

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

**Alternative Topogenese des Dynamin-ähnlichen
Proteins Mgm1 in Mitochondrien von
Saccharomyces cerevisiae und ihre Funktion in der
Erhaltung der mitochondrialen Morphologie**

Joachim Mark Herlan

aus
Sulz am Neckar

München
2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert betreut. Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen vertritt diese Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 10.09.2004



(Joachim Mark Herlan)

Dissertation eingereicht am: 10.09.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen

Mündliche Prüfung am: 15.11.2004

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Struktur und Funktion der Mitochondrien	1
1.2	Evolution und Biogenese von Mitochondrien	3
1.2.1	Mitochondriale Signalsequenzen	3
1.2.2	Die Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM-Komplex)	4
1.2.3	Import über den TIM17/TIM23-Komplex	6
1.2.4	Der TIM22/TIM54-Komplex	7
1.2.5	Der OXA-Komplex	8
1.3	Mitochondriale Dynamik	9
1.3.1	Mitochondriale Fusion	10
1.3.2	Teilung von Mitochondrien	13
1.3.3	Assoziation von Mitochondrien mit dem Cytoskelett	14
1.4	Mgm1 – ein mitochondriales Dynamin-ähnliches Protein	16
1.5	OPA1 – Autosomal Dominante Optikusatrophie Typ 1	18
1.6	Zielsetzung der Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Molekularbiologische Methoden	19
2.1.1	Konzentrationsbestimmung von DNA	19
2.1.2	Phenolextraktion und Ethanol-fällung	19
2.1.3	DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.1.4	Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen	20
2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	20
2.1.6	Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	21
2.1.7	Isolierung von mitochondrialer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	22
2.1.8	Restriktionsverdau	22
2.1.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase	22
2.1.10	Ligation von DNA	22
2.1.11	Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten	23
2.1.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
2.1.13	Präparation transformationskompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	23
2.1.14	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	24
2.1.15	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmid-DNA	24
2.1.16	DNA-Sequenzierung	25
2.1.17	Verwendete Vektoren	25
2.1.18	Klonierungsstrategien	27
2.1.19	Karten der verwendeten Plasmide	32
2.1.20	Weitere verwendete Plasmide	35

2.2	Methoden der Hefegenetik	35
2.2.1	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	35
2.2.2	Methoden der Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	37
2.2.3	Sporulation diploider Hefestämme	37
2.2.4	Tetradendisektion	37
2.2.5	Analyse des Wachstumsphänotyps auf fermentierbarer und nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle	38
2.2.6	Konstruktion eines <i>GAL10-PCP1</i> - und eines <i>GAL10-MGM1</i> -Stammes	38
2.3	Zellbiologische Methoden	39
2.3.1	Fluoreszenzmikroskopie	39
2.3.2	Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien mit Rhodamin B-Hexylester	39
2.3.3	Färbung von DNA mit DAPI	40
2.3.4	Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> durch alkalische Lyse	40
2.3.5	Isolation von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	40
2.3.6	Präparation von Mitoplasten durch osmotische Schwellung	42
2.3.7	Salzextraktion und alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen	42
2.3.8	<i>In vitro</i> -Import von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien	43
2.3.9	Puls-Markierung von Hefezellen	44
2.4	Proteinchemische Methoden	45
2.4.1	<i>In vitro</i> -Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine	45
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	46
2.4.3	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	46
2.4.4	SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS–PAGE)	46
2.4.5	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF-Membranen (Western-Blot)	47
2.4.6	Autoradiographie und densitometrische Quantifizierung	48
2.4.7	N-terminale Proteinsequenzierung durch Edman–Abbau	48
2.5	Immunologische Methoden	48
2.5.1	Erzeugung polyklonaler Antikörper	48
2.5.2	Kopplung synthetischer Peptide an Sulfolink Coupling Gel [®] (Pierce)	49
2.5.3	Affinitätsreinigung von Antikörpern	49
2.5.4	Immunpräzipitation	50
2.5.5	Immundekoration von Western-Blots	50
2.6	Puffer und Medien	51
2.7	Chemikalien und Geräte	52
2.7.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	52
2.7.2	Geräte	54
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Charakterisierung und Lokalisierung von Mgm1	55
3.1.1	Beide Isoformen von Mgm1 sind im Intermembranraum lokalisiert	55
3.1.2	Die ersten 228 Aminosäurereste von Mgm1 sind hinreichend für die Lokalisierung im Intermembranraum	56

3.1.3	Bestimmung der N-Termini der Mgm1-Isoformen	58
3.1.4	Die beiden Isoformen von Mgm1 unterscheiden sich in ihrer Membranassoziation	60
3.2	Identifizierung der Rhomboid-ähnlichen Protease Pcp1	61
3.2.1	Die Rhomboid-ähnliche Protease Pcp1 ist notwendig für die Erzeugung von s-Mgm1	61
3.2.2	Die Deletion von <i>PCP1</i> führt zum gleichen mitochondrialen Phänotyp wie die Deletion von <i>MGM1</i>	62
3.2.3	s-Mgm1* - eine Pcp1-unabhängige Version von s-Mgm1	64
3.2.4	Expression von s-Mgm1* in $\Delta pcp1$ -Stämmen	65
3.2.5	s-Mgm1* kann den Phänotyp der <i>PCP1</i> -Deletion teilweise komplementieren	66
3.2.6	l-Mgm1* - eine Variante von Mgm1, die nicht durch Pcp1 gespalten wird	70
3.2.7	Koexpression von l-Mgm1* und s-Mgm1* komplementiert teilweise den Phänotyp der <i>MGM1</i> -Deletion	71
3.3	Koordinierte Bildung beider Isoformen	76
3.3.1	s-Mgm1 entsteht direkt durch Prozessierung durch Pcp1 ohne Beteiligung einer weiteren Protease	77
3.3.2	Mgm1 hat zwei konservierte hydrophobe Bereiche in der Nähe des N-Terminus	78
3.3.3	Der weiter C-terminal gelegene hydrophobe Bereich wird von Pcp1 gespalten	78
3.3.4	Die Hydrophobizität des N-terminalen Transmembransegments von Mgm1 hat entscheidenden Einfluss auf die Prozessierungseffizienz	80
3.3.5	Die submitochondriale Lokalisierung bleibt von Mutationen in beiden hydrophoben Segmenten unbeeinflusst	81
3.3.6	Mutationen im N-terminalen Transmembransegment führen zu einer Verschiebung des Verhältnisses beider Isoformen und zum Verlust der tubulären mitochondrialen Struktur	82
3.3.7	Ein funktionaler Importmotor an der mitochondrialen Innenmembran ist notwendig für die Erzeugung von s-Mgm1	84
3.3.8	Die ATP-Konzentration in der Matrix ist kritisch für die Mgm1-Prozessierung	93
3.3.9	In stationären Zellen ist Pcp1 nicht limitierend für die Prozessierung von Mgm1	97
3.3.10	l-Mgm1 kann nicht in s-Mgm1 umgewandelt werden	99
4	DISKUSSION	101
4.1	Beide Isoformen von Mgm1 sind im Intermembranraum lokalisiert	101
4.2	Die Rhomboid-ähnliche Protease Pcp1 ist für die Bildung von s-Mgm1 verantwortlich	103
4.3	Der Phänotyp der <i>PCP1</i> -Deletion ist eine direkte Folge des Fehlens von s-Mgm1	105
4.4	Beide Isoformen von Mgm1 sind für die Funktion erforderlich	106
4.5	Die koordinierte Bildung beider Mgm1-Isoformen erfolgt durch einen neuartigen Mechanismus der alternativen Topogenese	108
4.6	Der Mechanismus der alternativen Topogenese könnte den bioenergetischen Zustand von Mitochondrien an ihre Struktur koppeln	112
4.7	Mögliche Funktion(en) von Mgm1	114

4.8	OPA1 – Autosomal Dominante Optikusatrophie	116
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
6	SUMMARY	120
7	LITERATURVERZEICHNIS	122
8	ABKÜRZUNGEN	134
9	DANKSAGUNG	136

1 Einleitung

Eukaryotische Zellen besitzen zur Organisation ihrer Stoffwechselprozesse mehrere membranumschlossene Reaktionsräume (Kompartimente). Entsprechend ihrer Proteinausstattung nehmen diese Zellorganellen spezialisierte Funktionen für die Zelle wahr, die sie in dem jeweiligen dafür optimierten Reaktionsraum ausüben. Man unterscheidet zwischen Organellen, die von einer einzelnen biologischen Membran umschlossen sind, wie z. B. das Endoplasmatische Retikulum, die Peroxisomen oder die Lysosomen und solchen, die von zwei biologischen Membranen umgeben sind. Zu Letzteren gehören vor allem die Zellkerne, die Mitochondrien und in Pflanzen die Chloroplasten und andere Plastiden.

1.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien

Die Mitochondrien sind durch die zwei sie umgebenden Membranen, die äußere und die innere mitochondriale Membran, in Subkompartimente aufgeteilt. Innerhalb der inneren Membran befindet sich die mitochondriale Matrix. Der Raum zwischen den beiden mitochondrialen Membranen wird Intermembranraum genannt. Darüber hinaus stellen die beiden mitochondrialen Membranen selbst spezialisierte Subkompartimente dar, die mit einer bestimmten Proteinausstattung bestimmte Aufgaben erfüllen. Die Innenmembran zeigt zahlreiche Ausstülpungen in den Matrixraum, die so genannten Cristae. Ein anderer Teil der Innenmembran, die Grenzmembran, liegt der Außenmembran eng an und tritt an manchen Stellen, den „*contact sites*“ direkt mit ihr in Kontakt. (Übersichtsartikel siehe Reichert und Neupert, 2002). Die Struktur der Cristae ist zwischen verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedlich und reicht von unregelmäßig verbreiterten Einstülpungen der Innenmembran, wie sie in Mitochondrien von *S. cerevisiae* zum Teil zu beobachten sind bis zu exakt parallel angeordneten Stapeln von Cristae wie sie z.B. in braunem Fettgewebe vorkommen (Mannella *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 1998). Die Öffnung der Grenzmembran gegen die Cristae jedoch ist sehr einheitlich geformt und bildet am Anfang häufig tubuläre Strukturen unterschiedlicher Länge aus, die einen sehr konstanten Durchmesser haben (Frey und Mannella, 2000; Frey *et al.*, 2002; Mannella, 2001; Perkins *et al.*, 1997; Perkins und Frey, 2000). Aufgrund der regelmäßigen Struktur dieser „*cristae junctions*“ wird eine Beteiligung von Proteinen an ihrer Entstehung und Stabilisierung vermutet. Die „*cristae junctions*“ teilen die Innenmembran in die innere Grenzmembran und die Cristaemembran auf und trennen vom Intermembranraum den Intracristaeraum ab. Möglicherweise bestehen auch zwischen diesen Subkompartimenten biochemische und funktionale Unterschiede.

1 Einleitung

Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien ist die Synthese von ATP und damit die Bereitstellung von Energie für den größten Teil der zellulären Prozesse. Dieser Vorgang wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet (Saraste, 1999). Dazu wird Pyruvat aus der cytosolischen Glykolyse zunächst oxidativ decarboxyliert. Im Citratzyklus, der bereits in der mitochondrialen Matrix abläuft, werden Reduktionsäquivalente in Form von NADH und FADH₂ erzeugt. Die Energie, die bei der Übertragung dieser Reduktionsäquivalente auf Sauerstoff frei wird, wird von den verschiedenen Komponenten der Atmungskette genutzt, um einen Protonengradienten über die Innenmembran aufzubauen. Dieser Protonengradient wird von der F₀F₁-ATPase zur Synthese von ATP genutzt (Mitchell, 1961). Normalerweise ist der Abbau des Protonengradienten streng an die Synthese von ATP gekoppelt. Es gibt jedoch spezialisierte Gewebe, die Entkopplungsproteine exprimieren und so die Dissipation des Protonengradienten ohne Synthese von ATP ermöglichen. Dabei wird die im Protonengradienten gespeicherte Energie in Wärme umgewandelt. Auf diese Weise leisten Mitochondrien einen wichtigen Beitrag zur Thermogenese und zur Erhaltung der Körpertemperatur in homoiothermen Organismen (Übersichtsartikel siehe Stuart *et al.*, 1999).

Darüber hinaus sind die Mitochondrien für weitere Stoffwechselprozesse wie z.B. die Biosynthese von Häm, den Abbau von Fettsäuren, die Synthese und den Abbau mancher Aminosäuren und die Stickstoffentgiftung durch Harnstoffsynthese verantwortlich. Nicht zuletzt produzieren Mitochondrien verschiedene Formen der Fe/S-Cluster, die außer in mitochondrialen auch in cytoplasmatischen und nukleären Proteinen essentiell für die Funktion sind (Übersichtsartikel siehe Lill und Kispal, 2000; Muhlenhoff und Lill, 2000).

Außer an diesen Stoffwechselprozessen sind die Mitochondrien an der Regulation globaler zellulärer Prozesse beteiligt. Insbesondere haben sie eine große Bedeutung bei der Regulation des programmierten Zelltods, der Apoptose (Bernardi *et al.*, 2001; Bernardi *et al.*, 1999).

Entsprechend dieser wichtigen Funktionen von Mitochondrien sind mitochondriale Dysfunktionen mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert (Übersichtsartikel siehe Wallace, 1999). Dabei wirken sich die mitochondrialen Defekte vor allem auf terminal differenzierte Gewebe mit hohem Energiebedarf aus. Die häufigsten Symptome betreffen Nerven- und Muskelgewebe. Warum sich bestimmte mitochondriale Fehlfunktionen spezifisch nur auf ganz bestimmte Teile des Nervengewebes (z.B. den Sehnerv) auswirken, während andere ein viel breiteres Spektrum an Symptomen zeigen, ist bis jetzt nur wenig verstanden.

1.2 Evolution und Biogenese von Mitochondrien

Evolutionär stammen Mitochondrien von Eubakterien ab. Die engste Verwandtschaft besteht zu einer Untergruppe der α -Proteobakterien (*Rickettsia*) (Andersson *et al.*, 1998). In einem als Endosymbiose bezeichneten Prozess wurden diese Bakterien vor etwa einer Milliarde Jahren von Vorläufern der eukaryotischen Zellen aufgenommen (Übersichtsartikel siehe Gray *et al.*, 1999; Margulis, 1970; Margulis, 1981; Whatley, 1981). Entsprechend gibt es viele Gemeinsamkeiten zwischen Mitochondrien und Eubakterien in Bezug auf ihre prinzipielle Organisation, ihr Proteom und ihre Funktion, die im Verlauf der Evolution konserviert blieben.

Mitochondrien werden nicht *de novo* synthetisiert. Sie entstehen vielmehr durch Teilung bereits vorhandener Mitochondrien und werden auf die Tochterzellen vererbt (Attardi und Schatz, 1988).

Mitochondrien verfügen über ein eigenes Genom und die Proteinausstattung, dieses zu replizieren zu transkribieren und die entstehenden Transkripte zu translatieren. Dennoch codiert das mitochondriale Genom im Allgemeinen nur wenige mitochondriale Proteine (Burger *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 1999; Lithgow, 2000). In der Bäckerhefe, *S. cerevisiae* hat es beispielsweise eine Größe von ca. 85 kb und codiert für 8 mitochondriale Proteine, die 21 S und 15 S ribosomalen RNAs, 24 tRNAs und die 9 S RNA-Komponente der RNaseP (Foury *et al.*, 1998). Nach neueren proteomischen Untersuchungen sind in Mitochondrien von *S. cerevisiae* insgesamt ca. 1000 verschiedene Proteine vorhanden (Prokisch *et al.*, 2004; Sickmann *et al.*, 2003). Der weitaus größte Teil der mitochondrialen Proteine ist im Kern codiert und wird an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert. Anhand spezifischer Signale werden diese Proteine erkannt und in die verschiedenen mitochondrialen Subkompartimente importiert. Für den Import von Proteinen in die Mitochondrien und die Insertion von Proteinen in die mitochondrialen Membranen sind mehrere hochmolekulare Proteinkomplexe in der mitochondrialen Außenmembran und in der mitochondrialen Innenmembran erforderlich, auf die im Folgenden im Detail eingegangen wird (Übersichtsartikel siehe Neupert, 1997).

1.2.1 Mitochondriale Signalsequenzen

Am besten sind die N-terminalen Signalsequenzen (Präsequenzen) für den Proteinimport in Mitochondrien charakterisiert. Sie führen in den meisten Fällen zu einer Sortierung des entsprechenden Proteins in die mitochondriale Matrix. Es gibt aber auch Beispiele, in denen das Protein, nachdem die N-terminale Signalsequenz zunächst die Matrix erreicht, lateral in die Innenmembran inseriert wird oder nach proteolytischer Prozessierung im Intermembranraum lokalisiert ist (Gartner *et al.*, 1995; Rojo *et al.*, 1998). Schließlich werden manche Proteine mit N-terminaler Signal-

1 Einleitung

sequenz zunächst in die Matrix importiert und inserieren dann von der Matrixseite in die Innenmembran. Diese Insertion des Proteins von der Matrixseite entspricht topologisch dem Exportsystem der endosymbiotischen Bakterien. Daher wird dieser Weg des Imports als konservativer Sortierungsweg bezeichnet. N-terminale Signalsequenzen zeichnen sich durch eine Häufung positiv geladener und hydrophober Aminosäurereste aus, die so angeordnet sind, dass sie vor allem in der Umgebung biologischer Membranen amphipathische Helices ausbilden können (Abe *et al.*, 2000; von Heijne, 1986; Wang und Weiner, 1994). Negative Ladungen kommen kaum oder gar nicht vor. Die amphipathische Helix wird von Rezeptoren des TOM-Komplexes (1.2.2) erkannt und leitet so den Import in die Mitochondrien ein. Für den Transport von Proteinen mit N-terminaler Signalsequenz über die Innenmembran sowie in vielen Fällen für die darauffolgende Insertion in die Innenmembran ist der TIM17/TIM23-Komplex verantwortlich (1.2.3). Sobald die Präsequenz die mitochondriale Matrix erreicht hat, wird sie durch die Matrix-Prozessierungs-Peptidase (MPP), eine Metallopeptidase bestehend aus den beiden Untereinheiten α -MPP und β -MPP, abgespalten (Arretz *et al.*, 1994; Arretz *et al.*, 1991; Brunner und Neupert, 1995; Luciano und Geli, 1996; Pollock *et al.*, 1988). Beim konservativen Sortierungsweg ist die OXA-Translokase der Innenmembran für die Membraninsertion notwendig (1.2.5).

Neben den N-terminalen Signalsequenzen gibt es interne Signale für den Proteinimport in die Mitochondrien. Allerdings sind diese nur in wenigen Fällen genau charakterisiert. Generell werden die Proteine der Außenmembran und viele Proteine des Intermembranraums aufgrund interner Signale sortiert. Auch polytope Membranproteine der Innenmembran aus der Familie des ADP/ATP-Transporters benutzen interne Sequenzen für eine korrekte Sortierung. Letztere werden durch den TIM22/TIM54-Komplex in die Innenmembran inseriert (1.2.4).

1.2.2 Die Translokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM-Komplex)

Der TOM-Komplex ist außer für den Proteintransport über die Außenmembran auch für die Insertion von Proteinen in die Außenmembran zuständig. Er besteht aus den Komponenten Tom40, Tom70, Tom20 und Tom22 sowie den kleinen Tom-Proteinen Tom5, Tom6 und Tom7 (Abbildung 1). Dabei bildet Tom40 die Translokationspore in der Außenmembran, durch die vermutlich die Proteine transportiert werden (Hill *et al.*, 1998; Kunkele *et al.*, 1998a; Kunkele *et al.*, 1998b). Tom70, sowie Tom20 und Tom22 sind Rezeptorproteine, die auf der äußeren Oberfläche der Mitochondrien die Substratproteine erkennen (Hines *et al.*, 1990; Hines und Schatz, 1993; Kiebler *et al.*, 1993; Moczko *et al.*, 1992; Sollner *et al.*, 1989). Weniger gut charakterisiert ist die genaue Funktion der kleinen Tom-Proteine. Tom6 und Tom7 scheinen eher strukturelle Funktionen bei der Assemblierung und Ausbildung der Translokationspore zu

1 Einleitung

haben (Dekker *et al.*, 1998; Dembowski *et al.*, 2001; Honlinger *et al.*, 1996), während Tom5 eine Funktion bei der Weitergabe der Substrate von den Rezeptoren an die Translokationspore zugeschrieben wird (Dietmeier *et al.*, 1997). Unlängst wurde gefunden, dass für die Insertion und Assemblierung von Proteinen mit β -Faltblattstruktur, den β -Barrel-Proteinen wie z.B. dem Porin, in die mitochondriale Außenmembran neben dem TOM-Komplex der so genannte TOB-Komplex (oder SAM-Komplex) mit den Komponenten Tob55 (Sam50), Mas37 und Tob38 (Sam35) erforderlich ist (Abbildung 1; Kozjak *et al.*, 2003; Milenkovic *et al.*, 2004; Paschen *et al.*, 2003; Waizenegger *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2003). Dieser stellt ein interessantes Beispiel für eine konservierte Funktion zwischen Bakterien und Mitochondrien dar. Sowohl der TOB-Komplex als auch seine Substrate, die β -Barrel-Proteine, sind bakteriellen Ursprungs und haben orthologe Proteine in Eubakterien.

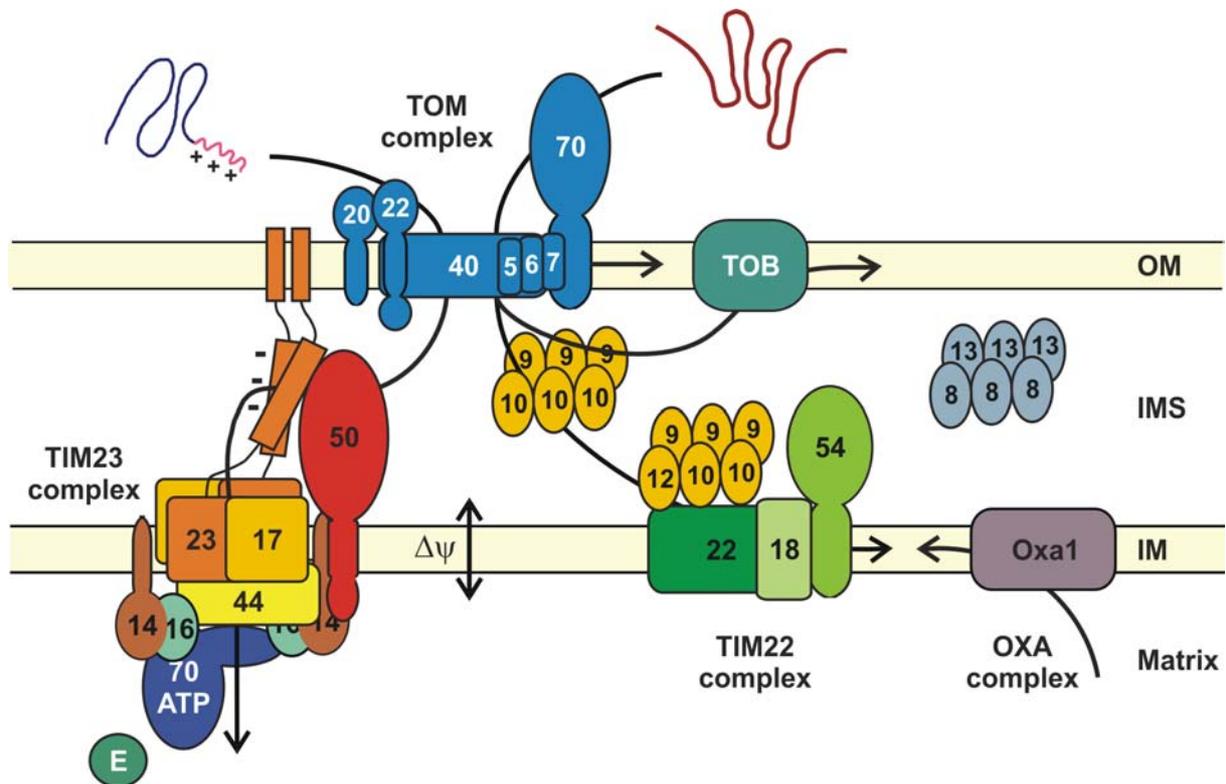


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Proteinkomplexe des mitochondrialen Proteinimports in *S. cerevisiae*. Die verschiedenen Importwege sind im Text beschrieben. TOM-Komplex: Tom40, Tom22, Tom20, Tom70, Tom5, Tom6, Tom7; TOB-Komplex: Tob55; Tob38, Mas37; TIM17/TIM23-Komplex und der assoziierte Importmotor in der mitochondrialen Matrix: Tim17, Tim23, Tim50, Tim44, Tim14, Tim16, mtHsp70(Ssc1), Mge1; TIM22-Komplex: Tim22, Tim18, Tim54, Tim9, Tim10, Tim12; TIM9/TIM10-Komplex: Tim9 und Tim10; TIM8/TIM13-Komplex: Tim8 und Tim13 und OXA-Komplex: Oxa1. OM, mitochondriale Außenmembran; IMS, Intermembranraum; IM, mitochondriale Innenmembran und $\Delta\psi$, Membranpotential über die mitochondriale Innenmembran.

1.2.3 Import über den TIM17/TIM23-Komplex

Auf der Ebene der Innenmembran gibt es mehrere Translokationsmaschinen. Der TIM17/TIM23-Komplex (Abbildung 1) ist für den Transport von Proteinen mit N-terminalen Signalsequenzen in die mitochondriale Matrix erforderlich (Berthold *et al.*, 1995; Moro *et al.*, 1999; Neupert, 1997; Paschen und Neupert, 2001). Außerdem benötigen einige monotope Innenmembranproteine, wie D-Lactatdehydrogenase oder die Untereinheit Va der Cytochrom *c*-Oxidase, den TIM17/TIM23-Komplex für ihre Membraninsertion (Gartner *et al.*, 1995; Rojo *et al.*, 1998). Manche dieser membranverankerten Proteine, so z.B. Cytochrom *b*₂, können nach einer weiteren proteolytische Prozessierung durch die Innenmembranprotease Imp1/Imp2 in den Intermembranraum freigesetzt werden. Dabei wird ein zusätzliches Sortierungssignal für den Intermembranraum entfernt (Nunnari *et al.*, 1993). Tim23 bildet den Translokationskanal in der Innenmembran (Truscott *et al.*, 2001). Der N-Terminus von Tim23 ist in der Außenmembran verankert, so dass Tim23 beide mitochondrialen Membranen verbindet (Donzeau *et al.*, 2000). Tim17 ist ebenfalls essentieller Bestandteil des TIM17/TIM23-Komplexes. Die genaue Funktion von Tim17 ist jedoch unklar. Der Proteinimport in die Matrix ist abhängig von einem Membranpotential ($\Delta\Psi$) über die Innenmembran und von ATP in der mitochondrialen Matrix. Für die D-Lactatdehydrogenase, bestimmte mutante Formen von Cytochrom *b*₂-Vorstufenproteinen und die Untereinheit Va der Cytochrom *c*-Oxidase ist jedoch eine ATP-unabhängige Insertion in die Innenmembran beobachtet worden (Gartner *et al.*, 1995; Rojo *et al.*, 1998). D-Lactatdehydrogenase wird über einen Stopp-Transfer-Mechanismus in die Innenmembran sortiert (Rojo *et al.*, 1998). Eine hydrophobe Sequenz im Vorstufenprotein, die auf beiden Seiten von Ladungen flankiert wird, führt zum Anhalten der Translokation und zur lateralen Insertion in die Innenmembran.

Während der Entstehung dieser Arbeit wurde Tim50 als neue Komponente des TIM17/TIM23 Komplexes beschrieben. Tim50 hat eine Funktion bei der Weitergabe der Vorstufenproteine vom TOM-Komplex an den TIM17/TIM23-Translokationskanal (Geissler *et al.*, 2002; Mokranjac *et al.*, 2003a; Yamamoto *et al.*, 2002).

Auf der Matrixseite des TIM17/TIM23-Komplexes befindet sich der mitochondriale Importmotor (Übersichtsartikel siehe Neupert und Brunner, 2002). Dieser ist ATP-abhängig und besteht aus den Komponenten Tim44, Ssc1 (mitochondriales Hsp70) und dessen Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Abbildung 1; Cyr *et al.*, 1993; Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1996; Stuart *et al.*, 1994; Voos *et al.*, 1994). Nach dem Modell des „Brownschen Sperrhakens“ (Gaume *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 2002; Ungermann *et al.*, 1996) bindet die Präsequenz, sobald sie die Matrix erreicht, an Tim44 und Ssc1. Durch ATP-Hydrolyse geht Ssc1 in die ADP-Form über. Dadurch wird die Bindung von Ssc1 an die Präsequenz fester. Anderer-

1 Einleitung

seits führt die ATP-Hydrolyse zur Dissoziation von Ssc1 von Tim44. Das Vorstufenprotein kann in diesem Stadium in ausgestreckter Konformation sowohl die TIM17/TIM23-Translokase als auch den TOM-Komplex durchspannen. Ein Zurückgleiten aus dem Translokationskanal wird durch das gebundene mtHsp70 verhindert. Erst der durch Mge1 vermittelte Nukleotidaustausch (ADP gegen ATP) am Ssc1 führt zur Freisetzung von Ssc1 von der Präsequenz. Durch wiederholte Zyklen von Bindung und Freisetzung von Ssc1 von dem Präprotein kann so das ganze Protein nach und nach importiert werden. Der Import erfolgt also ohne eine aktive Zugkraft auf das Vorstufenprotein allein durch das Festhalten des durch Brownsche Molekularbewegung spontan importierten Anteils des Präproteins in der Matrix. Das Modell des „Brownschen Sperrhakens“ erklärt auch, wie Präproteine für den Import entfaltet werden. Die Entfaltung findet nicht aktiv durch Zug am Präprotein statt. Vielmehr wird nach spontanen thermischen lokalen Entfaltungsreaktionen durch Bindung von Ssc1 in der mitochondrialen Matrix eine Rückfaltung verhindert (ähnlich wie z.B. Harnstoff Proteine nicht aktiv entfaltet, sondern nach spontaner Entfaltung durch Absättigung der Kapazität für Wasserstoffbrückenbindungen eine Rückfaltung verhindert) (Okamoto *et al.*, 2002). Ein anderes Modell bezüglich des mitochondrialen Importmotors geht dagegen von einer durch ATP-Hydrolyse getriebenen Konformationsänderung des an Tim44 gebundenen mtHsp70 aus, die unmittelbar eine Kraft auf das Präprotein ausübt und es schrittweise aktiv in die Matrix zieht (Glick, 1995; Glick *et al.*, 1993; Horst *et al.*, 1997; Krimmer *et al.*, 2000; Voisine *et al.*, 1999). Während der Entstehung dieser Arbeit wurden mit Tim14/Pam18 und Tim16/Pam16 zwei weitere Komponenten des mitochondrialen Importmotors gefunden (Abbildung 1; Frazier *et al.*, 2004; Kozany *et al.*, 2004; Mokranjac *et al.*, 2003b; Truscott *et al.*, 2003). Dabei enthält Tim14 eine J-Domäne, die die ATPase-Aktivität von Ssc1 stimuliert (Mokranjac *et al.*, 2003b). Weniger klar ist die genaue Funktion von Tim16. Es enthält ebenfalls eine J-ähnliche Domäne, jedoch fehlt das für J-Domänen charakteristische HPD-Motiv. Entsprechend wird die ATPase Aktivität von Ssc1 durch Tim16 nicht stimuliert. Außer strukturellen Aufgaben im Importmotor könnte durch Tim16 eine Stimulation der ATPase-Aktivität von Ssc1 durch Tim14 in Abwesenheit von Vorstufenproteinen verhindert werden (Kozany *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004).

1.2.4 Der TIM22/TIM54-Komplex

Polytope Membranproteine der Innenmembran aus der Familie der mitochondrialen Substrattransporter, so z.B. der ADP/ATP-Transporter Aac2, und Tim23 werden über den TIM22/TIM54-Komplex in die Innenmembran inseriert (Abbildung 1; Endres *et al.*, 1999; Sirrenberg *et al.*, 1996). Diese mitochondrialen Substrattransporter durchspannen die Membran normalerweise sechsmal. Tim23 besitzt vier Transmembransegmente in der Innenmembran. Die Substrate des TIM22/TIM54-Komplexes

1 Einleitung

verfügen über interne Signalsequenzen. Im Intermembranraum sind diese sehr hydrophoben Proteine an den TIM9/TIM10-Komplex und den TIM8/TIM13-Komplex gebunden, um sie durch das hydrophile Milieu zu transportieren (Abbildung 1; Adam *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 1998a; Koehler *et al.*, 1998b; Koehler *et al.*, 1999; Leuenberger *et al.*, 1999; Paschen *et al.*, 2000; Sirrenberg *et al.*, 1998). Der TIM8/TIM13-Komplex unterstützt dabei den Import von Tim23. Ein Teil von Tim9 und Tim10 ist zusammen mit Tim12 mit dem TIM22/TIM54-Komplex assoziiert. Auf diese Weise können die Proteine an den TIM22/TIM54-Komplex übergeben werden. Die Insertion der polytopen Membranproteine in die Innenmembran ist abhängig vom Membranpotential $\Delta\Psi$, aber unabhängig von ATP in der Matrix. In *S. cerevisiae* verfügt der TIM22/TIM54-Komplex mit Tim18 über eine weitere Komponente in der Innenmembran (Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000).

1.2.5 Der OXA-Komplex

Der OXA-Komplex ist in die Insertion von Proteinen von der Matrixseite in die Innenmembran involviert (Hell *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001; Herrmann und Neupert, 2003; Herrmann *et al.*, 1997). Einerseits sind das Proteine, die im mitochondrialen Genom codiert sind (Hell *et al.*, 2001). So benötigt die Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase (Cox2) Oxa1 für die Insertion ihres N-Terminus in die Innenmembran (Hell *et al.*, 1997). Die Insertion der Untereinheiten 1 und 3 der Cytochrom *c*-Oxidase (Cox1 und Cox3) in die Innenmembran wird von Oxa1 erleichtert, hängt aber nicht strikt von Oxa1 ab (Hell *et al.*, 1998). Andererseits gibt es kerncodierte Proteine, die dem konservativen Sortierungsweg folgen und nach dem Import in die mitochondriale Matrix von innen durch Oxa1 in die Innenmembran inseriert oder in den Intermembranraum exportiert werden (Hell *et al.*, 1998). Oxa1 und das bakterielle YidC, welches in *E. coli* für die Insertion einiger Proteine in die Plasmamembran verantwortlich ist, sind orthologe Proteine (Übersichtsartikel siehe Kuhn *et al.*, 2003). Auch Oxa1 selbst benutzt diesen Weg der Biogenese. Zunächst wird in der mitochondrialen Matrix durch MPP die N-terminale Präsequenz abgespalten. Durch Oxa1 wird dann die Insertion von Oxa1 in die innere mitochondriale Membran vermittelt (Hell *et al.*, 1998; Herrmann *et al.*, 1997). Für Cytochrom *b*₂ ist es immer noch umstritten, ob es ebenfalls diesem konservativen Sortierungsweg folgt und von der Matrixseite in die Innenmembran integriert, oder ob es ähnlich wie D-Lactatdehydrogenase nach einem Translokationsarrest im TIM17/TIM23-Kanal lateral in die Innenmembran inseriert, bevor es durch Imp1/Imp2 gespalten wird (Glick *et al.*, 1992; Koll *et al.*, 1992). Neben Oxa1 ist mit Mba1 eine weitere Komponente für eine effiziente Insertion des N-Terminus von Cox2 in die Innenmembran erforderlich und scheint darüber hinaus unabhängig von Oxa1 Einfluss auf die Integration von Proteinen in die Innenmembran zu haben (Preuss *et al.*, 2001).

1.3 Mitochondriale Dynamik

Die Struktur und Ultrastruktur von Mitochondrien variiert zwischen verschiedenen Organismen und Geweben (Frey und Mannella, 2000; Frey *et al.*, 2002; Mannella *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 1997; Perkins *et al.*, 2001; Perkins *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist die Morphologie der Mitochondrien sehr dynamisch (Bereiter-Hahn, 1990; Bereiter-Hahn und Voth, 1994). Mitochondrien werden innerhalb der Zelle transportiert, können miteinander fusionieren und sich teilen (Übersichtsartikel siehe Shaw und Nunnari, 2002; Westermann, 2002). Dieser Dynamik kommt funktionell eine große Bedeutung zu. Die Fusion von Mitochondrien ermöglicht Rekombination und dadurch die „Reparatur“ von Schädigungen im mitochondrialen Genom, wie sie etwa durch reaktive Sauerstoffspezies entstehen können (Ono *et al.*, 2001; Übersichtsartikel siehe Westermann, 2003). Bei der Reifung der Spermatozoen ist mitochondriale Fusion wichtig für die Bildung der so genannten Nebenkernkerne, mitochondrialer Strukturen, die sich an der Basis der Flagellen anlagern, um die Energie für die Bewegung der Spermien bereitzustellen (Hales und Fuller, 1997). Schließlich fusionieren Mitochondrien nach der Bildung von Zygoten in *S. cerevisiae* (Nunnari *et al.*, 1997). Dabei verteilen sich Proteine der mitochondrialen Matrix schnell und gleichmäßig über die fusionierten Mitochondrien (Azpiroz und Butow, 1993; Nunnari *et al.*, 1997). Die Proteine der äußeren und inneren mitochondrialen Membran brauchen etwas länger, bis sie gleichmäßig über das fusionierte mitochondriale Netzwerk verteilt sind (Okamoto *et al.*, 1998). Nach der Fusion wird die mitochondriale DNA beider Elternzellen in die Knospe transportiert (Berger und Yaffe, 1996; Berger und Yaffe, 2000; Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto *et al.*, 1998). Auf diese Weise gewährleistet die Fusion die Weitergabe der mitochondrialen Genome und ermöglicht gegebenenfalls Rekombination. Umgekehrt ist eine Funktion der Teilung der Mitochondrien für die Weitergabe an Tochterzellen unmittelbar ersichtlich. Die Teilung von Mitochondrien ist aber auch an der Regulation der Apoptose beteiligt (Frank *et al.*, 2001). Hierbei scheinen Teilungsprozesse der Mitochondrien für die Freisetzung des Cytochrom c aus dem Intermembranraum wichtig zu sein, welches seinerseits Caspasen aktivieren kann und zur Exekution des apoptotischen Programms führt (Bernardi *et al.*, 2001; Bernardi *et al.*, 1999).

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bilden ungefähr 1-10 Mitochondrien pro Zelle ein tubuläres Netzwerk, das dem Zellkortex von innen anliegt (Egner *et al.*, 2002; Hoffmann und Avers, 1973). Aufgrund der kontinuierlich ablaufenden Fusions- und Teilungsprozesse ist die Zahl der Mitochondrien in einer Zelle nicht absolut konstant. Abbildung 2 zeigt exemplarisch die tubuläre Struktur von Mitochondrien, die mit GFP visualisiert wurden, das durch eine mitochondriale Präsequenz in die mitochondriale Matrix dirigiert wurde (Westermann und Neupert, 2000).

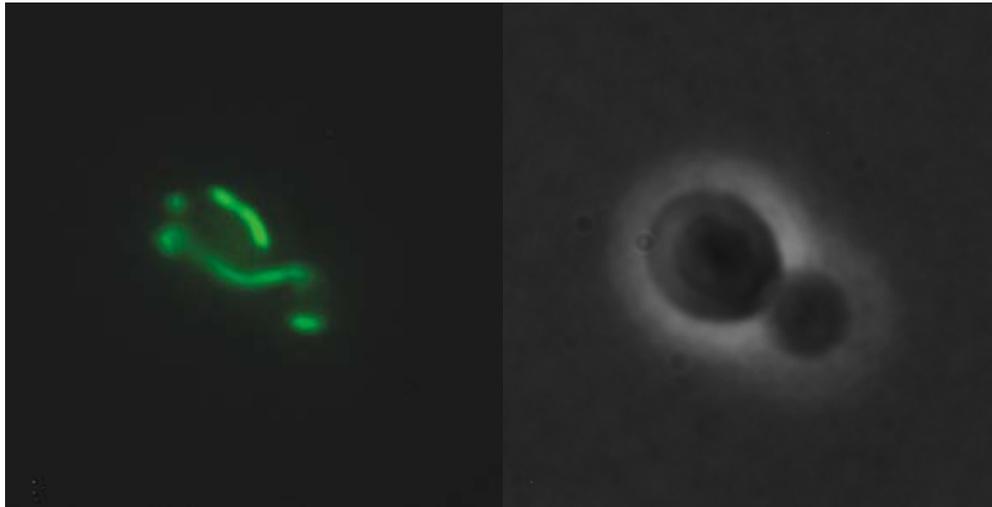


Abbildung 2: Tubuläre Struktur von Mitochondrien in *S. cerevisiae*. Die Mitochondrien wurden durch Expression von GFP visualisiert, welches mit Hilfe einer mitochondrialen Präsequenz in die mitochondriale Matrix dirigiert wurde. Links, fluoreszenzmikroskopisches Bild; rechts, Phasenkontrastbild.

Zur Aufrechterhaltung dieses dynamischen Netzwerks ist ein Gleichgewicht von Fusion und Teilung erforderlich (Bleazard *et al.*, 1999; Otsuga *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 1999). Die Geschwindigkeit der Fusion liegt bei ca. einem Fusionsvorgang pro Zelle in 2 Minuten (Nunnari *et al.*, 1997). Defekte in einem der Prozesse führen zu einer veränderten mitochondrialen Struktur. Im Falle eines Fusionsdefekts kommt es zur Fragmentierung der Mitochondrien, da die Teilung ungehindert weiterlaufen kann (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Nachfolgend neigen fragmentierte Mitochondrien zur Aggregation und verlieren häufig ihr mitochondriales Genom. Umgekehrt haben Mutanten, in denen die Teilung der Mitochondrien behindert ist, in der Regel nur ein Mitochondrium pro Zelle, das netzartig verzweigt ist (Bleazard *et al.*, 1999; Otsuga *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 1999). Mitochondrien sehen Wildtyp-ähnlich aus, wenn sowohl Fusion als auch Teilung blockiert sind. Daher ist das Gleichgewicht beider Prozesse für die Erhaltung der normalen mitochondrialen Struktur verantwortlich (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999).

1.3.1 Mitochondriale Fusion

Mitochondriale Fusion findet immer zwischen einem freien mitochondrialen Ende und dem Ende oder der Seite eines zweiten Mitochondriums statt (Bereiter-Hahn und Voth, 1994; Nunnari *et al.*, 1997). Der Prozess der mitochondrialen Fusion ist auf molekularer Ebene noch nicht sehr gut verstanden. Das liegt zum Teil an der gegenüber Fusionsereignissen auf dem sekretorischen Weg erhöhten Komplexität. Im Gegensatz zu sekretorischen Vesikeln sind Mitochondrien von zwei Membranen umgeben. Letztendlich sind also vier Membranen am mitochondrialen Fusionsprozess beteiligt. Die klassischen Komponenten der Vesikel- und Vakuolenfusion wie NSF

1 Einleitung

oder SNAREs sind nicht an der Fusion der Mitochondrien beteiligt (Übersichtsartikel zur Fusion der Vakuolen siehe Wickner, 2002). In den vergangenen Jahren wurden einige der mitochondrialen Fusionskomponenten identifiziert (Abbildung 3). Der als erster bekannt gewordene mitochondriale Fusionsfaktor ist Fzo (*fuzzy onion*). Eine Mutation im Fzo-Gen ist für den Phänotyp einer Mutante von *Drosophila melanogaster* verantwortlich, die aufgrund defekter mitochondrialer Fusion missgebildete Nebenkerne in den Spermatiden produziert. Auf ultrastruktureller Ebene sehen diese im Querschnitt wie verformte Zwiebeln aus (*fuzzy onion*). Die Mutation führt zu stark eingeschränkter Beweglichkeit der Spermien und dadurch zu männlicher Sterilität (Hales und Fuller, 1997). Fzo begründet die neue Familie der Mitofusine, die unter den Pilzen und Tieren konserviert sind. In *S. cerevisiae* ist Fzo1 ein integrales Protein der Außenmembran, das für die mitochondriale Fusion erforderlich ist und dessen N- und C-Termini zum Cytoplasma hin exponiert sind (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Am N-Terminus befindet sich eine GTPase-Domäne, während C-terminal zwei Transmembransegmente vorhanden sind, die durch ein kurzes Segment im Intermembranraum verbunden sind (Fritz *et al.*, 2001). Dieses Segment im Intermembranraum hat Kontakt zur Innenmembran (Fritz *et al.*, 2001). Die Deletion von *FZO1* führt zur Fragmentierung der Mitochondrien, zum Verlust der mitochondrialen DNA und verhindert in einem *in vivo*-Fusionsversuch die mitochondriale Fusion nach der Bildung der Zygote (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Wie Fzo1 allerdings auf molekularer Ebene mitochondriale Fusion bewirkt, ist nicht bekannt. Im Menschen kommt Fzo1 in Form von zwei homologen Proteinen vor, die Mitofusine Mfn1 und Mfn2, die gemeinsam für die mitochondriale Fusion verantwortlich sind (Chen *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 2002; Santel und Fuller, 2001). Die mitochondriale Fusion in menschlichen Zellen ist abhängig vom Membranpotential $\Delta\Psi$ (Legros *et al.*, 2002). Unlängst wurde eine Assoziation von Mutationen in Mfn2 mit der Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A (axonale Form) beschrieben, welche mit sensomotorischen Störungen einhergeht (Zuchner *et al.*, 2004). In genetischen Ansätzen in *S. cerevisiae* wurden als Suppressoren von Mutanten mit defekter mitochondrialer Teilung weitere Komponenten identifiziert, die an der mitochondrialen Fusion beteiligt sein könnten. Dabei scheint vor allem Ugo1, ebenfalls ein Protein der mitochondrialen Außenmembran, eine wichtige Rolle zu spielen (Sesaki und Jensen, 2001). Der Deletionsphänotyp von *UGO1* ist identisch mit dem von *FZO1* und während der Entstehung dieser Arbeit konnte eine zumindest transiente Interaktion zwischen Fzo1 und Ugo1 nachgewiesen werden (Sesaki und Jensen, 2004; Sesaki *et al.*, 2003b; Wong *et al.*, 2003). Zahlreiche weitere Komponenten, die für die Erhaltung der normalen mitochondrialen Struktur erforderlich sind, wurden bei der Durchmusterung einer Hefedeletionsbank gefunden. Dabei wurde die mitochondriale Struktur der Deletionsstämme, in denen die Mitochondrien durch

1 Einleitung

mitochondriales GFP visualisiert wurden, fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Dimmer *et al.*, 2002). Von den Deletionsmutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie zeigten insbesondere $\Delta mdm30$, $\Delta mdm37$ und $\Delta mdm39$ einen Phänotyp mit fragmentierten und aggregierten Mitochondrien, der dem einer Deletion von *FZO1* oder *UGO1* stark ähnelt. Die Produkte dieser drei Gene sind die wahrscheinlichsten Kandidaten für Komponenten, die direkt oder indirekt an der mitochondrialen Fusion beteiligt sind. Inzwischen wurde die Funktion von Mdm30 geklärt. Es reguliert den Abbau von Fzo1 in den Mitochondrien. Indirekt führen zu hohe Fzo1-Konzentrationen in der Deletionsmutante $\Delta mdm30$ zur Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien (Fritz *et al.*, 2003).

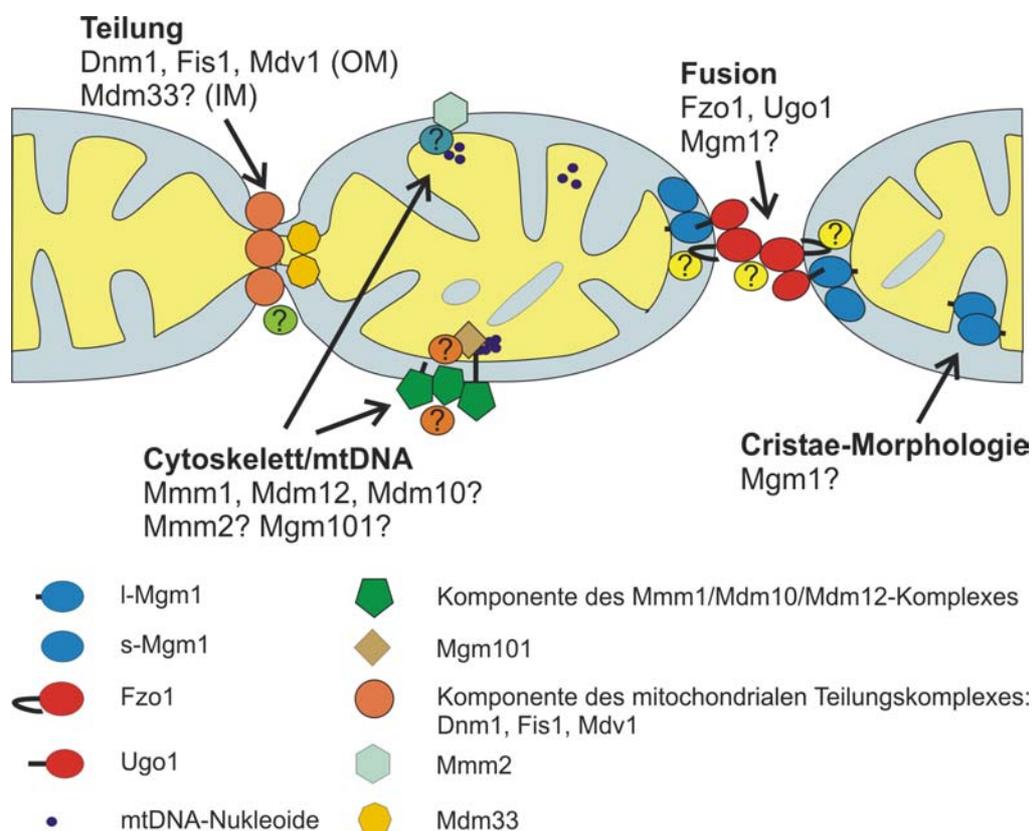


Abbildung 3: Schematische Darstellung der wichtigsten bekannten Proteine in der mitochondrialen Dynamik von *S. cerevisiae*. Der Dnm1/Fis1/Mdv1-Komplex vermittelt die Teilung der mitochondrialen Außenmembran (OM). Mdm33 ist vermutlich in die Teilung der mitochondrialen Innenmembran (IM) involviert. Der Fzo1/Ugo1/Mgm1-Komplex ist essentiell für die mitochondriale Fusion. Darüber hinaus wurde eine Funktion von Mgm1 in der Ausbildung der Cristae-Morphologie vorgeschlagen. Der Mmm1/Mdm10/Mdm12-Komplex ist für die Interaktion der Mitochondrien mit dem Aktin-Cytoskelett, ihre Motilität und ihre Vererbung in die Tochterzellen erforderlich und scheint direkt mit Mgm101 und den mitochondrialen DNA-Nukleoiden zu interagieren. Mmm2 konnte fluoreszenzmikroskopisch mit mitochondrialen DNA-Nukleoiden kolokalisiert werden und ist ebenfalls für die Vererbung der mitochondrialen DNA und die Erhaltung der tubulären Morphologie erforderlich. Weitere noch unbekannte Komponenten (z.B. Rezeptoren für Motorproteine, regulatorische Faktoren etc.) und Funktionen der bekannten Komponenten, die nicht abschließend geklärt sind, sind durch Fragezeichen gekennzeichnet.

1.3.2 Teilung von Mitochondrien

Als erstes Protein, welches an der mitochondrialen Teilung in *S. cerevisiae* beteiligt ist, wurde Dnm1 beschrieben (Abbildung 3). Mutationen in *DNM1* blockieren die mitochondriale Teilung. Da die mitochondriale Fusion davon unbeeinflusst bleibt, führt das zu netzartig verzweigten Mitochondrien bis schließlich nur noch ein Mitochondrium pro Zelle übrig bleibt (Bleazard *et al.*, 1999; Otsuga *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 1999). Dnm1 ist ein überwiegend cytoplasmatisches Protein. Darüber hinaus existiert eine Population von Dnm1, die mitochondrial lokalisiert ist und auf der Oberfläche der Mitochondrien eine punktförmige Verteilung an den Spitzen der Schläuche und an den Verzweigungsstellen aufweist (Otsuga *et al.*, 1998). Wahrscheinlich wird Dnm1 nur für die Teilung an die Mitochondrien rekrutiert. Immunelektronenmikroskopisch wurde Dnm1 mit den Orten kolokalisiert, an denen die Teilung der Mitochondrien erfolgt (Bleazard *et al.*, 1999). Diese Teilung kann sowohl innerhalb der mitochondrialen Schläuche als auch an den Verzweigungsstellen erfolgen (Nunnari *et al.*, 1997). Dnm1 besitzt Homologie zu Dynamamin, welches bei der Endozytose ringförmig um die Einstülpung der Cytoplasmamembran assembliert. Diese Selbstassemblierung stimuliert die GTPase-Aktivität des Dynamamins, da die so genannte GTPase-Aktivierungsdomäne („GTPase effector domain, GED“) eines Dynamamins die GTPase-Aktivität des benachbarten Dynamamins erhöhen kann (Praefcke und McMahon, 2004; Warnock *et al.*, 1996). Eine durch GTP-Hydrolyse induzierte mechanische Kontraktion des Ringes führt dann zur Abschnürung der Vesikel von der Cytoplasmamembran (De Camilli *et al.*, 1995; Takei *et al.*, 1995; Takei *et al.*, 1996). Alternativ zu diesem Modell, nach dem GTP-Hydrolyse durch Dynamamin unmittelbar mechanische Arbeit bewirkt, wird auch eine regulatorische Funktion der Dynamine diskutiert. Demnach wirken die Dynamine, indem sie GTP-abhängig weitere Komponenten der Endozytose rekrutieren (Sever *et al.*, 2000). In Analogie zum Dynamamin könnte in Mitochondrien Dnm1 um die Teilungsstelle assemblieren und zur Einschnürung und Teilung in die Tochtermitochondrien führen. Möglicherweise kann Dnm1 aber auch abhängig vom Nukleotidstatus seine eigene Assoziation mit Mitochondrien oder die Rekrutierung weiterer Komponenten der mitochondrialen Teilung regulieren. In genetischen Ansätzen, in denen nach Suppressoren von Fusionsmutanten gesucht wurde, konnten Fis1/Mdv2 und Fis2/Mdv1/Gag3/Net2 als weitere Komponenten der mitochondrialen Teilung identifiziert werden (Abbildung 3; Cervený *et al.*, 2001; Fekkes *et al.*, 2000; Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Fis2/Mdv1/Gag3/Net2 kolokalisiert mit den punktförmigen Strukturen von Dnm1 und zeigt den gleichen Deletionsphänotyp wie Dnm1. In Abwesenheit von Dnm1 ist es jedoch gleichmäßig über die Mitochondrien verteilt. Darüber hinaus ist eine direkte physikalische Interaktion zwischen Dnm1 und Fis2/Mdv1/Gag3/Net2 gezeigt worden (Cervený und Jensen, 2003; Tieu und Nunnari, 2000; Tieu *et al.*, 2002).

1 Einleitung

Insgesamt sprechen die verfügbaren Daten für einen Proteinkomplex aus Fis2/Mdv1/Gag3/Net2 und Dnm1, der die mitochondriale Teilung bewirkt. Fis1/Mdv2 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran. Im Gegensatz zu Dnm1 und Fis2/Mdv1/Gag3/Net2 ist es gleichmäßig über die Mitochondrien verteilt. Fis1/Mdv2 scheint zusammen mit Dnm1 an der Rekrutierung von Fis2/Mdv1/Gag3/Net2 an Mitochondrien notwendig zu sein. Die Deletion von *DNM1* und *FIS1/MDV2* führt zu einer cytoplasmatischen Lokalisation von Fis2/Mdv1/Gag3/Net2. An den Mitochondrien könnte Fis2/Mdv1/Gag3/Net2 eine Art Adapterfunktion zwischen Dnm1 und Fis1/Mdv2 ausüben, da es außer mit Dnm1 auch mit Fis1/Mdv2 interagiert (Cervený und Jensen, 2003; Tieu *et al.*, 2002).

Über die Teilung der mitochondrialen Innenmembran ist sehr wenig bekannt. Der Teilungsmechanismus aus den endosymbiotischen α -Proteobakterien scheint nicht konserviert zu sein (Erickson, 2000). Im Gegensatz zu Chloroplasten wurden in Mitochondrien von Pilzen bis jetzt keine mitochondrialen Homologen des bakteriellen Teilungsfaktors *ftsZ* gefunden. Lediglich in der Alge *Mallomonas splendens* wurde ein Protein mit Homologie zu *ftsZ* in Mitochondrien beschrieben (Beech *et al.*, 2000). Als erste Komponente, die in *S. cerevisiae* für die Teilung der mitochondrialen Innenmembran benötigt wird, wurde Mdm33 vorgeschlagen (Messerschmitt *et al.*, 2003). Mdm33 ist ein Protein der mitochondrialen Innenmembran. *MDM33*-Deletionsstämme zeigen ringförmige, häufig miteinander verbundenen Mitochondrien, die hohle sphärische Strukturen ausbilden. Die Überexpression von Mdm33 hat einen starken Einfluss auf die Ultrastruktur der mitochondrialen Innenmembran. Häufig werden Septen und Fragmente der Innenmembran beobachtet und die normale Cristae-Struktur geht verloren (Messerschmitt *et al.*, 2003).

1.3.3 Assoziation von Mitochondrien mit dem Cytoskelett

Für die dynamische Struktur der Mitochondrien ebenfalls unentbehrlich ist ihre Verankerung am und ihr Transport entlang des Cytoskeletts (Übersichtsartikel siehe Yaffe, 1999). In den meisten untersuchten Organismen werden Mitochondrien über das Tubulin-Cytoskelett und die dazugehörigen molekularen Motoren Dynein und Kinesin transportiert (Yaffe, 1999). In *S. cerevisiae*, in dem das Tubulin-Cytoskelett nur rudimentär entwickelt ist, scheint jedoch das Aktin-Cytoskelett die wichtigste Rolle zu spielen (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1995). Die Depolymerisation der Aktinfilamente durch Latrunculin A führt zur Fragmentierung der Mitochondrien (Boldogh *et al.*, 1998). Aktinfilamente konnten zusammen mit Mitochondrien ATP-abhängig sedimentiert werden (Boldogh und Pon, 2001). Die beteiligten Motorproteine sind bis jetzt unbekannt; Myosine, die normalerweise als Motorproteine entlang des Aktin-Cytoskeletts arbeiten, scheinen nicht beteiligt zu sein. Möglicherweise sind Polymerisation und Depolymerisation der

1 Einleitung

Aktinfilamente für einen gerichteten Transport von Mitochondrien in *S. cerevisiae* erforderlich (Boldogh *et al.*, 2001).

Die Deletion eines der drei Gene, die für Mmm1, Mdm10 oder Mdm12 codieren, führt zu einem ausgeprägten Morphologiephänotyp (Berger *et al.*, 1997; Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994). Das mitochondriale tubuläre Netzwerk kollabiert und sphärische Riesenmitochondrien entstehen. Häufig werden bei der Zellteilung in diesen Stämmen leere Knospen beobachtet (vielfach auch mehrere Knospen an einer Mutterzelle), die keine Mitochondrien erhalten haben. Die gerichtete Bewegung der Mitochondrien kommt völlig zum Erliegen. Darüber hinaus sind die Deletionsstämme atmungsdefizient. Alle drei Proteine sind integrale Proteine der Außenmembran und scheinen in einem Proteinkomplex vorzuliegen, der direkt oder indirekt Kontakt zu den mitochondrialen DNA-Nukleoiden hat (Abbildung 3; Boldogh *et al.*, 2003; Hobbs *et al.*, 2001). Tatsächlich durchspannt Mmm1 beide mitochondrialen Membranen (Kondo-Okamoto *et al.*, 2003) und interagiert auf der Matrixseite mit Mgm101 (Meeusen und Nunnari, 2003). Mgm101 bindet mitochondriale DNA und wird für die Reparatur oxidativ geschädigter DNA benötigt (Meeusen *et al.*, 1999). Es wurde vorgeschlagen, dass der Komplex aus Mmm1, Mdm10 und Mdm12 über die Interaktion mit Mgm101 und anderen Nukleoid assoziierten Proteinen, wie Abf2 und der mitochondrialen DNA-Polymerase Mip1, einen autonomen Replikationsapparat für die mitochondriale DNA bildet („Replisom“), der beide mitochondrialen Membranen durchspannt (Meeusen und Nunnari, 2003). Auf diese Weise könnte die mitochondriale DNA-Replikation, die Verteilung der mitochondrialen DNA auf Tochtermitochondrien und der Transport der Mitochondrien in die Tochterzellen durch einen einzigen Proteinkomplex koordiniert werden (Meeusen und Nunnari, 2003). Da aus den Deletionsstämmen von *MMM1*, *MDM10* oder *MDM12* isolierte Mitochondrien nicht mehr an Aktin binden können, wurde eine Rolle dieser Proteine als Rezeptoren für Aktin bindende Proteine oder aktinabhängige molekulare Motoren vorgeschlagen (Boldogh *et al.*, 1998). Das Aktin-Cytoskelett selbst bleibt in diesen Stämmen jedoch unbeeinflusst. Eine aktuelle Studie zeigt die Präsenz von Mdm10 im TOB/SAM-Komplex (vgl. 1.2.2) und eine Funktion von Mdm10 in den späten Assemblierungsschritten des TOM-Komplexes (Meisinger *et al.*, 2004). In dieser Studie wird ebenfalls ein mitochondrialer Morphologiephänotyp für Mutationen in den Komponenten des TOB/SAM-Komplexes und in Tom40 beschrieben (Meisinger *et al.*, 2004). Daher könnte Mdm10 nur transient mit Mmm1 und Mdm12 assoziiert sein. Der beobachtete Phänotyp von $\Delta m d m 1 0$ -Mutanten wäre eine sekundäre Konsequenz eines nicht korrekt assemblierten TOM-Komplexes und möglicherweise eines reduzierten Imports von Komponenten der mitochondrialen Außenmembran, die wichtig für die Erhaltung der mitochondrialen Morphologie sind.

1 Einleitung

Unlängst wurde für Mutationen in *MMM2* eine synthetische Letalität mit Mutationen in *MMM1* beschrieben (Youngman *et al.*, 2004). Wie *Mmm1* ist auch *Mmm2* ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran, das für die Erhaltung der mitochondrialen Morphologie und der mitochondrialen DNA erforderlich ist. Es kolokalisiert teilweise in punktförmigen Strukturen mit der mitochondrialen DNA, scheint aber nicht stabil mit dem *MMM1*-Komplex zu interagieren (Youngman *et al.*, 2004). Wahrscheinlich ist *Mmm2* Teil eines zweiten unabhängigen Komplexes, dessen dynamische Interaktion mit dem *MMM1*-Komplex für die mitochondriale Morphologie und die Weitergabe der mitochondrialen DNA wichtig ist (Youngman *et al.*, 2004).

1.4 Mgm1 – ein mitochondriales Dynamin-ähnliches Protein

Mgm1 ist ein Dynamin-ähnliches Protein in Mitochondrien. Es wurde erstmals bei der Suche nach Mutanten mit gestörter Vererbung des mitochondrialen Genoms entdeckt (*Mgm1: mitochondrial genome maintenance 1*) (Guan *et al.*, 1993; Jones und Fangman, 1992). Die Deletion von *MGM1* führt außer zum Verlust der mitochondrialen DNA und zur Respirationsdefizienz auch zur Fragmentierung und zur Aggregation von Mitochondrien. Die genaue Funktion von *Mgm1* ist nicht bekannt. Aufgrund des Phänotyps wurde eine Funktion bei der Fusion von Mitochondrien vorgeschlagen. Allerdings wurde in einer temperatursensitiven Mutante von *Mgm1*, *mgm1-5 Δ dnm1*, in der durch gleichzeitige Deletion der Teilungskomponente *DNM1*, das Gleichgewicht zwischen Fusion und Teilung wieder hergestellt war, in einem *in vivo*-Fusionsversuch bei der restriktiven Temperatur noch mitochondriale Fusion beobachtet (Wong *et al.*, 2000). Zusammen mit der Ähnlichkeit zu den Dynaminen und der in derselben Arbeit gefundenen Lokalisation im Intermembranraum führte das zur Spekulation, dass *Mgm1* eher an der Teilung der Innenmembran oder der Ausbildung der Cristae beteiligt sein könnte (Wong *et al.*, 2000). *Mgm1* könnte demnach wie die Dynamine ringförmig assemblieren und so entweder die Innenmembran einschnüren oder durch Ausbildung eines Ringes auf der Intermembranraumseite der Mitochondrien die Öffnung des Intermembranraums zu den Cristae hin („*cristae junctions*“) stabilisieren.

Die submitochondriale Lokalisierung von *Mgm1* war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit sehr umstritten. Neben der bereits beschriebenen Lokalisierung im Intermembranraum (Wong *et al.*, 2000) wurde das Protein auch auf der äußeren Oberfläche der Außenmembran lokalisiert (Shepard und Yaffe, 1999). *Msp1*, das orthologe Protein aus *Schizosaccharomyces pombe* wurde in der mitochondrialen Matrix gefunden (Pelloquin *et al.*, 1999). Auch ob *Mgm1* ein integrales Membranprotein oder nur peripher membranassoziiert ist, war zu Beginn dieser Arbeit nicht geklärt.

Wie *Dnm1* besitzt *Mgm1* Ähnlichkeit zu den Dynaminen. Inwieweit sich *Mgm1* in Bezug auf GTPase-Aktivität, Selbstassemblierung und Funktion tatsächlich wie ein

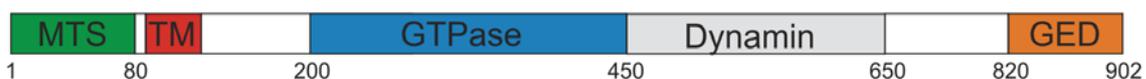
1 Einleitung

Dynamin verhält, ist nicht bekannt. Gelfiltrationsexperimente deuten die Präsenz von Mgm1 in einem Komplex von ca. 400 kD an (Shepard und Yaffe, 1999). Ebenso wenig ist geklärt, wie in Mgm1 vorhandene Eigenschaften der Dynamine zu dessen Funktion beitragen. GTP-Bindung und/oder Hydrolyse sind jedoch essentiell für die Funktion von Mgm1, da Punktmutationen des katalytischen Serins, Lysins oder Threonins im aktiven Zentrum zum Verlust der Funktion führen (Sesaki *et al.*, 2003b; Shepard und Yaffe, 1999).

Von den Dynaminen unterscheidet sich Mgm1 vor allem durch die Anwesenheit einer N-terminalen Präsequenz für die mitochondriale Lokalisation und einem vorhergesagten Transmembransegment in der Nähe des N-Terminus (Abbildung 4). Die sich anschließende GTPase-Domäne ist zwischen Mgm1 und Dynamin stark konserviert. Weniger gut konserviert ist die zentrale Dynaminregion. Am C-Terminus verfügt Dynamin über eine PH-Domäne, eine GTPase aktivierende Domäne und eine prolinreiche Domäne (Muhlberg *et al.*, 1997; Zhang und Hinshaw, 2001). Die PH-Domäne ist im Dynamin in die Bindung von Lipiden involviert (Muhlberg *et al.*, 1997; Salim *et al.*, 1996), während die prolinreiche Domäne eine Rolle bei der Selbstassemblierung des Proteins spielt (Hinshaw und Schmid, 1995; Muhlberg und Schmid, 2000; Muhlberg *et al.*, 1997) und über deren SH3-Domänen möglicherweise andere Proteine rekrutiert (Gout *et al.*, 1993). Von diesen drei Domänen ist in Mgm1 nur die GTPase aktivierende Domäne vorhanden, die bei den Dynaminen ebenfalls für die Assemblierung wichtig ist (Sever *et al.*, 1999). Eine geringe Ähnlichkeit besteht zur prolinreichen Domäne. Die PH-Domäne ist nicht konserviert.

Mgm1 aus *S. cerevisiae* und seine Orthologen aus anderen Organismen kommen in mindestens zwei Isoformen vor. Die genaue Identität dieser zwei Isoformen, ihre submitochondriale Lokalisierung und Membranassoziation, sowie ihre Funktion waren zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit nicht bekannt.

Mgm1



Dynamin



Abbildung 4: Domänenstruktur von Mgm1 und Dynamin (Muhlberg und Schmid, 2000; Muhlberg *et al.*, 1997; Zhang und Hinshaw, 2001). MTS, mitochondriale Signalsequenz; Dynamin, zentrale Dynamindomäne; GED, GTPase Effektor Domäne/GTPase aktivierende Domäne; GTPase, GTPase-Domäne; PH, Pleckstrin-Homologie Domäne; PRD, Prolin-reiche Domäne; TM, Transmembrandomäne.

1.5 OPA1 – Autosomal Dominante Optikusatrophie Typ 1

Mgm1 ist im Reich der Eukaryonten konserviert. OPA1 ist das menschliche Orthologe von Mgm1. Mutationen in OPA1 sind mit der Erbkrankheit Autosomal Dominante Optikusatrophie (ADOA) Typ I assoziiert (Alexander *et al.*, 2000, Delettre, *et al.*, 2000). Diese Form der Optikusatrophie ist mit einer Häufigkeit von 1:12000 bis 1:50000 die häufigste Form einer Optikusatrophie im Menschen. Die Symptome beginnen meist im frühen Kindesalter. Eine Degeneration der retinalen Ganglienzellen und eine weitergehende Atrophie des Sehnervs (*Nervus opticus*) führen zur fortschreitenden Einschränkung des Gesichtsfeldes und häufig zur Erblindung der betroffenen Patienten.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war die submitochondriale Lokalisierung und Membranassoziation von Mgm1 sehr umstritten. Da die Kenntnis der genauen Topologie von Mgm1 essentiell für ein Verständnis der Funktion ist, sollte zunächst die submitochondriale Lokalisierung und Membranassoziation geklärt werden.

Eine Besonderheit von Mgm1 ist sein Vorkommen in zwei Isoformen. Die genaue Identität der beiden Isoformen und mögliche Unterschiede in Bezug auf Funktion und Topologie sollten untersucht werden. Insbesondere geht es dabei um die Frage, ob beide Isoformen für die Funktion von Mgm1 notwendig sind, oder ob die größere nur ein Intermediat oder eine Speicherform für die Biogenese der kleineren Isoform ist.

In engem Zusammenhang damit steht die Frage nach der Biogenese beider Mgm1-Isoformen. Die kurze Form könnte durch proteolytische Prozessierung aus der langen Form entstehen. In diesem Fall ist die Identifizierung der dafür verantwortlichen Protease von grundlegender Bedeutung.

Über die proteolytische Prozessierung hinaus ist es wichtig zu verstehen, wie das Mengenverhältnis beider Isoformen reguliert wird. Geschieht das durch Regulation der Aktivität der Protease selbst oder sind andere Faktoren an der Regulation dieses Gleichgewichts beteiligt? Variiert das Verhältnis beider Isoformen unter physiologischen Bedingungen und beeinflusst das die Funktion von Mgm1 in Bezug auf die mitochondriale Morphologie und die Erhaltung der mitochondrialen DNA? Wie hängt die Biogenese beider Mgm1-Isoformen von den Komponenten der mitochondrialen Proteinimportmaschinerie ab?

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Gegebenenfalls wurden die Lösungen so verdünnt, dass die Messung im linearen Bereich (OD_{260} 0,1 -1) erfolgte.

2.1.2 Phenolextraktion und Ethanolfällung

Für die Extraktion von DNA mit Phenol wurde die DNA-Lösung zwei Mal mit zwei Volumina Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) ausgeschüttelt (Sambrook, 1989). Dabei sammeln sich die Proteinverunreinigungen an der Grenzfläche zwischen organischer und wässriger Phase. Zur besseren Phasentrennung wurde jeweils für 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, bevor die obere wässrige Phase abgenommen wurde.

Mit Hilfe der Ethanolfällung wurden wässrige DNA-Lösungen konzentriert und unerwünschte Salze entfernt. Dazu wurde die Lösung mit 5 M Natriumchloridlösung auf eine Endkonzentration von 300 mM versetzt. Durch Zugabe des 2,5fachen Volumens an Ethanol (-20 °C) und Inkubation für 30 min bei -20 °C wurde die DNA präzipitiert. Es wurde 30 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert und mit kaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde an der Luft getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen.

2.1.3 DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann durch wiederholtes Durchlaufen eines Reaktionszyklus von Trennung der Matrizenstränge, Anlagerung von kurzen spezifischen einzelsträngigen Oligonukleotiden (Primern) an die einzelsträngigen Matrizen und darauf folgende Verlängerung dieser Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase eine exponentielle Vervielfältigung der Matrizen-DNA erreicht werden (Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985). Ein typischer Reaktionsansatz von 100 µl enthielt 1-3 U der thermostabilen DNA-Polymerase, 10 µl des entsprechenden vom Hersteller der Polymerase gelieferten zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers, 75 pmol der beiden Oligonukleotide, 200 µM aller vier Desoxynukleosidtriphosphate und ca. 1-100 ng der Matrizen-DNA. Da die DNA-Polymerasen magnesiumabhängig sind, war im zehnfach konzentrierten Reaktionspuffer Magnesiumchlorid für eine Endkonzentration von 1,5 mM vorhanden. Als thermostabile DNA-Polymerasen

2 Material und Methoden

kamen die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* und das *Expand*-System (Roche) zum Einsatz. Die *Taq*-Polymerase zeichnet sich durch hohe Prozessivität und Geschwindigkeit aus. Die *Pfu*-Polymerase ist langsamer und weniger prozessiv, besitzt aber eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die die Fehlerrate bei der Amplifikation erheblich verringert („*proofreading*“). Das *Expand*-System besteht aus einer Mischung beider Polymerasen und vereint hohe Prozessivität und Geschwindigkeit mit geringer Fehlerrate bei der Amplifikation. Ein typischer Reaktionsverlauf begann mit einer fünfminütigen Vorinkubation bei 94 °C, um die Matrizenstränge vollständig zu denaturieren. Es folgten 25–35 Reaktionszyklen aus Denaturierung der Matrizenstränge (1 min bei 94 °C), Anlagerung der spezifischen Oligonukleotide (1 min bei 40–54 °C) und Synthese der DNA (1 bis 6 min bei 72 °C, je nach Länge des Matrizenstrangs). Nach Ablauf der Reaktionszyklen wurden unvollständig synthetisierte DNA-Stränge durch zehnminütige Inkubation bei 72 °C vervollständigt. Die Entstehung des entsprechenden Produkts wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.1.4 Reinigung von PCR-Produkten über Mikrozentrifugationssäulchen

Die Reinigung und Entsalzung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe von Mikrozentrifugationssäulchen (Qiaquick PCR Purification Kit). Dazu wurde das PCR-Produkt zunächst mit 5 Volumina Puffer PB verdünnt. Zum Binden an das Säulenmaterial wurde diese Lösung für 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge durch ein Mikrozentrifugationssäulchen zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Genauso wurde mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und nach Verwerfen der Waschlösung nochmals zentrifugiert, um den Puffer und darin enthaltenen Ethanol vollständig zu entfernen. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl sterilem Wasser eluiert.

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

Kleine Mengen an Plasmid-DNA (Minipräparation) wurden durch alkalische Lyse der entsprechenden *E. coli*-Zellen gewonnen (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979). Dazu wurden die Zellen über Nacht in 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C angezogen. 1,5 ml der Kultur wurden 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Rest der Kultur wurde bei 4 °C gelagert, um den entsprechenden Stamm für spätere Verwendung zu konservieren. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl; pH 8,0) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS). Nach erneuter Inkubation für 5 min bei RT wurden 150 µl Lösung 3 (3 M Natriumacetat; pH 4,8)

2 Material und Methoden

zugegeben, kurz geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Dabei fallen die meisten Proteine und chromosomale DNA aus und können bei 13000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die darin enthaltene DNA mit Ethanol gefällt (vgl. 2.1.2). Die getrocknete DNA wurde in 50 µl sterilem Wasser mit 50 µg/ml Ribonuklease A aufgenommen. 2 µl der präparierten Plasmid-DNA wurden durch Restriktionsverdau analysiert (vgl. 2.1.8). Größere Mengen an Plasmid-DNA mit einer höheren Reinheit (Midi-Präparation) wurden mit Hilfe des „Jetstar-Kits“ der Firma Genomed präpariert. 40 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes von *E. coli* bei 37 °C in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden 5 min bei 5000 rpm in einem JA20-Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 4 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; pH 8) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS) für 5 min bei RT lysiert und schließlich Proteine und chromosomale DNA durch Zugabe von 4 ml Lösung E3 (3,2 M Kaliumacetat; pH 5,5) gefällt. Nach zehnmütiger Zentrifugation in einem JA20-Rotor bei 12000 rpm wurde der Überstand auf eine zuvor mit 10 ml Lösung E4 (0,6 M NaCl; 0,1 M Natriumacetat; 0,15 % Triton X-100; pH 5,0) äquilibrierte Anionenaustauschersäule aufgebracht. Die Säule wurde zwei Mal mit 10 ml Lösung E5 (0,8 M NaCl; 0,1 M Natriumacetat; pH 5,5) gewaschen und die Plasmid-DNA schließlich mit 5 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl; 100 mM Tris/HCl; pH 8,5) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt, das Präzipitat für 30 min bei 10000 rpm und 4 °C im JA20-Rotor sedimentiert und einmal mit 5 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 µl sterilem Wasser gelöst.

2.1.6 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung genomischer DNA (Rose, 1990) wurde der Wildtyp-Stamm W303 α in 10 ml YPD-Medium über Nacht angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min in einer Sigma 3K12 Zentrifuge mit dem Rotor 11333 geerntet, einmal mit dem gleichen Volumen Wasser gewaschen und in 0,2 ml Puffer (2 % (w/v) Triton X-100; 1 % (w/v) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) resuspendiert. Es wurden 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g Glaskugeln (0,45 mm Durchmesser) zugegeben und 4 min gevortext, um die Zellen aufzuschließen. Nach Zugabe von 0,2 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt (vgl. 2.1.2) und in Wasser gelöst. Durch Zugabe von 75 µg/ml RNaseA und Inkubation für 5 min bei 37 °C wurde verun-

2 Material und Methoden

reinigende RNA entfernt, bevor die DNA erneut mit Ethanol gefällt und schließlich in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen wurde.

2.1.7 Isolierung von mitochondrialer DNA aus *S. cerevisiae*

Mitochondriale DNA wurde durch Phenolextraktion von isolierten Mitochondrien gewonnen. 1–3 mg Mitochondrien wurden mit H-Puffer (20 mM HEPES/KOH; pH 7,4) auf 400 µl verdünnt, mit Phenol extrahiert und die DNA aus der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt (vgl. 2.1.2).

2.1.8 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen. Dabei wurden die vom Hersteller (New England Biolabs, NEB) mitgelieferten zehnfach konzentrierten Puffer verwendet. Für 1 µg DNA wurden 1-2 U des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Die Ansätze wurden für mindestens zwei Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

2.1.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Nach dem Restriktionsverdau wurden endständige Phosphatgruppen der Klonierungsvektoren mit Shrimp alkalischer Phosphatase (Roche) entfernt, um eine spätere Religation der Vektoren zu vermeiden. Dazu wurden die Ansätze mit einem Zehntel ihres Volumens an zehnfach konzentriertem Puffer (0,5 M Tris/HCl; 50 mM MgCl₂; pH 8,5) und 1 U Shrimp alkalischer Phosphatase pro 50 µl Reaktionsansatz versetzt. Die Reaktionsansätze wurden für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch 15minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Die so behandelten Vektoren wurden über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (vgl. 2.1.11, 2.1.12).

2.1.10 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit T4-DNA-Ligase der Firma New England Biolabs (NEB). Dazu wurden ca. 50 bis 200 ng des linearisierten und phosphataseverdauten Vektors und ein ungefähr dreifacher molarer Überschuss des zu klonierenden Fragments eingesetzt. Außerdem enthielt ein 20 µl Ligationsansatz 2 µl des entsprechenden zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers (Endkonzentration: 50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 25 µg/ml BSA; pH 7,5), 0,5 U T4-DNA-Ligase und die entsprechende Menge Wasser. Die Ligation erfolgte für mindestens 4 Stunden, normalerweise über Nacht, bei 16 °C.

2 Material und Methoden

2.1.11 Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Für die gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden Agarose-Flachgele mit 30 oder 100 ml Gelbettvolumen benutzt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,8 -3 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 7,5; 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA) aufgekocht und bei 65 °C gelagert. Für die Detektion der DNA-Fragmente wurden beim Gießen der Gele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 5fach konzentriertem Auftragspuffer versetzt (Endkonzentration: 1 mM EDTA; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 6 % (w/v) Glycerol; pH 8) und auf das entsprechende Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 15 V/cm durchgeführt. Danach wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht.

2.1.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden zunächst unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen. Dabei wurde zunächst die Masse des Agarosestücks bestimmt und dieses dann mit dem dreifachen Volumen (also 300 µl pro 100 mg Agarose) Puffer QG versetzt. Durch Inkubation bei 50 °C für 10 min wurde die Agarose aufgelöst. Die Lösung wurde auf ein Mikrozentrifugationssäulchen geladen und dieses für 1 min bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulchen einmal mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Erneute Zentrifugation nach dem Verwerfen der Waschlösung stellte die vollständige Entfernung der Waschlösung und des darin enthaltenen Ethanols sicher. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl sterilem Wasser eluiert.

2.1.13 Präparation transformationskompetenter Zellen von *E. coli*

Mit einer 50 ml Vorkultur von *E. coli* DH5α auf LB-Medium wurden 2 l LB-Medium auf eine OD₅₇₈ von ca. 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C weitergezogen, bis eine OD₅₇₈ von ca. 0,5 erreicht war. Danach wurden die Zellen für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend 15 min bei 5000 rpm und 2 °C im JA10-Rotor abzentrifugiert. Alle verwendeten Behälter und Lösungen wurden bei 4 °C vorgekühlt. Die Zellen wurden nacheinander mit 1000 ml, 500 ml und schließlich 100 ml 10 % (v/v) Glycerol (4 °C) gewaschen und nach jedem Waschschrift 15 min bei 5000 rpm und 2 °C zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand vollständig abgenommen, die Bakterien in 1 ml 10 % (v/v) Glycerol aufgenommen und in Portionen von je 60 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

2 Material und Methoden

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

Die Transformation kompetenter Zellen von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz versetzt. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und darin in einem Elektroporationsgerät mit Spannungspulsen transformiert (2,5 kV; 400 Ω; 25 µF). Die Suspension wurde sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 45 min bei 37 °C geschüttelt, um die Resistenz gegen Ampicillin auszubilden. Danach wurden 200 µl der Suspension auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.15 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA

2.1.15.1 Herstellung kompetenter Hefezellen mit Lithiumacetat

Der entsprechende Stamm von *S. cerevisiae* wurde über Nacht in YPD oder einem anderen geeigneten Medium angezogen. Am nächsten Morgen wurde die Kultur auf eine OD₅₇₈ von ungefähr 0,1 verdünnt (50-100 ml) und bis zu einer OD₅₇₈ von ungefähr 0,5 weitergeschüttelt. Die Zellen wurden in einem sterilen Zentrifugationsröhrchen bei 3000 rpm für 5 min sedimentiert (Sigma 3K12; Rotor 11133), einmal mit sterilem Wasser gewaschen, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 s bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment schließlich in 400 µl 100 mM Lithiumacetat suspendiert. Die transformationskompetenten Zellen wurden in 50 µl Aliquots portioniert und sofort für die Transformation eingesetzt (Gietz *et al.*, 1995).

2.1.15.2 Transformation kompetenter Hefezellen

Für jede Transformation wurde ein 50 µl Aliquot der kompetenten Zellen für 15 s bei 3000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Den Zellen wurden 240 µl PEG 3350 (50 % (w/v)), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 10 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNA (10 mg/ml), und 80 µl steriles Wasser zugegeben, in dem 0,1-10 µg der zu transformierenden DNA gelöst waren. Die Ansätze wurden 1 min lang kräftig gemischt und dann 30 min bei 30 °C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 20 min. Bei temperatursensitiven Stämmen wurde auf diesen Hitzeschock verzichtet. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen 15 s bei 3000 rpm sedimentiert, in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf Platten mit Selektivmedium plattiert (Gietz *et al.*, 1995). Die Selektion erfolgte über die entsprechenden Auxotrophiemarker.

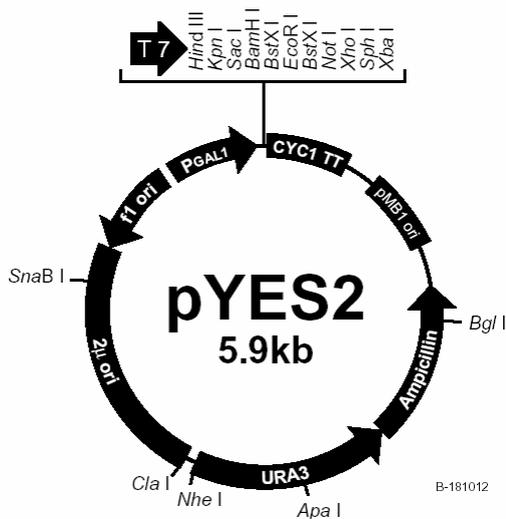
2 Material und Methoden

2.1.16 DNA–Sequenzierung

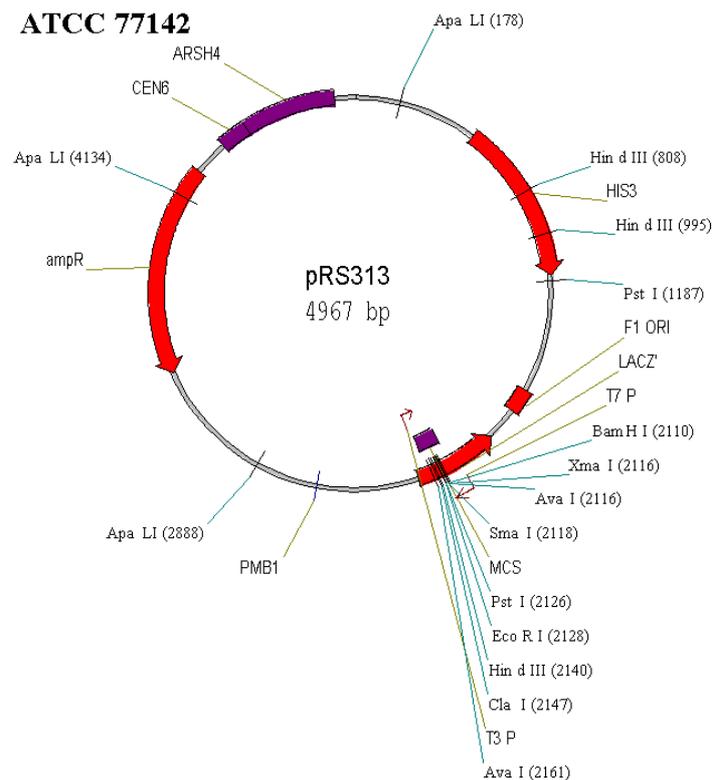
Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma Medigenomix (Martinsried, Deutschland) nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide.

2.1.17 Verwendete Vektoren

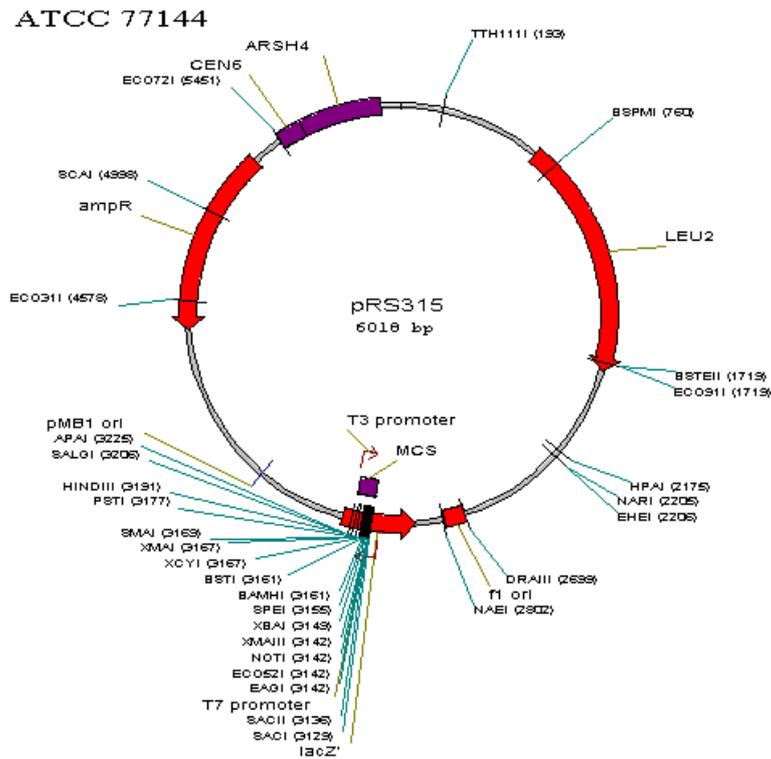
2.1.17.1 pYES2 (Invitrogen)



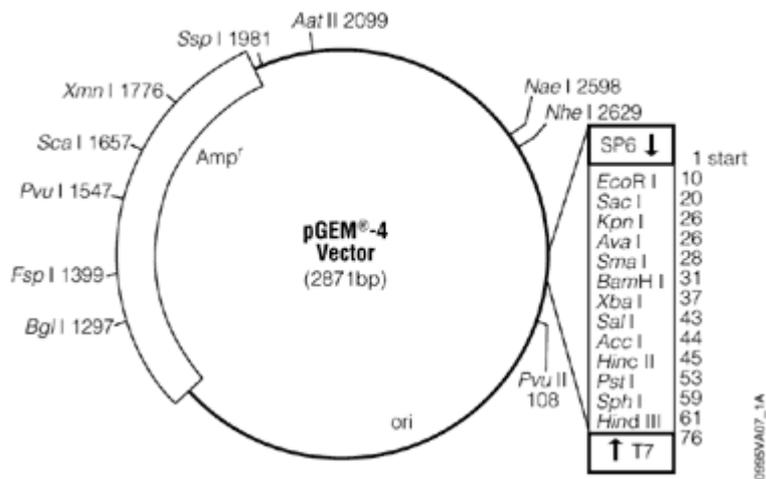
2.1.17.2 pRS313 und pRS315 (Sikorski und Hieter, 1989)



2 Material und Methoden

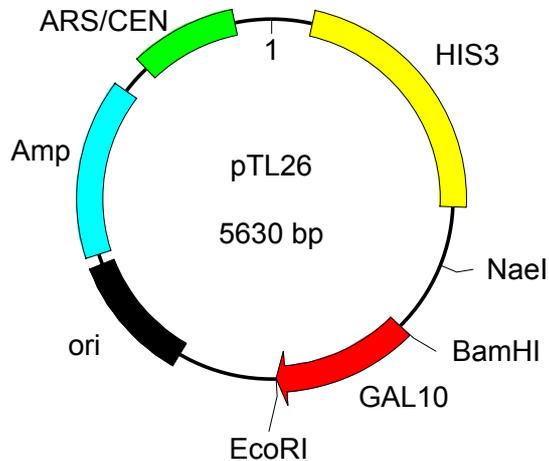


2.1.17.3 pGEM4 (Promega)



2 Material und Methoden

2.1.17.4 pTL26 (Lafontaine und Tollervey, 1996)



2.1.18 Klonierungsstrategien

2.1.18.1 pYES2-Mgm1

Mit den Primern *Mgm1-up* und *Mgm1-fl-dn* und genomischer DNA aus *S. cerevisiae* W303 α als Matrize wurde das *MGM1*-Gen durch PCR amplifiziert. Mit Hilfe der *SacI*- und der *XbaI*-Schnittstelle, die beide in den jeweiligen Primern enthalten waren, wurde das PCR-Produkt in den Hefeexpressionsvektor pYES2 kloniert. Von diesem Vektor konnte Mgm1 unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors exprimiert werden.

Primer	Sequenz
<i>Mgm1-up</i>	5'-CCC CGA ATT CGA GCT CGC CAT GAG TAA TTC TAC TTC ATT AAG G-3'
<i>Mgm1-fl-dn</i>	5'-CCC CGC GGC CGC TCT AGA TCA TAA ATT TTT GGA GAC GCC C-3'

Tabelle 1: Primer für die Klonierung von pYES2-Mgm1

2.1.18.2 pYES2-Mgm1 Δ 2 (pYES2-Mgm1 Δ 154-167/pYES2-I-Mgm1*)

Für die Herstellung von pYES2-Mgm1 Δ 2 wurden zunächst 2 PCR-Produkte von genomischer DNA als Matrize hergestellt. Das erste entstand durch Amplifikation mit den Primern *Mgm1-up* und *Mgm1-d154-167 antisense* und beinhaltete die Sequenz von *MGM1* bis zum 174. Codon, wobei durch die Wahl des Primers *Mgm1-d154-167 antisense* die Codons 154-167 deletiert wurden. Analog wurde ein zweites PCR-Produkt mit den Primern *Mgm1-d154-167 sense* und *Mgm1-fl-dn* hergestellt, das die Sequenz von *MGM1* ab dem 440. Nukleotid enthält. Auch hier wurden durch die

2 Material und Methoden

Wahl des Primers *Mgm1-d154-167 sense* die Codons 154-167 ausgespart. Beide Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Die beiden internen Primer *Mgm1-d154-167 sense* und *Mgm1-d154-167 antisense* sind einander komplementär. Daher konnte das erste Fragment verdünnt als Matrize in einer erneuten PCR amplifiziert werden, in der *Mgm1-up* und das zweite PCR-Fragment als Primer eingesetzt wurden. Das resultierende PCR-Produkt hatte eine Länge, die *MGM1* abzüglich der Codons 154-167 entspricht und wurde mit Hilfe der *SacI*- und *XbaI*-Restriktionsschnittstellen aus den Primern *Mgm1-up* und *Mgm1-fl-dn* in pYES2 kloniert. Von diesem Vektor konnte unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors eine *Mgm1*-Version exprimiert werden, der die Aminosäurereste 154-167 fehlen.

Primer	Sequenz
<i>Mgm1-d154-167 antisense</i>	5'-ACT TTC GTC ATC GTC GAG TGA TCC ATG ACC ACC GTC TTG TG-3'
<i>Mgm1-d154-167 sense</i>	5'-CAC AAG ACG GTG GTC ATG GAT CAC TCG ACG ATG ACG AAA GT-3'

Tabelle 2: Primer für die Klonierung von pYES2-Mgm1 Δ 2

2.1.18.3 pYES2-s-Mgm1* (pYES2-Cyb2₁₋₁₆₇ Δ N₁₆₀Mgm1)

pYES2-s-Mgm1* wurde mit der gleichen Methode hergestellt wie pYES2-Mgm1 Δ 2. Dabei entstand das erste PCR-Produkt durch Amplifikation der ersten 167 Codons von Cytochrom *b*₂ aus genomischer DNA von W303 α mit den Primern *Cyb2up* und *Cyb2Mgm1dn160 antisense*. Für das zweite PCR-Produkt wurden die Codons 161-903 von *MGM1* mit den Primern *Cyb2Mgm1dn160 sense* und *Mgm1-fl-dn* amplifiziert. Die beiden internen Primer *Cyb2Mgm1dn160 sense* und *Cyb2Mgm1dn160 antisense* waren wiederum so gewählt, dass sie überlappten. So konnten in einer dritten PCR, in der das erste PCR-Produkt in starker Verdünnung als Matrize und *Cyb2up* und das zweite PCR-Produkt als Primer eingesetzt wurden, die beiden ersten PCR-Produkte fusioniert werden. Dadurch entstand ein PCR-Produkt, das den ersten 167 Codons von Cytochrom *b*₂ und den Codons 161-903 von *MGM1* entspricht. Dieses Fusionsprodukt wurde mit Hilfe der *SacI*- und *XbaI*-Schnittstellen, die in den Primern *Cyb2up* und *Mgm1-fl-dn* vorhanden waren, in pYES2 kloniert. Von diesem Vektor konnte unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors ein Fusionsprotein aus den ersten 167 Aminosäureresten von Cytochrom *b*₂ und den Aminosäureresten 161-902 von *Mgm1* exprimiert werden.

2 Material und Methoden

Primer	Sequenz
<i>Cyb2up</i>	5'-CCC CGA GCT CGC CAT GCT AAA ATA CAA ACC TTT ACT A-3'
<i>Cyb2Mgm1dn160 antisense</i>	5'-GAT GTA GCG GCT ATT AGA GTA GCG GAT CCT TGA AGG GGA CCC-3'
<i>Cyb2Mgm1dn160 sense</i>	5'-GGG TCC CCT TCA AGG ATC CGC TAC TCT AAT AGC CGC TAC ATC-3'

Tabelle 3: Primer für die Klonierung von pYES2-s-Mgm1*

2.1.18.4 pRS315-Mgm1 und pRS315-Mgm1 Δ 2 (pRS315-Mgm1 Δ 154-167)

Für die Expression von Mgm1 und Mgm1 Δ 2 unter Kontrolle des endogenen Promotors wurden beide aus pYES2 mit Hilfe der *SacI*- und *XbaI*-Restriktionsschnittstellen in pRS315 subkloniert. 1030 Nukleotide oberhalb und die ersten 351 Nukleotide von *MGM1* wurden mit den Primern *Mgm1 pro up* und *Mgm1 NheI rev* amplifiziert und das resultierende Fragment mit den *SacI*- und *NheI*-Schnittstellen gegen das entsprechende Fragment von Mgm1 bzw. Mgm1 Δ 2 in pRS315 ausgetauscht. Von diesen Vektoren können Mgm1 bzw. Mgm1 Δ 2 unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert werden.

Primer	Sequenz
<i>Mgm1 pro up</i>	5'- CCC CGA GCT CCA AGT CAT GTG AAG GAT GGA C-3'
<i>Mgm1 NheI rev</i>	5'- CCC CGC TAG CTT CTT CCA TCT TAT AAG C-3'

Tabelle 4: Primer für die Klonierung von pRS315-Mgm1 und pRS315-Mgm1 Δ 2

2.1.18.5 pRS313-s-Mgm1* (pRS313-Cyb2₁₋₁₆₇ Δ N₁₆₀Mgm1)

Bei der Klonierung von pRS313-s-Mgm1* wurde der endogene Promotor von *MGM1* mit den Primern *Mgm1 pro up* und *Cyb2 BglII rev* von genomischer DNA aus W303 α amplifiziert. Der Primer *Cyb2 BglII rev* führt durch eine stille Mutation eine *BglII*-Schnittstelle in die Sequenz von Cytochrom *b*₂ ein. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SacI* und *EcoRI*, die in den beiden Primern vorhanden sind, in pYES2 kloniert. In einer zweiten PCR wurde von der Matrize pYES2-s-Mgm1* mit den Primern *Cyb2 BglII fwd* und *Mgm1-fl-dn* der größte Teil von s-Mgm1* amplifiziert. Auch hier wird durch den Primer *Cyb2 BglII fwd* mit einer stillen Mutation eine *BglII*-Schnittstelle eingeführt. Dieses PCR-Produkt wurde über die *BglII*- und die *XbaI*-Schnittstellen aus den Primern in pYES2 kloniert, welcher schon den endogenen Promotor enthielt. Aus pYES2 wurde das Produkt, das nun aus dem endogenen Promotor und s-Mgm1* besteht, mit Hilfe der *SacI*- und *XbaI*-Restriktions-

2 Material und Methoden

schnittstellen in pRS313 subkloniert. Auf diese Weise kann s-Mgm1* unter Kontrolle des endogenen Promotors von *MGM1* exprimiert werden.

Primer	Sequenz
<i>Cyb2 BgIIIrev</i>	5'-CCC CGA ATT CAG ATC TTT AGT AAA GGT TTG TAT TTT AGC ATG CTT TCA GAG TAT TAT GGT GAA-3'
<i>Cyb2 BgIII fwd</i>	5'- CCC CAG ATC TCG AAG AAC TGT GAG GCT GC-3'

Tabelle 5: Primer für die Klonierung von pRS313-s-Mgm1*

2.1.18.6 pRS315-Mgm1 Δ 1 (pRS315-Mgm1 Δ 91-111), pRS315-Mgm1VVL, pRS315-Mgm1G100D, pRS315-Mgm1G100K, pRS315-Mgm1 Δ 1& Δ 2

Die Mgm1-Varianten pRS315-Mgm1 Δ 1 (pRS315-Mgm1 Δ 91-111), pRS315-Mgm1VVL, pRS315-Mgm1G100D, pRS315-Mgm1G100K, pRS315-Mgm1 Δ 1& Δ 2 wurden alle über die gleiche Klonierungsstrategie einer ortsgerichteten Mutagenese erhalten. Es wurde jeweils der *MGM1*-Promotor (beginnend 1030 Nukleotide oberhalb des offenen Leserahmens) mit dem Primer *Mgm1 pro up* und einem zweiten Primer amplifiziert, der neben einer nach Nukleotid 351 endogen in *MGM1* vorhandenen *NheI*-Schnittstelle die Mutation oder Deletion im ersten hydrophoben Segment von Mgm1 (Aminosäure 91-111 von Mgm1) enthielt (Tabelle 6). Die PCR-Fragmente wurden über die *SacI*- und *NheI*-Schnittstellen gegen die entsprechenden Fragmente aus pRS315-Mgm1 (für pRS315-Mgm1 Δ 1 (pRS315-Mgm1 Δ 91-111), pRS315-Mgm1VVL, pRS315-Mgm1G100D, pRS315-Mgm1G100K) bzw. pRS315-Mgm1 Δ 2 (für pRS315-Mgm1 Δ 1& Δ 2) ausgetauscht. Von diesen Plasmiden können die angegebenen Varianten von Mgm1 unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert werden.

Primer	Sequenz
<i>Mgm1 Δ1</i>	5'-CCC CGC TAG CTT CTT CCA TCT T-3'
<i>Mgm1 VVL</i>	5'-CCC CGC TAG CTT CTT CCA TCT TAT AAG CTA TAT AAC TCC CTG CAG CAG CCA GCA CGA CAC CCA CAT ATA TGG-3'
<i>Mgm1 G100D</i>	5'- CCC CGC TAG CTT CTT CCA TCT TAT AAG CTA TAT AAC TCC CTG CAG CAG CCA TCC CGT CAC CCA CAT ATA TGG-3'
<i>Mgm1 G100K</i>	5'- CCC CGC TAG CTT CTT CCA TCT TAT AAG CTA TAT AAC TCC CTG CAG CAG CCA TCC CCT TAC CCA CAT ATA TGG-3'

Tabelle 6: Primer für die Klonierung von pRS315-Mgm1 Δ 1, pRS315-Mgm1VVL, pRS315-Mgm1G100D, pRS315-Mgm1G100K und pRS315-Mgm1 Δ 1& Δ 2.

2 Material und Methoden

2.1.18.7 pGEM4 Mgm1₁₋₄₂₇

Die ersten 427 Codons von *MGM1* wurden von genomischer DNA aus *S.cerevisiae* W303 α mit den Primern *Mgm1-up* und *Mgm1-1-427 dn* amplifiziert und über die *SacI*- und *XbaI*-Restriktionsschnittstellen in pGEM4 kloniert. In diesem Plasmid lässt sich vom *SP6*-Promotor aus pGEM4 ein Mgm1₁₋₄₂₇ Vorstufen-Protein *in vitro* synthetisieren.

Primer	Sequenz
<i>Mgm1-1-427 dn</i>	5'- CCC CGC GGC CGC TCT AGA TCA GAG AGG ATA TTT TTT ATT ATT C-3'

Tabelle 7: Primer für die Klonierung von pGEM4-Mgm1₁₋₄₂₇

2.1.18.8 pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR

Mit den Primern *Mgm1-up* und *Mgm1-1-228 dn* wurden die ersten 228 Codons von *MGM1* von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* W303 α amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt wurde mit den in den Primern vorhandenen Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* in pGEM4 kloniert, welcher Maus-DHFR zwischen den *BamHI* und *HindIII*-Schnittstellen enthielt. Der Primer *Mgm1-1-228 dn* war dabei so gewählt, dass die ersten 228 Aminosäurereste von Mgm1 im gleichen Leserahmen liegen wie die DHFR aus Maus. Daher kann vom *SP6*-Promotor dieses Plasmids ein Fusionsprotein aus den ersten 228 Aminosäureresten von Mgm1 mit Maus-DHFR *in vitro* synthetisiert werden.

Primer	Sequenz
<i>Mgm1-1-228 dn</i>	5'-CCC CGG ATC CAT GTG CAG AAG AAG AGT CC -3'

Tabelle 8: Primer für die Klonierung von pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR

2.1.18.9 Varianten von pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 1\&\Delta 2$, VVL, G100D, G100K)

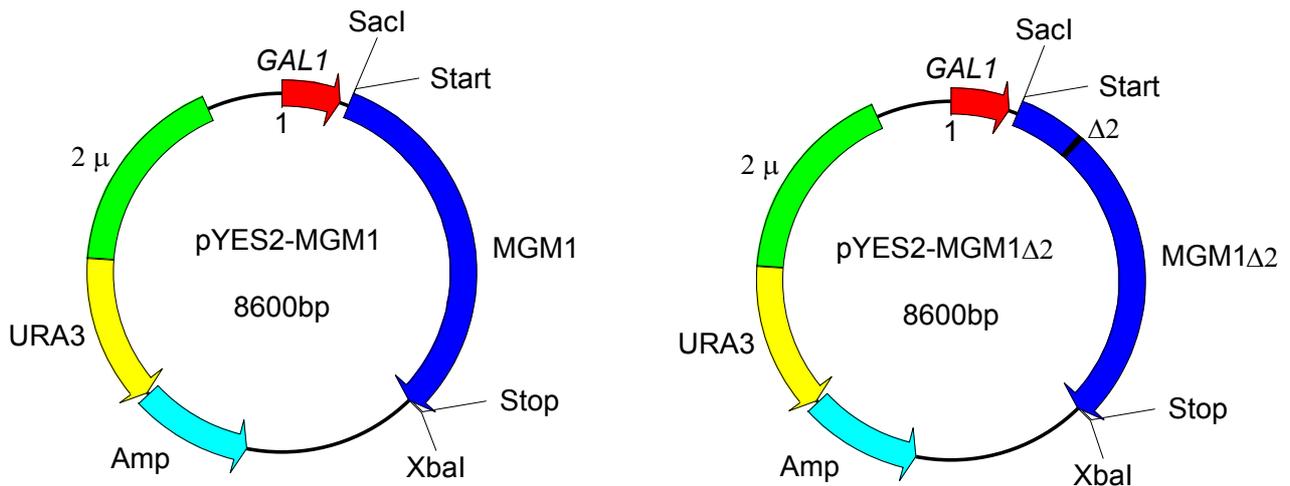
Von pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR wurden Varianten analog zu den in 2.1.18.6 beschriebenen Varianten angefertigt. Dazu wurden von diesen Mutanten in pRS315 jeweils die Bereiche von Codon 1 bis 228 von *MGM1* (mit den darin enthaltenen Mutationen oder Deletionen) mit den Primern *Mgm1-up* und *Mgm1-1-228 dn* amplifiziert und über die *EcoRI*- und *BamHI*-Schnittstellen in pGEM4 kloniert, welcher im gleichen Leserahmen Maus-DHFR zwischen den *BamHI*- und *HindIII*- Schnittstellen enthielt, wie unter 2.1.18.8 beschrieben. Auf diese Weise können die entsprechenden

2 Material und Methoden

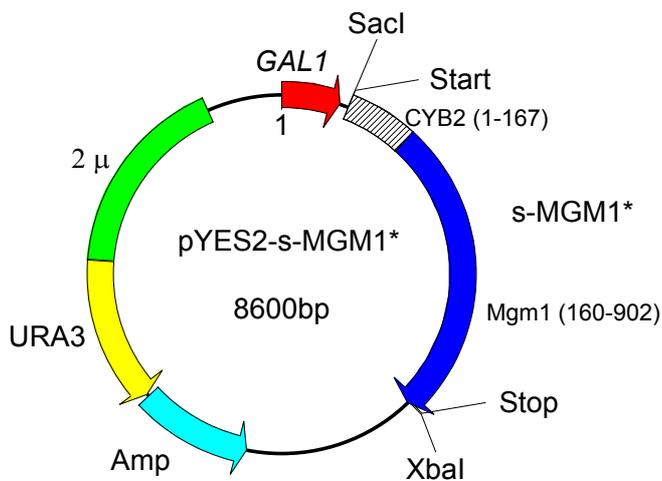
Varianten von pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR vom SP6-Promotor *in vitro* synthetisiert werden.

2.1.19 Karten der verwendeten Plasmide

2.1.19.1 pYES2-Mgm1 und pYES2-Mgm1Δ2

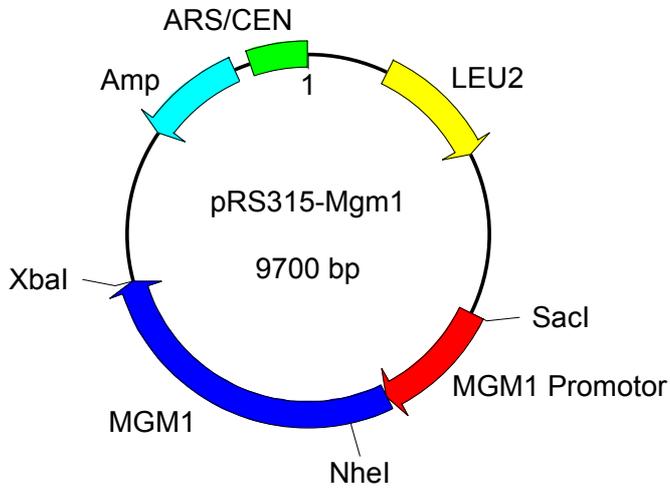


2.1.19.2 pYES2-s-Mgm1*

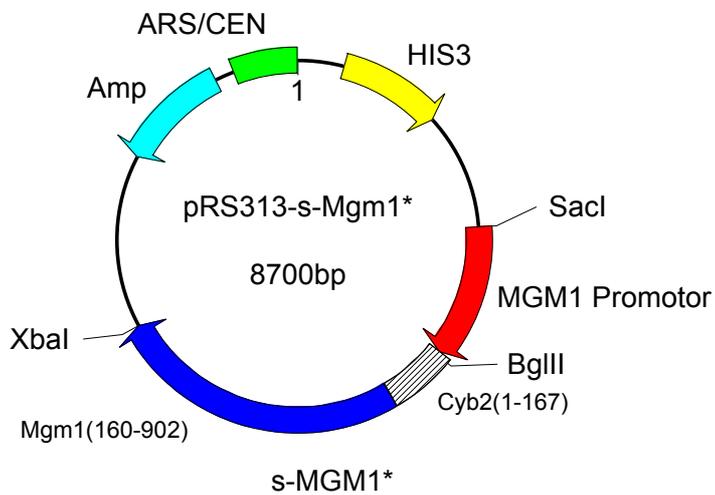


2 Material und Methoden

2.1.19.3 pRS315-Mgm1 und pRS315-Mgm1-Varianten

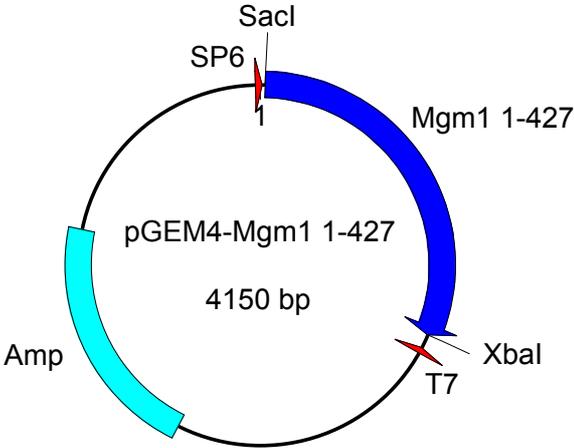


2.1.19.4 pRS313 s-Mgm1*

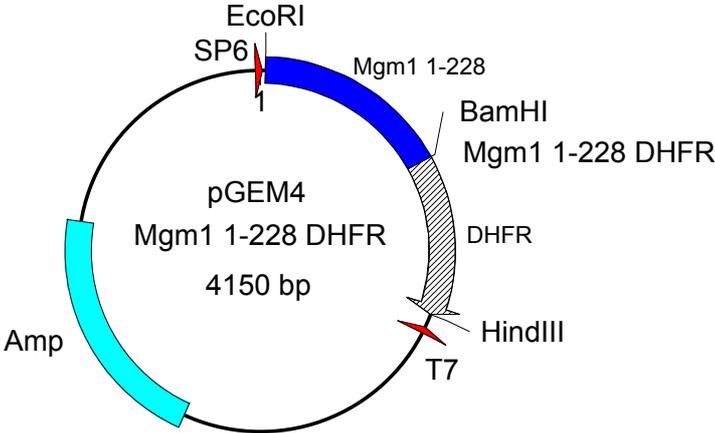


2 Material und Methoden

2.1.19.5 pGEM4-Mgm1₁₋₄₂₇



2.1.19.6 pGEM4-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR



2 Material und Methoden

2.1.20 Weitere verwendete Plasmide

2.1.20.1 pYX232-mtGFP und pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)

Diese Plasmide dienen zur Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien mit GFP. pYX232 verfügt über den konstitutiven *TPI*-Promotor (Triosephosphatisomerase) und pVT100U-mtGFP über den konstitutiven *ADH*-Promotor (Alkoholdehydrogenase). mtGFP ist ein Fusionsprotein aus der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 der F_0F_1 -ATPase aus *N. crassa* (Aminosäurereste 1-69, siehe oben). Dadurch wird GFP in die mitochondriale Matrix sortiert. Beide Plasmide liegen aufgrund des 2 μ Replikationsursprungs in hoher Kopienzahl vor.

2.2 Methoden der Hefegenetik

2.2.1 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Referenz
W303 α	MAT α , <i>ade2-1, his3-11,15 leu2,112 trp1 ura23-53, can1-100</i>	(Rothstein und Sherman, 1980)
D273-10 B	Wildtyp	ATCC, Nr. 24657
YPH499	MAT α , <i>ade3, his3(4), leu2, lys4, trp1, ura3</i>	(Sikorski und Hieter, 1989)
$\Delta mgm1/\Delta mgm1$	MAT α /MAT α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, MGM1 ::kanMX4/MGM1::kanMX4</i>	Research Genetics ¹
$\Delta pcp1/\Delta pcp1$	MAT α /MAT α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, PCP1 ::kanMX4/PCP1::kanMX4</i>	Research Genetics ¹
$\Delta mgm1/MGM1$	MAT α / α ; <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; <i>mgm1::kanMX4/MGM1</i></i>	Euroscarf
$\Delta pcp1/PCP1$	MAT α / α , <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; <i>pcp1::kanMX4/PCP1</i></i>	Euroscarf
GAL10-PCP1	MAT α , <i>ade2-1, his3-11,15 leu2,112 trp1 ura23-53, can1-100, GAL10-PCP1(HIS3)</i>	diese Arbeit
GAL10-MGM1	MAT α , <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2; GAL10-MGM1(HIS3)</i>	diese Arbeit

2 Material und Methoden

<i>GAL10-TIM14</i>	MATa, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, GAL10-TIM14(HIS3)</i>	(Mokranjac <i>et al.</i> , 2003b)
<i>GAL10-TIM22</i>	MATa, <i>pep4-3, prb1-1122, ura3-52, leu2-3, 112, reg1-501, gal1, GAL10TIM23(LEU2)</i>	(Sirrenberg <i>et al.</i> , 1996)
<i>GAL10-TIM44</i>	MATa, <i>pep4-3, prb1-1122, ura3-52, leu2-3, 112, reg1-501, gal1, GAL10-TIM44(LEU2)</i>	(Milisav <i>et al.</i> , 2001)
<i>GAL10-TIM17</i>	MATa, <i>pep4-3, prb1-1122, ura3-52, leu2-3, 112, reg1-501, gal1, GAL10-TIM17(LEU2)</i>	(Milisav <i>et al.</i> , 2001)
<i>GAL10-TIM16</i>	MATa, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2 GAL10-TIM16(HIS3)</i>	(Kozany <i>et al.</i> , 2004)
<i>GAL10-TIM23</i>	MATa, <i>pep4-3, prb1-1122, ura3-52, leu2-3, 112, reg1-501, gal1, GAL10-TIM23(LEU2)</i>	(Milisav <i>et al.</i> , 2001)
<i>GAL10-TIM50</i>	MATa, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, GAL10-TIM14(HIS3)</i>	(Mokranjac <i>et al.</i> , 2003a)
M28-82	MATa, <i>ade1, oli2</i>	(Foury und Tzagoloff, 1976)
SSC1	MAT α , <i>his4-713, lys2, ura3-52, Δtrp1, leu2-3,112</i>	(Gambill <i>et al.</i> , 1993)
<i>ssc1-2</i>	MAT α , <i>ade2-101, lys2, ura3-52, Δtrp1, leu2-3,112, ssc1-2(LEU2)</i>	(Gambill <i>et al.</i> , 1993)
<i>ssc1-3</i>	MAT α , <i>ade2-101, lys2, ura3-52, Δtrp1, leu2-3,112, ssc1-3(LEU2)</i>	(Gambill <i>et al.</i> , 1993)
Proteasedelestionsstämme: <i>Δprd1/Δprd1</i> <i>Δhsp78/Δhsp78</i> <i>Δyta6/Δyta6</i> <i>Δyta12/Δyta12</i> <i>Δyta10/Δyta10</i> <i>Δpim1/Δpim1</i> <i>Δimp1/Δimp1</i> <i>Δimp2/Δimp2</i> <i>Δmip1/Δmip1</i> <i>Δyme1/Δyme1</i> <i>Δynl123w/Δynl123w</i> <i>Δypl246c/Δypl246c</i>	alle: MATa/MAT α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0,</i>	Research Genetics ¹

Tabelle 9: verwendete Hefestämme: ¹Die homozygot diploiden Delestionsstämme entstammen der Delestionsstammssammlung der Firma Research Genetics. Der Stammhintergrund ist BY4743. Für eine detaillierte Beschreibung der Stammssammlung siehe Winzeler *et al.*, 1999 und http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/delestions3.html.

2 Material und Methoden

2.2.2 Methoden der Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefestämmen erfolgte im Wesentlichen nach Standardprotokollen (Guthrie und Fink, 1991). Hefestämme wurden in 15 % (v/v) Glycerollösung bei -80 °C gelagert. Vor der Überführung in Flüssigkultur wurden sie auf Agarplatten kultiviert. Als Standardmedien dienten YPD oder YPGal (fermentierbare Kohlenstoffquelle) und YPG oder Lactat-Medium (nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle) (vgl. 2.6). Bei der Selektion auf Plasmide mit bestimmten Markergenen wurden Selektivmedien mit den gleichen Kohlenstoffquellen verwendet, denen jedoch die entsprechenden Markeraminoacidsäuren oder Markerbasen fehlten. In Flüssigkultur wurden die Stämme bei 140 rpm und 30 °C geschüttelt. Die Glycerolstammkulturen wurden hergestellt, indem 1 ml einer Kultur ($OD_{578} \approx 1$) mit 1 ml sterilem 30 % (v/v) Glycerol gemischt wurden. Alternativ dazu wurden Zellen eines Stammes direkt von einer Agarplatte mit einer Impföse in sterilem 15 % (v/v) Glycerol suspendiert. Anschließend wurden die Glycerolstammkulturen bei -80 °C eingefroren.

2.2.3 Sporulation diploider Hefestämme

Diploide Hefestämme wurden sporuliert, indem sie zunächst auf einer normalen YPD- oder Selektivplatte angezogen wurden. Dann wurden sie auf eine nährstoffarme Sporulationsplatte (1 % (w/v) Kaliumacetat) überimpft, um sie zum Durchlaufen einer Meiose und zur Sporulation anzuregen. Die Sporulationsplatten wurden für 3–6 Tage bei 30 °C inkubiert, bis unter dem Lichtmikroskop charakteristische Vierergruppen von Sporen, so genannte Tetraden, sichtbar waren. Alle vier Sporen einer Tetrade sind Abkömmlinge derselben diploiden Zelle.

2.2.4 Tetradendisektion

Um die vier Sporen einer Tetrade zu trennen, wurden zunächst einige Zellen mit einer sterilen Pipettenspitze von den Sporulationsplatten abgekratzt und in 200 µl sterilem Wasser suspendiert. Durch Zugabe von 5 µl Zymolyase (10 mg/ml) und Inkubation für 3–5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellwände angegriffen, ohne sie komplett zu verdauen. Das ermöglicht eine Trennung der vier durch eine gemeinsame Zellwand umschlossenen Sporen einer Tetrade. 50 µl der Suspension wurden auf den Rand einer YPD-Platte aufgebracht. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die vier Sporen einer Tetrade getrennt und in einer Reihe an definierten Positionen auf der Platte abgelegt. Die Platte wurde für 3 Tage bei 30 °C inkubiert und die haploiden Kolonien, die aus den einzelnen Sporen hervorgingen, auf ihren Phänotyp untersucht.

2 Material und Methoden

2.2.5 Analyse des Wachstumsphänotyps auf fermentierbarer und nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle

Die Analyse des Wachstumsphänotyps erfolgte mit dem so genannten Tüpfel Test. Von einer exponentiell wachsenden Kultur wurde die OD_{578} bestimmt und ein Aliquot von 1 ml entnommen. Die Zellen wurden 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und in einer Menge sterilem Wasser aufgenommen, so dass die OD_{578} 0,7 betrug. Von dieser Suspension und aufeinander folgenden zehnfachen Verdünnungen (bis $1:10^5$) wurden jeweils 5 μ l in einer Reihe auf eine YPD- oder YPG-Platte getropft. Nach zwei (YPD) oder drei Tagen (YPG) Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der unterschiedlichen Verdünnungen ausgewertet.

2.2.6 Konstruktion eines *GAL10-PCP1*- und eines *GAL10-MGM1*-Stammes

Für die Konstruktion eines Stammes, in dem *PCP1* unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors exprimiert wird, wurde der *GAL10*-Promotor zusammen mit dem *HIS3* Marker aus pTL26 mit den Primern *Pcp1 Gal up* und *Pcp1 Gal dn* amplifiziert (Lafontaine und Tollervey, 1996). Die beiden Primer enthalten homologe Regionen zum endogenen Promotor von *PCP1* und dem Beginn des offenen Leserahmens von *PCP1*. Nach Transformation von *S. cerevisiae* W303 α mit dem PCR-Produkt wurde durch homologe Rekombination der endogene Promotor von *PCP1* durch den *GAL10*-Promotor ersetzt (Wach *et al.*, 1994). Klone, in denen die homologe Rekombination erfolgt ist, wurden auf SD-Medium ohne Histidin selektioniert und die korrekte Insertion des *GAL10*-Promotors im Genom durch eine PCR mit den Primern *Pcp1 rec check* und *Pcp1 seq1* überprüft. Dabei wurde das erwartete PCR-Produkt von ca. 3000 bp Länge erhalten.

Der *GAL10-MGM1*-Stamm wurde auf die gleiche Weise hergestellt. Bei der Amplifikation des *GAL10*-Promotors zusammen mit dem *HIS3* Marker aus pTL26 wurden jedoch die Primer *Mgm1 Gal up* und *Mgm1 Gal dn* verwendet, die homologe Regionen zur 5'-untranslatierten Region und zum offenen Leserahmen von *MGM1* enthielten. Nach der Transformation in den Wildtyp-Stamm YPH499 wurden die auf Selektivmedium erhaltenen Klone durch eine PCR mit den Primern *Mgm1 del check* und *Mgm1 seq7* überprüft. Es wurde das erwartete PCR-Produkt von ca. 3300 bp Länge erhalten.

2 Material und Methoden

Primer	Sequenz
<i>Pcp1 Gal up</i>	5'- ATG TCA CCC TAA AAC ATC TGT ACG TGT TTA TAT AGA TAT TTA AAG CAA TA CTC TTG GCC TCC TCT AGT-3'
<i>Pcp1 Gal dn</i>	5'- ATT CTT GTA GCA GGT CGA AGA CCG AGC ATA ACA GAG CTT ACA CCT GAC AT CGA ATT CCT TGA ATT TTC AAA-3'
<i>Pcp1 rec check</i>	5'-CCT CGG AAG AGA AGT CCA ACC-3'
<i>Pcp1 seq1</i>	5'-AAG GGT GGA ACG TGC TCG AAC-3'
<i>Mgm1 Gal up</i>	5'-CTG CAA AAG ACT TCG CAA AGA ACA TAT GGC GGG GTT TAT CCT TGA CTC TTG GCC TCC TCT AG-3'
<i>Mgm1 Gal dn</i>	5'-ATA GTT CGC CAC TCT TGG GAT GGC CCT TAA TGA AGT AGA ATT ACT CAT CGA ATT CCT TGA ATT TTC AAA-3'
<i>Mgm1 del check</i>	5'-AAA AGA GGT AGT ACA CGC CG-3'
<i>Mgm1 seq7</i>	5'-GTT TCC ATG ACC ACC GTC-3'

Tabelle 10: Primer für die Herstellung bzw. Überprüfung des *GAL10-PCP1*-Stammes und des *GAL10-MGM1*-Stammes

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem Ölimmersionsobjektiv ausgestattet war (Zeiss Plan Neofluar, 100X, numerische Apertur 1,3). Digitale Aufnahmen der untersuchten Zellen wurden mit einer CCD-Kamera (Modell 1.1.0, Diagnostic Instruments, USA) bei Raumtemperatur gemacht. Mikroskop und Kamera wurden durch die MetaView 3.6a Software gesteuert (Universal Image Corporation, USA). Für die Analyse von mtGFP wurde Filtersatz No. 09 verwendet (Anregung: 450 bis 490 nm, Emission: >515 nm) (Heim und Tsien, 1996). Für Rhodamin B-Hexylester wurde Filtersatz No. 15 verwendet (Anregung: 534 bis 558 nm, Emission: >590 nm) (Matz *et al.*, 1999). Die Färbungen mit DAPI wurden mit Filtersatz No. 01 ausgewertet (Anregung: 353 bis 377 nm, Emission: >397 nm) (vgl. 2.3.3). Quantitatives Auszählen verschiedener Phänotypen erfolgte ohne Kenntnis der Identität des untersuchten Stammes während der Analyse.

2.3.2 Fluoreszenzfärbung von Mitochondrien mit Rhodamin B-Hexylester

Eine 1 mM Stammlösung des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin B-Hexylester in DMSO wurde 1:100 in Wasser verdünnt. 10 µl dieser Lösung wurden zu 1 ml der zu untersuchenden exponentiell wachsenden Kultur gegeben und für 5 min bei 30 °C geschüttelt, bevor die Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert wurde.

2 Material und Methoden

2.3.3 Färbung von DNA mit DAPI

Um Hefezellen auf die Gegenwart mitochondrialer DNA zu untersuchen, wurden sie mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt (McConnell und Yaffe, 1992; Williamson und Fennell, 1979). Dazu wurden die Zellen für 1 min bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Es wurde 1 µl einer DAPI-Stammlösung (1 mg/ml in Wasser) zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur gefärbt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und schließlich in 1 ml PBS aufgenommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.3.4 Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus *S. cerevisiae* durch alkalische Lyse

1–1,5 ml einer Hefekultur ($OD_{578} \approx 1$) wurden für 1 min bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 250 µl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 suspendiert und mit 50 µl Aufschlusspuffer (1,85 M NaOH; 7,4 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 20 mM PMSF) versetzt (modifiziert nach Yaffe und Schatz, 1984). Es wurde gut gemischt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend die Proteine mit 220 µl 72 % (w/v) TCA gefällt. Nach erneuter Inkubation für 15 min auf Eis wurde für 15 min bei 20000 g zentrifugiert. Die Niederschläge wurden mit 1 ml Aceton (-20 °C) gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Schließlich wurden die Präzipitate in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen.

2.3.5 Isolation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Anzucht der Hefestämme für die Präparation von Mitochondrien von Wildtyp-Stämmen (D273-10B, W303α) erfolgte auf Lactat-Medium. Für andere Hefestämme, die Plasmide enthielten, wurden die entsprechenden Selektivmedien mit nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle eingesetzt. Nur Stämme, die atmungsdefizient waren und daher nicht auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle angezogen werden konnten, wurden die entsprechenden Medien mit fermentierbarer Kohlenstoffquelle benutzt.

Von einer Agarplatte wurde eine 50 ml Vorkultur angeimpft und bei 30 °C geschüttelt. Die Vorkultur wurde mindestens dreimal auf eine OD_{578} von ungefähr 0,05 verdünnt und dabei schrittweise das Gesamtvolumen der Kultur erhöht. Ein Übergang der Kultur in die stationäre Phase wurde vermieden ($OD_{578} < 1,5$). Schließlich wurde die Hauptkultur (5-10 l) auf eine OD_{578} von 0,05-0,2 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{578} von 1-1,5 geschüttelt.

Die eigentliche Präparation der Mitochondrien erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von Daum (Daum *et al.*, 1982). Zunächst wurden die Hefezellen durch

2 Material und Methoden

Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm in einem JLA-8.1000-Rotor geerntet, anschließend mit 300 ml Wasser gewaschen und in einen JA10 Zentrifugenbecher überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm im JA10-Rotor wurde das Nassgewicht der Zellen bestimmt und die Zellen mit einer Endkonzentration von 0,5 g Nassgewicht/ml in DTT-Puffer resuspendiert (100 mM Tris/SO₄ pH 9,4; 10 mM DTT). Die Suspension wurde 15 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und die Zellen 5 min bei 5000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde einmal mit 100 ml Sorbitolpuffer (1,2 M Sorbitol; 20 mM KP; pH 7,4) gewaschen und in Sorbitolpuffer auf eine Konzentration von 0,15 g Nassgewicht/ml aufgenommen. Pro Gramm Nassgewicht wurden 6 mg Zymolyase zugegeben, die zuvor in 1 ml Sorbitolpuffer aufgelöst wurden, und die Zellen wurden für 30-60 min bei 30 °C inkubiert. Dabei wird die Zellwand verdaut und es bilden sich Sphaeroblasten, die durch das Sorbitol im Puffer osmotisch stabilisiert sind. Zur Kontrolle der Sphaeroblastisierung wurden 20 µl der Suspension in eine Küvette gegeben und mit 1 ml deionisiertem Wasser versetzt. Unmittelbar danach wurde die OD₅₇₈ verfolgt. Eine rasche Abnahme der OD₅₇₈ auf ca. 10-20 % des ursprünglichen Wertes durch osmotische Lyse der Sphaeroblasten zeigt eine gute Sphaeroblastisierung an.

Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Nach dem Zymolyaseverdau wurden die Sphaeroblasten für 5 min bei 5000 rpm im JA10-Rotor sedimentiert und anschließend in 1 ml Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES/KOH; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,2 % (w/v) fettsäurefreies BSA; pH 7,4) pro 0,15 g Nassgewicht aufgenommen. Die Sphaeroblasten wurden mit einem Dounce-Homogenisator 30 Mal homogenisiert. Danach wurde eine fraktionierte Zentrifugation durchgeführt. Zunächst wurden große Zelltrümmer, nicht aufgeschlossene Zellen und Zellkerne durch zweimalige Zentrifugation bei 4000 rpm im JA20-Rotor bei 4 °C entfernt. Aus dem Überstand wurden durch Zentrifugation bei 12000 rpm für 12 min im JA20-Rotor bei 4 °C die Mitochondrien sedimentiert. Zur Erhöhung der Reinheit der Mitochondrienpräparation wurde das mitochondriale Sediment in HS-Puffer (20 mM HEPES/KOH; 0,6 M Sorbitol; pH 7,4) resuspendiert und die Suspension nochmals zentrifugiert (4000 rpm; 5 min; JA20-Rotor). Aus dem Überstand wurden die Mitochondrien erneut durch Zentrifugation für 12 min bei 12000 rpm und 4 °C im JA20-Rotor isoliert. Die Mitochondrien wurden in 0,5-2 ml HS-Puffer aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt und mit HS-Puffer auf 10 mg/ml eingestellt. Die Mitochondrien wurden in Aliquots von 100 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.6 Präparation von Mitoplasten durch osmotische Schwellung

Um die submitochondriale Lokalisierung endogener oder *in vitro* importierter mitochondrialer Proteine zu untersuchen, wurde die mitochondriale Außenmembran selektiv durch osmotisches Schwellen disruptiert. Die Mitochondrien wurden (gegebenenfalls nach dem *in vitro*-Import) mit HS-Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 0,6 M Sorbitol) auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und mit kaltem H-Puffer (20 mM HEPES/KOH; pH 7,6) zehnfach verdünnt. Normalerweise wurden die Mitoplasten mit 20-100 µg/ml Proteinase K oder Trypsin für 25 min auf Eis inkubiert, um die vom Intermembranraum aus zugänglichen Proteine zu verdauen. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 2 mM PMSF beendet. Es wurde nochmals 5 min auf Eis inkubiert und die Mitoplasten durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 rpm und 4 °C reisoliert. Der Überstand wurde verworfen, einmal mit 1 mM PMSF in HS-Puffer gewaschen und die Mitoplasten in HS-Puffer aufgenommen. Die Mitoplasten wurden mit TCA gefällt, um die Proteinase K oder das Trypsin vollständig zu inaktivieren und weitere Proteolyse nach der Lyse der Mitoplasten zu vermeiden. Schließlich wurden sie in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen und durch SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran analysiert. Um die Disruption der äußeren und die Integrität der inneren Membran zu überprüfen, wurden Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Intermembranraumproteine wie Cytochrom *c*-Peroxidase, Proteine der mitochondrialen Innenmembran, wie Oxa1 und den ADP/ATP-Transporter, und gegen das Matrixprotein Mge1 durchgeführt.

2.3.7 Salzextraktion und alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen

Die Membranassoziation von Proteinen wurde durch Salzextraktion und alkalische Extraktion untersucht (Fujiki *et al.*, 1982). Dazu wurden zunächst durch hypoosmotisches Schwellen Mitoplasten erzeugt (vgl. 2.3.6), normalerweise jedoch, ohne diese mit Protease zu behandeln. Die Mitoplasten wurden dann durch Zugabe des gleichen Volumens an 2 M NaCl in H-Puffer (Salzextraktion) oder 0,2 M Na₂CO₃ (alkalische Extraktion) für 30 min unter mehrmaligem Vortexen bei 4 °C extrahiert. Die extrahierten Membranen wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 2 °C und 45000 rpm in einem TLA45-Rotor in einer Beckman Optima Ultrazentrifuge sedimentiert. Das Membransediment wurde in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen und der Überstand mit TCA gefällt. Nach der alkalischen Extraktion wurde eine Endkonzentration von 24 % (w/v) TCA eingestellt, um den pH-Wert der alkalischen Ausgangslösung weit genug abzusenken. Gleiche Anteile der Membranfraktionen und der löslichen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE, Transfer auf eine Nitro-

2 Material und Methoden

zellulosemembran und Immundekoration analysiert. Die Extraktionseffizienz wurde durch Immundekoration mit Antikörpern gegen unterschiedlich stark in der Innenmembran verankerte integrale Membranproteine wie den ADP/ATP-Transporter oder D-Lactatdehydrogenase kontrolliert.

2.3.8 *In vitro*-Import von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien

Der Import von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen *in vitro* erfolgte in Importpuffer (600 mM Sorbitol; 50 mM HEPES/KOH; 80 mM KCl; 10 mM Magnesiumacetat; 2,5 mM EDTA; 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 5 mM NADH; 2,5 mM ATP; 2,5 mM Malat; 2,5 mM Succinat; pH 7,2). Isolierte Mitochondrien wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Der Ansatz wurde 3 min bei RT vorinkubiert, bevor die Importreaktion durch Zugabe des Retikulozytenlysats mit dem radioaktiv markierten Vorstufenprotein in einer Endkonzentration von 1-2 % (v/v) des Gesamtvolumens gestartet wurde. Die Reaktionsansätze wurden für 5 min bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht importierte Vorstufenproteine wurden durch zehnfache Verdünnung mit HS-Puffer und Zugabe von Proteinase K (10 mg/ml) oder Trypsin (10 mg/ml) auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml 25 min auf Eis verdaut. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 0,2 M PMSF auf eine Endkonzentration von 2 mM beendet. Es wurde nochmals für 5 min auf Eis inkubiert und die Mitochondrien durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C (Sigma 3K12) reisoliert. Der Überstand wurde verworfen, die Mitochondrien einmal mit 1 mM PMSF in HS-Puffer gewaschen und in HS-Puffer aufgenommen. Die Mitochondrien wurden mit TCA gefällt, um eingesetzte Protease vollständig zu inaktivieren und weitere Proteolyse nach der Lyse der Mitochondrien zu vermeiden. Schließlich wurden sie in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen und durch SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran analysiert. Zur Kontrolle der Integrität der mitochondrialen Außenmembran erfolgte die Immundekoration auch mit einem Antikörper gegen das Intermembranraumprotein Ccp1 oder die Innenmembranproteine Oxa1 oder AAC2.

2.3.8.1 Zerstörung des Membranpotentials durch Carbonylcyanid-m-chloro-phenylhydrazon (CCCP)

Das Membranpotential über die mitochondriale Innenmembran wurde durch Zugabe von CCCP in einer Endkonzentration von 50 µM zerstört. CCCP kann die Membran sowohl in protoniertem als auch in deprotoniertem Zustand passieren und transportiert so Protonen entlang des Protonengradienten über die Innenmembran.

2 Material und Methoden

2.3.8.2 ATP-Depletion in der mitochondrialen Matrix mit Apyrase/Oligomycin/Atractylosid

Für die Depletion von ATP aus der mitochondrialen Matrix wurden isolierte Mitochondrien vor der Importreaktion mit 40 U/ml Apyrase und 10 µg/ml Oligomycin behandelt (Stuart *et al.*, 1994). Apyrase führt zur Hydrolyse von ATP außerhalb der Mitochondrien. Der Export von ATP aus der mitochondrialen Matrix, welcher durch den ADP/ATP-Transporter in der mitochondrialen Innenmembran vermittelt wird, und die gleichzeitige Hemmung der Neusynthese von ATP durch Oligomycin führen auch in der mitochondrialen Matrix zur ATP-Verarmung. Nach Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur wurde der ADP/ATP-Transporter durch Zugabe von 5 µM Atractylosid und fünfminütige Inkubation bei 4 °C blockiert, um unter Importbedingungen einen Re-Import von ATP in die Matrix zu vermeiden. Die Effizienz der ATP-Depletion wurde durch gleichzeitigen Import des Vorstufenproteins pSu9₁₋₆₉-DHFR kontrolliert, für dessen Import eine ATP-Abhängigkeit gezeigt wurde (Gambill *et al.*, 1993).

2.3.9 Puls-Markierung von Hefezellen

Die Hefestämme wurden auf Selektivmedium mit den entsprechenden Auxotrophie-markern und Galaktose als Kohlenstoffquelle angezogen. Die Kulturen wurden mindestens zweimal passagiert, bevor die Hauptkultur angeimpft wurde. Die Hauptkultur wurde auf dem gleichen Medium bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bis 1 angezogen. 45 OD-Einheiten Zellen wurden 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und in 15 ml des gleichen vorgewärmten Mediums aufgenommen. Durch Zugabe von 75 µl [³⁵S]-Methionin (ca. 150 µCi) wurde mit der Markierung begonnen. Nach 15 min wurde die Markierung durch Zugabe von Cycloheximid (Stammlösung 7,5 mg/ml) auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml und Zugabe von 0,25 M nicht markiertem Methionin auf eine Endkonzentration von 10 mM beendet. Sofort und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ende der Markierung wurden 1 ml Aliquots entnommen. Die markierten Zellen wurden 2 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die weitere Untersuchung der verschiedenen Proben wurden Gesamtzellextrakte präpariert (vgl. 2.3.4). Nach der TCA-Fällung wurden die Proben jedoch nicht in Lämmli-Probenauftragspuffer, sondern in 75 µl SDS-Puffer (1 % (w/v) SDS; 0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 5 mM EDTA) aufgenommen. Die Proben wurden zwanzigfach in IP-Puffer verdünnt (1 % (w/v) Triton X-100; 300 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,5 mM PMSF). Nach Zentrifugation für 20 min bei 14000 g wurde der Überstand auf mit den entsprechenden Antikörpern beladene und auf den gleichen Puffer äquilibrierte Protein A-Sepharose geladen und so die markierten Proteine immunpräzipitiert (vgl. 2.5.4).

2 Material und Methoden

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 *In vitro*-Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine

Um mit [³⁵S]-Methionin markierte Vorstufenproteine für Importreaktionen in isolierte Mitochondrien zu synthetisieren, wurden die in das Plasmid pGEM4 klonierten Konstrukte mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase in mRNA transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin translatiert (Pelham und Jackson, 1976).

2.4.1.1 Transkription

Zu 40 µl fünffach konzentriertem Transkriptionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,9; 30 mM Magnesiumacetat; 10 mM Spermidin; 50 mM NaCl; 500 µg/ml BSA), je 10 µl 10 mM ATP, CTP und UTP, 10 µl 1 mM GTP, 20 µl 100 mM DTT, 10 µl 2,5 mM m⁷G(5')ppp(5')G und 4,5 µl RNasin (40 U/µl, Promega) wurden 10-20 µg DNA und steriles Wasser auf 200 µl zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion mit 1,5 µl SP6-RNA-Polymerase (25 U/µl) gestartet und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 20 µl 10 M Lithiumchlorid und 600 µl Ethanol (-20 °C) wurde die RNA durch eine 30minütige Inkubation bei -80 °C und eine ebenfalls 30minütige Zentrifugation bei 20000 g und 2 °C isoliert. Der Überstand wurde abgenommen, die RNA bei 30 °C vorsichtig getrocknet und in 50 µl Wasser und 1 µl RNasin (40 U/µl) gelöst. Die RNA wurde in Portionen zu je 20 µl bei -80 °C eingefroren.

2.4.1.2 Translation

Für die Translation von Vorstufenproteinen *in vitro* wurden 50 µl Kaninchen-Retikulozytenlysate (Promega), 1,5 µl RNasin (40 U/µl), 1,2 µl Aminosäurengemisch (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin je 1 mM), 10 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) und 20 µl RNA gemischt und das Volumen mit deionisiertem sterilem Wasser auf 100 µl ergänzt. Der Ansatz wurde 60 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 8 µl 0,2 M Methionin und 21 µl 1,5 M Saccharose zugegeben, um den weiteren Einbau von radioaktivem Methionin zu verhindern. Durch eine 30minütige Zentrifugation des Translationsansatzes bei 100000 g und 2 °C wurden an Ribosomen gebundene, unvollständig translatierte Polypeptidketten entfernt. Der Translationsansatz wurde in Aliquots von 10 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2 Material und Methoden

2.4.1.3 Gekoppelte Transkription und Translation (Promega, TNT-Lysat)

Alternativ zur separaten Transkription und Translation wurde ein gekoppeltes Transkriptions- und Translationssystem (TNT-Lysat, Promega) für die *in vitro*-Synthese von Vorstufenproteinen eingesetzt. Dazu wurden ca. 1 µg DNA, 2 µl TNT-Reaktionspuffer (Promega), 1 µl Aminosäurengemisch (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin je 1 mM), 1 µl RNasin (40 U/µl), 1 µl TNT SP6-RNA-Polymerase (Promega) und 2 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) mit 25 µl TNT-Kaninchenretikulozytenlysat (Promega) versetzt und das Volumen mit sterilem deionisiertem Wasser auf 50 µl ergänzt. Der Ansatz wurde bei 30 °C für 90 min inkubiert. Der Einbau des radioaktiven Methionins wurde durch Zugabe von 2,5 µl 0,2 M Methionin beendet. Es wurde nochmals für 5 min bei 30 °C inkubiert und 30 min bei 100000 g und 2 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Aliquots von 8 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurde das „Bio-Rad-Proteinassay“-Reagenz (Biorad) 1:5 mit Wasser verdünnt und 1 ml zu den Proben gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Anhand einer Eichkurve mit dem Protein IgG konnte die Proteinkonzentration in den Proben berechnet werden.

2.4.3 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine wurden durch Zugabe von 72 % (w/v) TCA auf eine Endkonzentration von 12 % (w/v) ausgefällt. Nach mindestens 15 min Inkubation auf Eis wurden die gefällten Proteine für 15 min bei 20000 g und 4 °C abzentrifugiert und einmal mit Aceton (-20 °C) gewaschen. Die Präzipitate wurden bei 37 °C getrocknet und in SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen.

2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli (Laemmli, 1970). Dazu wurden Glasplatten von 160 x140 mm und Abstandshalter von 1 mm Dicke verwendet. Die Endkonzentrationen von Acrylamid bzw. Bisacrylamid betragen je nach Molekulargewicht der untersuchten Proteine 14 % (w/v) bzw. 0,23 % (w/v) oder 10 % (w/v) bzw. 0,17 % (w/v). Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA für 2 h

2 Material und Methoden

30 min. Anschließend wurden die Proteine in den Gelen mit Coomassie gefärbt oder auf Nitrozellulose transferiert.

Trenngellösung: 14 % (w/v) Acrylamid/0,23 % (w/v) Bisacrylamid (für Proteine mit einer molekularen Masse bis ca. 60 kD)
10 % (w/v) Acrylamid/0,17 % (w/v) Bisacrylamid (für Proteine mit einer molekularen Masse über 60 kD)
375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,03 % (v/v) TEMED.

Die Trenngellösung wurde auch für das Bodengel benutzt.

Sammelgellösung: 5 % (w/v) Acrylamid; 0,08 % (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.

10x-Laufpuffer: 0,5 M Tris/HCl; pH 8,3; 3,8 M Glycin; 1 % (w/v) SDS.

2.4.5 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF-Membranen (Western-Blot)

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, wurden sie nach dem Halbtrockenverfahren auf Nitrozellulosemembranen oder PVDF-Membranen transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Gel, Nitrozellulosemembran und mehrere Lagen Whatman Filterpapier wurden mit Blot-Puffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,02 % (w/v) SDS) getränkt. PVDF-Membranen wurden davor zusätzlich kurz in Methanol geschwenkt. Drei Bögen des Filterpapiers wurden auf die untere Graphitelektrode (Anode) gelegt. Die Nitrozellulosemembran wurde auf dem getränkten Filterpapier und auf der Membran wiederum das Gel platziert. Das Gel wurde erst mit drei Lagen Filterpapier und dann mit der oberen Graphitelektrode (Kathode) abgedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 h 40 min bei 200 mA. Proteine mit weniger als 20 kD wurden für 1 h bei 100 mA transferiert. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran anschließend mit entsalztem Wasser gewaschen und in Ponceau S-Färbelösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA) geschwenkt. Überschüssige Färbelösung wurde durch Waschen mit entsalztem Wasser entfernt, so dass die gefärbten Proteinbanden sichtbar wurden.

2.4.6 Autoradiographie und densitometrische Quantifizierung

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran durch Autoradiographie detektiert und durch Densitometrie oder Phosphorimaging quantifiziert. Dazu wurden die Nitrozellulosemembranen getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Pharmacia) eingelesen und ihre Intensität mit dem Programm Image Master 1D (Pharmacia) densitometrisch bestimmt. Alternativ dazu wurden die Nitrozellulosemembranen nach dem Trocknen direkt auf Phosphorimaging-Platten exponiert. Die Signale wurden mit einem Phosphorimager der Firma Fuji (FLA 3000) eingelesen und mit dem Programm AIDA (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland) quantifiziert.

2.4.7 N-terminale Proteinsequenzierung durch Edman-Abbau

Die N-terminale Sequenzierung von Proteinen erfolgte durch Edman-Abbau. Dazu wurden die zu analysierenden Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit kolloidalem Coomassie gefärbt (GelCode[®], Pierce), mit deionisiertem Wasser gewaschen und getrocknet. Zu analysierende Banden wurden für die Sequenzierung ausgeschnitten. Die Sequenzierreaktion erfolgte durch die Firma TopLab GmbH (Martinsried, Deutschland).

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Erzeugung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung spezifischer gegen Mgm1 gerichteter Antiseren wurden chemisch synthetisierte Peptide als Antigene eingesetzt. Für ein polyklonales Antiserum gegen den C-Terminus von Mgm1 wurde ein Peptid mit der Sequenz H₂N-CKKSYKGVSKNL-COOH verwendet, welches den Aminosäureresten 892-902 von Mgm1 entspricht. Als internes Epitop von Mgm1 diente das Peptid H₂N-CSHQFEKAYFKENKK-COOH, entsprechend den Aminosäureresten 484-497 von Mgm1. Beide Peptide tragen am N-Terminus einen zusätzlichen Cystein-Rest für die Kopplung an eine Affinitätsmatrix. Die Peptidsynthese, die Kopplung des Peptids an *Keyhole Limpet* Hämocyanin und die Immunisierung der Kaninchen erfolgte durch die Firma Pineda Antikörperservice (Berlin, Deutschland).

2 Material und Methoden

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

Für die Affinitätsreinigung von Peptidantikörpern wurden die immunogenen Peptide mit einem zusätzlichen Cysteinrest am N-Terminus synthetisiert. Dieser Cysteinrest wurde für die Kopplung der Peptide an die Affinitätsmatrix genutzt. Sulfolink Coupling Gel® (Pierce) besitzt zu diesem Zweck Iodacetylgruppen, die über einen 12 Atome langen Arm an die Matrix gebunden sind. Eine Säule mit 1 ml Gelbettvolumen an Sulfolink Coupling Gel® wurde mit 6 Säulenvolumina Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; pH 8,5) äquilibriert. 10 mg des zu koppelnden Peptids wurden in 1 ml Bindungspuffer gelöst und das äquilibrierte Säulenmaterial darin suspendiert. Die Kopplung erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Kopplungslösung entfernt und die Säule mit 3 Säulenvolumina Kopplungspuffer gewaschen. Um Bindungsstellen abzusättigen, die während der Kopplungsreaktion nicht reagiert haben, wurde das Säulenmaterial nochmals in 1 ml 50 mM Cystein in Kopplungspuffer resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur wurde die überschüssige Lösung abgelassen und die Säule mit 16 Säulenvolumina 1 M NaCl und 16 Säulenvolumina 0,05 % (w/v) Natriumazid gewaschen. Schließlich wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl pH 7,6 mit 0,02 % (w/v) Natriumazid gewaschen und in dieser Lösung bei 4 °C gelagert.

2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Die Affinitätssäule mit dem gekoppelten Peptid wurde zunächst nacheinander mit je 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM Glycin/HCl pH 2,5, 10 mM Tris/HCl pH 8,8 und 100 mM NaP_i pH 11,5 gewaschen, um eventuell vorhandene Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule wieder mit 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 äquilibriert. 4 ml des Antiserums wurden mit 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 und 70 µl 0,2 M PMSF versetzt und bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min mit einer Peristaltikpumpe dreimal über die Säule gepumpt. Es wurde je zweimal mit 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 und 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,6 und 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte in drei Schritten bei verschiedenen pH-Werten. Zunächst wurde mit 10 ml 100 mM Citratpuffer pH 4, dann mit 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5 und schließlich mit 10 ml 100 mM NaP_i pH 11,5 eluiert. Es wurden jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt und der pH-Wert schnell mit 1 M Tris-Base (1. und 2. Elution) bzw. 1 M Glycin/HCl pH 2,5 (3. Elution) neutralisiert. Die Proteinkonzentration in den Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt (vgl. 2.4.2). Der Antikörper eluierte in den meisten Fällen in den Fraktionen 2-4 der Glycin/HCl pH 2,5 Elution. Diese Fraktionen wurden vereinigt, in 100 µl Aliquots portioniert und bei -20 °C gelagert. Die Proteinkonzentration betrug in den meisten Fällen zwischen 0,5 und 1 mg/ml. Schließlich wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl pH 7,6 mit 0,02 % (w/v)

2 Material und Methoden

Natriumazid gewaschen und in dieser Lösung bis zur erneuten Benutzung bei 4 °C gelagert.

2.5.4 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation aus mitochondrialem Lysat von 10 mg isolierten Mitochondrien wurden 500 µl Protein A–Sephrose dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Dabei wurde für jeden Waschschrift die Protein A-Sephrose durch Zentrifugation für 2 min bei 4000 g sedimentiert und der Überstand abgenommen. Danach wurden ca. 200 µg affinitätsgereinigter Antikörper gegen das C-terminale Peptid in 1 ml PBS auf die Protein A–Sephrose gegeben und eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Es wurde erneut zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, um eventuell nicht gebundene Antikörper zu entfernen und anschließend mit zweimal 1 ml Lysepuffer (10 mM Tris/HCl; 0,5 % (w/v) Triton X-100; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM PMSF; pH 7,6) äquilibriert. 10 mg Mitochondrien wurden bei 4 °C in 1 ml Lysepuffer für 15 Minuten lysiert. Unvollständig solubilisierte Membranen und Proteinaggregate wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 g und 4 °C sedimentiert und der Überstand auf die mit Antikörpern beladene und mit Lysepuffer äquilibrierte Protein A–Sephrose gegeben. Nach erneuter zweistündiger Inkubation bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen (nicht gebundenes Protein), dreimal mit 1 ml Lysepuffer und einmal mit PBS gewaschen und schließlich das gebundene Protein mit 50 µl Lämmli-Probenauftragspuffer eluiert. Gebundenes und nicht gebundenes Protein wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot analysiert.

2.5.5 Immundekoration von Western-Blots

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Nitrozellulosemembranen nach dem Proteintransfer bei RT 60 min in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer geschwenkt. Es folgte eine 60minütige Immundekoration mit einem spezifischen Antiserum oder einem affinitätsgereinigten Antikörper, das je nach Titer zwischen 1:250 und 1:5000 in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS verdünnt war. Danach wurden die Membranen 3 mal 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen Immunglobulin G von Kaninchen (oder Maus) gerichtete Antikörper verwendet, an die Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war (Ziege anti-Kaninchen-HRP Konjugat oder Ziege anti-Maus-HRP Konjugat, Biorad). Diese Antikörper wurden 1:10 000 (Ziege anti-Kaninchen) oder 1:5000 (Ziege anti-Maus) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer verdünnt und die Membranen 60 min mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen und die gebundene Peroxidase mit einem auf Chemolumineszenz

2 Material und Methoden

basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham Biosciences) nachgewiesen. Dafür wurden die beiden Lösungen ECL1 (100 mM Tris/HCl; 0,044 % (w/v) Luminol; 0,0066 % (w/v) p-Coumarinsäure; pH 8,5) und ECL2 (100 mM Tris/HCl; 0,024 % (w/v) H₂O₂; pH 8,5) unmittelbar vor der Reaktion im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membranen wurden mit der Lumineszenz-Lösung inkubiert und zwischen 1 s und 10 min auf Röntgenfilmen (Fuji) exponiert.

2.6 Puffer und Medien

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid;
Für LB^{Amp} wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

LB-Platten: LB-Medium; 1,5 % (w/v) Agar
Für LB^{Amp}-Platten wurden nach dem Autoklavieren 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

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

Sporulationsplatten: 1 % (w/v) Kaliumacetat; 2 % (w/v) Agar

2 Material und Methoden

PBS-Puffer:	0,9 % (w/v) NaCl; 0,2 % (w/v) Kaliumchlorid; 6,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat; pH 7,4
TBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM Natriumchlorid
TE-Puffer:	1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 8,0
YP-Medium:	1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Bacto-Pepton; mit HCl auf pH 5 einstellen; 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 6 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.

2.7 Chemikalien und Geräte

2.7.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert (München)	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
Amersham-Biosciences (Freiburg)	ECL-Immunoblot-Detektionssystem, Kaninchen-Retikulozytenlysat
ARK-Sigma (Darmstadt)	Oligonukleotide
Biorad (München)	Proteinstandard und Proteinreagenzien zur Proteinbestimmung, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-IgG
Boehringer (Mannheim)	Desoxynukleosidtriphosphate, Expand PCR-Kit, Ethidiumbromid, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, ATP, Proteinase K, Restriktionsenzyme, Tris
Braun (Melsungen)	Kanülen, Spritzen

2 Material und Methoden

DIFCO (Detroit, USA)	Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Hefeextrakt, <i>Yeast Nitrogen Base</i>
EUROSCARF (Frankfurt)	Hefestämme (vgl. Tabelle 9)
Fuji (Tokyo, Japan)	Super RX Fuji Medical X-Ray Film 100 MF 13 x 18 cm
Genomed (Bad Oeynhausen)	Jetstar®-Reagenzien und Säulen zur Plasmidisolierung
Gerbu (Gaiberg)	Acrylamid, Ampicillin, DTT, NADH
GIBCO-BRL (Eggenstein)	Agarose, T4-DNA-Ligase, Restriktionsenzyme
GL BioTech (Hude)	GL taq PCR-Kit
ICN Pharmaceuticals (Eschwege)	[³⁵ S]-Methionin (1100 bis 1400 Ci/mmol), Tris
Invitrogen (Groningen)	DH5 α , Elektroporationsküvetten, See Blue Plus 2 Prestained Protein Standard
Kodak (München)	Biomax MR Kodak TR-1 Film 13 x 18 cm
Metabion (Martinsried)	Oligonukleotide
Molecular Probes (Eugene, USA)	Rhodamin B-Hexylester
Nestlé-Alete (München)	Magermilchpulver
New England Biolabs (Schwalbach)	Restriktionsenzyme und 10 x Puffer für Restriktionsenzyme
Pall Life Sciences (New York, USA)	Nanosep Centrifugal Devices
peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)	peqGOLD Proteinmarker, Molekulargewichts-Standard für SDS-PAGE
Pierce (Rockford, USA)	Sulfolink® Coupling Gel, Slide-A-Lyzer Dialysis Unit, Quervernetzungsreagenzien DSG, DSS und MBS, GelCode® Kolloidaler Commassie Färber
Pineda Antikörper Service (Berlin)	Antikörper gegen C-terminales und internes Epitop von Mgm1 (vgl. 2.5.1)
Promega (Heidelberg)	RNasin, TNT Coupled Reticulocyte System, pGEM4-Vektor, Gel Drying Film, <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
Qiagen (Hilden)	QIAquick Gel Extraction Kit®, Ni-NTA Agarose
R&D Systems (Abingdon, UK)	pYX-Vektoren
Research Genetics (Huntsville, USA)	homozygot diploide Deletions-Hefestammsammlung (vgl. Tabelle 9)
Riedel de Haen (Seelze)	Kaliumacetat
Sarstedt (Bad Homburg)	Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Röhrchen
Schleicher & Schüll (Kassel)	Protran Nitrozellulosemembranen BA83, PVDF-Membran, Whatman Filterpapiere, Faltenfilter, Sterilfilter
Seikagaku (Tokyo, Japan)	Zymolyase 20T
Serva (Heidelberg)	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Raffinose, Saccharose (Sucrose), Serva Blau G, SDS, TEMED
Sigma (München)	Aminosäuren, Ammoniumperoxodisulfat, BSA Grade VIII (fettsäurefrei), Ethidiumbromid, Glycerol, Lachsspermien-DNA, β -Mercaptoethanol, LMW und HMW Molekulargewichts-Standards für SDS-PAGE, PMSF, Triton X-100, Oligomycin, Trypsin (Typ VIII aus Rinderpankreas), Valinomycin A

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

2 Material und Methoden

2.7.2 Geräte

Agarose-Geldokumentation	The Imager® Imaging System, Appligene (Heidelberg)
Autoklav	Varioclav® 400E, H + P Labortechnik (Oberschleißheim)
Brutschränke, Inkubatoren	Heraeus Christ (Osterode)
Chromatographiesäule Superose 6	Amersham Biosciences (Freiburg)
Chromatographiesystem	Äkta Explorer, Amersham Biosciences (Freiburg)
CCD-Kamera für Fluoreszenzmikroskop	Modell 1.1.0, Diagnostic Instruments, USA
Durchlichtscanner und Quantifizierungssoftware	Image Scanner und Software Image Master 1D, Amersham Biosciences (Freiburg)
Elektroporationssystem	Gene Pulser, BioRad
Entwicklermaschine	Gevamatic 60® Agfa-Gevaert (München)
Feinwaagen	Sartorius (Mainz)
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan, Carl Zeiss Jena GmbH
Gelkammern	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München) Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad (München)
Kolbenhubpipetten	Abimed (Düsseldorf)
Magnetrührer	MR 3001 K, Heidorph
Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Peristaltische Pumpe	P-1, Amersham Biosciences (Freiburg)
Phosphoimager	Phosphoimager FLA 3000, Fuji (Tokyo, Japan)
Photometer	Photometer UV-120-02 und UV-240, Shimadzu (Kyoto, Japan) GeneQuant <i>pro</i> , Amersham Biosciences Eppendorf
Quarzküvetten	Hellma
Reinstwasseranlagen	PureLab Plus, USF Deutschland GmbH (Ransbach- Baumbach)
Halbtrocken Blotapparatur	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)
Software Fluoreszenzmikroskop	MetaView 3.6 a, Universal Image Corporation, USA
Spannungsquellen	Electrophoresis Power Supply EPS 600, Amersham Biosciences (Freiburg)
Sterilbank	BDK
Thermocycler	Primus 25/96, MWG Biotech (Ebersberg)
Thermomixer	Thermomixer <i>compact</i> Eppendorf (Hamburg)
Überkopfschüttler	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie (München)
Ultraschallgerät	Branson Sonifier B-15, G. Heinemann
Vortex-Mixer	Bender und Hobein (München)
Wärmeschränke	Memmert (Hannover)
Zentrifugen	Beckman Instruments: Kühlzentrifuge J2-21 Ultrazentrifugen Optima TLX und Optima MX-E Ultrazentrifugen L8-50M/E und L8-M Eppendorf: Tischzentrifuge (5415D) Heraeus Christ: Tischzentrifuge Bactifuge® Sigma: Kühlzentrifuge 3K30

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und Lokalisierung von Mgm1

Ein wesentlicher Faktor für das Verständnis der Funktion von Mgm1 ist die Klärung der genauen submitochondrialen Lokalisierung und der Topologie seiner beiden Isoformen. Diese war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit sehr umstritten. Verschiedene Arbeitsgruppen hatten Mgm1 an der äußeren Oberfläche der mitochondrialen Außenmembran (Shepard und Yaffe, 1999) oder im Intermembranraum lokalisiert (Wong *et al.*, 2000). Eine dritte Arbeitsgruppe fand eine Lokalisierung des orthologen Proteins Msp1 aus *Schizosaccharomyces pombe* in der mitochondrialen Matrix (Pelloquin *et al.*, 1999). Daher wurde in unabhängigen Ansätzen die submitochondriale Lokalisierung und Topologie von Mgm1 nochmals adressiert.

3.1.1 Beide Isoformen von Mgm1 sind im Intermembranraum lokalisiert

Dazu wurden isolierte Mitochondrien aus *S. cerevisiae* D273-10B mit Proteinase K behandelt und anschließend durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot analysiert. Die Immundekoration mit Antikörpern gegen ein C-terminales Peptid oder gegen ein internes Peptid von Mgm1 ergab, dass endogenes Mgm1 in Mitochondrien vor dem Verdau durch von außen zugegebene Protease geschützt ist (Abbildung 5). Wird hingegen durch osmotisches Schwellen der Mitochondrien die Außenmembran selektiv geöffnet und Proteinase K zugegeben, werden beide Isoformen von Mgm1 verdaut. Sowohl das C-terminale als auch das interne Epitop ist demnach im Intermembranraum lokalisiert. Mgm1 enthält nur ein vorhergesagtes Transmembransegment am N-Terminus. Beide Epitope liegen C-terminal von diesem vorhergesagten Transmembransegment. Damit ist der größte Teil beider Isoformen im Intermembranraum lokalisiert. Die Integrität der mitochondrialen Membranen (ohne osmotisches Schwellen) und die Effizienz des osmotischen Schwellens wurde durch Dekoration derselben Western-Blots mit Antikörpern gegen den ADP/ATP-Transporter Aac2 oder die Proteininsertase der Innenmembran Oxa1 kontrolliert. In Mitochondrien sind beide Proteine vor dem Verdau durch Proteinase K geschützt. Nach osmotischem Schwellen sind Fragmente beider Proteine zu beobachten, die charakteristisch für eine geöffnete mitochondriale Außenmembran und eine intakte mitochondriale Innenmembran sind. (Herrmann *et al.*, 1997; Pfanner und Neupert, 1987).

3 Ergebnisse

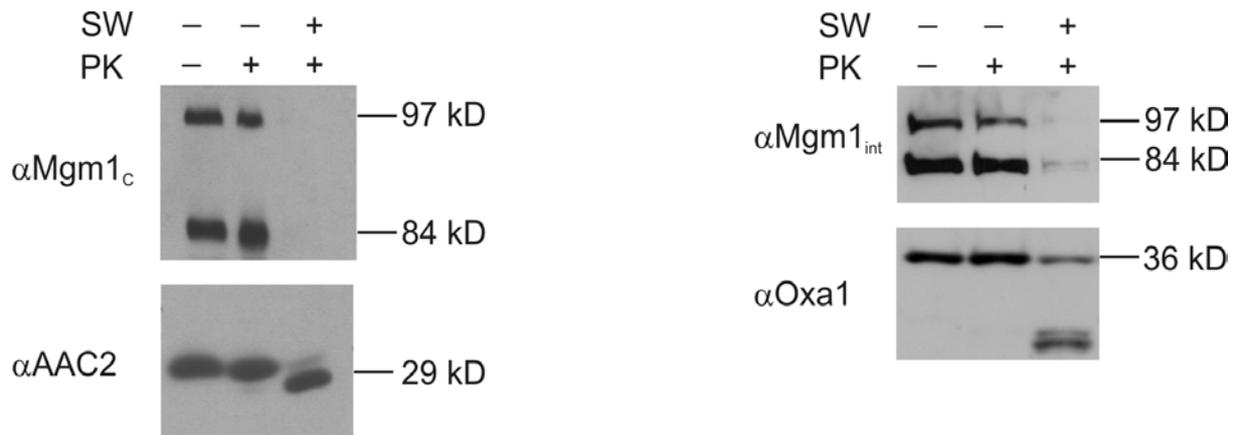


Abbildung 5: Mgm1 ist im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert. Beide Isoformen von Mgm1 (97 kD und 84 kD) sind in Mitochondrien, nicht aber in Mitoplasten (SW) vor dem Verdau durch Proteinase K (PK) geschützt. Als Kontrolle für die Integrität der Mitochondrien und die Effizienz des osmotischen Schwellens wurden die gleichen Western-Blots mit Antikörpern gegen AAC2 (α AAC2) oder Oxa1 (α Oxa1) dekoriert. Für die Detektion von Mgm1 wurde ein Antikörper gegen ein C-terminales Epitop (Aminosäurereste 892-902 von Mgm1, α Mgm1_c) oder gegen ein internes Epitop (Aminosäurereste 484-497 von Mgm1, α Mgm1_{int}) verwendet.

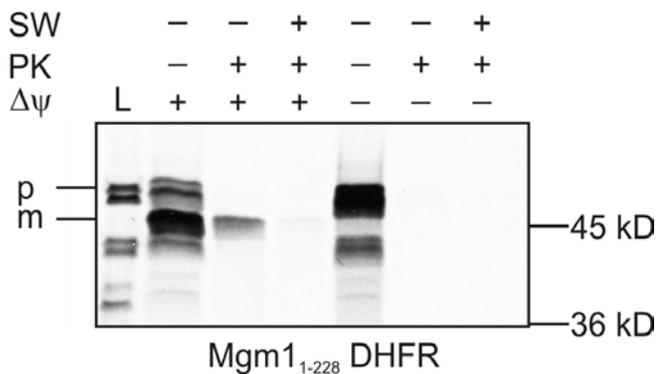
3.1.2 Die ersten 228 Aminosäurereste von Mgm1 sind hinreichend für die Lokalisierung im Intermembranraum

In einem zweiten unabhängigen Ansatz wurden die radioaktiv markierten Vorstufenproteine Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR und Mgm1₁₋₄₂₇ *in vitro* in isolierte Mitochondrien importiert. Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR ist ein Fusionsprotein aus den ersten 228 Aminosäureresten von Mgm1, welche die vorhergesagte Signalsequenz von Mgm1 für den Import in Mitochondrien enthalten, und DHFR aus Maus. Mgm1₁₋₄₂₇ ist ein N-terminales Fragment von Mgm1, das ebenfalls die vorhergesagte N-terminale Präsequenz enthält. Beim Import werden beide Vorstufenproteine prozessiert. Es ergeben sich Proteine mit einer Größe von 47 kD (Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR) und 45 kD (Mgm1₁₋₄₂₇) (Abbildung 6). Das entspricht der Abspaltung einer 9 kD großen N-terminalen Präsequenz durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP). Beide prozessierte Proteine waren in Mitochondrien vor dem Verdau durch zugegebene Proteinase K geschützt. Sie wurden über die Außenmembran der Mitochondrien transportiert. Nach selektiver Öffnung der Außenmembran wurden die Proteine durch Proteinase K verdaut. In Übereinstimmung mit der Lokalisierung des endogenen Mgm1 sind die *in vitro* importierten Proteine im Intermembranraum lokalisiert. Darüber hinaus sind die ersten 228 Aminosäurereste von Mgm1 hinreichend, um das nicht mitochondriale Protein DHFR in den Intermembranraum zu dirigieren. Der Import beider Vorstufenproteine war abhängig vom Membranpotential $\Delta\Psi$ über die

3 Ergebnisse

mitochondriale Innenmembran. Wurde das Membranpotential durch Zugabe von CCCP zerstört, war weder Prozessierung der Vorstufenproteine noch Import an einen proteasegeschützten Ort zu beobachten. Diese Abhängigkeit des Imports vom Membranpotential ist charakteristisch für Proteine mit einer N-terminalen mitochondrialen Signalsequenz.

A



B

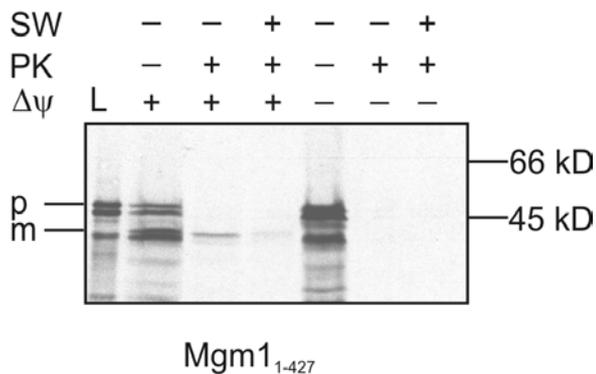


Abbildung 6: Import von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen von Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR und Mgm1₁₋₄₂₇ in isolierte Mitochondrien mit oder ohne Membranpotential. Nach dem Import wurden die Proben geteilt und ein Teil der Mitochondrien geschwollen, um Mitoplasten zu erzeugen (SW), und mit Proteinase K (PK) behandelt wie angegeben. p, Vorstufenprotein; m, reifes Protein; L, 10 % des für eine Importreaktion eingesetzten Vorstufenproteins. Beide Vorstufenproteine werden membranpotentialabhängig in den Intermembranraum importiert.

Zusammenfassend sind beide Isoformen von Mgm1 im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert und die 228 N-terminalen Aminosäurereste sind ausreichend, um Mgm1 in den Intermembranraum zu dirigieren.

3 Ergebnisse

3.1.3 Bestimmung der N-Termini der Mgm1-Isoformen

Eine charakteristische Eigenschaft von Mgm1 ist seine Präsenz in zwei Isoformen von 97 kD und 84 kD (Herlan *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2000). Diese beiden Isoformen sind normalerweise in einem Mengenverhältnis von ungefähr 1:1 vorhanden. Ein Antikörper gegen ein C-terminales Peptid ist in der Lage, beide Isoformen zu erkennen. Daher ist die kleine Isoform (s-Mgm1) vermutlich eine N-terminal verkürzte Version der großen Isoform (l-Mgm1). Um die Identität der beiden Isoformen zu bestimmen, wurden 10 mg Wildtyp-Mitochondrien lysiert und beide Isoformen von Mgm1 aus dem mitochondrialen Lysat mit Antikörpern gegen das C-terminale Epitop präzipitiert. Gebundenes Protein wurde mit Lämmli-Probenauftragspuffer eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach Färbung der Proteine mit kolloidalem Coomassie wurden die beiden den Isoformen von Mgm1 entsprechenden Banden aus der Membran ausgeschnitten und durch Edman-Abbau vom N-Terminus sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen sind in Abbildung 7A wiedergegeben.

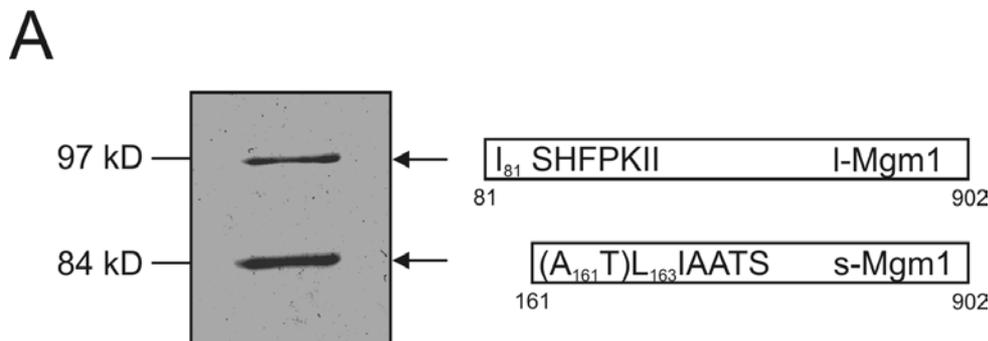


Abbildung 7: Bestimmung der N-Termini beider Mgm1-Isoformen. **A**, Mitochondrien wurden lysiert und Mgm1 aus dem Lysat mit Antikörpern gegen ein C-terminales Epitop immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die N-Termini durch Edman-Abbau bestimmt. Die angegebene Sequenz für l-Mgm1 entspricht den Aminosäureresten 81-88 von Mgm1. Für s-Mgm1 wurden zwei überlappende Peptide beginnend mit dem 161. (A₁₆₁TLIAATS) bzw. dem 163. (L₁₆₃IAATS) Aminosäurerest von Mgm1 in ungefähr gleicher Menge erhalten. **B**, Proteinsequenz von Mgm1. Die N-Termini von l-Mgm1 und s-Mgm1 (→) und die Schnittstellen (≧<) von MPP und einer bis dahin nicht bekannten Protease, die möglicherweise s-Mgm1 erzeugt, sind angegeben. l-Mgm1 verfügt über eine hydrophobe Sequenz (TM1), die eine Membranverankerung bewirken könnte und die in s-Mgm1 fehlt.

3 Ergebnisse

1 MSNSTSLRAI PRVANYNTLV RMNASPVRLI ILRRQLATHP AILYSSPYIK SPLVHLHSRM

61 SNVHRSAHAN ALSFVITRRS ISHFPKIISK IIRLPIYVGG GMAAAGSYIA YKMEEASSFT

I-Mgm1
→
✂
MPP
TM1
s-Mgm1
→
✂

121 KDKLDRIKDL GESMKEKFNK MFSGDKSQDG GHGNDGTVPT ATLIAATSLD DDESKRQGDG

181 KDDDDDEDDDD EDDENDSVDT TQDEMLNLTK QMIEIRTI LN KVDSSSAHLT LPSIVVIGSQ

241 SSGKSSVLES IVGREFLPKG SNMVTRRPIE LTLVNTPN SN NVTADFPSMR LYNIKDFKEV

301 KRMLMELNMA VPTSEAVSEE PIQLTIKSSR VPDLSLVDLP GYIQVEAADQ PIELKTKIRD

361 LCEKYLTAPN IILAISAADV DLANSSALKA SKAADPKGLR TIGVITKLDL VDPEKARSIL

421 NNKKYPLSMG YVGVITKTPS SINRKHLGLF GEAPSSSLSG IFSKGQHGQS SGEENTNGLK

481 QIVSHQFEKA YFKENKKYFT NCQVSTKCLR EKLKILEIS MSNALEPTST LIQQELDDTS

541 YLFKVEFNDR HLTPKSYLLN NIDVLKLGIK EFQEKFHRNE LKSILRAELD QKVLDVLATR

601 YWKDDNLQDL SSSKLES DTD MLYWHKKLEL ASSGLTKMGI GRLSTMLTTN AILKELDNIL

661 ESTQLKNHEL IKDLVSNTAI NVLNSKYYST ADQVENCIKP FKYEIDLEER DWSLARQHSI

721 NLIKEELRQC NSRYQAIKNA VGSKKLANVM GYLENESNLQ KETLGMSKLL LERGSEAI FL

781 DKRCKVLSFR LKMLKNKCHS TIEKDRCEPV FLSAVSDKLT STAVLFLNVE LLSDDFFYNFP

841 IELDRRLTLL GDEQVEMFAK EDPKISRHIE LQKRKELLEL ALEKIDSILV FKKS YKGVSK

901 NL

Demnach ist s-Mgm1 tatsächlich eine N-terminal verkürzte Form von Mgm1. I-Mgm1 beginnt mit der 81. Aminosäure des offenen Leserahmens von *MGM1*. Es entsteht durch Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz von Mgm1 durch MPP, da an dieser Position eine Konsensussequenz (hier RRS^{VI}) für MPP-Spaltung vorhanden ist (Hendrick *et al.*, 1989; Neupert, 1997). Für s-Mgm1 wurden zwei Sequenzen in ungefähr gleicher Menge identifiziert. Eine beginnt mit dem 161. Aminosäurerest von Mgm1, die andere mit dem 163. Aminosäurerest. Wahrscheinlich findet die initiale Prozessierung vor dem 161. Aminosäurerest von Mgm1 statt und zwei weitere Aminosäuren können durch Peptidasen im Intermembranraum abgespalten werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die initiale Prozessierung von Mgm1 sowohl vor dem 161. als auch dem 163. Aminosäurerest erfolgen kann. Auf welche Weise s-Mgm1 entsteht, ist auf Basis der Sequenz nicht zu beantworten. Keine der Proteasen, deren Sequenzspezifität bekannt ist, hat eine Sequenz-

3 Ergebnisse

spezifität, die der Aminosäuresequenz im Bereich um den experimentell bestimmten N-Terminus von s-Mgm1 entspricht.

3.1.4 Die beiden Isoformen von Mgm1 unterscheiden sich in ihrer Membranassoziation

Ein Unterschied zwischen den beiden Isoformen von Mgm1 ist die Präsenz eines hydrophoben Bereiches in l-Mgm1 (Aminosäurereste 94-113), der in s-Mgm1 fehlt (Abbildung 7B). Dieser Bereich könnte nach Sekundärstrukturvorhersagen eine Transmembranhelix bilden, die l-Mgm1 in der Innenmembran verankern würde. Um zu untersuchen, ob sich die beiden Isoformen von Mgm1 in ihrer Membranassoziation unterscheiden, wurden Extraktionsexperimente mit 1 M NaCl oder mit 0,1 M Na₂CO₃ durchgeführt (Abbildung 8).

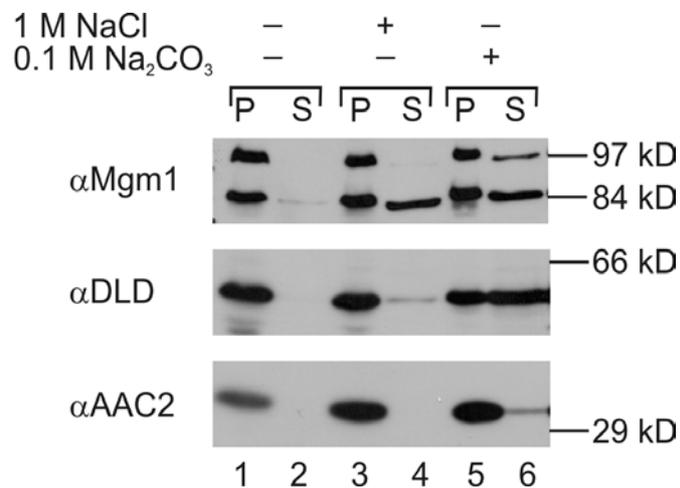


Abbildung 8: l-Mgm1 und s-Mgm1 unterscheiden sich in ihrer Membranassoziation. Isolierte Mitochondrien wurden mit hypoosmotischem Puffer alleine (Spur 1 und 2), hypoosmotischem Puffer und anschließend 1 M NaCl (Spur 3 und 4) oder mit 0,1 M Na₂CO₃ extrahiert. Die Membranfraktion (P) und die lösliche Fraktion (S) wurden durch Zentrifugation getrennt. Durch Dekoration mit Antikörpern gegen D-Lactatdehydrogenase (αDLD) und ADP/ATP-Transporter (αAAC2) wurde die Extraktionseffizienz kontrolliert.

Durch osmotische Öffnung der Außenmembran konnte keine der beiden Isoformen in den mitochondrialen Überstand entlassen werden. Keine der beiden Isoformen ist ein lösliches Protein im Intermembranraum. Wurden die Mitochondrien nach osmotischem Schwellen mit 1 M NaCl extrahiert, wurden erhebliche Mengen von s-Mgm1 im Überstand gefunden, während l-Mgm1 mit der Membranfraktion sedimentierte. Behandlung der Mitoplasten mit 0,1 M Na₂CO₃ führte schließlich zur partiellen Freisetzung beider Isoformen in den Überstand. s-Mgm1 wurde wiederum effizienter extrahiert als l-Mgm1. Die unvollständige Extraktion von s-Mgm1 mit Na₂CO₃ könnte

3 Ergebnisse

auf einer geringen Löslichkeit des Proteins oder einer Aggregation im alkalischen Milieu beruhen. I-Mgm1 ist wahrscheinlich mit seinem N-Terminus in der Innenmembran verankert, während s-Mgm1 nur peripher membranassoziiert ist. Für D-Lactatdehydrogenase ist eine Verankerung des N-Terminus in der mitochondrialen Innenmembran mit nur wenigen Aminosäureresten auf der Matrixseite etabliert (Rojo *et al.*, 1998). Tatsächlich zeigte D-Lactatdehydrogenase in einem Kontrollexperiment das gleiche Extraktionsverhalten wie I-Mgm1 (Abbildung 8). Die partielle Extrahierbarkeit von I-Mgm1 mit Na_2CO_3 steht also nicht im Widerspruch mit einer integralen Membranassoziation. Der ADP/ATP-Transporter, der die mitochondriale Innenmembran sechsmal durchspannt (Pfanner *et al.*, 1987), zeigte sich erwartungsgemäß unter allen Bedingungen resistent gegen die Extraktion (Abbildung 8).

3.2 Identifizierung der Rhomboid-ähnlichen Protease Pcp1

3.2.1 Die Rhomboid-ähnliche Protease Pcp1 ist notwendig für die Erzeugung von s-Mgm1

Nach den Ergebnissen der N-terminalen Sequenzierung der Isoformen von Mgm1 entsteht s-Mgm1 wahrscheinlich durch proteolytische Prozessierung von I-Mgm1. Die Analyse der Aminosäuresequenz um den N-Terminus von s-Mgm1 ergab jedoch keinen Hinweis darauf, welche Protease für die Entstehung von s-Mgm1 verantwortlich sein könnte (vgl. 3.1.3). Um zu untersuchen, ob der Entstehung von s-Mgm1 eine proteolytische Prozessierung zugrunde liegt und gegebenenfalls die dafür erforderliche Protease zu identifizieren, wurden Gesamtzellextrakte von Hefestämmen präpariert, in denen jeweils eine bekannte oder vorhergesagte mitochondriale Protease deletiert war. Durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse dieser Gesamtzellextrakte mit Antikörpern gegen den C-Terminus von Mgm1 wurde untersucht, ob die Entstehung von s-Mgm1 reduziert ist. Im Gesamtzellextrakt des $\Delta pcp1$ -Stammes war s-Mgm1 nicht nachweisbar (Abbildung 9). In allen anderen Deletionsstämmen war das Verhältnis der beiden Mgm1-Isoformen im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Pcp1 ist notwendig für die Prozessierung von Mgm1 zu s-Mgm1. Pcp1 hat Sequenzähnlichkeit zur Familie der Rhomboid-Proteasen (Koonin *et al.*, 2003) und wurde zuvor als Protease identifiziert, die an der Reifung von Ccp1 beteiligt ist (Esser *et al.*, 2002). Rhomboid-Proteasen sind Serinproteasen, die selbst integrale Membranproteine sind und ihre Substrate innerhalb der Membran spalten (Übersichtsartikel siehe Freeman, 2004; Urban und Freeman, 2003; Urban *et al.*, 2001; Urban *et al.*, 2002a; Urban *et al.*, 2002b; Wasserman *et al.*, 2000). Daher ist Pcp1 wahrscheinlich direkt für die proteolytische Prozessierung von Mgm1 verantwortlich.

3 Ergebnisse

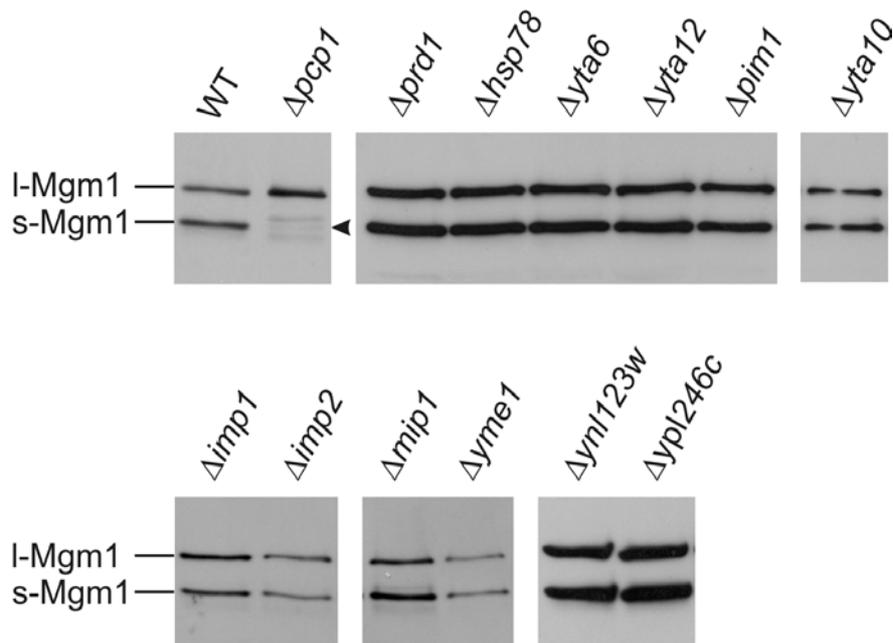


Abbildung 9: Pcp1 ist notwendig für die Erzeugung von s-Mgm1. Aus den angegebenen Hefestämmen, in denen jeweils eine der bekannten oder vorhergesagten mitochondrialen Proteasen deletiert war, wurden Gesamtzellextrakte präpariert und durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Das Fehlen von s-Mgm1 im $\Delta pcp1$ -Stamm ist durch eine Pfeilspitze verdeutlicht. WT, Wildtyp.

In Übereinstimmung damit wurde nach Veröffentlichung dieser Daten (Herlan *et al.*, 2003) die Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1 in zwei unabhängigen Studien bestätigt (McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003a).

3.2.2 Die Deletion von *PCP1* führt zum gleichen mitochondrialen Phänotyp wie die Deletion von *MGM1*

Unabhängig von dieser proteolytischen Funktion wurde Pcp1 in einer Studie gefunden, in der eine Bibliothek von Deletionsstämmen systematisch nach Mutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie durchmustert wurde (Dimmer *et al.*, 2002). Der $\Delta pcp1$ -Stamm zeigte fragmentierte und kurze tubuläre Mitochondrien, die zur Aggregation neigten. Außerdem resultierte die Deletion von *PCP1* in einem atemungsdefizienten Phänotyp. Damit ist der $\Delta pcp1$ -Phänotyp dem einer Deletion von *MGM1* sehr ähnlich. Um die Phänotypen der beiden Deletionsmutanten detailliert zu vergleichen, wurden die Deletionsstämme mit pVT100U-mtGFP transformiert, um die Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch zu visualisieren. In Übereinstimmung mit Dimmer *et al.* zeigten beide Deletionsstämme fragmentierte Mitochondrien, die zur Aggregation neigten. (Abbildung 13; Abbildung 17; Tabelle 11; Tabelle 12). Außerdem war keiner der Deletionsstämme in der Lage, auf nicht fermentierbarer

3 Ergebnisse

Kohlenstoffquelle zu wachsen (Abbildung 14; Abbildung 18; Tabelle 11; Tabelle 12). Darüber hinaus wurden $\Delta mgm1$ - und $\Delta pcp1$ -Stämme durch DAPI-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie auf ihren Gehalt an mitochondrialer DNA untersucht (Abbildung 10; Tabelle 11; Tabelle 12). Während im Wildtyp in jeder Zelle zahlreiche mitochondriale Nukleoide angefärbt wurden, waren sowohl im $\Delta mgm1$ - als auch im $\Delta pcp1$ -Stamm nur die Zellkerne zu sehen. Keiner der beiden Stämme enthält detektierbare Mengen von mitochondrialer DNA. Die Phänotypen der Deletion von *MGM1* und *PCP1* sind in Bezug auf die mitochondriale Morphologie, die Respirationskompetenz und den Verlust von mitochondrialer DNA nicht voneinander zu unterscheiden.

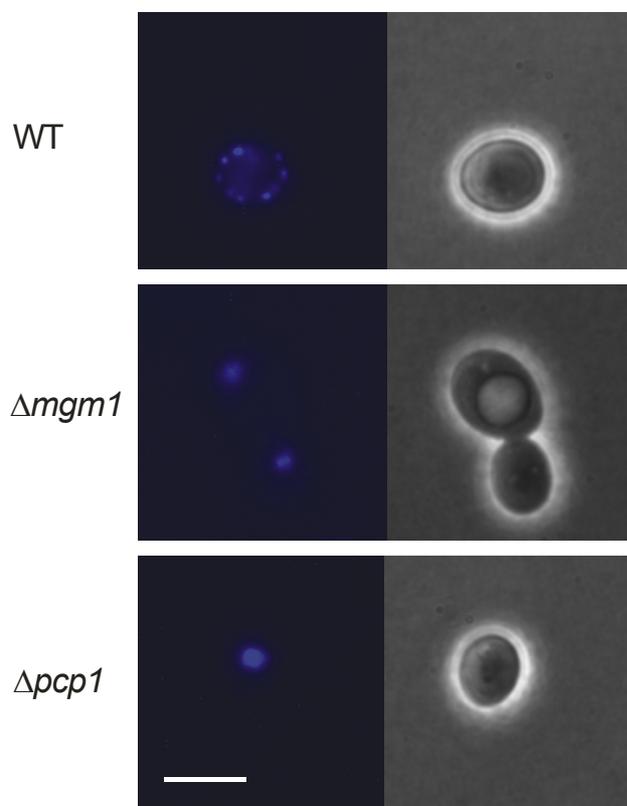


Abbildung 10: $\Delta mgm1$ - und $\Delta pcp1$ -Stämme enthalten keine mitochondriale DNA. Aliquots exponentiell wachsender Kulturen der angegebenen Stämme wurden mit DAPI gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch (links) und im Phasenkontrast (rechts) analysiert. Im $\Delta mgm1$ - und $\Delta pcp1$ -Stamm sind im Gegensatz zum Wildtyp (WT) keine mitochondrialen Nukleoide sichtbar. Balken, 10µm.

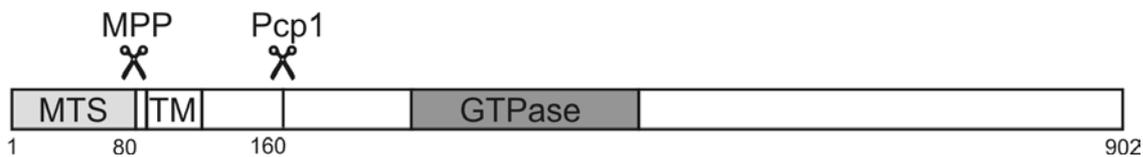
Der $\Delta pcp1$ -Phänotyp könnte daher eine direkte Konsequenz der fehlenden Prozessierung von Mgm1 und der Abwesenheit von s-Mgm1 sein. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist für die Deletion von *CCP1*, des einzigen anderen bekannten Substrats von Pcp1, weder eine veränderte mitochondriale Morphologie noch ein atmungsdefizienter Phänotyp beschrieben worden (Dimmer *et al.*, 2002).

3 Ergebnisse

3.2.3 s-Mgm1* - eine Pcp1-unabhängige Version von s-Mgm1

Für die Überprüfung dieser Hypothese wurde eine artifizielle Isoform von s-Mgm1 konstruiert, die im Folgenden mit s-Mgm1* bezeichnet wird. Diese artifizielle Isoform sollte unabhängig von Pcp1 im Intermembranraum von Mitochondrien exprimiert werden. Dafür wurde ein Fusionsprotein bestehend aus den N-terminalen 167 Aminosäureresten von Cytochrom b_2 und s-Mgm1 (d.h. den Aminosäureresten 161-902 von Mgm1) hergestellt. Die ersten 167 Reste von Cytochrom b_2 sind hinreichend, um DHFR in den Intermembranraum zu dirigieren. (Koll *et al.*, 1992; Stuart *et al.*, 1994). Während des Imports von Cytochrom b_2 in Mitochondrien wird dessen N-Terminus von MPP und der Innenmembranprotease Imp1/Imp2 gespalten, so dass ein reifes Protein im Intermembranraum entsteht, dem die ersten 80 Aminosäurereste des Vorstufenproteins fehlen (Stuart *et al.*, 1994). Analog sollte s-Mgm1* nach dem Import aus s-Mgm1 bestehen, das am N-Terminus zusätzlich einen Anhang aus den Aminosäureresten 81-167 von Cytochrom b_2 trägt. Eine schematische Darstellung der Vorstufenproteine von Mgm1 und der artifiziellen Form s-Mgm1* ist in Abbildung 11 wiedergegeben.

Mgm1



s-Mgm1*

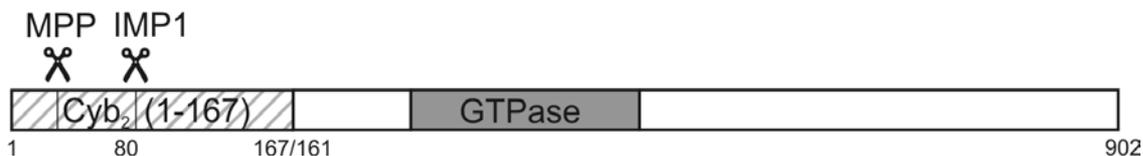


Abbildung 11: Schematische Darstellung von Mgm1 und des Konstrukts für die artifizielle Expression von s-Mgm1 unter Kontrolle des endogenen *MGM1*-Promotors. Um s-Mgm1* in den Intermembranraum zu dirigieren, wurden die mitochondriale Präsequenz und das Sortierungssignal von Cytochrom b_2 (Cyb₂(1-167)) an den experimentell bestimmten N-Terminus von s-Mgm1 fusioniert. MPP, Mitochondriale Prozessierungspeptidase; MTS; mitochondriale Präsequenz; IMP1; mitochondriale Innenmembranprotease; TM; Transmembransegment; GTPase, GTPase-Domäne.

3 Ergebnisse

3.2.4 Expression von s-Mgm1* in $\Delta pcp1$ -Stämmen

Um zu klären, ob der Phänotyp der *PCP1*-Deletion eine direkte Konsequenz des Fehlens von s-Mgm1 ist, wurde s-Mgm1* von dem Plasmid pRS313-s-Mgm1* unter Kontrolle des endogenen *MGM1*-Promotors in einem diploiden Stamm exprimiert, der heterozygot für die Deletion von *PCP1* war (*PCP1*/ $\Delta pcp1$). Zusätzlich wurde der Stamm mit pVT100U-mtGFP transformiert, um fluoreszenzmikroskopisch die mitochondriale Struktur zu analysieren. Die diploiden Stämme wurden sporuliert und die einzelnen Sporen mit einem Mikromanipulator dissektiert. Als Kontrolle wurde ein *PCP1*/ $\Delta pcp1$ -Stamm, der nicht das Plasmid für die Expression von s-Mgm1* enthielt, auf die gleiche Weise behandelt. Mit den erhaltenen Sporen sollte untersucht werden, ob artifizielles s-Mgm1* in der Lage ist den $\Delta pcp1$ -Phänotyp zu komplementieren.

Zwei der vier aus einer Tetrade erhaltenen Sporen tragen die Deletion von *PCP1*. Von den erhaltenen Sporen wurden Flüssigkulturen angezogen und die Expression von s-Mgm1* und endogenem Mgm1 wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten kontrolliert (Abbildung 12).

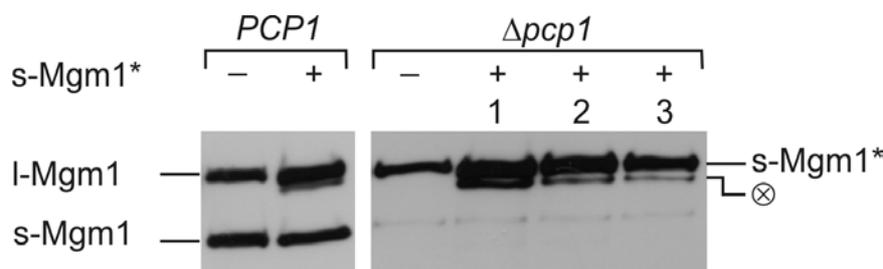


Abbildung 12: Expression von s-Mgm1* und endogenem Mgm1 in *PCP1* und $\Delta pcp1$ -Stämmen.

A, Gesamtzellextrakte der entsprechenden Stämme wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Die Expression von s-Mgm1* ist außer durch eine erhöhte Intensität auf gleicher Höhe mit endogenem I-Mgm1 an einer Abbaubande (⊗) mit geringfügig kleinerem Molekulargewicht zu erkennen.

Erwartungsgemäß wurde s-Mgm1* in den mit pRS315-s-Mgm1* transformierten Stämmen exprimiert. Da s-Mgm1* aufgrund des N-terminalen Anhangs aus den Aminosäureresten 81-167 von Cytochrom *b*₂ die gleiche Größe hat wie endogenes I-Mgm1 wird seine Expression nur an der im Vergleich zum Stamm ohne das Expressionsplasmid größeren Intensität und an einem mutmaßlichen Abbauprodukt deutlich, das knapp unterhalb von I-Mgm1 läuft (Abbildung 12). Die Stärke der Expression von s-Mgm1* war der von endogenem Mgm1 vergleichbar. Die Deletion von *PCP1* ist am Fehlen von endogenem s-Mgm1 erkennbar. Aufgrund von Prote-

3 Ergebnisse

aseschutzexperimenten wurde s-Mgm1*, wie endogenes s-Mgm1, im Intermembranraum lokalisiert (nicht dargestellt).

3.2.5 s-Mgm1* kann den Phänotyp der *PCP1*-Deletion teilweise komplementieren

Die Komplementation des Phänotyps der *PCP1*-Deletion durch s-Mgm1* wurde mit drei verschiedenen Ansätzen untersucht. Neben der mitochondrialen Struktur wurde die Respirationskompetenz und der Gehalt an mitochondrialer DNA von Wildtyp-Stämmen, $\Delta pcp1$ -Stämmen und $\Delta pcp1$ -Stämmen, die zur Komplementation mit dem Expressionsplasmid für s-Mgm1* transformiert waren, verglichen. Zur Analyse der Phänotypen wurden die Sporen von der Dissektionsplatte (YPD) einmal auf eine Platte mit Selektivmedium mit 2 % (w/v) Glukose als Kohlenstoffquelle übertragen, um die Anwesenheit der Plasmide sicherzustellen. Von dieser Platte wurden Flüssigkulturen bis in die mittlere logarithmische Wachstumsphase ($OD_{578\text{ nm}}$ 0,3 bis 0,7) angezogen und für die entsprechenden Experimente eingesetzt.

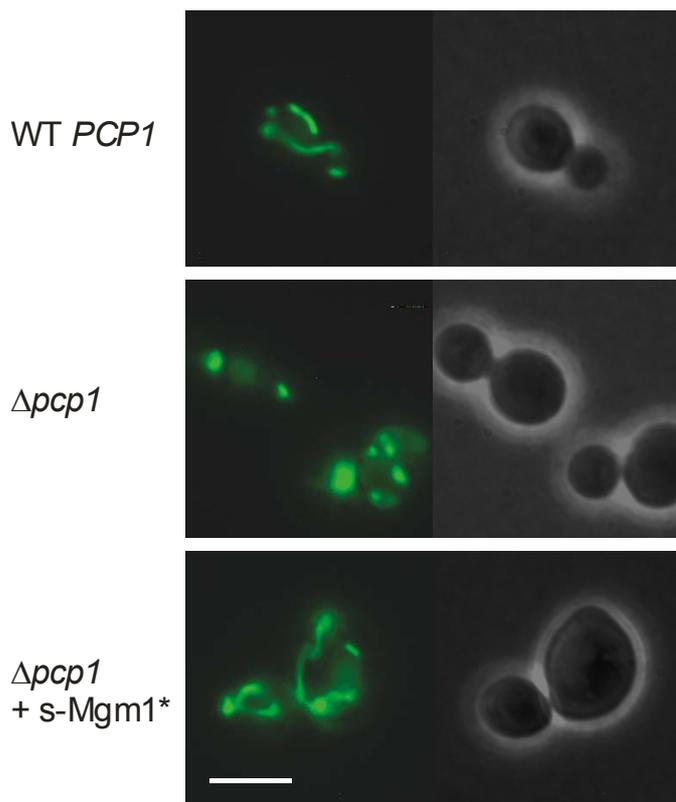
3.2.5.1 Mitochondriale Struktur

Zur Analyse der mitochondrialen Struktur wurden die zusätzlich mit pVT100U-mtGFP transformierten Stämme fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Während der $\Delta pcp1$ -Stamm fragmentierte und aggregierte Mitochondrien aufwies, sind nach Expression von s-Mgm1* in diesem Stamm Wildtyp-ähnliche tubuläre Mitochondrien zu beobachten (Abbildung 13A). Der Morphologie-Phänotyp der $\Delta pcp1$ -Stämme wird durch die Expression von s-Mgm1* also gemildert.

Die quantitative Auswertung der Morphologiephänotypen (Abbildung 13B, Tabelle 11) zeigt, dass die Komplementation nicht vollständig ist und zwischen Stämmen variiert, die von verschiedenen Sporen abgeleitet sind. Der Stamm, der s-Mgm1* im Wildtyp-Hintergrund exprimiert, zeigt eine mitochondriale Morphologie, die von der des Wildtyps nicht zu unterscheiden ist (Abbildung 13B; Tabelle 11). Ein dominant negativer Effekt der Expression von s-Mgm1* kann damit ausgeschlossen werden. Zusammenfassend ist eine partielle Komplementation des Morphologiephänotyps des $\Delta pcp1$ -Stammes durch die Expression von s-Mgm1* zu beobachten.

3 Ergebnisse

A



B

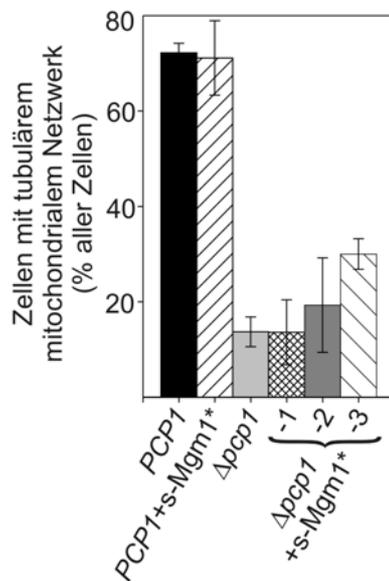


Abbildung 13: Die Expression von s-Mgm1* kann in $\Delta pcp1$ -Stämmen die mitochondriale Struktur teilweise wieder herstellen. Die zusätzlich mit pVT100U-mtGFP transformierten Stämme wurden bei 30 °C bis zur mittleren exponentiellen Phase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. A, Repräsentative Fluoreszenzbilder (links) und Phasenkontrastbilder (rechts) der angegebenen Stämme. Balken, 10 μ m. B, Quantitative Analyse der Morphologiephänotypen in (A). Mindestens 150 Zellen jedes Stammes wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht. Für jeden Stamm sind der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Drei von verschiedenen Sporen abgeleitete Stämme, die s-Mgm1* exprimieren, sind gezeigt.

3 Ergebnisse

3.2.5.2 Respirationskompetenz

Die Respirationskompetenz der verschiedenen Sporen wurde durch Tüpfeltest auf fermentierbarer und nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPD und YPG) untersucht. Durch die Expression von s-Mgm1* in den $\Delta pcp1$ -Stämmen konnte das Wachstum auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle teilweise wieder hergestellt werden (Abbildung 14, Tabelle 11). Auch hier war eine gewisse Variation zwischen verschiedenen s-Mgm1* exprimierenden Stämmen zu beobachten, die von verschiedenen $\Delta pcp1$ -Sporen abgeleitet wurden. Das Wachstum auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle erreichte in diesen Stämmen nicht das Wachstum des Wildtyp-Stammes. Ein Wachstum auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle von $\Delta pcp1$ -Stämmen, die nicht s-Mgm1* exprimierten, wurde nicht beobachtet.

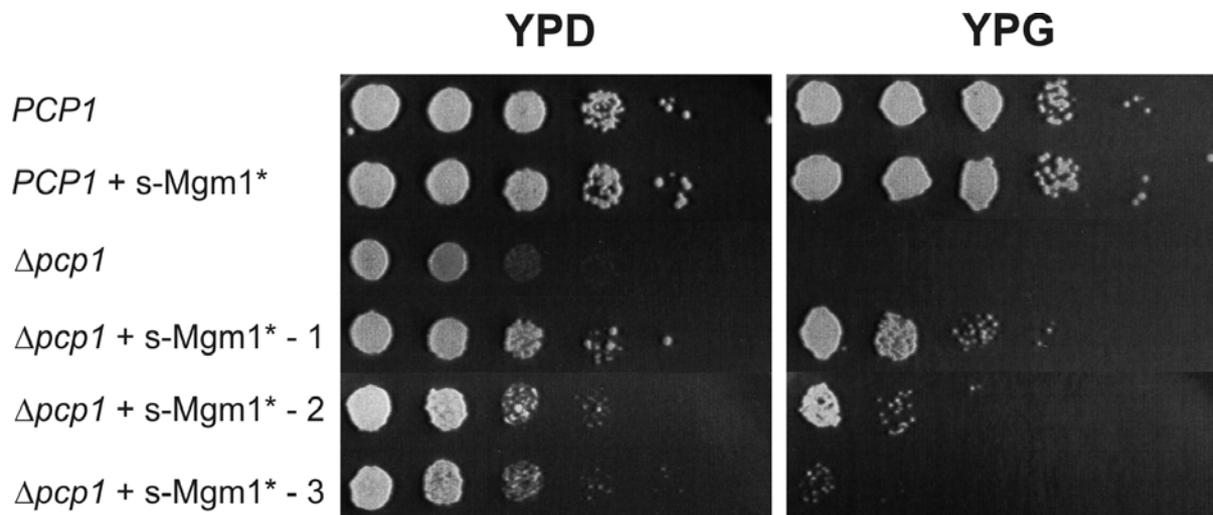


Abbildung 14: Die Expression von s-Mgm1* kann in $\Delta pcp1$ -Stämmen die Respirationskompetenz teilweise wieder herstellen. Die Stämme wurden bei 30 °C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase angezogen, aufeinander folgenden zehnfachen Verdünnungsschritten unterzogen und auf YPD- und YPG-Platten getüpfelt. Drei von verschiedenen Sporen abgeleitete $\Delta pcp1$ -Stämme, die s-Mgm1* exprimieren, sind abgebildet.

Auch auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPD) zeigten die s-Mgm1* exprimierenden $\Delta pcp1$ -Stämme ein geringfügig besseres Wachstum als $\Delta pcp1$ -Kontrollstämme. Durch Expression von s-Mgm1* im Wildtyp-Hintergrund konnten dominant negative Effekte ausgeschlossen werden. Der Phänotyp ist weder auf fermentierbarer noch auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle vom Wildtyp zu unterscheiden. Zusammenfassend kann die Expression von s-Mgm1* die Respirationskompetenz von $\Delta pcp1$ -Stämmen teilweise wieder herstellen.

3 Ergebnisse

3.2.5.3 Verlust mitochondrialer DNA

Schließlich wurden dieselben Stämme durch Färbung mit DAPI und fluoreszenzmikroskopische Analyse auf ihren Gehalt an mitochondrialer DNA untersucht. Die Stämme, die s-Mgm1* im $\Delta pcp1$ -Hintergrund exprimierten, zeigten gegenüber untransformierten $\Delta pcp1$ -Stämmen einen deutlich höheren Anteil an Zellen, die mitochondriale DNA enthalten (Tabelle 11). Der Verlust der mitochondrialen DNA konnte durch die Expression von s-Mgm1* jedoch nicht vollständig unterbunden werden. Die Expression von s-Mgm1* im Wildtyp-Hintergrund hat keinen dominant negativen Effekt auf die Erhaltung von mitochondrialer DNA. Zusammenfassend wird durch die Expression von s-Mgm1* der Verlust mitochondrialer DNA in $\Delta pcp1$ -Stämmen teilweise komplementiert.

Stamm	Mitochondriale Struktur in % der Zellen		Gehalt an mtDNA	
	Wildtyp/Tubulär		Wachstum auf YPG	rho ⁺ Zellen (%)
WT <i>PCP1</i>	72,2 ± 2,0		+++	95,4±1,5
WT <i>PCP1</i> +s-Mgm1*	71,1±7,8		+++	90,1±3,6
$\Delta pcp1$	13,7±2,3		-	21,5±5,2
$\Delta pcp1$ +s-Mgm1*	-1	13,6±6,8	++	66,1±1,3
	-2	19,3±9,9	+(+)	46,2±6,2
	-3	30,0±3,2	+	39,2±5,4

Tabelle 11: Komplementationsanalyse von s-Mgm1* in $\Delta pcp1$. Der prozentuale Anteil von Zellen mit Wildtyp-ähnlicher mitochondrialer Morphologie wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Der Anteil an Zellen, die mitochondriale DNA enthielten (rho⁺), wurde durch Färbung mit DAPI und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Quantifizierung der Phänotypen erfolgte in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 150 Zellen, ohne dass die Identität des untersuchten Stammes während des Experiments bekannt war. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben. Die Respirationskompetenz wurde durch Wachstumsversuche auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPG) getestet (vgl. Abbildung 14).

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Komplementationsstudien von s-Mgm1* in $\Delta pcp1$ -Stämmen. Alle untersuchten Phänotypen (abnormale mitochondriale Mor-

3 Ergebnisse

phologie, Respirationsdefizienz und Verlust von mtDNA) werden durch die Expression von s-Mgm1* deutlich gemildert. Das zeigt eine zumindest partielle Funktionalität der artifiziellen Form von s-Mgm1, s-Mgm1*. Für keinen der untersuchten Phänotypen war die Komplementation vollständig. Die Ursache dafür könnte in der exprimierten Menge von s-Mgm1* oder einer unvollständigen Funktionalität von s-Mgm1* liegen. Möglicherweise muss die Prozessierung von Mgm1 zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt innerhalb eines genau regulierten Prozesses erfolgen, um die volle Funktionalität zu gewährleisten. Darüber hinaus kann aufgrund der Daten nicht ausgeschlossen werden, dass Pcp1 weitere Substrate prozessiert, die ebenfalls in die Erhaltung der mitochondrialen Struktur und der mitochondrialen DNA involviert sind. Der Phänotyp der Deletion von *PCP1* ist nach diesen Ergebnissen, die eine partielle Komplementation aller Phänotypen deutlich zeigen, eine direkte Konsequenz der fehlenden Prozessierung von Mgm1 und des Fehlens von s-Mgm1. In Übereinstimmung damit hat die Deletion von *CCP1*, des einzigen weiteren bekannten Substrats von Pcp1, weder Einfluss auf die mitochondriale Struktur noch auf die Erhaltung der mitochondrialen DNA (Dimmer *et al.*, 2002).

3.2.6 I-Mgm1* - eine Variante von Mgm1, die nicht durch Pcp1 gespalten wird

Wie der Phänotyp der $\Delta pcp1$ -Stämme und die Komplementationsstudien mit s-Mgm1* zeigen, ist I-Mgm1 alleine nicht hinreichend für die Funktion von Mgm1. Daraus erwächst unmittelbar die Frage, ob s-Mgm1 alleine hinreichend für die Funktion von Mgm1 ist. I-Mgm1 wäre dann eine Art inaktive Vorstufe oder Speicherform für s-Mgm1. Alternativ dazu wären beide Isoformen für die Funktion von Mgm1 notwendig. Welche dieser Möglichkeiten zutrifft, wurde mit dem prinzipiell gleichen Ansatz adressiert, wie zuvor die Frage nach der Notwendigkeit von s-Mgm1. s-Mgm1* sollte in einem $\Delta mgm1$ -Hintergrund exprimiert und eine mögliche Komplementation des Phänotyps untersucht werden. Außerdem sollte eine artifizielle Form von I-Mgm1, I-Mgm1*, die nicht mehr durch Pcp1 gespalten werden kann, in einem $\Delta mgm1$ -Hintergrund exprimiert werden. Schließlich sollten beide artifiziellen Isoformen, s-Mgm1* und I-Mgm1* koexprimiert werden, um zu untersuchen, ob beide Isoformen für die Funktion von Mgm1 erforderlich sind.

Für die Expression von I-Mgm1* wurden die Aminosäurereste an den Positionen 154-167 des offenen Leserahmens von *MGM1* deletiert. Da dieser Bereich die Spaltstelle für Pcp1 enthält, sollte das entsprechende Protein nicht mehr durch Pcp1 gespalten werden. Seine Sortierung in den Intermembranraum sollte davon unbeeinflusst bleiben. Abbildung 15 zeigt eine schematische Darstellung des Konstrukts für die Expression von I-Mgm1*.

I-Mgm1*

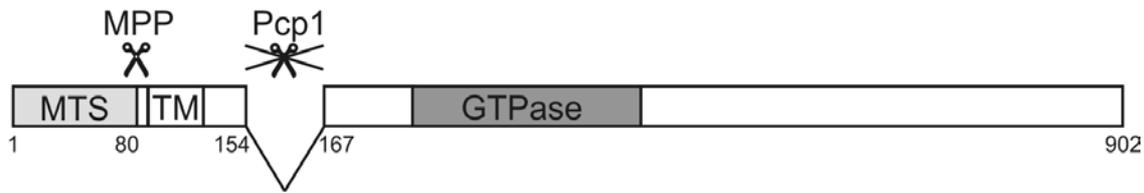


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Konstrukts für die Expression von I-Mgm1*, einer artifiziellen Form von I-Mgm1, unter Kontrolle des endogenen *MGM1*-Promotors. Um die Prozessierung zu s-Mgm1 zu vermeiden, wurden die Aminosäurereste 154-167 von Mgm1 deletiert, die die experimentell bestimmte Spaltstelle von Pcp1 enthalten. Die Sortierung in den Intermembranraum sollte davon unbeeinflusst bleiben. Auf diese Weise sollte eine Version von I-Mgm1, der die Aminosäurereste 154-167 fehlen, im Intermembranraum exprimiert werden.

3.2.7 Koexpression von I-Mgm1* und s-Mgm1* komplementiert teilweise den Phänotyp der *MGM1*-Deletion

Diploide Stämme mit einer heterozygoten Deletion von *MGM1* (*MGM1*/ Δ *mgm1*) wurden mit den Plasmiden pRS313-s-Mgm1*, pRS315-I-Mgm1* oder beiden Plasmiden transformiert, um die artifiziellen Isoformen von Mgm1 unter Kontrolle des endogenen Promotors zu exprimieren. Darüber hinaus wurde mit pVT100U-mtGFP kotransformiert, um die mitochondriale Struktur mit GFP im Fluoreszenzmikroskop visualisieren zu können. Als Kontrollen wurden *MGM1*/ Δ *mgm1*-Stämme nur mit pVT100U-mtGFP oder mit pRS315-Mgm1 und pVT100U-mtGFP transformiert. Die entsprechenden Stämme wurden sporuliert und Tetraden dissektiert. Zur Analyse der Phänotypen wurden die Sporen von der Dissektionsplatte (YPD) einmal auf eine Platte mit Selektivmedium mit 2 % (w/v) Glukose als Kohlenstoffquelle übertragen, um die Anwesenheit der Plasmide sicherzustellen. Von dieser Platte wurden Flüssigkulturen bis in die mittlere logarithmische Wachstumsphase ($OD_{578\text{ nm}}$ 0,3 bis 0,7) angezogen und für die entsprechenden Experimente eingesetzt.

Zunächst wurde die Expression von I-Mgm1*, s-Mgm1* und endogenem Mgm1 durch Präparation von Gesamtzellextrakten aus den von den Sporen abgeleiteten Stämmen kontrolliert. Die Analyse der Gesamtzellextrakte durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 zeigt das erwartete Muster für die Expression der artifiziellen Isoformen und des endogenen Mgm1 (Abbildung 16).

3 Ergebnisse

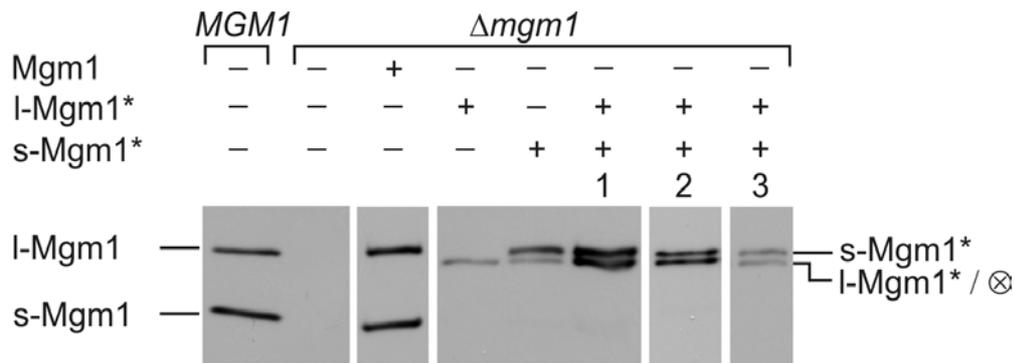


Abbildung 16: Expression von s-Mgm1*, I-Mgm1* und endogenem Mgm1 in *MGM1*- und *Δmgm1*-Stämmen. Gesamtzellextrakte der entsprechenden Stämme wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Die Expression von s-Mgm1* ist an einer Bande auf gleicher Höhe mit endogenem I-Mgm1 und an einer Abbaubande mit geringfügig kleinerem Molekulargewicht (⊗) zu erkennen. I-Mgm1* läuft auf gleicher Höhe wie das Abbauprodukt von s-Mgm1*.

I-Mgm1* wird aufgrund der Deletion der Region um die Spaltstelle tatsächlich nicht prozessiert und läuft wegen der Deletion etwas unterhalb von endogenem I-Mgm1 (Abbildung 16). s-Mgm1* hat die gleiche Größe wie endogenes I-Mgm1 (vgl. 3.2.4) und ist außerdem an einem Abbauprodukt zu erkennen, das die gleiche Größe hat wie I-Mgm1*. Die Expressionshöhe beider artifizierender Isoformen entspricht ungefähr der von endogenem Mgm1. Proteaseschutzexperimente ergaben eine korrekte Lokalisation von I-Mgm1* und s-Mgm1* im Intermembranraum (nicht dargestellt).

3.2.7.1 Mitochondriale Struktur

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der von den Sporen abgeleiteten Stämme ergab nur nach Expression von endogenem Mgm1 oder Koexpression von s-Mgm1* und I-Mgm1*, nicht aber nach Expression von s-Mgm1* oder I-Mgm1* alleine eine tubuläre mitochondriale Struktur und damit eine signifikante Komplementation des Morphologiephänotyps des *Δmgm1*-Stammes (Abbildung 17A). Die Expression von endogenem Mgm1 führte zu vollständiger Komplementation, während die Koexpression von s-Mgm1* und I-Mgm1* den Morphologiephänotyp teilweise komplementieren konnte (Abbildung 17B). Das Ausmaß der Komplementation variierte in s-Mgm1* und I-Mgm1* koexprimierenden Stämmen, die von verschiedenen Sporen abgeleitet waren. Dennoch führte die Koexpression beider artifizierender Isoformen insgesamt zu einer gegenüber *Δmgm1*-Stämmen oder *Δmgm1*-Stämmen, die nur eine der beiden artifizierender Isoformen exprimierten, verbesserten mitochondrialen Struktur. Für die Erhaltung der tubulären mitochondrialen Morphologie sind also beide Isoformen von Mgm1 erforderlich.

3 Ergebnisse

A

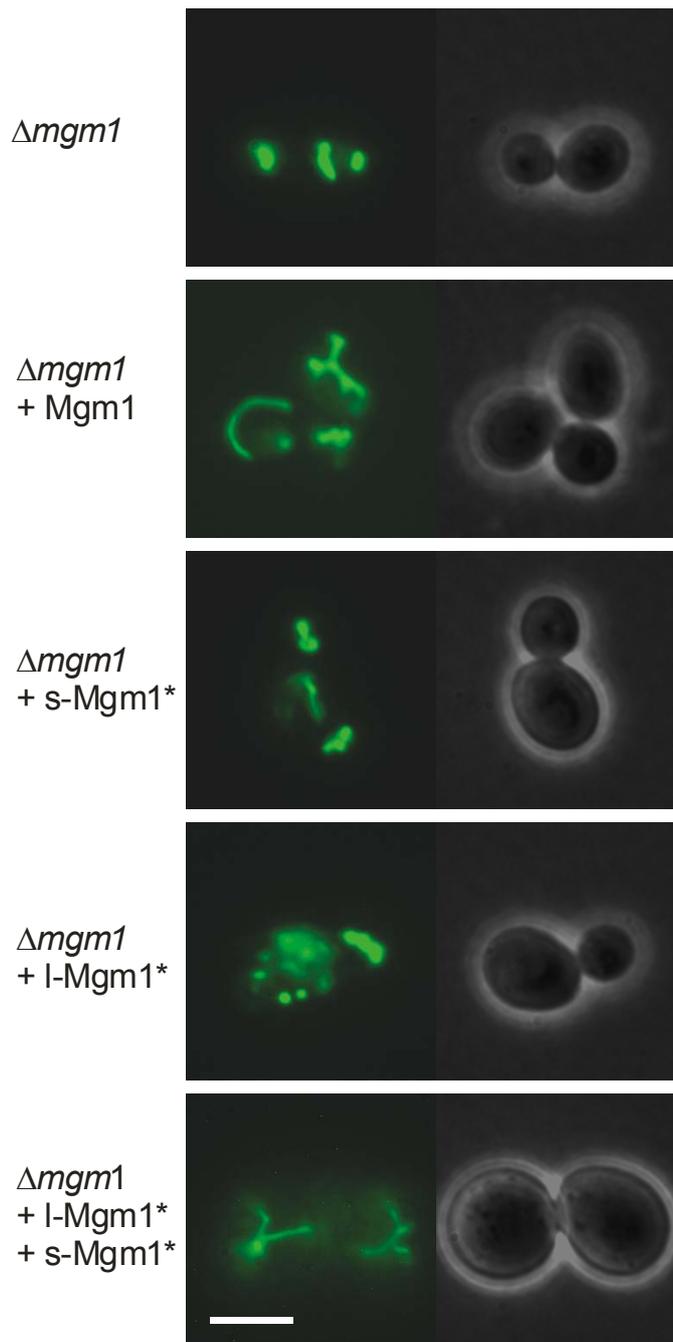
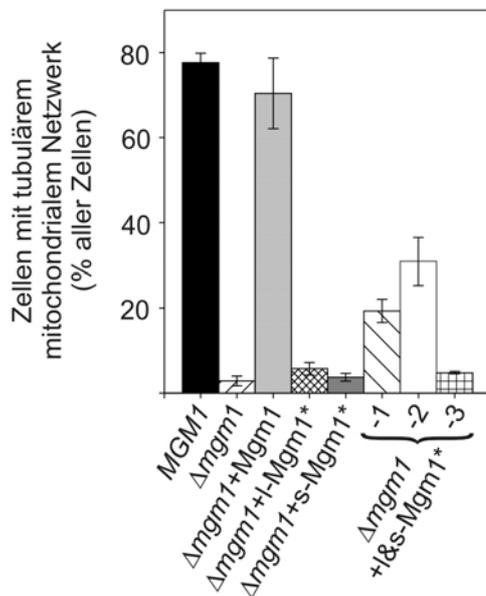


Abbildung 17: Nur die Koexpression von I-Mgm1* und s-Mgm1*, nicht aber die Expression von I-Mgm1* oder s-Mgm1* alleine, kann in *Δmgm1*-Stämmen die mitochondriale Morphologie teilweise wieder herstellen. Die zusätzlich mit pVT100U-mtGFP transformierten Stämme wurden bei 30 °C bis zur mittleren exponentiellen Phase angezogen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. **A**, Repräsentative Fluoreszenzbilder (links) und Phasenkontrastbilder (rechts) der angegebenen Stämme. Balken, 10 μm. **B**, Quantitative Analyse der Morphologiephänotypen in **(A)**. Mindestens 150 Zellen jedes Stammes wurden in drei unabhängigen Experimenten untersucht. Für jeden Stamm sind der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Drei von verschiedenen *Δmgm1*-Sporen abgeleitete Stämme, die s-Mgm1* und I-Mgm1* koexprimieren, sind gezeigt.

B



3.2.7.2 Respirationskompetenz und Verlust mitochondrialer DNA

Um zu untersuchen, ob auch für die Erhaltung der Respirationskompetenz beide Isoformen von Mgm1 erforderlich sind, wurde mit den von den gleichen Sporen abgeleiteten Stämmen ein Tüpfeltest auf fermentierbarer (YPD) und nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPG) durchgeführt. Wiederum war nur Wildtyp Mgm1 in der Lage das Wachstum auf YPG vollständig wieder herzustellen und den atmungsdefizienten Phänotyp des $\Delta mgm1$ -Stammes vollständig zu komplementieren (Abbildung 18). Die Expression von I-Mgm1* oder s-Mgm1* in den $\Delta mgm1$ -Stämmen konnte das Wachstum auf YPD oder YPG im Vergleich zum Deletionsstamm von MGM1 nicht verbessern. Die Koexpression beider artifizieller Isoformen verbesserte das Wachstum auf YPD geringfügig und resultierte in einem Fall auch im Wachstum auf YPG. Dabei wurde allerdings nicht das Niveau des Wildtyps erreicht. Die gleichen Stämme wurden durch DAPI-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie untersucht, um festzustellen, ob beide Isoformen von Mgm1 für die Erhaltung der mitochondrialen DNA notwendig sind und ob der Gehalt an mitochondrialer DNA in diesen Stämmen mit der Respirationskompetenz korreliert ist. Auch in den I-Mgm1* und s-Mgm1* koexprimierenden Stämmen, die nicht auf YPG wachsen können, war der Gehalt an mitochondrialer DNA gegenüber $\Delta mgm1$ -Stämmen oder $\Delta mgm1$ -Stämmen, die nur s-Mgm1* oder I-Mgm1* exprimieren, deutlich erhöht (Tabelle 12). Die starke Schwankung zwischen den verschiedenen Sporen der s-Mgm1* und I-Mgm1* koexprimierenden Stämme ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass die zu beobachtende partielle Komplementation den Verlust der Respirationskompetenz zwar verzögert, aber nicht vollständig verhindern kann. Geringfügige Schwankungen

3 Ergebnisse

in der Geschwindigkeit des mitochondrialen DNA–Verlusts zwischen verschiedenen Sporen könnten für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sein. Für $\Delta mgm1$ -Stämme und $\Delta mgm1$ -Stämme, die nur eine der artifiziellen Isoformen exprimieren, wurde niemals ein Wachstum auf YPG und immer nur ein sehr geringer Gehalt an mtDNA beobachtet.

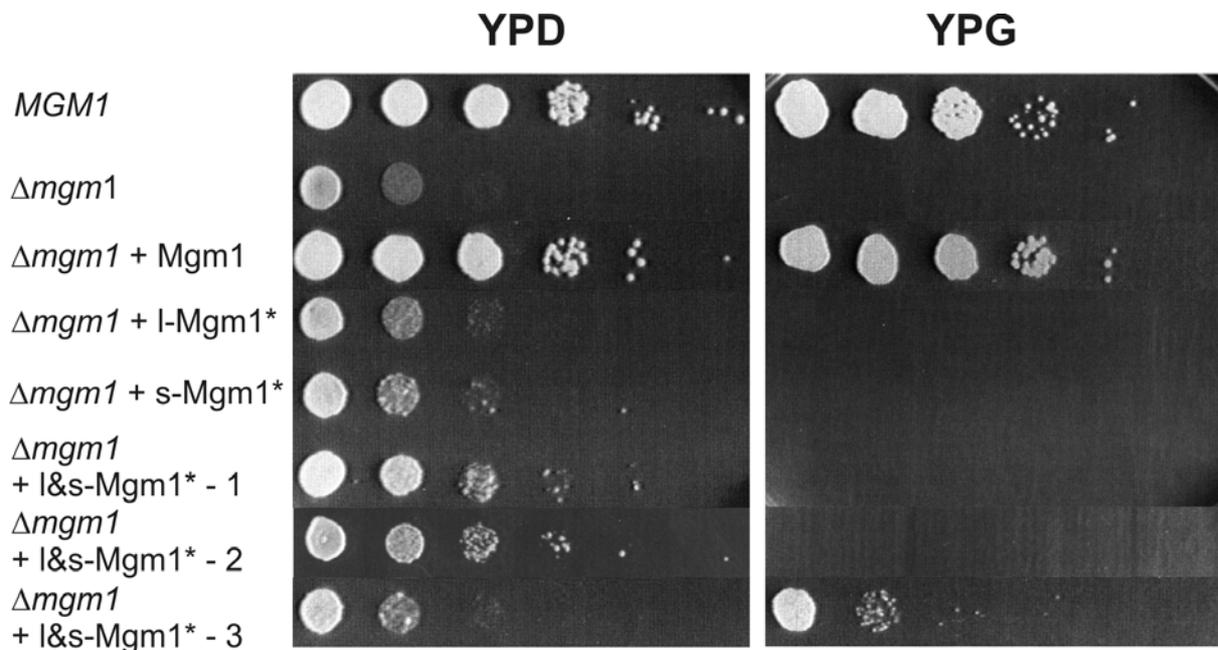


Abbildung 18 Koexpression von *I-Mgm1 und *s-Mgm1**, nicht aber Expression von *I-Mgm1** oder *s-Mgm1** alleine, kann in $\Delta mgm1$ -Stämmen die Respirationskompetenz teilweise wieder herstellen.** Die Stämme wurden bei 30 °C bis zur mittleren exponentiellen Phase angezogen, aufeinanderfolgenden zehnfachen Verdünnungsschritten unterzogen und auf YPD- und YPG-Platten getüpfelt. Drei von verschiedenen Sporen abgeleitete $\Delta mgm1$ -Stämme, die *I-Mgm1** und *s-Mgm1** koexprimieren, sind abgebildet.

Aufgrund dieser Daten ist auch *I-Mgm1** zumindest teilweise funktional. Darüber hinaus kann nur die Koexpression beider artifizieller Isoformen, nicht aber die Expression einer der beiden artifiziellen Isoformen alleine, den $\Delta mgm1$ -Phänotyp erleichtern. Für eine volle Funktionalität von *Mgm1* sind also beide Isoformen notwendig.

3 Ergebnisse

Stamm	Mitochondriale Struktur in % der Zellen		Gehalt an mtDNA	
	Wildtyp/Tubulär		Wachstum auf YPG	rho ⁺ Zellen (%)
WT <i>MGM1</i>	77,7±2,2		+++	86,9±1,7
Δ <i>mgm1</i>	2,8±1,2		-	8,8±1,8
Δ <i>mgm1</i> +Mgm1	70,4±8,3		+++	89,8±4,1
Δ <i>mgm1</i> +l-Mgm1*	5,7±1,5		-	10,1±3,2
Δ <i>mgm1</i> +s-Mgm1*	3,7±0,9		-	14,7±8,5
Δ <i>mgm1</i> -1	19,3±2,7		-	31,5±8,1
Δ <i>mgm1</i> -2	30,9±5,6		-	23,9±4,7
Δ <i>mgm1</i> -3	4,8±0,3		+	60,6±3,9

Tabelle 12: Komplementationsanalyse von l-Mgm1* und s-Mgm1* in Δ mgm1. Der prozentuale Anteil von Zellen mit Wildtyp-ähnlicher mitochondrialer Morphologie wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Der Anteil an Zellen, die mitochondriale DNA enthielten (rho⁺), wurde durch Färbung mit DAPI und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Quantifizierung der Phänotypen erfolgte in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 150 Zellen, ohne dass die Identität des untersuchten Stammes während des Experiments bekannt war. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben. Die Respirationskompetenz wurde durch Wachstumsversuche auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPG) getestet (vgl. Abbildung 18).

3.3 Koordinierte Bildung beider Isoformen

Die Notwendigkeit beider Isoformen von Mgm1 für die Funktion wirft unmittelbar die Frage auf, wie ihre koordinierte Bildung in einem Mengenverhältnis von ungefähr 1:1 gewährleistet wird. Mit dieser Fragestellung eng verknüpft ist, dass trotz der durch N-terminale Sequenzierung mit hoher Sicherheit bestimmten Identität von s-Mgm1 eine Spaltung von Mgm1 in der N-terminalen hydrophoben Region (Aminosäurereste 94-113 von Mgm1) vorgeschlagen wurde (McQuibban *et al.*, 2003). Eine Spaltung an dieser Position hätte ein N-terminal um 60 Aminosäurereste längeres s-Mgm1 zur Folge. Dieser Vorschlag beruhte auf der fehlenden Prozessierung einer mutierten Version von Mgm1, in der die Aminosäurereste GGM an den Positionen 100-102 im

3 Ergebnisse

N-terminalen hydrophoben Bereich gegen die Aminosäurereste VVL ausgetauscht waren (McQuibban *et al.*, 2003).

3.3.1 s-Mgm1 entsteht direkt durch Prozessierung durch Pcp1 ohne Beteiligung einer weiteren Protease

Eine mögliche Erklärung dieses Widerspruchs ist die Notwendigkeit einer zweiten Protease für die Entstehung von s-Mgm1. Demnach würde Mgm1 zunächst im N-terminalen hydrophoben Segment durch Pcp1 gespalten. In einem zweiten Schritt, der die initiale Pcp1-Spaltung benötigt, würde das resultierende Produkt durch eine bisher unbekannte mitochondriale Protease zu s-Mgm1 prozessiert. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die artifizielle Isoform für I-Mgm1, I-Mgm1*, in einem $\Delta mgm1$ und in einem $\Delta pcp1$ -Hintergrund exprimiert. Die fehlende Prozessierung von I-Mgm1* zu s-Mgm1 wäre nach diesem Modell nicht durch Deletion der Schnittstelle für Pcp1 verursacht, sondern durch Deletion der Schnittstelle für die zweite noch unbekannte Protease. Pcp1-Prozessierung wäre in diesem Fall noch möglich. Daher sollte I-Mgm1* in einem $\Delta mgm1$ -Hintergrund, in dem Pcp1 aktiv ist und I-Mgm1* nach der Aminosäure G₁₀₀ spalten könnte, ein um etwa 2,0-2,5 kD (entsprechend den Aminosäureresten 81-100 von Mgm1) geringeres Molekulargewicht haben als in einem $\Delta pcp1$ -Hintergrund, in dem die initiale Spaltung durch Pcp1 nicht möglich ist.

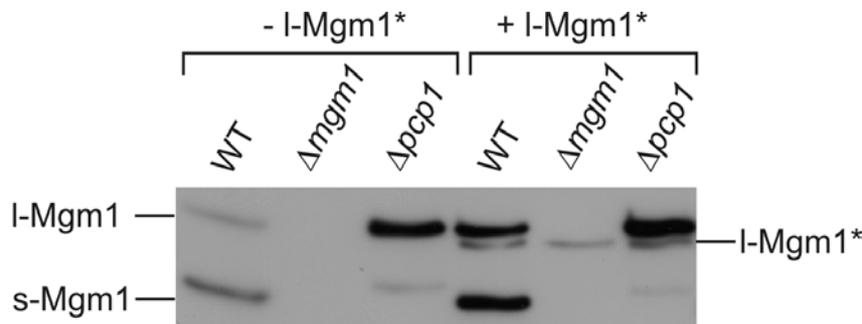


Abbildung 19: I-Mgm1* kann nicht durch Pcp1 prozessiert werden. I-Mgm1* wurde in Wildtyp-Hefe, $\Delta mgm1$ - und $\Delta pcp1$ -Stämmen exprimiert. Gesamtzellextrakte der angegebenen Stämme wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. I-Mgm1* hat in Wildtyp-, $\Delta mgm1$ - und $\Delta pcp1$ -Stämmen die gleiche Größe.

Tatsächlich ist das Laufverhalten von I-Mgm1* in Wildtyp-, $\Delta mgm1$ und $\Delta pcp1$ -Stämmen jedoch identisch (Abbildung 19). Da I-Mgm1*, dem im Vergleich zu I-Mgm1 14 Aminosäurereste fehlen, auf dem Gel deutlich von endogenem I-Mgm1 getrennt werden konnte, ist das gleiche Laufverhalten von I-Mgm1* im $\Delta mgm1$ - und $\Delta pcp1$ -

3 Ergebnisse

Stamm (hier wäre der zu erwartende Unterschied 20 Aminosäurereste) nicht durch ein mangelndes Auflösungsvermögen des Gels zu erklären. Zusammenfassend entsteht s-Mgm1 nicht durch ein zweites Prozessierungsereignis durch eine unbekannte Protease nach initialer Spaltung durch Pcp1 im N-terminalen hydrophoben Segment. Vielmehr ist Pcp1 direkt für die Erzeugung von s-Mgm1 verantwortlich.

3.3.2 Mgm1 hat zwei konservierte hydrophobe Bereiche in der Nähe des N-Terminus

In Übereinstimmung mit einer direkten Entstehung von s-Mgm1 durch Pcp1-Spaltung nach dem 160. Aminosäurerest von Mgm1 gibt es in der Region von den Aminosäureresten 154-167 einen zweiten, bisher nicht erkannten hydrophoben Bereich (Abbildung 20). Wie das N-terminale hydrophobe Segment (Aminosäurereste 94-113) erfüllt auch dieser zweite hydrophobe Bereich mit einer mittleren Hydrophobizität und der Präsenz helixbrechender Aminosäurereste die Kriterien, die für die Substratspezifität von Rhomboid-Proteasen aufgestellt wurden (Urban und Freeman, 2003). Darüber hinaus ist die Präsenz zweier hydrophober Segmente am N-Terminus von Mgm1 und seiner orthologen Proteine zwischen verschiedenen Spezies von *S. cerevisiae* bis *H. sapiens* konserviert (Abbildung 20).

3.3.3 Der weiter C-terminal gelegene hydrophobe Bereich wird von Pcp1 gespalten

Um zu untersuchen, ob das erste hydrophobe Segment notwendig für die Pcp1-Prozessierung ist, wurden Mgm1-Mutanten konstruiert, in denen das erste oder das zweite oder beide hydrophoben Segmente deletiert waren, und unter Kontrolle des endogenen *MGM1*-Promotors vom Plasmid pRS315 (pRS315-Mgm1 Δ 1, pRS315-Mgm1 Δ 2 (pRS315-I-Mgm1*), pRS315-Mgm1 Δ 1& Δ 2) in einem Δ *mgm1*/ Δ *mgm1*-Hintergrund exprimiert. Die Deletion des zweiten hydrophoben Segments (Mgm1 Δ 2; I-Mgm1*) führte zum Verlust der Prozessierung (Abbildung 21, vgl. 3.2.6). Genausowenig wurde eine Version von Mgm1 prozessiert, in der beide hydrophoben Segmente deletiert waren (Mgm1 Δ 1& Δ 2). Dagegen führte die Deletion lediglich des ersten hydrophoben Segments zu einer vollständigen Prozessierung des gesamten Mgm1 zu s-Mgm1 (Abbildung 21).

3 Ergebnisse

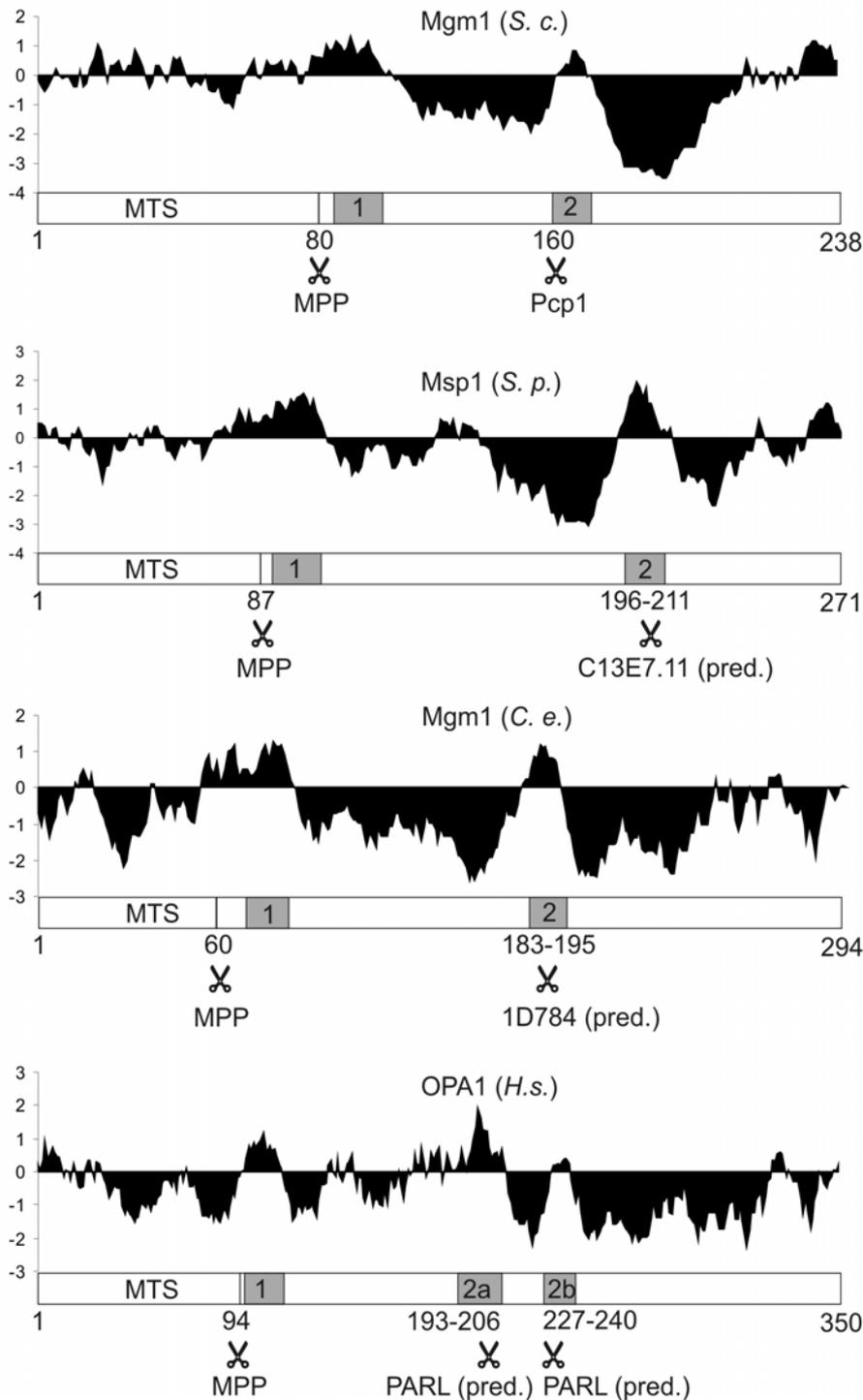


Abbildung 20: Hydrophobizitätsanalyse des N-Terminus von Mgm1 und seiner Orthologen nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982). Die Nummern unterhalb der Hydrophobizitätsprofile geben die Positionen der Aminosäurereste an, nach denen die Spaltung durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) oder die mitochondriale Rhomboid-Protease erfolgt. pred.; vorhergesagte Rhomboid-Proteasen und Spaltregionen. *S. c.*, *Saccharomyces cerevisiae*; *S. p.*, *Schizosaccharomyces pombe*; *C. e.*, *Caenorhabditis elegans*; *H. s.*, *Homo sapiens*. MTS, mitochondriale Signalsequenz. Im Fall von OPA1 wurde Spleißvariante 8 analysiert.

3 Ergebnisse

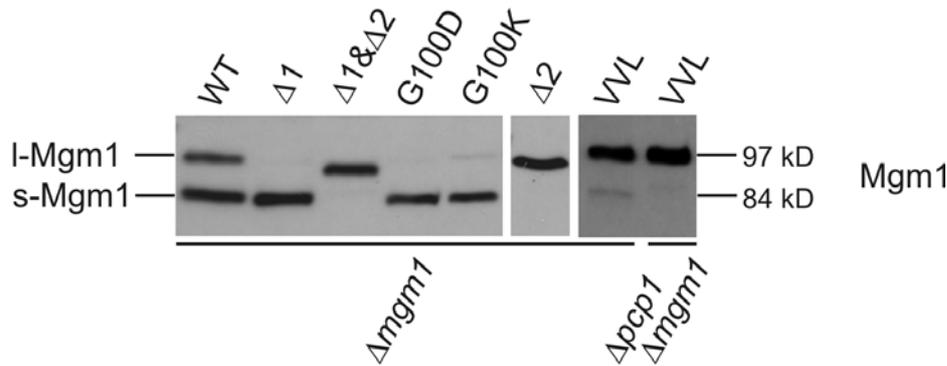


Abbildung 21: Die Hydrophobizität des N-terminalen hydrophoben Segments von Mgm1 bestimmt die Prozessierungseffizienz zu s-Mgm1. Gesamtzellextrakte von $\Delta mgm1$ -Stämmen (oder einem $\Delta pcp1\Delta mgm1$ -Stamm), die die angegebenen Versionen von Mgm1 exprimieren, wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Die l-Mgm1 und s-Mgm1 entsprechenden Banden sind markiert. Mgm1-Versionen: WT, Wildtyp; $\Delta 1$, Deletion des ersten hydrophoben Segments (Aminosäurereste 91-111); $\Delta 2$, Deletion des zweiten hydrophoben Segments (Aminosäurereste 154-167); $\Delta 1\&\Delta 2$, Deletion beider hydrophober Segmente; G100D, G100K, entsprechende Punktmutationen; VVL, drei aufeinanderfolgende Aminosäurereste GGM an den Positionen 100-102 von Mgm1 wurden gegen VVL ausgetauscht.

Das erste hydrophobe Segment ist für die Prozessierung von Mgm1 und die Erzeugung von s-Mgm1 also nicht notwendig. In Übereinstimmung mit weiter oben beschriebenen Ergebnissen liegt die Schnittstelle im zweiten hydrophoben Segment und s-Mgm1 entsteht direkt durch Pcp1-Prozessierung in diesem Bereich.

3.3.4 Die Hydrophobizität des N-terminalen Transmembransegments von Mgm1 hat entscheidenden Einfluss auf die Prozessierungseffizienz

Dennoch scheint auch das erste hydrophobe Segment, Einfluss auf die Prozessierungseffizienz zu haben. So führte die Deletion dieses Segments zu vollständiger Prozessierung von Mgm1 zu s-Mgm1 (vgl. 3.3.3). Insbesondere konnte in Übereinstimmung mit Daten von McQuibban *et al.*, 2003 bestätigt werden, dass Mgm1VVL, eine Variante von Mgm1, in der die Aminosäurereste GGM an den Positionen 100-102 gegen VVL ausgetauscht waren, sehr ineffizient prozessiert wird (Abbildung 21). Im Gegensatz zu dieser Studie war aber eine schwache Prozessierung von Mgm1VVL in einem $\Delta mgm1$ -Hintergrund zu beobachten, welche in einem $\Delta pcp1\Delta mgm1$ -Stamm nicht auftrat und somit spezifisch durch Pcp1 erfolgte. Mgm1VVL kann offenbar prinzipiell noch durch Pcp1 gespalten werden. Durch die Mutation der Aminosäurereste GGM im ersten hydrophoben Segment zu den Aminosäureresten VVL wird dieses Segment wesentlich hydrophober als das entsprechende Wildtyp-Segment. Daher könnte die Hydrophobizität dieses Segments den

3 Ergebnisse

Einfluss auf die Prozessierungseffizienz ausüben. Um den Einfluss der Hydrophobizität des ersten hydrophoben Segments genauer zu untersuchen, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese Punktmutationen in dieses Segment eingeführt, die im Austausch von Glycin an Position 100 gegen Lysin oder Aspartat resultierten. Durch Einführung dieser positiven oder negativen Ladung wird der Bereich wesentlich hydrophiler. Gesamtzellextrakte der Mutanten Mgm1G100K und Mgm1G100D zeigen fast vollständige (G100K) oder vollständige Umwandlung (G100D) von Mgm1 in s-Mgm1. Die Hydrophobizität des weiter N-terminal gelegenen hydrophoben Segments determiniert das Ausmaß der Prozessierung von I-Mgm1 zu s-Mgm1. Die mittlere Hydrophobizität der Wildtyp-Sequenz gewährleistet eine koordinierte Bildung beider Isoformen in einem Verhältnis von ungefähr 1:1.

3.3.5 Die submitochondriale Lokalisierung bleibt von Mutationen in beiden hydrophoben Segmenten unbeeinflusst

Um zu untersuchen, ob die Mutationen in den beiden hydrophoben Segmenten die submitochondriale Lokalisierung dieser Varianten von Mgm1 beeinflussen, wurden Proteaseschutzexperimente in Mitochondrien und Mitoplasten durchgeführt, die aus den entsprechenden Stämmen isoliert worden waren. Außerdem wurde mittels Salz- und Carbonatextraktionsexperimenten untersucht, ob sich die Membranassoziation der entstehenden Isoformen von der von endogenem I-Mgm1 bzw. s-Mgm1 unterscheidet. In allen Fällen zeigten sich die entstehenden Mgm1-Isoformen in Mitochondrien resistent gegen die Behandlung mit Proteinase K (Abbildung 22). Nach selektivem Öffnen der Außenmembran durch hypoosmotischen Schock wurden die vorhandenen Isoformen von Mgm1 durch Proteinase K abgebaut (Abbildung 22). Lediglich Mgm1 Δ 1 Δ 2 war nach dem Schwellen der Mitochondrien teilweise resistent gegen Proteinase K (Abbildung 22). Durch Dekoration derselben Western-Blots mit Antikörpern gegen das Matrixprotein Mge1 wurde die Integrität der mitochondrialen Innenmembran nach osmotischem Schwellen bestätigt (nicht dargestellt). Die aus den mutierten Versionen von Mgm1 hervorgegangenen Isoformen waren genauso wie die aus endogenem Mgm1 erzeugten Isoformen im Intermembranraum lokalisiert. Nur die Deletion beider hydrophober Segmente (Mgm1 Δ 1 Δ 2) führte zu einer partiellen Misslokalisierung des Proteins in der Matrix.

Auch die Salz- und Carbonatextraktionsexperimente an diesen isolierten Mitochondrien zeigten keine Unterschiede zwischen Isoformen, die aus Wildtyp Mgm1-Vorstufenproteinen erzeugt wurden und solchen, die aus den verschiedenen Varianten entstanden. s-Mgm1 war in allen Fällen partiell mit 1 M NaCl extrahierbar, während sich I-Mgm1 als resistent gegen die Salzextraktion erwies (nicht dargestellt). Für alle Versionen von Mgm1 war der größte Teil beider Isoformen unter diesen Bedingungen mit 0,1 M Na₂CO₃ extrahierbar. In Übereinstimmung mit einer integralen

3 Ergebnisse

Membranassoziation von I-Mgm1 in der Innenmembran war auch das mit dem N-Terminus in der Innenmembran verankerte Protein D-Lactatdehydrogenase unter diesen Bedingungen mit Na_2CO_3 extrahierbar (vgl. 3.1.4). Der ADP/ATP-Transporter AAC2, der die mitochondriale Innenmembran sechs mal durchspannt, zeigte sich resistent gegen alle Extraktionsbedingungen. Zusammenfassend zeigen I-Mgm1 und s-Mgm1 die gleiche Lokalisierung und Membranassoziation, unabhängig davon, ob sie aus Wildtyp Mgm1-Vorstufenproteinen oder einer der verschiedenen Varianten in den beiden hydrophoben Segmenten hervorgegangen sind (mit Ausnahme von Mgm1 Δ 1& Δ 2).

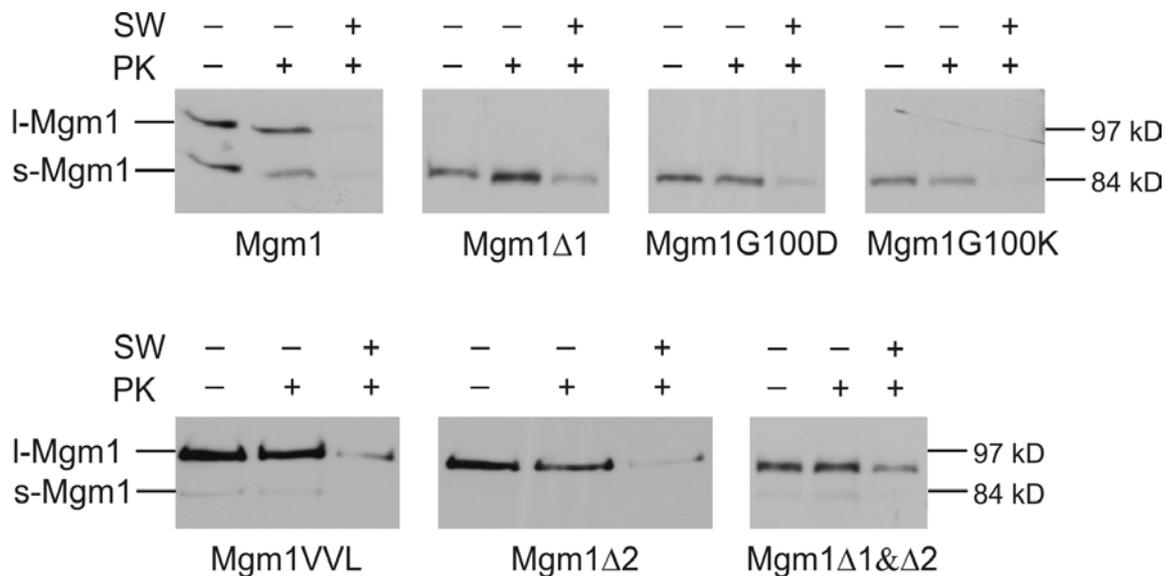


Abbildung 22: Mgm1-Isoformen, die aus Mgm1 Δ 1, Mgm1G100D, Mgm1G100K, Mgm1VVL und Mgm1 Δ 2 generiert wurden, haben die gleiche submitochondriale Lokalisierung wie aus Wildtyp Mgm1 erzeugte Isoformen. A, Aus Δ mgm1-Stämmen, die die angegebenen Varianten von Mgm1 von pRS315 unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimieren, wurden Mitochondrien isoliert und mit 100 μ g/ml Proteinase K (PK) behandelt. In allen Fällen waren die Mgm1-Isoformen in Mitochondrien resistent gegen den Verdau mit PK. Nach selektivem Öffnen der Außenmembran durch hypoosmotischen Schock (SW) wurden die Isoformen von Mgm1 abgebaut. Lediglich Mgm1 Δ 1& Δ 2 zeigte sich unter diesen Bedingungen partiell resistent gegen Proteinase K.

3.3.6 Mutationen im N-terminalen Transmembransegment führen zu einer Verschiebung des Verhältnisses beider Isoformen und zum Verlust der tubulären mitochondrialen Struktur

In den in 3.3.3 und 3.3.4 beschriebenen Versionen von Mgm1, Mgm1 Δ 1, Mgm1 Δ 2 (I-Mgm1*), Mgm1 Δ 1& Δ 2, Mgm1VVL, Mgm1G100D und Mgm1G100K weicht das Verhältnis beider Mgm1-Isoformen deutlich vom normalen Verhältnis von 1:1 ab. Im Wesentlichen ist jeweils entweder nur I-Mgm1 oder nur s-Mgm1 vorhanden. Da beide

3 Ergebnisse

Isoformen für die Funktion von Mgm1 essentiell sind (vgl. 3.2.6), ist in diesen Fällen eine veränderte Struktur der Mitochondrien zu erwarten. Die Stämme, die die entsprechenden Versionen von Mgm1 in einem $\Delta mgm1$ -Hintergrund exprimieren, wurden zusätzlich mit pVT100U-mtGFP transformiert, um die mitochondriale Morphologie zu untersuchen. Exponentiell wachsende Kulturen dieser Mutanten wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert, und die Morphologiephänotypen wurden quantitativ ausgewertet (Abbildung 23). Tatsächlich ist nur Wildtyp-Mgm1 in der Lage die tubuläre mitochondriale Struktur zu erhalten. Alle Versionen von Mgm1, die ausschließlich oder fast ausschließlich in der Expression einer Isoform resultieren, zeigen überwiegend fragmentierte oder aggregierte Mitochondrien (Abbildung 23). Diese Beobachtung untermauert zusätzlich die Notwendigkeit beider Mgm1-Isoformen für dessen Funktion.

A

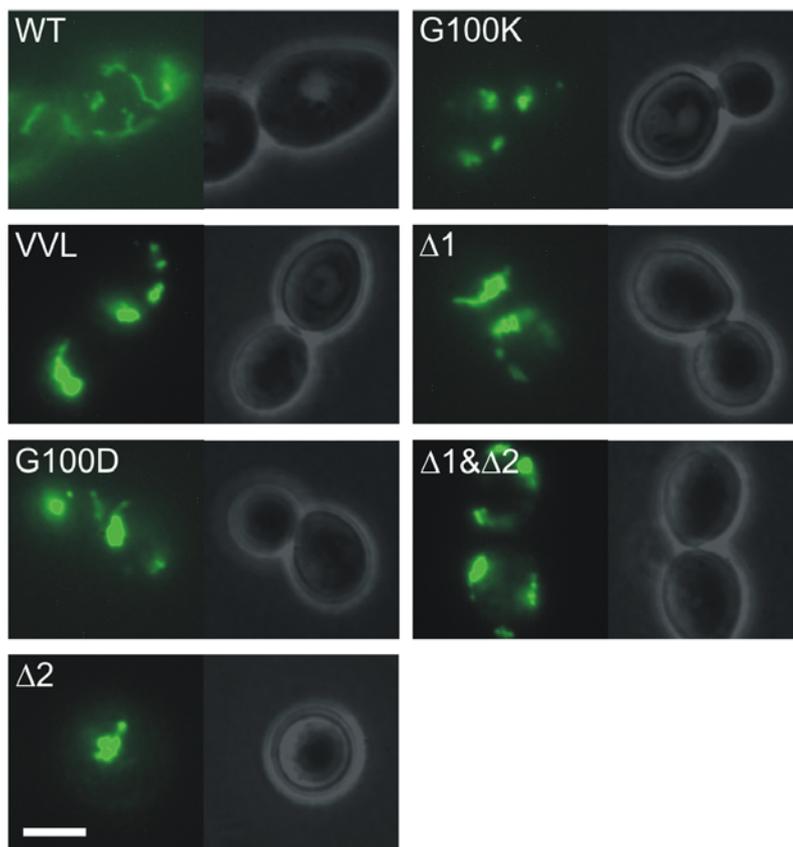
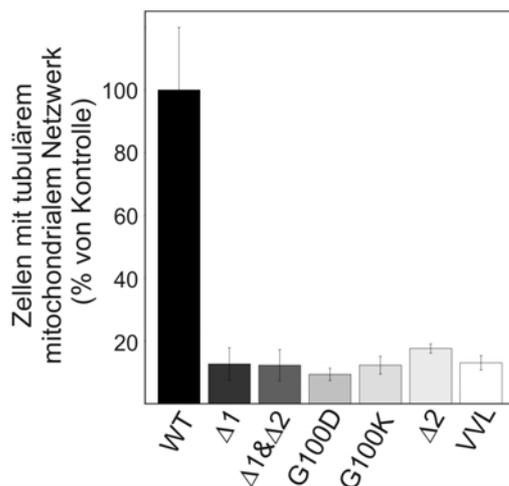


Abbildung 23: Die mitochondriale Struktur von $\Delta mgm1$ -Stämmen, die die angegebenen Varianten von Mgm1 (zusammen mit mtGFP) exprimieren, wurde untersucht. A, repräsentative Fluoreszenz- (links) und Phasenkontrastbilder (rechts). Balken, 5 μm . **B**, Quantifizierung der Morphologiephänotypen der Stämme in (A) für mindestens 150 Zellen in drei unabhängigen Experimenten. Der Anteil der Zellen, die ein Wildtyp-ähnliches tubuläres mitochondriales Netzwerk zeigen, ist im Verhältnis zu dem des Kontrollstammes angegeben, der Wildtyp-Mgm1 exprimiert.

B



3.3.7 Ein funktionaler Importmotor an der mitochondrialen Innenmembran ist notwendig für die Erzeugung von s-Mgm1

Bei der Biogenese von I-Mgm1 dient das erste hydrophobe Segment von Mgm1 als Stopp-Transfer-Signal im TIM17/TIM23-Translokationskanal. Laterale Insertion dieses N-terminalen hydrophoben Segments in die Innenmembran führt dann zu Bildung von I-Mgm1 (Herlan *et al.*, 2003; vgl. 3.1.4). In diesem Fall könnte die Spaltstelle im zweiten hydrophoben Segment die Prozessierungsprotease Pcp1 in der Innenmembran nicht erreichen und I-Mgm1 könnte nicht mehr durch Pcp1 prozessiert werden. Um eine Prozessierung zu ermöglichen, müsste der Translokationsarrest überwunden und das Vorstufenprotein von Mgm1 weiter importiert werden, bis das zweite hydrophobe Segment die Innenmembran erreicht. Dieser Prozess sollte von der Funktion des Importmotors in der mitochondrialen Matrix abhängen.

Der mitochondriale Importmotor besteht aus den essentiellen Komponenten Tim44, mitochondrialem Hsp70 (Ssc1) und dessen Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Cyr *et al.*, 1993; Neupert und Brunner, 2002; Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994; Stuart *et al.*, 1994; Voos *et al.*, 1994). Vor kurzem wurden Tim14 (Pam18), welches eine J-Domäne enthält, und das ebenfalls DnaJ-ähnliche Tim16 (Pam16) als neue essentielle Komponenten des mitochondrialen Importmotors identifiziert (Frazier *et al.*, 2004; Kozany *et al.*, 2004; Mokranjac *et al.*, 2003b; Truscott *et al.*, 2003). Letzterem fehlt allerdings die HPD-Signatur zur Aktivierung der ATPase-Aktivität von mitochondrialem Hsp70. Zusammen vermitteln diese Komponenten den ATP getriebenen Import von Vorstufenproteinen in die mitochondriale Matrix.

3 Ergebnisse

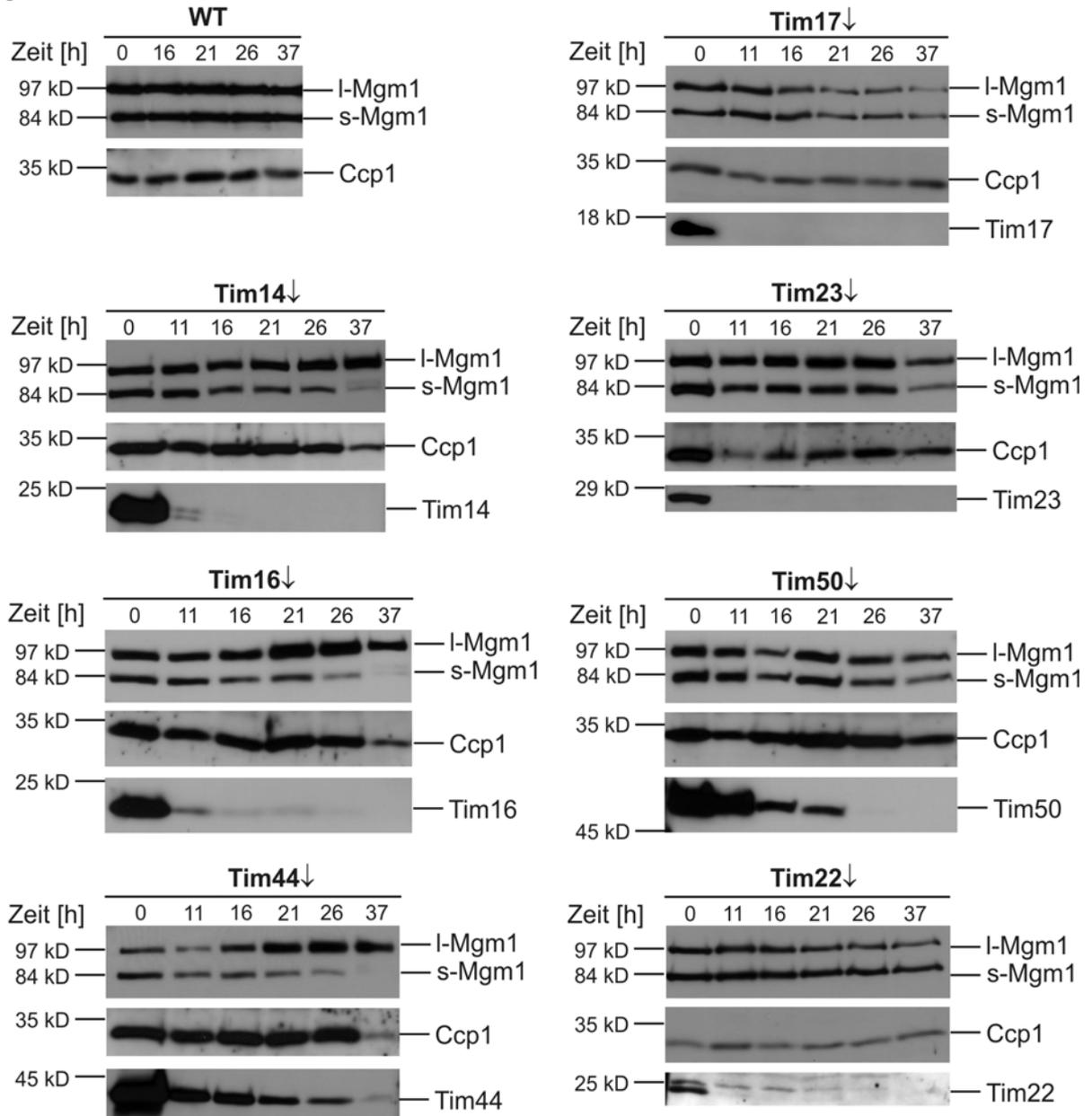
3.3.7.1 Tim14, Tim16 und Tim44 sind notwendig für die Erzeugung von s-Mgm1

Um den Einfluss des Importmotors auf die Bildung von s-Mgm1 zu untersuchen, wurden Stämme, in denen die Komponenten Tim14, Tim16 und Tim44 unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors standen, auf Lactat-Medium mit 0,1 % (w/v) Galaktose angezogen. In exponentiell wachsenden Kulturen dieser Stämme wurde dann das Medium gegen Lactat-Medium mit 0,1 % (w/v) Glukose ausgetauscht und so die Expression von Tim14, Tim16 oder Tim44 reprimiert. Vor dem Wechsel des Mediums und zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Wechsel des Mediums wurden Proben entnommen, Gesamtzellextrakte präpariert und durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert (Abbildung 24A). Tatsächlich war ab dem Zeitpunkt 16 h nach Beginn der Repression von Tim14, Tim16 oder Tim44 eine verminderte Bildung von s-Mgm1 zu beobachten. Im weiteren Verlauf der Herunterregulation wurde der Effekt jeweils zunehmend stärker. Die Bildung von l-Mgm1 war nicht behindert oder wurde sogar begünstigt. Tim14 und Tim16 waren bereits nach Herunterregulation für 16 Stunden nicht mehr nachweisbar (Abbildung 24A). Die Expression von Tim44 nimmt durch die Glukoserepression ebenfalls stark ab, Spuren von Tim44 sind jedoch auch nach Herunterregulation für 37 h noch nachweisbar (Abbildung 24A). Die Stabilität der jeweiligen anderen Komponenten des Importmotors oder des TIM17/TIM23-Komplexes wird durch Herunterregulation einer dieser Komponenten nicht oder nur geringfügig beeinflusst (Kozany *et al.*, 2004; Milisav *et al.*, 2001; Mokranjac *et al.*, 2003b).

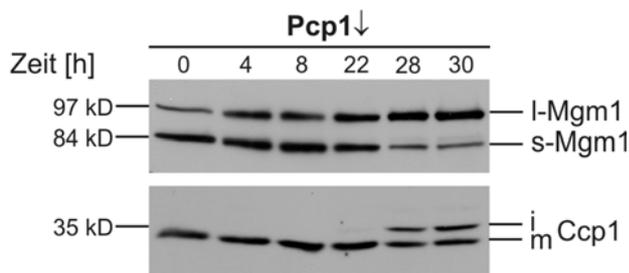
Abbildung 24: Ein funktionaler Importmotor ist notwendig für die Biogenese von Mgm1. A, Nach den angegebenen Zeiträumen der Herunterregulation der angegebenen Proteine wurden den Kulturen Aliquots entnommen, Gesamtzellextrakte präpariert und nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Antikörpern gegen Mgm1, Ccp1 und die jeweilige herunterregulierte Komponente dekoriert. Die vollständige Prozessierung von Ccp1 zeigt, dass Pcp1 nicht limitierend für die Prozessierung von Mgm1 ist. **B,** Nach den angegebenen Zeiträumen der Herunterregulation von Pcp1 wurden der Kultur Aliquots entnommen, Gesamtzellextrakte präpariert und nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Antikörpern gegen Mgm1 und Ccp1 dekoriert. Die Akkumulation des Intermediats von Ccp1 beginnt gleichzeitig mit dem Verlust der Mgm1-Prozessierung. i, Intermediat und m, reife Form von Ccp1.

3 Ergebnisse

A



B



3 Ergebnisse

Um eine verminderte Bildung von s-Mgm1 aufgrund eines verminderten Imports und damit verminderter Aktivität von Pcp1 auszuschließen, wurden dieselben Western-Blots mit Antikörpern gegen Ccp1 dekoriert (Abbildung 24A). Ccp1 ist das einzige weitere bekannte Substrat von Pcp1. Die Deletion von *PCP1* resultiert in der Akkumulation eines Intermediats von Ccp1 (i in Abbildung 24B; Esser *et al.*, 2002). Wenn Pcp1 unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors reprimiert wurde, war die Akkumulation dieses Intermediats und die verminderte Bildung von s-Mgm1 gleichzeitig zu beobachten. Die Prozessierung von Mgm1 und Ccp1 ist in gleichem Ausmaß betroffen, wenn die Pcp1-Aktivität limitierend wird. Bei der Herunterregulation von Tim14, Tim16 und Tim44 ist die Prozessierung von Ccp1 nicht betroffen, d.h. eine Akkumulation des Intermediats von Ccp1 ist nicht zu beobachten (Abbildung 24A). Ein indirekter Effekt aufgrund verringerter Aktivität von Pcp1 liegt also nicht vor. Damit sind die Komponenten des Importmotors, Tim14, Tim16 und Tim44 notwendig für die Erzeugung von s-Mgm1.

Tim17 und Tim23 sind ebenfalls essentielle mitochondriale Proteine. Im Gegensatz zu Tim14, Tim16 und Tim44 sind sie aber nicht Bestandteil des Importmotors auf der Matrixseite der Mitochondrien. Vielmehr bilden sie den Translokationskanal des TIM17/TIM23-Komplexes in der inneren Mitochondrienmembran (Moro *et al.*, 1999; Neupert und Brunner, 2002; Truscott *et al.*, 2001). Auch Tim50 ist essentieller Bestandteil des TIM17/TIM23-Komplexes. Tim50 tritt als erste Komponente des TIM17/TIM23-Komplexes mit der Präsequenz eines zu importierenden Proteins in Kontakt. Es hat wahrscheinlich eine Chaperone-ähnliche Funktion bei der Weitergabe des Präproteins vom TOM-Komplex an den TIM17/TIM23-Translokationskanal (Geissler *et al.*, 2002; Mokranjac *et al.*, 2003a; Yamamoto *et al.*, 2002). Nach Herunterregulation von Tim17 sind die Mengen beider Isoformen von Mgm1 reduziert (Abbildung 24A). Die Herunterregulation von Tim23 und Tim50 betrifft die Bildung von s-Mgm1 nur leicht und die Bildung von l-Mgm1 ist ebenfalls betroffen (Abbildung 24A). Um die Effizienz der Depletion dieser Komponenten zu kontrollieren, wurden dieselben Western-Blots jeweils auch mit Antikörpern gegen Tim17, Tim23 oder Tim50 dekoriert. Tim17 und Tim23 sind bereits nach 11 h Herunterregulation nicht mehr nachweisbar, während Tim50 erst nach 26 h nicht mehr detektiert werden kann (Abbildung 24A). Die Herunterregulation einer dieser drei Komponenten des TIM17/TIM23-Komplex hat keinen oder nur geringen Einfluss auf die Stabilität der anderen beiden Komponenten oder auf die Stabilität der Komponenten des Importmotors (Milisav *et al.*, 2001; Mokranjac *et al.*, 2003a). Die Prozessierung von Ccp1 ist in keinem der Experimente betroffen. Pcp1 ist in keinem Fall limitierend für die Prozessierung von Mgm1. Tim17, Tim23 und Tim50 werden für die Biogenese beider Isoformen von Mgm1 benötigt.

Tim22 ist eine Komponente des TIM22/TIM54-Komplexes. Dieser Komplex ist ebenfalls essentiell. Zusammen mit den kleinen Tim-Proteinen im Intermembranraum

3 Ergebnisse

(TIM9/TIM10-Komplex und/oder TIM8/TIM13-Komplex) vermittelt er die Insertion in die Innenmembran von hydrophoben Proteinen mit interner Signalsequenz, v.a. aus der Familie der mitochondrialen Substrat-Transporter (Adam *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 1998a; Koehler *et al.*, 1998b; Leuenberger *et al.*, 1999; Paschen *et al.*, 2000; Sirrenberg *et al.*, 1996). Obwohl Tim22 effizient depletiert wurde und bereits nach Herunterregulation für 11 h nicht mehr nachweisbar war, war kein Effekt auf die Biogenese von Mgm1 zu beobachten (Abbildung 24A). Die Prozessierung von Ccp1 blieb ebenfalls unbeeinflusst. Der TIM22/TIM54-Komplex ist demnach nicht in die Biogenese von Mgm1 involviert. Ein solches Verhalten ist für Proteine mit N-terminaler Signalsequenz zu erwarten. Darüber hinaus ist die Reduktion der Menge von s-Mgm1 keine generelle Konsequenz der Herunterregulation eines essentiellen mitochondrialen Proteins.

3.3.7.2 Ein funktionaler Importmotor ist notwendig für eine normale tubuläre mitochondriale Struktur

Das Fehlen einer Isoform von Mgm1 führt zu einer gestörten mitochondrialen Morphologie (Herlan *et al.*, 2003; vgl. 3.2.7). Nach der Herunterregulation von Tim14, Tim16 und Tim44 weicht das Verhältnis zwischen den beiden Isoformen von Mgm1 deutlich von 1:1 ab. Auch hier könnte die mitochondriale Morphologie betroffen sein. Um die mitochondriale Morphologie in diesen Stämmen zu untersuchen, wurden dieselben mit pVT100U-mtGFP transformierten Stämme zu den gleichen Zeitpunkten wie in 3.3.7.1 fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abbildung 25AB). Die Herunterregulation von Tim14, Tim16 und Tim44 führte schnell zur Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien. Unter diesen Bedingungen war die Bildung von s-Mgm1 stark reduziert (vgl. 3.3.7.1). Auch die Herunterregulation von Tim17 und Tim23 führte zur Fragmentierung und Aggregation von Mitochondrien (Abbildung 25AB). In diesem Fall sind wahrscheinlich reduzierte Mengen beider Mgm1-Isoformen dafür verantwortlich. Möglicherweise werden Tim17 und/oder Tim23 aber für den Import weiterer Proteine benötigt, die für die Erhaltung der mitochondrialen Struktur wichtig sind und daher zu diesem Effekt beitragen. Letzteres gilt insbesondere für Tim23, da der Effekt der Herunterregulation von Tim23 auf die Biogenese von Mgm1 nicht sehr ausgeprägt ist (vgl. 3.3.7.1). Herunterregulation von Tim50 zeigte den schwächsten Effekt auf die mitochondriale Morphologie (Abbildung 25AB). Erst nach 37 h Herunterregulation zeigt ein großer Teil der Zellen fragmentierte und/oder aggregierte Mitochondrien. Hier war auch der Effekt auf die Biogenese beider Mgm1-Isoformen am geringsten (vgl. 3.3.7.1). In Übereinstimmung mit dem fehlenden Effekt der Herunterregulation von Tim22 auf die Biogenese von Mgm1 war in diesem Fall kein Effekt auf die mitochondriale Morphologie zu beobachten. Das impliziert weiter, dass keine andere Komponente, die für die Erhaltung der normalen

3 Ergebnisse

mitochondrialen Morphologie notwendig ist, den TIM22/TIM54-Komplex für ihre Biogenese zu benötigen scheint.

A

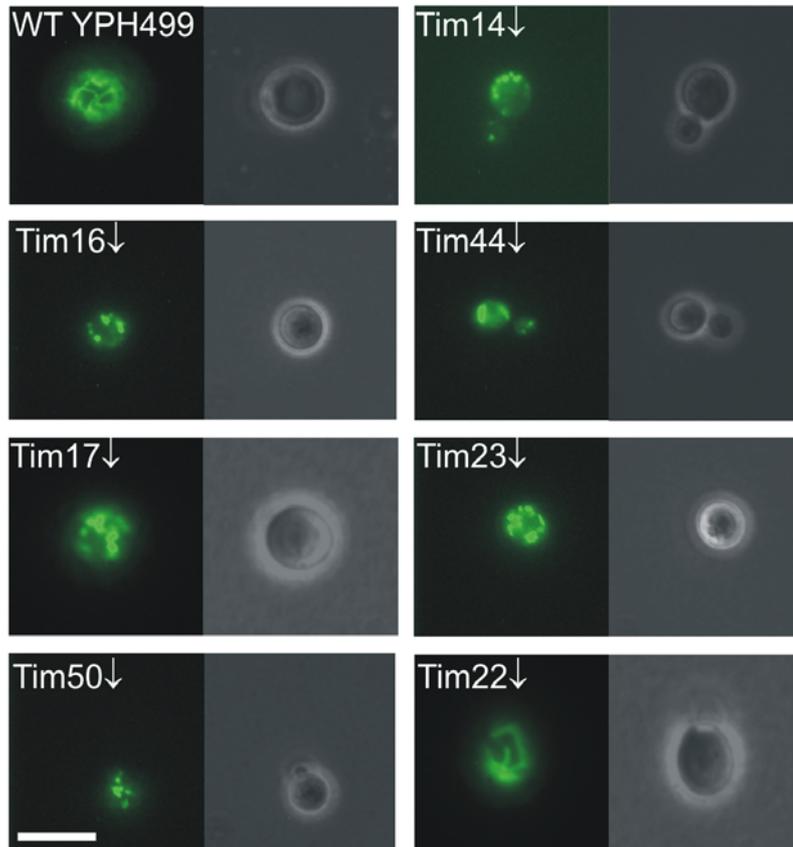
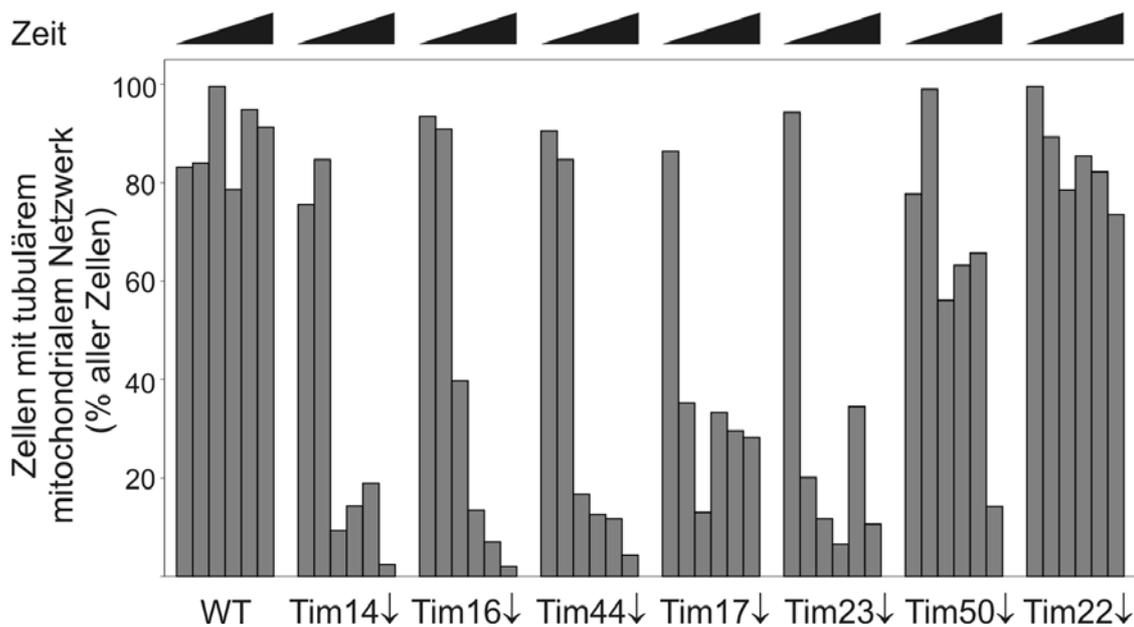


Abbildung 25: Ein funktionaler Importmotor ist notwendig für die Erhaltung der mitochondrialen Morphologie. Nach den angegebenen Zeiträumen der Herunterregulation der angegebenen Proteine wurden den Kulturen Aliquots entnommen und diese fluoreszenzmikroskopisch analysiert. **A**, Repräsentative Fluoreszenz- (links) und Phasenkontrastbilder (rechts) nach Herunterregulation der jeweiligen Proteine (Tim14↓, Tim16↓, Tim44↓, Tim17↓, Tim23↓, Tim50↓, Tim22↓). WT YPH499, genauso behandelter Wildtyp-Stamm. Balken, 5 μ m. **B**, Quantifizierung der mitochondrialen Morphologiephänotypen für die herunterregulierten Stämme aus **(A)**. Mindestens 150 Zellen wurden für jeden Zeitpunkt analysiert.

3 Ergebnisse

B



3.3.7.3 Mitochondriales Hsp70 ist notwendig für die Erzeugung von s-Mgm1

Eine weitere essentielle Komponente des mitochondrialen Importmotors ist mitochondriales Hsp70 (Ssc1) (Gambill *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 1990; Ostermann *et al.*, 1990; Schneider *et al.*, 1994). Für Ssc1 wurden zwei temperatursensitive Mutanten, *ssc1-2* und *ssc1-3*, beschrieben. Bei der permissiven Temperatur von 24 °C zeigen die mutierten Proteine im Wesentlichen normale Funktion, bei der restriktiven Temperatur von 37 °C verlieren sie ihre Funktion vollständig (Gambill *et al.*, 1993). Die Mutation liegt im *ssc1-2*-Stamm in der Peptidbindungsdomäne von Ssc1 und führt bei der restriktiven Temperatur zum Verlust der Interaktion von Ssc1 mit Tim44. Die Interaktion von Ssc1 mit Präproteinen bleibt in diesem Stamm jedoch erhalten (Gambill *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1994; Voos *et al.*, 1996). In der *ssc1-3*-Mutante ist die ATP-Bindungsdomäne von Ssc1 betroffen (Gambill *et al.*, 1993). Dadurch wird die vom Nukleotidstatus abhängige Dissoziation von Ssc1 von Tim44 verhindert (Schneider *et al.*, 1994; Voos *et al.*, 1996).

In temperatursensitiven Mutanten von mtHsp70 geht die Funktion des Importmotors wesentlich schneller verloren als bei der Herunterregulation essentieller Motor-komponenten. Mögliche sekundäre Effekte fallen deshalb in der Regel geringer aus. Die Stämme wurden auf selektivem Medium mit 2 % Glukose als Kohlenstoffquelle bei der permissiven Temperatur von 24 °C bis in die Mitte der exponentiellen Phase angezogen. Dann wurde die Temperatur auf 37 °C erhöht. Nach den angegebenen Zeitspannen wurden Proben entnommen, Gesamtzellextrakte präpariert und durch

3 Ergebnisse

SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 und Ccp1 analysiert (Abbildung 26).

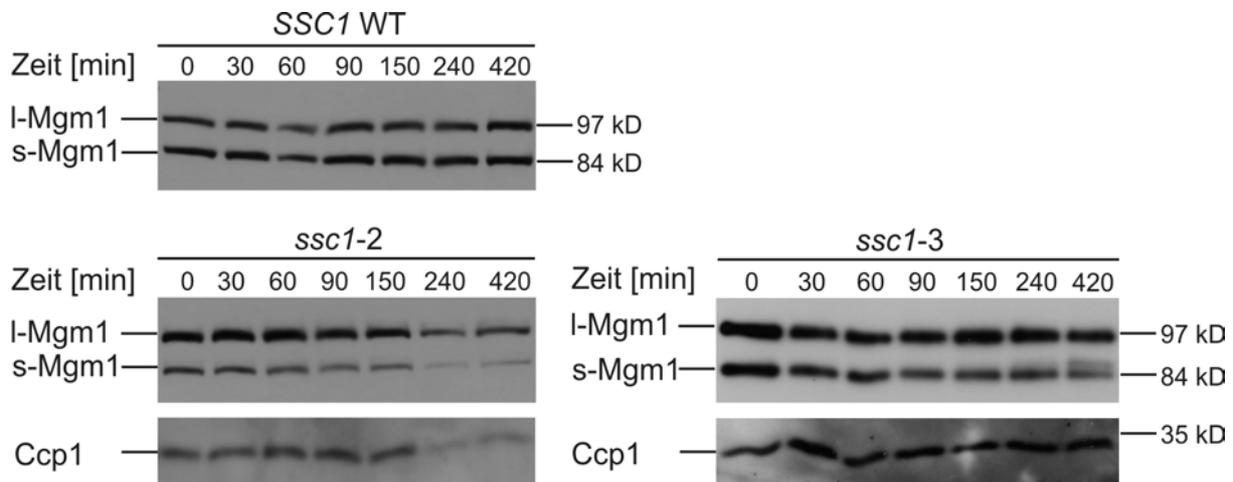


Abbildung 26: Mitochondriales Hsp70 ist notwendig für die Biogenese von s-Mgm1. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Erhöhung der Temperatur auf 37 °C wurden den Kulturen Aliquots entnommen, Gesamtzellextrakte präpariert und nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Antikörpern gegen Mgm1 und Ccp1 dekoriert. Die vollständige Prozessierung von Ccp1 zeigt, dass Pcp1 nicht limitierend für die Prozessierung von Mgm1 ist.

Während im Wildtyp die Veränderung der Temperatur keinen Einfluss auf die Biogenese von Mgm1 hatte, wurde die Bildung von s-Mgm1 sowohl in der *ssc1-2*- als auch in der *ssc1-3*-Mutante bei der restriktiven Temperatur reduziert. In der *ssc1-2*-Mutante dominierte I-Mgm1 schon bei der permissiven Temperatur leicht über s-Mgm1. Möglicherweise ist in diesem Stamm Ssc1 schon bei der permissiven Temperatur nicht voll funktional. Die Bildung von I-Mgm1 blieb in beiden Mutanten im Wesentlichen unbeeinflusst. Eine Akkumulation des Intermediats von Ccp1 war nicht zu beobachten. Der Effekt auf die Bildung von s-Mgm1 beruht nicht auf einer reduzierten Aktivität von Pcp1 (vgl. 3.3.7.1). Damit ist unmittelbar die Aktivität von mitochondrialem Hsp70 notwendig für die Biogenese von s-Mgm1.

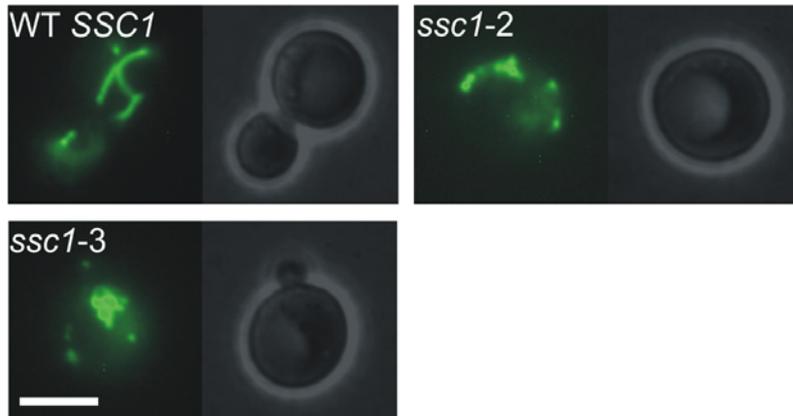
3.3.7.4 Temperatursensitive Mutanten von SSC1 zeigen bei der restriktiven Temperatur veränderte mitochondriale Morphologie

Die beiden *ssc1-2*- und *ssc1-3*-Mutanten sowie der isogenetische SSC1 Wildtyp-Stamm wurden jeweils mit pVT100U-mtGFP transformiert. Unter den gleichen Bedingungen der Temperaturerhöhung auf 37 °C wurde in diesen Stämmen fluoreszenzmikroskopisch die Morphologie der Mitochondrien untersucht. Beide temperatursensitiven Mutanten von SSC1 zeigten nach der Erhöhung der Temperatur auf

3 Ergebnisse

37 °C einen schnellen Verlust der tubulären mitochondrialen Struktur. Statt dessen war Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien zu beobachten. (Abbildung 27AB).

A



B

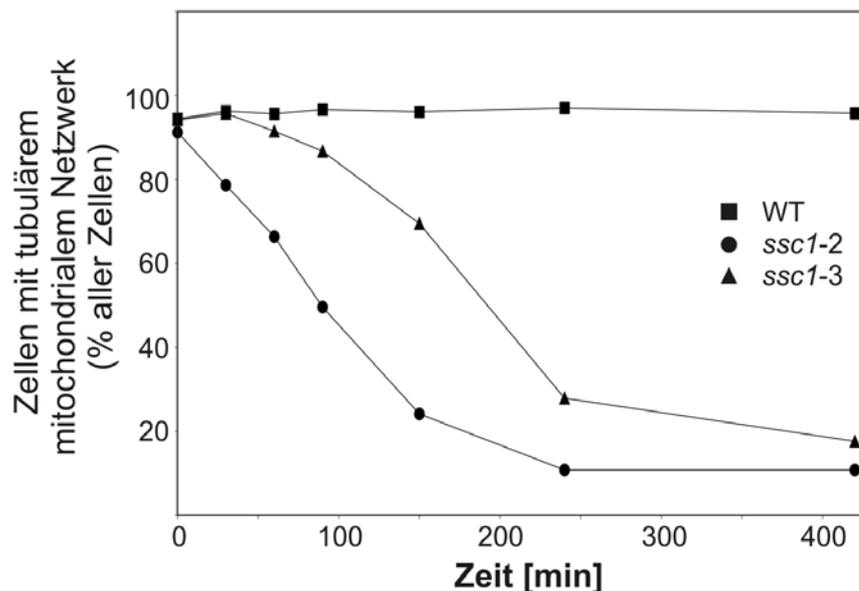


Abbildung 27: Mitochondriales Hsp70 ist notwendig für die Erhaltung der normalen tubulären mitochondrialen Morphologie. Mit pVT100U-mtGFP transformierte temperatursensitive Mutanten von *SSC1* (*ssc1-2* und *ssc1-3*), sowie der isogenetische Wildtyp-Stamm (WT *SSC1*) wurden bis zur mittleren logarithmischen Phase bei permissiver Temperatur (24 °C) angezogen. Dann wurde die Temperatur auf die restriktive Temperatur (37 °C) erhöht. Nach den angegebenen Zeiträumen bei restriktiver Temperatur wurde die mitochondriale Morphologie der Stämme fluoreszenzmikroskopisch analysiert. **A**, Repräsentative Fluoreszenz- (links) und Phasenkontrastbilder (rechts). Balken, 5 µm. **B**, Die mitochondrialen Morphologiephänotypen wurden für jeweils mindestens 150 Zellen in fünf unabhängigen Experimenten ausgezählt. Der Mittelwert ist dargestellt.

3 Ergebnisse

Die Morphologie des isogenetischen Wildtyp-Stammes blieb nach der Erhöhung der Temperatur auf 37 °C unverändert. Die Fragmentation und Aggregation der Mitochondrien verlief im *ssc1-2*-Stamm deutlich schneller als im *ssc1-3*-Stamm. Diese Ergebnisse bestätigen eine Studie, in der mit diesen temperatursensitiven Mutanten nach Erhöhung der Temperatur auf 37 °C ebenfalls ein Verlust der normalen tubulären mitochondrialen Morphologie beobachtet wurde (Kawai *et al.*, 2001).

3.3.8 Die ATP-Konzentration in der Matrix ist kritisch für die Mgm1-Prozessierung

Der Import von Vorstufenproteinen in die mitochondriale Matrix ist ATP-abhängig (Gambill *et al.*, 1993; Stuart *et al.*, 1994). Diese ATP-Abhängigkeit beruht auf der ATP-Abhängigkeit des mitochondrialen Hsp70. Da die Biogenese von s-Mgm1 von mitochondrialem Hsp70 abhängt (vgl. 3.3.7.3), ist eine direkte Abhängigkeit der Biogenese von s-Mgm1 von der ATP-Konzentration in der mitochondrialen Matrix naheliegend. Die ATP-Konzentration in der Matrix kann in isolierten Mitochondrien *in vitro* manipuliert werden. Insbesondere ist eine Depletion von ATP aus der mitochondrialen Matrix möglich, indem Mitochondrien mit Apyrase und Oligomycin vorinkubiert werden. Apyrase hydrolysiert außerhalb der Mitochondrien ATP. Durch Export aus der mitochondrialen Matrix über den ADP/ATP-Transporter wird ATP nachgeliefert. Bei gleichzeitiger Hemmung der Neusynthese von ATP in der Matrix durch Oligomycin verarmt auch die Matrix an ATP. Anschließend wird der Re-Import von ATP unter den Bedingungen der Importreaktion durch die Hemmung des ADP/ATP-Transporters mit Atractylosid verhindert (Stuart *et al.*, 1994).

3.3.8.1 Ein *in vitro*-Prozessierungssystem für Mgm1

Die Aminosäurereste 1-228 von Mgm1 waren hinreichend, um DHFR beim Import in isolierte Mitochondrien in den Intermembranraum zu dirigieren (vgl. 3.1.2.). Das dabei verwendete Vorstufenprotein Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR enthält beide hydrophoben Segmente von Mgm1 und die Prozessierungsstelle für Pcp1. Nach *in vitro*-Import dieses Vorstufenproteins in isolierte Mitochondrien war neben einer intensiven Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 47 kD eine weitere schwächere Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 34 kD vorhanden. Beide Banden waren resistent gegen Trypsinbehandlung der Mitochondrien, sind also über die äußere Membran von Mitochondrien transportiert worden (Abbildung 28). Die Größendifferenz von 13 kD zwischen beiden Banden entspricht genau der Größendifferenz zwischen I-Mgm1 und s-Mgm1. Die beiden Banden entsprechen wahrscheinlich I-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR und s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR. Um die Identität der Bande von 34 kD mit s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR zu bestätigen, wurden analoge Versionen von Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR-

3 Ergebnisse

Vorstufenproteinen mit den gleichen Mutationen im ersten oder zweiten hydrophoben Segment *in vitro* importiert, wie sie schon in 3.3.2 und 3.3.3 *in vivo* analysiert worden waren. Die 34 kD Bande wurde im Vergleich zu Wildtyp Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR stärker, wenn das erste hydrophobe Segment durch Einführung einer positiven oder negativen Ladung (G100K, G100D) hydrophiler gemacht wurde. Beim Import der Mgm1VVL entsprechenden Mutation (VVL) oder Deletion der Spaltstelle ($\Delta 2$) in den Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR Versionen war die 34 kD Bande nicht mehr zu beobachten (Abbildung 28). Damit entspricht die 34 kD Bande s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR. Darüber hinaus sind diese *in vitro*-Ergebnisse im Einklang mit den Beobachtungen *in vivo* und bestätigen zusätzlich den Einfluss der Hydrophobizität des ersten hydrophoben Segments von Mgm1 auf die Prozessierungseffizienz.

3.3.8.2 Die Entstehung von s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR *in vitro* ist ATP-abhängig

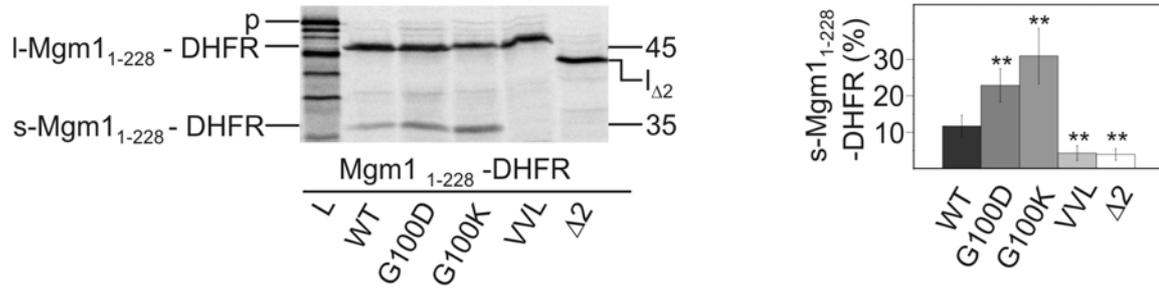
Die Abhängigkeit der Prozessierung von Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR von der ATP-Konzentration in der Matrix wurde *in vitro* durch Import des Vorstufenproteins in isolierte Mitochondrien untersucht, in denen vor dem Import durch Vorinkubation mit Apyrase und Oligomycin ATP depletiert wurde (Abbildung 28B). Während ohne Depletion von ATP fast 20 % des gesamten Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR als s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR vorlagen, machte s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR nach Depletion von ATP aus der Matrix weniger als 3 % des gesamten Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR aus. Das zeigt eine starke ATP-Abhängigkeit der Bildung von s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR. Die Bildung von l-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR war unabhängig von der ATP-Konzentration in der Matrix. Generell ist die Prozessierungseffizienz für das verwendete Vorstufenprotein *in vitro* etwas geringer als für endogenes Mgm1 *in vivo*. Das ist jedoch nicht ungewöhnlich, da eine Vielzahl von Prozessen *in vitro* weniger effizient abläuft als *in vivo*.

3.3.8.3 Die Bildung von s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR hängt von mtHsp70 ab

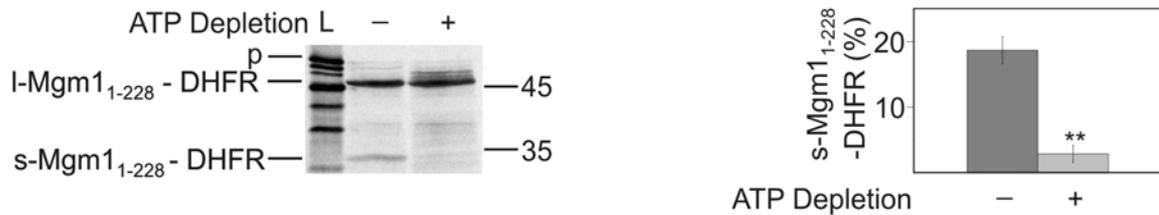
Schließlich wurde das Vorstufenprotein Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR in Mitochondrien importiert, die aus Wildtyp-Hefestämmen oder aus der *ssc1-3* temperatursensitiven Mutante isoliert wurden. Vor dem Import wurden die Mitochondrien jeweils für 15 min bei 24 °C oder bei 37 °C vorinkubiert. Durch die Behandlung von Mitochondrien aus dem *ssc1-3*-Stamm bei 37 °C sollte mitochondriales Hsp70 inaktiviert werden. In Mitochondrien aus dem Wildtyp-Stamm hatte die Vorinkubation bei 37 °C keinen signifikanten Einfluss auf die Prozessierungseffizienz von Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR. Im Gegensatz dazu war die Bildung von s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR bei Vorinkubation der *ssc1-3*-Mitochondrien bei 37 °C stark reduziert (Abbildung 28C). Die Entstehung von l-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR blieb in Mitochondrien aus beiden Stämmen unbeeinflusst (Abbildung 28C). Auch *in vitro* hängt die Erzeugung von s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR von der Funktion des mitochondrialen Hsp70 ab. l-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR kann unabhängig von mtHsp70 entstehen.

3 Ergebnisse

A



B



C

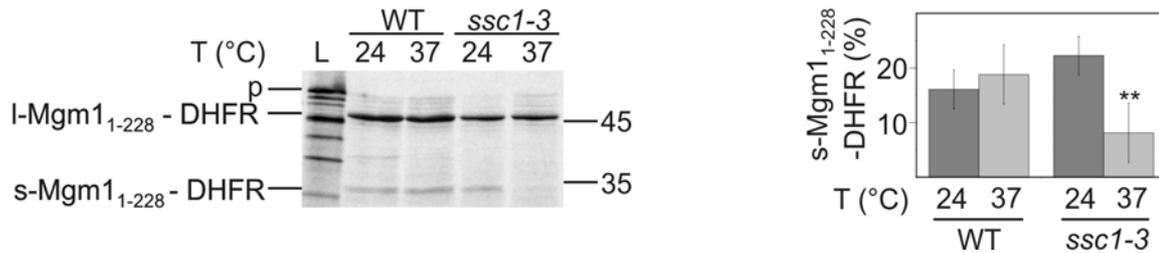


Abbildung 28: ATP-Abhängigkeit der Erzeugung von s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR *in vitro*. **A-C**, Linke Seite. Radioaktiv markierte Vorstufenproteine von Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR wurden in isolierte Mitochondrien importiert und nach dem Import mit 50 µg/ml Trypsin behandelt. p, Vorstufenprotein; I_{Δ2}, I-Mgm1(Δ2)₁₋₂₂₈-DHFR. Rechte Seite. Die relative Menge von s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR bezogen auf die Gesamtmenge von Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR wurde durch densitometrische Quantifizierung ermittelt. **A**, Die angegebenen Varianten (WT, G100D, G100K, VVL, Δ2; vgl. Abbildung 21) von Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR-Vorstufenproteinen wurden in isolierte Mitochondrien importiert. Für VVL und Δ2 wurde der Hintergrund auf Höhe von s-Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR quantifiziert. **B**, Wo angegeben, wurde die mitochondriale Matrix vor dem Import von ATP depletiert. **C**, Mitochondrien, die aus Wildtyp-Hefe oder aus der *ssc1-3* temperatursensitiven Mutante isoliert wurden, wurden vor dem Import für 15 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert. A-C, Nach Wilcoxon-Test statistisch hoch signifikante Unterschiede (p<0,01) zu **(A)** Wildtyp Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR (n=8), **(B)** Import ohne vorherige ATP-Depletion (n=6) und **(C)** Import nach Vorinkubation bei 24 °C (n=6) sind durch ** gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.3.8.4 Eine Mutation in der Untereinheit 6 der F_0F_1 -ATPase führt zu reduzierter Bildung von s-Mgm1

Die beiden Isoformen von Mgm1 haben für ihre Biogenese unterschiedliche Anforderungen an die ATP-Konzentration in der Matrix. Daher könnten physiologisch Bedingungen auftreten, unter denen die Bildung von s-Mgm1 reduziert ist. Um solche Bedingungen mit reduzierter ATP-Konzentration in der Matrix zu simulieren, wurde der M28-82-Stamm verwendet. Dieser Stamm trägt eine Mutation im mitochondrialen Genom, die auf dem *ATP6/OLI2* Locus lokalisiert wurde (Foury und Tzagoloff, 1976). Der M28-82-Stamm zeigt eine verringerte F_0F_1 -ATPase-Aktivität und langsames Wachstum auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Dieser Phänotyp beruht wahrscheinlich auf reduzierter ATP-Konzentration in der mitochondrialen Matrix aufgrund verringerter ATP-Synthese auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle.

Aus exponentiell auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle wachsenden Kulturen dieses Stammes wurden Gesamtzellextrakte präpariert und durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 und Ccp1 analysiert (Abbildung 29A). In der Mutante war das Verhältnis der beiden Isoformen von Mgm1 zugunsten von l-Mgm1 verschoben. Die Prozessierung von Ccp1 war hingegen nicht behindert. Die reduzierte Bildung von s-Mgm1 beruht also nicht auf einer verminderten Aktivität von Pcp1.

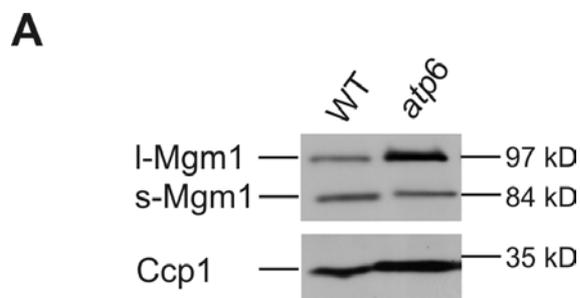
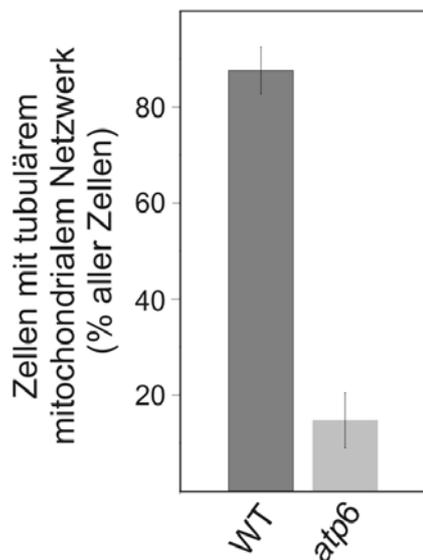
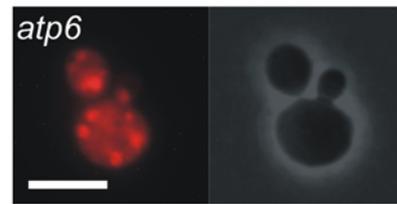


Abbildung 29: Untersuchung des M28-82-Stammes (*atp6*), der eine Mutation enthält, die auf dem *ATP6* Locus lokalisiert wurde. Wildtyp- und M28-82-Stamm wurden bei 30 °C auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle angezogen. **A**, Gesamtzellextrakte wurden präpariert und durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 und Ccp1 analysiert. Wie die vollständige Prozessierung von Ccp1 zeigt, ist die Pcp1-Aktivität nicht limitierend. **B**, Aliquots der Kulturen wurden mit Rhodamin B-Hexylester gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Für die Quantifizierung der Morphologiephänotypen wurden mindestens 150 Zellen in vier unabhängigen Experimenten ausgewertet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt. **C**, Repräsentatives Fluoreszenz- (links) und Phasenkontrastbild (rechts) des in **(B)** analysierten M28-82-Stammes. Balken, 5 μ m.

B



C



Die mitochondriale Morphologie wurde im M28-82-Stamm ebenfalls untersucht. Dazu wurden exponentiell auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle wachsende Kulturen von Wildtyp und Mutante mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B-Hexylester gefärbt. Dieser Farbstoff färbt abhängig vom Membranpotential spezifisch die Mitochondrien (Abbildung 29BC). Unter diesen Bedingungen zeigten Mitochondrien aus dem Wildtyp-Hefestamm eine normale tubuläre Struktur. Im M28-82-Stamm waren die Mitochondrien jedoch überwiegend fragmentiert und aggregiert. Auch in diesem Experiment besteht eine Korrelation zwischen einem gestörten Mengenverhältnis beider Mgm1-Isoformen und einer gestörten mitochondrialen Struktur.

3.3.9 In stationären Zellen ist Pcp1 nicht limitierend für die Prozessierung von Mgm1

Die Abhängigkeit der Prozessierung von Mgm1 von einem funktionalen Importmotor und der ATP-Konzentration in der Matrix weist darauf hin, dass das Verhältnis beider Mgm1-Isoformen schon während des Imports etabliert wird. I-Mgm1 sollte in diesem Fall nicht mehr von Pcp1 gespalten werden, sobald es seine Lokalisation in der Innenmembran erreicht hat. Eine regulatorische Funktion der Protease Pcp1 wäre wenig wahrscheinlich.

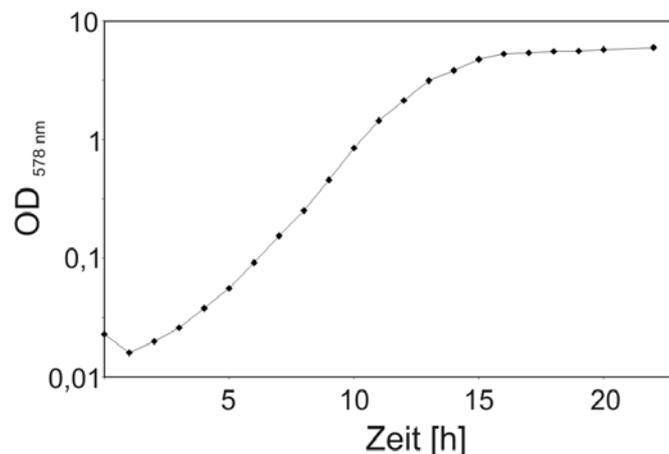
Im Gegensatz dazu wurde eine kontinuierlich abnehmende Expression von Pcp1 von der frühen exponentiellen bis zur stationären Wachstumsphase beschrieben (McQuibban *et al.*, 2003). Gleichzeitig nimmt die Intensität von I-Mgm1, welches in dieser Studie in der frühen exponentiellen Wachstumsphase nicht nachweisbar ist, zu, bis in der späten exponentiellen Phase und der stationären Phase die beiden Isoformen von Mgm1 das normale Verhältnis von ca. 1:1 erreichen (McQuibban *et*

3 Ergebnisse

al., 2003). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine Funktion von Pcp1 als physiologisch signifikanter Regulator der Prozessierung von Mgm1 und der mitochondrialen Morphologie vorgeschlagen.

Um zu untersuchen, ob die Aktivität von Pcp1 in der stationären Wachstumsphase limitierend für die Prozessierung von Mgm1 ist, wurde von W303 α eine Wachstumskurve erstellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde einerseits die Absorption bei 578 nm bestimmt und andererseits durch Präparation von Gesamtzellextrakten, SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 und Ccp1 das Verhältnis beider Isoformen analysiert. Dieses Experiment wurde sowohl für das Wachstum auf fermentierbarer (YPD, Abbildung 30AB) als auch auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPG, Abbildung 30CD) durchgeführt.

A



B

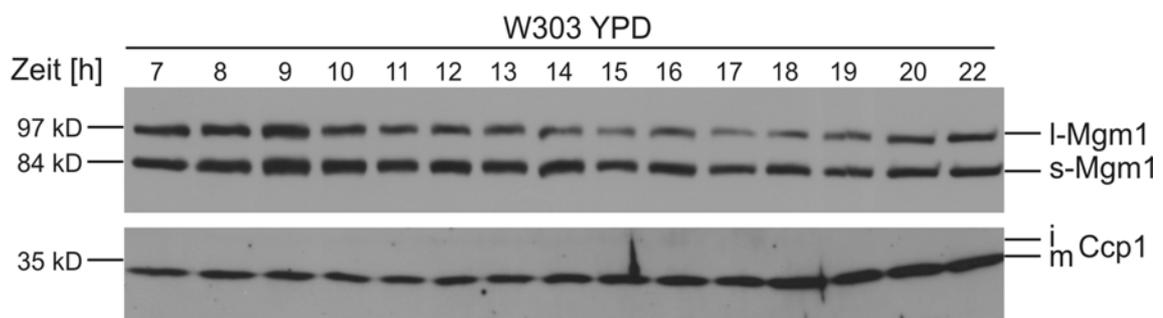
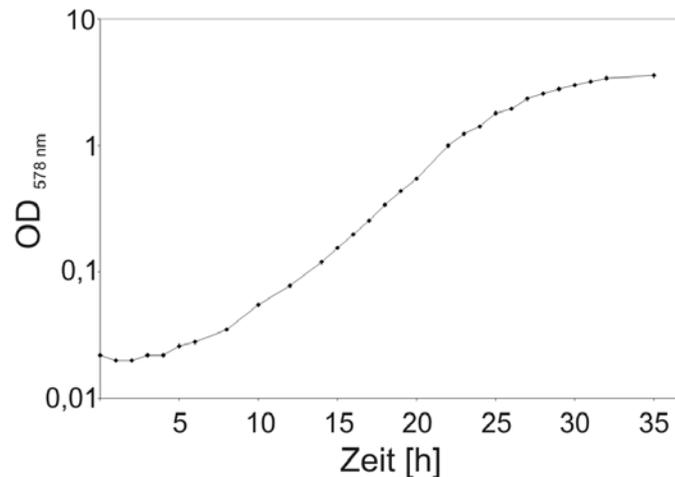


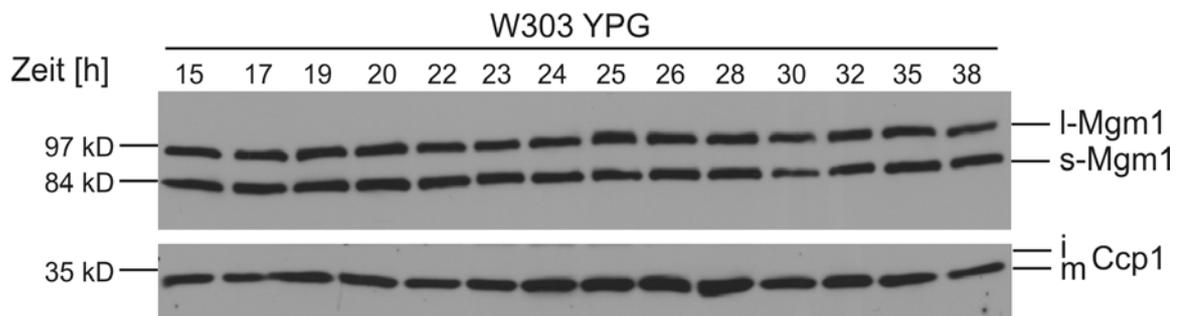
Abbildung 30: Das Verhältnis beider Mgm1-Isoformen ist unabhängig von der Wachstumsphase. **A**, Wachstumskurve des Wildtyp-Stammes W303 α auf fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPD). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Absorption bei 578 nm bestimmt. **B**, Gesamtzellextrakte der Proben in **(A)** wurden präpariert und durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 und Ccp1 analysiert. i, Intermediat und m, reife Form von Ccp1. **C**, **D**, Das gleiche Experiment wie in **(A)** und **(B)** wurde auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (YPG) durchgeführt. **B**, **D**, Vollständige Prozessierung von Ccp1 zeigt, dass Pcp1 zu keinem Zeitpunkt limitierend für die Prozessierung von Mgm1 ist.

3 Ergebnisse

C



D



Weder auf fermentierbarer noch auf nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle wurde in irgendeiner Wachstumsphase eine signifikante Abweichung vom normalen Verhältnis beider Mgm1-Isoformen von ca. 1:1 beobachtet. Das Verhältnis beider Isoformen scheint von der Wachstumsphase unabhängig zu sein. Insbesondere kommt es in der stationären Phase nicht zu einer Akkumulation des Intermediats von Ccp1. Obwohl seine Expression reduziert zu sein scheint, ist Pcp1 in der stationären Phase nicht limitierend für die Prozessierung von Mgm1.

3.3.10 I-Mgm1 kann nicht in s-Mgm1 umgewandelt werden

Um zu untersuchen, ob einmal entstandenes I-Mgm1 prinzipiell in s-Mgm1 umgewandelt werden kann, wurde der Wildtyp-Stamm W303 α bis zur mittleren logarithmischen Phase angezogen und dann mit 100 μ g/ml Cycloheximid versetzt. Da dadurch die Neusynthese von Mgm1 unterbunden wird, sollte I-Mgm1 durch Pcp1 vollständig in s-Mgm1 umgewandelt werden, falls die Prozessierung nach der Entstehung von I-Mgm1 prinzipiell möglich ist.

Die Menge beider Isoformen nimmt über den beobachteten Zeitraum von 49 Stunden durch den natürlichen Abbau von Mgm1 ab (Abbildung 31A). Das Verhältnis beider

3 Ergebnisse

Isoformen von Mgm1 bleibt nach der Zugabe von Cycloheximid jedoch unverändert. Eine Umwandlung von l-Mgm1 in s-Mgm1 findet nach Unterbindung der Proteinbiosynthese nicht statt.

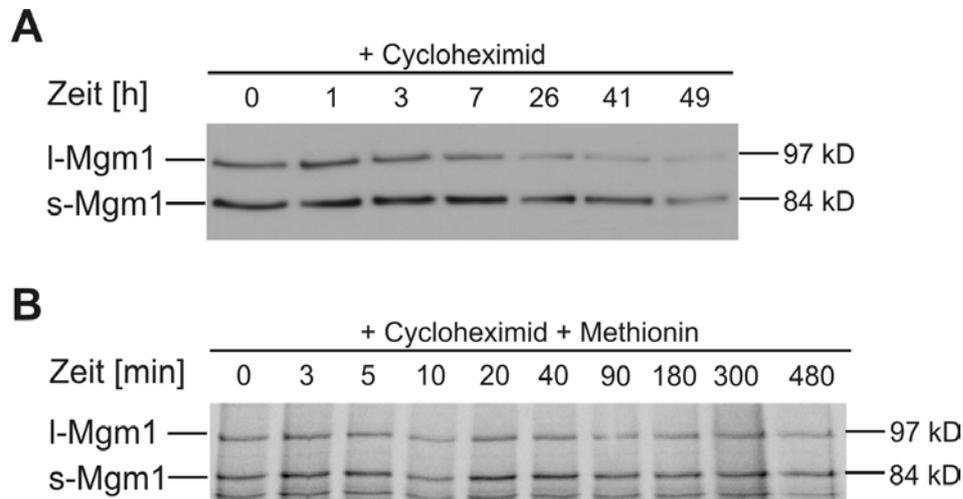


Abbildung 31: Einmal entstandenes l-Mgm1 kann nicht in s-Mgm1 umgewandelt werden. **A**, Exponentiell wachsende Kulturen von W303 α wurden mit 100 μ g/ml Cycloheximid versetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden den Kulturen Aliquots entnommen, Gesamtzell-extrakte präpariert und durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekoration mit Antikörpern gegen Mgm1 analysiert. Das Verhältnis beider Mgm1-Isoformen ändert sich nicht durch die Unterbindung der Proteinbiosynthese. **B**, Neu synthetisierte Proteine wurden in exponentiell wachsenden Kulturen von W303 α für 15 min mit [35 S]-Methionin markiert. Dann wurde die weitere Synthese markierter Proteine durch Zugabe von 100 μ g/ml Cycloheximid und einem Überschuss von nicht markiertem Methionin unterbunden. Nach den angegebenen Zeiträumen wurden den Kulturen Aliquots entnommen, Gesamtzell-extrakte präpariert und daraus die beiden Isoformen von Mgm1 mit Antikörpern gegen das C-terminale Epitop präzipitiert. Die Analyse durch SDS-PAGE und Autoradiographie zeigt keine Veränderung des Verhältnisses beider Mgm1-Isoformen.

Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde ein *Pulse-chase* Experiment durchgeführt. In einer exponentiell wachsenden Kultur von *S. cerevisiae* W303 α wurden neu synthetisierte Proteine 15 min lang mit [35 S]-Methionin markiert (*pulse*). Anschließend wurde die weitere Synthese von markierten Proteinen durch Zugabe von 100 μ g/ml Cycloheximid und 10 mM nicht markiertem Methionin unterbunden (*chase*). Nach verschieden langen Zeiträumen wurden der Kultur Aliquots entnommen, Gesamtzell-extrakte präpariert und durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen das C-terminale Epitop, SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Sofort nach Ende der Markierungsphase sind beide Isoformen von Mgm1 vorhanden (Abbildung 31B). Das zu diesem Zeitpunkt etablierte Verhältnis beider Mgm1-Isoformen ändert sich über den beobachteten Zeitraum von 8 Stunden nicht. Einmal entstandenes l-Mgm1 kann nicht in s-Mgm1 umgewandelt werden.

4 Diskussion

4.1 Beide Isoformen von Mgm1 sind im Intermembranraum lokalisiert

In der vorliegenden Arbeit wurde die submitochondriale Lokalisation und Biogenese des mitochondrialen Dynamin-ähnlichen Proteins Mgm1 untersucht. Mgm1 kommt in zwei Isoformen vor, deren Identität in dieser Arbeit geklärt wurde. Beide Isoformen von endogenem Mgm1 waren in Mitochondrien, nicht aber in Mitoplasten, vor dem Verdau durch zugegebene Proteinase K geschützt. Damit sind die für die Detektion von endogenem Mgm1 verwendeten Epitope, ein C-terminales und ein internes Epitop, im Intermembranraum lokalisiert. Mgm1 besitzt nur am N-Terminus ein vorhergesagtes Transmembransegment. Der gesamte Anteil des Proteins C-terminal von diesem vorhergesagten Transmembransegment befindet sich also im Intermembranraum. Diese Lokalisierung ist in Übereinstimmung mit einer Studie von (Wong *et al.*, 2000) und zwei weiteren im Verlauf dieser Arbeit veröffentlichten Studien (Sesaki *et al.*, 2003b; Wong *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu war zuvor eine Lokalisierung von Mgm1 in der mitochondrialen Außenmembran beschrieben worden (Shepard und Yaffe, 1999). Allerdings wurde in dieser Studie die Integrität der Außenmembran bei der Trypsinbehandlung nicht durch Trypsinresistenz eines Intermembranraumproteins nachgewiesen und bei höheren Trypsinkonzentrationen wurde selbst das Matrixprotein Mas2 teilweise verdaut. Daher ist der dort beobachtete Abbau von Mgm1 wahrscheinlich auf eine defekte Außenmembran und nicht auf eine Exposition von Mgm1 auf der äußeren Oberfläche von Mitochondrien zurückzuführen. In Übereinstimmung mit der Lokalisierung von Mgm1 in *S. cerevisiae* wurde OPA1, das menschliche Ortholog von Mgm1, im Intermembranraum lokalisiert (Gripacic *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2003). Msp1, das orthologe Protein aus *Schizosaccharomyces pombe*, wurde in der mitochondrialen Matrix gefunden (Pelloquin *et al.*, 1999). Dabei konnte ein Fusionsprotein aus den ersten 109 Aminosäureresten von Msp1 und DHFR *in vitro* in die Matrix importiert werden. Ein Fusionsprotein aus den ersten 89 bzw. 113 Aminosäureresten von Mgm1 und DHFR wird *in vitro* ebenfalls in die Matrix misslokalisiert (nicht dargestellt). Erst die N-terminalen 228 Aminosäurereste von Mgm1 sind hinreichend, um DHFR beim *in vitro*-Import korrekt in den Intermembranraum zu sortieren. Deshalb könnte die von Pelloquin *et al.*, 1999 beobachtete Lokalisierung in der Matrix eine Misslokalisierung aufgrund einer unvollständigen Sortierungssequenz widerspiegeln. Der von Pelloquin *et al.*, 1999 ebenfalls durchgeführte Import von Msp1 in isolierte Mitochondrien gibt keinen Aufschluss über die submitochondriale Lokalisierung von Msp1, da nach dem Import nur intakte Mitochondrien, nicht aber Mitoplasten mit Trypsin behandelt wurden. Schließlich wurde in dieser Studie moderat überexprimiertes Msp1 in der Matrix lokalisiert. Allerdings wurde dabei die Effizienz

4 Diskussion

des osmotischen Öffnens der Außenmembran nicht kontrolliert. Menschliches OPA1, welches eindeutig im Intermembranraum lokalisiert wurde, konnte die Deletion von Msp1 in *Schizosaccharomyces pombe* komplementieren (Lenaers *et al.*, 2002). Das macht eine Lokalisation von Msp1 in der Matrix sehr unwahrscheinlich. Insgesamt zeigen die verfügbaren Daten eine Lokalisierung von Mgm1 und OPA1 und wahrscheinlich der orthologen Proteine im Intermembranraum an.

Weniger eindeutig ist die Frage nach der Membranassoziation der beiden Isoformen von Mgm1 zu beantworten. Die Identifizierung der N-Termini der Mgm1-Isoformen zeigte die Präsenz einer vorhergesagten Transmembranhelix in I-Mgm1, die in s-Mgm1 fehlt. In Übereinstimmung damit wurde in Salz- und Carbonatextraktions-experimenten eine stärkere Membranassoziation von I-Mgm1 im Vergleich zu s-Mgm1 beobachtet. Der N-Terminus von Mgm1 erreicht zumindest vorübergehend die Matrix, da die Präsequenz durch MPP abgespalten wird. Diese Daten stützen eine Topologie, bei der I-Mgm1 mit seinem N-Terminus in der Innenmembran verankert ist und den größten Teil des Proteins in den Intermembranraum exponiert. s-Mgm1 ist im Intermembranraum peripher membranassoziiert. Für OPA1 wurde die gleiche Topologie wie für I-Mgm1 beschrieben (Gripalic *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2002). Die partielle Extrahierbarkeit von I-Mgm1 mit Na₂CO₃ wurde in einer Weise interpretiert, dass I-Mgm1 nur peripher membranassoziiert ist (Sesaki *et al.*, 2003b; Wong *et al.*, 2000). Auch in der vorliegenden Arbeit war I-Mgm1 teilweise mit Na₂CO₃ extrahierbar. Dieses Verhalten ist jedoch nicht ungewöhnlich für integrale Membranproteine, die auf einer Seite der Membran nur wenige Aminosäurereste besitzen. D-Lactatdehydrogenase, ein anerkannterweise mit seinem N-Terminus in der Innenmembran verankertes Protein (Rojo *et al.*, 1998), war unter diesen Bedingungen ebenfalls mit Na₂CO₃ extrahierbar. Die partielle Extrahierbarkeit von Mgm1 stellt damit keinen Widerspruch mit der vorgeschlagenen Topologie von I-Mgm1 dar.

Mit welcher der beiden mitochondrialen Membranen s-Mgm1 assoziiert ist, ist nicht geklärt. Während I-Mgm1 in allen Fällen ausschließlich (Wong *et al.*, 2000) oder zumindest auch (Sesaki *et al.*, 2003b) mit der Innenmembran assoziiert gefunden wurde, wurde für s-Mgm1 auch eine exklusive Lokalisierung an der Außenmembran beschrieben (Sesaki *et al.*, 2003b). Eine differentielle Lokalisierung mit I-Mgm1 in der Innenmembran und s-Mgm1 auf der Innenseite der Außenmembran ist also nicht auszuschließen. Für OPA1 wurde sowohl eine solche differentielle Verteilung der zwei Isoformen (Sato *et al.*, 2003) als auch eine ausschließliche Assoziation mit der Innenmembran gefordert (Gripalic *et al.*, 2004; Olichon *et al.*, 2002). Eigene Experimente zur Trennung der mitochondrialen Membranen durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation konnten diese Frage ebenfalls nicht entscheiden. I-Mgm1 war überwiegend, aber nicht ausschließlich mit der Innenmembran assoziiert, während s-Mgm1 häufiger, aber nicht immer mit der Außenmembran assoziiert war (nicht dargestellt). Generell waren diese Subfraktionierungsexperimente nicht

4 Diskussion

zufriedenstellend reproduzierbar. Vermutlich werden während des Beschallens der Mitochondrien zur Herstellung submitochondrialer Vesikel unterschiedliche Mengen von I-Mgm1 und s-Mgm1 von ihrer ursprünglichen Membran abgelöst und können dann unspezifisch an benachbarte Membranen assoziieren. Eine solche Lipid-assoziation wäre für Dynamamin-ähnliche Proteine nicht ungewöhnlich, da Dynamamine lipidbindende Proteine sind (Takei *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit einer zumindest partiellen Assoziation von beiden Mgm1-Isoformen mit der Außenmembran wurde unlängst eine physikalische Interaktion zwischen beiden Formen von Mgm1 und den Außenmembranproteinen Fzo1 und Ugo1 beschrieben (Sesaki und Jensen, 2004; Sesaki *et al.*, 2003b; Wong *et al.*, 2003). Dabei scheint die Interaktion von I-Mgm1 mit Ugo1 und Fzo1 stärker zu sein als die von s-Mgm1. Da der größte Teil von I-Mgm1 im Intermembranraum liegt, könnte dieser Teil des Proteins mit Bereichen von Ugo1 und/oder Fzo1 interagieren, die zum Intermembranraum hin exponiert sind. Tatsächlich wurde eine Interaktion des integralen Außenmembranproteins Fzo1 mit der Innenmembran beschrieben, für die ein zum Intermembranraum hin exponiertes Segment von Fzo1 erforderlich ist (Fritz *et al.*, 2001). Allerdings ist Mgm1 wahrscheinlich nicht das unmittelbar mit Fzo1 interagierende Protein in der Innenmembran, weil die Interaktion zwischen Fzo1 und Mgm1 von Ugo1 in der Außenmembran abhängt (Sesaki und Jensen, 2004). Zusammenfassend ist eine intergrale Verankerung des N-Terminus von I-Mgm1 in der Innenmembran am wahrscheinlichsten. Vermittelt durch Ugo1 könnte I-Mgm1 einen Kontakt zwischen beiden mitochondrialen Membranen herstellen. s-Mgm1 könnte als Teil eines Proteinkomplexes eine ähnliche Rolle im Intermembranraum spielen oder aber ausschließlich mit der Außen- oder der Innenmembran assoziiert sein. Auch verschiedene Populationen von s-Mgm1, die entweder ausschließlich mit der Innen- oder mit der Außenmembran interagieren, können nicht ausgeschlossen werden.

4.2 Die Rhomboid-ähnliche Protease Pcp1 ist für die Bildung von s-Mgm1 verantwortlich

Die N-terminale Sequenzierung beider Mgm1-Isoformen ergab, dass s-Mgm1 eine N-terminal verkürzte Form von I-Mgm1 ist. Bei der Durchmusterung von Deletionsmutanten bekannter oder vorhergesagter mitochondrialer Proteasen konnte Pcp1 als essentiell für die Prozessierung von Mgm1 identifiziert werden. In der Zwischenzeit wurde die Rolle von Pcp1 bei der Prozessierung von Mgm1 von zwei weiteren unabhängigen Studien bestätigt (McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003a). Pcp1 hat ein konserviertes Motiv aus Serin-, Asparagin- und Histidin-Resten im aktiven Zentrum, welches charakteristisch für Serinproteasen ist. Wahrscheinlich besitzt Pcp1 proteolytische Aktivität und ist direkt für die Prozessierung von Mgm1 verantwortlich. Pcp1 wurde schon zuvor als Protease beschrieben, die für die

4 Diskussion

Prozessierung von Ccp1 essentiell ist (Esser *et al.*, 2002). Die Mutation des katalytischen Serins führte zum Verlust der Prozessierungsaktivität und zur Akkumulation einer intermediären Form von Ccp1. Zusammenfassend besitzt Pcp1 proteolytische Aktivität und ist unmittelbar für die Prozessierung von Mgm1 und Ccp1 verantwortlich.

Für die Prozessierung von Ccp1 durch Pcp1 ist eine vorhergehende Prozessierung des Ccp1-Vorstufenproteins durch die mitochondriale AAA-Protease Yta10/Yta12 erforderlich (Esser *et al.*, 2002). Yta10/Yta12 ist in der mitochondrialen Innenmembran verankert. Das aktive Zentrum liegt in der mitochondrialen Matrix (Arnold und Langer, 2002). Wie bei Mgm1 erfolgt die initiale Abspaltung der Präsequenz in der Matrix. Im Gegensatz zu Ccp1 erfolgt die initiale Prozessierung von Mgm1 allerdings durch MPP. Die Pcp1-Prozessierung von Mgm1 ist unabhängig von Yta10/Yta12. Yta10/Yta12-Spaltung ist also keine generelle Voraussetzung für eine Spaltung durch Pcp1. Während die Pcp1-Spaltung von Ccp1 eine vorherige Spaltung von Ccp1 durch Yta10/Yta12 erfordert, scheint die MPP-Spaltung von Mgm1 nicht notwendig für eine Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1 zu sein. Beim *in vitro*-Import konnte die s-Mgm1 entsprechende Isoform von Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR auch nach Hemmung von MPP durch o-Phenanthrolin und EDTA gebildet werden (nicht dargestellt).

Pcp1 gehört zur unlängst beschriebenen Familie der Rhomboid-Proteasen (Koonin *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2001) und ist deren erster beschriebener mitochondrialer Vertreter. Durch *in vitro*-Importexperimente und Fluoreszenzmikroskopie konnte es in Mitochondrien lokalisiert werden (McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003a; Steinmetz *et al.*, 2002). Die abspaltbare N-terminale Signalsequenz und die Membranpotentialabhängigkeit seines Imports zusammen mit den für die mitochondrialen Vertreter der Rhomboid-Proteasen vorhergesagten 7 Transmembransegmenten sprechen für eine Lokalisation von Pcp1 in der mitochondrialen Innenmembran (Steinmetz *et al.*, 2002).

Rhomboid-Proteasen gehören zu den Serinproteasen und sind integrale Membranproteine, die ihre Substrate innerhalb der Membran spalten (Übersichtsartikel siehe Freeman, 2004; Urban und Freeman, 2003; Urban *et al.*, 2001; Urban *et al.*, 2002a; Urban *et al.*, 2002b). Für die meisten bakteriellen und archaealen Rhomboid-Proteasen wird ein Kern aus sechs Transmembranhelices vorhergesagt. Die mitochondrialen Vertreter der Rhomboid-Proteasen (Pcp1 und sein menschliches Ortholog PARL) verfügen über ein zusätzliches siebtes vorhergesagtes Transmembransegment am N-Terminus (Koonin *et al.*, 2003). Andere eukaryotische Rhomboid-Proteasen besitzen eine zusätzliche Transmembranhelix am C-Terminus (Koonin *et al.*, 2003). Der Prototyp einer Rhomboid-Protease ist Rhomboid-1 aus *Drosophila melanogaster*, welches den membranverankerten Liganden Spitz des *Epidermal Growth Factor Receptors* im Golgiapparat spaltet und so dessen Sekretion ermög-

4 Diskussion

licht (Lee *et al.*, 2001; Urban *et al.*, 2001). Auf diese Weise wird der Signalweg des *Epidermal Growth Factor Receptors* aktiviert. Dieser Signalmechanismus ist essenziell für die Musterbildung während der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*. Auf die prinzipiell gleiche Weise können auch andere Liganden von EGFR wie Gurken und Keren durch Rhomboid-Proteasen aktiviert werden (Reich und Shilo, 2002; Urban *et al.*, 2002a). Die Substratspezifität von Rhomboid-Proteasen wurde ausgiebig untersucht. Ein klares Konsensusmotiv für die Spaltung scheint nicht zu existieren. Alle bekannten Substrate besitzen jedoch ein Transmembransegment, innerhalb dessen die proteolytische Spaltung erfolgt. Im Falle von Rhomboid-1 und Spitz ist ein Transmembranbereich mittlerer Hydrophobizität, der nahe an der Spaltstelle über helixbrechende Aminosäurereste wie Glycin oder Prolin verfügt, hinreichend für eine effiziente Spaltung (Urban und Freeman, 2003). Es scheint weniger die genaue Aminosäuresequenz als vielmehr die Struktur einer verzerrten α -Helix mittlerer Hydrophobizität von Rhomboid-Proteasen erkannt zu werden. In Übereinstimmung damit weist die durch N-terminale Sequenzierung bestimmte Spaltstelle von Mgm1 eine für Transmembrandomänen eher geringe Hydrophobizität auf und helixbrechende Aminosäurereste sind vorhanden. Eine unlängst veröffentlichte Studie deutet aber darauf hin, dass für andere Rhomboid-Proteasen und andere Substrate andere Substraterkennungsmechanismen wichtig sind. Mit RHBDL-2 und Thrombomodulin aus Maus wurde die erste Rhomboid-Protease in Vertebraten zusammen mit einem physiologischen Substrat beschrieben (Lohi *et al.*, 2004). Hier scheint die Transmembrandomäne des Thrombomodulins entbehrlich für die Erkennung zu sein. Eine C-terminale cytoplasmatische Domäne ist hinreichend für die Erkennung durch RHBDL-2 und kann die Spaltung innerhalb nicht verwandter Transmembransegmente durch RHBDL-2 herbeiführen (Lohi *et al.*, 2004). Ob in Mgm1 weitere Bereiche außer der Region um die Prozessierungsstelle wichtig für die Spaltung sind, oder ob dieser Bereich hinreichend für die Prozessierung durch Pcp1 ist, ist momentan Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.3 Der Phänotyp der *PCP1*-Deletion ist eine direkte Folge des Fehlens von *s-Mgm1*

Schon vor der Beschreibung der Spaltung von Mgm1 durch Pcp1 wurde Pcp1 (Mdm37) bei der Durchmusterung einer Hefedeletionsbibliothek nach Mutanten mit abnormaler mitochondrialer Morphologie gefunden (Dimmer *et al.*, 2002). Die Deletion von *PCP1* führte zur Fragmentierung und Aggregation von Mitochondrien und zu einem atmungsdefizienten Phänotyp (Dimmer *et al.*, 2002). Dieser Phänotyp konnte in der vorliegenden Arbeit und anderen Studien bestätigt werden (McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003a). Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit durch Färbung mit DAPI und fluoreszenzmikroskopische Analyse ein Verlust von mito-

4 Diskussion

chondrialer DNA gefunden, der mit dem Verlust der Respirationskompetenz korreliert. *PCP1* ist allelisch mit *UGO2*. *UGO2* wurde bei der Durchmusterung von zufällig erzeugten Mutanten als Suppressor einer *DNM1*-Deletion gefunden und war deshalb für eine wahrscheinliche Komponente der mitochondrialen Fusion gehalten worden (Sesaki und Jensen, 2001; Sesaki *et al.*, 2003a).

Der Phänotyp eines $\Delta pcp1$ -Stammes ist von dem eines $\Delta mgm1$ -Stammes nicht zu unterscheiden. Daher könnte der $\Delta pcp1$ -Phänotyp durch das Fehlen von s-Mgm1 verursacht sein. Der Phänotyp der *PCP1*-Deletion konnte durch Expression einer artifiziellen Isoform von s-Mgm1, welche unabhängig von Pcp1 in den Intermembranraum dirigiert wurde, teilweise komplementiert werden. I-Mgm1 alleine ist also nicht hinreichend für die Funktion von Mgm1 und der $\Delta pcp1$ -Phänotyp ist tatsächlich durch eine fehlende Prozessierung von Mgm1 bedingt. Die Komplementation war jedoch nicht vollständig. Möglicherweise gibt es weitere Substrate von Pcp1, deren Prozessierung für die Erhaltung der mitochondrialen Struktur und der mitochondrialen DNA wichtig ist. Wahrscheinlicher scheint jedoch, dass die artifizielle Isoform von s-Mgm1 nicht voll funktionell ist oder das Expressionsniveau nicht exakt auf das im Wildtyp eingestellt werden konnte und deshalb keine vollständige Komplementation zu beobachten war. Außerdem könnte die Prozessierung von Mgm1 durch Pcp1 Teil eines geordnet ablaufenden Prozesses und somit die einfache Zugabe von s-Mgm1 in einem $\Delta pcp1$ -Stamm nicht ausreichend sein, um die Funktion vollständig wiederherzustellen. In Übereinstimmung mit der Annahme, dass fehlende Mgm1-Prozessierung der einzige oder zumindest der wichtigste Grund für den beobachteten $\Delta pcp1$ -Phänotyp ist, zeigt die Deletion von *CCP1*, dem Gen für das einzige weitere bekannte Substrat von Pcp1, weder einen Effekt auf die mitochondriale Struktur noch auf die Respirationskompetenz und die Vererbung der mitochondrialen DNA.

$\Delta pcp1$ -Stämme können nach der Zygotenbildung *in vivo* fusionieren (Sesaki *et al.*, 2003a). Diese Beobachtung steht nicht im Widerspruch zur Notwendigkeit beider Mgm1-Isoformen für eine volle Funktionalität. Obwohl I-Mgm1 ausreichend für die Fusion unter den Bedingungen des *in vivo*-Fusionsversuchs ist, scheint s-Mgm1 (direkt oder indirekt) für eine effiziente Fusion in vegetativ wachsenden Zellen benötigt zu werden. In $\Delta pcp1$ -Stämmen, in denen nur I-Mgm1 vorhanden ist, führt eine ineffiziente oder verlangsamte mitochondriale Fusion bei unverminderter Dnm1 vermittelter mitochondrialer Teilung zur Fragmentierung der Mitochondrien.

4.4 Beide Isoformen von Mgm1 sind für die Funktion erforderlich

s-Mgm1 ist für die volle Funktionalität von Mgm1 unentbehrlich, wie anhand des Phänotyps der *PCP1*-Deletion und der beobachteten partiellen Komplementation dieses Phänotyps mit einer artifiziellen Form von s-Mgm1 deutlich wird. Die Deletion

4 Diskussion

von *MGM1* konnte nur durch Koexpression von artifiziellen Formen für s-Mgm1 und l-Mgm1 teilweise komplementiert werden, nicht aber durch die Expression einer dieser Formen allein. Daher sind beide Isoformen von Mgm1 für eine volle Funktionalität erforderlich. In Übereinstimmung damit konnte in keiner der untersuchten Varianten, welche nur (oder fast nur) l-Mgm1 (Mgm1 Δ 2, Mgm1VVL) bzw. nur (oder fast nur) s-Mgm1 (Mgm1 Δ 1, Mgm1G100D, Mgm1G100K) hervorbringen, Komplementation von Δ *mgm1*-Stämmen beobachtet werden. Obwohl dies in Analogie zum nicht prozessierten EGFR-Liganden Spitz vorgeschlagen wurde (Freeman, 2004; McQuibban *et al.*, 2003), ist l-Mgm1 nicht nur eine Speicherform, die durch Pcp1-Prozessierung zur eigentlich aktiven Komponente s-Mgm1 aktiviert wird. Auch mit der Fusionskompetenz von Δ *pcp1*-Stämmen nach der Zygotenbildung (Sesaki *et al.*, 2003a) ist die Idee von l-Mgm1 als inaktiver Vorstufe nicht vereinbar.

Die Notwendigkeit beider Mgm1-Isoformen für eine volle Funktionalität kann auf molekularer Ebene verschiedene Ursachen haben. Beide Isoformen könnten einen heterooligomeren Komplex bilden, der für die Funktion erforderlich ist und durch einen homooligomeren Komplex nicht oder nur teilweise ersetzt werden kann. Für die Existenz eines oligomeren Komplexes von Mgm1 sprechen zwei Beobachtungen. Erstens ist das durch Gelfiltration ermittelte Molekulargewicht von l-Mgm1 von ca. 400 kD mit einem solchen Komplex vereinbar (Shepard und Yaffe, 1999). s-Mgm1 eluierte in dieser Studie als separater Komplex mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 120 kD. Entweder gibt es unterschiedliche Komplexe von l-Mgm1 und s-Mgm1 oder ein möglicher heterooligomeres Komplex, der beide Isoformen von Mgm1 enthält, ist unter diesen Bedingungen nicht stabil. Zweitens können verschiedene temperatursensitive Allele von Mgm1, von denen das eine die Mutation in der GTPase-Domäne und das andere die Mutation weiter C-terminal trägt, einander komplementieren (Wong *et al.*, 2003). In einem oligomeren Komplex könnte es ausreichen, wenn eine funktionale GTPase-Domäne und ein funktionaler C-Terminus vorhanden ist. Für die verwandten Dynamine ist eine Homooligomerisierung etabliert (Hinshaw, 1999; Hinshaw und Schmid, 1995; Warnock *et al.*, 1996; Zhang und Hinshaw, 2001). Diese Daten geben aber keinen Aufschluss darüber, ob beide Mgm1-Isoformen im gleichen oligomeren Komplex vorliegen. Ob Mgm1 tatsächlich Homo- oder Heterooligomere bilden kann und ob beide Isoformen im selben Proteinkomplex vorliegen, ist momentan Gegenstand weiterer Untersuchungen. Andererseits wäre die Notwendigkeit beider Isoformen auch erklärbar, wenn l-Mgm1 und s-Mgm1 nacheinander im selben Prozess benötigt werden. Schließlich könnten l-Mgm1 und s-Mgm1 an unterschiedlichen Prozessen beteiligt sein. In diesem Fall müssten die unterschiedlichen Prozesse zumindest indirekt voneinander abhängen, da nur dann der gleiche Phänotyp von Mutanten zu erklären ist, die nur entweder l-Mgm1 oder s-Mgm1 exprimieren.

4.5 Die koordinierte Bildung beider Mgm1-Isoformen erfolgt durch einen neuartigen Mechanismus der alternativen Topogenese

Die Notwendigkeit beider Isoformen für die Funktion wirft unmittelbar die Frage auf, wie die koordinierte Bildung beider Isoformen gewährleistet wird. In diesem Zusammenhang sind insbesondere drei Ergebnisse von Bedeutung.

1. Der N-Terminus von Mgm1 enthält zwei aufeinanderfolgende hydrophobe Segmente, von denen das zweite durch Pcp1 gespalten wird.

Der N-Terminus von Mgm1 und seinen orthologen Proteinen besitzt eine konservierte Anordnung von zwei aufeinanderfolgenden hydrophoben Segmenten. Beide hydrophoben Segmente erfüllen mit einer mittleren Hydrophobizität und der Präsenz helixbrechender Aminosäurereste wie Glycin und Prolin die Kriterien, die für die Substratspezifität von Rhomboid-Proteasen aufgestellt wurden (Urban und Freeman, 2003). Die Bestimmung des N-Terminus von s-Mgm1 und die fehlende Prozessierung von Mgm1 Δ 2 zeigen, dass die Prozessierung im zweiten hydrophoben Segment erfolgt.

2. Die Hydrophobizität des weiter N-terminal gelegenen hydrophoben Segments bestimmt das Verhältnis beider Mgm1-Isoformen.

Mutationen, die die Hydrophobizität des ersten hydrophoben Segments verändern, bewirken eine Veränderung im Verhältnis beider Mgm1-Isoformen. Erhöhte Hydrophobizität führt dabei zu einer verminderten Prozessierung, verminderte Hydrophobizität steigert die Prozessierungseffizienz. Nur die intermediäre Hydrophobizität der Wildtyp-Sequenz in diesem Bereich gewährleistet die koordinierte Bildung beider Isoformen im Verhältnis von ungefähr 1:1.

3. Ein funktionaler Importmotor und ATP in der Matrix sind erforderlich für die Erzeugung von s-Mgm1

Nach Herunterregulation essentieller Komponenten (Tim14, Tim16, Tim44) des mit dem TIM17/TIM23-Komplex assoziierten Proteinimportmotors in der mitochondrialen Matrix oder in temperatursensitiven Mutanten des mitochondrialen Hsp70 (*ssc1-2*, *ssc1-3*) bei der restriktiven Temperatur ist die Bildung von s-Mgm1 stark reduziert. Auch hier führen Komponenten des mitochondrialen Proteinimportmotors, die eine weitere Translokation begünstigen, zur Bildung von s-Mgm1, während der Verlust der Funktion dieser Komponenten zum Verlust der weiteren Translokation und zum Verlust von s-Mgm1 führt.

Diese Beobachtungen können in einem neuartigen Modell der „alternativen Topogenese“ zusammengefasst werden, das unter normalen Wachstumsbedingungen die

4 Diskussion

Bildung beider Isoformen in einem Verhältnis von ungefähr 1:1 sicherstellt (Abbildung 32).

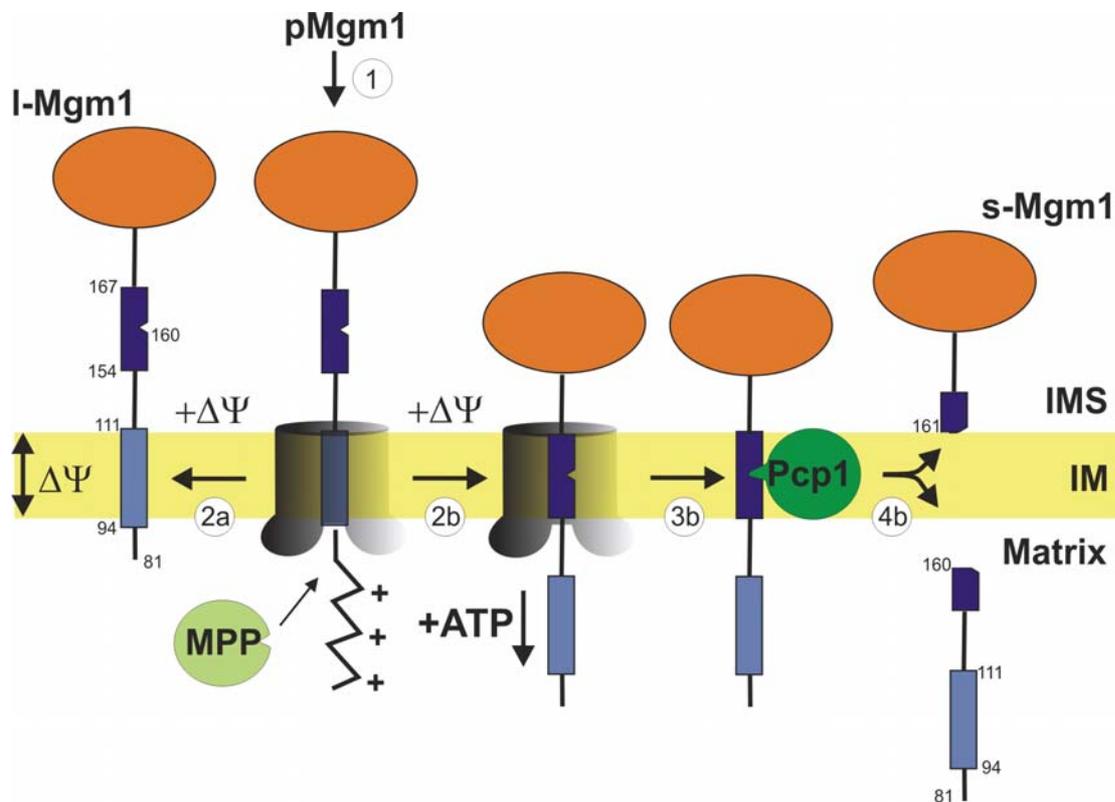


Abbildung 32: Alternative Topogenese von Mgm1. Die TIM17/TIM23-Translokase der mitochondrialen Innenmembran mit allen essentiellen Untereinheiten (Tim17, Tim23 und Tim50) sowie den Komponenten des mitochondrialen Importmotors (Tim44, Tim14, Tim16, mtHsp70 und Mge1) ist transparent grau dargestellt. Die beiden hydrophoben Segmente am N-Terminus von Mgm1 sind durch ein hellblaues (erstes hydrophobes Segment) bzw. dunkelblaues Rechteck mit Spaltstelle (zweites hydrophobes Segment) veranschaulicht. Die Nummern zeigen die Reihenfolge der Topogenese für I-Mgm1 (1, 2a) und s-Mgm1 (1, 2b, 3b, 4b) an. Nur wenn das zweite hydrophobe Segment die Protease Pcp1 in der Innenmembran erreicht, wird Mgm1 prozessiert und s-Mgm1 entsteht. Die dafür notwendige Überwindung des Translokationsarrests hängt von einem funktionalen Importmotor und der ATP-Konzentration in der Matrix ab. IMS, Intermembranraum; IM, mitochondriale Innenmembran; $\Delta\Psi$, Membranpotential; MPP, mitochondriale Prozessierungspeptidase; pMgm1, Vorstufenprotein von Mgm1; I-Mgm1 und s-Mgm1, große und kleine Isoform von Mgm1.

Nach diesem Modell wird das Vorstufenprotein von Mgm1 mit seinem N-Terminus zunächst über den TIM17/TIM23-Komplex importiert. Sobald die N-terminale Präsequenz die Matrix erreicht, kann sie durch MPP abgespalten werden. Die Ankunft des ersten hydrophoben Segments von Mgm1 im Translokationskanal führt zum Arrest der Translokation. Ein solcher Stopp-Transfer-Mechanismus wurde für D-Lactatdehydrogenase und CoxVa beschrieben und wird für Cytochrom b_2 diskutiert

4 Diskussion

(Gartner *et al.*, 1995; Glick *et al.*, 1992; Rojo *et al.*, 1998). Laterale Insertion des ersten hydrophoben Segments in die mitochondriale Innenmembran führt zur Bildung von I-Mgm1. Alternativ zu dieser lateralen Insertion kann der Translokationsarrest überwunden und das Mgm1-Vorstufenprotein weiter importiert werden. Der weitere Import ist abhängig von einem funktionalen Importmotor (gezeigt für die Komponenten Tim14, Tim16, Tim44 und Ssc1) und einer genügend hohen ATP-Konzentration in der Matrix. Wenn das zweite hydrophobe Segment mit der Spaltstelle für Pcp1 den TIM17/TIM23-Translokationskanal erreicht, kann auch dieses lateral in die Innenmembran inserieren. Dort wird es durch Pcp1 gespalten und s-Mgm1 entsteht. Nach diesem Modell sind die laterale Insertion des ersten hydrophoben Segments, die zur Bildung von I-Mgm1 führt, und die weitere Translokation bis das zweite hydrophobe Segment die Innenmembran erreicht, wo die Spaltung durch Pcp1 die Bildung von s-Mgm1 bewirkt, kompetierende Prozesse. Alle Faktoren, die den Translokationsarrest oder die laterale Insertion des ersten hydrophoben Segments begünstigen (erhöhte Hydrophobizität des ersten hydrophoben Segments, nicht funktionaler Importmotor, geringe ATP-Konzentration in der Matrix) führen zur verstärkten Bildung von I-Mgm1, während die Menge des gebildeten s-Mgm1 abnimmt. Umgekehrt führt eine Hemmung des Translokationsarrests und der lateralen Insertion von I-Mgm1 (Deletion oder verringerte Hydrophobizität des ersten hydrophoben Segments) bevorzugt zur weiteren Translokation und zur Bildung von s-Mgm1. Die intermediäre Hydrophobizität des ersten hydrophoben Segments im Wildtyp ist entscheidend für die Bildung beider Isoformen im Verhältnis von ungefähr 1:1.

Was nach der Pcp1-Spaltung mit dem abgespaltenen 80 Aminosäurereste langen N-terminalen Fragment (Aminosäurereste 81-160) von Mgm1 geschieht, ist unklar. Da kein Antikörper gegen ein Epitop in diesem Bereich zur Verfügung stand, konnte es nicht detektiert werden. Nach *in vitro*-Import von Mgm1₁₋₂₂₈-DHFR-Vorstufenproteinen konnte keine der beobachteten Banden diesem Fragment zugeordnet werden. Wahrscheinlich wird das Fragment schnell abgebaut. Eine physiologische Funktion dieses Fragments kann aber aufgrund der verfügbaren Daten gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden.

Das Modell der alternativen Topogenese erklärt alle in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse. Darüber hinaus löst es bestehende Widersprüche bezüglich der genauen Spaltstelle von Pcp1 innerhalb von Mgm1 auf. Aufgrund einer fehlenden Prozessierung von Mgm1^{VVL} wurde eine Spaltung von Mgm1 im ersten hydrophoben Segment gefordert (McQuibban *et al.*, 2003). Die fehlende Prozessierung dieser Mgm1-Variante liegt aber nicht an der Veränderung der Spaltstelle, sondern an der erhöhten Hydrophobizität des ersten hydrophoben Segments, die zu einer effizienteren lateralen Insertion und damit zu einer bevorzugten Bildung von I-Mgm1 führt. Die tatsächliche Spaltstelle für Pcp1 ist in dieser Version unverändert, kann jedoch die Protease in der Innenmembran nicht erreichen. In Übereinstimmung mit dieser Inter-

4 Diskussion

pretation konnte Mgm1VVL in der vorliegenden Arbeit mit geringer Effizienz Pcp1-abhängig prozessiert werden. Die Möglichkeit einer initialen Spaltung von Mgm1 durch Pcp1 im ersten hydrophoben Segment und einer nachfolgenden Entstehung von s-Mgm1 durch ein weiteres proteolytisches Ereignis („*Trimming*“) im Inter-membranraum (Freeman, 2004), konnte ausgeschlossen werden. Mgm1 Δ 1 wird sogar vollständig in s-Mgm1 umgewandelt. Die Prozessierung hängt nicht vom ersten hydrophoben Segment ab. Außerdem konnte Mgm1 Δ 2, in dem das zweite hydrophobe Segment deletiert das erste aber unverändert ist, nicht Pcp1-abhängig prozessiert werden.

Rhomboid-Proteasen sind normalerweise in Signalprozesse involviert (Lee *et al.*, 2001; Übersichtsartikel siehe Freeman, 2004; vgl. 4.2). Durch proteolytische Prozessierung setzt beispielsweise Rhomboid-1 aus membranverankertem Spitz im Golgiapparat den aktiven Liganden des EGFR frei und führt zu dessen Sekretion (Lee *et al.*, 2001). Auf diese Weise wird der Signalweg des EGFR aktiviert. In Analogie dazu könnte auch Mgm1 ein Signalmolekül sein, das unter bestimmten physiologischen Bedingungen durch Pcp1 prozessiert wird und so die mitochondriale Fusion und die mitochondriale Morphologie reguliert. Tatsächlich nimmt das Expressionsniveau von Pcp1 beim Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Wachstumsphase ab (McQuibban *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine Funktion von Pcp1 als physiologisch bedeutsamer Regulator der Mgm1-Prozessierung und damit der mitochondrialen Morphologie gefordert (Freeman, 2004; McQuibban *et al.*, 2003). Andererseits impliziert der Mechanismus der alternativen Topogenese, dass I-Mgm1 nicht mehr in s-Mgm1 umgewandelt werden kann, sobald seine Topologie etabliert ist, da die Spaltstelle die Protease in der Innenmembran nicht mehr erreicht. In Übereinstimmung damit konnte I-Mgm1 in einem Puls-Markierungs-Experiment nicht in s-Mgm1 umgewandelt werden. Beide Mgm1-Isoformen waren in diesem Experiment schon unmittelbar nach Ende der Markierungsphase vorhanden. Sie werden sehr schnell gebildet. Danach ändert sich ihr relatives Verhältnis nicht mehr. Die Entscheidung über die Entstehung von I-Mgm1 oder s-Mgm1 fällt schon während des Imports, bevor die Spaltstelle im zweiten hydrophoben Segment die Protease in der mitochondrialen Innenmembran erreicht. Darüber hinaus wird der Teil von Mgm1, dessen Prozessierungsstelle die Protease in der Innenmembran erreicht, vermutlich vollständig gespalten, wie an den Mutanten deutlich wird, in denen das erste hydrophobe Segment deletiert oder wesentlich hydrophiler war. Deshalb ist eine physiologisch bedeutsame Funktion der Aktivität von Pcp1 als Regulator der Mgm1-Prozessierung unwahrscheinlich. Die Aktivität von Pcp1 war weder in der stationären Phase noch in irgendeinem anderen Experiment (außer der Herunterregulation von Pcp1 selbst) limitierend für die Prozessierung von Mgm1. In der frühen exponentiellen Phase wurde in der vorliegenden Arbeit im

4 Diskussion

Gegensatz zu McQuibban *et al.*, 2003 keine vollständige Umwandlung von Mgm1 in s-Mgm1 beobachtet. Selbst Überexpression von Pcp1 unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors führte nicht zur vollständigen Prozessierung von Mgm1. Die Expressionshöhe von Pcp1 kann unter physiologischen Bedingungen also allenfalls eine untergeordnete Rolle für die Regulation der Prozessierung von Mgm1 und der mitochondrialen Morphologie spielen. Vielmehr wird die koordinierte Bildung beider Isoformen von Mgm1 und die Integrität der mitochondrialen Morphologie durch den beschriebenen Mechanismus der alternativen Topogenese gewährleistet.

4.6 Der Mechanismus der alternativen Topogenese könnte den bioenergetischen Zustand von Mitochondrien an ihre Struktur koppeln

Im Gegensatz zur Expression von Pcp1 ist die ATP-Konzentration in der Matrix ein Parameter, der das Verhältnis beider Mgm1-Isoformen beeinflusst. Niedrige ATP-Konzentrationen in der Matrix führen zur verminderten Bildung von s-Mgm1 und zu einer Fragmentierung der Mitochondrien. Eine deutliche Veränderung im Verhältnis beider Mgm1-Isoformen (in beide Richtungen) ist hinreichend, um die mitochondriale Morphologie zu stören. Niedrige ATP-Konzentrationen in der mitochondrialen Matrix sind hinreichend, um das Verhältnis beider Mgm1-Isoformen über den Mechanismus der alternativen Topogenese deutlich in Richtung auf l-Mgm1 zu verschieben. Damit stellt die alternative Topogenese einen möglichen molekularen Mechanismus dar, der die ATP-Konzentration in der mitochondrialen Matrix an die mitochondriale Morphologie koppeln könnte. Mgm1-Mutanten, die nur zur Bildung von l-Mgm1 führen, verlieren ihre mitochondriale DNA. Deswegen könnte die ATP-Konzentration über den Mechanismus der alternativen Topogenese neben der mitochondrialen Struktur auch die Vererbung mitochondrialer DNA beeinflussen. Auch unter anderen Bedingungen, die den bioenergetischen Zustand von Mitochondrien betreffen, wurden abnormale mitochondriale Strukturen beobachtet, so z.B. in menschlichen Zellen, deren Atmungsaktivität durch Punktmutationen in mitochondrial codierten tRNA-Genen behindert war (Hayashi *et al.*, 1994).

Eine Korrelation zwischen verändertem Verhältnis beider Mgm1-Isoformen und einer veränderten mitochondrialen Struktur ist deutlich zu beobachten. Kleinere Veränderungen im Verhältnis der Isoformen scheinen aber keine dramatischen Auswirkungen auf die mitochondriale Struktur zu haben. Die Existenz weiterer Faktoren, die in Abhängigkeit vom bioenergetischen Zustand der Mitochondrien die mitochondriale Morphologie beeinflussen, kann daher nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte die Expression von Mgm1 Δ 1, einer Mgm1-Version, die unter normalen Bedingungen nur s-Mgm1 hervorbringt, in den *ssc1* temperatursensitiven Mutanten bei der restriktiven Temperatur zwar die s-Mgm1 Menge teilweise wieder herstellen (was bedeutet, dass in Abwesenheit des ersten hydrophoben Segments

4 Diskussion

s-Mgm1 unabhängig von Ssc1 entstehen kann), jedoch wurde keine signifikante Verbesserung des Morphologiephänotyps beobachtet. Außerdem scheint der Verlust der Wildtyp-Morphologie in den *ssc1* temperatursensitiven Mutanten nicht von der Proteinbiosynthese abzuhängen (Kawai *et al.*, 2001), während das Verhältnis beider Mgm1-Isoformen nach dem Modell der alternativen Topogenese beim Import neu synthetisierter Vorstufenproteine etabliert wird. Diese fehlende Komplementation in den *ssc1* temperatursensitiven Mutanten macht die Existenz weiterer für die mitochondriale Struktur wichtiger Komponenten wahrscheinlich, die Ssc1 für ihren Import in Mitochondrien benötigen. Alternativ könnte Ssc1 notwendig sein, um Aggregation und Funktionsverlust dieser Komponenten bei 37 °C zu vermeiden.

Eine weitere Frage stellt sich bezüglich der Geschwindigkeit, mit der die alternative Topogenese in Antwort auf veränderte bioenergetische Verhältnisse, die mitochondriale Morphologie beeinflussen kann. Für eine signifikante Veränderung des Verhältnisses beider Isoformen sind nach dem Modell der alternativen Topogenese die Neusynthese und der Import von Mgm1 und unter Umständen auch der Abbau des Proteins bzw. die Verdünnung im Laufe der Zellteilung erforderlich. Da diese Vorgänge eine gewisse Zeit in Anspruch nehmen, ist der Mechanismus der alternativen Topogenese eher für langsamere und längerfristige Anpassungsvorgänge bezüglich der mitochondrialen Morphologie und der Vererbung der mitochondrialen DNA geeignet. Im Falle der *ssc1* temperatursensitiven Mutanten war nach der Erhöhung der Temperatur auf 37 °C nach Zeiträumen in der Größenordnung von 30-120 Minuten ein Effekt auf das Verhältnis beider Mgm1-Isoformen und auf die mitochondriale Morphologie zu beobachten. Das scheint für eine regulatorische Funktion immer noch hinreichend schnell und könnte eine Relevanz für die Integration von bioenergetischen Störungen über einen längeren Zeitraum besitzen. Schnellere Anpassungen könnten aber andere Mechanismen erfordern.

Diese Beobachtungen machen weitere Untersuchungen erforderlich, um zu klären, inwieweit die beobachtete Veränderung im Verhältnis beider Mgm1-Isoformen unter den Bedingungen reduzierter ATP-Konzentrationen in der Matrix oder eines defekten Importmotors ursächlich für die beobachteten morphologischen Veränderungen ist. Komplementationsstudien mit Mgm1 Δ 1 in anderen Mutanten, in denen die s-Mgm1-Bildung gestört ist und die vielleicht geringfügigere sekundäre Effekte mit sich bringen als das Ausschalten einer essentiellen Komponente des mitochondrialen Importmotors, sollten diese Frage in Zukunft klären.

Was könnte die physiologische Relevanz einer Kopplung des bioenergetischen Zustands der Mitochondrien über die alternative Topogenese von Mgm1 an ihre Morphologie sein? Eine wichtige Ursache für niedrige ATP-Konzentrationen in der Matrix sind Mutationen in der mitochondrialen DNA, die für einen Teil der Komponenten der Atmungskette und der mitochondrialen F₀F₁-ATP-Synthase codiert.

4 Diskussion

Solche Mutationen können z.B. durch oxidativen Stress entstehen. Die resultierenden niedrigen ATP-Konzentrationen in der mitochondrialen Matrix führen dann zu einer verringerten Bildung von s-Mgm1 und zur Fragmentierung der Mitochondrien. Die wahrscheinlichste Funktion von Mgm1 liegt in der Fusion von Mitochondrien (vgl. 4.7). Reduzierte ATP-Konzentrationen nach Mutationen könnten in den betroffenen Mitochondrien die Fusion dieser „kranken“ Mitochondrien mit dem intakten mitochondrialen Netzwerk verhindern. Dieser „Quarantänemechanismus“ würde eine Möglichkeit für die Zellen darstellen, gegen defekte mitochondriale DNA zu selektieren und die Akkumulation mitochondrialer Mutationen zu vermeiden.

Inwieweit dieser Mechanismus physiologisch eine Rolle spielt, ist nicht geklärt. Zwar läuft dieser Mechanismus nach den verfügbaren Daten zwangsläufig ab, wenn die ATP-Konzentration in der mitochondrialen Matrix weit genug absinkt. Jedoch ist nicht bekannt, ob unter physiologischen Bedingungen die ATP-Konzentration so weit absinken kann, dass durch stark reduzierte Bildung von s-Mgm1 mitochondriale Fusion tatsächlich verlangsamt oder verhindert wird. Bis jetzt wurde das nur in einer Mutanten mit stark reduzierter F_0F_1 -ATPase-Aktivität oder nach Herunterregulation essentieller Komponenten des Importmotors beobachtet. Weitere Studien müssen Klarheit schaffen, ob es physiologisch eine Mgm1-abhängige Selektion gegen defekte Mitochondrien gibt.

4.7 Mögliche Funktion(en) von Mgm1

Das Verständnis der Funktion von Mgm1 auf molekularer Ebene ist immer noch sehr unvollständig. Im Wesentlichen werden zwei Funktionen für Mgm1 diskutiert, die sich nicht gegenseitig ausschließen. Der Deletionsphänotyp von *MGM1* spricht für eine Funktion von Mgm1 bei der Fusion von Mitochondrien. Er ist nicht vom Deletionsphänotyp etablierter Komponenten der mitochondrialen Fusion wie *FZO1* oder *UGO1* zu unterscheiden. $\Delta dnm1mgm1-5$ -Mutanten können nach der Zygotenbildung *in vivo* auch bei der nicht permissiven Temperatur fusionieren (Wong *et al.*, 2000). Daher wurde die Fragmentierung von Mitochondrien und die reduzierte Fusionsaktivität in *MGM1*-Mutanten als indirekt betrachtet und Mgm1 eher als wichtig dafür angesehen, Mitochondrien in einem fusionskompetenten Zustand zu halten (Wong *et al.*, 2000). Inzwischen wurde in Übereinstimmung mit einer unmittelbaren Funktion von Mgm1 bei der mitochondrialen Fusion jedoch gezeigt, dass $\Delta dnm1\Delta mgm1$ -Mutanten in diesem *in vivo*-Fusionsversuch nicht fusionieren (Sesaki *et al.*, 2003b; Wong *et al.*, 2003). Die zuvor beobachtete Fusionsaktivität war vermutlich auf eine Restfunktion des *mgm1-5*-Allels bei der nicht permissiven Temperatur zurückzuführen. Für eine unmittelbare Funktion von Mgm1 in der mitochondrialen Fusion spricht die kürzlich gezeigte physikalische Interaktion von Mgm1 mit zwei etablierten Fusionskomponenten, Fzo1 und Ugo1, in der mitochondrialen Außenmembran (vgl.

4 Diskussion

4.1; Sesaki *et al.*, 2003b; Wong *et al.*, 2003). Die Interaktion zwischen Mgm1 und Fzo1 wird dabei durch Ugo1 vermittelt (Sesaki und Jensen, 2004). Da Fzo1 und Ugo1 integrale Proteine der mitochondrialen Außenmembran sind (vgl. 4.1; Rapaport *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 2001), während I-Mgm1 ein integrales Protein der Innenmembran ist, könnte Mgm1 über Ugo1 eine Interaktion zwischen den beiden mitochondrialen Membranen vermitteln und dadurch eine koordinierte Fusion von Außen- und Innenmembran ermöglichen.

Die zweite Funktion, die für Mgm1 und für sein menschliches Orthologes, OPA1, vorgeschlagen wurde, liegt in der Remodellierung der mitochondrialen Innenmembran und der Ausbildung der Cristae. Diese Interpretation beruht auf einer gestörten Cristae-Struktur oder der vollständigen Abwesenheit von Cristae in *mgm1*-Mutanten. Die Herunterregulation von OPA1 mit siRNA führt ebenfalls zu einer defekten Cristae-morphologie (Olichon *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde Mgm1 in immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen auch oder überwiegend in den Cristae und an den Übergängen zwischen innerer Grenzmembran und Cristae-Membran lokalisiert (Wong *et al.*, 2000). Aufgrund der Ähnlichkeit zu den Dynaminen wurde die Präsenz von Mgm1 in ringförmigen Homo- oder Heterooligomeren diskutiert (vgl. 4.4), die von der Matrixseite analog zur Endozytose zur Invagination der Innenmembran führen. Im Unterschied zur Endozytose erfolgt aber keine vollständige Abschnürung der Cristae – vielmehr werden die „*Cristae-junctions*“ gebildet, die den Übergang zwischen innerer Grenzmembran und Cristae-Membran darstellen. Die Topologie von Mgm1 mit dem größten Teil des Proteins im Intermembranraum schließt diesen Mechanismus allerdings aus. Stattdessen könnten solche homo- oder heterooligomeren Ringe aus I-Mgm1 und eventuell s-Mgm1 auf der Intermembranraumseite der „*Cristae junctions*“ wirksam sein und dort diese tubulären Strukturen initiieren oder stabilisieren. Gegen diese Hypothese spricht die Präsenz scheinbar normaler Cristae in $\Delta dnm1\Delta mgm1$ -Mitochondrien (Sesaki *et al.*, 2003b).

Um auf molekularer Ebene zu klären, wie Mgm1 an der mitochondrialen Fusion beteiligt ist und ob ihm außerdem eine Funktion bei der Ausbildung der Cristae zukommt, ist einerseits eine genaue Lokalisierung beider Isoformen erforderlich. Sind diese gleichmäßig über die Mitochondrien verteilt oder gibt es punktförmige Lokalisierungen von Mgm1, wie die der Teilungskomponenten Dnm1 und Mdv1? Ist die Lokalisation beider Isoformen von Mgm1 dabei identisch oder unterscheidet sich die Lokalisation von I-Mgm1 von der von s-Mgm1? Immunelektronenmikroskopische und Immunfluoreszenzuntersuchungen sollen hier Klarheit schaffen.

Weiterhin ist es wichtig, die beiden Mgm1-Isoformen *in vitro* zu charakterisieren. Insbesondere stellt sich dabei die Frage, ob sie sich wie Dynamine verhalten und ringförmige Homo- oder Heterooligomere bilden können und ob sie miteinander

4 Diskussion

interagieren. Auch die generell vermutete GTP-Bindung und Hydrolyse durch Mgm1 wurde *in vitro* noch nicht gezeigt. Dabei sind insbesondere die kinetischen Parameter interessant, die Hinweise darauf geben könnten, ob die GTPase Aktivität, wie es für die Dynamine gefordert wird, unmittelbar mechanische Arbeit leistet oder doch eher regulatorische Funktion hat. Schließlich ist es interessant, ob der Assemblierungszustand von Mgm1 die GTPase-Aktivität beeinflusst und ob sich beide Isoformen in ihrer Aktivität unterscheiden. Diese Fragen sind zur Zeit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.8 OPA1 – Autosomal Dominante Optikusatrophie

Unabhängig von der genauen Funktion von Mgm1 sind Mutationen im menschlichen Orthologen OPA1 mit der häufigsten Form der erblichen optischen Atrophie, der Autosomal Dominanten Optikusatrophie (ADOA) Typ I verknüpft (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000). Diese kommt mit einer Häufigkeit von 1:10000 bis 1:50000 in der europäischen Bevölkerung vor und führt beginnend kurz nach der Geburt zu fortschreitenden Gesichtsfeldeinschränkungen, die meistens zur Erblindung der betroffenen Personen führen (Delettre *et al.*, 2002). Verursacht werden diese durch eine Atrophie der retinalen Ganglien und des Sehnervs. OPA1 kann das orthologe Protein aus *Schizosaccharomyces pombe*, Msp1, funktionell ersetzen (Lenaers *et al.*, 2002). Daran wird die konservierte Funktion von OPA1, Msp1 und Mgm1 deutlich. Mutationen, die mit einer mitochondrialen Fehlfunktion einhergehen betreffen normalerweise postmitotisches Gewebe mit hohem Energiebedarf, vor allem das Nerven- und Muskelgewebe. Unklar ist, warum Mutationen in OPA1 spezifisch den Sehnerv betreffen, während andere Mutationen, die die mitochondriale Funktion stören, bevorzugt mit Schädigungen am Gehör oder Muskelerkrankungen einhergehen. Beispielsweise sind beim Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (auch Deafness-Dystonia-Syndrom genannt) Mutationen in DDP1, einem der kleinen Tim-Proteine im Intermembranraum von menschlichen Mitochondrien, vor allem mit Taubheit und dystonen Bewegungsstörungen assoziiert (Jin *et al.*, 1996; Mohr und Mageroy, 1960; Tranebjaerg *et al.*, 1995). Erst im beginnenden Erwachsenenalter können weitere Symptome wie kortikale Blindheit, mentale Retardierung und psychiatrische Symptome auftreten. Eine mögliche Erklärung für diese Spezifität der Krankheitssymptome besteht in der verstärkten Cytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien, die nach Herunterregulation von OPA1 durch siRNA in Zellkultur zu verstärkter Apoptose führt (Olichon *et al.*, 2003). Tatsächlich spielt apoptotischer Zelltod bei der Entwicklung und Differenzierung des Sehnervs eine wichtige Rolle (Farkas und Grosskreutz, 2001). Bei der Ausprägung der Retina sterben ca. 70% der retinalen Ganglienzellen einen apoptotischen Zelltod. Fehlende OPA1-Funktion könnte in

4 Diskussion

dieser Entwicklungsphase verstärkte Apoptose bewirken und damit die Atrophie des Sehnervs auslösen.

Wie Mgm1, ist OPA1 in mindestens zwei Isoformen vorhanden. Die genaue Anzahl der Isoformen und das Expressionsniveau variiert allerdings zwischen verschiedenen Geweben. Im Menschen gibt es acht verschiedene Spleißvarianten von OPA1 (Delettre *et al.*, 2001). Ob die verschiedenen Isoformen Produkte verschiedener Spleißvarianten sind oder wie in der Bäckerhefe durch proteolytische Prozessierung entstehen, ist nicht bekannt. Für letztere Option spricht die Existenz von PARL, einer zu Pcp1 orthologen Protease im Menschen, die Pcp1 in *S. cerevisiae* funktionell ersetzen kann (McQuibban *et al.*, 2003). Falls OPA1 durch PARL gespalten wird und diese Spaltung in Analogie zum Hefesystem notwendig für die Funktion ist, könnte PARL ebenfalls ein krankheitsrelevantes Gen im Menschen sein. Möglicherweise sind Mutationen in PARL für bis jetzt noch nicht geklärte Fälle von optischer Atrophie verantwortlich. In diesem Fall könnte der Mechanismus der alternativen Topogenese auch auf OPA1 zutreffen und Implikationen für die Entstehung und das Verständnis mitochondrial verursachter Erbkrankheiten haben. Das für die alternative Topogenese kritische Hydrophobizitätsprofil aus zwei aufeinanderfolgenden hydrophoben Segmenten ist in OPA1 jedenfalls konserviert.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit der Mechanismus der alternativen Topogenese des Dynamin-ähnlichen Proteins Mgm1 in Mitochondrien von *S. cerevisiae* unter Beteiligung der neuen Rhomboid-ähnlichen Protease Pcp1 aufgeklärt. Dieser Mechanismus ist essentiell für die Erhaltung der mitochondrialen Morphologie und der mitochondrialen DNA und könnte auf molekularer Ebene den bioenergetischen Zustand von Mitochondrien an ihre Morphologie und die Vererbung der mitochondrialen DNA koppeln. Mgm1 ist zusammen mit Fzo1 und Ugo1 an der Fusion von Mitochondrien beteiligt. Der Mechanismus der mitochondrialen Fusion auf molekularer Ebene und die genaue Funktion beider Mgm1-Isoformen in diesem Prozess wird in zukünftigen Studien adressiert werden müssen. Die Relevanz eines Verständnisses der mitochondrialen Fusion und ihrer Regulation wird nicht zuletzt an der Assoziation von Mutationen in OPA1 und Mfn2, den menschlichen Orthologen von Mgm1 und Fzo1, mit Autosomal Dominanter Optikusatrophie Typ I und Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 2A deutlich. Über die mitochondriale Fusion hinaus wurden in den letzten Jahren zahlreiche Komponenten identifiziert, die in die mitochondriale Dynamik involviert sind. Die Aufklärung der genauen molekularen Funktion dieser Komponenten und ihrer Regulation wird in den nächsten Jahren neue Einblicke in die Dynamik der Mitochondrien und ihre Bedeutung für die gesamte Zelle ermöglichen.

5 Zusammenfassung

In *S. cerevisiae* bilden Mitochondrien ein tubuläres Netzwerk, für dessen Erhaltung ein Gleichgewicht aus Fusions- und Teilungsprozessen notwendig ist. Mgm1 ist ein Dynamin-ähnliches Protein in Mitochondrien, das an der mitochondrialen Fusion beteiligt ist. Es kommt in einer großen Isoform (l-Mgm1) von 97 kD und einer kleinen Isoform (s-Mgm1) von 84 kD vor. In der vorliegenden Arbeit sollte die Biogenese dieser beiden Isoformen und ihre Rolle in der Erhaltung der mitochondrialen Morphologie und der mitochondrialen DNA geklärt werden.

Beide Isoformen konnten im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert werden. Durch Immunpräzipitation und N-terminale Sequenzierung wurden die N-Termini beider Isoformen identifiziert. l-Mgm1 besitzt an seinem N-Terminus ein hydrophobes Segment. Mit diesem Segment ist es in der inneren mitochondrialen Membran verankert. s-Mgm1, dem dieses Segment fehlt, ist peripher membran-assoziiert.

Die Rhomboid-ähnliche Protease Pcp1 in der mitochondrialen Innenmembran ist für die Prozessierung von Mgm1 zu s-Mgm1 verantwortlich. Die Deletion von *PCP1* führt zur Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien und zum Verlust der Respirationskompetenz und der mitochondrialen DNA. Dieser Phänotyp ist von dem der Deletion von *MGM1* nicht zu unterscheiden. Der $\Delta pcp1$ -Phänotyp ist eine direkte Konsequenz der fehlenden Mgm1-Prozessierung und des Fehlens von s-Mgm1. Darüber hinaus ist die Bildung beider Isoformen in ungefähr gleicher Menge für die volle Funktionalität von Mgm1 erforderlich.

Für die koordinierte Bildung beider Isoformen ist eine konservierte Abfolge von zwei hydrophoben Segmenten am N-Terminus von Mgm1 erforderlich. Das weiter C-terminal gelegene hydrophobe Segment enthält die Spaltstelle für Pcp1. Die Hydrophobizität des N-terminalen Segments determiniert hingegen das Mengenverhältnis beider Isoformen. Dabei führt verringerte Hydrophobizität zur vermehrten Bildung von s-Mgm1, während erhöhte Hydrophobizität die Bildung von s-Mgm1 fast vollständig verhindert. Die intermediäre Hydrophobizität der Wildtyp-Sequenz ist kritisch für die koordinierte Bildung beider Isoformen im Verhältnis von ungefähr 1:1. Die Bildung von s-Mgm1 hängt weiterhin von einem funktionalen Importmotor und einer hinreichend hohen ATP-Konzentration in der mitochondrialen Matrix ab. l-Mgm1 kann dagegen ATP-unabhängig und unabhängig vom Importmotor gebildet werden.

5 Zusammenfassung

Diese Daten führten zum Modell der alternativen Topogenese von Mgm1. Demnach dient das erste hydrophobe Segment als Stopp-Transfer-Signal im TIM17/TIM23-Translokationskomplex. Laterale Insertion dieses Segments in die mitochondriale Innenmembran führt zur Bildung von I-Mgm1. Die Überwindung dieses Translokationsarrests führt zum weiteren Import bis das zweite hydrophobe Segment mit der Spaltstelle die Innenmembran erreicht. Dort entsteht durch Pcp1-Spaltung s-Mgm1. Der weitere Import und damit die Pcp1-Prozessierung sind abhängig von ATP und einem funktionalen Importmotor. Die Bildung von I-Mgm1 und s-Mgm1 sind kompetierende Prozesse.

Störungen in diesem kompetitiven Gleichgewicht (veränderte Hydrophobizität des ersten hydrophoben Segments, nicht funktionaler Importmotor, niedrige ATP-Konzentration in der Matrix) führen zu Verschiebungen im Verhältnis beider Mgm1-Isoformen und zur Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien. Daher stellt der Mechanismus der alternativen Topogenese eine Möglichkeit dar, wie der bioenergetische Zustand der Mitochondrien auf molekularer Ebene an die mitochondriale Struktur gekoppelt sein könnte.

Auf diese Weise könnte in Mitochondrien, deren bioenergetischer Status z.B. aufgrund von Mutationen in der mitochondrialen DNA, wie sie durch oxidativen Stress entstehen, gestört ist, die Bildung von s-Mgm1 verringert sein. Möglicherweise führt das dazu, dass die betroffenen Mitochondrien nicht mehr effizient fusionieren und so aus dem mitochondrialen Netzwerk ausgeschlossen werden. Der Mechanismus der alternativen Topogenese würde in diesem Fall gegen geschädigte mitochondriale DNA selektionieren und so deren Vererbung unterbinden.

6 Summary

In *S. cerevisiae* mitochondria form a tubular network. Its maintenance depends on a balance of fusion and fission processes. One of the components essential for mitochondrial fusion is the dynamin-like protein Mgm1. Mgm1 is present in a large isoform (l-Mgm1) with an apparent size of 97 kD and a short isoform (s-Mgm1) with an apparent size of 84 kD. The aim of the present study was to elucidate the biogenesis of both isoforms and their function in the maintenance of mitochondrial morphology and mitochondrial DNA.

Both isoforms were localized to the intermembrane space of mitochondria. Immunoprecipitation and N-terminal sequencing of the two isoforms revealed their N-termini. Near its N-terminus l-Mgm1 contains a hydrophobic segment which serves as an anchor to the inner mitochondrial membrane. s-Mgm1 lacks this segment and is peripherally attached to mitochondrial membranes.

The rhomboid-like protease Pcp1 in the inner mitochondrial membrane is responsible for the processing of Mgm1 to s-Mgm1. Deletion of *PCP1* results in fragmentation of mitochondria, loss of respiration competence and loss of mitochondrial DNA. This phenotype is not distinguishable from the phenotype of the deletion of *MGM1*. The deletion phenotype of *PCP1* is a direct consequence of the absence of s-Mgm1. Moreover, a balanced formation of both isoforms of Mgm1 is required for Mgm1 function.

This balanced formation of both Mgm1 isoforms requires a conserved motif of two subsequent hydrophobic stretches close to the N-terminus of Mgm1. The more C-terminal hydrophobic segment contains the cleavage site for Pcp1. The hydrophobicity of the more N-terminal hydrophobic segment determines the ratio of the two Mgm1 isoforms. Decreased hydrophobicity of this segment leads to increased formation of s-Mgm1 whereas increased hydrophobicity almost completely abolishes generation of s-Mgm1. The intermediate hydrophobicity of the wildtype sequence is crucial for the coordinate formation of both isoforms in a ratio of approximately 1:1. Generation of s-Mgm1 further depends on a functional import motor and the ATP-level in the mitochondrial matrix. In contrast, l-Mgm1 can be generated independently of ATP in the matrix and of a functional import motor.

6 Summary

Based on these data a model of alternative topogenesis of Mgm1 was established. According to this model the first hydrophobic segment acts as a stop transfer signal in the TIM17/TIM23 translocation complex. Lateral insertion of this segment into the inner membrane generates l-Mgm1. In the presence of sufficiently high levels of ATP in the mitochondrial matrix and a functional import motor, part of the preprotein is “pulled in” further until the second hydrophobic segment containing the cleavage site reaches the protease in the inner membrane. Pcp1-cleavage generates s-Mgm1. In this way, generation of l-Mgm1 and s-Mgm1 are competing processes.

Alterations in this competitive equilibrium (altered hydrophobicity of the first hydrophobic segment, non functional import motor, low ATP levels in the mitochondrial matrix) result in a changed ratio of the two Mgm1 isoforms and in fragmentation and aggregation of mitochondria. Therefore, alternative topogenesis provides a mechanism by which the bioenergetic state of mitochondria may be linked to mitochondrial morphology on a molecular level.

Mitochondrial damage such as the acquisition of mutations in mitochondrial DNA by oxidative stress could lead to reduced ATP levels in the matrix. Such damaged mitochondria may be prevented from fusing with intact mitochondria since formation of s-Mgm1 is impaired. In this way, alternative topogenesis would serve as a mechanism that counterselects against bioenergetically disordered mitochondria and excludes them from the mitochondrial network and from inheriting damaged mtDNA.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, Y., T. Shodai, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo, and D. Kohda. 2000. Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*. 100:551-60.
- Adam, A., M. Endres, C. Sirrenberg, F. Lottspeich, W. Neupert, and M. Brunner. 1999. Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *Embo J*. 18:313-9.
- Alexander, C., M. Votruba, U.E. Pesch, D.L. Thiselton, S. Mayer, A. Moore, M. Rodriguez, U. Kellner, B. Leo-Kottler, G. Auburger, S.S. Bhattacharya, and B. Wissinger. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*. 26:211-5.
- Andersson, S.G., A. Zomorodipour, J.O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U.C. Alsmark, R.M. Podowski, A.K. Naslund, A.S. Eriksson, H.H. Winkler, and C.G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*. 396:133-40.
- Arnold, I., and T. Langer. 2002. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1592:89.
- Arretz, M., H. Schneider, B. Guiard, M. Brunner, and W. Neupert. 1994. Characterization of the mitochondrial processing peptidase of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*. 269:4959-67.
- Arretz, M., H. Schneider, U. Wienhues, and W. Neupert. 1991. Processing of mitochondrial precursor proteins. *Biomed Biochim Acta*. 50:403-12.
- Attardi, G., and G. Schatz. 1988. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*. 4:289-333.
- Azpiroz, R., and R.A. Butow. 1993. Patterns of mitochondrial sorting in yeast zygotes. *Mol Biol Cell*. 4:21-36.
- Beech, P.L., T. Nheu, T. Schultz, S. Herbert, T. Lithgow, P.R. Gilson, and G.I. McFadden. 2000. Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science*. 287:1276-9.
- Bereiter-Hahn, J. 1990. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol*. 122:1-63.
- Bereiter-Hahn, J., and M. Voth. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*. 27:198-219.
- Berger, K.H., L.F. Sogo, and M.P. Yaffe. 1997. Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol*. 136:545-53.
- Berger, K.H., and M.P. Yaffe. 1996. Mitochondrial distribution and inheritance. *Experientia*. 52:1111-6.
- Berger, K.H., and M.P. Yaffe. 2000. Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol*. 8:508-13.
- Bernardi, P., V. Petronilli, F. Di Lisa, and M. Forte. 2001. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci*. 26:112-7.
- Bernardi, P., L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli, and F. Di Lisa. 1999. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*. 264:687-701.
- Berthold, J., M.F. Bauer, H.C. Schneider, C. Klaus, K. Dietmeier, W. Neupert, and M. Brunner. 1995. The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell*. 81:1085-93.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7:1513-23.
- Bleazard, W., J.M. McCaffery, E.J. King, S. Bale, A. Mozdy, Q. Tieu, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol*. 1:298-304.
- Boldogh, I., N. Vojtov, S. Karmon, and L.A. Pon. 1998. Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J Cell Biol*. 141:1371-81.
- Boldogh, I.R., D.W. Nowakowski, H.C. Yang, H. Chung, S. Karmon, P. Royes, and L.A. Pon. 2003. A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell*. 14:4618-27.
- Boldogh, I.R., and L.A. Pon. 2001. Assaying actin-binding activity of mitochondria in yeast. *Methods Cell Biol*. 65:159-73.
- Boldogh, I.R., H.C. Yang, W.D. Nowakowski, S.L. Karmon, L.G. Hays, J.R. Yates, 3rd, and L.A. Pon. 2001. Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:3162-7.
- 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*. 72:248-54.
- Brunner, M., and W. Neupert. 1995. Purification and characterization of mitochondrial processing peptidase of *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol*. 248:717-28.

7 Literaturverzeichnis

- Burger, G., M.W. Gray, and B.F. Lang. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* 19:709-16.
- Burgess, S.M., M. Delannoy, and R.E. Jensen. 1994. MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol.* 126:1375-91.
- Cervený, K.L., and R.E. Jensen. 2003. The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol Biol Cell.* 14:4126-39.
- Cervený, K.L., J.M. McCaffery, and R.E. Jensen. 2001. Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol Biol Cell.* 12:309-21.
- Chen, H., S.A. Detmer, A.J. Ewald, E.E. Griffin, S.E. Fraser, and D.C. Chan. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 160:189-200.
- Cyr, D.M., R.A. Stuart, and W. Neupert. 1993. A matrix ATP requirement for presequence translocation across the inner membrane of mitochondria. *J Biol Chem.* 268:23751-4.
- Daum, G., P.C. Bohni, and G. Schatz. 1982. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 257:13028-33.
- De Camilli, P., K. Takei, and P.S. McPherson. 1995. The function of dynamin in endocytosis. *Curr Opin Neurobiol.* 5:559-65.
- Dekker, P.J., M.T. Ryan, J. Brix, H. Muller, A. Honlinger, and N. Pfanner. 1998. Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol.* 18:6515-24.
- Delettre, C., J.M. Griffoin, J. Kaplan, H. Dollfus, B. Lorenz, L. Faivre, G. Lenaers, P. Belenguer, and C.P. Hamel. 2001. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet.* 109:584-91.
- Delettre, C., G. Lenaers, J.M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquelles, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan, and C.P. Hamel. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet.* 26:207-10.
- Delettre, C., G. Lenaers, L. Pelloquin, P. Belenguer, and C.P. Hamel. 2002. OPA1 (Kjer Type) Dominant Optic Atrophy: A Novel Mitochondrial Disease. *Mol Genet Metab.* 75:97-107.
- Dembowski, M., K.P. Kunkele, F.E. Nargang, W. Neupert, and D. Rapaport. 2001. Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem.* 6:6.
- Dietmeier, K., A. Honlinger, U. Bomer, P.J. Dekker, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, M. Kubrich, and N. Pfanner. 1997. Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature.* 388:195-200.
- Dimmer, K.S., S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert, and B. Westermann. 2002. Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 13:847-53.
- Donzeau, M., K. Kaldi, A. Adam, S. Paschen, G. Wanner, B. Guiard, M.F. Bauer, W. Neupert, and M. Brunner. 2000. Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell.* 101:401-12.
- Drubin, D.G., H.D. Jones, and K.F. Wertman. 1993. Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol Biol Cell.* 4:1277-94.
- Egner, A., S. Jakobs, and S.W. Hell. 2002. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3370-5.
- Endres, M., W. Neupert, and M. Brunner. 1999. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *Embo J.* 18:3214-21.
- Erickson, H.P. 2000. Dynamin and FtsZ. Missing links in mitochondrial and bacterial division. *J Cell Biol.* 148:1103-5.
- Esser, K., B. Tursun, M. Ingenhoven, G. Michaelis, and P. E. 2002. A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease pcp1. *J Mol Biol.* 323:835-843.
- Farkas, R.H., and C.L. Grosskreutz. 2001. Apoptosis, neuroprotection, and retinal ganglion cell death: an overview. *Int Ophthalmol Clin.* 41:111-30.
- Fekkes, P., K.A. Shepard, and M.P. Yaffe. 2000. Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J Cell Biol.* 151:333-40.
- Foury, F., T. Roganti, N. Lecrenier, and B. Purnelle. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440:325-31.
- Foury, F., and A. Tzagoloff. 1976. Localization on mitochondrial DNA of mutations leading to a loss of rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase. *Eur J Biochem.* 68:113-9.

7 Literaturverzeichnis

- Frank, S., B. Gaume, E.S. Bergmann-Leitner, W.W. Leitner, E.G. Robert, F. Catez, C.L. Smith, and R.J. Youle. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*. 1:515-25.
- Frazier, A.E., J. Dudek, B. Guiard, W. Voos, Y. Li, M. Lind, C. Meisinger, A. Geissler, A. Sickmann, H.E. Meyer, V. Bilanchone, M.G. Cumsky, K.N. Truscott, N. Pfanner, and P. Rehling. 2004. Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol*. 11:226-33.
- Freeman, M. 2004. Proteolysis within the membrane: rhomboids revealed. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:188-97.
- Frey, T.G., and C.A. Mannella. 2000. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 25:319-24.
- Frey, T.G., C.W. Renken, and G.A. Perkins. 2002. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta*. 1555:196-203.
- Fritz, S., D. Rapaport, E. Klanner, W. Neupert, and B. Westermann. 2001. Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol*. 152:683-92.
- Fritz, S., N. Weinbach, and B. Westermann. 2003. Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell*. 14:2303-13.
- Fujiki, Y., A.L. Hubbard, S. Fowler, and P.B. Lazarow. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 93:97-102.
- Gambill, B.D., W. Voos, P.J. Kang, B. Miao, T. Langer, E.A. Craig, and N. Pfanner. 1993. A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J Cell Biol*. 123:109-17.
- Gartner, F., W. Voos, A. Querol, B.R. Miller, E.A. Craig, M.G. Cumsky, and N. Pfanner. 1995. Mitochondrial import of subunit Va of cytochrome c oxidase characterized with yeast mutants. *J Biol Chem*. 270:3788-95.
- Gaume, B., C. Klaus, C. Ungermann, B. Guiard, W. Neupert, and M. Brunner. 1998. Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *Embo J*. 17:6497-507.
- Geissler, A., A. Chacinska, K.N. Truscott, N. Wiedemann, K. Brandner, A. Sickmann, H.E. Meyer, C. Meisinger, N. Pfanner, and P. Rehling. 2002. The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*. 111:507-18.
- Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems, and R.A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. 11:355-60.
- Glick, B.S. 1995. Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell*. 80:11-4.
- Glick, B.S., A. Brandt, K. Cunningham, S. Muller, R.L. Hallberg, and G. Schatz. 1992. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell*. 69:809-22.
- Glick, B.S., C. Wachter, G.A. Reid, and G. Schatz. 1993. Import of cytochrome b2 to the mitochondrial intermembrane space: the tightly folded heme-binding domain makes import dependent upon matrix ATP. *Protein Sci*. 2:1901-17.
- Gout, I., R. Dhand, I.D. Hiles, M.J. Fry, G. Panayotou, P. Das, O. Truong, N.F. Totty, J. Hsuan, G.W. Booker, and et al. 1993. The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell*. 75:25-36.
- Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang. 1999. Mitochondrial evolution. *Science*. 283:1476-81.
- Griparic, L., N.N. Van Der Wel, I.J. Orozco, P.J. Peters, and A.M. Van Der Bliek. 2004. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/Opa1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem*.
- Guan, K., L. Farh, T.K. Marshall, and R.J. Deschenes. 1993. Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the MGM1 gene. *Curr Genet*. 24:141-8.
- Guthrie, C., and G.R. Fink. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol*. 194:1-270.
- Hales, K.G., and M.T. Fuller. 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*. 90:121-9.
- Hayashi, J., S. Ohta, Y. Kagawa, D. Takai, S. Miyabayashi, K. Tada, H. Fukushima, K. Inui, S. Okada, Y. Goto, and et al. 1994. Functional and morphological abnormalities of mitochondria in human cells containing mitochondrial DNA with pathogenic point mutations in tRNA genes. *J Biol Chem*. 269:19060-6.
- Heim, R., and R.Y. Tsien. 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol*. 6:178-82.

7 Literaturverzeichnis

- Hell, K., J. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert, and R.A. Stuart. 1997. Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett.* 418:367-70.
- Hell, K., J.M. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert, and R.A. Stuart. 1998. Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2250-5.
- Hell, K., W. Neupert, and R.A. Stuart. 2001. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Embo J.* 20:1281-8.
- Hendrick, J.P., P.E. Hodges, and L.E. Rosenberg. 1989. Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:4056-60.
- Herlan, M., F. Vogel, C. Bornhovd, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2003. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem.* 278:27781-8.
- Herrmann, G.J., J.W. Thatcher, J.P. Mills, K.G. Hales, M.T. Fuller, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1998. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol.* 143:359-73.
- Herrmann, J.M., and W. Neupert. 2003. Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life.* 55:219-25.
- Herrmann, J.M., W. Neupert, and R.A. Stuart. 1997. Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J.* 16:2217-26.
- Hill, K., K. Model, M.T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner, and N. Pfanner. 1998. Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature.* 395:516-21.
- Hines, V., A. Brandt, G. Griffiths, H. Horstmann, H. Brutsch, and G. Schatz. 1990. Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. *Embo J.* 9:3191-200.
- Hines, V., and G. Schatz. 1993. Precursor binding to yeast mitochondria. A general role for the outer membrane protein Mas70p. *J Biol Chem.* 268:449-54.
- Hinshaw, J.E. 1999. Dynamin spirals. *Curr Opin Struct Biol.* 9:260-7.
- Hinshaw, J.E., and S.L. Schmid. 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature.* 374:190-2.
- Hobbs, A.E., M. Srinivasan, J.M. McCaffery, and R.E. Jensen. 2001. Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol.* 152:401-10.
- Hoffmann, H.P., and C.J. Avers. 1973. Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science.* 181:749-51.
- Honlinger, A., U. Bomer, A. Alconada, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, K. Dietmeier, and N. Pfanner. 1996. Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *Embo J.* 15:2125-37.
- Horst, M., A. Azem, G. Schatz, and B.S. Glick. 1997. What is the driving force for protein import into mitochondria? *Biochim Biophys Acta.* 1318:71-8.
- Jin, H., M. May, L. Tranebjaerg, E. Kendall, G. Fontan, J. Jackson, S.H. Subramony, F. Arena, H. Lubs, S. Smith, R. Stevenson, C. Schwartz, and D. Vetrie. 1996. A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet.* 14:177-80.
- Jones, B.A., and W.L. Fangman. 1992. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* 6:380-9.
- Kang, P.J., J. Ostermann, J. Shilling, W. Neupert, E.A. Craig, and N. Pfanner. 1990. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature.* 348:137-43.
- Kawai, A., S. Nishikawa, A. Hirata, and T. Endo. 2001. Loss of the mitochondrial Hsp70 functions causes aggregation of mitochondria in yeast cells. *J Cell Sci.* 114:3565-74.
- Kerscher, O., N.B. Sepuri, and R.E. Jensen. 2000. Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell.* 11:103-16.
- Kiebler, M., P. Keil, H. Schneider, I.J. van der Klei, N. Pfanner, and W. Neupert. 1993. The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore. *Cell.* 74:483-92.
- Koehler, C.M., E. Jarosch, K. Tokatlidis, K. Schmid, R.J. Schweyen, and G. Schatz. 1998a. Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science.* 279:369-73.

7 Literaturverzeichnis

- Koehler, C.M., S. Merchant, W. Oppliger, K. Schmid, E. Jarosch, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz, and K. Tokatlidis. 1998b. Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *Embo J.* 17:6477-86.
- Koehler, C.M., S. Merchant, and G. Schatz. 1999. How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci.* 24:428-32.
- Koehler, C.M., M.P. Murphy, N.A. Bally, D. Leuenberger, W. Oppliger, L. Dolfini, T. Junne, G. Schatz, and E. Or. 2000. Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol.* 20:1187-93.
- Koll, H., B. Guiard, J. Rassow, J. Ostermann, A.L. Horwich, W. Neupert, and F.U. Hartl. 1992. Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell.* 68:1163-75.
- Kondo-Okamoto, N., J.M. Shaw, and K. Okamoto. 2003. Mmm1p spans both the outer and inner mitochondrial membranes, and contains distinct domains for targeting and foci formation. *J Biol Chem.*
- Koonin, E.V., K.S. Makarova, I.B. Rogozin, L. Davidovic, M.C. Letellier, and L. Pellegrini. 2003. The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol.* 4:R19.
- Kozany, C., D. Mokranjac, M. Sichting, W. Neupert, and K. Hell. 2004. The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol.* 11:234-41.
- Kozjak, V., N. Wiedemann, D. Milenkovic, C. Lohaus, H.E. Meyer, B. Guiard, C. Meisinger, and N. Pfanner. 2003. An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem.* 278:48520-3.
- Krimmer, T., J. Rassow, W.H. Kunau, W. Voos, and N. Pfanner. 2000. Mitochondrial protein import motor: the ATPase domain of matrix Hsp70 is crucial for binding to Tim44, while the peptide binding domain and the carboxy-terminal segment play a stimulatory role. *Mol Cell Biol.* 20:5879-87.
- Kuhn, A., R. Stuart, R. Henry, and R.E. Dalbey. 2003. The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* 13:510-6.
- Kunkele, K.P., S. Heins, M. Dembowski, F.E. Nargang, R. Benz, M. Thieffry, J. Walz, R. Lill, S. Nussberger, and W. Neupert. 1998a. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell.* 93:1009-19.
- Kunkele, K.P., P. Juin, C. Pompa, F.E. Nargang, J.P. Henry, W. Neupert, R. Lill, and M. Thieffry. 1998b. The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J Biol Chem.* 273:31032-9.
- Kyte, J., and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 157:105-32.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lafontaine, D., and D. Tollervey. 1996. One-step PCR mediated strategy for the construction of conditionally expressed and epitope tagged yeast proteins. *Nucleic Acids Res.* 24:3469-71.
- Lazzarino, D.A., I. Boldogh, M.G. Smith, J. Rosand, and L.A. Pon. 1994. Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity. *Mol Biol Cell.* 5:807-18.
- Lee, J.R., S. Urban, C.F. Garvey, and M. Freeman. 2001. Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell.* 107:161-71.
- Legros, F., A. Lombes, P. Frachon, and M. Rojo. 2002. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell.* 13:4343-54.
- Lenaers, G., L. Pelloquin, A. Olichon, L.J. Emorine, E. Guillou, C. Delettre, C.P. Hamel, B. Ducommun, and P. Belenguer. 2002. What similarity between human and fission yeast proteins is required for orthology? *Yeast.* 19:1125-6.
- Leuenberger, D., N.A. Bally, G. Schatz, and C.M. Koehler. 1999. Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *Embo J.* 18:4816-22.
- Li, Y., J. Dudek, B. Guiard, N. Pfanner, P. Rehling, and W. Voos. 2004. The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria: Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18. *J Biol Chem.*
- Lill, R., and G. Kispal. 2000. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 25:352-6.
- Lithgow, T. 2000. Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett.* 476:22-6.
- Lohi, O., S. Urban, and M. Freeman. 2004. Diverse substrate recognition mechanisms for rhomboids; thrombomodulin is cleaved by Mammalian rhomboids. *Curr Biol.* 14:236-41.

7 Literaturverzeichnis

- Luciano, P., and V. Geli. 1996. The mitochondrial processing peptidase: function and specificity. *Experientia*. 52:1077-82.
- Mannella, C.A. 2001. Application of electron tomography to mitochondrial research. *Methods Cell Biol.* 65:245-56.
- Mannella, C.A., D.R. Pfeiffer, P.C. Bradshaw, Moraru, II, B. Slepchenko, L.M. Loew, C.E. Hsieh, K. Buttle, and M. Marko. 2001. Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*. 52:93-100.
- Margulis, L. 1970. Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven, CT.
- Margulis, L. 1981. Symbiosis in Cell Evolution. *San Francisco: W.H. Freeman*.
- Matz, M.V., A.F. Fradkov, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, A.G. Zarskiy, M.L. Markelov, and S.A. Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol.* 17:969-73.
- McConnell, S.J., and M.P. Yaffe. 1992. Nuclear and mitochondrial inheritance in yeast depends on novel cytoplasmic structures defined by the MDM1 protein. *J Cell Biol.* 118:385-95.
- McQuibban, G.A., S. Saurya, and M. Freeman. 2003. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*. 423:537-41.
- Meeusen, S., and J. Nunnari. 2003. Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J Cell Biol.* 163:503-10.
- Meeusen, S., Q. Tieu, E. Wong, E. Weiss, D. Schieltz, J.R. Yates, and J. Nunnari. 1999. Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *J Cell Biol.* 145:291-304.
- Meisinger, C., M. Rissler, A. Chacinska, L.K. Szklarz, D. Milenkovic, V. Kozjak, B. Schonfisch, C. Lohaus, H.E. Meyer, M.P. Yaffe, B. Guiard, N. Wiedemann, and N. Pfanner. 2004. The mitochondrial morphology protein mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell*. 7:61-71.
- Messerschmitt, M., S. Jakobs, F. Vogel, S. Fritz, K.S. Dimmer, W. Neupert, and B. Westermann. 2003. The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol.* 160:553-64.
- Milenkovic, D., V. Kozjak, N. Wiedemann, C. Lohaus, H.E. Meyer, B. Guiard, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2004. Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J Biol Chem*.
- Milisav, I., F. Moro, W. Neupert, and M. Brunner. 2001. Modular structure of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *J Biol Chem*. 276:25856-61.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Naturwissenschaften*. 191:144-8.
- Moczko, M., K. Dietmeier, T. Sollner, B. Segui, H.F. Steger, W. Neupert, and N. Pfanner. 1992. Identification of the mitochondrial receptor complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 310:265-8.
- Mohr, J., and K. Mageroy. 1960. Sex-linked deafness of a possibly new type. *Acta Genet Stat Med.* 10:54-62.
- Mokranjac, D., S.A. Paschen, C. Kozany, H. Prokisch, S.C. Hoppins, F.E. Nargang, W. Neupert, and K. Hell. 2003a. Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *Embo J.* 22:816-25.
- Mokranjac, D., M. Sichtung, W. Neupert, and K. Hell. 2003b. Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *Embo J.* 22:4945-56.
- Moro, F., C. Sirrenberg, H.C. Schneider, W. Neupert, and M. Brunner. 1999. The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *Embo J.* 18:3667-75.
- Mozdy, A.D., J.M. McCaffery, and J.M. Shaw. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol.* 151:367-80.
- Muhlberg, A.B., and S.L. Schmid. 2000. Domain structure and function of dynamin probed by limited proteolysis. *Methods*. 20:475-83.
- Muhlberg, A.B., D.E. Warnock, and S.L. Schmid. 1997. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *Embo J.* 16:6676-83.
- Muhlenhoff, U., and R. Lill. 2000. Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 1459:370-82.
- Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 66:863-917.
- Neupert, W., and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:555-65.
- Nunnari, J., T.D. Fox, and P. Walter. 1993. A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science*. 262:1997-2004.

7 Literaturverzeichnis

- Nunnari, J., W.F. Marshall, A. Straight, A. Murray, J.W. Sedat, and P. Walter. 1997. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell*. 8:1233-42.
- Okamoto, K., A. Brinker, S.A. Paschen, I. Moarefi, M. Hayer-Hartl, W. Neupert, and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *Embo J*. 21:3659-71.
- Okamoto, K., P.S. Perlman, and R.A. Butow. 1998. The sorting of mitochondrial DNA and mitochondrial proteins in zygotes: preferential transmission of mitochondrial DNA to the medial bud. *J Cell Biol*. 142:613-23.
- Olichon, A., L. Baricault, N. Gas, E. Guillou, A. Valette, P. Belenguer, and G. Lenaers. 2003. Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem*. 278:7743-7746.
- Olichon, A., L.J. Emorine, E. Descoins, L. Pelloquin, L. Brichese, N. Gas, E. Guillou, C. Delettre, A. Valette, C.P. Hamel, B. Ducommun, G. Lenaers, and P. Belenguer. 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett*. 523:171-6.
- Ono, T., K. Isobe, K. Nakada, and J.I. Hayashi. 2001. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet*. 28:272-5.
- Ostermann, J., W. Voos, P.J. Kang, E.A. Craig, W. Neupert, and N. Pfanner. 1990. Precursor proteins in transit through mitochondrial contact sites interact with hsp70 in the matrix. *FEBS Lett*. 277:281-4.
- Otsuga, D., B.R. Keegan, E. Brisch, J.W. Thatcher, G.J. Hermann, W. Bleazard, and J.M. Shaw. 1998. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol*. 143:333-49.
- Paschen, S.A., and W. Neupert. 2001. Protein import into mitochondria. *IUBMB Life*. 52:101-12.
- Paschen, S.A., U. Rothbauer, K. Kaldi, M.F. Bauer, W. Neupert, and M. Brunner. 2000. The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *Embo J*. 19:6392-400.
- Paschen, S.A., T. Waizenegger, T. Stan, M. Preuss, M. Cyrklaff, K. Hell, D. Rapaport, and W. Neupert. 2003. Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature*. 426:862-6.
- Pelham, H.R., and R.J. Jackson. 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*. 67:247-56.
- Pelloquin, L., P. Belenguer, Y. Menon, N. Gas, and B. Ducommun. 1999. Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin-related protein. *J Cell Sci*. 112:4151-61.
- Perkins, G., C. Renken, M.E. Martone, S.J. Young, M. Ellisman, and T. Frey. 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*. 119:260-72.
- Perkins, G.A., and T.G. Frey. 2000. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron*. 31:97-111.
- Perkins, G.A., C.W. Renken, I.J. van der Klei, M.H. Ellisman, W. Neupert, and T.G. Frey. 2001. Electron tomography of mitochondria after the arrest of protein import associated with Tom19 depletion. *Eur J Cell Biol*. 80:139-50.
- Perkins, G.A., J.Y. Song, L. Tarsa, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, and T.G. Frey. 1998. Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions. *J Bioenerg Biomembr*. 30:431-42.
- Pfanner, N., P. Hoeben, M. Tropschug, and W. Neupert. 1987. The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria. *J Biol Chem*. 262:14851-4.
- Pfanner, N., and W. Neupert. 1987. Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *J Biol Chem*. 262:7528-36.
- Pollock, R.A., F.U. Hartl, M.Y. Cheng, J. Ostermann, A. Horwich, and W. Neupert. 1988. The processing peptidase of yeast mitochondria: the two co-operating components MPP and PEP are structurally related. *Embo J*. 7:3493-500.
- Praefcke, G.J., and H.T. McMahon. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:133-47.
- Preuss, M., K. Leonhard, K. Hell, R.A. Stuart, W. Neupert, and J.M. Herrmann. 2001. Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 153:1085-96.

7 Literaturverzeichnis

- Prokisch, H., C. Scharfe, D.G. Camp, 2nd, W. Xiao, L. David, C. Andreoli, M.E. Monroe, R.J. Moore, M.A. Gritsenko, C. Kozany, K.K. Hixson, H.M. Mottaz, H. Zischka, M. Ueffing, Z.S. Herman, R.W. Davis, T. Meitinger, P.J. Oefner, R.D. Smith, and L.M. Steinmetz. 2004. Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol.* 2:E160.
- Rapaport, D., M. Brunner, W. Neupert, and B. Westermann. 1998. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 273:20150-5.
- Rassow, J., A.C. Maarse, E. Krainer, M. Kubrich, H. Muller, M. Meijer, E.A. Craig, and N. Pfanner. 1994. Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol.* 127:1547-56.
- Reich, A., and B.Z. Shilo. 2002. Keren, a new ligand of the *Drosophila* epidermal growth factor receptor, undergoes two modes of cleavage. *Embo J.* 21:4287-96.
- Reichert, A.S., and W. Neupert. 2002. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta.* 1592:41.
- Rojo, E.E., B. Guiard, W. Neupert, and R.A. Stuart. 1998. Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements. *J Biol Chem.* 273:8040-7.
- Rojo, M., F. Legros, D. Chateau, and A. Lombes. 2002. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci.* 115:1663-74.
- Rose, M.D., Winston, F., Hieter, P. 1990. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Rothstein, R.J., and F. Sherman. 1980. Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics.* 94:871-89.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-91.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-4.
- Salim, K., M.J. Bottomley, E. Querfurth, M.J. Zvelebil, I. Gout, R. Scaife, R.L. Margolis, R. Gigg, C.I. Smith, P.C. Driscoll, M.D. Waterfield, and G. Panayotou. 1996. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *Embo J.* 15:6241-50.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Manniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5463-7.
- Santel, A., and M.T. Fuller. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci.* 114:867-74.
- Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science.* 283:1488-93.
- Satoh, M., T. Hamamoto, N. Seo, Y. Kagawa, and H. Endo. 2003. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 300:482-93.
- Schneider, H.C., J. Berthold, M.F. Bauer, K. Dietmeier, B. Guiard, M. Brunner, and W. Neupert. 1994. Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature.* 371:768-74.
- Schneider, H.C., B. Westermann, W. Neupert, and M. Brunner. 1996. The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. *Embo J.* 15:5796-803.
- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol.* 147:699-706.
- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 2001. UGO1 Encodes an Outer Membrane Protein Required for Mitochondrial Fusion. *J Cell Biol.* 152:1123-34.
- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 2004. Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem.*
- Sesaki, H., S.M. Southard, A.E. Hobbs, and R.E. Jensen. 2003a. Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem Biophys Res Commun.* 308:276-83.
- Sesaki, H., S.M. Southard, M.P. Yaffe, and R.E. Jensen. 2003b. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell.* 14:2342-56.

7 Literaturverzeichnis

- Sever, S., H. Damke, and S.L. Schmid. 2000. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic*. 1:385-92.
- Sever, S., A.B. Muhlbarg, and S.L. Schmid. 1999. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 398:481-6.
- Shaw, J.M., and J. Nunnari. 2002. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol*. 12:178-84.
- Shepard, K.A., and M.P. Yaffe. 1999. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J Cell Biol*. 144:711-20.
- Sickmann, A., J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H.E. Meyer, B. Schonfisch, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, P. Rehling, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Sikorski, R.S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 122:19-27.
- Simon, V.R., S.L. Karmon, and L.A. Pon. 1997. Mitochondrial inheritance: cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 37:199-210.
- Simon, V.R., T.C. Swayne, and L.A. Pon. 1995. Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J Cell Biol*. 130:345-54.
- Sirrenberg, C., M.F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert, and M. Brunner. 1996. Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*. 384:582-5.
- Sirrenberg, C., M. Endres, H. Folsch, R.A. Stuart, W. Neupert, and M. Brunner. 1998. Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*. 391:912-5.
- Sogo, L.F., and M.P. Yaffe. 1994. Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol*. 126:1361-73.
- Sollner, T., G. Griffiths, R. Pfaller, N. Pfanner, and W. Neupert. 1989. MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell*. 59:1061-70.
- Steinmetz, L.M., C. Scharfe, A.M. Deutschbauer, D. Mokranjac, Z.S. Herman, T. Jones, A.M. Chu, G. Giaever, H. Prokisch, P.J. Oefner, and R.W. Davis. 2002. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet*. 31:400-4.
- Stuart, J.A., K.M. Brindle, J.A. Harper, and M.D. Brand. 1999. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr*. 31:517-25.
- Stuart, R.A., A. Gruhler, I. van der Klei, B. Guiard, H. Koll, and W. Neupert. 1994. The requirement of matrix ATP for the import of precursor proteins into the mitochondrial matrix and intermembrane space. *Eur J Biochem*. 220:9-18.
- Takei, K., V. Haucke, V. Slepnev, K. Farsad, M. Salazar, H. Chen, and P. De Camilli. 1998. Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell*. 94:131-41.
- Takei, K., P.S. McPherson, S.L. Schmid, and P. De Camilli. 1995. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature*. 374:186-90.
- Takei, K., O. Mundigl, L. Daniell, and P. De Camilli. 1996. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol*. 133:1237-50.
- Takei, K., V.I. Slepnev, and P. De Camilli. 2001. Interactions of dynamin and amphiphysin with liposomes. *Methods Enzymol*. 329:478-86.
- Tieu, Q., and J. Nunnari. 2000. Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol*. 151:353-66.
- Tieu, Q., V. Okreglak, K. Naylor, and J. Nunnari. 2002. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol*. 158:445-52.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:4350-4.
- Tranebjaerg, L., C. Schwartz, H. Eriksen, S. Andreasson, V. Ponjavic, A. Dahl, R.E. Stevenson, M. May, F. Arena, D. Barker, and et al. 1995. A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet*. 32:257-63.
- Truscott, K.N., P. Kovermann, A. Geissler, A. Merlin, M. Meijer, A.J. Driessen, J. Rassow, N. Pfanner, and R. Wagner. 2001. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*. 8:1074-82.

7 Literaturverzeichnis

- Truscott, K.N., W. Voos, A.E. Frazier, M. Lind, Y. Li, A. Geissler, J. Dudek, H. Muller, A. Sickmann, H.E. Meyer, C. Meisinger, B. Guiard, P. Rehling, and N. Pfanner. 2003. A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol.* 163:707-13.
- Ungermann, C., B. Guiard, W. Neupert, and D.M. Cyr. 1996. The delta psi- and Hsp70/MIM44-dependent reaction cycle driving early steps of protein import into mitochondria. *Embo J.* 15:735-44.
- Urban, S., and M. Freeman. 2003. Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell.* 11:1425-34.
- Urban, S., J.R. Lee, and M. Freeman. 2001. Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell.* 107:173-82.
- Urban, S., J.R. Lee, and M. Freeman. 2002a. A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all Drosophila membrane-tethered EGF ligands. *Embo J.* 21:4277-86.
- Urban, S., D. Schlieper, and M. Freeman. 2002b. Conservation of intramembrane proteolytic activity and substrate specificity in prokaryotic and eukaryotic rhomboids. *Curr Biol.* 12:1507.
- Voisine, C., E.A. Craig, N. Zufall, O. von Ahsen, N. Pfanner, and W. Voos. 1999. The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell.* 97:565-74.
- von Heijne. 1986. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J.* 5:1335-42.
- Voos, W., B.D. Gambill, S. Laloraya, D. Ang, E.A. Craig, and N. Pfanner. 1994. Mitochondrial GrpE is present in a complex with hsp70 and preproteins in transit across membranes. *Mol Cell Biol.* 14:6627-34.
- Voos, W., O. von Ahsen, H. Muller, B. Guiard, J. Rassow, and N. Pfanner. 1996. Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. *Embo J.* 15:2668-77.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann, and P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 10:1793-808.
- Waizenegger, T., S.J. Habib, M. Lech, D. Mokranjac, S.A. Paschen, K. Hell, W. Neupert, and D. Rapaport. 2004. Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep.* 5:704-9.
- Wallace, D.C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 283:1482-8.
- Wang, Y., and H. Weiner. 1994. Evaluation of electrostatic and hydrophobic effects on the interaction of mitochondrial signal sequences with phospholipid bilayers. *Biochemistry.* 33:12860-7.
- Warnock, D.E., J.E. Hinshaw, and S.L. Schmid. 1996. Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem.* 271:22310-4.
- Wasserman, J.D., S. Urban, and M. Freeman. 2000. A family of rhomboid-like genes: Drosophila rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes Dev.* 14:1651-63.
- Westermann, B. 2002. Merging mitochondria matters: Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep.* 3:527-31.
- Westermann, B. 2003. Mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta.* 1641:195-202.
- Westermann, B., and W. Neupert. 2000. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 16:1421-7.
- Whatley, F.R. 1981. The establishment of mitochondria: *Paracoccus* and *Rhodospseudomonas*. *Ann N Y Acad Sci.* 361:330-40.
- Wickner, W. 2002. Yeast vacuoles and membrane fusion pathways. *Embo J.* 21:1241-7.
- Wiedemann, N., V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schonfisch, S. Rospert, M.T. Ryan, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2003. Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature.* 424:565-71.
- Williamson, D.H., and D.J. Fennell. 1979. Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol.* 56:728-33.
- Winzler, E.A., D.D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J.D. Boeke, H. Bussey, A.M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S.W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S.H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J.H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, R.W. Davis, and et al. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.* 285:901-6.
- Wong, E.D., J.A. Wagner, S.W. Gorsich, J.M. McCaffery, J.M. Shaw, and J. Nunnari. 2000. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol.* 151:341-52.

7 Literaturverzeichnis

- Wong, E.D., J.A. Wagner, S.V. Scott, V. Okreglak, T.J. Holewinske, A. Cassidy-Stone, and J. Nunnari. 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol.* 160:303-11.
- Yaffe, M.P. 1999. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science.* 283:1493-7.
- Yaffe, M.P., and G. Schatz. 1984. Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:4819-23.
- Yamamoto, H., M. Esaki, T. Kanamori, Y. Tamura, S. Nishikawa, and T. Endo. 2002. Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell.* 111:519-28.
- Youngman, M.J., A.E. Hobbs, S.M. Burgess, M. Srinivasan, and R.E. Jensen. 2004. Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J Cell Biol.* 164:677-88.
- Zhang, P., and J.E. Hinshaw. 2001. Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat Cell Biol.* 3:922-6.
- Zuchner, S., I.V. Mersiyanova, M. Muglia, N. Bissar-Tadmouri, J. Rochelle, E.L. Dadali, M. Zappia, E. Nelis, A. Patitucci, J. Senderek, Y. Parman, O. Evgrafov, P.D. Jonghe, Y. Takahashi, S. Tsuji, M.A. Pericak-Vance, A. Quattrone, E. Battaloglu, A.V. Polyakov, V. Timmerman, J.M. Schroder, J.M. Vance, and E. Battaloglu. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* 36:449-51.

7 Literaturverzeichnis

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Herlan, M., F. Vogel, C. Bornhovd, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2003. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem.* 278:27781-8.

Herlan, M., C. Bornhovd, K. Hell, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol.* 165:167-73.

8 Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
ADOA	Autosomal Dominante Optikusatrophie
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
<i>C. e.</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
Ccp1	Cytochrome c Peroxidase
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DHFR	Dihydrofolatreductase
DLD	D-Lactatdehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNM	<i>dynamin related</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FIS	<i>mitochondrial fission</i>
Fzo1	<i>fuzzy onion</i>
<i>g</i>	9,81 m/s ²
G	Guanin
GAG	<i>glycerol adapted growth</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GED	<i>GTPase effector domain</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
<i>H. s.</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
Imp1	<i>Mitochondrial Inner Membrane Protease Untereinheit 1</i>
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
I-Mgm1	große Isoform von Mgm1 („ <i>large isoform</i> “)
MDM	<i>mitochondrial distribution and morphology</i>
MDV	<i>mitochondrial division</i>
MGM	<i>mitochondrial genome maintenance</i>
MMM	<i>mitochondrial morphology maintenance</i>
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
<i>N. c.</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>

8 Abkürzungsverzeichnis

NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
NET	<i>complex mitochondrial network</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide Sensitive Factor</i>
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARL	<i>Presenilin associated rhomboid like protein</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
Pcp1	<i>Processing of Cytochrome c peroxidase 1</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PH-Domäne	<i>Pleckstrin homology</i> – Domäne
P _i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RHBDL-2	<i>Rhomboid-like protein 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. p.</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
s-Mgm1	kleine Isoform von Mgm1 („ <i>short isoform</i> “)
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
Su9	Untereinheit 9 der F ₀ F ₁ -ATPase
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TIM	Translokationskomplex der Innenmembran
Tom	Protein des TOM-Komplexes
TOM	Translokationskomplex der Außenmembran
TPI	Triosephosphatisomerase
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit
U	Uridin
Ugo1	Fusion (japanisches Wort)
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
YPD	Hefeextrakt, Pepton, Dextrose
YPG	Hefeextrakt, Pepton, Glycerol
YPGal	Hefeextrakt, Pepton, Galaktose
z. T.	zum Teil

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. Walter Neupert, für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, an seinem Institut zu arbeiten. Sein Interesse an meiner Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Darüber hinaus verstand er es, in seiner international besetzten Gruppe ein hervorragendes Klima für wissenschaftliches Denken und Arbeiten, den Austausch von Ideen und die wissenschaftliche Diskussion zu schaffen.

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

Dr. Andreas Reichert danke ich herzlich für die erstklassige Anleitung und Unterstützung bei dieser Arbeit und die freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit. Mit einer Vielzahl von Ideen war er mir immer wieder eine große Hilfe für den Fortgang meiner Projekte. Besonders schätzte ich die Offenheit in der Diskussion, die Aufgeschlossenheit gegenüber anderen Argumenten und Sichtweisen und die Freiheiten, die er mir bei der Ausgestaltung meiner Projekte ließ.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Christiane Kotthoff. Sie hat durch ihre herausragende und engagierte Arbeit, insbesondere auch in kritischen Projektphasen, durch ihre Freundschaft und durch viele aufmunternde Worte einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Darüber hinaus war ihre freundliche und optimistische Art ein Garant für die gute Atmosphäre in der Gruppe.

Carsten Bornhövd danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und für seine Hilfsbereitschaft und Freundschaft über die Wissenschaft hinaus. Viele interessante und produktive Diskussionen, eine stets gewährleistete Versorgung mit Arbeitsmaterialien und nicht zuletzt praktische Hilfe im Labor habe ich ihm zu verdanken. Dr. Vincent Soubannier, Dr. Stéphane Duvezin-Caubet, Anja Schäfer und Johannes Wagener danke ich für die gute, bisweilen heitere Arbeitsatmosphäre, für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für viele gemeinsame Unternehmungen auch außerhalb des Laborbetriebs. Dr. Kai Hell und allen anderen Mitarbeiterinnen

9 Danksagung

und Mitarbeitern in unserem Labor, Ulrike Gärtner, Stephan Paschen, Alexander Adam und Gabriele Ludwig gebührt ebenfalls dieser Dank.

Kai Dimmer, Florian Fuchs, Stefan Fritz und Marlies Messerschmidt danke ich für die gute Aufnahme im „Neupert“-Labor, die Hilfe bei meinen ersten Experimenten und eine später weiterbestehende Interaktion und Diskussionsbereitschaft. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Michael Brunner, Prof. Dr. Benedikt Westermann und Prof. Dr. Koji Okamoto, die mir insbesondere zu Beginn meiner Arbeit mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung zur Seite standen.

Allen anderen Kollegen im „Neupert“-Labor, die ich hier nicht im einzelnen erwähnen kann, sei gedankt für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank gilt all denen, die mir während meiner Arbeit Antikörper, Plasmide, *E. coli*- oder Hefestämme zur Verfügung gestellt haben.

Frau Döge, Frau Farsen und Frau Hauck danke ich für die Hilfe, die sie mir in allen verwaltungstechnischen Angelegenheiten zukommen ließen. Auch den Mitarbeitern der Werkstatt und des Tierstalls und den Spülfrauen, die täglich für einen reibungslosen Ablauf des Laborbetriebs sorgten, danke ich herzlich.

Prof. Dr. Tzagoloff danke ich für die Bereitstellung des M28-82 Stamms.

Zum Schluss gilt mein größter Dank meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht und mich auf diesem Weg immer unterstützt haben und meiner Frau, Alice. Sie hat mich in schwierigen Projektphasen mit ihrer Liebe und ihrer Bereitschaft zuzuhören aufgemuntert und mir Kraft gegeben, meine Arbeit mit neuem Schwung fortzusetzen. Geduldig hat sie es ertragen, wenn der Wissenschaft wieder einmal Vorrang vor gemeinsamen Unternehmungen gegeben wurde.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Joachim Mark Herlan
Geburtsdatum: 27.06.1974
Geburtsort: Sulz am Neckar
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1980 -1984 Besuch der Neuberg–Grundschule in Neckarsulm
1984-1993 Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Neckarsulm
Mai 1993 Abitur am Albert-Schweitzer-Gymnasium in Neckarsulm

Hochschulbildung:

Oktober 1994-Juli 2000 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
Oktober 1995 Diplomvorprüfung, Teil I
April 1997 Diplomvorprüfung, Teil II
April 1998-April 1999 Praktikumsjahr am Max-Planck-Institut für Biochemie in
Martinsried bei München und an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
Oktober 1999 Diplomhauptprüfung
Oktober 1999-Juli 2000 Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. K.-U.
Fröhlich am Physiologisch-Chemischen Institut der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Thema: Apoptose in der Bäckerhefe *Saccharomyces
cerevisiae*
Oktober 2000 Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von
Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für
Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Stipendien:

1997-2000: Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes