tob55 stabilisieren oder eine indirekte Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen vermitteln. Das Fehlen von Mcs19 könnte zur (Fehl-) Lokalisation von Fcj1 zu den Cristamembranen führen und dadurch die Ausbildung von Verzweigungen der Cristae auslösen. Verzweigungen wurden auch bei Überexpression von Fcj1 beobachtet ist. Gegen die Annahme, dass Mcs19 für die Interaktion zwischen Fcj1 und Tob55 notwendig ist sprechen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, die auf eine direkte Interaktion der C-terminalen Domäne von Fcj1 mit Tob55 hindeuten. Somit erscheint ein stabilisierender Einfluss von Mcs19 auf diese Interaktion wahrscheinlicher (Abb. 4.2).



**Abb.4.2: Modell zur Stabilisierung der Interaktion zwischen Fcj1 und Tob55 durch die Komponente des MICOS-Komplexes Mcs19.** Die Komponenten des MICOS-Komplexes Mcs10, Mcs27, Mcs29 und Mcs12 sind schematisch dargestellt. OM, Außenmembran; IM, Innenmembran. Zur Erläuterung siehe Text.

Die Stabilität und Integrität der Komplexe MICOS I und MICOS II ist vor allem von Mcs10 und Fcj1 abhängig. Mcs10 bildet wie Fcj1 homotypische Interaktionen aus. Möglicherweise sind diese Strukturmerkmale das Grundgerüst für MICOS I und MICOS II. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigen die Bedeutung, die ein funktioneller MICOS-Komplex für die Architektur von Mitochondrien hat. Die Struktur der Mitochondrien ist wichtig für die Funktion von Mitochondrien, wie Ergebnisse zeigen. Die Deletionen von Fcj1 und einigen Mcs-Proteinen führt zu einer Abnahme der respiratorischen Kompetenz (Harner et al., 2011). Die Vererbung von mitochondrialer DNA erfordert die Anwesenheit von Fcj1 und drei weiteren Mcs-Proteinen. Diese Mcs-Proteine wurden als Aim-Proteine („*altered inheritance of mitochondrial DNA*“) klassifiziert (Hess et al., 2009). Der Lipidtransport zwischen den Membranen scheint abhängig von MICOS zu sein. Darauf deuten Ergebnisse für Fcj1 hin, die in dieser Arbeit gezeigt wurden. Wie dies von den einzelnen Komponenten des MICOS-Komplexes auf molekularer Ebene bewirkt wird und wie Architektur und Funktion miteinander verknüpft sind, müssen künftige Studien zeigen.

## 5 Zusammenfassung

Die molekularen Grundlagen der Struktur der Mitochondrien sind weitgehend unbekannt. Eine wesentliche Frage dabei ist die Organisation der Innenmembran der Mitochondrien, die in die innere Grenzmembran und die Cristamembran unterteilt ist. Diese beiden Membranteile sind durch die Crista Junctions verbunden, tubuläre Strukturen, in denen eine stark negative Membrankrümmung vorliegt.

Vor kurzer Zeit wurde eine Proteinkomponente der mitochondrialen Innenmembran identifiziert, Fcj1, die eine wesentliche Rolle für die Ausbildung der mitochondrialen Ultrastruktur hat. In ihrer Abwesenheit fehlen Crista Junctions, die Form und Anordnung der Crista ist verändert. Die Mitochondrien werden atmungsdefizient und verlieren ihre mitochondriale DNA. Fcj1 wirkt antagonistisch zu den Untereinheiten *Su e* und *Su g* der ATP-Synthase, die ihrerseits die mitochondriale Struktur bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit sollten zum einen die verschiedenen Bereiche des Fcj1-Proteins hinsichtlich ihrer Funktion untersucht werden, sowie mögliche Interaktionspartner gefunden werden und der Beitrag zur Architektur von Mitochondrien analysiert werden.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1) Fcj1 ist mit einer Transmembrandomäne in der Innenmembran verankert. Für die Funktion von Fcj1 ist das Vorhandensein einer Transmembrandomäne wichtig. Allerdings ist deren Aminosäuresequenz nicht entscheidend. Der carboxyterminale Hauptteil des Proteins besteht aus einer Coiled-Coil-Domäne und einer C-terminalen Domäne. Die Coiled-Coil-Domäne ist für die Ausbildung von Crista Junctions notwendig, jedoch ist eine Fcj1-Variante ohne diese Domäne noch in der Lage die respiratorische Inkompetenz von Mitochondrien ohne Fcj1 teilweise zu kompensieren. Die C-terminale Domäne, der einzige Bereich von Fcj1 mit einer erkennbar konservierten Aminosäuresequenz, ist für die Funktion von Fcj1 essentiell. Dieser Bereich befähigt Fcj1 zur Bildung von Homooligomeren. Diese Eigenschaft der C-terminalen Domäne ist wahrscheinlich notwendig für die Ausbildung von CJs.

2) Fcj1 interagiert mit Tob55, einer Komponente des TOB-Komplexes in der Außenmembran. Dieser Proteinkomplex vermittelt die Insertion von  $\beta$ -Barrel-Proteinen in die Außenmembran. Die C-terminale Domäne ist für diese Interaktion erforderlich. Diese Interaktion zwischen Fcj1 und dem TOB-Komplex ist notwendig für die Ausbildung von Kontaktstellen zwischen der Innen- und der Außenmembran. Diese Kontaktstellen spielen

offenbar eine zentrale Rolle bei der Verankerung der Crista Junctions an der Außenmembran. Funktionen in weiteren Prozessen wie dem Lipidtransport sind aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse wahrscheinlich.

3) Fcj1 bildet mit fünf Proteinen die beiden hochmolekularen Komplexe MICOS I und MICOS II (*mitochondrial contact site*). Deren apparente Massen betragen ca. 1,5 bzw. 0,7 kDa. Die diese Komplexe aufbauenden Mcs-Proteine (*mitochondrial contact site*) Mcs10, Mcs12, Mcs19, Mcs27 und Mcs29 sind wie Fcj1 entscheidende Komponenten für die Architektur der mitochondrialen Innenmembran und insbesondere für die Ausbildung von CJs. Von diesen Proteinen wurden die folgenden schwerpunktmäßig untersucht:

Mcs10 weist einige Gemeinsamkeiten mit Fcj1 auf: So führt dessen Deletion zu einer vollständigen Abwesenheit von Crista Junctions und die Cristamembranen sind wie in  $\Delta fcj1$ -Mitochondrien stapelförmig angeordnet. Mcs10 bildet homotypische Assoziationen aus. Die Deletion von Mcs19 führt zu einer starken Reduktion der Anzahl an Crista Junctions und gleichzeitig zu Verzweigungen der Cristamembran. Möglicherweise stabilisiert Mcs19 die Interaktion zwischen Fcj1 und Tob55. Die Deletion von Mcs19 führt möglicherweise zu einer vermehrten Fehllokalisation von Fcj1 in das Innere der Cristamembran und ruft dort innere Verzweigungen hervor. Die Deletion der einzelnen Mcs-Proteine führt zu einer moderaten bis starken Reduktion der Anzahl der Crista Junctions. In den untersuchten Deletionsstämmen werden häufig, ähnlich wie in  $\Delta fcj1$ -Mitochondrien, stapelförmig angeordnete Cristamembranen beobachtet.

Der MICOS-Komplex ist nicht nur entscheidend für die Architektur von Mitochondrien. Einige der Komponenten des Komplexes sind notwendig für die Aufrechterhaltung der respiratorischen Kompetenz und der Fähigkeit, die mitochondriale DNA zu vererben. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen auch nahe, dass MICOS wichtig für den Lipidtransport in die Mitochondrien ist. Die vorliegenden Resultate stellen erste Schritte zum Verständnis der molekularen Grundlagen der mitochondrialen Architektur dar.

**6 Literaturverzeichnis**

- Acehan, D., Xu, Y., Stokes, D.L., Schlame, M. (2007). Comparison of lymphoblast mitochondria from normal subjects and patients with Barth syndrome using electron microscopic tomography. *Lab Invest* 87, 40-48.
- Allen, R.D., Schroeder, C.C., Fok, A.K. (1989). An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J Cell Biol* 108, 2233-2240.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., Schagger, H. (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* 17, 7170-7178.
- Arselin, G., Giraud, M.F., 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, 1875-1884.
- Becker, T., Wenz, L.S., Thornton, N., Stroud, D., Meisinger, C., Wiedemann, N., Pfanner, N. (2011). Biogenesis of mitochondria: dual role of Tom7 in modulating assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *J Mol Biol* 405, 113-124.
- Berger, K.H., Sogo, L.F., Yaffe, M.P. (1997). Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol* 136, 545-553.
- Berger, K.H., Yaffe, M.P. (2000). Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol* 8, 508-513.
- 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.
- Bione, S., D'Adamo, P., Maestrini, E., Gedeon, A.K., Bolhuis, P.A., Toniolo, D. (1996). A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet* 12, 385-389.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* 1, 298-304.
- Boldogh, I.R., Nowakowski, D.W., Yang, H.C., Chung, H., Karmon, S., Royes, P., Pon, L.A. (2003). A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell* 14, 4618-4627.
- Bornhovd, C., Vogel, F., Neupert, W., Reichert, A.S. (2006). Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes. *J Biol Chem* 281, 13990-13998.



- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.
- Brandner, K., Mick, D.U., Frazier, A.E., Taylor, R.D., 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*, 5202-5214.
- Chance, B., Williams, G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J Biol Chem* *217*, 429-438.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 15927-15932.
- Dagley, M.J., Gentle, I.E., Beilharz, T.H., Pettolino, F.A., Djordjevic, J.T., Lo, T.L., Uwamahoro, N., Rupasinghe, T., Tull, D.L., McConville, M., Beaurepaire, C., Nantel, A., Lithgow, T., Mitchell, A.P., Traven, A. (2011). Cell wall integrity is linked to mitochondria and phospholipid homeostasis in *Candida albicans* through the activity of the post-transcriptional regulator Ccr4-Pop2. *Mol Microbiol* *79*, 968-989.
- Dalbey, R.E., Kuhn, A. (2000). Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 51-87.
- Darshi, M., Mendiola, V.L., Mackey, M.R., Murphy, A.N., Koller, A., Perkins, G.A., Ellisman, M.H., Taylor, S.S. (2011). ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem* *286*, 2918-2932.
- Daum, G., Bohni, P.C., 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*, 13028-13033.
- Dembowski, M., Kunkele, K.P., Nargang, F.E., Neupert, W., Rapaport, D. (2001). Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* *276*, 17679-17685.
- Dolder, M., Wendt, S., Wallimann, T. (2001). Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol Signals Recept* *10*, 93-111.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W., Brunner, M. (2000). Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* *101*, 401-412.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* *16*, 6127-6145.
- Dukanovic, R. (2010) Novel insights into the functions of the TOB complex in the mitochondrial outer membrane. Dissertation, Tübingen.

- Endres, M., Neupert, W., Brunner, M. (1999). Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J* 18, 3214-3221.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Braun, H.P. (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 42, 937-942.
- Fawcett DW (1981): Mitochondria. In Saunders WB (ed): "The Cell." Philadelphia.
- Frey, T.G., Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25, 319-324.
- Frey, T.G., Renken, C.W., Perkins, G.A. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 1555, 196-203.
- Gaigg, B., Simbeni, R., Hrastnik, C., Paltauf, F., Daum, G. (1995). Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1234, 214-220.
- Genevrois, S., Steeghs, L., Roholl, P., Letesson, J.J., van der Ley, P. (2003). The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *EMBO J* 22, 1780-1789.
- 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, 395-399.
- Giraud, M.F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brethes, D., di Rago, J.P., 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, 174-180.
- Glick, B.S., Beasley, E.M., Schatz, G. (1992). Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem Sci* 17, 453-459.
- Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R.E., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S.D., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G., Horst, M. (1995). Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J Cell Biol* 129, 25-34.
- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Guthrie C, Fink GR (1991): Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol* 194, 1-270.
- Hackenbrock, C.R. (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, 269-297.
- Hackenbrock, C.R. (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, C.R., Chazotte, B., Gupte, S.S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18, 331-368.
- Hackenbrock, C.R., Miller, K.J. (1975). The distribution of anionic sites on the surfaces of mitochondrial membranes. Visual probing with polycationic ferritin. *J Cell Biol* 65, 615-630.
- Harner M., Körner C., Walther D., Mokranjac D., Kaesmacher J., Welsch U., Griffith J., Mann T., Reggiori F., Neupert W. (2011) The Mitochondrial Contact Site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J*, advance online publication 18 October 2011; doi:10.1038/emboj.2011.379.
- Head, B.P., Zulaika, M., Ryazantsev, S., van der Blik, A.M. (2011). A novel mitochondrial outer membrane protein, MOMA-1, that affects cristae morphology in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 22, 831-841.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W., Stuart, R.A. (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2250-2255.
- Hell, K., Neupert, W., Stuart, R.A. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J* 20, 1281-1288.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., Reichert, A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 278, 27781-27788.
- Herrmann, J.M., Neupert, W. (2000). Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* 3, 210-214.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143, 359-373.
- Herrmann, J.M., Neupert, W., Stuart, R.A. (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J* 16, 2217-2226.
- Hess, D.C., Myers, C.L., Huttenhower, C., Hibbs, M.A., Hayes, A.P., Paw, J., Clore, J.J., Mendoza, R.M., Luis, B.S., Nislow, C., Giaever, G., Costanzo, M., Troyanskaya, O.G., Caudy, A.A. (2009). Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS Genet* 5, e1000407.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* 395, 516-521.
- Hoppins, S.C., Nargang, F.E. (2004). The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 279, 12396-12405.

- 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, 301-306.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170, 1021-1027.
- Ishikawa, D., Yamamoto, H., Tamura, Y., Moritoh, K., Endo, T. (2004). Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate beta-barrel protein assembly. *J Cell Biol* 166, 621-627.
- Jensen, R.E., Dunn, C.D. (2002). Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta* 1592, 25-34.
- John, G.B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C.A., Selker, J.M., Rangell, L., Bennett, M.J., Zha, J. (2005). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell* 16, 1543-1554.
- Kellems, R.E., Allison, V.F., Butow, R.A. (1975). Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *J Cell Biol* 65, 1-14.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325, 477-481.
- Kornmann, B., Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci* 123, 1389-1393.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N. (2003). An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 278, 48520-48523.
- Krause, F., Reifschneider, N.H., Goto, S., Dencher, N.A. (2005). Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 583-590.
- Krause, F., Scheckhuber, C.Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N.H., Dencher, N.A., Osiewacz, H.D. (2004). Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *J Biol Chem* 279, 26453-26461.
- Krayl, M., Lim, J.H., Martin, F., Guiard, B., Voos, W. (2007). A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. *Mol Cell Biol* 27, 411-425.
- Kunkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., Neupert, W. (1998). The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93, 1009-1019.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Mannella, C.A. (2006). The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* 1762, 140-147.
- Mannella, C.A., 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, 278-283.
- Mannella, C.A., Pfeiffer, D.R., Bradshaw, P.C., Moraru, II, Slepchenko, B., Loew, L.M., Hsieh, C.E., Buttle, K., Marko, M. (2001). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* 52, 93-100.
- Marques, I., Dencher, N.A., Videira, A., Krause, F. (2007). Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eukaryot Cell* 6, 2391-2405.
- Martin, J., Mahlke, K., Pfanner, N. (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem* 266, 18051-18057.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D.R., Ryan, M.T. (2006). Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J Mol Biol* 361, 462-469.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M., Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.
- Meisinger, C., Pfannschmidt, S., Rissler, M., Milenkovic, D., Becker, T., Stojanovski, D., Youngman, M.J., Jensen, R.E., 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, 2229-2239.
- Meisinger, C., Rissler, M., Chacinska, A., Szklarz, L.K., Milenkovic, D., Kozjak, V., Schonfisch, B., Lohaus, C., Meyer, H.E., Yaffe, M.P., Guiard, B., Wiedemann, N., Pfanner, N. (2004). The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell* 7, 61-71.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., Herrmann, J.M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121, 1059-1069.
- Miller, J.F., Dower, W.J., Tompkins, L.S. (1988). High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 856-860.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

- Model, K., Meisinger, C., Prinz, T., Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfanner, N., Ryan, M.T. (2001). Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Biol* 8, 361-370.
- Mokranjac, D., Neupert, W. (2009). Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta* 1793, 33-41.
- Mokranjac, D., Paschen, S.A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S.C., Nargang, F.E., Neupert, W., Hell, K. (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J* 22, 816-825.
- Mokranjac, D., Popov-Celeketic, D., Hell, K., Neupert, W. (2005). Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *J Biol Chem* 280, 23437-23440.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151, 367-380.
- Muhlenhoff, U., Lill, R. (2000). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1459, 370-382.
- Neupert, W., Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 555-565.
- Neupert, W., Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 723-749.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* 8, 1233-1242.
- Odgren, P.R., Toukatly, G., Bangs, P.L., Gilmore, R., Fey, E.G. (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), 2253-2264.
- Osman, C., Voelker, D.R., Langer, T. (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol* 192, 7-16.
- Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1, 188-211.
- Paschen, S.A., 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, 862-866.
- Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brethes, D., di Rago, J.P., Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21, 221-230.

- Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M., Frey, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* 119, 260-272.
- Perkins, G.A., Renken, C.W., van der Klei, I.J., Ellisman, M.H., Neupert, W., Frey, T.G. (2001). Electron tomography of mitochondria after the arrest of protein import associated with Tom19 depletion. *Eur J Cell Biol* 80, 139-150.
- Perkins, G.A., Song, J.Y., Tarsa, L., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Frey, T.G. (1998). Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions. *J Bioenerg Biomembr* 30, 431-442.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., Schagger, H. (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 278, 52873-52880.
- Pon, L., Moll, T., Vestweber, D., Marshallsay, B., Schatz, G. (1989). Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. *J Cell Biol* 109, 2603-2616.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D.G., 2nd, Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M.E., Moore, R.J., Gritsenko, M.A., Kozany, C., Hixson, K.K., Mottaz, H.M., Zischka, H., Ueffing, M., Herman, Z.S., Davis, R.W., Meitinger, T., Oefner, P.J., Smith, R.D., Steinmetz, L.M. (2004). Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol* 2, e160.
- 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, A.S. (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcjl and Su e/g. *J Cell Biol* 185, 1047-1063.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 20150-20155.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kuhlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N., Pfanner, N. (2003). Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* 299, 1747-1751.
- Reichert, A.S., Neupert, W. (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1592, 41-49.
- Reichert, A.S., Neupert, W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet* 20, 555-562.
- Rothstein, R.J., Sherman, F. (1980). Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics* 94, 871-889.
- Rubinstein, J.L., Walker, J.E., Henderson, R. (2003). Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J* 22, 6182-6192.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283, 1488-1493.
- Schagger, H., Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777-1783.
- Scheffler, I.E. (2001). Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev* 49, 3-26.
- Schmidt, O., Pfanner, N., Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 655-667.
- Schmitt, S., Ahting, U., Eichacker, L., Granvogl, B., Go, N.E., Nargang, F.E., Neupert, W., Nussberger, S. (2005). Role of Tom5 in maintaining the structural stability of the TOM complex of mitochondria. *J Biol Chem* 280, 14499-14506.
- Sesaki, H., Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol* 147, 699-706.
- Sesaki, H., Jensen, R.E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 152, 1123-1134.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13207-13212.
- Sikorski, R.S., Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W., Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* 384, 582-585.
- Sogo, L.F., Yaffe, M.P. (1994). Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 126, 1361-1373.
- 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, 10739-10745.



- Steck, R. (2010). Die Rolle des Proteins Fcj1 und der Untereinheiten Su e/Su g der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase bei der Entstehung von Cristae und Crista Junctions in Mitochondrien. Dissertation, München.
- Stojanovski, D., Guiard, B., Kozjak-Pavlovic, V., Pfanner, N., Meisinger, C. (2007). Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins. *J Cell Biol* 179, 881-893.
- Tieu, Q., Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol* 151, 353-366.
- Tokuyasu, K.T. (1989). Use of poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinyl alcohol) for cryoultramicrotomy. *Histochem J* 21, 163-171.
- 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, 4350-4354.
- Trotter, P.J., Pedretti, J., Voelker, D.R. (1993). Phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of mutants, cloning of the gene, and creation of a null allele. *J Biol Chem* 268, 21416-21424.
- van der Klei, I.J., Veenhuis, M., Neupert, W. (1994). A morphological view on mitochondrial protein targeting. *Microsc Res Tech* 27, 284-293.
- Velours, J., Arselin, G. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* 32, 383-390.
- Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175, 237-247.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., Tommassen, J. (2003). Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299, 262-265.
- Waizenegger, T., Habib, S.J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S.A., Hell, K., Neupert, W., Rapaport, D. (2004). Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep* 5, 704-709.
- Waizenegger, T., Schmitt, S., Zivkovic, J., Neupert, W., Rapaport, D. (2005). Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria. *EMBO Rep* 6, 57-62.
- Weimann, T., Vaillier, J., Salin, B., Velours, J. (2008). The intermembrane space loop of subunit b (4) is a major determinant of the stability of yeast oligomeric ATP synthases. *Biochemistry* 47, 3556-3563.
- Westermann, B. (2003). Mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 1641, 195-202.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 872-884.

- Westermann, B., Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *16*, 1421-1427.
- Wiedemann, N., Frazier, A.E., Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* *279*, 14473-14476.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schonfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N., Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* *424*, 565-571.
- Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M., Schagger, H. (2006). Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* *1757*, 1066-1072.
- Wittig, I., Velours, J., Stuart, R., Schagger, H. (2008). Characterization of domain interfaces in monomeric and dimeric ATP synthase. *Mol Cell Proteomics* *7*, 995-1004.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* *151*, 341-352.
- Wurm, C.A., Jakobs, S. (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett* *580*, 5628-5634.
- Xie, J., Marusich, M.F., Souda, P., Whitelegge, J., Capaldi, R.A. (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*, 3545-3549.
- Xu, Y., Malhotra, A., Ren, M., Schlame, M. (2006). The enzymatic function of tafazzin. *J Biol Chem* *281*, 39217-39224.
- Yaffe, M.P., Schatz, G. (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 4819-4823.
- Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S., Endo, T. (2002). Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell* *111*, 519-528.
- Zick, M., Rabl, R., Reichert, A.S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* *1793*, 5-19.

**7 Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$	Antikörper
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Aco	Aconitase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. gossypii</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Atp4	Untereinheit 4 der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. sphaerica</i>	<i>Candida sphaerica</i>
CM	Cristamembran
CJ	Crista Junction
CT	Cristaspitze ( <i>crista tip</i> )
Cytb <sub>2</sub>	Cytochrom b <sub>2</sub>
C-terminal	Carboxyterminal
Dld1 -	D-Lactatdehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
evtl.	eventuell
Fcj1	<i>formation of c</i> <u>r</u> <i>ista j</i> <u>u</u> <i>nc</i> <u>tion</u>
Fis1	<i>mitochondrial f</i> <u>i</u> <i>ssion</i>

<i>g</i>	9,81 m/s <sup>2</sup>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanin-5'-triphosphat
HA	Hämagglutinin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HeLa-Zellen	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethansulfonsäure
IBM	Innere Grenzmembran
IM	Innenmembran der Mitochondrien
IMS	Intermembranraum der Mitochondrien
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Mcs	<u>m</u> itochondrial- <u>c</u> ontact- <u>s</u> ite-Protein; Protein des MICOS-Komplexes
l-Mgm1	lange Isoform von Mgm1
Mgm1	<u>m</u> itochondrial <u>g</u> enome <u>m</u> aintenance protein 1
MICOS	<u>M</u> itochondrial- <u>C</u> ontact- <u>S</u> ite-Komplex
µm	Mikrometer
min	Minute
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
mtDNA	mitochondriale DNA
MWCO	<u>m</u> olecular <u>w</u> eight <u>c</u> ut <u>o</u> ff
nm	Nanometer
NaOH	Natronlauge
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
OM	Außenmembran

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>P. Pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	selektives Glukose-Medium
sec	Sekunde
SLac	selektives Laktat-Medium
Su e	Untereinheit e der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase
Su g	Untereinheit g der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase
TBS	Tris gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TIM	<i>t</i> ranslocase of the <i>i</i> nnner <i>m</i> embrane
TMD	Transmembrandomäne
TOB	<i>t</i> opogenesis of mitochondrial <i>o</i> uter membrane <i>b</i> eta-barrel proteins
Tom	Protein des TOM-Komplexes
TOM	<i>t</i> ranslocase of the <i>o</i> uter <i>m</i> embrane
<i>T. hansenii</i>	<i>Torulaspora hansenii</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

**Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen. Danke für die Betreuung und Unterstützung in den letzten Jahren. Die zahlreichen Diskussionen gaben mir immer wieder wertvolle Anregungen für meine Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner danke ich für die Bereitschaft, meine Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Bei Prof. Dr. Andreas Reichert bedanke ich mich für die Betreuung auf dem Fcj1-Projekt. Seine Aufgeschlossenheit gegenüber neuen Ideen und die Freiheiten bei der Bearbeitung dieses Projektes ermöglichten es mir, mich ständig weiter zu entwickeln. Danke für die gute Zusammenarbeit. Danke auch an Miguel, Katharina und Dr. Frank Vogel für die zahlreichen EM-Bilder, die sie für mich gemacht haben.

Bei Gabriele Ludwig und Simone Grau möchte ich mich ganz herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Bearbeitung meiner Projekte bedanken. Bei Christiane Kotthoff für die zahllosen Tips in Sachen Klonierungen.

Den Kollegen aus dem Reichert-Labor danke ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für die angenehme Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hier Regina Steck für die gute Zusammenarbeit auf dem Fcj1-Projekt.

Bei Prof. Dr. Ullrich Welsch bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie. Bei Sabine Tost, Claudia Köhler und Beate Aschauer für die Anfertigung der Hefeschnitte und für die Unterstützung beim Mikroskopieren.

Bei allen Mitgliedern des Neupert-Labors möchte ich für die gute Atmosphäre bedanken. Bei Marica für all die Mito-Präps, die sie für mich gemacht hat. Bei Christine Werner und Frau Hauck für deren Hilfe, die sie mir in allen verwaltungstechnischen Angelegenheiten zukommen ließen. Bei Peter Reiser und Gerd Fried für die Lösung von technischen Problemen jeder Art. Bei meinen Labornachbarn Astrid Klein, Patrick Schreiner und Andrea Berger für die nette Atmosphäre im Labor. Mein ganz besonderer Dank gilt hier Max Harner für die tolle

Zusammenarbeit auf dem Contact-Site-Projekt, für die zahllosen Gespräche, Diskussion und für die aufmunternden Worte, wenns mal wieder überhaupt nicht lief.

Allen meinen Freunden sage ich danke dafür, dass sie mich die ganze Zeit unterstützt und nicht aufgegeben haben und mich immer wieder darauf hingewiesen haben, dass es auch ein Leben außerhalb des Labors gibt.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meiner Familie. Meinen Eltern für Ihre Unterstützung während meiner Studien- und meiner Doktorandenzeit. Ohne sie hätte ich es nicht bis hierher geschafft. Dasselbe gilt meinen Geschwistern Emmi, Andreas, Angelika und Martina.



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Christian Bruno Körner  
Geburtsdatum: 05.12.1977  
Geburtsort: Zwiesel  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung**

1984-1988 Besuch der Grundschule in Zwiesel  
1988-1997 Besuch des Gymnasiums Zwiesel  
1997 Abitur am Gymnasium Zwiesel

### **Hochschulausbildung**

1998-2001 Studium der Chemie an der TU München  
2001-2004 Studium der Chemie an der LMU München  
2004 Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der LMU München

### **Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:**

Körner C., Barrera M., Dukanovic J., Eydt K., Rabl R., Vogel F., Rapaport D., Neupert W., Reichert AS. Manuskript eingereicht

Harner M., Körner C., Walther D., Mokranjac D., Kaesmacher J., Welsch U., Griffith J., Mann T., Reggiori F, Neupert W. (2011) The Mitochondrial Contact Site complex, a determinant of mitochondrial architecture. EMBO J, advance online publication 18 October 2011; doi:10.1038/emboj.2011.379.

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, A.S. (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcjl and Su e/g. *J Cell Biol* 185, 1047-1063.