

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

**Untersuchungen zur  
mitochondrialen Membranfusion**

von  
**Stefan Fritz**  
aus  
Heidelberg

2003

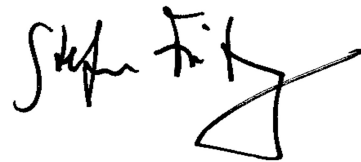
## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dr. W. Neupert (Fachvertreter: PD Dr. M. Meisterernst) betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 07.04.2003

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Stefan Fritsch'. The signature is stylized with a large, sweeping flourish at the end.

(Unterschrift des Autors)

Dissertation eingereicht am 08.04.2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert
2. Gutachter: PD Dr. Michael Meisterernst

Mündliche Prüfung am 04.07.2003

*Für meine Eltern*

## Abkürzungen

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol pro Liter
Ω	Ohm
A	Absorptionskoeffizient
A	Ampere
A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CCPO	Cytochrom c-Peroxidase
Ci	Curie
cm	Zentimeter
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DLD	D-Laktatdehydrogenase
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Farad

G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung $m/s^2$
G418	Geneticin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin-Peptid
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
IMR	Intermembranraum
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Mol pro Liter
mA	Milliampère
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mtGFP	Fusionsprotein aus GFP und der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 des $F_0$ -Teils der mitochondrialen ATP-Synthase von <i>Neurospora crassa</i>

mtRFP	Fusionsprotein aus RFP und der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 des F <sub>0</sub> -Teils der mitochondrialen ATP-Synthase von <i>Neurospora crassa</i>
m/v	Masse pro Volumen
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitive fusion factor
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD <sub>578</sub>	Optische Dichte bei 578 nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RFP	Rot Fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Medium	Synthetisches Vollmedium

SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit(s)
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Identifizierung von Hefemutanten, die Defekte der mitochondrialen Dynamik aufweisen.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Fusion und Teilung von Mitochondrien.....</b>	<b>6</b>
1.2.1	Fusion und Teilung von Mitochondrien in Hefe.....	7
1.2.2	Fzo1 spielt eine wichtige Rolle für die Mitochondrienfusion .....	10
1.2.3	Die mitochondriale Teilung wird durch Dnm1 und seine Co-Faktoren vermittelt.....	12
<b>1.3</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1.1	Plasmidreinigung aus <i>E. coli</i> .....	16
2.1.2	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	17
2.1.3	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	18
2.1.3.1	Restriktionsverdau von DNA .....	18
2.1.3.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	18
2.1.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase .....	19
2.1.4	Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	19
2.1.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	20
2.1.6	Präparation transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	20
2.1.7	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation .....	20
2.1.8	Verwendete Vektoren .....	21
2.1.9	Verwendete Plasmide .....	21



<b>2.2 Methoden der Hefegenetik.....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	24
2.2.2 Kreuzung und Tetradenanalyse von Hefestämmen.....	25
2.2.3 Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> („Tüpfeltest“).....	26
2.2.4 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	27
2.2.4.1 Herstellung transformationskompetenter Hefezellen.....	27
2.2.4.2 Transformation von Hefe.....	27
2.2.5 Nachweis chromosomaler Insertionen/Deletionen in <i>S. cerevisiae</i> ...	28
2.2.6 Verwendete Hefestämme.....	28
<b>2.3 Methoden der Zellbiologie .....</b>	<b>32</b>
2.3.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe.....	32
2.3.2 Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	33
2.3.3 Subfraktionierung von Mitochondrien.....	34
2.3.4 <i>In vivo</i> -Nachweis der mitochondrialen Fusion (Mating Assay) .....	36
2.3.5 DAPI-Färbung der mitochondrialen DNA .....	37
2.3.6 Fluoreszenzmikroskopie.....	38
2.3.7 Durchmusterung einer Hefestammsammlung nach Mutanten mit veränderter mitochondrialer Form.....	38
2.3.8 Bestimmung der Aktivität von $\beta$ -Galaktosidase .....	39
<b>2.4 Methoden der Proteinbiochemie .....</b>	<b>40</b>
2.4.1 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine <i>in vitro</i> .....	40
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE).....	41
2.4.3 Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomasie-Blau .....	42
2.4.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen .....	43
2.4.5 Quantifizierung von Proteinbanden durch Autoradiographie/ Densitometrie und durch Phosphorimaging.....	43
2.4.6 Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure .....	44

2.4.7	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
2.4.8	Quervernetzung mitochondrialer Proteine .....	44
2.4.9	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinkomplexen durch Gelfiltration.....	45
2.4.10	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose- Membranen (Westernblot).....	46
<b>2.5</b>	<b>Puffer und Medien .....</b>	<b>48</b>
<b>2.6</b>	<b>Chemikalien und Geräte .....</b>	<b>49</b>
2.6.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	49
2.6.2	Geräte.....	50
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Biochemische Charakterisierung von Fzo1 .....</b>	<b>51</b>
3.1.1	Fzo1 enthält zwei potentielle Transmembrandomänen .....	51
3.1.2	Der C-Terminus von Fzo1 ist im Cytosol lokalisiert.....	54
3.1.2.1	Bestimmung der Topologie von Fzo1 durch Subfraktionierung und Proteasebehandlung von Mitochondrien.....	54
3.1.2.2	Die Topologie von Fzo1 und die Entstehung der Fzo1-Fragmente.....	60
3.1.3	Untersuchungen zur Interaktion von Fzo1 mit der Innenmembran...	61
3.1.3.1	Fzo1 befindet sich in einer Kontaktstelle.....	61
3.1.3.2	Fzo1 ist peripher mit der mitochondrialen Innenmembran verbunden.....	63
3.1.3.3	Welcher Teil von Fzo1 interagiert mit der Innenmembran?.....	65
3.1.3.4	Ein intaktes Fzo1-Intermembranraumsegment wird für eine Assoziation mit der Innenmembran benötigt .....	67
3.1.3.5	Die Wechselwirkung von Fzo1 mit der Innenmembran wird für die mitochondriale Fusion benötigt.....	70

3.1.4	Wechselwirkung von benachbarten Fzo1-Proteinen .....	73
<b>3.2</b>	<b>Mdm30 reguliert die Fusionsaktivität der Mitochondrien .....</b>	<b>76</b>
3.2.1	Identifizierung neuer <i>mdm</i> -Mutanten.....	76
3.2.2	Mdm30 wird für die Fusion der Mitochondrien benötigt.....	81
3.2.3	Mdm30 reguliert die Fzo1-Proteinmenge .....	83
3.2.4	Die Rolle von <i>MDM30</i> und <i>FZO1</i> bei der Aggregation von Mitochondrien.....	86
3.2.5	$\Delta$ <i>mdm30</i> -Mutanten verlieren bei 37°C ihre mtDNA .....	88
3.2.6	Die $\Delta$ <i>mdm30</i> -Mutation beeinflusst nicht die Transkription von <i>FZO1</i> .....	91
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>94</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Rolle von Fzo1 bei der Fusion.....</b>	<b>94</b>
4.1.1	Die Topologie von Fzo1 .....	94
4.1.2	Die Rolle von Kontaktstellen bei der Fusion .....	96
4.1.3	Rolle von Fzo1 als „Docking“-Faktor der Mitochondrien oder als Fusogen für die mitochondriale Außenmembran.....	97
<b>4.2</b>	<b>Ein möglicher Mechanismus der mitochondrialen Fusion.....</b>	<b>99</b>
<b>4.3</b>	<b>Die molekulare Basis der mitochondrialen Formgebung.....</b>	<b>103</b>
<b>4.4</b>	<b>Mdm30 ist ein neues Protein, das eine Rolle bei der Fusion spielt....</b>	<b>104</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>110</b>

**VERÖFFENTLICHUNGEN**

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**

## 1 Einleitung

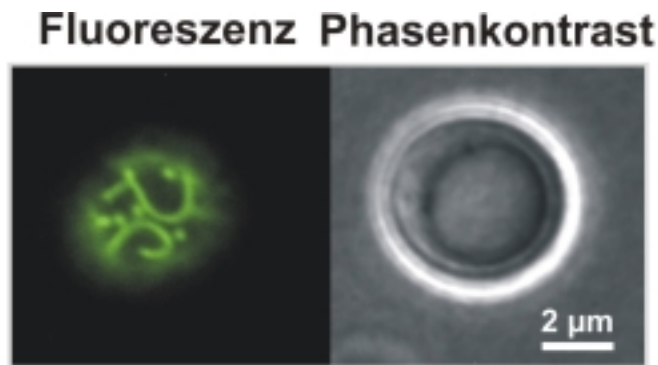
Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle bei der Synthese von ATP, der Assemblierung von prosthetischen Eisen/Schwefel-Gruppen, dem Fettsäureabbau, der Apoptose, der Zellalterung und anderen biochemischen und zellulären Prozessen. Die Vielfalt der mitochondrialen Funktionen spiegelt sich wider in ihrer zelltypspezifischen Anzahl, Positionierung und Form (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994). In einigen Zelltypen – wie z.B. Muskelzellen – nehmen die Mitochondrien über 30 % des Zellvolumens ein. Sie sind zwischen die Aktin/Myosin-Fasern eingelagert, wodurch eine effiziente Energieversorgung der ATP-verbrauchenden Strukturen sicher gestellt wird. In Fibroblasten hingegen machen die Mitochondrien nur einen relativ geringen Prozentanteil des Zellvolumens aus und sind gleichmäßig in der Zelle verteilt. Die Gestalt der Mitochondrien kann von Zelle zu Zelle stark variieren: die Vielfalt der Formen reicht von kleinen, kugelförmigen Organellen bis hin zu langgestreckten, verzweigten schlauchförmigen Netzwerken.

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* werden Form, Positionierung und Anzahl der Mitochondrien in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen reguliert (Hermann und Shaw, 1998; Yaffe, 1999b). Unter anaeroben Bedingungen sind die Mitochondrien sehr klein und werden als „Pro-Mitochondrien“ bezeichnet (Criddle und Schatz, 1969). Wenn Hefezellen unter aeroben Bedingungen wachsen, werden die Mitochondrien größer, verlängern sich und positionieren sich an der Zellperipherie (Hoffmann und Avers, 1973) (Abbildung 1). Auf diese Weise werden die Mitochondrien dort platziert, wo Sauerstoff in die Zelle eintritt. Darüber hinaus erleichtert die ausgestreckte Form der Mitochondrien die rasche Verteilung von ATP in der Zelle. Verzweigte, schlauchförmige Mitochondrien, die denen der Hefe ähneln, werden in vielen unterschiedlichen eukaryotischen Zellen beobachtet. Neben

Form und Größe ist auch die Anzahl der Mitochondrien einer Zelle variabel. Während des logarithmischen Wachstums befinden sich zwischen ein und zehn schlauchförmige Mitochondrien in einer Hefezelle (Hoffmann und Avers, 1973). Dabei bleibt die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle jedoch nicht absolut konstant, da die Mitochondrien kontinuierlich fusionieren und sich wieder teilen (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994; Nunnari *et al.*, 1997). In der stationären Wachstumsphase fragmentieren die mitochondrialen Schläuche und bilden zahlreiche kleine, runde Mitochondrien (Stevens, 1977).

### **1.1 Identifizierung von Hefemutanten, die Defekte der mitochondrialen Dynamik aufweisen**

Die Hefe *S. cerevisiae* bietet für die Untersuchung der Mitochondriendynamik viele experimentelle Vorteile. Das Genom ist seit 1996 bekannt, und der Organismus ist für gentechnische Manipulationen sehr leicht zugänglich. Dies ermöglicht gezielte Mutationen, Deletionen oder Insertionen im Hefe-Genom. Darüber hinaus ist ein breites Spektrum von biochemischen Methoden zur Untersuchung von Hefezellen verfügbar. *S. cerevisiae* bietet einen weiteren entscheidenden Vorteil: Mutationen in Genen, die für die Funktion der Mitochondrien wichtig sind, sind in den meisten Fällen nicht letal. Als fakultativ anaerober Organismus kann *S. cerevisiae* den Energiebedarf durch Fermentation decken, wenn eine geeignete Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Daher sind nur wenige mitochondriale Proteine unverzichtbar für die Lebensfähigkeit von Hefezellen.



**Abbildung 1: In Hefe bilden die Mitochondrien ein verzweigtes Netz unter der Zelloberfläche.**

Mitochondrien wurden mit mtGFP (Grün Fluoreszierendes Protein mit einer mitochondrialen Präsequenz) gefärbt. (Abbildung aus Westermann und Neupert, 2000).

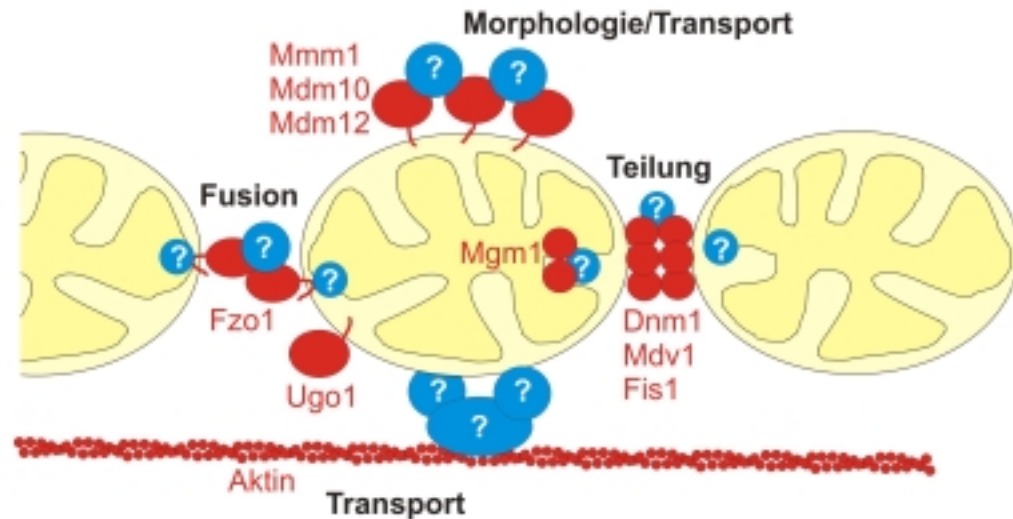
Seit den frühen 1990er Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen Hefemutanten mit veränderter mitochondrialer Form beschrieben, die *mdm*-Mutanten (*mitochondrial distribution and morphology*) (McConnell *et al.*, 1990; Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994; Hermann *et al.*, 1997; Sesaki und Jensen, 1999). Diese Mutanten wurden aus Stammsammlungen von temperatursensitiven Mutanten isoliert, nachdem die Mitochondrien mit spezifischen fluoreszierenden Farbstoffen angefärbt und die mitochondriale Form mikroskopisch analysiert worden war. Seit einigen Jahren wird GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) zur Färbung von Mitochondrien verwendet. So können Mitochondrien durch ein Fusionsprotein aus GFP und einer mitochondrialen Präsequenz (mtGFP) markiert werden (siehe Abbildung 1; Westermann und Neupert, 2000).

Für eine Reihe von Proteinen ist eine Rolle in der mitochondrialen Morphogenese belegt (zur Übersicht siehe Abbildung 2; Berger und Yaffe, 1996; Hermann und Shaw, 1998; Yaffe, 1999b). Darunter sind sowohl Proteine,

die die Fusion und Teilung der Mitochondrien beeinflussen (z.B. Fzo1 und Dnm1; nähere Beschreibung siehe 1.2), als auch die Außenmembranproteine Mdm10, Mdm12 und Mmm1, die die Motilität der Mitochondrien beeinflussen (Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994; Berger *et al.*, 1997a; Boldogh *et al.*, 1998; Aiken Hobbs *et al.*, 2001).

Auffällig viele *mdm*-Mutanten verlieren ihre mtDNA und werden dadurch atmungsdefizient (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 2001; Wong *et al.*, 2000). Atmungsdefiziente Stämme können nicht auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen und werden auch als *petite*- oder *pet*-Mutanten bezeichnet (Tzagoloff und Dieckmann, 1990). Die mtDNA ist an die Innenmembran der Mitochondrien gebunden und wird über einen kontrollierten Mechanismus vererbt (Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto *et al.*, 1998; Berger und Yaffe, 2000). Voraussetzung dafür ist die Aufrechterhaltung der normalen Struktur des mitochondrialen Kompartiments.





**Abbildung 2: Übersicht zur Vererbung und Morphogenese von Mitochondrien in Hefe.**

Die mitochondriale Form hängt vom Organellentransport entlang des Cytoskeletts sowie von Fusions- und Teilungsprozessen ab. In den letzten Jahren wurden einige Komponenten identifiziert, die diese Prozesse steuern (Beschreibung im Text). Eine Reihe zusätzlicher, unbekannter Proteine wird benötigt: Rezeptoren für Motorproteine, Verbindungsproteine zu den Aktinfilamenten, Fusionsfaktoren in der Innenmembran und verschiedene regulatorische Faktoren. Bisher unbekannte Komponenten sind durch Fragezeichen (?) deutlich gemacht. (Abbildung nach B. Westermann, unveröffentlicht).

## 1.2 Fusion und Teilung von Mitochondrien

Fusion und Teilung von Mitochondrien wurde in vielen unterschiedlichen eukaryotischen Zellen beobachtet (Bereiter-Hahn, 1990; Bereiter-Hahn und Vöth, 1994). In Kulturen von *Xenopus*-Endothelialzellen wurde die mitochondriale Teilung mit Hilfe der „Time-lapse“-Mikroskopie nachgewiesen (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994). Die Fusion der Mitochondrien kann unter anderem die rasche Verteilung mitochondrialer DNA-Moleküle in HeLa-Zellen erklären (Hayashi, 1994). Cortese (1999) berichtete über *in vitro*-Tests zum Nachweis der mitochondrialen Fusion.

Fusion und Teilung von Mitochondrien haben wichtige Funktionen für eine Reihe von zellbiologischen Prozessen (zur Übersicht siehe Warren, 1985; Jensen *et al.*, 2000; Osteryoung, 2001; Shaw und Nunnari, 2002; Westermann, 2002): (i) Die Fusion der Mitochondrien wirkt der Zellalterung entgegen. Durch den oxidativen Metabolismus der Mitochondrien entstehen Sauerstoffradikale, die das Genom, die Proteinkomplexe und die Membranen der Mitochondrien schädigen. Die Fusion der Mitochondrien ermöglicht eine Rekombination der mtDNA, wodurch Erbgutschäden repariert werden können, und sie erlaubt die Komplementation der Funktionen geschädigter Proteinkomplexe (Ono *et al.*, 2001). (ii) In höheren Organismen ist die Fusion der Mitochondrien häufig von Bedeutung für die Zelldifferenzierung. Im Herzmuskel beispielsweise führt die Fusion der Mitochondrien zur Bildung eines komplexen mitochondrialen Netzwerks (David *et al.*, 1981; Smolich, 1995), welches den Großteil des Herzzellvolumens einnimmt und den beständig arbeitenden Herzmuskel mit ATP versorgt. Ein weiteres Beispiel für eine Rolle der Mitochondrienfusion in der Zellentwicklung ist die Reifung von Spermienzellen in der Fruchtfliege *Drosophila* (siehe 1.2.2; Hales und Fuller, 1997). (iii) Auch die Teilung der Mitochondrien korreliert mit Schritten der Zelldifferenzierung. In jungen *Xenopus*-Oocyten liegen die schlauchförmigen Mitochondrien in großen

Aggregaten vor, die auch als „mitochondrial clouds“ bezeichnet werden (Schnapp *et al.* 1997). Während der Oocytenreifung teilen sich die mitochondrialen Aggregate zu Fragmenten, die sich zum vegetativen Pol hinbewegen (Heasman *et al.*, 1984). (iv) Da Mitochondrien nicht *de novo* synthetisiert werden können, ist die Teilung der Mitochondrien eine Voraussetzung für ihre Vererbung während der Zellteilung. Die Zellzyklus-abhängige Teilung ist besonders wichtig in Organismen, die nur ein einziges Mitochondrion pro Zelle besitzen, wie z.B. der Alge *Cyanidioschyzon merolae* (Suzuki *et al.*, 1994). (v) Teilung von Mitochondrien ist eine Voraussetzung für die Apoptose (Frank *et al.*, 2001). Die Teilungsvorgänge der Mitochondrien führen dabei vermutlich zur Entstehung funktionell unterschiedlicher Organellen. Einige Mitochondrien verlieren ihr Membranpotenzial und setzen Cytochrom c frei, um die Apoptose herbeizuführen. Andere Mitochondrien hingegen bleiben funktionsfähig und liefern die für die Apoptose nötige Energie.

### **1.2.1 Fusion und Teilung von Mitochondrien in Hefe**

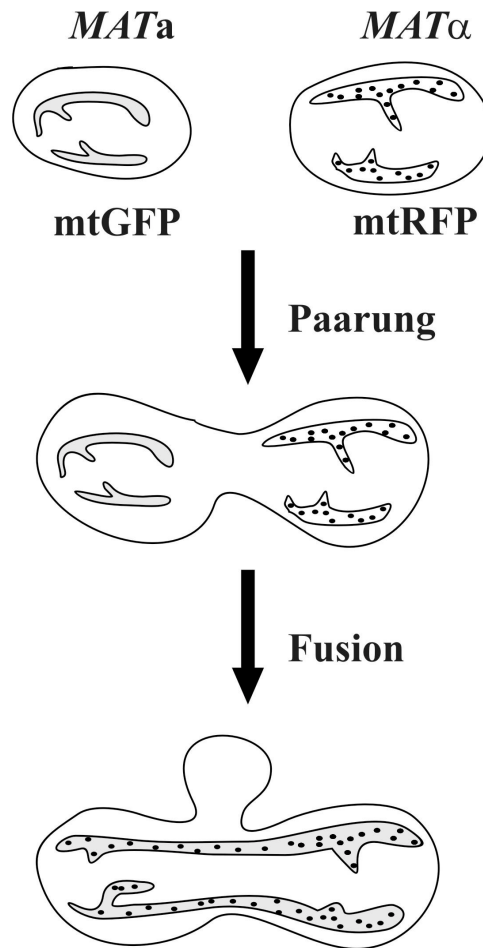
Einen eindeutigen Beweis für die mitochondriale Fusion in *S. cerevisiae* lieferte die Beobachtung der Mitochondrien während der Paarung von Hefezellen (Abbildung 3). Die Mitochondrien beider Elternzellen verschmelzen in der Zygote zu einem einheitlichen Retikulum. Die löslichen Proteine der mitochondrialen Matrix verbreiten sich rasch und gleichmäßig über die Gesamtheit des Mitochondrions (Azpiroz und Butow, 1993; Nunnari *et al.*, 1997). Proteine der inneren und äußeren mitochondrialen Membran sowie die mtDNA-Moleküle können während des Fusionsprozesses nicht frei diffundieren und verteilen sich daher langsamer über das fusionierte Netzwerk als Proteine

der Matrix (Berger und Yaffe, 1996; Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto *et al.*, 1998).

Während der Meiose und Sporulation von Hefe kommt es zu auffälligen Fusions- und Teilungsvorgängen der Mitochondrien (Smith *et al.*, 1995). Bei Nährstoffmangel, der die Sporulation auslöst, fragmentieren die mitochondrialen Schläuche einer diploiden Zelle zu 30 bis 50 separaten, kleinen Organellen. Kurz nach Beginn der Sporulation fusionieren diese Mitochondrien zu einem langgezogenen, in sich verflochtenen Schlauch. Dieser Schlauch teilt sich wieder, und die resultierenden Schläuche wandern zu den vier Sporen, wo sie nach vollendeter Meiose jeden der Kerne umgeben.

Unter normalen Wachstumsbedingungen fusionieren und teilen sich die Mitochondrien kontinuierlich. Ungefähr einmal in zwei Minuten beobachtet man in jeder Hefezelle einen solchen Prozess (Nunnari *et al.*, 1997). Fusion und Teilung liegen miteinander im Gleichgewicht, so dass die Anzahl an Mitochondrien pro Zelle relativ konstant bleibt.

Mitochondrien fusionieren dann, wenn ein freies mitochondriales Ende auf das Ende oder auf die Seite eines anderen Mitochondrions trifft (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994; Nunnari *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu kann die Teilung der Mitochondrien an jeder Stelle entlang des mitochondrialen Schlauchs erfolgen.



**Abbildung 3: Testsystem zum *in vivo*-Nachweis der Fusion von Mitochondrien.**

Schematische Darstellung der mitochondrialen Fusion während der Verschmelzung von Hefezellen mit entgegengesetztem Paarungstyp (Nunnari *et al.*, 1997). Der Vorgang kann mit einem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden, wenn unterschiedliche fluoreszierende Markerproteine verwendet werden, wie z.B. mtRFP (Rot Fluoreszierendes Protein mit einer mitochondrialen Präsequenz) (Punkte) und mtGFP (grau). Eine Überlagerung der beiden fluoreszierenden Markerproteine zeigt die Durchmischung des Matrixinhalts und damit Fusion der Mitochondrien an (siehe auch Abbildung 16). Darstellung nach Jensen *et al.*, 2000, verändert.

### 1.2.2 Fzo1 spielt eine wichtige Rolle für die Mitochondrienfusion

Untersuchungen zur Spermatogenese von *Drosophila* führten zur Identifizierung des ersten Proteins, für das eine wichtige Funktion bei der mitochondrialen Fusion belegt werden konnte (Hales und Fuller, 1997). Im Laufe der Spermatogenese kommt es in den Spermatiden, den unreifen männlichen Keimzellen, zur Umstrukturierung der Mitochondrien. Mehrere kleine, runde Mitochondrien aggregieren in Nachbarschaft zum haploiden Zellkern und fusionieren anschließend zu zwei großen Strukturen, die umeinander gewunden sind und als Nebenkern bezeichnet werden (Hales und Fuller, 1997). Im Elektronenmikroskop gleicht dieser Nebenkern einer aufgeschnittenen Zwiebel. Schließlich lösen sich die beiden Mitochondrien des Nebenkerns wieder voneinander und winden sich um das Flagellum. Dort stellen sie die Energie für die Fortbewegung der Spermazelle bereit.

In der *fuzzy onions*-Mutante können die Mitochondrien der Spermatiden nicht mehr fusionieren (Hales und Fuller, 1997). Die fragmentierten Mitochondrien aggregieren und bilden eine Struktur, die im Elektronenmikroskop einer deformierten Zwiebel ähnelt. Die *fuzzy onions*-Mutante hat eine Mutation in der GTPase-Domäne eines neuartigen Transmembranproteins, welches für die mitochondriale Fusion in Spermatiden benötigt wird, Fzo. Das Fzo-Protein wird nur zum Zeitpunkt der Fusion synthetisiert, aber nicht mehr, nachdem der Vorgang vollendet ist (Hales und Fuller, 1997). Im Genom von *Drosophila* existiert ein zweites, bislang nicht charakterisiertes Gen, das mit dem *fuzzy onions*-Gen verwandt ist. Wahrscheinlich spielt dieses zweite Gen eine generelle Rolle bei der mitochondrialen Formgebung in der Fliege (Hwa *et al.*, 2002).

Das Fzo-Protein ist ein Transmembranprotein von 81,5 kDa und besitzt neben einer N-terminalen GTPase-Domäne einen hydrophoben Bereich am C-Terminus sowie drei „coiled-coil“-Motive. Bei diesem Strukturmotiv sind zwei

bis vier amphiphile Helices umeinander gewunden. Entlang der Kontaktfläche ragen hydrophobe Seitenketten wie „Köpfe“ von der einen Helix in die „Lücken“ zwischen den hydrophoben Seitenketten der anderen Helix, wodurch Protein/Protein-Wechselwirkungen vermittelt werden.

Es gibt *fuzzy onions*-Homologe in Säugern, Würmern und Pilzen (Hales und Fuller, 1997). Das *fuzzy onions*-Protein in *S. cerevisiae*, Fzo1 (19% identisch mit dem *fuzzy onions*-Protein von *Drosophila*), ist unverzichtbar für die mitochondriale Fusion (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Die Deletion des *FZO1*-Gens in Hefe führt zur Fragmentierung des Kompartiments in eine Vielzahl kleiner, gleichmäßig verteilter mitochondrialer Strukturen. Diese fragmentierten Organellen werden zwar weiterhin an die Tochterzelle vererbt, verlieren aber ihre mtDNA-Nukleotide (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998).

Fzo1 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran. Die N-terminale GTPase-Domäne macht den größten Teil des Proteins aus und ist zum Cytosol hin exponiert (Hales und Fuller, 1997; Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Fzo1 ist Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes von 800 kDa, der vermutlich den Fusionsapparat der mitochondrialen Außenmembran darstellt (Rapaport *et al.*, 1998).

Ob dem Fzo1-Protein während der Hefe-Sporulation eine spezielle Rolle zukommt, ist noch unklar. Es wurde jedoch zu zwei Zeitpunkten der Sporulation eine erhöhte Expression von *FZO1*-mRNA beobachtet, die mit Zeitpunkten erhöhter Fusionsaktivität korrelieren könnte (Chu *et al.*, 1998).

Eine Reihe von Fragen zur Funktion von Fzo1 ist noch offen: Ist Fzo1 direkt an der Katalyse der Fusionsprozesse beteiligt, oder spielt es eine regulatorische Rolle? Wie wird die Integrität der mitochondrialen Innen- und Außenmembran während der Fusion aufrechterhalten? Welche anderen Komponenten werden für die mitochondriale Fusion benötigt, und wie werden sie reguliert?

Kürzlich wurden zwei weitere Komponenten beschrieben, die für die Fusion der Mitochondrien benötigt werden.

Ugo1 besitzt eine Transmembrandomäne, die die äußere mitochondriale Membran durchspannt (Sesaki und Jensen, 2001). Es wirkt, ähnlich wie Fzo1, an der mitochondrialen Fusion mit. Das Dynamin-ähnliche (siehe 1.2.3) Protein Mgm1 befindet sich im Intermembranraum und ist peripher mit der mitochondrialen Innenmembran assoziiert (Wong *et al.*, 2000). Mutationen im *MGMI*-Gen verursachen den Verlust des mitochondrialen Genoms und die Aggregation der Mitochondrien (Jones und Fangman, 1992; Guan *et al.*, 1993; Shepard und Yaffe, 1999). Dabei handelt es sich um Ansammlungen mehrerer dicht beieinander liegender fragmentierter Organellen. Welche Rolle Mgm1 und Ugo1 bei der Mitochondrienfusion spielen ist noch unklar.

### **1.2.3 Die mitochondriale Teilung wird durch Dnm1 und seine Co-Faktoren vermittelt**

Ähnlich wie die Fusion wird auch die Teilung der Mitochondrien von einem GTP-bindenden Protein vermittelt. Das Dnm1-Protein der Hefe (Gammi *et al.*, 1995) gehört zur Protein-Familie der Dynamine (Bleazard *et al.*, 1999; Otsuga *et al.*, 1998). Diese Proteine sind GTPasen mit einem hohen Molekulargewicht und weisen Homologie zu dem Dynamin-Protein aus *Drosophila* auf. Dynamin bildet während der Endocytose an der Plasmamembran Ringe um den Hals von neu entstehenden Vesikeln und durchschnürt nach Hydrolyse von GTP als Mechanoenzym die Membran, so dass das Vesikel in das Cytosol freigesetzt wird (De Camilli *et al.*, 1995; Takei *et al.*, 1995; Takei *et al.*, 1996). Wahrscheinlich spielt Dnm1 eine ähnliche Rolle bei der Teilung der Mitochondrien, indem es Ringe um das Organell bildet und durch Zusammenschnüren die Membranen teilt (zur Übersicht siehe van der Bliek, 2000).



Mutationen im *DNMI*-Gen führen zu einer verdichteten netzartigen Mitochondrienstruktur, die sich nur in einer Zellhälfte befindet. In diesen Mutanten ist das Gleichgewicht zwischen Fusion und Teilung der Mitochondrien auf die Seite der Fusionsprozesse verschoben. Aufgrund verminderter Teilungsaktivität bleiben die bereits bestehenden Verzweigungen erhalten. Da die Organellen weiterhin fusionieren, werden schließlich dichte mitochondriale Netze ausgebildet (Yaffe, 1999a).

Das Gleichgewicht zwischen Teilungs- und Fusionsprozessen bestimmt die Anzahl und Gestalt der Mitochondrien in einer Zelle. Interessanterweise besitzen *dnm1/fzo1*-Doppelmutanten, die weder Teilungs- noch Fusionsaktivität aufweisen, Wildtyp-ähnliche mitochondriale Schläuche (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Die Schlauchform der Mitochondrien wird also nicht allein durch Fusions- und Teilungsprozesse bestimmt, sondern es müssen noch andere Mechanismen zur Morphogenese der Organellen beitragen, die das Wachstum der mitochondrialen Schläuche ausgehend von den Enden bereits bestehender Mitochondrien ermöglichen (Yaffe, 1999a; Jensen *et al.*, 2000).

Weitere Komponenten der mitochondrialen Teilungsmaschinerie sind die kürzlich identifizierten Proteine Fis1 und Mdv1. Fis1 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran. Es rekrutiert das cytosolische Dnm1 an die Oberfläche der Mitochondrien (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Mdv1 co-lokalisiert mit Dnm1 in fleckenartigen Strukturen, die über die Oberfläche der Mitochondrien verteilt sind (Otsuga *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999). Dabei handelt es sich vermutlich um die Stellen, an denen die Teilung der Mitochondrien stattfindet (Fekkes *et al.*, 2000; Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000).

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Topologie von Fzo1 in der mitochondrialen Außenmembran aufgeklärt und eine mögliche Verbindung zur Innenmembran untersucht werden. Nach einem Modell von Hales und Fuller (1997) durchspannt Fzo1 mit seinen zwei Transmembrandomänen sowohl die Außenmembran als auch die Innenmembran der Mitochondrien und bildet so eine Kontaktstelle, an der die Fusion ausgelöst wird. Diese Topologie würde eine Funktion von Fzo1 als Teil eines Ligand/Rezeptor-Paars zwischen separaten Mitochondrien erlauben. So könnte der N-Terminus über eine „coiled-coil“-Region mit Proteinen benachbarter Mitochondrien interagieren und so die Fusion der Außenmembranen einleiten. Bei einer die Doppelmembranen durchspannende Topologie von Fzo1 würde die C-terminale Domäne die Fusion der Innenmembran vermitteln. Wenn hingegen Fzo1 nur in der Außenmembran lokalisiert ist, müssen andere Mechanismen existieren, um die Fusion der Innenmembran einzuleiten. Die Kenntnis der Topologie von Fzo1 könnte also wichtige Hinweise für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Fusionsreaktion liefern. Zu Beginn der Arbeit stellte sich daher die Frage, wo der C-Terminus von Fzo1 lokalisiert ist, und ob das Protein über eine oder zwei Transmembrandomänen verfügt. In diesem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, ob Fzo1 mit der Innenmembran assoziiert ist, und über welche Proteinbereiche diese Interaktion vermittelt wird.

Die Kenntnis der beteiligten Proteine ist Voraussetzung für die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Motilität und der Formgebung von Mitochondrien. Erst wenn die beteiligten Komponenten bekannt sind, können Interaktionen aufgedeckt und ihre Funktion durch Mutationsanalysen oder biochemische Verfahren untersucht werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde deshalb angestrebt, weitere Hefemutanten zu identifizieren, die eine veränderte mitochondriale Form zeigen. Dazu wurde eine Deletionsmutanten-Bibliothek

verwendet, die sämtliche nicht-essentielle Gene der Hefe umfasst (siehe 2.2.6; Giaever *et al.*, 2002). Diese Hefestammsammlung sollte hinsichtlich anormaler Vererbung und Form der Mitochondrien durchmustert werden. Des Weiteren sollte die Fusionsaktivität viel versprechender Kandidaten untersucht werden. Eine der neu identifizierten Komponenten, Mdm30, die sich als relevant für den Fusionsprozess der Mitochondrien erwies, sollte genauer charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

Die Zusammensetzung von Puffern und Medien, die nicht im Zusammenhang mit den jeweiligen Methoden beschrieben sind, ist in Kapitel 2.5 zu finden. Die Hersteller der verwendeten Chemikalien sind in Kapitel 2.6 aufgelistet.

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

(Sambrook *et al.*, 1989)

#### 2.1.1 Plasmidreinigung aus *E. coli*

(Birnboim und Doly, 1979)

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA wurden nach der Methode der alkalischen Lyse aus *E. coli*-Zellen gewonnen. Die Bakterien wurden in 2 ml LB-Medium angeimpft, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, über Nacht bei 37°C geschüttelt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden 20 s bei 13.000 rpm bei RT in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 100 µl der Lösung 1 (50 mM Glucose; 10 mM EDTA pH 8,0; 25 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension 5 min bei RT geschüttelt. Es wurden 200 µl Lösung 2 (200 mM NaOH; 1% (m/v) SDS) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung 3 (3 M Natriumacetat pH 4,8) zugegeben, kurz geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Ausgefällene Proteine und chromosomale DNA wurden 20 s bei 13.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde mit 1 ml 96%-igem (v/v) Ethanol gemischt und 10 min bei 13.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml 70%-igem (v/v) Ethanol und

anschließendem 10-minütigen Trocknen bei 37°C wurde die Plasmid-DNA in 20 bis 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde der Jetstar<sup>®</sup>-Kit der Firma Genomed verwendet. Hierfür wurden 30 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium mit transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht geschüttelt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der gewonnenen DNA mit 500 µl Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm gegen Wasser gemessen. Die Extinktion der gelösten Plasmid-DNA bei 260 nm ist proportional zur Konzentration der DNA. Eine  $E_{260}$  von 1,0 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der Präparation. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### **2.1.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Bei der Polymerase-Kettenreaktion oder PCR wird durch den wiederholten Ablauf von Strangtrennung, Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNA-Synthese mit hitzestabiler DNA-Polymerase eine exponentielle Synthese von DNA-Molekülen aus Desoxynukleosidtriphosphaten erreicht (Saiki *et al.*, 1985). Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl enthielt zusätzlich zu dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer 0,2 mM der Desoxynukleosidtriphosphate,  $10^5$  bis  $10^6$  DNA-Moleküle des Matrizenstranges, 10 bis 50 pmol Oligonukleotide und 2 U *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyranococcus furiosus*. Das Gemisch wurde mit Mineralöl überschichtet und in einem programmierbaren Thermostaten inkubiert. Ein typischer Reaktionsablauf begann mit einer 4-minütigen Vorinkubation bei 95°C zur vollständigen Denaturierung der Matrizenstränge. Dann wurde eine

Reaktionsfolge 20- bis 30-mal wiederholt, die aus Denaturieren der DNA (30 s bei 95°C), Anlagern der Oligonukleotide (40 s bei 40 bis 50°C) und Synthese der DNA (2 min/kb bei 72°C) bestand. Schließlich wurde während einer 4-minütigen Nachinkubation bei 72°C die DNA-Synthese vervollständigt. Die Bildung des amplifizierten Fragments wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert (2.1.4).

### **2.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten**

#### **2.1.3.1 Restriktionsverdau von DNA**

Die spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern. Es wurden ca. 1 bis 2 U Enzym für 1 µg zirkuläre DNA eingesetzt und 60 min bei der für das Enzym angegebenen Temperatur inkubiert.

#### **2.1.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Mit der Alkalischen Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP) wurden gleiche sowie glatte („blunt ends“) Enden der Vektor-DNA vor Ligationsreaktionen dephosphoryliert, um eine Ligation innerhalb der geschnittenen Vektor-DNA zu verhindern. Es wurden 10 µg DNA in 50 µl CIP-Puffer (vom jeweiligen Hersteller) mit 1 U Enzym für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Bei glatten Enden erfolgte die zweite Inkubation bei 56°C. Die Reaktion wurde mit 17 µl TE-Puffer, 2,5 µl 10% (m/v) SDS und 5 µl 1 M NaCl und 0,5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Nach Inaktivierung durch eine

Inkubation für 20 min bei 75°C wurden die dephosphorylierten Vektoren nach Herstellerangabe mit Qiaquick<sup>®</sup>-Säulen von Qiagen isoliert.

### **2.1.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase**

Zur Verknüpfung von DNA-Enden wurde T4-DNA-Ligase der Firma Gibco/BRL verwendet. Es wurden 50 bis 200 ng DNA des linearisierten Vektors mit einem etwa 5-fachen molaren Überschuss des DNA-Fragmentes in dem vom Hersteller mitgelieferten 5x Puffer (0,25 M Tris/HCl pH 7,6; 50 mM Magnesiumchlorid; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25% (v/v) PEG-8000) und Wasser gemischt. Der Ansatz wurde mit 0,5 U T4-Ligase in einem Volumen von 10 µl für 2 h bei 25°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

### **2.1.4 Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Zur gelelektrophoretischen Analyse von DNA wurden Agarose-Flachgele mit 30 bzw. 100 ml Bettvolumen benutzt. Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 7,5; 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA) aufgekocht und bei 65°C aufbewahrt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen im Bereich von 0,8 bis 2% (m/v) gewählt. Der Agarose wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, um die DNA unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Die Proben wurden in Auftragspuffer (2 mM EDTA pH 8,0; 4% (m/v) Saccharose; 0,025% (m/v) Bromphenolblau) aufgenommen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit TAE-Puffer bei einer Spannung von 15 V/cm durchgeführt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### **2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurden sie unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden über Qiaquick<sup>®</sup>-Säulen von Qiagen isoliert.

### **2.1.6 Präparation transformationskompetenter *E. coli*-Zellen**

Über Nacht wurde in 5 ml LB-Medium eine Kultur des *E. coli*-Stamms XL1-Blue angezogen und am nächsten Morgen damit 1,0 l des gleichen Mediums angeimpft. Alle verwendeten Behälter und Lösungen wurden bei 4°C vorgekühlt. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 2°C und 4.400 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden im Kühlraum nacheinander in 500 ml, in 250 ml und schließlich in 50 ml 10% (v/v) Glycerin gewaschen und nach jedem Waschschrift 15 min bei 2°C und 4.400 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vollständig abgenommen, die Bakterien in 500 µl 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, zu je 40 µl portioniert und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.1.7 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation**

40 µl transformationskompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, zusammen mit der DNA (1-2 µl Ligationsansatz oder 1 ng Plasmid-DNA) in eine vorgekühlte Transformationsküvette (0,2 cm) gegeben und in einem Elektroporationsgerät durch einen Stromstoß transformiert (2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, Zeitkonstante 8-9 ms). Anschließend wurde der Ansatz sofort mit 1 ml SOC-Medium gemischt, 30 bis 60 min lang bei 37°C geschüttelt, kurz abzentrifugiert und in 100 µl SOC-Medium aufgenommen. Die transformierten



Zellen wurden auf LB<sup>Amp</sup>-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.1.8 Verwendete Vektoren

Zur Expression von *FZO1* und *fzo1-2* in Hefe von Einzelkopie-Plasmiden wurden die Gene mit ihren eigenen regulatorischen Sequenzen in den centromerischen Vektor pRS315 (Sikorski und Hieter, 1989) und in den Multikopien-Vektor pRS425 (Christianson *et al.*, 1992) kloniert. Zur Überexpression von *FZO1* und *fzo1-2* in Hefe wurde der Multikopien-Vektor pYX232 (R&D Systems) verwendet, in dem die codierende Sequenz hinter den konstitutiven Triosephosphat-Isomerase-Promotor (TPI) kloniert worden war.

Für Subklonierungen wurde das Plasmid pCRII-TOPO (Invitrogen) verwendet.

Der Vektor YlpMEL $\beta$ 2 (Melcher *et al.*, 2000) diente zur Bestimmung von Promotoraktivitäten über die Enzymaktivität von  $\beta$ -Galaktosidase als Reporterprotein.

### 2.1.9 Verwendete Plasmide

Die Klonierungsstrategien für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide und eine kurze Beschreibung der Plasmide, die von anderer Seite stammten, sind nachfolgend aufgelistet.

#### a) Klonierungsstrategien der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide

pRS315-*fzo1-2* und pRS425-*fzo1-2* (diese Arbeit; Fritz *et al.*, 2001)

Die C-terminalen 120 Codons und der Terminator des *FZO1*-Gens wurden mit Hilfe der PCR (2.1.2) aus genomischer DNA unter Verwendung der Primer

*FZO1-735-N* und *FZO1-3* amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pBluescript II KS kloniert. Es resultierte das Plasmid pBS-*FZO1-C-term*.

Der Promotor und die N-terminalen 733 Codons des *FZO1*-Gens wurden aus genomischer DNA durch PCR über die Primer *FZO1-5* und *FZO1-733-C* amplifiziert. Um das Plasmid pBS-*FZO1* zu konstruieren, wurde das PCR-Fragment über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *EcoRI* in das Plasmid pBS-*FZO1-C-term* kloniert.

Ein DNA-Fragment, das für zwei Kopien des flexiblen Linker-Segments KL(GGS)<sub>3</sub> codiert, wurde aus dem Plasmid pJM28-3 (McNew *et al.*, 1999) mittels PCR mit den Primern sw-N und sw-C amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SallI* in das Plasmid pBS-*FZO1* kloniert. Es resultierte das Plasmid pBS-*fzo1-2*. Das Insert wurde sequenziert und über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* in die Vektoren pRS315 (Sikorski und Hieter, 1989) und pRS425 (Christianson *et al.*, 1992) subkloniert. Es resultierten die Plasmide pRS315-*fzo1-2* und pRS425-*fzo1-2*.

*FZO1-5*: 5'-CGCGGATCCACTACCATCCTTCTAGCC-3'

*FZO1-3*: 5'-CGCCTCGAGAATGTTTATGTAATTTTCGTGC-3'

*FZO1-735-N*: 5'-AAAGAATTCAGTCGACCAAGAAGTTATCAGTTCCG-3'

*FZO1-733-C*: 5'-AAAGAATTCCTGAGCTCCACGACGATAA-3'

sw-N: 5'-AAAGAATTCAAAGCAGGAAGAAGCTCG-3'

sw-C: 5'-AAAAGTCGACCCGATCATAAGCTTGGAAC-3'

#### Ylp*FZO1*β<sub>2</sub>, diese Arbeit

Der *FZO1*-Promotor wurde aus dem Plasmid p*FZO*-425 (Fritz *et al.*, 2001) mit den Primern *FZO-Hind* und *FZO-Bam* durch PCR (2.1.2) amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde in den Vektor pCRII-TOPO subkloniert und schließlich

über die in die Primer eingebauten Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in das Plasmid YlpMEL $\beta$ 2 (Melcher *et al.*, 2000) kloniert, um das Plasmid YlpFZO1 $\beta$ 2 zu erhalten.

FZO-Hind: 5'-GGGAAGCTTACTACCATCCTTCTAGCC-3'

FZO-Bam: 5'-GGGGGATCCAAACATCGTTAAATGAGCCTACCG-3'

## **b) Beschreibung weiterer verwendeter Plasmide**

pYX232-FZO1-ORF (E. Klanner; Fritz *et al.*, 2001)

Das Plasmid dient der konstitutiven Überexpression eines Fusionsproteins aus Fzo1 und eines C-terminal fusionierten Hämagglutinin-Peptids (HA).

pRS416-FZO1 und pRS425-FZO1 (E. Klanner; Fritz *et al.*, 2001)

Die Plasmide mit *FZO1* und seinen regulatorischen Sequenzen (*FZO1*-eigener Promotor und Terminator) komplementieren die  $\Delta$ *fzo1*-Mutation. pRS425 ist ein Multikopien-Vektor. pRS416 ist ein centromerischer Vektor.

pGEM4-Fzo(600-810)-DHFR und pGEM4-Fzo(600-810) (D. Rapaport; Fritz *et al.*, 2001)

Die Plasmide dienen der *in vitro*-Transkription/Translation von DHFR-Fusionsproteinen und von Fzo1-Fragmenten (Aminosäurereste 600-810 des Fzo1-Proteins).

pRS416-mtRFP (pRS416-*GAL1*+ *PrF<sub>o</sub>ATP9*-RFP) (J. M. Shaw; Mozdy *et al.*, 2000)

RFP ist ein Rot Fluoreszierendes Protein, dsRed, welches in Riff-Korallen entdeckt wurde (Matz *et al.*, 1999). mtRFP ist ein Fusionsprotein aus RFP und der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 des F<sub>0</sub>-Teils der

mitochondrialen ATP-Synthase von *Neurospora crassa* und wird in die mitochondriale Matrix sortiert. Die Expression von mtRFP wird über einen GAL-Promotor reguliert.

pYX232-mtGFP, pYX113-mtGFP und pVT100U-mtGFP (B. Westermann; Westermann und Neupert, 2000)

Die Plasmide dienen zur Färbung von Mitochondrien. pYX113 verfügt über den regulierbaren GAL-Promotor, pYX232 über einen TPI-Promotor und pVT100U-mtGFP über den konstitutiven ADH-Promotor (Alkoholdehydrogenase). mtGFP ist ein Fusionsprotein aus GFP und einer mitochondrialen Präsequenz (siehe oben) und wird in die mitochondriale Matrix sortiert.

pYES2-MDM30 (N. Weinbach)

Dieses Plasmid diente zur Überexpression von Mdm30, die über einen GAL-Promotor reguliert wird.

## **2.2 Methoden der Hefegenetik**

(Guthrie und Fink, 1991; Rose *et al.*, 1990)

### **2.2.1 Kultivierung von *S. cerevisiae***

Das Standardmedium war YPD. Zur Selektion auf mitochondriale Funktionen wurde YPG-Medium verwendet. Um die Expression von Genen zu induzieren, die hinter einen GAL-Promotor kloniert waren, wurde YPGal-Medium verwendet. Zur Selektion auf Auxotrophiemarker wurde SD-Medium verwendet, das den Selektionsbedingungen entsprechend supplementiert war. Für den Mating Assay (2.3.4) wurden Stämme unterschiedlichen Paarungstyps

unter selektiven Bedingungen in SR-Medium vorkultiviert, um Plasmid-Verluste und die Repression des GAL-Promotors durch Glukose zu vermeiden. Induktion des GAL-Promotors erfolgte dann über Nacht in SR-Medium mit 2% Galaktose. Um bei diploiden Stämmen Sporulation zu induzieren, wurden Sporulationsplatten verwendet. Die Selektion gegen das Wildtyp-*URA3*-Allel erfolgte auf 5-FOA-Medium (SD-Medium mit 0,1% 5-Fluororot-Säure (5FOA) und 50 mg/l Uracil) (Boeke *et al.*, 1984). Die Standardtemperatur für die Kultivierung von Hefezellen war 30°C. Flüssig-Kulturen wurden im Erlenmeyer-Kolben unter Schütteln (120 bis 160 rpm) inkubiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 2% Bacto-Agar zugesetzt.

Für die Isolierung von Mitochondrien wurde Hefe in Laktat-Medium kultiviert. Atmungsdefiziente Hefestämme wurden in Laktat-Medium mit 1% Galaktose oder in YPD-Medium kultiviert. Die Kultur wurde immer im logarithmischen Wachstum gehalten.

Die Hefestämme wurden bis zu zwei Monate auf Agarplatten bei 4°C gelagert. Für längere Lagerung wurden sie in 15% (v/v) Glycerin bei -80°C eingefroren.

### **2.2.2 Kreuzung und Tetradenanalyse von Hefestämmen**

Zum Kreuzen wurden zwei Stämme entgegengesetzten Paarungstyps als Strich auf zwei getrennten YPD-Platten aufgetragen, über Nacht inkubiert, mit Saft über Kreuz auf eine neue YPD-Platte überstempelt, erneut inkubiert und auf selektives Medium gestempelt. Das selektive Medium wurde so gewählt, dass nur die diploiden Zellen an der Kreuzungsstelle wachsen konnten. Diploide Zellen wurden anschließend auf selektivem Medium als Einzelkolonien ausgestrichen.

Die Bestimmung des Paarungstyps wurde mit Hilfe von Testerstämmen entgegengesetzten Paarungstyps durchgeführt. Dazu wurden die haploiden

Hefestämme wie beschrieben mit den Testerstämmen gekreuzt. Zellen, die auf SD-Medium ohne Auxotrophiemarker wachsen konnten, hatten sich mit den Testerstämmen gepaart.

Für die Tetradenanalyse wurden die diploiden Hefestämme auf nährstoffarmen Platten (Sporulationsplatten) zur Sporulation angeregt. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert, bis sich nach einigen Tagen aus ca. 10% der Zellen Asci gebildet hatten, die als solche im Mikroskop erkennbar waren. Um die Zellwand der Asci zu verdauen, ohne dabei die Sporen freizusetzen, wurden die Zellen in H<sub>2</sub>O aufgenommen, so dass die Suspension leicht trübe war, und für 10 min mit 250 µg/ml Zymolyase bei RT inkubiert. Diese Suspension wurde auf eine YPD-Platte übertragen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die Asci einzeln aufgenommen, die Sporen getrennt und einzeln an definierten Positionen auf der Platte übertragen. Nachdem die Sporen zu Kolonien hochgewachsen waren, wurden der Phänotyp und die Aufspaltung von Auxotrophiemarkern auf selektiven Medien untersucht.

### **2.2.3 Test des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae* („Tüpfeltest“)**

Hefestämme wurden in flüssigem Medium ca. zwei Tage passagiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Eine Zellsuspension von 1 OD<sub>578</sub> in H<sub>2</sub>O wurde hergestellt und folgende Verdünnungsreihe in H<sub>2</sub>O angesetzt: 1; 0,1; 0,01; 0,001 OD<sub>578</sub>. Pro Verdünnung wurden 5 µl auf je zwei YPD- und YPG-Platten aufgetragen und bei 30°C und 37°C inkubiert.

## **2.2.4 Transformation von *S. cerevisiae***

### **2.2.4.1 Herstellung transformationskompetenter Hefezellen**

Hefestämme wurden über Nacht in 50 ml YPD kultiviert. Die Zellen wurden bei  $OD_{578}$  von 0,5 bei RT 3 min bei 1000 g abzentrifugiert, in 25 ml sterilem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die isolierten Zellen wurden in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 15 s abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 400  $\mu$ l 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und die Zellsuspension zu je 50  $\mu$ l portioniert. Die kompetenten Zellen wurden sofort transformiert.

### **2.2.4.2 Transformation von Hefe**

DNA (2 mg/ml) aus Lachsspermien wurde 5 min lang bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. 50  $\mu$ l Suspension kompetenter Zellen wurden 5 min bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Den Hefezellen wurden folgende Substanzen zugegeben: 240  $\mu$ l PEG 3350 (50% (v/v)), 36  $\mu$ l 1 M Lithiumacetat, 25  $\mu$ l einzelsträngige Lachsspermien-DNA (2 mg/ml), 50  $\mu$ l steriles Wasser, in dem 0,1 bis 10  $\mu$ g der zu transformierenden DNA gelöst war. Der Ansatz wurde 1 min lang kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei 30°C inkubiert. Darauf folgte eine 20- bis 25-minütige Inkubation bei 42°C. Nun wurden die Hefezellen 15 s bei 8000 rpm abzentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte über Auxotrophiemarker auf SD-Platten oder über Geneticinresistenz auf YPD-Platten, die 500  $\mu$ g/ml Geneticin (G418) enthielten. Bei der Selektion auf G418 wurden die Zellen nach der Transformation zunächst in 1 ml YPD-Flüssigmedium aufgenommen und 2 bis

3 h bei 30°C inkubiert, um die Expression des Geneticin-Resistenzgens zu erlauben.

### **2.2.5 Nachweis chromosomaler Insertionen/Deletionen in *S. cerevisiae***

Die Genome einiger der verwendeten Hefestämme waren durch chromosomale Insertionen/Deletionen modifiziert worden, um Gene zu disruptieren oder Promotoren und zusätzliche Proteinabschnitte (Tags) einzufügen. Dabei wurde meistens eine Kasette mit Kanamycin- oder Histidinen in das Hefegenom eingefügt. Mittels PCR (2.1.2) wurde die korrekte Integration der Markerkasette kontrolliert. Dabei ermöglichten Primer, die auf der 5'-Seite und der 3'-Seite des zu untersuchenden Gen-Lokus hybridisieren, die Synthese eines Fragments. Die Größe des Fragments unterscheidet sich bei erfolgter Integration von der in der Wildtyp-Situation. Zur Durchführung der PCR wurden mit einer Pipettenspitze Hefezellen direkt zu den Reagenzien und der DNA-Polymerase gegeben. Die PCR wurde mit einer Inkubation von 15 min bei 95°C gestartet. Nach erfolgter PCR wurden 10 µl des Überstands auf einem Agarosegel analysiert (2.1.4).

### **2.2.6 Verwendete Hefestämme**

Der Wildtypstamm D273-10B oder die haploiden Hefestämme YBW114 und YBW183 wurden für die Isolierung und Subfraktionierung von Hefemitochondrien verwendet. Die mitochondriale Form sowie das Verhalten der Fzo1-Proteine bei Fraktionierungen von YBW114 oder YBW183 waren identisch mit den isogenen Stämmen, die *FZO1* (YBW89) bzw. *fzo1-2* (YBW110) von Einzelkopie-Plasmiden exprimierten.



Für die *FZO1*-Expression mit Hilfe eines Multikopien-Plasmids wurde der Stamm YBW89 mit dem Plasmid pRS425-*FZO1* transformiert (2.2.4). Die Selektion gegen das Plasmid pRS416-*FZO1* erfolgte auf 5-FOA-Medium (2.2.1). Es resultierte der Stamm YBW114.

Die Expression des Proteins Fzo1-2 erfolgte in den Stämmen YBW110 und YBW183. Ausgangsstamm war YBW89, der mit den Plasmiden pRS315-*fzo1-2* und pRS425-*fzo1-2* transformiert wurde und anschließend auf 5-FOA-Medium kultiviert wurde.

Eine  $\Delta$ *fzo1*-Mutante, die mtGFP exprimiert (YBW113), wurde durch Transformation von YBW89 mit dem Vektor pRS315 und anschließendem Wachstum auf 5-FOA-Medium erhalten. Weiterhin wurde ein Stamm mit *FZO1*-Hintergrund konstruiert, der *fzo1-2* mit Hilfe eines Multikopien-Plasmids überexprimiert (YBW210). Dazu wurde YBW183 mit dem Plasmid pRS416-*FZO1* transformiert.

Für die Überexpression von *FZO1* wurden die Hefestämme YBW321 und YBW339 verwendet. Dazu wurde der GAL-Promotor mittels homologer Rekombination (Wach *et al.*, 1994) vor die codierende Sequenz von *FZO1* eingeführt. Der GAL-Promotor wurde unter Verwendung der Primer GAL-*FZO*-3 und GAL-*FZO*-5 und der Plasmid-Matrize pTL26 (Lafontaine und Tollervey, 1996), die durch Restriktionsverdau mit *ScaI* linearisiert worden war (2.1.3.1), über PCR amplifiziert (2.1.2). Das PCR-Fragment enthielt die Auxotrophiemarker-Kassette *HIS3* und wurde in die Hefestämme BY4742 und  $\Delta$ *mdm30* transformiert. Über die homologen, flankierenden Fragmente konnte das PCR-Fragment im genomischen Ziel-Lokus integriert werden. Um positive Klone zu isolieren, wurde auf Selektivmedium ohne Histidin inkubiert, und die Klone wurden mittels PCR analysiert.

GAL-*FZO*-3: 5'-GCGGTTTATTGCTGTCTTTGAATTGTTGTTTTTCCTTCAG  
ACATCGAATTCCTTGAATTTTCAAA -3'

GAL-*FZO*-5: 5'-AAAAGTTGGTGCGCAGTCCGGGTAAATACAGCTTTTC  
ATGCTGACTCTTGGCCTCCTCTAGT-3'

Um die Aktivität des *FZO*I-Promotors messen zu können, wurden die Stämme YBW329 und YBW327 konstruiert. Dazu wurde Ylp*FZO*I $\beta$ 2 mit dem Restriktionsenzym *Nco*I linearisiert und in die Hefestämme BY4742 und  $\Delta$ *mdm30* transformiert. Dabei wird das Plasmid, das den *FZO*I-Promotor und das Reportergen *lacZ* enthält, durch homologe Rekombination in das Hefe-Genom integriert (Melcher *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Teil einer Sammlung von Hefestämmen durchmustert. Diese Hefe-Bibliothek bestand aus 4794 homozygoten, diploiden Deletionsmutanten und war das Resultat einer weltweiten Kooperation von Hefelabors (Giaever *et al.*, 2002; Winzeler *et al.*, 1999). Eine Auflistung sämtlicher Stämme befindet sich auf der Webpage der Firma Research Genetics ([ftp://ftp.resgen.com/pub/deletions/Homo\\_diploids\\_061101.txt](ftp://ftp.resgen.com/pub/deletions/Homo_diploids_061101.txt)). Für weitere Untersuchungen der Deletionsmutanten der Hefe-Bibliothek wurden die haploiden Stämme der Stammsammlung EUROSCARF verwendet (<http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>).

Eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Stämme und ihrer Genotypen findet sich in Tabelle 1.

## Material und Methoden

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
<i>D273-10B</i>	<i>Wildtyp</i>	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
<i>YPH500</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2</i>	Sikorski und Hieter, 1989
<i>YPH499</i>	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2</i>	Sikorski und Hieter, 1989
<i>Afzo1 (YBW6)</i>	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::Kanr, rho<sup>0</sup></i>	Rapaport <i>et al.</i> , 1998
<i>YBW18</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::Kanr [URA3/FZO1]</i>	E. Klanner; Fritz <i>et al.</i> , 2001
<i>YBW54</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::Kanr [URA3/FZO1][TRP1/FZO1-HA]</i>	E. Klanner; unveröffentlicht
<i>YBW57</i>	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::Kanr, rho<sup>0</sup>? [URA3/FZO1][TRP1/FZO1-HA][HIS3/mtGFP]</i>	E. Klanner; unveröffentlicht
<i>YBW60 (FZO1-HA)</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::Kanr, rho<sup>0</sup>? [TRP1/FZO1-HA][HIS3/mtGFP]</i>	E. Klanner; unveröffentlicht
<i>YBW89</i>	<i>MAT?, ade2, lys2, trp1, leu2, ura3, his3, fzo1::Kanr [URA3/FZO1][TRP1/mtGFP]</i>	E. Klanner; Fritz <i>et al.</i> , 2001
<i>YBW110</i>	<i>MAT?, ade2, lys2, trp1, leu2, ura3, his3, fzo1::Kanr [TRP1/mtGFP][LEU2/fzo1-2]</i>	diese Arbeit; Fritz <i>et al.</i> , 2001
<i>YBW113 (<math>\Delta</math>fzo1)</i>	<i>MAT?, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, fzo1::Kanr, rho<sup>0</sup> [TRP1/mtGFP][LEU2]</i>	diese Arbeit; Fritz <i>et al.</i> , 2001
<i>YBW114</i>	<i>MAT?, ade2, lys2, trp1, leu2, ura3, his3, fzo1::Kanr [TRP1/mtGFP][LEU2/FZO1]</i>	diese Arbeit; Fritz <i>et al.</i> , 2001
<i>YBW183 (fzo1-2)</i>	<i>MAT?, ade2, lys2, trp1, leu2, ura3, his3, fzo1::Kanr [LEU2/fzo1-2][TRP1/mtGFP]</i>	diese Arbeit; Fritz <i>et al.</i> , 2001
<i>YBW210</i>	<i>MAT?, ade2, lys2, trp1, leu2, ura3, his3, fzo1::Kanr [LEU2/fzo1-2][TRP1/mtGFP][URA3/FZO1]</i>	diese Arbeit; Fritz <i>et al.</i> , 2001
<i>BY4743</i>	<i>MATa/<math>\alpha</math>, his3/his3, leu2/leu2, ura3/ura3, met15/MET15, lys2/LYS2</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002; Brachmann <i>et al.</i> , 1998
<i>BY4742</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002; Brachmann <i>et al.</i> , 1998
<i>BY4741</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002; Brachmann <i>et al.</i> , 1998
<i>Amdm30</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ylr368w::Kanr</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Amdm30-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ylr368w::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Amdm30-RFP</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ylr368w::Kanr [URA3/mtRFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Amdm31-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, yhr194w::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Amdm31-RFP</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, yhr194w::Kanr [URA3/mtRFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Amdm32-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, yor147w::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Amdm32-RFP</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, met15, ura3, yor147w::Kanr [URA3/mtRFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Amdm33-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ydr393w::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Amdm33-RFP</i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, lys2, ura3, ydr393w::Kanr [URA3/mtRFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Δmdm37-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ygr101w::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Δmdm37-RFP</i>	<i>MATα, his3, leu2, lys2, ura3, ygr101w::Kanr [URA3/mtRFP]</i>	diese Arbeit; Giaever <i>et al.</i> , 2002
<i>Δmdm30/Δdnm1-GFP</i>	<i>MATα, his3, leu2, ura3, dnm1::Kanr, ylr368w::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit; Doppelmutante von N. Weinbach
<i>Δmdm30/Δdnm1-RFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, ura3, dnm1::Kanr, ylr368w::Kanr [URA3/mtRFP]</i>	diese Arbeit; Doppelmutante von N. Weinbach
<i>YBW339</i>	<i>GAL-Promoter (aus pTL26) chromosomal integriert vor FZO1 in BY4742</i>	diese Arbeit
<i>YBW321</i>	<i>GAL-Promoter (aus pTL26) chromosomal integriert vor FZO1 in Δmdm30</i>	diese Arbeit
<i>YBW342</i>	<i>YBW339 mit pYES2-MDM30</i>	diese Arbeit
<i>YBW329</i>	<i>BY4742 mit YlpMELβ2 mit FZO1-Promotor (YlpFZO1β2)</i>	diese Arbeit
<i>YBW327</i>	<i>Δmdm30 mit YlpMELβ2 mit FZO1-Promotor (YlpFZO1β2)</i>	diese Arbeit
<i>Test-a und Test-A</i>	<i>Testerstämme zur Bestimmung von Paarungstypen</i>	L. van Dyck, J. Herrmann

**Tabelle 1: Die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Hefestämme**

Eckige Klammern zeigen Gene auf Plasmiden an. Stämme mit *rho*<sup>0</sup> haben ihre mtDNA verloren.

## 2.3 Methoden der Zellbiologie

### 2.3.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe

1 ml einer Flüssig-Kultur (0,2 OD<sub>578</sub>) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert und in 200 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Dem Ansatz wurden Glaskügelchen (Ø 0,3 mm) entsprechend dem Volumen des Zellpellets (ca. 40 bis 100 µl) zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden 20 s gevortext und anschließend 20 s auf Eis gekühlt. Vortexen und Kühlen wurde insgesamt dreimal hintereinander durchgeführt. Dann wurden die Ansätze 10 min bei 95°C erhitzt und konnten für eine SDS-PAGE (2.4.2) eingesetzt werden. Es wurden 10 µl pro Spur geladen.

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

Die Isolierung erfolgte nach der von (Daum *et al.*, 1982a) beschriebenen Methode. Die Hefekulturen wurden bei einer OD<sub>578</sub> von 1,0 bis 2,0 geerntet. Die Hefekulturen wurden zentrifugiert (3000 rpm, 5 min, RT, Beckmann-JA10-Rotor), die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und ihr Feuchtgewicht bestimmt. Sie wurden in 2 ml/g 0,1 M Tris/HCl pH 9,4 und 10 mM DTT resuspendiert und 10 min bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 rpm, 5 min, RT, Beckmann-JA10-Rotor) und mit 40 bis 100 ml 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat pH 7,4 gewaschen.

Um die Zellen in Sphäroplasten zu verwandeln, wurden sie in 7 ml/g 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat pH 7,4 mit 3 mg/g Zymolyase resuspendiert und 30 bis 60 min bei 30°C geschüttelt. Die Bildung von Sphäroplasten wurde nach 30 min durch osmotische Lyse in Wasser getestet. Dafür wurden je 20 µl Zellsuspension in 1 ml Wasser gegeben und kurz geschüttelt. Die Zymolyasebehandlung war ausreichend, wenn die Suspension nach einigen Sekunden klar wurde. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Geräten. Die Sphäroplasten wurden geerntet (3000 rpm, 5 min, 2°C, Beckmann-JA10-Rotor) und mit 40 bis 100 ml 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat pH 7,4 gewaschen.

Um die Sphäroplasten aufzubrechen, wurden sie in 3 ml/g Homogenisierungspuffer resuspendiert (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,6 M Sorbitol; 0,5% (m/v) fettsäurefreies BSA; 1 mM PMSF) und durch 13 bis 15 Stöße in einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation (3000 rpm, 5 min, RT, Beckmann-JA10-Rotor) wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die darin enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (12.000 rpm, 12 min, 2°C, Beckmann-JA20-Rotor) gesammelt und vorsichtig in 0,25 bis 1 ml 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4 resuspendiert. Anschließend wurde die

Proteinkonzentration bestimmt (2.4.7), und die Mitochondrien wurden mit 10 mg/ml fettsäurefreiem BSA in 20 bis 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.3.3 Subfraktionierung von Mitochondrien**

Durch osmotische Schwellung von Mitochondrien wurden Mitoplasten erzeugt, d. h. Mitochondrien, deren äußere Membran geöffnet ist. Dazu wurden Mitochondrien in Importpuffer mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml resuspendiert, 10-fach mit einem hypotonischen Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,2, 4°C) verdünnt und 30 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurden Mitochondrien in eiskaltem SEM-Puffer resuspendiert.

Um die submitochondriale Lokalisation von Proteinen zu untersuchen, wurden Mitochondrien oder Mitoplasten mit Proteinase K behandelt. Zur Proteasebehandlung der Mitoplasten wurde dem hypotonischen Puffer 100 µg/ml Proteinase K zugesetzt. Die Proteasebehandlung wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF (Stammlösung: 200 mM in EtOH) und 5 min Inkubation auf Eis beendet. Nach einer Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 2°C) wurden die Mitoplasten in SEM-Puffer reisoliert, erneut abzentrifugiert und anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (2.4.2) aufgetrennt und nach dem Transfer auf Nitrozellulose (2.4.4) analysiert. Zur Überprüfung der Schwellung wurde die Nitrozellulose-Membran mit Antikörpern gegen endogene Markerproteine für den Intermembranraum (Cytochrom c-Peroxidase und DLD) und den Matrixraum (Mge1p) dekoriert (2.4.10).

Mit Hilfe der Carbonatextraktion wurden lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen abgetrennt (Fujiki *et al.*, 1982). Dazu wurden 0,1 mg/ml Mitochondrien in einer 0.1 M

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (pH 11,5) resuspendiert und in Gegenwart von 1 mM PMSF für 30 min bei 4°C inkubiert. Durch eine Zentrifugation (45.000 rpm, 1 h, Beckman TLA 45-Rotor, 4°C) wurden die integralen Membranproteine sedimentiert. Der Überstand enthielt die löslichen und peripher mit der Membran assoziierten Proteine.

Für die Carbonatextraktion von Fzo1-Fragmenten wurden Mitoplasten nach Proteasebehandlung zweimal in 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM MOPS/KOH pH 7,2 gewaschen. Anschließend wurden die Mitoplasten in 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 mM PMSF resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden 266 µl 2,4 M Sorbitol (1,5 M Endkonzentration) zugegeben. Diese Lösung wurde überschichtet mit 250 µl 1,4 M Saccharose und 200 µl 250 mM Saccharose in einem Puffer mit 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 mM HEPES pH 7,4. Der Stufengradient wurde bei 336.840 g für 4 h bei 2°C zentrifugiert. Der Gradient wurde folgendermaßen von oben geerntet: 350 µl (Membranen und integrale Membranproteine), 150 µl (mittlere Fraktion), 216 µl (lösliche Proteine). Die Fraktionen wurden durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt (2.4.6) und durch SDS-PAGE (2.4.2), Westernblot (2.4.10) und Dekoration mit spezifischen Antiseren analysiert. Als Marker dienten Mge1 für lösliche Proteine und der ADP/ATP-Carrier, AAC, für integrale Membranproteine.

Zur Trennung der äußeren und der inneren mitochondrialen Membran wurde ein Saccharosegradient verwendet (Pon *et al.*, 1989). Zunächst wurde die mitochondriale Matrix kondensiert. Dazu wurden 17,5 mg/ml Mitochondrien in einem hyperosmotischen Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,2; 0,5 M Sorbitol; 80 mM Kaliumchlorid; 10 mM Magnesiumacetat; 2 mM Kaliumphosphat, pH 7,4; 2 mM Manganchlorid) für 45 min bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe der 18-fachen Menge an Schwellpuffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7,2) wurde für weitere 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Zur Proteasebehandlung

wurde während des Schwellens 100 µg/ml Proteinase K zugegeben. Die Protease wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF nach 5 min auf Eis gestoppt.

Um submitochondriale Membranvesikel zu erzeugen, wurde die Suspension für 20 min mit einem Dounce-Homogenisator behandelt. Durch Zugabe von 2 M Harnstoff konnten bei diesem Schritt die Wechselwirkungen zwischen Proteinen gestört werden. Anschließend wurde die Lösung über einen Saccharosegradienten geschichtet. Dazu wurde ein Stufengradient verwendet (SW41 Röhren), bestehend aus je 2 ml 1,5 M Saccharose, 1,4 M Saccharose, 1,21 M Saccharose und 1 M Saccharose im Gradientenpuffer (20 mM HEPES pH 7,2, 2,5 mM EDTA, 100 mM KCl). Der Gradient wurde für 16 h bei 2°C zentrifugiert (28.000 rpm, Beckman SW41-Rotor) und anschließend von oben beginnend in 960 µl Fraktionen geerntet. Die Fraktionen wurden mit TCA versetzt (2.4.6) und die Proteine durch Westernblot (2.4.10) analysiert.

Bei der Digitoninfraktionierung werden die mitochondrialen Membranen nacheinander durch steigende Detergenzkonzentrationen geöffnet. Dadurch werden die verschiedenen mitochondrialen Kompartimente nacheinander für von außen zugegebene Protease zugänglich (Hartl *et al.*, 1986). Je 100 µg Mitochondrien wurden in 20 µl SEMK-Puffer mit 0%, 0,125%, 0,15%, 0,2%, 0,3%, 0,4% und 0,6% Digitonin für 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 800 µl SEMK-Puffer mit 500 µg/ml Proteinase K zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Proteasebehandlung durch Zugabe von 1 mM PMSF und Inkubation für 5 min auf Eis beendet. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (17.500 g, 5 min, 2°C) gesammelt und die Proteine durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert (2.4.2 und 2.4.10).

### **2.3.4 *In vivo*-Nachweis der mitochondrialen Fusion (Mating Assay)**

Haploide Stämme beider Paarungstypen wurden mit den Plasmiden, die mtGFP



(pYX113-mtGFP) bzw. mtRFP (pRS416-GAL-mtRFP) codieren, transformiert (2.2.4.2). Die Expression der fluoreszierenden Proteine wurde mit Galaktose induziert (2.2.1). Die Kulturen wurden bei 0,2 OD<sub>578</sub> geerntet und in YPD pH 3,5 resuspendiert und für weitere 2 h bei 30°C im Schüttler inkubiert, um die durch den GAL-Promotor vermittelte Proteinexpression zu stoppen.

Dann wurden die Kulturen beider Paarungstypen vermengt, geerntet, in 0,3 ml sterilem Wasser resuspendiert und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe auf einen Nitrozellulosefilter überführt. Der Filter wurde mit den Zellen nach oben auf eine YPD-Platte pH 4,5 gelegt. Durch die Änderungen des pH-Bereichs wurden die Zellzyklen der Hefezellen synchronisiert. Diese Beeinflussung des Zellzyklus steigert die Paarungseffizienz um mindestens das 10-fache.

Nach 3 h bei 30°C wurden die Zellen in Wasser aufgenommen. Dazu wurde der Filter in ein 15 ml Röhrchen mit 1 ml Wasser gelegt und gevortext. Die Zellen wurden über Fluoreszenzmikroskopie analysiert (2.3.6).

### **2.3.5 DAPI-Färbung der mitochondrialen DNA**

DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) bildet mit doppelsträngiger DNA fluoreszierende Komplexe. Auf diese Weise können auch die mtDNA-Nukleotide der Mitochondrien angefärbt werden (McConnell und Yaffe, 1992; Williamson und Fennell, 1975).

1 ml einer Hefekultur, die im gewünschten Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1 kultiviert wurde, wurde 20 s bei 13.000 rpm bei RT in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert, in 700 µl Methanol aufgenommen und 5 min inkubiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS-Puffer gewaschen, wieder in 1 ml PBS resuspendiert und nach Zugabe von 1 µl DAPI (Stammlösung: 1 mg/ml in Wasser) für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 bis

300  $\mu$ l PBS resuspendiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (2.3.6).

### **2.3.6 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Analyse der Form von Mitochondrien erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Die Mitochondrien wurden mit fluoreszierenden Proteinen oder Farbstoffen sichtbar gemacht (siehe 2.3.7).

Für die Analyse im Mikroskop wurde eine Zellsuspension durch Zugabe von 0,5% (m/v) Low Melting Point Agarose auf dem Objektträger fixiert. Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen wurden an einem Axioplan Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 100x/1,30 Öl-Objektiv (Carl Zeiss, Jena GmbH) erstellt. Es wurde eine 100 W Quecksilber-Lampe verwendet. Für die Analyse von mtGFP wurde Filtersatz No. 09 verwendet (Anregung: 450 bis 490 nm, Emission: >515 nm) (Heim und Tsien, 1996). Für mtRFP und 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 durchgeführt (Anregung: 353 bis 377 nm, Emission: >397 nm) (2.3.5).

### **2.3.7 Durchmusterung einer Hefestammsammlung nach Mutanten mit veränderter mitochondrialer Form**

Für die Identifizierung von Mutanten mit veränderter mitochondrialer Form wurde 0,5 ml flüssiges YPD-Medium mit einer Hefekolonie beimpft. Dazu wurde die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von einer YPG-Platte, die *petite*-Mutanten von einer YPD-Platte, in ein Kulturröhrchen überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C im Schüttler wurden die Kulturen mit 3 ml

YPD verdünnt, um ein logarithmisches Wachstum zu garantieren. Nach weiteren 3 h Schütteln wurden die Mitochondrien durch Zugabe von 0,1  $\mu\text{M}$  Rhodamin B hexylester und 15-minütige Inkubation bei RT im Drehrad gefärbt. Die Analyse der gefärbten Mitochondrien erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (2.3.6). Hefestämme, deren Mitochondrien verändert waren, oder deren Mitochondrien sich aufgrund eines fehlenden Membranpotenzials nicht anfärben ließen, wurden ein zweites Mal durchmustert. Mutanten, die wiederholt keine Wildtyp-Mitochondrien zeigten, wurden in einer dritten Durchmusterung mit dem Plasmid pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) transformiert (2.2.4.2). Die transformierten Mutanten wurden in YPD-Medium angezogen und im Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich ihrer mitochondrialen Form untersucht.

Die Gendisruption von Mutanten mit eindeutig veränderter mitochondrialer Form wurde mittels PCR (2.1.2) überprüft, und der mitochondriale Phänotyp wurde im genetischen Hintergrund der haploiden Stämme von EUROSCARF nochmals durch Anfärben mit Rhodamin B hexylester und Transformation mit pVT100U-mtGFP überprüft.

### **2.3.8 Bestimmung der Aktivität von $\beta$ -Galaktosidase**

Die Aktivität des *FZO1*-Promotors wurde über das Reporterenzym  $\beta$ -Galaktosidase gemessen (Melcher *et al.*, 2000). Die Hefestämme YBW327 und YBW329 wurden in 25 ml YPD-Medium angezogen, bei 0,6 bis 0,8  $\text{OD}_{578}$  geerntet und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in 20 mM HEPES/KOH pH 8,0 und 1 mM DTT resuspendiert und mit Hilfe von Glaskügelchen geöffnet (2.3.1). Nach einer Zentrifugation (10.000 rpm, 10 min, 2°C, Sigma-Kühlzentrifuge) wurde die Proteinkonzentration des Überstands bestimmt (2.4.7). Dann wurden 10  $\mu\text{l}$  des Zellextrakts im 1,5 ml Reaktionsgefäß

mit 990  $\mu\text{l}$  60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 40 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 200  $\mu\text{l}$  o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG, 4 mg/ml Stammlösung) vermengt. Nach 10, 20 und 30 min Inkubation bei 30°C wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung entnommen und in 1 ml 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  verdünnt, wodurch die Umsetzung gestoppt wurde. Durch Messung der Absorption bei 420 nm im Photometer wurde die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt. Als Referenz diente eine Lösung mit 1 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 200  $\mu\text{l}$  ONPG. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wurde über die hydrolysierte Menge an ONPG in nmol/(min x mg Protein) berechnet. Dabei wurde folgende Näherung zugrunde gelegt: 1 nmol umgesetztes ONPG/ml = 0,0045  $\Delta A_{420}$ .

## 2.4 Methoden der Proteinbiochemie

### 2.4.1 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

Um Vorstufenproteine, die mit [ $^{35}\text{S}$ ]Methionin markiert sind, für Importreaktionen in isolierte Mitochondrien zu synthetisieren, wurden die in das Plasmid pGEM4 klonierten cDNAs mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase in mRNA transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von [ $^{35}\text{S}$ ]Methionin translatiert (Pelham und Jackson, 1976).

#### *in vitro*-Transkription

Zu 120  $\mu\text{l}$  Transkriptionsansatz, 10  $\mu\text{l}$  2,5 mM  $m^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{G}$  und 4,5  $\mu\text{l}$  RNasin (40 U/ $\mu\text{l}$ ) wurden 10 bis 20  $\mu\text{g}$  DNA und steriles Wasser ad 200  $\mu\text{l}$  zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion mit 1,5  $\mu\text{l}$  SP6-Polymerase (25 U/ $\mu\text{l}$ ) gestartet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  10 M Lithiumchlorid und 600  $\mu\text{l}$  96%-igem (v/v) Ethanol (-20°C) wurde die RNA durch eine 30-minütige Inkubation bei -80°C und eine ebenfalls

30 min lange Zentrifugation bei 20.000 g bei 2°C gefällt. Der Überstand wurde abgenommen, die RNA bei 30°C getrocknet und in 50 µl Wasser mit 1 µl RNasin (40 U/µl) gelöst. Die RNA wurde in Portionen zu je 16 µl bei -80°C eingefroren.

Transkriptionsansatz: 40 mM HEPES/KOH pH 7,4; 6 mM Magnesiumacetat;  
2 mM Spermidin; 100 µg/ml BSA; 100 µl 10 mM DTT;  
100 µM GTP; je 500 µM ATP, CTP, UTP

### *in vitro*-Translation in Retikulozytenlysate

Für die Translation von Vorstufenproteinen *in vitro* wurden 70 µl Kaninchen-Retikulozytenlysate, 2 µl RNasin (40 U/µl), 2 µl Aminosäurerestegemisch (alle proteinogenen Aminosäurereste außer Methionin, je 1 mM), 8 µl [<sup>35</sup>S]Methionin (10 mCi/ml) und 16 µl RNA gemischt. Der Ansatz wurde 60 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µl 0,2 M Methionin und 20 µl 1,5 M Saccharose zugegeben. Durch eine 30-minütige Zentrifugation des Translationsansatzes bei 100.000 g und 2°C wurden an Ribosomen gebundene, unvollständig translatierte Polypeptidketten entfernt. Der Translationsansatz wurde portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)**

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970). Es wurden Minigelapparaturen der Firma Biorad eingesetzt. Das Sammelgel hatte eine Abmessung von 5 x 72 x 0,75 mm und das Trenngel von 55 x 72 x 0,75 mm. Die Endkonzentration von Acrylamid betrug 11 bis 20% (m/v). Die Proben wurden in 1 x SDS-Probenpuffer gelöst und 1 min auf 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei konstant 20 mA. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert (2.4.4) oder einer Proteinfärbung unterzogen (2.4.3).

- Trenngellösung: 20% (m/v) Acrylamid/0,13% (m/v) Bisacrylamid  
(für Proteine mit einer molekularen Masse bis ca. 60 kDa)  
11% (m/v) Acrylamid/0,08% (m/v) Bisacrylamid  
(für Proteine mit einer molekularen Masse über 60 kDa)  
375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% (m/v) SDS; 0,1% (m/v) APS; 0,01% (v/v) TEMED.
- Sammelgellösung: 5% (m/v) Acrylamid; 0,03% (m/v) Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% (m/v) SDS; 0,1% (m/v) APS; 0,01% (v/v) TEMED.
- Bodengellösung: 20% (m/v) Acrylamid; 0,13% (m/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% (m/v) SDS; 0,1% APS (m/v); 0,01% (v/v) TEMED.
- 10x-Laufpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 8,3; 3,8 M Glycin; 1% (m/v) SDS.

### **2.4.3 Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau**

Nach der SDS-PAGE wurden Sammelgel und Bodengel vom Trenngel entfernt. Das Trenngel wurde in 50 ml Färbelösung (30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% (m/v) Coomassie Brilliant blau R-250) bei RT mindestens 20 min geschüttelt. Daraufhin wurde die Färbelösung abgegossen, das Gel mit entsalztem Wasser abgespült und 50 ml Entfärber (30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure) zugegeben. Das Polyacrylamidgel wurde 15 min geschwenkt. Dann wurde der Entfärber erneuert und das Gel für weitere 15 min inkubiert. Sobald die Proteinbanden sichtbar wurden, wurde das Gel zur längeren

Lagerung unter Verwendung eines Geltrockners in Klarsichtfolie eingeschweißt. Sollte das Gel nur für einige Tage aufbewahrt werden, wurde es in eine Lösung mit 30% (v/v) Methanol eingelegt.

#### **2.4.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen**

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, wurden sie nach dem Halbtrockenverfahren auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Gel, Nitrozellulose-Membran und mehrere Lagen Filterpapier wurden mit Blotpuffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,02% (m/v) SDS) getränkt. Zwei bis drei Bögen des Filterpapiers wurden auf die untere Graphitelektrode gelegt. Die Nitrozellulose-Membran wurde auf dem getränkten Filterpapier, auf der Membran das Gel platziert. Das Gel wurde erst mit mehreren Lagen Filterpapier und dann mit der oberen Graphitelektrode abgedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,5 h bei 70 mA. Proteine mit weniger als 20 kDa wurden für 1,3 h bei 50 mA transferiert. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran anschließend mit entsalztem Wasser gewaschen und in Ponceau S-Färbelösung (0,2% (m/v) Ponceau S in 3% (m/v) TCA) geschwenkt.

#### **2.4.5 Quantifizierung von Proteinbanden durch Autoradiographie/ Densitometrie und durch Phosphorimaging**

Nitrozellulose-Membranen, auf die radioaktiv markierte Proteine transferiert worden waren, wurden nach dem Trocknen auf einem Röntgenfilm exponiert (Autoradiographie). Die auf den Röntgenfilmen sichtbaren Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Pharmacia) eingelesen und ihre Intensität gemessen (Densitometrie). Alternativ wurden die Nitrozellulose-Membranen

nach dem Transfer der Proteine direkt auf Phosphorimaging-Platten exponiert und die Intensität der radioaktiv markierten Proteinbanden durch einen Phosphorimager der Firma Fuji bestimmt.

#### **2.4.6 Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure**

Proteine wurden durch die Zugabe von TCA (10% (m/v) Endkonzentration) und einer nachfolgenden Inkubation von mindestens 20 min auf Eis ausgefällt. Die Proben wurden abzentrifugiert (20 min, 30.000 g, 4°C), ein- bis zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen und nach dem Trocknen bei 37°C in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

#### **2.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung erfolgte nach der Methode von (Bradford, 1976) mit dem Reagenz „Bio-Rad-Proteinassay“. Das Farbstoffkonzentrat wurde 1 zu 5 verdünnt und zu den Proben gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt und anhand einer Eichkurve mit dem Protein IgG konnte die Konzentration berechnet werden.

#### **2.4.8 Quervernetzung mitochondrialer Proteine**

Quervernetzungsreaktionen, die eine kovalente Verknüpfung benachbarter Proteine erlauben, wurden zur Charakterisierung nativer Proteininteraktionen herangezogen. Innerhalb dieser Arbeit wurden DSG (Disuccinimidylglutarat), MBS (m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester) und DSS (Disuccinimidylsuberat) als Quervernetzungsreagenzien verwendet, die durch



die Membranen hindurchdiffundieren können. DSG und DSS erlauben eine Vernetzung benachbarter Proteine über freie Aminogruppen. Das bifunktionelle Quervernetzungsreagenz MBS bewirkt die Verknüpfung von Cysteinseitenketten mit Lysinseitenketten benachbarter Proteine. Isolierte Mitochondrien (300 µg) wurden in SEM-Puffer resuspendiert und mit einer 10 mM Quervernetzer-Stammlösung (gelöst in DMSO) versetzt. Die Endkonzentration des Quervernetzers betrug 2,5 µM. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit reinem DMSO. Nach einer Inkubation für 30 min bei 25°C wurde die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von 1 M Glycin, pH 8,0 zu einer Endkonzentration von 0,1 M beendet. Nach weiterer Inkubation für 10 min bei 25°C wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 2°C) reisoliert, zweimal mit SEM-Puffer gewaschen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Quervernetzungsaddukte wurden durch SDS-PAGE (2.4.2), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.4) und Immundekoration (2.4.10) analysiert.

### **2.4.9 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinkomplexen durch Gelfiltration**

Die Bestimmung der nativen Molekulargewichte von Proteinen und Proteinkomplexen erfolgte durch Gelfiltration. 1 mg Mitochondrien wurden mit einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in Lysepuffer (1% (v/v) Triton X-100; 150 mM Kaliumacetat; 4 mM Magnesiumacetat; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 mM PMSF) resuspendiert und 15 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden unlösliche Aggregate durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 30.000 g entfernt. Der lösliche Überstand wurde auf eine Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit 4 Säulenvolumina Laufpuffer (0,05% (v/v) Triton X-100; 150 mM Kaliumacetat; 4 mM Magnesiumacetat; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 mM PMSF) äquilibriert war. Der Lauf wurde mit einer

Flussrate von 0,3 ml/min durchgeführt. Fraktionen zu je 500 µl wurden gesammelt und die Proteine mit Trichloressigsäure ausgefällt. Nach SDS-PAGE (2.4.2) wurden die Gele auf Nitrozellulose-Membranen übertragen und mit Hilfe eines Antikörpers detektiert. Das Molekulargewicht der Proteinkomplexe wurde anhand einer Eichkurve bestimmt, die mit folgenden Proteinen ermittelt worden war: Hsp60 (840 kDa), Thyreoglobulin (670 kDa), Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa).

### **2.4.10 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)**

Es wurde ein polyklonales Serum gegen den C-Terminus von Fzo1 verwendet (anti-Fzo1-C). Das Serum war gegen das synthetische Peptid CKLMVEEINLDID, gekoppelt an das Trägerprotein KLH, gerichtet (Rapaport *et al.*, 1998). Weitere verwendete Antiseren stammten aus der Seren-Sammlung des Neupert-Labors.

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Nitrozellulose-Membranen nach dem Proteintransfer (2.4.4) bei RT 30 min in TBS-Puffer mit 5% (m/v) Magermilchpulver geschwenkt. Es folgte eine 60-minütige Immundekoration mit einem spezifischen Antiserum, das je nach Titer zwischen 1:250 und 1:2000 in TBS mit 5% (m/v) Magermilchpulver verdünnt war. Danach wurden die Membranen 10 min in TBS-Puffer, ebenfalls 10 min in 0,05% (v/v) Triton X-100 in TBS und wieder 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden gegen Immunglobulin G von Kaninchen gerichtete Antikörper verwendet, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Diese Antikörper wurden 1:10.000 in TBS-Puffer mit 5% (m/v) Magermilchpulver verdünnt und die Membranen 60 min mit dieser Lösung

inkubiert. Anschließend wurde erneut gewaschen und die gebundene Peroxidase mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham) nachgewiesen. Die Membranen wurden mit der Lumineszenz-Lösung inkubiert und zwischen 1 s und 10 min auf Röntgenfilmen exponiert.

Für die Immundekoration von Fzo1 wurde die Nitrozellulosemembran in einer TBS/0,05% Tween-Lösung geschüttelt, die 2% BSA enthielt. Für die Immundekoration wurde eine TBS/0,05% Tween-Lösung mit 1% BSA verwendet, die das Serum in einer 1:250-Verdünnung enthielt. Für die nachfolgenden Waschschrte wurde eine TBS/0,05% Tween-Lösung verwendet.

### 2.5 Puffer und Medien

Importpuffer:	50 mM HEPES/KOH pH 7,2; 0,5 M Sorbitol; 80 mM Kaliumchlorid; 10 mM Magnesiumacetat; 2 mM Kaliumphosphat pH 7,4; 1 mM Manganchlorid; 3% (m/v) BSA (fettsäurefrei).
Laktat-Medium:	3 g Hefeextrakt, 1 g Glucose, 1 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 g NH <sub>4</sub> Cl, 0,5 g CaCl <sub>2</sub> X 2 H <sub>2</sub> O, 0,5 g NaCl, 1,1 g MgSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 0,3 ml 1% FeCl <sub>3</sub> , 22 ml 90% Milchsäure, H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l, pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen.
LB-Medium:	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid; für LB <sup>Amp</sup> wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.
LB-Platten:	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid; 1,5% (m/v) Agar. Für LB <sup>Amp</sup> -Platten wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.
PBS-Puffer:	50 mM Kaliumphosphat pH 7,4; 1 % NaCl.
S-Medium:	1,7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäurereste und Ammoniumsulfat, 5 g Ammoniumsulfat, H <sub>2</sub> O dest. ad 900 ml, nach dem Autoklavieren: Zugabe von 100 ml 20% Galaktose ( <u>SGal</u> ) oder + 100 ml 20% Glucose ( <u>SD</u> ) oder + 100 ml 20% Raffinose ( <u>SR</u> ). Von den Stammlösungen der Markersubstanzen wurden unter Berücksichtigung der zu selektierenden Auxotrophiemarker 2 ml Tryptophan und Histidin, bzw. 3 ml Leucin und Lysin (Stammlösung 10 g/l), sowie je 10 ml Adenin- und Uracil-Lösung (Stammlösung 2 g/l) pro Liter Medium zugesetzt.
SDS-Probenpuffer:	2% (m/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin; 0,02% (m/v) Bromphenolblau.
SEM-Puffer:	250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM MOPS/KOH pH 7,4.
SEM-K-Puffer:	SEM-Puffer mit 80 mM KCl.
SOB-Medium:	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,58 g/l Natriumchlorid; 0,19 g/l Kaliumchlorid.
SOC-Medium:	SOB-Medium mit 20 mM Glucose und 10 mM Magnesiumchlorid.
Sporulationsplatten:	1% (m/v) Kaliumacetat; 2% (m/v) Agarose; mit ¼ der für S-Medium angegebenen Menge von Aminosäurereste supplementiert.
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:	10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, H <sub>2</sub> O dest. ad 900 ml, nach dem Autoklavieren: + 100 ml 20% Galaktose (YPGal) oder + 100 ml 20% Glucose (YPD) oder + 100 ml 30% Glycerin (YPG).
YPD-G418-Platten:	2% (m/v) Hefeextrakt; 4% (m/v) Pepton; 2% (m/v) Agar; mit HCl pH 5 einstellen; autoklavieren; auf unter 65°C abkühlen lassen; in Wasser vorgelöstes G418 ad 500 mg/l und Glucose ad 2% (m/v) zugeben.

## 2.6 Chemikalien und Geräte

### 2.6.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert, München:	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
ARK-Sigma, Darmstadt:	Oligonukleotide
Amersham-Buchler, Braunschweig:	ECL-Immunoblot-Detektionssystem, Kaninchen-Retikulozyten-lysate
Biometra, Göttingen:	Reagenzien für Polymerase-Kettenreaktion (PrimeZyme <sup>®</sup> )
Biorad, München:	Reagenzien zur Proteinbestimmung, Anti-Kaninchen-IgG-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase
Biozym, Hess. Oldendorf:	SP6-Polymerase
Boehringer, Mannheim:	dNTPs, Ethidiumbromid, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, NTPs, Proteinase K, Restriktionsenzyme, Tris
Braun, Melsungen:	Kanülen, Spritzen
Clontech, Heidelberg:	<i>E. coli</i> -Stämme
DIFCO, Detroit, USA:	Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt
EUROSCARF, Frankfurt:	Vektoren (Y1pMEL $\beta$ 2) und Hefestämme
Fluka, Buchs, USA:	Trichloressigsäure
Fuji, Düsseldorf:	Röntgenfilme
Genomed, Bad Oeynhausen:	Jetstar <sup>®</sup> -Reagenzien und -Säulen zur Plasmidisolierung
Gerbu, Gaiberg:	Acrylamid, Ampicillin, DTT, NADH
GIBCO-BRL, Eggenstein:	Agarose, T4-Ligase, Restriktionsenzyme
ICN Pharmaceuticals, Eschwege:	[ <sup>35</sup> S]Methionin (1100 bis 1400 Ci/mmol)
Invitrogen, Groningen:	pCRII-TOPO-Vektor
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat MD
Molecular Probes, Eugene, USA:	Rhodamin B Hexylester
Nestlé-Alete, München:	Magermilchpulver
NEB, Schwalbach:	Restriktionsenzyme
Pharmacia, Freiburg:	m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G
Pierce, Rockford, USA:	Quervernetzungsreagenzien DSG, DSS und MBS
Promega, Heidelberg:	RNasin, Kaninchen-Retikulozytenlysate, pGEM-Vektoren (pGEM4)
Qiagen, Homburg:	Gel Extraction Kit <sup>®</sup> , <i>E. coli</i> XL1-Blue
Research Genetics, Huntsville, USA:	Hefestammsammlung
R&D Systems, Abingdon, UK:	pYX-Vektoren
Riedel de Haen, Seelze:	Kaliumacetat
Sarstedt, Bad Homburg:	Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Röhrchen
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulose-Membranen 0,2 $\mu$ m, Faltenfilter, Filterpapier, Sterilfilter
Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan:	Zymolyase 20T
Serva, Heidelberg:	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Ponceau S, Raffinose, Saccharose (Sucrose), SDS, Spermidin, TEMED
Sigma, München:	Aminosäurereste, Ammoniumperoxodisulfat, BSA (fettsäurefrei), Glycerin, Lachsspermien-DNA, $\beta$ -Mercaptoethanol, Mineralöl; Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE, PMSF, Triton X-100, Valinomycin A
Stratagene, Heidelberg:	pBluescript II KS
United States Biochemical, Cleveland, USA:	Pepton, Trypton, Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäurereste)
Whatman, Maidstone, England:	DE52-Zellulose

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

### 2.6.2 Geräte

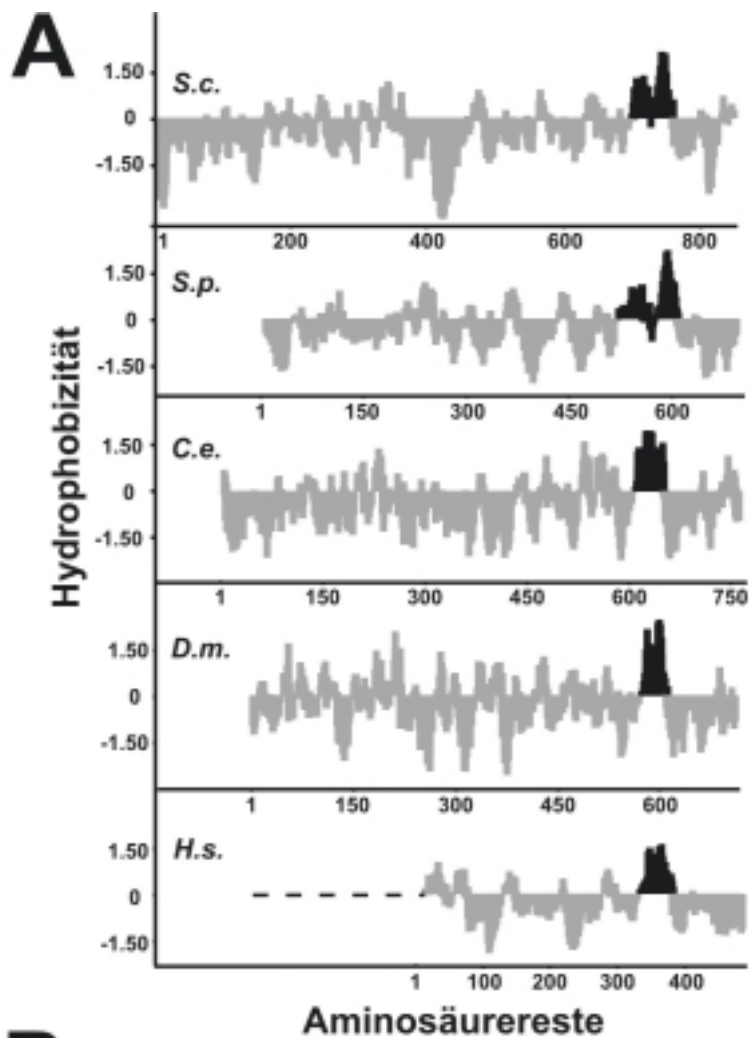
Abimed, Düsseldorf:	Kolbenhubpipetten
Agfa-Gevaert, München:	Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Gevomatic® 60
Appligene, Heidelberg:	Imaging-System The Imager™
Carl Zeiss, Jena GmbH:	Axioplan Fluoreszenzmikroskop
Beckman, München:	Kühlzentrifuge J2-21 und Ultrazentrifugen Optima TLX und Optima MX-E, L8-50M/E und L8-M, Rotoren, Zentrifugationsröhrchen
Bender und Hobein, München:	Vortex-Mixer
Branson, Heusenstamm:	Ultraschallgerät Sonifier B-15
Braun, Melsungen:	Schüttelwasserbäder
Consort, Freiburg:	Spannungsgeräte für die Elektrophorese
Eppendorf, Hamburg:	Photometer, Multipette, Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen (5415D)
Fuji, Tokyo, Japan:	Phospho-Imager BAS-1500
Heraeus Christ, Osterode:	Tischzentrifuge Bactifuge®, Brutschränke, Inkubatoren
Ika, Staufen:	Magnetrührer
Julabo, Seelbach:	Wasserbadthermostat
Memmert, Hannover:	Wärmeschränke
Pharmacia, Freiburg:	Spannungsgeräte für Gelelektrophorese und Immunoblots, Densitometer Ultrascan XL, FPLC-Anlagen, Chromatographiesäulen Superose 6
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen, Ultrafiltrationsapparatur, Sterilfilter
Schütt, Göttingen:	Autoklav Bioclav®
Shimadzu, Kyoto, Japan:	Photometer UV-120-02 und UV-240
Sigma, München:	Kühlzentrifuge 3K30
Werkstatt des Instituts, München:	Semi-dry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopfschüttler

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Biochemische Charakterisierung von Fzo1**

#### **3.1.1 Fzo1 enthält zwei potentielle Transmembrandomänen**

Das Hefeprotein Fzo1 gehört zu einer evolutionär konservierten Proteinfamilie, deren Mitglieder in Tieren und Pilzen gefunden wurden. Für die Sequenzen von Fzo1 und der verwandten Proteine in anderen Organismen wurde eine Transmembrandomäne am C-Terminus vorhergesagt (Hales und Fuller, 1997). Aus dem Hydrophobizitätsprofil geht hervor, dass diese vorausberechnete Transmembrandomäne aus zwei ausgeprägten hydrophoben Bereichen besteht, die durch 6 bis 10 Aminosäurereste getrennt sind, von denen 1 bis 3 Aminosäurereste positive Ladungen tragen (Abbildung 4A; siehe auch Hales und Fuller, 1997). Mit Hilfe des Programms TMpred (Hofmann und Stoffel, 1993) wurden für die Fzo-Proteine der Pilze und *Caenorhabditis elegans* zwei potentielle  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen vorhergesagt (Abbildung 4B). Sämtliche homologen Proteine verfügen über zwei hydrophobe Abschnitte von ausreichender Länge, um jeweils eine Membran zu durchspannen. Aus diesen Vorhersagen und den bereits bekannten Eigenschaften des Proteins (siehe 1.2.2) ergibt sich die in Abbildung 4C dargestellte Domänenstruktur von Fzo1.



**B**

```

Sc KIPTLTLTYFLGSTKVVGNIIILNGIKLSSWSSLKKLSVPVIVVGSLLGLTYLIH 755
Sp VLGKTPSFTTLGAFTGNLGYPIFKYFQNNSLQHLLVPVLGLASICVFGYVIY 602
Ce MVLTSAAFLANGSLGVLVVGGIVYKAVGW---WRVIAVGGAAAYAGLYAWERMR 664
Dm WQMLESLVKSKGSLGTVLLSAMAIRSFNW----PIVLILGGLVGSFYIYEYAA 613
Hs LVTGLASVTSRTSMGIIIVGGVIWKTIGW---KLLSSVSLTMYGALYLYERLS 384
TMs          *****                               *****
    
```





**Abbildung 4: Mitglieder der Fzo1-Proteinfamilie haben zwei mögliche Transmembrandomänen.**

(A) Hydrophobizitätsprofil der Fzo-Proteine von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. c.*), *Schizosaccharomyces pombe* (*S. p.*), *Caenorhabditis elegans* (*C. e.*), *Drosophila melanogaster* (*D. m.*) (Hales und Fuller, 1997) und ein Teil der Sequenz des menschlichen Fzo1 (*H. s.*) (Hales und Fuller, 1997). Grafische Darstellung nach Kyte und Doolittle, 1982. Hydrophobe Bereiche sind schwarz hervorgehoben.

(B) Sequenzvergleich zwischen den hydrophoben Abschnitten der Fzo-Proteine. Mögliche Aminosäurereste einer Transmembrandomäne wurden über das TMPred-Programm (Hofmann und Stoffel, 1993) bestimmt und sind unterstrichen. Positionen, die in mehreren Spezies hydrophobe Reste besitzen, sind durch einen Stern (\*) markiert.

(C) Domänenstruktur von Fzo1. Das Protein besitzt drei „coiled-coil“-Motive, eine GTPase-Domäne am N-Terminus sowie zwei postulierte Transmembrandomänen (TMs) am C-Terminus.

### **3.1.2 Der C-Terminus von Fzo1 ist im Cytosol lokalisiert**

Fzo1 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran und exponiert seinen N-Terminus ins Cytosol (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Bisher gab es jedoch keinerlei experimentelle Hinweise auf die Lokalisation des C-Terminus. Aus den in 3.1.1 getroffenen Vorhersagen ergeben sich drei unterschiedliche Möglichkeiten: (i) Die benachbarten Transmembrandomänen durchspannen die mitochondriale Außen- und Innenmembran. In diesem Fall müsste sich der C-Terminus in der Matrix befinden. Diese Möglichkeit wurde bereits von Hales und Fuller (1997) vorgeschlagen, wobei sie darauf hinwiesen, dass der isoelektrische Punkt (pI) des C-terminalen Endes von Fzo mit dem durchschnittlichen pI-Wert von Matrix-Proteinen vergleichbar ist. (ii) Andererseits könnten die Transmembrandomänen die äußere mitochondriale Membran zweimal durchspannen. Der C-Terminus wäre dann im Cytosol. (iii) Wenn es sich allerdings nur um eine einzige Transmembrandomäne handelt, wäre der C-Terminus im Intermembranraum lokalisiert. Nachfolgend wurde untersucht, welche der möglichen Topologien für Fzo1 zutrifft.

#### **3.1.2.1 Bestimmung der Topologie von Fzo1 durch Subfraktionierung und Proteasebehandlung von Mitochondrien**

Um die submitochondriale Lokalisation des C-Terminus von Fzo1 zu untersuchen, wurden Mitochondrien aus Wildtyphefe (WT; D273-10B) isoliert und mit Proteinase K (PK) behandelt. Unter Verwendung eines spezifischen Antiserums, das gegen die letzten 12 C-terminalen Aminosäurereste von Fzo1 gerichtet ist, anti-Fzo1-C, konnte ein Protease-resistentes 19 kDa Proteinfragment im Westernblot detektiert werden (Abbildung 5A, Spur 2). Der berechnete Wert für ein Fzo1-Fragment, das sich aus dem C-Terminus sowie

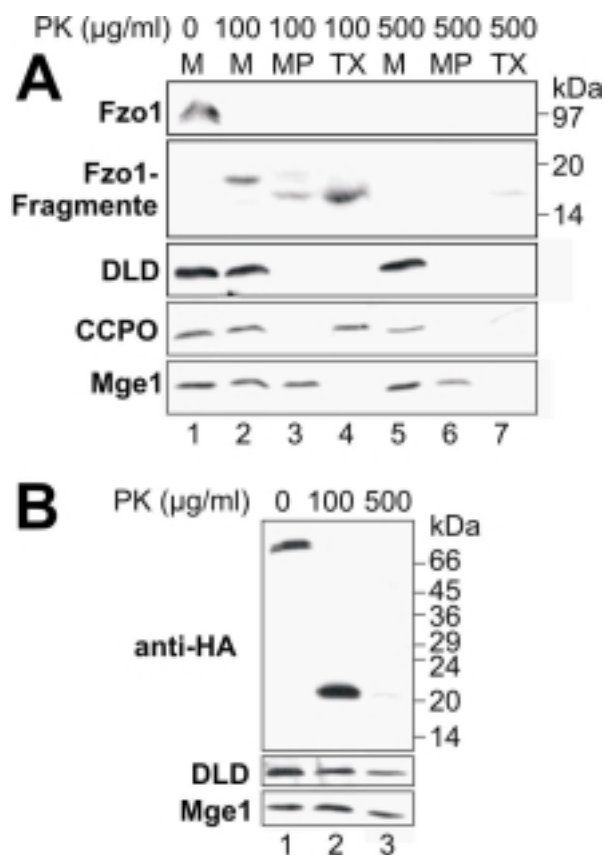
den beiden vorhergesagten Transmembrandomänen zusammensetzt (Aminosäurereste 704-855), beträgt 17,4 kDa. In einem zweiten Ansatz wurden Mitochondrien durch Inkubation in hypotonischem Puffer in Mitoplasten umgewandelt und mit Protease behandelt. Die Größe des geschützten Fragments reduzierte sich dabei auf 16 kDa (Abbildung 5A, Spur 3). Die berechnete Größe eines C-terminalen Fragments, in dem nur die zweite vorhergesagte Transmembrandomäne vorhanden ist (Aminosäurereste 737-855), beträgt 13,8 kDa. Die beobachtete Reduzierung des Fragments um ca. 3 kDa stimmt mit den berechneten Werten überein, was darauf hindeutet, dass der Bereich zwischen den beiden Transmembrandomänen durch das Öffnen der Außenmembran für die Protease zugänglich wird und zur Bildung des kleineren Fragments führt (siehe 3.1.2.2).

Da das verwendete Antiserum auch unspezifische Kreuzreaktionen zeigte, sollte eingehender untersucht werden, ob es sich bei den beobachteten Proteinbanden um Abbauprodukte von Fzo1 handelt. Dazu diente ein Hefestamm, der Fzo1 von einem Multikopien-Plasmid exprimiert. Mitochondrien wurden isoliert und wie oben beschrieben behandelt. Durch die Überexpression von Fzo1 konnten die Fragmente angereichert werden. Dies bestätigte, dass es sich bei den Proteinbanden um Fzo1-Fragmente handelt (nicht gezeigt).

Zur weiteren Untersuchung der Lokalisation des C-Terminus wurden die mitochondrialen Membranen mit einem Detergenz solubilisiert und mit Protease behandelt. Das 16 kDa Fragment konnte auch in diesem Fall nachgewiesen werden (Abbildung 5A, Spur 4). Dieses Fzo1-Fragment war also nicht durch eine der Membranen vor der Protease geschützt gewesen, sondern konnte aufgrund seiner besonderen Protease-resistenten Konformation gebildet werden. Des weiteren wurden Mitochondrien und Mitoplasten mit größeren Mengen an PK behandelt, was zum gänzlichen Abbau der Fzo1-Fragmente führte (Abbildung 5A, Spur 5 und 6). Der C-Terminus war für die Protease zugänglich

und muss sich folglich außerhalb des Organells befinden. In Gegenwart von Detergenz wird unter diesen Bedingungen ein schwaches Signal des 16 kD Fragments beobachtet (Abbildung 5A, Spur 7). Das Detergenz scheint den C-Terminus gegen Proteaseabbau zu stabilisieren.

In einem zweiten Ansatz zur Lokalisation des C-Terminus von Fzo1 wurden Mitochondrien aus dem Hefestamm YBW60 präpariert, der ein Fusionsprotein aus Fzo1 und einem C-terminalen Hämagglutinin-Epitop (Fzo1-HA) überexprimiert. Nach Behandlung mit Protease wurde mit Hilfe eines monoklonalen anti-HA Antikörpers ein 20 kDa Fragment detektiert (Abbildung 5B, Spur 2). Die berechnete Größe eines Fragments, das mit dem Aminosäurerest 704 beginnt, und sich somit aus den zwei potentiellen Transmembrandomänen, der C-terminalen Domäne und dem HA-Epitop zusammensetzt, beträgt 18,5 kDa. Die Größe der beobachteten Proteinbande ist demnach mit dem errechneten Molekulargewicht eines solchen Fragments vergleichbar. Das Fzo1-HA-Fragment wurde nicht beobachtet, wenn größere Proteasemengen eingesetzt wurden (Abbildung 5B, Spur 3) oder Mitochondrien, die kein Fzo1-HA besaßen (nicht gezeigt).

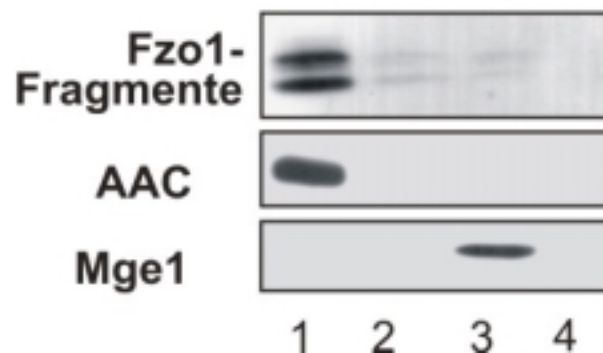


### Abbildung 5: Das C-terminale Ende von Fzo1 ist im Cytosol lokalisiert.

(A) Subfraktionierung und Proteasebehandlung von Mitochondrien aus der WT-Hefe D273-10B. Mitochondrien (M), Mitoplasten (MP) oder Mitochondrien, die mit Triton X-100 (TX) solubilisiert worden waren, wurden mit den angegebenen Mengen an Proteinase K (PK) behandelt. Proteine wurden mit TCA präzipitiert und mittels SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und anschließender Dekoration mit Antikörpern analysiert. Fzo1 und seine C-terminalen Fragmente wurden mit einem affinitätsgereinigten Antiserum, das gegen die letzten 12 C-terminalen Aminosäurereste gerichtet ist, detektiert. Folgende Proteine wurden als Marker für die mitochondrialen Kompartimente verwendet: D-Laktatdehydrogenase (DLD) für integrale Proteine in der mitochondrialen Innenmembran. DLD wird durch PK abgebaut, wenn die Außenmembran durch osmotische Schwellung oder Zugabe von Detergenz geöffnet wird. Cytochrom c-Peroxidase (CCPO) für lösliche Proteine im Intermembranraum. CCPO löst sich von den Mitochondrien, wenn sich deren Außenmembran öffnet, und hat eine Protease-resistente Konformation. Mge1 für lösliche Matrixproteine. Es wird für die Protease zugänglich, wenn die Innenmembran geöffnet wird. Die einzelnen Proteine wurden mit dem Chemolumineszenzsystem (Amersham) detektiert.

(B) Proteasebehandlung von Mitochondrien aus einem Hefestamm, der Fzo1-HA überexprimiert. Mitochondrien wurden aus dem Hefestamm YBW60 präpariert und mit den angegebenen Mengen an PK inkubiert. Mitochondriale Proteine wurden durch Immundekoration mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop und Antiserum gegen DLD und Mge1 analysiert.

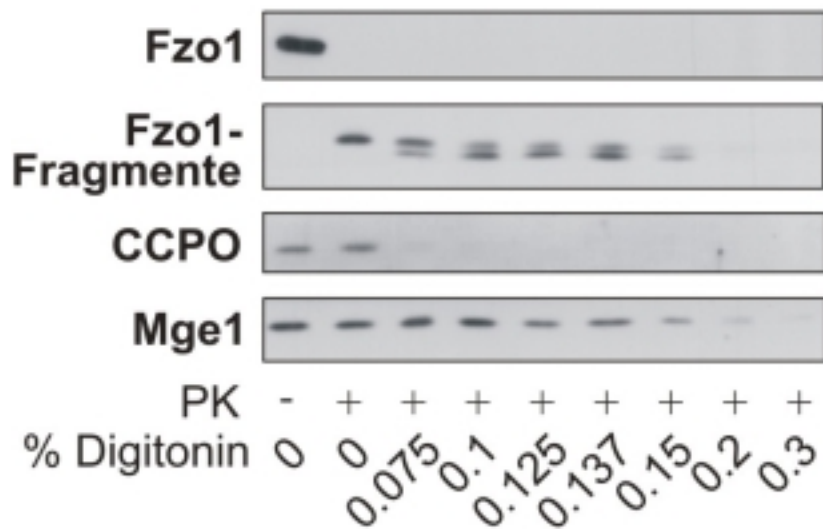
Durch alkalische Extraktion der Mitochondrien mit Carbonat (pH 11,5) sollte überprüft werden, ob die Fzo1-Fragmente integrale Bestandteile der mitochondrialen Membran sind. Beide Fragmente befanden sich nach Carbonatextraktion und Flotation im Dichtegradienten vollständig in der Fraktion mit der geringsten Dichte und verhielten sich somit wie das integrale Membranprotein AAC (Abbildung 6). Darüber hinaus fraktionierten sie in Saccharose-Dichtegradienten mit Membranenfragmenten submitochondrialer Partikel (siehe 3.1.3.1).



**Abbildung 6: Die C-terminalen Fzo1-Fragmente sind integrale Bestandteile der Außenmembran.**

Carbonatextraktion der C-terminalen Fzo1-Fragmente. Mitoplasten wurden aus dem Hefestamm YBW114 präpariert, mit PK behandelt und dann mit 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extrahiert. Anschließend wurden die Membranen in einem Saccharosegradienten durch Zentrifugation aufgeschwemmt. Der Gradient wurde geerntet, und Proteine wurden durch Zugabe von TCA gefällt und über SDS-PAGE und Immundekoration analysiert. Spur 1: Fraktion der integralen Membranproteine; Spur 2: Mittlere Fraktion; Spur 3: Fraktion der löslichen Proteine; Spur 4: Fraktion der Proteine im Pellet. Eingesetzte Marker: ADP/ATP-Carrier (AAC), ein integrales Protein der Innenmembran, und Mge1.

Eine zusätzliche Bestätigung für die Lokalisation des C-Terminus lieferte die Digitoninfraktionierung von Mitochondrien. Die mitochondrialen Membranen wurden nacheinander durch steigende Detergenzkonzentrationen geöffnet. Anschließend wurden die Organellen mit Protease behandelt und durch Zentrifugation reisoliert. Wie in 3.1.2.1 beschrieben wird in intakten Mitochondrien ein 19 kDa Fragment gebildet. Sobald sich die äußere Membran öffnet, wird auch das 16 kDa Fragment gebildet. Erst bei Digitoninkonzentrationen, die ausreichen, um die Innenmembran zu solubilisieren, verschwinden die Fzo1-Signale (Abbildung 7). Bei diesen Konzentrationen werden die Fzo1-Fragmente aus der Außenmembran extrahiert und gehen in den Überstand.

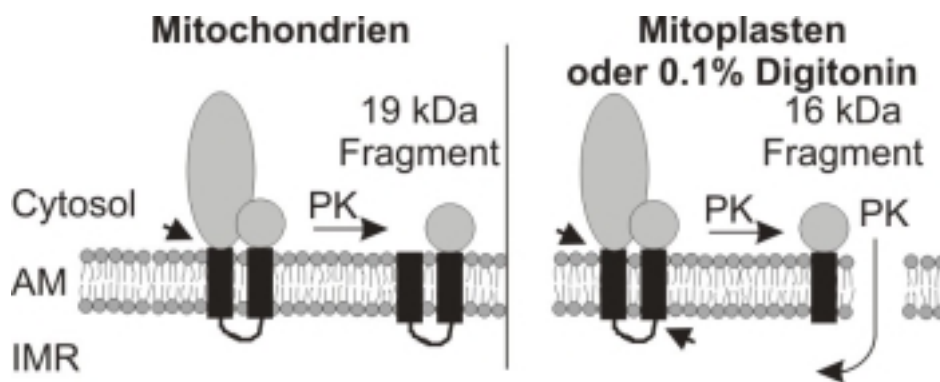


**Abbildung 7: Entstehung der Fzo1-Fragmente bei der Digitoninfraktionierung.**

Digitoninfraktionierung von Mitochondrien. Mitochondrien wurden aus dem Hefestamm YBW114 isoliert und mit den angegebenen Digitoninkonzentrationen behandelt und in Abwesenheit oder Gegenwart von 500  $\mu\text{g/ml}$  PK inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation reisoliert und mittels SDS-PAGE und Immundekoration untersucht.

### 3.1.2.2 Die Topologie von Fzo1 und die Entstehung der Fzo1-Fragmente

Die in 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Fzo1 eine  $N_{\text{außen}}/C_{\text{außen}}$ -Topologie in der mitochondrialen Außenmembran besitzt. Die beiden Transmembrandomänen sind über ein kurzes Proteinsegment im Intermembranraum verbunden. Durch die Proteasebehandlung von Mitochondrien wird die N-terminale GTPase-Domäne vom Protein entfernt. Gleichzeitig wird ein 19 kDa Fragment generiert, das aus den beiden Transmembransegmenten sowie der C-terminalen Domäne besteht. Sobald der Intermembranraum für die Protease zugänglich wird, entsteht ein 16 kDa Fragment, das lediglich aus dem zweiten Transmembransegment sowie der C-terminalen Domäne besteht. Die Topologie von Fzo1 und die Bildung seiner Fragmente ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Topologie von Fzo1 und Entstehung der C-terminalen Fzo1-Fragmente.**

Im linken Teil der Abbildung sind die Topologie von Fzo1 in der Außenmembran (AM) und die Entstehung des C-terminalen 19 kDa Fragments durch den Einfluss von PK skizziert. Im rechten Teil der Abbildung ist die Bildung des 16 kDa Fragments dargestellt. In diesem Fall ist der Intermembranraum (IMR) für die Protease zugänglich, so dass sich der Protease zwei Spaltstellen bieten, die durch Pfeile angedeutet sind.



### 3.1.3 Untersuchungen zur Interaktion von Fzo1 mit der Innenmembran

Bei der Auftrennung der mitochondrialen Membranen im Saccharosegradienten fraktioniert Fzo1 in einer Fraktion mit mittlerer Dichte (Intermediate Density Fraction; IDF), die zwischen der Dichte der Außenmembran- und der Dichte der Innenmembranfraktion liegt (Hermann *et al.*, 1998). Das Muster der Fraktionierung ähnelt dem eines Vorstufenproteins, das in der Kontaktstelle eines Translokationsapparats verankert ist und beide mitochondrialen Membranen durchspannt (Pon *et al.*, 1989). Daher wurde vorgeschlagen, dass Fzo1 mit einer Transmembrandomäne in der Innenmembran verankert ist (Hermann *et al.*, 1998). Eine solche Topologie wäre jedoch im Widerspruch zu einer  $N_{\text{außen}}/C_{\text{außen}}$ -Topologie, wie sie in dieser Arbeit belegt wurde. Es wurde daher untersucht, auf welche Weise Fzo1 mit der mitochondrialen Innenmembran interagiert.

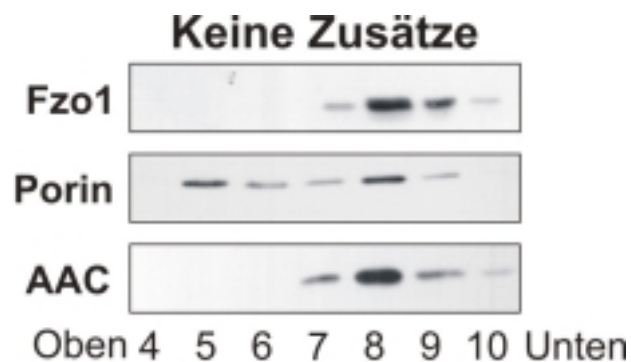
#### 3.1.3.1 Fzo1 befindet sich in einer Kontaktstelle

Mitochondrien wurden durch osmotisches Öffnen der Außenmembran in Mitoplasten umgewandelt, homogenisiert, und die submitochondrialen Partikel wurden in einem Saccharosegradienten aufgetrennt (Daum *et al.*, 1982b; Schwaiger *et al.*, 1987; Pon *et al.*, 1989). Bei dieser Methode werden Innenmembranvesikel hoher Dichte sowie Außenmembranvesikel geringerer Dichte erzeugt und voneinander getrennt. In der IDF befinden sich Innenmembranvesikel, die über Proteine der Kontaktstellen mit Außenmembranvesikeln verknüpft sind (Brdiczka, 1991; Lithgow *et al.*, 1991; Pon *et al.*, 1989; Schwaiger *et al.*, 1987).

Als Markerprotein für die Außenmembranvesikel wurde Porin verwendet. Unter Standardbedingungen befindet es sich in den leichten Fraktionen, aber auch gemeinsam mit AAC, dem Markerprotein für die Innenmembranvesikel, in den

schweren Fraktionen. Die Kofraktionierung von AAC und Porin kann dadurch erklärt werden, dass beide Proteine Teil submitochondrialer Partikel sind, die beide mitochondrialen Membranen beinhalten. Tatsächlich gibt es Hinweise, dass beide Proteine einen Komplex bilden, der sich in einer Kontaktstelle befindet (Brdiczka *et al.*, 1998; Crompton *et al.*, 1998; Crompton, 1999).

Fzo1 fraktionierte ausschließlich zusammen mit dem mitochondrialen Innenmembranprotein AAC und nicht mit den Außenmembranvesikeln (Abbildung 9). Dies deutet darauf hin, dass sich Fzo1 in Außenmembranvesikeln befindet, die mit der Innenmembran assoziiert sind.



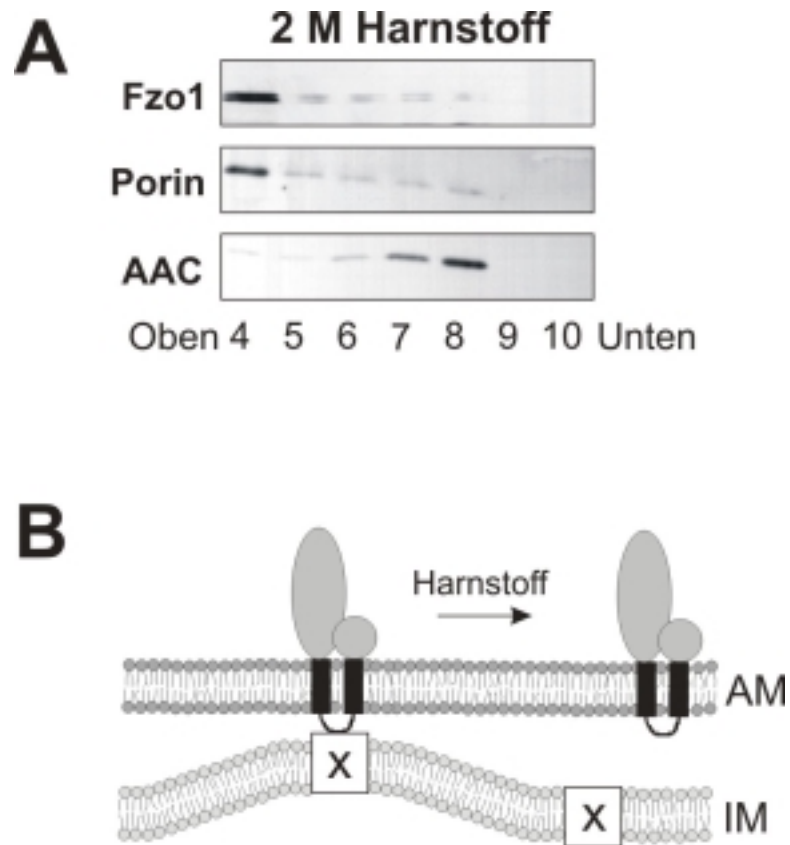
**Abbildung 9: Fzo1 ist mit der Innenmembran assoziiert.**

Mitochondrien wurden in submitochondriale Fragmente zerlegt, die anschließend über einen Saccharosegradienten aufgetrennt wurden. Die Fraktionen 4 bis 10 wurden mit TCA gefällt und mittels Westernblot analysiert. Porin diente als Marker für die Außenmembran. AAC wurde als Marker für die Innenmembran eingesetzt. Das Verhalten der Proteine bei der Fraktionierung war unabhängig davon, ob Mitochondrien aus den Hefestämmen YBW114 oder D273-10B verwendet wurden. Die hier verwendeten Mitochondrien wurden auch für die Subfraktionierungen eingesetzt, die in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt sind.

### **3.1.3.2 Fzo1 ist peripher mit der mitochondrialen Innenmembran verbunden**

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Assoziation zwischen Fzo1 und der Innenmembran auf einer peripheren oder einer integralen Verknüpfung beruht, wurde Harnstoff bei den Subfraktionierungen eingesetzt. Unter diesen Bedingungen werden periphere Membranproteine von der Lipiddoppelschicht extrahiert (Gilmore und Blobel, 1985; Steck und Yu, 1973). Integrale Membranproteine werden hingegen nicht beeinflusst.

Wenn Mitoplasten in Gegenwart von 2 M Harnstoff homogenisiert und anschließend über einen Saccharosegradienten fraktioniert wurden, befand sich Fzo1 ausschließlich in der Außenmembranfraktion (Abbildung 10A). Unter diesen Bedingungen wird auch die Interaktion von Porin mit der Innenmembran aufgehoben. Die periphere Assoziation von Fzo1 mit der Innenmembran ist in Abbildung 10B dargestellt.



**Abbildung 10: Harnstoff löst die periphere Verbindung zwischen Fzo1 und Innenmembran auf.**

(A) Mitochondriale Membranpartikel wurden in Gegenwart von 2 M Harnstoff generiert und wie in Abbildung 9 analysiert.

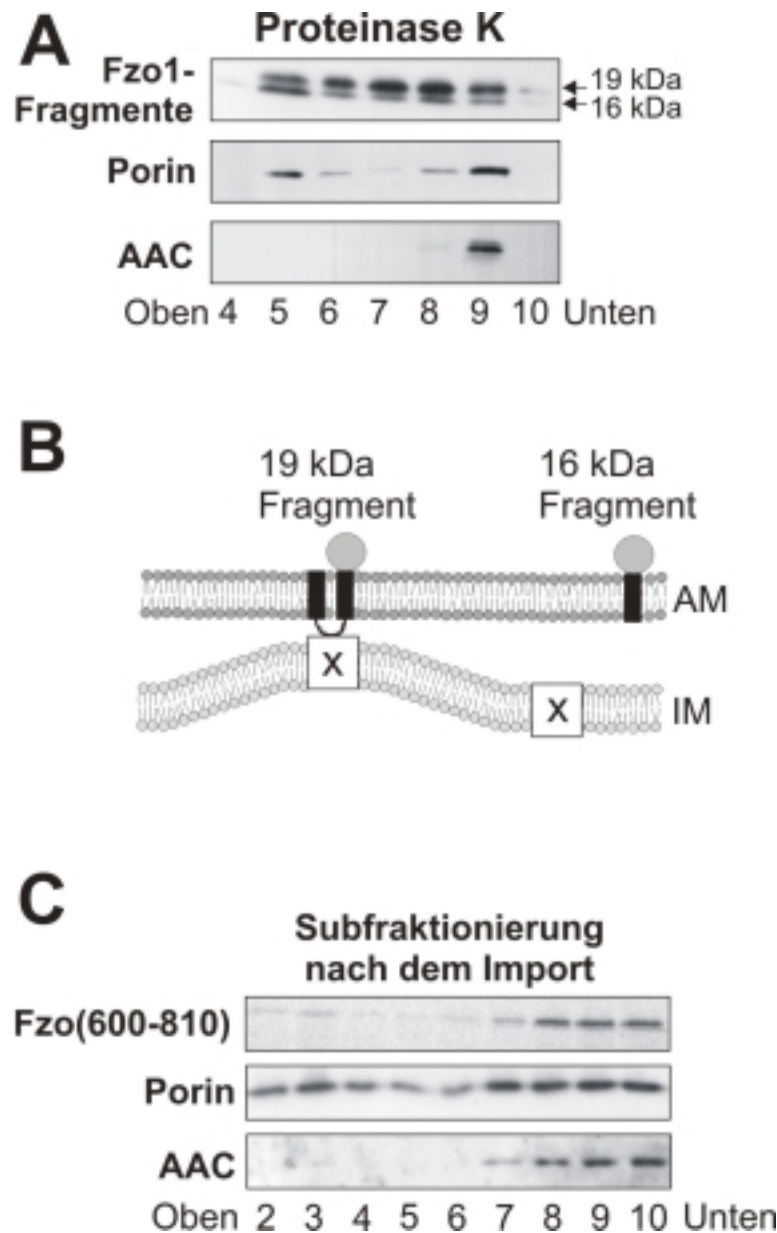
(B) Schematische Darstellung der Lokalisation von Fzo1 in einer Kontaktstelle und der Wirkung von Harnstoff. AM: Außenmembran; IM: Innenmembran; X: Unbekannter Interaktionspartner von Fzo1 in der Innenmembran.

### 3.1.3.3 Welcher Teil von Fzo1 interagiert mit der Innenmembran?

Um zu untersuchen, welcher Proteinbereich Fzo1 mit der Innenmembran verbindet, wurde die Fraktionierung der C-terminalen Fragmente untersucht. Die Außenmembran wurde durch Schwellen der Mitochondrien in hypotonischem Puffer geöffnet, und die Mitoplasten wurden mit Protease behandelt. Unter den gewählten Bedingungen wurde sowohl das 19 kDa als auch das 16 kDa Fzo1-Fragment gebildet. Nach der Subfraktionierung der Mitochondrien befand sich der Großteil des 19 kDa Proteinfragments in den schweren Fraktionen. Es verhielt sich somit ähnlich wie das intakte Fzo1. Dagegen fraktionierte das 16 kDa Fragment größtenteils mit den Außenmembranvesikeln (Abbildung 11A). In Abbildung 11B ist das Verhalten der Fzo1-Fragmente bei der Subfraktionierung dargestellt.

Es wurde untersucht, ob ein verkürztes Fzo1-Konstrukt, das aus den beiden Transmembrandomänen, der Intermembranraumdomäne und dem C-Terminus besteht, eine Assoziation mit der Innenmembran eingeht. Dazu wurde Fzo1(600-810) verwendet, das in die mitochondriale Außenmembran importiert wird (D. Rapaport; Fritz *et al.*, 2001). In Gegenwart von [<sup>35</sup>S]Methionin wurde das Vorstufenprotein von Fzo1(600-810) *in vitro* synthetisiert. Der Import der radioaktiven Vorstufe erfolgte in WT-Mitochondrien des Hefestamms D273-10B. Anschließend wurden die Mitochondrien über einen Saccharosegradienten subfraktioniert. Fzo1(600-810) fraktionierte überwiegend gemeinsam mit Vesikeln der Innenmembran (Abbildung 11C).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Intermembranraumsegment von Fzo1 für eine Wechselwirkung mit der Innenmembran von entscheidender Bedeutung ist.



**Abbildung 11: Die Intermembranraumdomäne von Fzo1 vermittelt die Interaktion zur Innenmembran.**

(A) Lokalisation der C-terminalen Fzo1-Fragmente. Mitochondrien wurden in Gegenwart von 100  $\mu\text{g/ml}$  PK geschwollen. Mitochondriale Membranfragmente wurden wie in Abbildung 9 subfraktioniert und analysiert.

(B) Darstellung der Lokalisation der C-terminalen Fzo1-Fragmente in einer Kontaktstelle. Bezeichnungen wie in Abbildung 10B.

(C) Fzo1(600-810) fraktioniert mit Vesikeln der Innenmembran. Die radioaktiv markierte Vorstufe von Fzo1(600-810) wurde in WT-Mitochondrien importiert. Anschließend wurden die Mitochondrien gewaschen und subfraktioniert. Porin und AAC wurden nachgewiesen wie oben beschrieben. Die Analyse von Fzo1(600-810) erfolgte durch Autoradiographie.

#### **3.1.3.4 Ein intaktes Fzo1-Intermembranraumsegment wird für eine Assoziation mit der Innenmembran benötigt**

Da die Intermembranraumdomäne für eine Verbindung des Fzo1-Komplexes zur Innenmembran benötigt wird, wurde die Funktion dieses Bereichs näher untersucht. Dazu wurde ein flexibles Verbindungssegment, (KL[GGS]<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, zwischen die beiden Transmembrandomänen eingefügt. Ziel war es, die Struktur des Intermembranraumsegments wesentlich zu modifizieren, ohne Zielsteuerung, Topologie oder Komplexassemblierung des Mutantenproteins zu beeinflussen. Mit dieser Mutante sollte es möglich sein, die Interaktion mit Komponenten in der Innenmembran zu beeinträchtigen (Abbildung 12A).

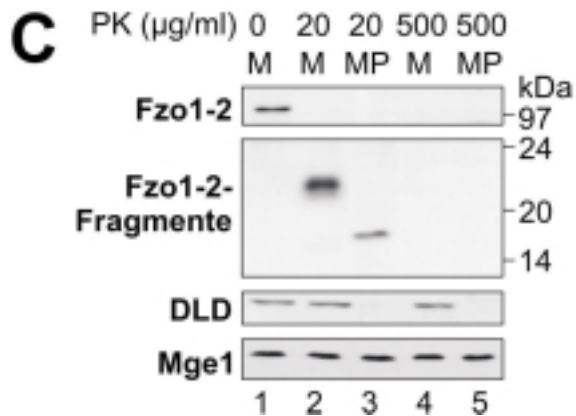
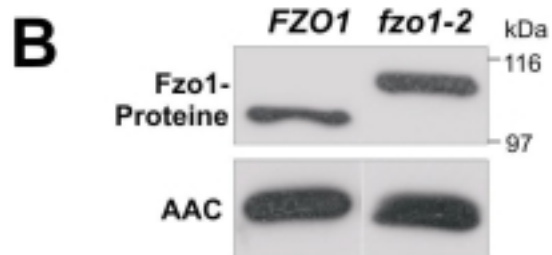
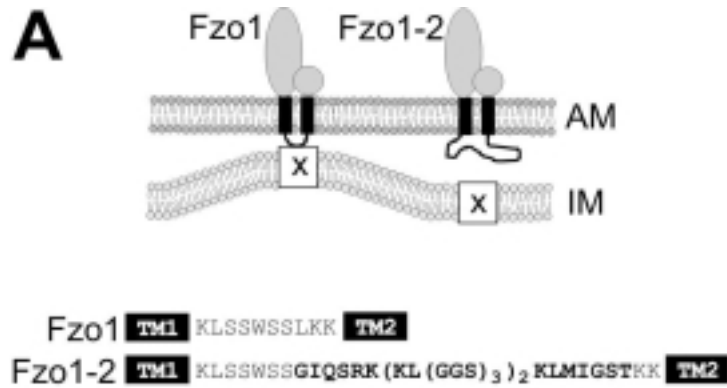
Das modifizierte Protein, Fzo1-2, wurde in der gleichen Menge wie das WT-Protein exprimiert (Abbildung 12B). Durch Proteasebehandlung von Mitochondrien entstand ein C-terminales Fragment, das ca. 3 kDa größer war als das 19 kDa Proteinfragment des WT-Proteins. Die Proteasebehandlung von Mitoplasten lieferte ein 16 kDa Fragment, welches mit dem identisch war, das für das WT-Protein beobachtet worden war. Beide Fragmente wurden bei Behandlung intakter Mitochondrien mit hohen Proteasekonzentrationen abgebaut. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Fzo1-2 die korrekte Topologie besitzt (Abbildung 12C).

Durch Gelfiltration wurde untersucht, ob die Assemblierung des Mutantenproteins in den höhermolekularen Komplex beeinträchtigt ist. Fzo1-2 eluierte bei ca. 800 kDa (Abbildung 12D), was dem Molekulargewicht des WT-Komplexes entspricht (Rapaport *et al.*, 1998). Die Assemblierung in einen Proteinkomplex ist demnach nicht beeinflusst.

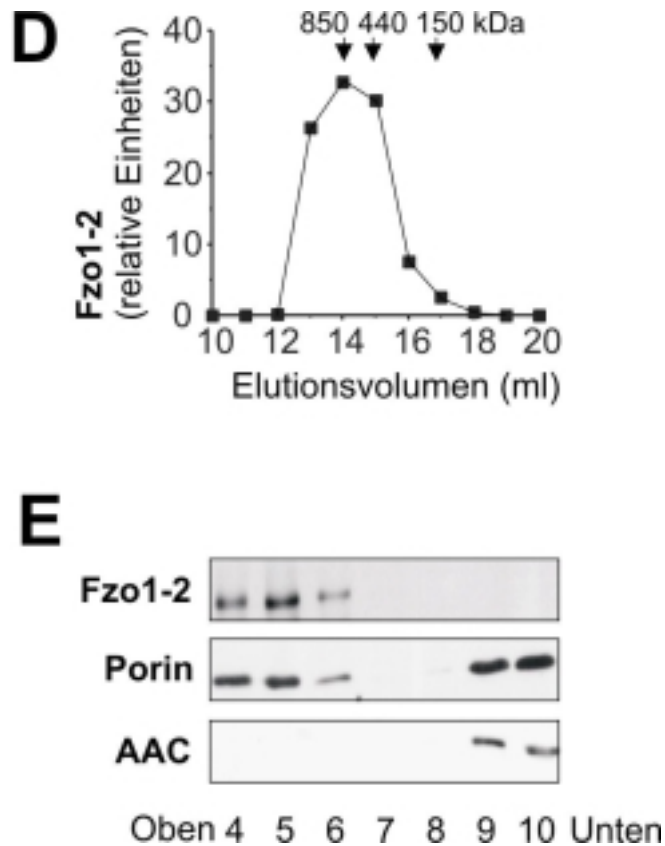
Um die Interaktion des Mutantenproteins mit der Innenmembran zu untersuchen, wurden submitochondriale Fragmente über einen Saccharosegradienten aufgetrennt. Im Gegensatz zum WT-Protein (siehe

Abbildung 8) war Fzo1-2 nicht mit der Innenmembran assoziiert (Abbildung 12E).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein intaktes Intermembranraumsegment entscheidend zur Interaktion zwischen Fzo1 und der Innenmembran beiträgt.







### Abbildung 12: Durch Mutation des Intermembranraumsegments von Fzo1 wird die Assoziation mit der Innenmembran aufgelöst.

(A) Eine modifizierte Version von Fzo1, Fzo1-2, wurde durch Einfügen zusätzlicher Aminosäuren zwischen die beiden Transmembrandomänen (TM) konstruiert. Es ist die Topologie von Fzo1-2 sowie die Aminosäuresequenz des Intermembranraumsegments abgebildet.

(B) Expression von Fzo1-2. Mitochondrien wurden aus dem WT-Stamm und der *fzo1-2*-Mutante gewonnen. Gleiche Mengen an mitochondrialem Protein wurden über SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Als Kontrolle für die aufgetragenen Proteinmengen diente AAC.

(C) Die Topologie von Fzo1-2. Mitochondrien, die Fzo1-2 besitzen, wurde wie in Abbildung 4A analysiert.

(D) Fzo1-2 assembliert in einen höhermolekularen Proteinkomplex. *fzo1-2*-Mitochondrien wurden in Solubilisierungspuffer mit Triton X-100 solubilisiert und auf eine Superose 6-Säule aufgetragen. Die Fraktionen wurden gesammelt und nach einer TCA-Fällung mittels SDS-PAGE, Immundekoration und Quantifizierung durch Laserdensitometrie analysiert. Als Eichproteine dienten Hsp60 (850 kDa), Apoferritin (440 kDa) und ADH (150 kDa). Die gesamte Menge des eluierten Proteins wurde auf 100 % festgelegt.

(E) Submitochondriale Lokalisation von Fzo1-2. *fzo1-2*-Mitochondrien wurden subfraktioniert und wie in Abbildung 9 analysiert.

### 3.1.3.5 Die Wechselwirkung von Fzo1 mit der Innenmembran wird für die mitochondriale Fusion benötigt

Mit der *fzo1-2*-Mutante konnte die Bedeutung der Assoziation von Fzo1 mit der Innenmembran für die Funktion des Proteins untersucht werden.

In der  $\Delta fzo1$ -Deletionsmutante sind die Mitochondrien fragmentiert, denn die Fusion ist blockiert, während die Teilungsmaschinerie immer noch aktiv ist. Aufgrund der veränderten Form der Mitochondrien verlieren  $\Delta fzo1$ -Zellen ihre mtDNA und werden atmungsdefizient (Bleazard *et al.*, 1999; Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 1999).

Es wurde untersucht, ob die *fzo1-2*-Mutante einen ähnlichen Phänotyp hat wie  $\Delta fzo1$ . Von einer Kultur der *fzo1-2*-Mutante wurden 10-fache Verdünnungsstufen auf YPD- und YPG-Platten übertragen. Das Wachstum der Mutante war auf YPG-Medium stark vermindert (Abbildung 13A), was darauf hindeutet, dass das Mutantenprotein nur noch teilweise funktionell ist.

Zellen, die mtGFP exprimieren, wurden hinsichtlich ihrer Mitochondrienform unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abbildung 13B). Die Mitochondrien der WT-Zellen bildeten das charakteristische Netzwerk unter der Zelloberfläche. Mitochondrien von  $\Delta fzo1$ -Zellen waren stark fragmentiert. Die Mehrheit der *fzo1-2*-Zellen war nicht von der Deletionsmutante zu unterscheiden; nur wenige Zellen besaßen einige wenige tubuläre mitochondriale Strukturen. Die Quantifizierung der mitochondrialen Phänotypen zeigte, dass ein großer Teil der *fzo1-2*-Zellen über aggregierte Mitochondrien verfügt (Tabelle 2). Dabei könnte es sich um Zwischenstufen der Membranfusion handeln.

Die Auswirkung der *fzo1-2*-Mutation auf die Mitochondrienform wurde weiter untersucht. Der Hefestamm YBW183, der Fzo1-2 von einem Multikopien-Plasmid exprimiert (*fzo1-2*[2 $\mu$ ]), wurde mit einem Einzelkopie-Plasmid mit dem *FZO1*-Gen transformiert (*fzo1-2*[2 $\mu$ ]*FZO1*; YBW210). Dadurch wurde das

mitochondriale Retikulum teilweise wiederhergestellt (Tabelle 2). Allerdings waren die Mitochondrien vieler Zellen immer noch aggregiert. Möglicherweise wirkt sich das Fzo1-2-Protein selbst in Gegenwart des WT-Proteins nachteilig auf die mitochondriale Fusion aus.

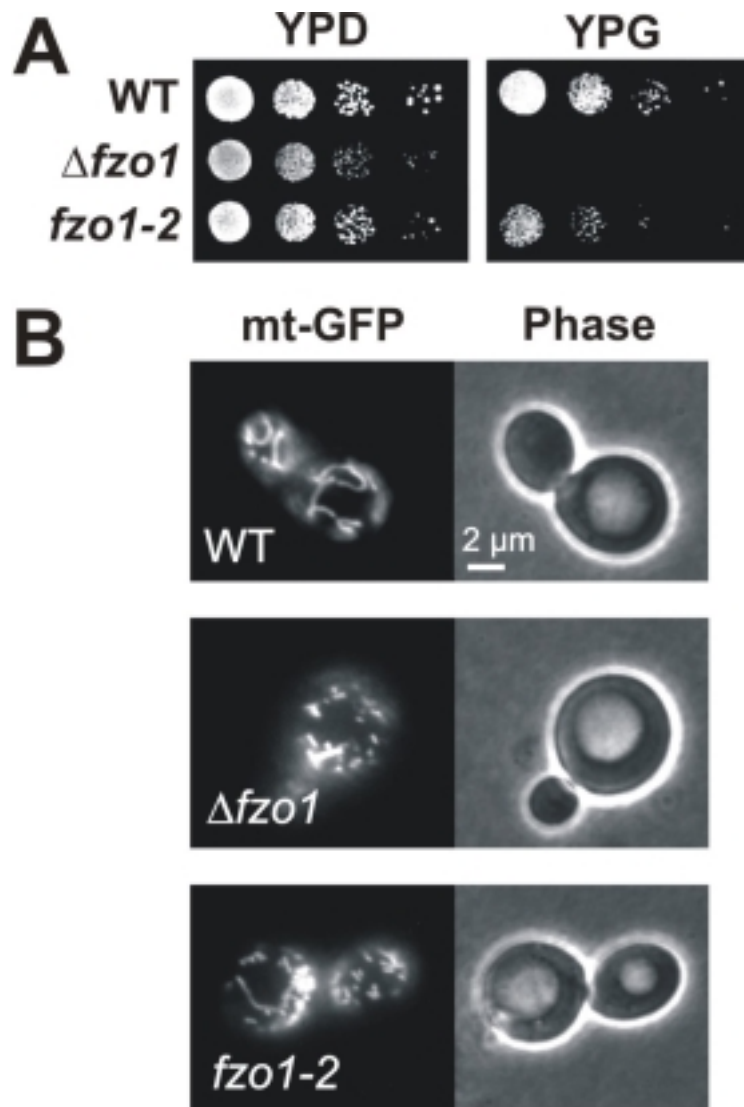
Zusammenfassend machen diese Ergebnisse deutlich, dass die Funktion von Fzo1 durch Insertion eines Verbindungssegments in den Intermembranraumbereich beeinträchtigt wird. Dieser Proteinbereich scheint für eine Interaktion mit der Innenmembran wichtig zu sein. Daher kann der beobachtete Phänotyp der Mutante dem Fehlen einer solchen Interaktion zugeschrieben werden. Die Koppelung der beiden mitochondrialen Membranen, die über die Fusionsmaschinerie vermittelt wird, ist vermutlich ein kritischer Faktor für die Fusion der mitochondrialen Membranen.

Hefestamm	Mitochondriale Form (% Zellen)			
	WT-ähnlich	Wenige Schläuche	Fragmentiert	Aggregiert
<i>WT</i>	90	4	4	2
$\Delta fzo1$	0	0	9	91
<i>fzo1-2</i>	0	21	22	57
<i>fzo1-2</i> [2 $\mu$ ]	0	15	27	58
<i>fzo1-2</i> [2 $\mu$ ] <i>FZO1</i>	64	13	18	5

n = 100

**Tabelle 2: Quantifizierung der mitochondrialen Form von *fzo1*-Mutanten.**

Folgende Stämme wurden in SD-Medium kultiviert: WT (YBW89),  $\Delta fzo1$  (YBW113), *fzo1-2* (YBW110), ein Fzo1-2-überexprimierender Hefestamm (*fzo1-2*[2 $\mu$ ]; YBW183) und ein Fzo1-2-überexprimierender Hefestamm mit dem *FZO1*-Gen auf einem Einzelkopie-Plasmid (*fzo1-2*[2 $\mu$ ]*FZO1*; YBW210). 100 Zellen (n = 100) wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht und in folgende phänotypischen Klassen gruppiert: WT-ähnlich (mitochondriales Retikulum unter der Zelloberfläche), einige Schläuche (fragmentierte Mitochondrien mit vereinzelt tubulären Strukturen), aggregiert (Anhäufung fragmentierter Mitochondrien) und fragmentiert (gleichmäßig verteilte fragmentierte Mitochondrien).



**Abbildung 13: Mutation des Intermembranraumsegments beeinträchtigt die Funktion von Fzo1.**

(A) Wachstumsphänotyp der *fzo1-2*-Mutante. Die *fzo1-2*-Mutante, die  $\Delta fzo1$ -Mutante und der isogene WT-Hefestamm wurden über Nacht in flüssigem SD-Medium bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Von diesen Kulturen wurden 10-fache Verdünnungsstufen auf YPD- und YPG-Platten übertragen, die dann für drei Tage (YPD) bzw. für vier Tage (YPG) bei 30°C inkubiert wurden.

(B) Mitochondriale Form der *fzo1-2*-Mutante. Die *fzo1-2*-Mutante, die  $\Delta fzo1$ -Mutante und der isogene WT-Hefestamm, die mtGFP exprimieren, wurden über Nacht in flüssigem SGal-Medium kultiviert. Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Im linken Teil der Abbildung ist die mitochondriale Form einer repräsentativen Zelle gezeigt; im rechten Teil ist die entsprechende Phasenkontrastaufnahme gezeigt.

### 3.1.4 Wechselwirkung von benachbarten Fzo1-Proteinen

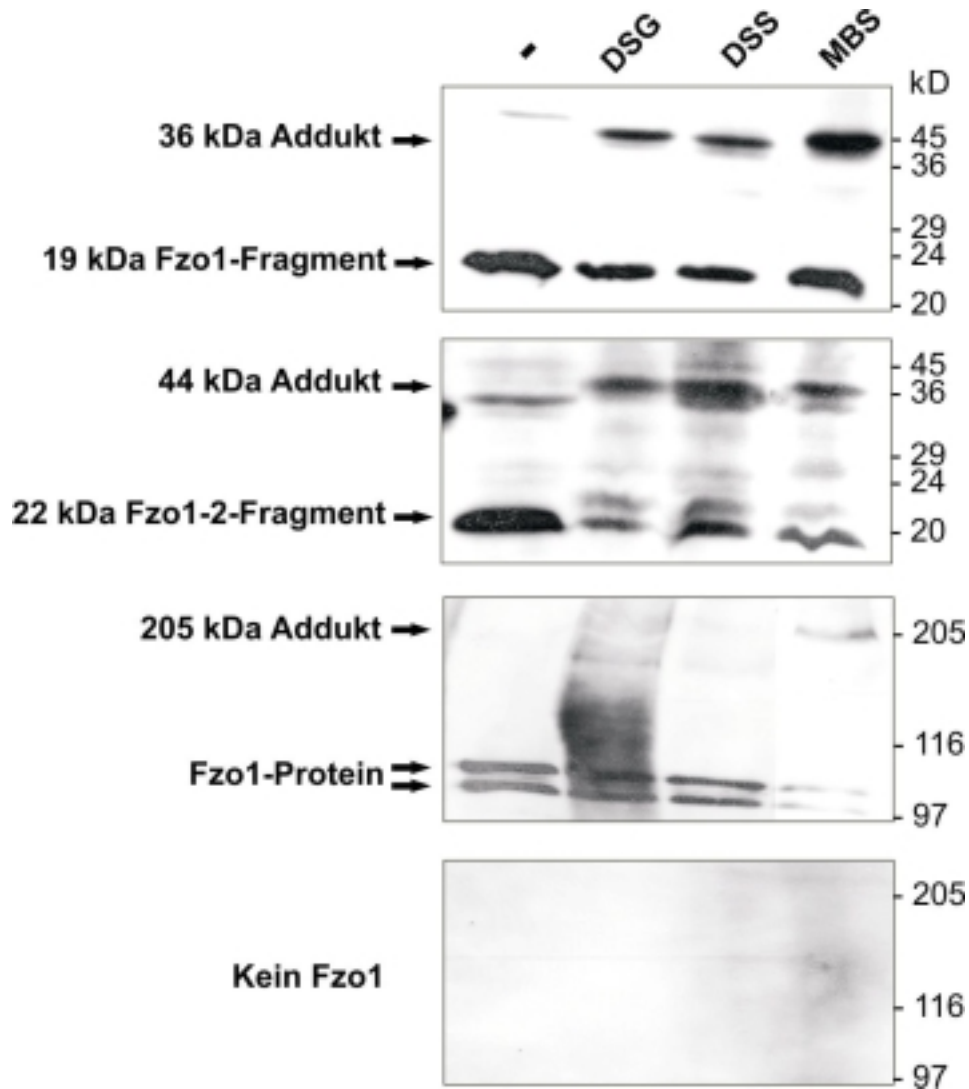
Der Fzo1-Proteinkomplex, der vermutlich den Fusionsapparat der mitochondrialen Außenmembran darstellt, hat ein Molekulargewicht von 800 kDa (Rapaport *et al.*, 1998). Bisher gibt es keine Hinweise auf die Zusammensetzung dieses Komplexes. Die Untersuchungen der vorliegenden Studie führten zu der Vermutung, dass es einen unbekanntem Interaktionspartner in der Innenmembran gibt. Neben Interaktionen mit unbekanntem Proteinen ist auch eine Assemblierung von Fzo1-Proteinen zu einem Homooligomer denkbar. Es sollte untersucht werden, ob Fzo1 über sein Intermembranraumsegment oder über hydrophobe Bereiche am C-Terminus mit unbekanntem Komponenten bzw. mit benachbarten Fzo1-Proteinen in Wechselwirkung tritt. Zu diesem Zweck wurden Quervernetzungsexperimente durchgeführt. Eine Quervernetzung könnte zum Beispiel über die drei Lysinreste im Intermembranraumsegment von Fzo1 stattfinden. Auch im cytosolischen Bereich des C-Terminus befinden sich mehrere Lysinreste sowie ein Cysteinrest. Im cytosolischen Teil des N-Terminus befinden sich vier Cysteinreste und mehrere Lysinreste. Als chemische Quervernetzer dienen DSG (Disuccinimidylglutarat), MBS (m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester) und DSS (Disuccinimidylsuberat). DSG und DSS erlauben eine kovalente Quervernetzung benachbarter Proteine über Lysinreste, MBS eine Quervernetzung über Lysin- und Cysteinreste.

Es wurden Mitochondrien aus den Stämmen YBW114 (*FZO1*), YBW183 (*fzo1-2*) und YBW113 ( $\Delta$ *fzo1*) isoliert. Mitochondrien, die das Fzo1- oder Fzo1-2-Protein enthielten, wurden mit PK behandelt, um das 19 kDa Fzo1-Fragment und das entsprechende Fzo1-2-Fragment zu generieren. Die Mitochondrien wurden in SEM-Puffer gewaschen, mit den jeweiligen Quervernetzern inkubiert und danach durch Zentrifugation reisoliert. Die Addukte wurden mittels Immundekoration mit anti-Fzo1-C analysiert. Die Verwendung von DSS, DSG

und MBS führte zu einem Addukt von 36 kDa. Dieses Produkt trat bei MBS mit hoher Effizienz auf, wenn *FZO1*-Mitochondrien verwendet wurden (Abbildung 14). Die Verwendung von *fzo1-2*-Mitochondrien führte zu einem Quervernetzungsaddukt von 44 kDa. Die Größe der Addukte entspricht einer Dimerisierung der Fzo1- bzw. Fzo1-2-Fragmente.

In einem zweiten Ansatz wurden *FZO1*-Mitochondrien direkt mit den Quervernetzern inkubiert, um das intakte Fzo1-Protein zu untersuchen. Als Kontrolle dienten  $\Delta fzo1$ -Mitochondrien. Mit MBS wurde ein Addukt von ca. 200 kDa beobachtet (Abbildung 14), das nicht bei den  $\Delta fzo1$ -Mitochondrien auftrat. Dieses Ergebnis deutet auf eine kovalente Quervernetzung zwischen zwei benachbarten Fzo1-Molekülen hin.

Fzo1 ist also wahrscheinlich mit anderen Fzo1-Molekülen assoziiert. Die N-terminale GTPase-Domäne ist dafür nicht erforderlich, da auch die C-terminalen Fzo1-Fragmente miteinander assoziieren. Auch das Intermembranraumsegment ist nicht entscheidend für die Assoziation, da auch Fzo1-2-Fragmente quervernetzt werden konnten. Die Wechselwirkung der Fzo1-Moleküle wird vermutlich über spezifische Bereiche am C-Terminus vermittelt.



**Abbildung 14: Fzo1 bildet Quervernetzungsaddukte.**

Quervernetzungsexperiment mit PK-behandelten *FZO1*-Mitochondrien (oberer Immunoblot der Abbildung) und *fzo1-2*-Mitochondrien (zweiter Immunoblot der Abbildung). Mitochondrien wurden mit PK (2  $\mu\text{g/ml}$  Endkonzentration) behandelt. Danach wurden die Mitochondrien zweimal mit SEM-Puffer (mit 0,3 mM PMSF) gewaschen. Die Mitochondrien wurden in SEM-Puffer (mit 0,3 mM PMSF) aufgenommen und nach Zugabe von 0,25  $\mu\text{M}$  der angegebenen Quervernetzer wie in Abschnitt 2.4.8 beschrieben behandelt und über SDS-PAGE und Immundekoration analysiert. Fzo1-Addukte sind durch einen schwarzen Pfeil angezeigt.

Im dritten Immunoblot ist ein Quervernetzungsexperiment mit *FZO1*-Mitochondrien dargestellt. Mitochondrien wurden in SEM-Puffer resuspendiert und wie oben beschrieben mit Quervernetzern behandelt und analysiert.

Als Kontrolle diente ein Quervernetzungsexperiment mit  $\Delta fzo1$ -Mitochondrien, in dem kein Fzo1-Signal detektiert wurde (unterer Immunoblot).

## 3.2 Mdm30 reguliert die Fusionsaktivität der Mitochondrien

### 3.2.1 Identifizierung neuer *mdm*-Mutanten

*MDM*-Gene kodieren für Proteine, die für eine WT-ähnliche Verteilung und Form der Mitochondrien benötigt werden. Neben *FZO1* gibt es eine Reihe weiterer *MDM*-Gene, für die eine Bedeutung bei der Dynamik der Mitochondrien gezeigt wurde (siehe Abbildung 2). Es sollten weitere Gene identifiziert werden, die wie *FZO1* für die mitochondriale Formgebung nötig sind. Zu diesem Zweck wurde eine Sammlung von Deletionsmutanten nicht-essentieller Hefegene analysiert (Giaever *et al.*, 2002; Winzeler *et al.*, 1999). Es wurde nach Deletionsmutanten gesucht, die eine veränderte Mitochondrienstruktur aufweisen.

Um die Hefebibliothek zu analysieren, wurden die Deletionsmutanten mit einem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff angefärbt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden Mutanten mit ungewöhnlicher Mitochondrienform identifiziert (Tabelle 3; Dimmer *et al.*, 2002). Als Kontrolle diente der isogene WT-Hefestamm.

Die neuen Mutanten wurden in drei Klassen eingeteilt. Gene der Klasse I kodieren für Proteine, die für die Bildung der mitochondrialen WT-Form essentiell sind. Bei diesen Mutanten wurden keinerlei WT-Mitochondrien beobachtet. Mitochondrien der Klasse II und III sind meistens fragmentiert oder aggregiert. Allerdings zeigten einige Zellen dieser Mutanten auch eine WT-ähnliche Form. Diese Gene sind demnach für die Ausbildung der normalen mitochondrialen Struktur wichtig, aber nicht essentiell.

Mutanten der Klasse II sind atmungsdefizient. Zu dieser Klasse gehören auch Stämme, deren mitochondriale Form nur unter bestimmten Bedingungen verändert ist, wie zum Beispiel die Hefemutante  $\Delta mdm20$ . Diese cytoplasmatische Komponente stabilisiert das Aktincytoskelett und ist daher



auch für den Transport bzw. die Vererbung von Mitochondrien relevant (Hermann und Shaw, 1998; Yaffe, 1999b). Zur Klasse II gehören außerdem Gene, die in der Biosynthese von Ergosterol involviert sind, wie zum Beispiel *ERG24* und *ERG28* (Lorenz und Parks, 1992; Gachotte *et al.*, 2001). Wie Untersuchungen der Vererbung von Vakuolen zeigten, spielt Ergosterol eine Rolle bei der Membranfusion (Kato und Wickner, 2001).

Mutanten der Klasse III zeigen neben einem Defekt der mitochondrialen Form einen *petite*-Phänotyp. *Petite*-Stämme haben häufig eine veränderte Innenmembranstruktur, die sich im Verlust ihrer Cristae äußert (Pon und Schatz, 1991). Da die mitochondriale Morphogenese in direktem Zusammenhang mit der Verbindung zwischen Außen- und Innenmembran steht (siehe 3.1; Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Fritz *et al.*, 2001), ist es vorstellbar, dass sich Veränderungen der Innenmembranstruktur auf die Gesamtstruktur des Organells auswirken.

Es wurde eine Reihe von Genen identifiziert, wie beispielsweise *MBPI* (Koch *et al.*, 1993), die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Diese beeinflussen die Expression von mehreren Genen. Vermutlich befindet sich darunter ein Gen, das für die Morphogenese der Mitochondrien benötigt wird. Diese Annahme würde die beobachteten Phänotypen erklären.

Zur Klasse I gehören Gene, wie etwa *FZO1* (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998), die für bekannte Komponenten der mitochondrialen Form kodieren. Darüberhinaus wurden einige bisher uncharakterisierte Gene identifiziert, die für die Ausbildung der mitochondrialen Form essentiell sind. Die beiden Komponenten Mdm30 und Mdm36 besitzen keine typischen mitochondrialen Präsequenzen oder Transmembrandomänen. Die Mitochondrien der  $\Delta$ *mdm36*-Deletionsmutante befinden sich auf einer Seite der Zelle (Abbildung 15C), ähnlich wie bei den *dnm1*-Mutanten (Otsuga *et al.*, 1998). Es ist noch unklar, ob es sich wie bei *dnm1* um einen Teilungsdefekt handelt.

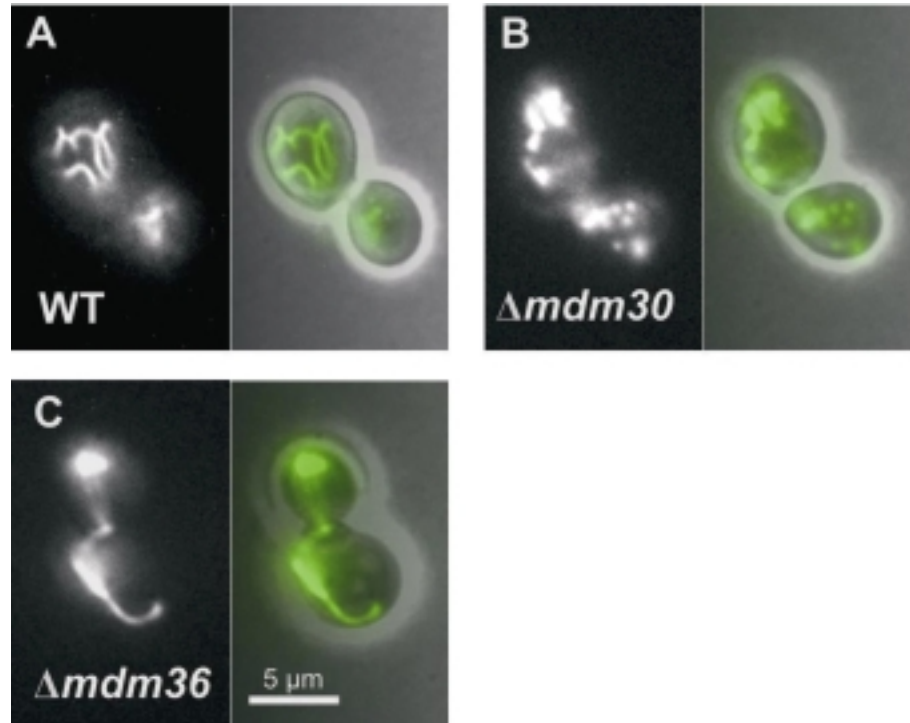
Die Mitochondrien der  $\Delta mdm30$ -Mutante sind fragmentiert und aggregiert. Nur wenige verkürzte Schläuche wurden beobachtet (Abbildung 15B).

*MDM30* kodiert für ein Protein mit 598 Aminosäureresten (ca. 70 kDa) mit unbekannter Funktion. Im Hefe Two-Hybrid System interagierte Mdm30 mit Cdc53 (Cullin) und Skp1 (Uetz *et al.*, 2000). Diese beiden Komponenten bilden gemeinsam mit einem F-Box-Protein einen SCF-Komplex (Skp1-Cdc53-F-Box), der eine Ubiquitinierung und damit eine gesteuerte Proteolyse der Substratproteine induziert (Skowyra *et al.*, 1997). Mdm30 besitzt ein F-Box-Motiv am N-Terminus und gehört demnach zur Gruppe der F-Box-Proteine, deren Funktion die Bindung von Substratproteinen an den SCF-Komplex ist (Patton *et al.*, 1998). Die meisten F-Box-Proteine wurden im Zellkern oder im Cytoplasma gefunden (Cenciarelli *et al.*, 1999; Winston *et al.*, 1999). Mdm30-, das mit einem HA-Epitop fusioniert ist, kann im Cytoplasma und mit Mitochondrien assoziiert nachgewiesen werden (Fritz *et al.*, 2003). Der Effekt der  $\Delta mdm30$ -Mutation ist spezifisch für Mitochondrien, da die Form anderer Organellen nicht betroffen ist (N. Weinbach, persönliche Mitteilung; Fritz *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung der zellbiologischen Funktion von Mdm30 weitergeführt.

Systematische/gängige Bezeichnung des Gens	Klasse	Funktion des Proteins
<i>YBR179C/FZO1</i>	I	Fusion von Mitochondrien
<i>YLR368W/MDM30</i>	I	Fusion von Mitochondrien (diese Studie)
<i>YPR083W/MDM36</i>	I	Unbekanntes Protein
<i>YER044C/ERG28</i>	II	Synthese von Ergosterol
<i>YNL280C/ERG24</i>	II	Sterolreduktase
<i>YOL076W/MDM20</i>	II	Motilität und Vererbung von Mitochondrien und Organisation von Aktin
<i>YDL056W/MBP1</i>	III	Transkriptionsfaktor

**Tabelle 3: Bei der Untersuchung der Hefebibliothek identifizierte Gene, die wichtig für eine normale mitochondriale Form und Vererbung sind.**

Die hier aufgeführten Gene wurden im Rahmen der vorliegenden Studie neu identifiziert, bzw. wiedergefunden. Die vollständige Liste mit allen Mutanten befindet sich in Dimmer *et al.*, 2002. Insgesamt wurden zehn neue *MDM*-Gene identifiziert. Die Mutanten sind in die im Text beschriebenen Klassen eingeteilt. Es ist eine kurze Beschreibung der Funktion des Proteins aufgeführt. Die dazugehörigen Referenzen sind im Text angegeben.



**Abbildung 15: Mitochondriale Form der neu identifizierten *mdm*-Mutanten  $\Delta mdm30$  und  $\Delta mdm36$ .**

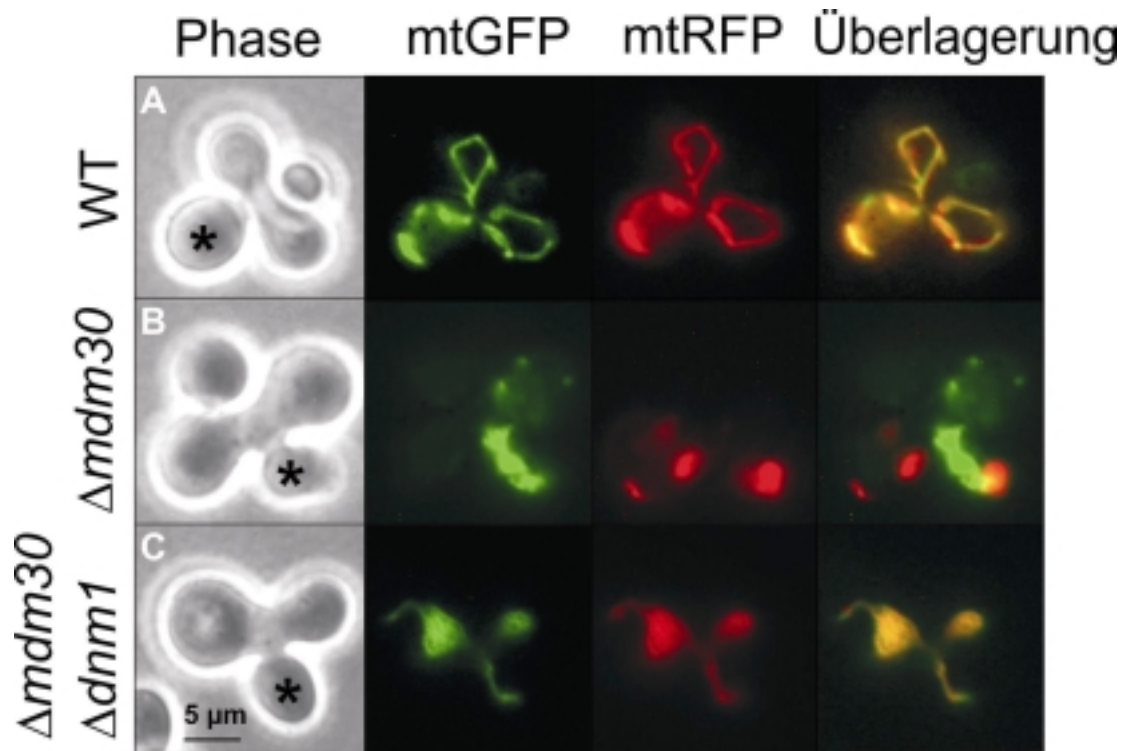
Stämme, die mtGFP exprimieren, wurden in YPD-Medium bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Links ist die mitochondriale Struktur abgebildet; rechts eine Überlagerung mit der zugehörigen Phasenkontrastaufnahme. Beschreibung von (B) und (C) im Text. Als Vergleich ist in (A) der entsprechende WT dargestellt.

### 3.2.2 Mdm30 wird für die Fusion der Mitochondrien benötigt

Fragmentierte und aggregierte Mitochondrien sind häufig ein Hinweis auf einen Defekt der Fusion der Organellen. Daher wurde zunächst getestet, ob die Fusionsfähigkeit der  $\Delta mdm30$ -Mitochondrien beeinträchtigt ist.

Für den Test der mitochondrialen Fusion *in vivo* (Nunnari *et al.*, 1997) wurden die Stämme  $\Delta mdm30$ -GFP und  $\Delta mdm30$ -RFP miteinander gepaart und im Fluoreszenzmikroskop analysiert (das Prinzip dieses Tests ist in Abbildung 2 dargestellt). Als Positivkontrolle diente ein WT-Hefestamm. In WT-Zellen war eine effiziente Durchmischung der Markerproteine in der Matrix und damit mitochondriale Fusion zu beobachten (Abbildung 16A). Im Gegensatz dazu war in den  $\Delta mdm30$ -Zygoten keine Fusionsaktivität nachzuweisen (Abbildung 16B). Es wurde selbst dann keine Fusion beobachtet, wenn die Organellen dicht beieinander lagen. Diese Daten deuten darauf hin, dass Mdm30 eine Rolle bei der Fusion der Mitochondrien spielt.

*FZO1* ist essentiell für die Fusion der Mitochondrien. So wird auch in Abwesenheit von Dnm1, das antagonistisch zu Fzo1 wirkt, die Fusionsfähigkeit in  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ -Zellen nicht wieder hergestellt (Bleazard *et al.*, 1999). Um zu prüfen, ob auch Mdm30 essentiell für die Fusion ist, wurde die mitochondriale Fusion während der Paarung von  $\Delta mdm30/\Delta dnm1$ -Doppelmutanten untersucht. Interessanterweise konnte in  $\Delta mdm30/\Delta dnm1$ -Zellen Fusionsaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 16C). Mdm30 wird also nicht für die Fusion benötigt, wenn das *DNM1*-Gen deletiert ist. Demnach ist Mdm30 nur indirekt an der Fusion der Organellen beteiligt.



**Abbildung 16: Mdm30 ist indirekt an der Membranfusion beteiligt.**

*In vivo*-Nachweis der Fusion von Mitochondrien. Zellen mit entgegengesetzten Paarungstypen waren mit mtRFP bzw. mtGFP markiert. Nach der Paarung wurden die Zygoten im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Links ist die Phasenkontrastaufnahme gezeigt. Die Knospen der reifen Zygoten sind mit einem Stern (\*) angezeigt. Beschreibung im Text.

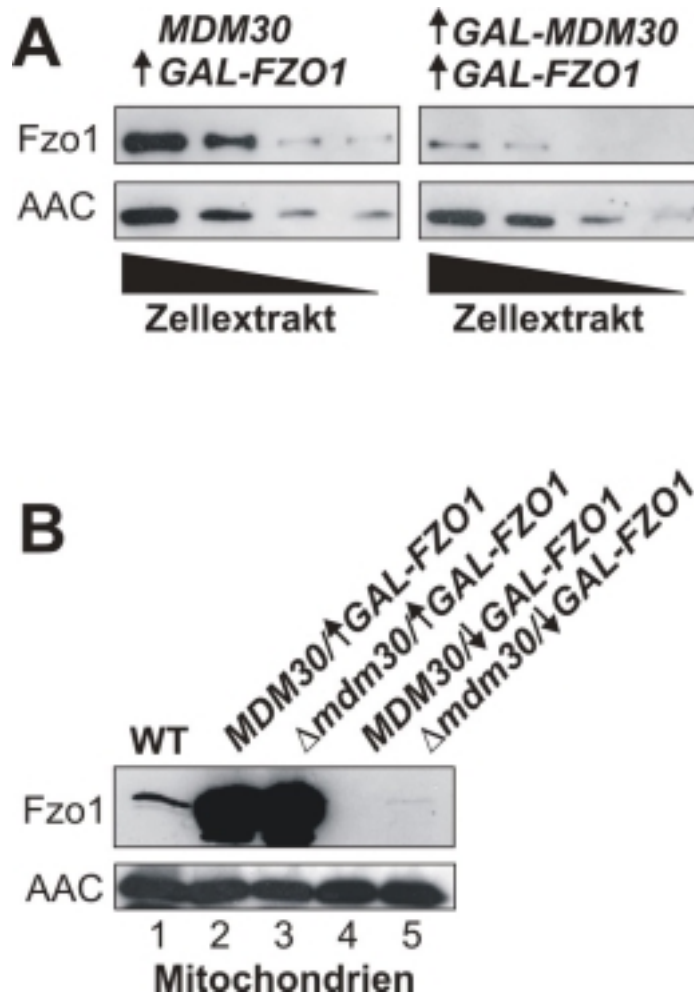
### 3.2.3 Mdm30 reguliert die Fzo1-Proteinmenge

Da Mdm30 kein integraler Bestandteil der Fusionsmaschinerie ist (3.2.2), liegt die Vermutung nahe, dass es eine regulatorische Funktion ausübt und über einen oder mehrere Interaktionspartner auf die Fusion der Mitochondrien einwirkt. Interessanterweise ist die Fzo1-Proteinmenge in  $\Delta mdm30$ -Zellen ungefähr zehnmal höher als in den entsprechenden WT-Zellen (N. Weinbach, persönliche Mitteilung; Fritz *et al.*, 2003). Die Menge der Mdm-Proteine Dnm1, Mdv1, Fis1, Mgm1, Ugo1 sowie der Kontrollproteine Porin und AAC ist hingegen unverändert. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass Mdm30 die Fzo1-Proteinmenge beeinflusst, und dass keine Komponenten der Teilungsmaschinerie betroffen sind.

Der Einfluss von Mdm30 auf die Fzo1-Proteinmenge sollte näher untersucht werden. Dazu wurde getestet, ob die Fzo1-Proteinmenge auch dann von Mdm30 beeinflusst wird, wenn Fzo1 über einen heterologen Promotor überexprimiert wird. Es wurde der Hefestamm *MDM30/GAL-FZO1* konstruiert, in dem Fzo1 über einen chromosomal inserierten GAL-Promotor exprimiert wird. Dieser Hefestamm wurde mit dem Plasmid *pYES2-MDM30* (N. Weinbach) transformiert (Hefestamm *GAL-MDM30/GAL-FZO1*), um auch Mdm30 über einen GAL-Promotor überexprimieren zu können. Die Expression der GAL-regulierten Gene erfolgte durch Wachstum in Galaktose-haltigem Flüssigmedium über Nacht. Es wurden logarithmisch wachsende Zellen geerntet und Zellextrakte präpariert, die mittels Immundekoration analysiert wurden (Abbildung 17A). Der Hefestamm, der gleichzeitig Fzo1 und Mdm30 überexprimierte, zeigte eine 5-fach erniedrigte Fzo1-Proteinmenge im Vergleich zu dem Hefestamm, der nur Fzo1 überexprimierte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mdm30 eine Rolle bei der Regulation der Fzo1-Proteinmenge spielt.

Um die relative Fzo1-Proteinmenge in den Hefestämmen *MDM30/GAL-FZO1* und  $\Delta$ *mdm30/GAL-FZO1* abzuschätzen, wurden Mitochondrien aus induzierten und reprimierten Kulturen isoliert und über Immundekoration analysiert (Abbildung 17B). Infolge der Induktion des GAL-Promotors kam es zur Fzo1-Überexpression (Abbildung 17B; Spur 2 und 3), die auch in Gesamtzellextrakten nachgewiesen wurde (nicht gezeigt). Ein möglicher Einfluss von Mdm30 auf Fzo1 ist in diesem Fall zu vernachlässigen, da Mdm30 in den hier verwendeten Hefestämmen über seinen endogenen Promotor exprimiert wird und daher in wesentlich geringeren Mengen als Fzo1 vorliegt. Im Gegensatz dazu führte die Repression des GAL-Promotors in Glukosehaltigen Medium YPD zu einer sehr geringen Fzo1-Proteinmenge. In Mitochondrien von *MDM30/GAL-FZO1*-Zellen, die das *MDM30*-WT-Allel besitzen, wurde in diesem Medium kein Fzo1 nachgewiesen (Abbildung 17B; Spur 4). In Mitochondrien von  $\Delta$ *mdm30/GAL-FZO1*-Zellen, die das  $\Delta$ *mdm30*-Allel besitzen, wurde eine basale Fzo1-Expression beobachtet (Abbildung 17B; Spur 5). Dies könnte darauf hinweisen, dass Fzo1 in  $\Delta$ *mdm30*-Zellen einen stabilisierten Zustand einnimmt.





**Abbildung 17: Nachweis der Fzo1-Expression in *MDM30/GAL-FZO1*, *Δmdm30/GAL-FZO1* und *GAL-MDM30/GAL-FZO1*-Stämmen.**

(A) Mdm30 beeinflusst die Fzo1-Proteinmenge. Zellen von YBW339 (*MDM30/GAL-FZO1*) und YBW342 (*GAL-MDM30/GAL-FZO1*) wurden einige Tage in SD-Medium kultiviert. Dann wurde über Nacht in SGal-Medium induziert. Dabei befanden sich die Zellen immer in der logarithmischen Wachstumsphase. Das Gesamtzellprotein wurde aus den Zellen extrahiert und in 2-fachen Verdünnungsstufen auf die SDS-Gele geladen. Die Menge an mitochondrialem Protein wurde durch Dekoration gegen AAC kontrolliert.

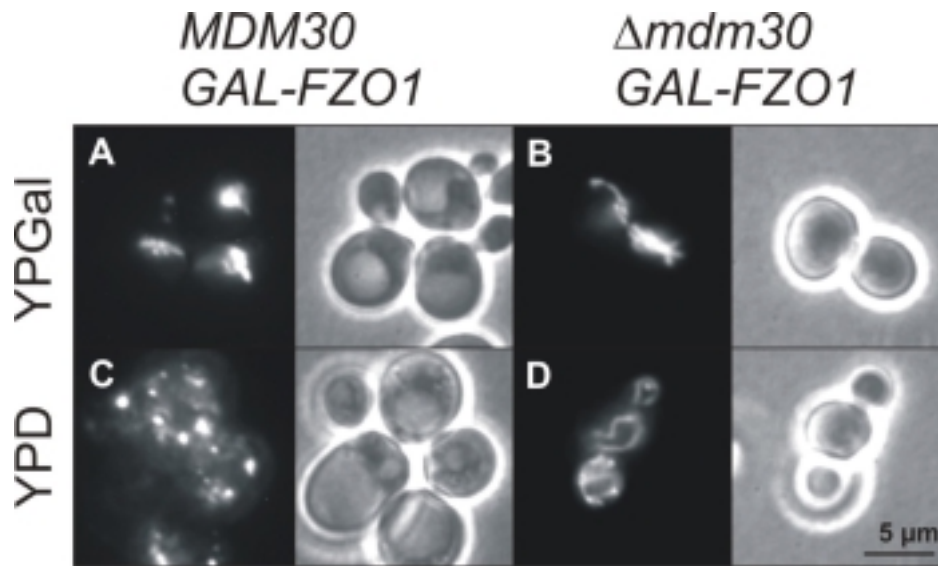
(B) Galaktose-induzierte Überexpression von Fzo1. Isolierte Mitochondrien (je 100 µg Protein) von YBW339 (*MDM30/GAL-FZO1*) und YBW321 (*Δmdm30/GAL-FZO1*), die in YPD (Spur 4 und 5) bzw. YPGal (Spur 2 und 3) kultiviert wurden. Die Stämme wurden bei 30°C in flüssigem YPD-Medium bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Ein Teil der Kulturen wurde über Nacht in YPGal kultiviert, um den GAL-Promotor zu induzieren. Die Expression von Fzo1 wurde über Immundekoration mit anti-Fzo1-C nachgewiesen. Als Vergleich dienten isolierte Mitochondrien aus dem Hefestamm D273-10B (Spur 1). Die Proteinmenge wurde durch Immundekoration gegen AAC kontrolliert.

### 3.2.4 Die Rolle von *MDM30* und *FZO1* bei der Aggregation von Mitochondrien

Die Deletion des *MDM30*-Gens führt zu einer erhöhten Fzo1-Proteinmenge und zur Aggregation der Mitochondrien. Es wurde getestet, ob die GAL-regulierte Überexpression von Fzo1 ähnliche Auswirkungen auf die mitochondriale Form hat.

Durch Induktion des GAL-Promotors kommt es sowohl in *MDM30/GAL-FZO1*-Zellen als auch in  $\Delta$ *mdm30/GAL-FZO1*-Zellen zur Aggregation der Mitochondrien (Abbildung 18A und B; Tabelle 4). Die Aggregation wurde auch beobachtet, wenn neben Fzo1 auch Mdm30 durch GAL-Induktion in *GAL-MDM30/GAL-FZO1*-Zellen überexprimiert wurde (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aggregation der Mitochondrien bei starker Fzo1-Überexpression von Mdm30 unabhängig ist.

Wenn die GAL-regulierte Fzo1-Expression reprimiert wird, werden in *MDM30/GAL-FZO1*-Zellen fragmentierte Organellen beobachtet (Abbildung 18C; Tabelle 4), was den  $\Delta$ *fzo1*-Phänotyp widerspiegelt (vergleiche Abbildung 12B). Dies stimmt überein mit dem Fehlen eines Fzo1-Signals im Westernblot unter diesen Bedingungen (Abbildung 18B, Spur 4). In  $\Delta$ *mdm30/GAL-FZO1*-Zellen hingegen wird das mitochondriale Retikulum teilweise wiederhergestellt (Abbildung 18D; Tabelle 4). Unter diesen Bedingungen konnte eine geringe Fzo1-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 18B, Spur 5), welche vermutlich ausreicht, um der mitochondrialen Teilung entgegenzuwirken und die schlauchförmige Mitochondrienform aufrechtzuerhalten.



**Abbildung 18: Mitochondriale Form in *MDM30*- und  $\Delta$ *mdm30*-Zellen, deren *Fzo1*-Expression über einen GAL-Promotor kontrolliert wird.**

Die *Fzo1*-Überexpression führt zur Aggregation der Mitochondrien. Die Stämme wurden bei 30°C in flüssigem YPD-Medium bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Ein Teil der Kulturen wurde über Nacht in YPGal kultiviert, um den GAL-Promotor zu induzieren. Die Organellen waren mit mtGFP angefärbt. Somit konnte die Form über Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden (A bis D). Rechts befindet sich jeweils die zugehörige Phasenkontrastaufnahme. Quantifizierung siehe Tabelle 4.

Hefestamm	Medium	Mitochondriale Form (% Zellen)		
		Einige Schläuche	Fragmentiert	Aggregiert
<i>MDM30/GAL-FZO1</i>	YPGal	0	2	98
$\Delta$ <i>mdm30/GAL-FZO1</i>	YPGal	6	1	93
<i>MDM30/GAL-FZO1</i>	YPD	0	96	4
$\Delta$ <i>mdm30/GAL-FZO1</i>	YPD	22	10	68

n = 100 Zellen

**Tabelle 4: Statistische Erfassung der mitochondrialen Phänotypen in *MDM30/GAL-FZO1* und  $\Delta$ *mdm30/GAL-FZO1*-Stämmen.**

Quantifizierung der Mitochondrienform der in Abbildung 18A und 17 verwendeten Zellen. Beschreibung im Text.

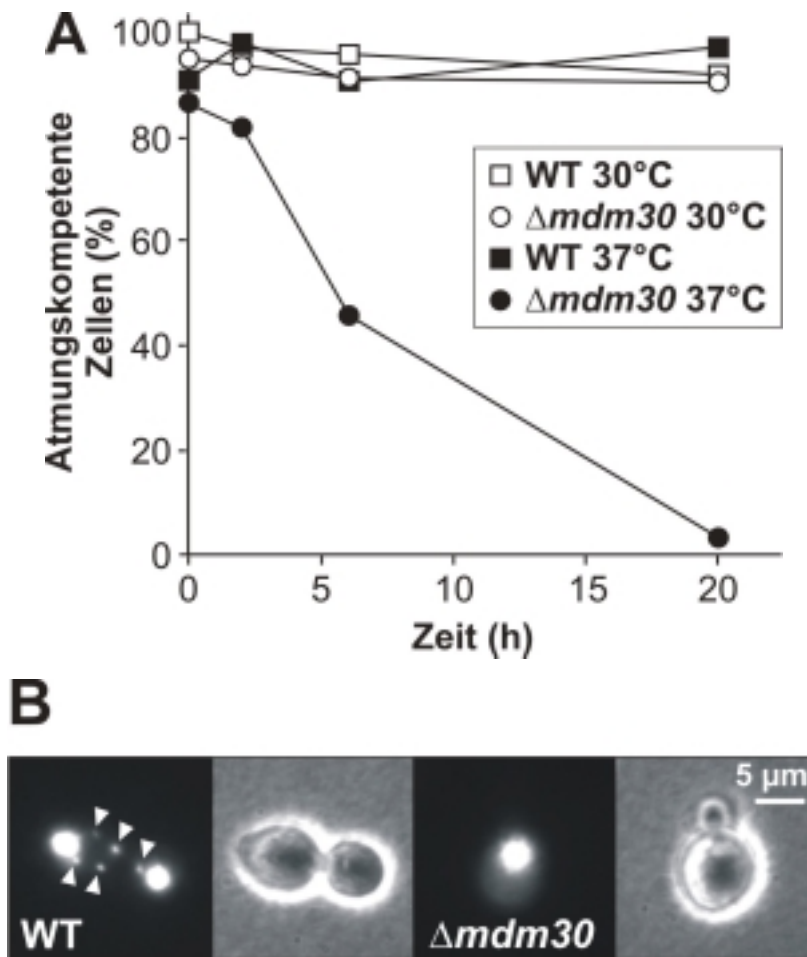
### 3.2.5 $\Delta mdm30$ -Mutanten verlieren bei 37°C ihre mtDNA

$\Delta mdm30$ -Hefekulturen zeigten bei 37°C auf YPG im Vergleich zum WT ein stark verringertes Wachstum (N. Weinbach, persönliche Mitteilung; Fritz *et al.* 2003). Möglicherweise sind also mitochondriale Funktionen des Mutantenstamms *in vivo* beeinträchtigt. Diese Beobachtung sollte näher untersucht werden.

Zunächst wurde die Kinetik des temperaturabhängigen Verlusts der mitochondrialen Funktion getestet. WT- und  $\Delta mdm30$ -Zellen wurden in YPD-Medium bei unterschiedlichen Temperaturen (30°C und 37°C) kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen entnommen und auf YPD ausplattiert und nach etwa einem Tag auf YPG überstempelt. Es wurde der Prozentsatz der Kolonien ermittelt, die auf diesem Medium wachsen konnten (Abbildung 19A). Dieser Betrag gibt die Anzahl der Zellen wieder, die ihre mitochondrialen Funktionen in der Flüssigkultur aufrechterhalten konnten. Beinahe 100 % der Zellen, die bei 30°C kultiviert wurden, waren auch nach 20 h noch atmungskompetent. Jedoch weniger als 10 % der Zellen, die 20 h bei 37°C kultiviert wurden, waren in der Lage, auf YPG zu wachsen. Diese Zellen scheinen im Verlauf der Inkubation bei 37°C ihre mitochondrialen Funktionen zu verlieren.

Es wurde vermutet, dass die  $\Delta mdm30$ -Zellen bei 37°C ihre mtDNA verlieren und somit nicht mehr auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen können. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die mtDNA der Zellen, die 20 h bei 37°C in YPD kultiviert worden waren, mit dem DNA-spezifischen Farbstoff DAPI angefärbt. WT-Zellen zeigten typische mtDNA-Nukleotide (Abbildung 19B). Im Gegensatz dazu zeigten die  $\Delta mdm30$ -Zellen nur wenig bzw. keine mtDNA. Diese Ergebnisse belegen, dass Mdm30 für die Beibehaltung der mtDNA bei erhöhten Temperaturen benötigt wird.

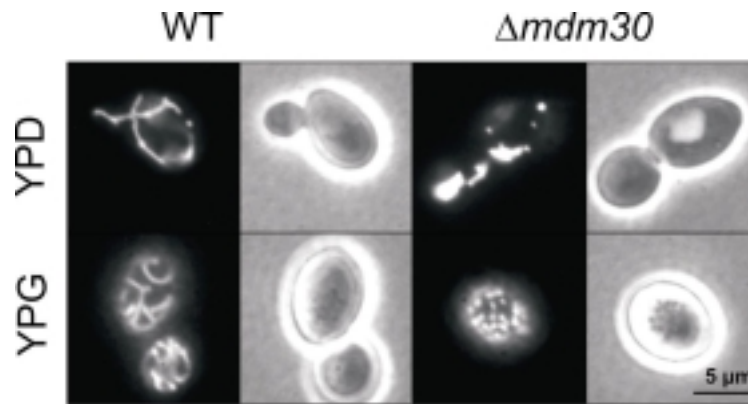
Der Verlust der mtDNA bei 37°C könnte auf Änderungen der mitochondrialen Form beruhen. Daher wurde die Form der Mitochondrien der eingesetzten Stämme überprüft. WT- und  $\Delta mdm30$ -Zellen wurden sowohl in YPD als auch in YPG bei 30°C und 37°C über Nacht kultiviert. Mitochondrien waren mit mtGFP angefärbt und wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 20). Mitochondrien von WT-Zellen, die in der nichtfermentierbaren Kohlenstoffquelle (YPG) kultiviert wurden, waren etwas stärker verzweigt als in YPD, denn die Form von WT-Mitochondrien passt sich der entsprechenden Kohlenstoffquelle an (siehe auch Egner *et al.*, 2002). Wie erwartet waren die Mitochondrien der  $\Delta mdm30$ -Zellen, die in YPD kultiviert wurden, aggregiert und fragmentiert. Es zeigte sich aber, dass die Mitochondrien der  $\Delta mdm30$ -Zellen, die in YPG kultiviert wurden, extrem fragmentiert und gleichmäßig über die Zelle verteilt waren. Die beobachteten Phänotypen waren bei 30°C und 37°C identisch. Die Untersuchung der mitochondrialen Form lieferte also keine Erklärung dafür, warum die  $\Delta mdm30$ -Zellen ihre mtDNA bei 37°C verlieren. Jedoch liefern diese Ergebnisse einen weiteren Hinweis darauf, dass Mdm30 essentiell für die Aufrechterhaltung der WT-Form ist. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass sich die  $\Delta mdm30$ -Mitochondrien einer Veränderung der Kohlenstoffquelle anpassen können.



**Abbildung 19: Die Deletion von *MDM30* führt zum Verlust der mtDNA.**

(A) Atmungskompetenz der  $\Delta mdm30$ -Zellen. WT- und  $\Delta mdm30$ -Zellen wurden auf einer YPG-Platte ausplattiert, so dass nur Zellen wachsen konnten, die mtDNA besitzen. Dann wurden die Zellen bei verschiedenen Temperaturen in flüssigem YPD-Medium kultiviert, um den Verlust der mtDNA zu erlauben. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils 0,2 ml Zellkultur OD<sub>578</sub> 0,2 auf die erste YPD-Platte übertragen. Die Anzahl der Kolonien auf der ersten YPD-Platte wurde gleich 100 % gesetzt. Nach dem Überstempeln auf YPD und YPG wurden wiederum die Kolonien ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien, die wiederholt auf YPD wachsen konnten, lag bei 100 % (nicht gezeigt). Im Diagramm ist die Anzahl der atmungsfähigen Zellkolonien auf YPG angegeben.

(B) DAPI-Färbung. Die Hefestämme aus (A) wurden 20 h in YPD bei 37°C kultiviert. Dabei befanden sich die Zellen immer in der logarithmischen Wachstumsphase. Die DNA der Zellen wurde mit 1  $\mu$ g/ml DAPI angefärbt. Die Pfeilköpfe deuten auf die mtDNA-Nukleotide im WT.



**Abbildung 20: Die Form der  $\Delta mdm30$ -Mitochondrien.**

WT- und  $\Delta mdm30$ -Zellen wurden in YPD bzw. YPG bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Rechts befindet sich jeweils die Phasenkontrastaufnahme. Die mitochondriale Form war bei 30°C und 37°C identisch.

### 3.2.6 Die $\Delta mdm30$ -Mutation beeinflusst nicht die Transkription von *FZO1*

Es sollte getestet werden, ob die Aktivität des *FZO1*-Promotors in den  $\Delta mdm30$ -Zellen verändert ist, da dies eine mögliche Erklärung für die erhöhte Fzo1-Proteinmenge sein könnte. Die Aktivität des Promotors sollte über das Reporterenzym  $\beta$ -Galaktosidase gemessen werden.

Das Plasmid Ylp*FZO1* $\beta$ 2 wurde durch homologe Rekombination in das Genom eines WT- und eines  $\Delta mdm30$ -Hefestamms integriert, so dass die Transkription des  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergens durch den *FZO1*-Promotor kontrolliert wird. Von den so erhaltenen Hefestämmen WT- $\beta$ -Gal und  $\Delta mdm30$ - $\beta$ -Gal wurden Zellextrakte präpariert, mit denen der Enzymtest durchgeführt wurde.

$\beta$ -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse des synthetischen Substrats ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid), die im Photometer bei 420 nm

beobachtet werden kann. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase ist dabei abhängig vom *FZO1*-Promotor, der ihre Expression reguliert.

Das verwendete Plasmid erwies sich als vorteilhaft, weil keinerlei Hintergrund-Aktivität gemessen wurde. Es wurden mehrere Klone der transformierten Hefen getestet (Tabelle 5). Als gemittelte Durchschnittswerte der Aktivitäten ergaben sich 17,1 nmol/(min x mg) für  $\Delta$ *mdm30* und 18,8 nmol/(min x mg) für den WT. Die berechneten Aktivitäten sind vergleichbar mit Werten, die für andere Hefestämme gefunden wurden (Melcher *et al.*, 2000).

Es liegt also kein signifikanter Unterschied der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zwischen WT und  $\Delta$ *mdm30* vor. Demzufolge scheint *MDM30* keinen Einfluss auf die Stabilität oder Aktivität von Transkriptionsfaktoren des *FZO1*-Promotors zu haben. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen aus 3.2.3, die zeigten, dass die Fzo1-Proteinmenge auch dann von Mdm30-abhängig ist, wenn Fzo1 über den heterologen GAL-Promotor exprimiert wird. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Fzo1-Proteinmenge post-transkriptional durch Mdm30 reguliert wird.



## Ergebnisse

Klon	$\Delta m d m 3 0$ - $\beta$ -Gal	WT- $\beta$ -Gal
1	26,2 $\pm$ 8,0	8.75 $\pm$ 1,2
2	14,8 $\pm$ 5,6	28.75 $\pm$ 0,5
3	29,1 $\pm$ 14,4	43.2 $\pm$ 15,7
4	19,2 $\pm$ 2,5	9.5 $\pm$ 1,4
5	6,9 $\pm$ 0,0	17.9 $\pm$ 9,5
6	6,5 $\pm$ 4,5	4.8 $\pm$ 4,2
Durchschnittswert $\pm$ Standardabweichung	17,1 $\pm$ 9,5	18,8 $\pm$ 14,7

**Tabelle 5: Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase in Wildtyp- und  $\Delta m d m 3 0$ -Zellen, die mit dem Reporterplasmid YlpFZO1 $\beta$ 2 transformiert worden waren.**

Es wurden Zellextrakte der Hefestämme YBW329 (WT- $\beta$ -Gal) und YBW327 ( $\Delta m d m 3 0$ - $\beta$ -Gal) verwendet. Die Werte sind angegeben in nmol ONPG (hydrolysiert)/(min x mg Protein). Aus den Messungen mit verschiedenen Klonen wurden die aufgelisteten Durchschnittswerte berechnet. Vergleichbare Stämme ohne Reporterplasmid zeigten keine messbare Enzymaktivität.

## 4 Diskussion

Mitochondrien besitzen zwei Membranen und stehen daher vor der Herausforderung, insgesamt vier Membranen miteinander zu fusionieren. Bislang ist nicht bekannt, welche Prozesse auf molekularer Ebene diesen Vorgang bewerkstelligen.

Fzo1 ist ein Außenmembranprotein, das für die Fusion benötigt wird (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). In der vorliegenden Studie wurde seine Topologie sowie deren Bedeutung für die Membranfusion untersucht, um nähere Einblicke in den Mechanismus der Fusion zu gewinnen. Fzo1 spielt eine maßgebliche Rolle bei der Koordination der beiden mitochondrialen Membranen während der Fusion.

Um weitere Komponenten der mitochondrialen Fusionsmaschinerie zu identifizieren, wurde nach Hefemutanten gesucht, in denen die mitochondriale Fusion defekt sein könnte. Die eingehende Charakterisierung von Mdm30 zeigte, dass dieses Protein die Fzo1-Proteinmenge und damit auch die Fusion der Mitochondrien beeinflusst.

### 4.1 Die Rolle von Fzo1 bei der Fusion

#### 4.1.1 Die Topologie von Fzo1

Wie aus den Ergebnissen der biochemischen Subfraktionierung hervorgeht, besitzt Fzo1 eine  $N_{\text{außen}}/C_{\text{außen}}$ -Topologie in der Außenmembran. Dies wurde zum einen durch die Analyse des Imports von Fzo1-DHFR Fusionsproteinen bestätigt (D. Rapaport; Fritz *et al.*, 2001) und zum anderen durch das Verhalten von Fzo1 im Dichtegradienten. Endogenes Fzo1 fraktioniert gemeinsam mit

Vesikeln der Innenmembran, jedoch nach Behandlung mit Harnstoff ausschließlich mit Vesikeln der Außenmembran.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann die von Hales und Fuller (1997) ursprünglich vorgeschlagene Fzo1-Topologie, bei der Fzo1 beide mitochondrialen Membranen durchspannt, ausgeschlossen werden. Allein das Intermembranraumsegment von Fzo1 ist für eine Interaktion mit Komponenten der Innenmembran verfügbar. Obwohl auch zusätzliche Faktoren daran beteiligt sein können, ist eine direkte Interaktion mit einem Bestandteil der Innenmembran sehr wahrscheinlich. Das Vorhandensein des Intermembranraumsegments ist für die Kofraktionierung des C-terminalen Fzo1-Fragments mit der Innenmembran notwendig. Zudem wird die Interaktion in der Mutante *fzo1-2*, die ein verändertes Segment in den Intermembranraum exponiert, aufgehoben. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung zwischen dem Fzo1-Komplex und der Innenmembran. Die Untersuchungen mit der *fzo1-2*-Mutante deuten auf eine Bedeutung dieser Verbindung für die Funktion des Proteins hin. Vermutlich ist die Verbindung zwischen Außen- und Innenmembran wichtig für den Mechanismus der mitochondrialen Fusion.

Eine  $N_{\text{außen}}/C_{\text{außen}}$ -Topologie wurde kürzlich auch für die Mitofusine, die menschlichen Fzo1-Homologen, nachgewiesen (Rojo *et al.*, 2002). Die Domänenstruktur ist bei den Fzo1-Homologen vermutlich konserviert (Hales und Fuller, 1997).

Die Topologie von Fzo1 könnte weitere Hinweise auf den Mechanismus der Membranfusion liefern, die nicht im Gegensatz zu den obigen Erkenntnissen stehen. Die Transmembrandomänen von Fzo1 sind nur durch ein auffällig kurzes Intermembranraumsegment voneinander getrennt. Dieses stabilisiert möglicherweise die räumliche Anordnung der Transmembrandomänen oder eines anderen Strukturelements des Proteins, was zur Funktion von Fzo1 beitragen könnte.

#### 4.1.2 Die Rolle von Kontaktstellen bei der Fusion

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden Bereiche in den Mitochondrien nachgewiesen, die sich durch eine auffällige Nähe der Außen- und Innenmembran auszeichnen (Hackenbrock, 1968; Nicastro *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 1997; van der Klei *et al.*, 1994). Diesen mitochondrialen Kontaktstellen wurde eine Reihe unterschiedlicher Funktionen zugeschrieben. Dazu zählen die Translokation von Proteinen über die mitochondrialen Membranen (Donzeau *et al.*, 2000; Pon *et al.*, 1989; Rassow *et al.*, 1989; Schleyer und Neupert, 1985; Schwaiger *et al.*, 1987), die Translokation von Phospholipiden über die mitochondrialen Membranen (Simbeni *et al.*, 1991) sowie Funktionen im Energiemetabolismus (Brdiczka *et al.*, 1998; Brdiczka *et al.*, 1990; Rojo *et al.*, 1991). Die Komponenten, die sich zu einer Kontaktstellen zusammensetzen, sind für jeden dieser beschriebenen Prozesse unterschiedlich (Brdiczka, 1991; Pfanner *et al.*, 1992). Übereinstimmend damit blieb in der *fzo1-2*-Mutante eine Fraktion des Außenmembranproteins Porin in Kontakt mit der Innenmembran (siehe Abbildung 12E), da es offenbar Kontaktstellen ausbildet, die von Fzo1 unabhängig sind.

Bereiter-Hahn und Vöth (1994) beobachteten mit Hilfe eines Elektronenmikroskops Mitochondrien, deren Membranen sich berühren. Ein Großteil der beobachteten Organellen schien nur dann zu fusionieren, wenn sich auf beiden Seiten eine mitochondriale Kontaktstelle befand. Die mitochondriale Fusion könnte also an Kontaktstellen initiiert werden. Die in der vorliegenden Studie beschriebene Lokalisation von Fzo1 in Kontaktstellen liefert die biochemische Basis für diesen morphologischen Befund. Demnach bildet die mitochondriale Fusionsmaschinerie Kontaktstellen aus, die den Fusionsprozess der Membranen vermitteln. Die Verbindung zwischen mitochondrialer Außen- und Innenmembran wird durch das Intermembranraumsegment von Fzo1 vermittelt. Fzo1 koordiniert wahrscheinlich sowohl die Fusion der

Außenmembranen als auch die der Innenmembranen. Eine eigenständige Fusion der Innenmembranen, die unabhängig vom Fusionsvorgang der Außenmembranen verläuft, ist also nicht erforderlich.

Die Kontaktstellen, deren Bestandteil Fzo1 ist, sind vermutlich in den mitochondrialen Enden konzentriert oder spezifisch aktiviert, da ein mitochondriales Ende an jedem Fusionsvorgang beteiligt sein muss (siehe auch 1.2.1).

#### **4.1.3 Rolle von Fzo1 als „Docking“-Faktor der Mitochondrien oder als Fusogen für die mitochondriale Außenmembran**

Fzo1 verfügt über strukturelle Elemente, die auch bei Fusionsproteinen in anderen Zellorganellen eine wichtige Rolle spielen. Die SNARE-Proteine bilden eine Gruppe konservierter Fusionsproteine, die am „Docking“ und an der Fusion intrazellulärer Vesikel beteiligt sind (Weber *et al.*, 1998). Beim „Docking“ werden Membranen miteinander in engen Kontakt gebracht und die Fusionspartner miteinander verbunden.

SNARE-Proteine besitzen „coiled-coil“-Motive in N-terminalen Domänen. Die „coiled-coil“-Proteinbereiche der Vesikel-assoziierten v-SNAREs und der an der Zielmembran befindlichen t-SNAREs bilden gemeinsam eine superspiralisierte stäbchenförmige Struktur, die das Vesikel nahe der Akzeptormembran festhält (Hay und Scheller, 1997). Auch für Fzo1 sind solche „coiled-coil“-Bereiche vorausgesagt worden, die ins Cytosol ragen (siehe Abbildung 4C).

Fzo1 könnte eine SNARE-ähnliche Funktion ausüben. Über „coiled-coil“-Bereiche könnten zum Beispiel mehrere Fzo1-Proteine miteinander in der Außenmembran verknüpft werden (*cis*-Komplex). Auf diesem Wege könnte der Fusionskomplex gebildet werden. Andererseits könnten verschiedene Fzo1-

Proteine, die in gegenüberliegenden Membranen sitzen, über ihre „coiled-coil“-Bereiche miteinander assoziieren (*trans*-Komplex), um so das „Docking“ der mitochondrialen Membranen zu bewirken.

Bei den Mitofusinen wurden Interaktionen zwischen N-terminalen und C-terminalen Domänen nachgewiesen (Rojo *et al.*, 2002). Es ist nicht klar, ob diese Interaktionen zwischen Molekülen stattfinden, die in gegenüberliegenden Membranen oder innerhalb derselben Membran sitzen. Es könnte sich auch um intramolekulare Interaktionen handeln. Darüber hinaus kommt es zur vermehrten Aggregation der Mitochondrien, wenn eines der Mitofusine in menschlichen Zellen überexprimiert wird. Vermutlich handelt es sich dabei um Organellen, die im „Docking“-Zustand festsitzen. Das heißt, die Mitochondrien liegen zwar dicht beieinander, fusionieren aber nicht, wie Rojo *et al.* (2002) aufgrund von Untersuchungen mit einem Elektronenmikroskop vermuteten. Diese Aggregation erfordert einen intakten Mitofusin-C-Terminus (Santel und Fuller, 2001). Das „Docking“ der Mitochondrien könnte demzufolge über Interaktionen mit dem Mitofusin-C-Terminus herbeigeführt werden.

Auch Fzo1 in Hefe besitzt Proteinbereiche, die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen vermitteln können. So spielt der C-Terminus eine Rolle bei der Dimerisierung von Fzo1, wie die Quervernetzungsexperimente zeigten. Weiterhin wurde bei der Überexpression von Fzo1, ähnlich wie bei den Mitofusinen, eine vermehrte Aggregation der Mitochondrien beobachtet. Fzo1 scheint also auch eine entscheidende Rolle beim „Docking“ der Mitochondrien zu spielen. Welche Aufgabe dabei der C-Terminus hat, ist noch nicht geklärt.

Die GTPase-Domäne von Fzo1 wird vermutlich für das „Docking“ oder für die Fusion der mitochondrialen Membranen benötigt (Hermann *et al.*, 1998). Sie könnte dabei den zeitlichen Ablauf von Fzo1-Interaktionen steuern. Eine ähnliche Funktion erfüllen die GTP-bindenden Rab-Proteine beim Vesikeltransport (Lupashin und Waters, 1997). Alternativ könnte die GTPase-

Domäne biomechanische Energie liefern, die über die Transmembrandomänen an die Fusion der Membranen gekoppelt wird (Hales und Fuller, 1997; Hermann und Shaw, 1998). Eine ähnliche Funktion wurde bereits für die GTPase-Domänen der Dynamine vermutet (Warnock und Schmid, 1996).

## 4.2 Ein möglicher Mechanismus der mitochondrialen Fusion

Aus den durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnissen über die Funktion von Fzo1 lässt sich ein Modell für den Mechanismus der mitochondrialen Fusion entwickeln, das in Abbildung 21 dargestellt ist. Welche molekularen Prozesse dabei ablaufen, bleibt unklar. Da für die Vakuolenfusion über 60 verschiedene Komponenten benötigt werden (Wickner, 2002), ist es wahrscheinlich, dass auch für die Fusion von Mitochondrien eine Reihe weiterer noch unbekannter Faktoren benötigt wird.

Der mitochondrialen Fusion geht die eindimensionale Bewegung der Organellen entlang der Aktinfilamente voraus (Nunnari *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1995b). So löst die Behandlung von Hefezellen mit Latrunculin A, das das Aktincytoskelett depolymerisiert, die Fragmentierung der Mitochondrien aus. Dies deutet auf einen Defekt in der mitochondrialen Fusion hin (Boldogh *et al.*, 1998). Aktin könnte also nicht nur für die Motilität der Mitochondrien sorgen, sondern auch an der Fusion selbst beteiligt sein. Zum Beispiel könnte es für die Aufrechterhaltung der tubulären Form der Organellen von Bedeutung sein. Diese Form der Organellen könnte eine bestimmte Fusionskompetenz erzeugen. Aktin erfüllt möglicherweise auch andere Aufgaben bei der Fusion, die bislang nicht bekannt sind. Bei den Vakuolen zum Beispiel wird Aktin bei einem der letzten Schritte der Membranfusion benötigt (Eitzen *et al.*, 2002).

Der eigentliche Fusionsvorgang von biologischen Membranen erfolgt in der Regel in drei Stufen: (i) Beim „Priming“ werden die Fusionspartner fusions-

kompetent gemacht. (ii) Beim „Docking“ werden die Fusionspartner miteinander verbunden (siehe 4.1.3). (iii) Bei der Membranfusion schließlich verschmelzen die Lipiddoppelschichten miteinander (zur Übersicht siehe Jahn und Südhof, 1999; Mayer, 2002; Wickner, 2002). Das Modell in Abbildung 21 bezieht sich auf diese grundlegenden Prinzipien der Membranfusion.

Die ersten Schritte der mitochondrialen Membranfusion („Priming“, „Docking“, Vermischen der Außenmembranlipide) unterscheiden sich wahrscheinlich kaum von den Mechanismen, die für die SNARE-vermittelte Membranfusion bekannt sind (Skehel und Wiley, 1998; Weber *et al.*, 1998). Höchstwahrscheinlich sind sie reversibel, wie es beispielsweise auch das Öffnen der Fusionspore während der Exocytose ist (Zimmerberg *et al.*, 1993).

Das „Priming“ ist vermutlich die Voraussetzung für eine effiziente Membranfusion der Mitochondrien. Es wäre denkbar, dass dabei zunächst die Komponenten der Fusionsmaschinerie assemblieren, falls es sich dabei um temporäre Zustände handelt. Außerdem könnten in diesem Schritt die *cis*-Komplexe von Fusionsproteinen aufgelöst werden, damit *trans*-Komplexe ausgebildet werden können. Ein ähnlicher Vorgang ist aus der SNARE-vermittelten Fusion bekannt.

Das „Docking“ der Außenmembranen zweier dicht beieinander liegender Mitochondrien beginnt, sobald die cytosolischen Domänen der gegenüberliegenden Fusionsmaschinerien miteinander in Kontakt treten. Dabei interagieren vermutlich Fusionskomponenten der gegenüberliegenden *trans*-Komplexe, was im Wesentlichen die Verknüpfung zwischen den Mitochondrien ausmacht.

Bei der SNARE-vermittelten Fusion ist die Bildung von *trans*-Komplexen zwar notwendig, aber möglicherweise nicht ausreichend für den letzten Schritt der Membranfusion, das Verschmelzen der Lipiddoppelschichten (Langosch *et al.*, 2001a; Langosch *et al.*, 2001b). Dies könnte auch auf die mitochondriale Fusion

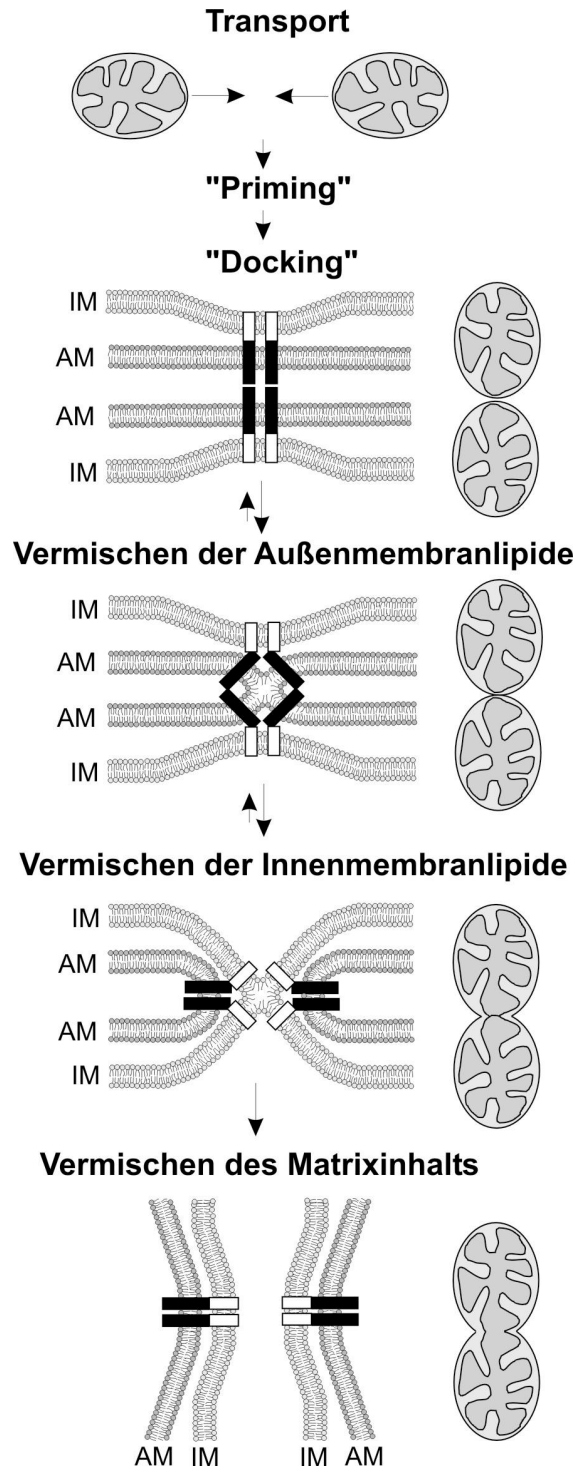


zutreffen. In diesem Fall wären weitere, bisher unbekannte Vorgänge nötig, die letztendlich zur Verschmelzung der Außenmembranen führen. Dieser Schritt wird wahrscheinlich durch eine Destabilisierung der Lipiddoppelschichten unterstützt, die das Öffnen der Fusionspore erleichtert. Darüber hinaus könnte die intrinsische Flexibilität der Transmembrandomänen von Außenmembranproteinen wichtig für die Vermischung der Lipide sein (Langosch *et al.*, 2001b).

Die nun folgenden Ereignisse sind einzigartig für Organellen mit zwei Membranen. Nachdem die Außenmembranen miteinander fusioniert worden sind, wird vermutlich die Verknüpfung der Außen- mit der Innenmembran benötigt, um die Fusion der Innenmembranen zu initiieren. Damit wäre ein neuer Reaktionszyklus, in dem die Innenmembranen miteinander in Kontakt gebracht werden müssen, überflüssig, denn die beteiligten Komponenten befinden sich bereits in idealer Position für den Fusionsprozess.

Wenn die Verknüpfung der beiden Membranen fehlt, wäre die Fusion der Innenmembranen weniger effizient, und daher wäre die Rückreaktion bevorzugt. Diese Vorhersage stimmt gut mit der beobachteten Fragmentierung der Mitochondrien in der *fzo1-2*-Mutante überein.

Im letzten Schritt des Modells kommt es zur Trennung der fusionierten Membranen und zur Vermischung des Matrixinhalts, die den Fusionsprozess vervollständigen.



**Abbildung 21: Hypothetisches Modell zur mitochondrialen Fusion.**

Die koordinierte Fusion der Mitochondrien wird vermutlich über einen Mechanismus erreicht, der den engen Kontakt zwischen Außen- und Innenmembran vermittelt. Der Fusionskomplex der Außenmembran ist in schwarz dargestellt; die vermuteten Interaktionspartner in der Innenmembran sind durch weiße Kästen markiert. Beschreibung im Text.

### 4.3 Die molekulare Basis der mitochondrialen Formgebung

Im letzten Jahrzehnt wurde durch genetisches und morphologisches Screening eine Reihe wichtiger Komponenten der mitochondrialen Vererbung identifiziert. Dennoch sind viele der Prozesse und Komponenten, die das mitochondriale Verhalten bestimmen, bisher nicht aufgeklärt. Dazu zählen die Maschinerie, die die Mitochondrien an das Aktincytoskelett bindet (Boldogh *et al.*, 1998; Boldogh *et al.*, 2001a; Simon *et al.*, 1995a), Proteine, die mit Fzo1 oder Ugo1 bei der mitochondrialen Fusion kooperieren (Fritz *et al.*, 2001; Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 2001), sowie Komponenten, die die interne Struktur der Mitochondrien ausbilden (Wong *et al.*, 2000).

Der klassische Ansatz zur Identifizierung von *MDM*-Genen basiert typischerweise auf der Durchmusterung von temperatursensitiven Mutanten nach zufallsgesteuerter Mutagenese (Hermann und Shaw, 1998). Der hier durchgeführte systematische Ansatz ermöglichte die Identifizierung etlicher Komponenten, die bei den klassischen Ansätzen nicht gefunden wurden (Dimmer *et al.*, 2002). Die Durchmusterung brachte unter anderem einige *mdm*-Mutanten hervor, wie etwa *mdm30* und *mdm36*, die keinen offensichtlichen Wachstumsdefekt besitzen. Die Identifizierung dieser Mutanten wäre durch konventionelles genetisches Screening und Selektion auf Wachstumsdefekte wahrscheinlich nicht möglich gewesen. Dies veranschaulicht das Potenzial des hier durchgeführten genomischen Ansatzes, der in ähnlicher Weise auch für die Untersuchung anderer zellbiologischer Prozesse von großem Nutzen sein könnte.

Ein Großteil der Proteine, die von den neuen *MDM*-Genen kodiert werden, zeigt keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen. Aufgrund der verschiedenartigen Phänotypen der Mutanten handelt es sich bei den neu identifizierten Proteinen höchstwahrscheinlich um Faktoren, die über

unterschiedliche Prozesse an der mitochondrialen Morphogenese mitwirken. Die relativ kleine Anzahl neu identifizierter Komponenten ist ein Hinweis auf die Spezifität des Ansatzes. Die identifizierten Gene könnten allerdings auch essentiell für andere Vorgänge in der Zelle sein, die sich indirekt auf die mitochondriale Form auswirken.

Die meisten Mdm-Proteine beeinflussen neben den Mitochondrien vermutlich keine anderen Organellen. Mgm1 und Dnm1 sind die einzigen bekannten Komponenten, die mit bekannten Proteinen der Morphogenese anderer Organellen verwandt sind. Offenbar hat die Natur eine vollkommen neuartige Maschinerie für die Aufrechterhaltung der Organellenstruktur entwickelt, nachdem die Vorläufer der Mitochondrien in die eukaryotischen Zellen gelangten waren.

#### **4.4 Mdm30 ist ein neues Protein, das eine Rolle bei der Fusion spielt**

In dieser Studie wurde mit Mdm30 ein neuer Faktor untersucht, der für die Aufrechterhaltung der Fusionsfähigkeit der Mitochondrien wichtig ist. *Δmdm30*-Zellen haben typische Eigenschaften einer Mutante, deren mitochondriale Fusion beeinträchtigt ist, wie etwa die aggregierten und fragmentierten Mitochondrien, der Defekt in der Vererbung der mtDNA sowie die *in vivo* blockierte mitochondriale Fusion.

Aufgrund mehrerer genetischer und biochemischer Befunde scheint es sich bei Mdm30 um einen regulatorischen Faktor der mitochondrialen Fusionsmaschinerie zu handeln: (i) Die mitochondriale Fusion ist in *Δmdm30/Δdnm1*-Zygoten wiederhergestellt. Mdm30 ist demnach kein essentieller Bestandteil der Fusionsmaschinerie. (ii) Die Fzo1-Proteinmenge ist abhängig von der Mdm30-Expression. (iii) *MDM30*-abhängige Veränderungen

der Fzo1-Proteinmenge gehen mit Veränderungen der mitochondrialen Form einher.

Das F-Box-Motiv und die beobachtete Interaktion von Mdm30 mit Skp1 und Cdc53 im Hefe Two-Hybrid System (Uetz *et al.*, 2000) sind Hinweise darauf, dass Mdm30 Bestandteil eines SCF-Komplexes ist. Die Fzo1-Proteinmenge könnte über eine Skp1-Cdc53-Mdm30-abhängige Ubiquitinierung und einen darauf folgenden Abbau durch das 26S Proteasom reguliert werden. Im einfachsten Fall wäre Fzo1 das Substrat der Ubiquitinierung. Allerdings kann die Beteiligung anderer Faktoren nicht ausgeschlossen werden. Fzo1 konnte zudem noch nicht als ein Substrat des 26S Proteasoms nachgewiesen werden.

In Abwesenheit von Mdm30 wird überschüssiges Fzo1 angehäuft. Da die mitochondriale Aggregation sowohl durch die Deletion von *MDM30* als auch durch Fzo1-Überexpression ausgelöst werden kann, handelt es sich bei der Aggregation der Mitochondrien vermutlich um eine direkte Folgeerscheinung der Fzo1-Anhäufung. Durch Überexpression von Mitofusinen in Säugerzellen wird eine vergleichbare Aggregation der Mitochondrien induziert (siehe 4.1.3; Santel und Fuller, 2001; Rojo *et al.*, 2002). Vermutlich sind fusogene Kofaktoren bei diesem Schritt limitierend. Möglicherweise kommt es auch zu einer Anhäufung unproduktiver Fusionsintermediate.

Es sind zwei mögliche Rollen für Mdm30 bei der mitochondrialen Fusion denkbar, die sich gegenseitig nicht ausschließen. Zum einen muss das Gleichgewicht zwischen Teilungs- und Fusionsvorgängen genau eingehalten werden, um die schlauchförmige mitochondriale Form aufrechtzuerhalten (Nunnari *et al.*, 1997; Yaffe, 1999a). Mdm30 könnte in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein, da es die Fzo1-Proteinmenge reguliert. Es bestimmt die nötige Fzo1-Proteinmenge, die für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts mit Dnm1 nötig ist. Zum anderen werden wahrscheinlich auch unter normalen Bedingungen geringe Mengen unproduktiver Fusionskomplexe gebildet. In

diesem Fall könnte Mdm30 für die Beseitigung dieser fehlgebildeten Komplexe benötigt werden und somit der mitochondrialen Aggregation entgegenwirken. In der  $\Delta mdm30$ -Mutante fehlt diese Kontrolle des Gleichgewichts durch Mdm30. Die vorhandenen unproduktiven Fusionskomplexe bilden zusätzliche „Docking“-Zustände, die nicht mehr fusionieren können. Das Gleichgewicht liegt nun auf der Seite der Teilungsvorgänge, was die aggregierten und fragmentierten Mitochondrien in der  $\Delta mdm30$ -Mutante erklärt.

Die Beteiligung eines F-Box-Proteins an der mitochondrialen Fusion passt zu publizierten Untersuchungen, die eine Verbindung zwischen dem Ubiquitin/26S Proteasom-System und den Mitochondrien aufzeigten. So wurde eine Ubiquitin-Mutante beschrieben, die eine Polyubiquitinierung verhindert und die Aggregation von Mitochondrien induziert (Fisk und Yaffe, 1999). Dieser Effekt ist dem Phänotyp des  $\Delta mdm30$ -Hefestamms sehr ähnlich. Es ist also möglich, dass die *MDM30*-Deletion und die Überexpression der Ubiquitin-Mutante die gleichen Reaktionswege in der Zelle betreffen.

Darüber hinaus gibt es weitere Ubiquitin-abhängige Prozesse, die die mitochondriale Form beeinflussen. Mutanten der Ubiquitin-Ligase Rsp5 zeigen einen Defekt in der Verteilung der Mitochondrien (Fisk und Yaffe, 1999), da die Transkription des *OLE1/MDM2*-Gens blockiert ist (Hoppe *et al.*, 2000). Dieses Gen kodiert für eine Fettsäure-Desaturase, die wichtig für die mitochondriale Vererbung ist (Stewart und Yaffe, 1991). Eine konditionale Mutante des *MPRI*-Gens, welches eine regulatorische Untereinheit des 26S Proteasoms kodiert, zeigt pleiotrope Defekte, die beeinträchtigt Wachstum auf Glycerin, fragmentierte und aggregierte Mitochondrien sowie eine vermehrte Replikation von mtDNA einschließen (Rinaldi *et al.*, 1998). Die Mutation des *YNT1*-Gens, welches für eine weitere regulatorische Proteasomuntereinheit kodiert, unterdrückt den Defekt der mitochondrialen Form, der durch Deletion von *YME1* hervorgerufen wird, einer ATP-

abhängigen Protease im Intermembranraum (Campbell *et al.*, 1994). Ein letztes Beispiel ist die Ubiquitinierung von Mitochondrien in Spermazellen von Säugern. Dieser kaum verstandene Mechanismus ist vermutlich für die strikt maternale Vererbung der mtDNA verantwortlich (Sutovsky *et al.*, 1999; Sutovsky *et al.*, 2000).

## 5 Zusammenfassung

Die Fusion von Mitochondrien und deren Membranen ist ein Prozess, der für die Aufrechterhaltung der Mitochondrienmorphologie essentiell ist. Da Mitochondrien von zwei verschiedenen Membranen begrenzt werden, müssen dabei insgesamt vier Membranen auf koordinierte Weise miteinander verschmelzen. Fzo1 ist eine zentrale Komponente der mitochondrialen Fusionsmaschinerie in der Außenmembran. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Fzo1 die Fusion der Außenmembranen mit der Fusion der Innenmembranen koordiniert. Darüber hinaus sollten neue Komponenten identifiziert werden, die für die Fusion von Mitochondrien wichtig sind.

Fzo1 besitzt zwei Transmembrandomänen, welche die Außenmembran durchqueren. Es exponiert sowohl den Amino- als auch den Carboxyterminus ins Cytosol. Ein kurzes Segment im Intermembranraum ist für die Lokalisation von Fzo1 in Kontaktstellen zwischen Außen- und Innenmembran verantwortlich. Mutationen in diesem Segment führen zum Verlust der Assoziation von Fzo1 mit der Innenmembran und zum Verlust der Funktion des Proteins. Diese Beobachtungen bilden die Grundlage für ein Modell, in dem die Fusionsmaschinerie Kontakte zwischen den beiden Membranen ausbildet und so die koordinierte Fusion der vier mitochondrialen Membranen vermittelt.

Mdm30 ist eine neue Komponente, die für die Fusion von Mitochondrien benötigt wird. Mdm30 besitzt ein F-Box-Motiv. Dieses Motiv findet sich in Untereinheiten von SCF-Komplexen, einer vielseitigen Klasse von Ubiquitin-Ligasen.  $\Delta mdm30$ -Mutanten haben fragmentierte und aggregierte Mitochondrien. Die Mitochondrien der  $\Delta mdm30$ -Zellen können nur fusionieren, wenn gleichzeitig die Teilung von Mitochondrien blockiert wird. Durch die Deletion des *MDM30*-Gens kommt es bei erhöhten Temperaturen zum Verlust



der mitochondrialen DNA. Mdm30 bestimmt die Struktur der Mitochondrien, indem es die Fzo1-Proteinmenge reguliert.

## 5 Literatur

- Aiken Hobbs, A.E., Srinivasan, M., McCaffery, J.M. und Jensen, R.E. (2001) Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J. Cell Biol.*, **152**, 401-410.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. und Wissinger, B. (2000) *OPA1*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.*, **26**, 211-215.
- Azpiroz, R. und Butow, R.A. (1993) Patterns of mitochondrial sorting in yeast zygotes. *Mol. Biol. Cell*, **4**, 21-36.
- Bereiter-Hahn, J. (1990) Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.*, **122**, 1-62.
- Bereiter-Hahn, J. und Vöth, M. (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.*, **27**, 198-219.
- Berger, K.H., Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1997a) Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J. Cell Biol.*, **136**, 545-553.
- Berger, K.H. und Yaffe, M.P. (1996) Mitochondrial distribution and inheritance. *Experientia*, **52**, 1111-1116.
- Berger, K.H. und Yaffe, M.P. (2000) Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol.*, **8**, 508-513.
- Berger, K.L., Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1997b) Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J. Cell Biol.*, **136**, 545-553.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. und Shaw, J. (1999) The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 298-304.

- Boeke, J.D., LaCroute, F. und Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 345-346.
- Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S. und Pon, L.A. (1998) Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J. Cell Biol.*, **141**, 1371-1381.
- Boldogh, I.R., Yang, H.-C., Nowakowski, W.D., Karmon, S.L., Hays, L.G., Yates III, J.R. und Pon, L.A. (2001a) Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 3162-3167.
- Boldogh, I.R., Yang, H.-C. und Pon, L.A. (2001b) Mitochondrial inheritance in budding yeast. *Traffic*, **2**, 368-374.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**, 115-132.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brdiczka, D. (1991) Contact sites between mitochondrial envelope membranes: structure and function in energy- and protein transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 291-312.
- Brdiczka, D., Beutner, G., Ruck, A., Dolder, M. und Wallimann, T. (1998) The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. *Biofactors*, **8**, 235-242.
- Brdiczka, D., Bücheler, K., Kottke, M., Adams, V. und Nalam, V.K. (1990) Characterization and metabolic function of mitochondrial contact sites. *Biochim. Biophys. Acta*, **1018**, 234-238.
- Burgess, S.M., Delannoy, M. und Jensen, R.E. (1994) *MMM1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell Biol.*, **126**, 1375-1391.
- Campbell, C.L., Tanaka, N., White, K.H. und Thorsness, P.E. (1994) Mitochondrial morphology and functional defects caused by *yme1* are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 899-905.

- Cenciarelli, C., Chiaur, D.S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M. und Pagano, M. (1999) Identification of a family of human F-box proteins. *Curr. Biol.*, **9**, 1177-1179.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. und Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, **110**, 119-122.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O. und Herskowitz, I. (1998) The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science*, **282**, 699–705.
- Cortese, J.D. (1999) Rat liver GTP-binding proteins mediate changes in mitochondrial membrane potential and organelle fusion. *Am. J. Physiol.*, **276**, C611–620.
- Criddle, R.S. und Schatz, G. (1969) Promitochondria of anaerobically grown yeast. I. Isolation and biochemical properties. *Biochemistry*, **8**, 322– 334.
- Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.*, **341**, 233-249.
- Crompton, M., Virji, S. und Ward, J.M. (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur. J. Biochem.*, **258**, 729-735.
- Daum, G., Böhni, P.C. und Schatz, G. (1982a) Import of proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13028-13033.
- Daum, G., Böhni, P.C. und Schatz, G. (1982b) Import of proteins into mitochondria: cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13028-13033.
- David, H., Bozner, A., Meyer, R. und Wassilew, G. (1981) Pre- and postnatal development and ageing of the heart. Ultrastructural results and quantitative data. *Exp. Pathol. Suppl.*, **7**, 1–176.
- De Camilli, P., Takei, K. und McPherson, P.S. (1995) The function of dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**, 559-565.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelles, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. und Hamel, C.P. (2000) Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.*, **26**, 207-210.

- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B. (2002) Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 847-853.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Tim23 links inner and outer mitochondrial membranes. *Cell*, **101**, 401-412.
- Egner, A., Jakobs, S. und Hell, S.W. (2002) Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 3370-3375.
- Eitzen, G., Wang, L., Thorngren, N. und Wickner, W. (2002) Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *J. Cell Biol.*, **158**, 669-679.
- Fekkes, P., Shepard, K.A. und Yaffe, M.P. (2000) Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J. Cell Biol.*, **151**, 333-340.
- Fisk, H.A. und Yaffe, M.P. (1999) A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **145**, 1199-1208.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L. und Youle, R.J. (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell*, **1**, 515-525.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. und Westermann, B. (2001) Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.*, **152**, 683-692.
- Fritz, S., Weinbach, N. und Westermann, B. (2003) Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol. Biol. Cell*, im Druck.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. und Lazarow, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **93**, 97-102.
- Gachotte, D., Eckstein, J., Barbuch, R., Hughes, T., Roberts, C. und Bard, M. (2001) A novel gene conserved from yeast to humans is involved in sterol biosynthesis. *J. Lipid Res.*, **42**, 150-154.
- Gammie, A.E., Kurihara, L.J., Vallee, R.B. und Rose, M.D. (1995) *DNM1*, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J. Cell Biol.*, **130**, 553-566.

- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Luca-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. und Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387-391.
- Gilmore, R. und Blobel, G. (1985) Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants. *Cell*, **42**, 497-505.
- Guan, K., Farh, L., Marshall, T.K. und Deshenes, R.J. (1993) Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the *MGM1* gene. *Curr. Genet.*, **24**, 141-148.
- Guthrie, C. und Fink, G.R. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Meth. Enzymology*, **194**.
- Hackenbrock, C.R. (1968) Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 598-605.
- Hales, K.G. und Fuller, M.T. (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, **90**, 121-129.
- Hartl, F.-U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, E. und Neupert, W. (1986) Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell*, **47**, 939-951.
- Hay, J.C. und Scheller, R.H. (1997) SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **9**, 505-512.
- Hayashi, J.-I., Takemitsu, M., Goto, Y. und Nonaka, I. (1994) Human mitochondria and mitochondrial genome function as a single dynamic cellular unit. *J. Cell Biol.*, **125**, 43-50.

- Heasman, J., Quarmby, J. und Wylie, C.C. (1984) The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: the source of germinal granule material. *Dev. Biol.*, **105**, 458–469.
- Heim, R. und Tsien, R.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.*, **6**, 178-182.
- Hermann, G.J., King, E.J. und Shaw, J.M. (1997) The yeast gene, *MDM20*, is necessary for mitochondrial inheritance and organization of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, **137**, 141-153.
- Hermann, G.J. und Shaw, J.M. (1998) Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**, 265-303.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J. und Shaw, J.M. (1998) Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.*, **143**, 359-373.
- Hoffmann, H.-P. und Avers, C.J. (1973) Mitochondrion of yeast: Ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science*, **181**, 749-750.
- Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **347**, 166.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D. und Jentsch, S. (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*, **102**, 577-586.
- Hwa, J.J., Hiller, M.A., Fuller, M.T. und Santel, A. (2002) Differential expression of the *Drosophila* mitofusin genes *fuzzy onions (fzo)* and *dmpn*. *Mech Dev*, **116**, 213-216.
- Jahn, R. und Südhof, T.C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 863-911.
- Jensen, R.E., Hobbs, A.E., Cervený, K.L. und Sesaki, H. (2000) Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc. Res. Tech.*, **51**, 573-583.
- Jones, B.A. und Fangman, W.L. (1992) Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.*, **6**, 380-389.
- Kato, M. und Wickner, W. (2001) Ergosterol is required for the Sec18/ATP-dependent priming step of homotypic vacuole fusion. *EMBO J.*, **20**, 4035-4040.

- Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H. und Nasmyth, K. (1993) A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science*, **261**, 1551-1557.
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lafontaine, D. und Tollervey, D. (1996) One-step PCR mediated strategy for the construction of conditionally expressed and epitope tagged yeast proteins. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3469-3471.
- Langosch, D., Brosig, B. und Pipkorn, R. (2001a) Peptide mimics of the vesicular stomatitis virus G-protein transmembrane segment drive membrane fusion in vitro. *J. Biol. Chem.*, **276**, 32016-32021.
- Langosch, D., Crane, J.M., Brosig, B., Hellwig, A., Tamm, L.K. und Reed, J. (2001b) Peptide mimics of SNARE transmembrane segments drive membrane fusion depending on their conformational plasticity. *J. Mol. Biol.*, **311**, 709-721.
- Lithgow, T., Timms, M., Hoi, P.B. und Hoogenraad N.J. (1991) Identification of a GTP-binding protein in the contact sites between inner and outer mitochondrial membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 1453-1459.
- Logan, D.C. und Leaver, C.J. (2000) Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J. Exp. Bot.*, **51**, 865-871.
- Lorenz, R.T. und Parks, L.W. (1992) Cloning, sequencing, and disruption of the gene encoding sterol C-14 reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol.*, **11**, 685-692.
- Lupashin, V.V. und Waters, M.G. (1997) t-SNARE activation through transient interaction with rab-like guanosine triphosphatase. *Science*, **276**, 1255-1258.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. und Lukyanov, S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 969-973.
- Mayer, A. (2002) Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **18**, 289-314.



- McConnell, S.J., Stewart, L.C., Talin, A. und Yaffe, M.P. (1990) Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.*, **111**, 967-976.
- McConnell, S.J. und Yaffe, M.P. (1992) Nuclear and mitochondrial inheritance in yeast depends on novel cytoplasmic structures defined by the MDM1 protein. *J. Cell Biol.*, **118**, 385-395.
- McNew, J.A., Weber, T., Engelman, D.M., Söllner, T.H. und Rothman, J.E. (1999) The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNARE-dependent fusion. *Mol. Cell*, **4**, 415-421.
- Melcher, K., Sharma, B., Ding, W.V. und Nolden, M. (2000) Zero background yeast reporter plasmids. *Gene*, **247**, 53-61.
- Mellman, I. und Warren, G. (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell*, **100**, 99-112.
- Mozdy, A., McCaffery, J.M. und Shaw, J.M. (2000) Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fusion is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.*, **151**, 367-379.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 863-917.
- Nicastro, D., Frangakis, A.S., Typke, D. und Baumeister, W. (2000) Cryo-electron tomography of *Neurospora* mitochondria. *J. Struct. Biol.*, **129**, 48-56.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W. und Walter, P. (1997) Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1233-1242.
- Okamoto, K., Perlman, P.S. und Butow, R.A. (1998) The sorting of mitochondrial DNA and mitochondrial proteins in zygotes: preferential transmission of mitochondrial DNA to the medial bud. *J. Cell Biol.*, **142**, 613-623.
- Okamoto, K., Perlman, P.S. und Butow, R.A. (2001) Targeting of green fluorescent protein to mitochondria. *Methods Cell Biol.*, **65**, 277-283.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. und Hayashi, J.I. (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.*, **28**, 272-275.
- Osteryoung, K.W. (2001) Organelle fission in eukaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 639-646.

- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W. und Shaw, J.M. (1998) The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.*, **143**, 333-349.
- Patton, E.E., Willems, A.R. und Tyers, M. (1998) Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: Don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.*, **14**, 236-243.
- Pelham, H.R.B. und Jackson, R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247-256.
- Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M. und Frey, T. (1997) Electron tomography of neuronal mitochondria: Three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.*, **119**, 260-272.
- Pfanner, N., Rassow, J., van der Klei, I. und Neupert, W. (1992) A dynamic model of the mitochondrial protein import machinery. *Cell*, **68**, 999-1002.
- Pon, L., Moll, T., Vestweber, D., Marshallsay, B. und Schatz, G. (1989) Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. *J. Cell Biol.*, **109**, 2603-2616.
- Pon, L. und Schatz, G. (1991) Biogenesis of yeast mitochondria. In Broach, J.R., Pringle, J.R. und Jones, E.W. (eds.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Genome dynamics, protein synthesis, and energetics*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 333-406.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. und Westermann, B. (1998) Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20150-20155.
- Rassow, J., Guiard, B., Wienhues, U., Herzog, V., Hartl, F.-U. und Neupert, W. (1989) Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites. *J. Cell Biol.*, **109**, 1421-1428.
- Rinaldi, T., Ricci, C., Porro, D., Bolotin-Fukuhara, M. und Frontali, L. (1998) A mutation in a novel yeast proteasomal gene, *RPN11/MPRI*, produces cell cycle arrest, overreplication of nuclear and mitochondrial DNA, and an altered mitochondrial morphology. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 2917-2931.

- Rojo, M., Hovius, R., Demel, R.A., Nicolay, K. und Wallimann, T. (1991) Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20290-29295.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. und Lombes, A. (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.*, **115**, 1663-1674.
- Rose, M.D., Winston, F. und Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Santel, A. und Fuller, M.T. (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.*, **114**, 867-874.
- Schleyer, M. und Neupert, W. (1985) Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell*, **43**, 339-350.
- Schnapp, B.J., Arn, E.A., Deshler, J.O., Highett, M.I. (1997) RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **8**, 529-540.
- Schwaiger, M., Herzog, V. und Neupert, W. (1987) Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins. *J. Cell Biol.*, **105**, 235-246.
- Sesaki, H. und Jensen, R.E. (1999) Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.*, **147**, 699-706.
- Sesaki, H. und Jensen, R.E. (2001) *UGOI* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.*, **152**, 1123-1134.
- Shaw, J.M. und Nunnari, J. (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.*, **12**, 178-184.
- Shepard, K.A. und Yaffe, M.P. (1999) The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.*, **144**, 711-720.
- Sikorski, R.S. und Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.

- Simbeni, R., Pon, L., Zinser, E., Paltauf, F. und Daum, G. (1991) Mitochondrial membrane contact sites of yeast. *J. Biol. Chem.*, **266**, 10047-10049.
- Simon, V.R., Swayne, T.C. und Pon, L.A. (1995a) Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J. Cell Biol.*, **130**, 345-354.
- Simon, V.R., Swayne, T.C. und Pon, L.A. (1995b) Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: Identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J. Cell Biol.*, **130**, 345-354.
- Skehel, J.J. und Wiley, D.C. (1998) Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell*, **95**, 871-874.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J. und Harper, J.W. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, **91**, 209-219.
- Smolich, J.J. (1995) Ultrastructural and functional features of the developing mammalian heart: a brief overview. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**, 451-461.
- Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1994) Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.*, **130**, 1361-1373.
- Steck, T.L. und Yu, J. (1973) Selective solubilization of proteins from red blood cell membranes by protein perturbants. *J. Supramol. Struct.*, **1**, 220-248.
- Stevens, B.J. (1977) Variation in number and volume of the mitochondria in yeast according to growth conditions. A study based on serial sectioning and computer graphics reconstitution. *Biol. Cell*, **28**, 37-56.
- Stewart, L.C. und Yaffe, M.P. (1991) A role for unsaturated fatty acids in mitochondrial movement and inheritance. *J. Cell Biol.*, **115**, 1249-1257.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. und Schatten, G. (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, **402**, 371-372.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. und Schatten, G. (2000) Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol. Reprod.*, **63**, 582-590.
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L. und De Camilli, P. (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature*, **374**, 186-190.

- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. und De Camilli, P. (1996) The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J. Cell Biol.*, **133**, 1237-1250.
- Tieu, Q. und Nunnari, J. (2000) Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.*, **151**, 353-365.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tyler, D.D. (1992) *The Mitochondrion in Health and Disease*. VCH Publishers, Inc., New York.
- Tzagoloff, A. und Dieckmann, C.L. (1990) PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **54**, 211-225.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. und Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-627.
- van der Blik, A.M. (2000) A mitochondrial division apparatus takes shape. *J. Cell Biol.*, **151**, F1-4.
- van der Klei, I.J., Veenhuis, M. und Neupert, W. (1994) A morphological view on mitochondrial protein targeting. *Microsc. Res. Tech.*, **27**, 284-293.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. und Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.
- Warnock, D.E. und Schmid, S.L. (1996) Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. *Bioessays*, **18**, 885-893.
- Warren, G. (1985) Membrane traffic and organelle division. *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 439-443.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H. und Rothman, J.E. (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, **92**, 759-772.

- Westermann, B. (2002) Merging mitochondria matters: Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep.*, **3**, 527-531.
- Westermann, B. und Neupert, W. (2000) Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **16**, 1421-1427.
- Wickner, W. (2002) Yeast vacuoles and membrane fusion pathways. *EMBO J.*, **21**, 1241-1247.
- Williamson, D.H. und Fennell, D.J. (1975) The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. *Methods Cell Biol.*, **12**, 335-351.
- Winston, J.T., Koepp, D.M., Zhu, C., Elledge, S.J. und Harper, J.W. (1999) A family of mammalian F-box proteins. *Curr. Biol.*, **9**, 1180-1182.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Leibundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. und Davis, R.W. (1999) Functional Characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901-906.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. und Nunnari, J. (2000) The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.*, **151**, 341-352.
- Yaffe, M.P. (1999a) Dynamic mitochondria. *Nat. Cell Biol.*, **1**, E149-E150.
- Yaffe, M.P. (1999b) The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science*, **283**, 1493-1497.
- Zimmerberg, J., Vogel, S.S. und Chernomordik, L.V. (1993) Mechanisms of membrane fusion. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 433-466.

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

Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. und Westermann, B. (2001) Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.*, **152**, 683-692.

Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B. (2002) The genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 847-853.

Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K.S., Neupert, W. und Westermann, B. (2003) The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.*, **160**, 553-564.

Fritz, S., Weinbach, N. und Westermann, B. (2003) Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol. Biol. Cell*, im Druck.

## **Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für sein Interesse am Fortgang der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen.

Bei Herrn PD Dr. Michael Meisterernst bedanke ich mich für seine Bereitschaft, meine Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dr. Benedikt Westermann für die gute Zusammenarbeit und die entscheidenden Hinweise und Anregungen bei der Planung der Experimente.

Mein besonderer Dank geht an Nicole Bauknecht, Kai-Stefan Dimmer, Jutta Dierolf, Florian Fuchs, Elisabeth Klanner, Gabriele Ludwig, Marlies Messerschmitt, Nadja Weinbach und Hanno Wolters für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung, die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Ferner möchte ich mich auch bei Frau Kirschner, Frau Döge, Frau Farsen und allen nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern für die freundliche Unterstützung bedanken.



## Lebenslauf

28.02.1971	Geboren in Heidelberg
1977-1982	Gesamtschule Schuldorf Bergstraße in Seeheim
1982-1990	Goethe-Gymnasium in Bensheim
1990	Abitur
1990-1991	Zivildienst, Kreiskrankenhauses Jugenheim
10/1991-10/1997	Studium der Chemie an der Technischen Universität Darmstadt
10/1997	Diplom
03/1997-10/1997	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. A. Skerra an der TU Darmstadt Thema: Substratoptimierung und Protein-Engineering der Glutathion-S-Transferase aus <i>Schistosoma japonicum</i>
10/1997-05/1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. Dr. h. c. R. K.-H. Kinne am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund
seit 06/1998	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München