

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

**Mdm31 und Mdm32:
Zwei neue Komponenten des mitochondrialen
Morphologie- und Vererbungsapparates**

von
Kai Stefan Dimmer
aus
Villingen-Schwenningen

München
2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Professor Dr. Dr. Walter Neupert und Professor Dr. Ralf-Peter Jansen betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München im November 2004

(Kai Stefan Dimmer)

Dissertation eingereicht am 19.11.2004

1. Gutachter Professor Dr. Dr. Walter Neupert

2. Gutachter Professor Dr. Ralf-Peter Jansen

Mündliche Prüfung am 21.12.2004

Für meine Eltern

Abkürzungen

| | |
|------------------------------|--|
| AAC | ADP/ATP-Carrier |
| ADP | Adenosin-5'-diphosphat |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| C-terminal | carboxyterminal |
| Ci | Curie |
| cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratzentimeter |
| CTP | Cytosin-5'-triphosphat |
| dATP | Desoxyadenosin-5'-triphosphat |
| dCTP | Desoxycytosin-5'-triphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosin-5'-triphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat |
| DsRed | <i>Discosoma red fluorescent protein</i> |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidin-5'-triphosphat |
| $\Delta\psi$ | Membranpotential |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| 5-FOA | 5-Fluororotsäure |
| FPLC | <i>fast protein liquid chromatography</i> |
| g | Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> aus <i>Aequorea</i> |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| h | Stunde(n) |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonat |
| Hsp | Hitzeschockprotein |
| IgG | Immunglobulin G |
| IPTG | Isopropylthiogalaktosid |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| kV | Kilovolt |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani-Medium (<i>E. coli</i> Nährlösung) |
| M | molar |
| m ⁷ G(5')ppp(5')G | 7-Methylguanosintriphosphat |
| mA | Milliampere |
| μCi | Mikrocurie |
| μF | Mikrofarad |
| mg | Milligramm |

| | |
|----------------------|--|
| µg | Mikrogramm |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| mM | millimolar |
| µM | mikromolar |
| mm | Millimeter |
| mmol | Millimol |
| MOPS | 3-[N-Morpholino]ethansulfonat |
| MPP | mitochondriale Prozessierungs-Peptidase |
| mt | mitochondrial |
| N-terminal | aminoterminal |
| NADH | Nikotinamidadenosindinukleotid, reduziert |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| OD | optische Dichte |
| ORF | offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>) |
| PAS | Protein A-Sepharose |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PEG | Polyethylenglycol |
| P _i | Phosphat |
| PK | Proteinase K |
| pmol | Pikomol |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| RFP | <i>red fluorescent protein</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNaseA | Ribonuklease A |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| SAP | Alkalische Phosphatase aus Shrimps |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| sec | Sekunde(n) |
| SEM | Sorbitol/EDTA/MOPS-Puffer |
| SMKCl | Sorbitol/MOPS/KCl-Puffer |
| Su9 | Untereinheit 9 des F ₀ -Teils der F ₁ F ₀ -ATPase |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TE | Tris/EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TIM-Komplex | Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran |
| TOB-Komplex | Proteinkomplex essentiell für die Topogenese von mitochondrialen <i>β-barrel</i> Außenmembranproteinen |
| TOM-Komplex | Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Einheiten (units) |
| UTP | Uridin-5'-triphosphat |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| Ω | Ohm |

| | |
|-------|--|
| w/v | Masse pro Volumen |
| w/w | Masse pro Masse |
| WT | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galaktopyranosid |
| YPD | Hefeextrakt/Pepton/Dextrose-Medium |
| YPG | Hefeextrakt/Pepton/Glycerin-Medium |
| YPGal | Hefeextrakt/Pepton/Galaktose-Medium |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Ursprung und Struktur der Mitochondrien | 1 |
| 1.2 | Physiologische Bedeutung der Mitochondrienmorphologie | 5 |
| 1.3 | Teilung und Fusion von Mitochondrien | 6 |
| 1.4 | Vererbung der Mitochondrien und mitochondrialer DNA | 7 |
| 1.5 | Motilität und Dynamik der Mitochondrien | 9 |
| 1.5.1 | Die Bedeutung des Zytoskelettes für Mitochondrien in <i>S. cerevisiae</i> | 9 |
| 1.5.2 | Der Transportmechanismus für Hefemitochondrien | 10 |
| 1.5.3 | Morphologiekomponenten der mitochondrialen Außenmembran | 12 |
| 1.6 | Fragestellung und Zielsetzung | 14 |
| 1.6.1 | Identifizierung neuer Gene der Mitochondrienmorphologie | 14 |
| 1.6.2 | Charakterisierung von Mdm31 und Mdm32, zweier neuer Komponenten der Mitochondrienmorphogenese | 15 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 2.1 | Molekularbiologische Methoden | 17 |
| 2.1.1 | Präparation von DNA | 17 |
| 2.1.1.1 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 17 |
| 2.1.1.2 | Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> | 18 |
| 2.1.1.3 | Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 18 |
| 2.1.1.4 | Konzentrationsbestimmung von DNA | 19 |
| 2.1.2 | Klonierung von DNA-Fragmenten | 19 |
| 2.1.2.1 | Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten | 19 |
| 2.1.2.2 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 19 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1.2.3 | Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Anionenaustauschersäulen | 20 |
| 2.1.2.4 | Restriktionsverdau von DNA | 20 |
| 2.1.2.5 | Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten | 20 |
| 2.1.2.6 | Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase | 20 |
| 2.1.2.7 | TA-Klonierung von PCR-Produkten | 21 |
| 2.1.2.8 | Präparation transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 21 |
| 2.1.2.9 | Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation | 21 |
| 2.1.2.10 | Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme | 22 |
| 2.1.2.11 | Für Klonierungen verwendete Primer | 22 |
| 2.1.2.12 | Verwendete Plasmide | 23 |
| 2.2 | Methoden der Hefegenetik | 25 |
| 2.2.1 | Verwendete Hefestämme | 25 |
| 2.2.2 | Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> | 29 |
| 2.2.3 | Kreuzung und Tetradenanalyse von <i>S. cerevisiae</i> | 30 |
| 2.2.4 | Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> („Tüpfeltest“) | 31 |
| 2.2.5 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Hefepiasmiden | 31 |
| 2.2.6 | Deletion nicht essentieller Gene in <i>S. cerevisiae</i> | 32 |
| 2.2.7 | Einfügen von DNA-Abschnitten in das Genom von <i>S. cerevisiae</i> | 35 |
| 2.2.7.1 | Anfügen von Peptid-Markern und GFP am C-Terminus („Epitope Tagging“) | 35 |
| 2.2.7.2 | Einfügen eines <i>GALI0</i> -Promotors vor einem Gen | 36 |
| 2.2.8 | Nachweis chromosomaler Insertionen/Deletionen in <i>S. cerevisiae</i> | 37 |
| 2.3 | Methoden der Zellbiologie | 38 |
| 2.3.1 | Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe | 38 |
| 2.3.2 | Subfraktionierung von Hefezellen | 38 |
| 2.3.3 | Mitochondrien-Schnellpräparation | 39 |
| 2.3.4 | Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> | 39 |
| 2.3.5 | Reinigung isolierter Mitochondrien mittels Saccharose-Stufen-Gradient | 40 |
| 2.3.6 | <i>In vitro</i> -Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien | 40 |
| 2.3.7 | Nachweis integraler Membranproteine, Carbonatextraktion | 41 |
| 2.3.8 | <i>In vivo</i> -Nachweis der mitochondrialen Fusion („Mating Assay“) | 42 |
| 2.3.9 | Färbung subzellulärer Strukturen in <i>S. cerevisiae</i> für die Fluoreszenzmikroskopie | 42 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.3.10 | DAPI-Färbung der mitochondrialen DNA | 44 |
| 2.3.11 | Fluoreszenzmikroskopie | 44 |
| 2.3.12 | Durchmusterung einer Hefestammsammlung nach Mutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie | 44 |
| 2.4 | Methoden der Proteinbiochemie | 45 |
| 2.4.1 | Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine <i>in vitro</i> | 45 |
| 2.4.1.1 | <i>In vitro</i> -Transkription | 45 |
| 2.4.1.2 | <i>In vitro</i> -Translation in Retikulozytenlysat | 46 |
| 2.4.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) | 46 |
| 2.4.3 | Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau | 47 |
| 2.4.4 | Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen | 47 |
| 2.4.5 | Reinigung von Inclusion-Bodies aus <i>E. coli</i> | 47 |
| 2.4.6 | Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure | 48 |
| 2.4.7 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 48 |
| 2.4.8 | Quervernetzung mitochondrialer Proteine | 49 |
| 2.4.9 | Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinkomplexen durch Gelfiltration | 49 |
| 2.4.10 | <i>In vitro</i> -Testsystem der Interaktion von <i>S. cerevisiae</i> -Mitochondrien mit filamentösem Aktin (Aktin Sedimentationsassay) | 50 |
| 2.5 | Immunologische Methoden | 52 |
| 2.5.1 | Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot) | 52 |
| 2.5.2 | Gewinnung polyklonaler Antikörper in Kaninchen | 53 |
| 2.5.3 | Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper | 53 |
| 2.5.4 | Koimmunfällung | 55 |
| 2.5.5 | Verwendete Antikörper | 56 |
| 2.6 | Puffer und Medien | 56 |
| 2.6.1 | Puffer | 56 |
| 2.6.2 | Medien | 57 |
| 2.7 | Chemikalien und Geräte | 58 |
| 2.7.1 | Chemikalien und Verbrauchsmaterial | 58 |
| 2.7.2 | Geräte | 59 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3 | ERGEBNISSE | 61 |
| 3.1 | Identifizierung neuer <i>MDM</i>-Gene | 61 |
| 3.2 | Zwei neue Komponenten des mitochondrialen Morphologie- und Vererbungsapparates: Mdm31 und Mdm32 | 65 |
| 3.2.1 | <i>In silico</i> Analyse von Mdm31 und Mdm32 | 65 |
| 3.2.2 | Mitochondrialer Phänotyp von $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Zellen | 68 |
| 3.2.3 | Lokalisierung von Mdm31 und Mdm32 | 72 |
| 3.2.3.1 | Mdm31 und Mdm32 werden membranpotentialabhängig in Mitochondrien importiert | 72 |
| 3.2.3.2 | Mdm31 und Mdm32 sind mitochondriale Proteine | 74 |
| 3.2.3.3 | Mdm31 und Mdm32 sind Membranproteine der mitochondrialen Innenmembran, deren Hauptteil im Intermembranraum liegt | 76 |
| 3.2.4 | Mdm31 und Mdm32 besitzen überlappende Funktionen | 80 |
| 3.2.5 | Mdm31 und Mdm32 liegen in zwei unterschiedlichen, transient interagierenden, höhermolekularen Komplexen vor | 81 |
| 3.2.6 | Mdm31 und Mdm32 beeinflussen indirekt die mitochondriale Fusioneffizienz | 85 |
| 3.2.7 | Epistatische Beziehung von <i>MDM31/MDM32</i> zu Genen des mitochondrialen Teilungs- und Fusionsapparates | 87 |
| 3.2.8 | Epistatische Beziehung von <i>MDM31</i> und <i>MDM32</i> zu <i>ATP21</i> , <i>MDM36</i> und <i>MAS37</i> | 89 |
| 3.2.9 | Wachstumsphänotyp von $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämmen | 91 |
| 3.2.10 | Verlust der mtDNA und Veränderungen der Nukleoidstruktur in $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ - Stämmen | 94 |
| 3.2.11 | Reduzierte Motilität der Mitochondrien in $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ - Stämmen | 95 |
| 3.2.12 | Aktininteraktion | 97 |
| 3.2.13 | Synthetisch letale Beziehung von <i>MDM31</i> , <i>MDM32</i> und <i>MMM1</i> , <i>MDM10</i> , <i>MDM12</i> , <i>MMM2</i> | 100 |
| 3.2.14 | Untersuchungen zur Interaktion von Mdm31 und Mdm32 mit Morphologiekomponenten der mitochondrialen Außenmembran | 104 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4 | DISKUSSION | 107 |
| 4.1 | Identifizierung neuer Morphologiekomponenten | 107 |
| 4.2 | Mdm31 und Mdm32: zwei neue Morphologiekomponenten der mitochondrialen Innenmembran | 111 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 119 |
| 6 | LITERATUR | 121 |

1 Einleitung

Die ersten mikroskopischen Beobachtungen von Mitochondrien reichen mehr als 100 Jahre zurück. So wurde der Begriff Mitochondrion, der sich aus dem Griechischen ableitet und übersetzt „Fadenkörperchen“ bedeutet (*mitos*, griech. Faden; *chondros*, griech. Korn), 1898 zum ersten Mal von C. Benda bei der Beschreibung intrazellulärer Strukturen verwendet. Vor weniger als 50 Jahren wurden Mitochondrien als Zellorganellen identifiziert und isoliert. Zunächst stand ihre Bedeutung bei katabolen Stoffwechselprozessen (z.B. Krebszyklus und oxidative Phosphorylierung) im Vordergrund, was zu der Vorstellung als „Kraftwerk der Zelle“ führte. Nach und nach wurden auch anabole Prozesse (z.B. Synthese einiger Aminosäuren, Lipidbiosynthese, Eisenschwefelclusterbiosynthese) in Mitochondrien entdeckt. Ihre Bedeutung bei vielen muskulären und neurologischen Erkrankungen, sowie die zentrale Rolle der Mitochondrien bei Vorgängen wie der Apoptose oder der Zellalterung wurden erst in den letzten Jahren offenkundig. Bei diesen zentralen zellulären Prozessen spielen die Morphologie und die Dynamik der Mitochondrien eine Rolle. Die genaue Bedeutung der Mitochondriengestalt und der mitochondrialen Dynamik ist bei vielen physiologischen Funktionen des Organells nicht bekannt. Ferner sind die molekularen Mechanismen der mitochondrialen Morphogenese nur ansatzweise entschlüsselt.

1.1 Ursprung und Struktur der Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die von zwei Lipidmembranen umgeben sind. Sie besitzen folglich vier verschiedene Kompartimente, die äußere und innere Membran, den von beiden Membranen eingeschlossenen Intermembranraum und die von der Innenmembran umgebene mitochondriale Matrix.

Mitochondrien entstammen einem Endosymbioseprozess, der im Laufe der Evolution einmal stattgefunden hat. Die aus einem Proteobakterium hervorgegangenen Organellen finden sich in fast allen Eukaryoten (Gray *et al.*, 1999). Wenige Spezies, ausschließlich Einzeller, die keine Mitochondrien im herkömmlichen Sinne aufweisen (Amitochondriatae), besitzen rudimentäre Mitochondrien. Dabei handelt es sich entweder um Mitosomen (Leon-Avila und Tovar, 2004) oder Hydrogenosomen, Organellen, die aus Pyruvat ATP synthetisieren und die Reduktionsäquivalente in elementarem Wasserstoff überführen (Embley *et al.*, 2003).

Das mitochondriale Genom (mtDNA) enthält neben Abschnitten für mitochondriale tRNAs und rRNAs nur wenige Gene. In *S. cerevisiae* werden acht, beim Menschen 13 Proteine der Komplexe der Atmungskette und mitochondrialer Ribosomen vom zirkulären Genom des Organells kodiert. Proteomexperimente mit isolierten Mitochondrien deuten allerdings auf ca. 1000 mitochondriale Proteine hin (Sickmann *et al.*, 2003). Fast das komplette Genom des „Urmitochondrions“ wurde im Laufe der Evolution in den Zellkern integriert. Folglich werden tausend verschiedene, zytosolisch synthetisierte Proteine über mehrere Proteinkomplexe der äußeren und inneren Mitochondrienmembran mit Hilfe spezifischer Abschnitte der Aminosäureprimärsequenz (sog. Zielsteuerungssequenzen) an den Ort ihrer Funktion dirigiert (Neupert, 1997; Neupert und Brunner, 2002). Da Mitochondrien nicht *de novo* von Zellen synthetisiert werden können, müssen mitochondriale Einheiten zusammen mit ihrer Erbinformation bei Mitose und Meiose an die Tochterzellen weitergegeben werden.

In *S. cerevisiae* finden sich ein bis zehn Organellen je Zelle als „Röhrensystem“ unterhalb des Zellcortex (Egner *et al.*, 2002). Auch für verschiedene Zelltypen unterschiedlicher Spezies wurden tubuläre Netzwerke beschrieben (Bereiter-Hahn, 1990; Brandt *et al.*, 1974; Johnson *et al.*, 1980). All diese Membransysteme unterliegen einem ständigen Gestaltwandel und sind somit höchst dynamische Einheiten. Sowohl die Vererbung der Mitochondrien als auch die Ausbildung des mitochondrialen Netzwerkes ist abhängig von Vorgängen wie Teilung, Fusion, gerichtetem Transport der Mitochondrien, sowie der Koordinierung der beiden Membranen der Mitochondrien (Außenmembran, Innenmembran) untereinander und mit der mitochondrialen DNA.

Zum Studium der mitochondrialen Morphologie und Dynamik wird häufig der Modellorganismus *S. cerevisiae* verwendet. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die bislang bekannten Morphologiekomponenten. Tabelle 1 enthält die wichtigsten Referenzen für die einzelnen Proteine.

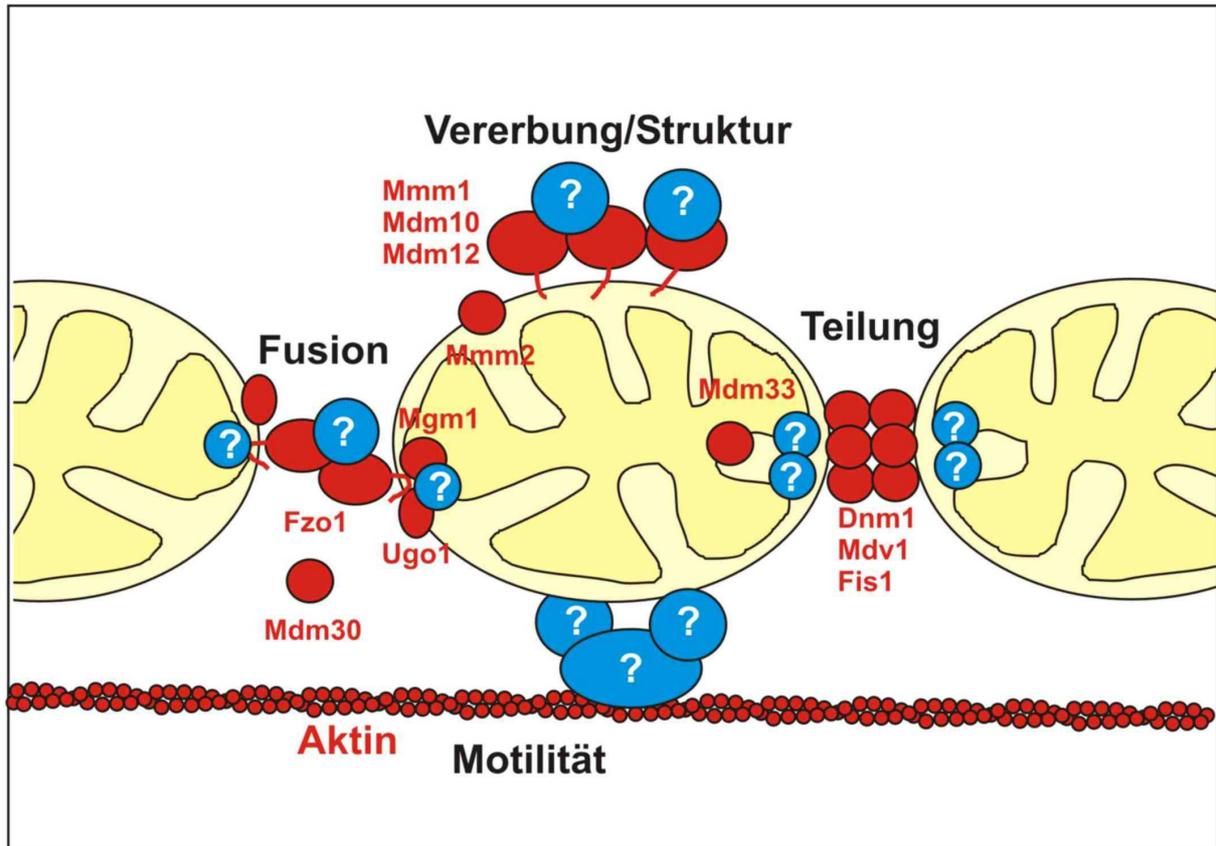


Abbildung 1: Molekulare Maschinerie der mitochondrialen Morphogenese in *S. cerevisiae*. Bekannte Komponenten sind mit Namen aufgeführt, zu erwartende Komponenten mit einem Fragezeichen markiert. Bekannte Proteine sind entsprechend ihrer Funktion gruppiert. Die Komponenten wurden so angeordnet, dass Interaktionen durch Kontakte in der Zeichnung veranschaulicht werden. (Abbildung ergänzt und erweitert nach B. Westermann, unveröffentlicht). Die Referenzen, die für die Erstellung dieser Abbildung verwendet wurden, enthält Tabelle 1.

Einleitung

| Protein | Phänotyp der Deletionsmutante | Lokalisation | Eigenschaften | Referenzen |
|---------------------|---|--|--|---|
| Fzo1 | Fragmentierte, aggregierte Mitochondrien; Fusionsdefekt | Mitochondriale Außenmembran | GTPase, zwei Transmembrandomänen | (Hermann <i>et al.</i> , 1998; Rapaport <i>et al.</i> , 1998; Sesaki und Jensen, 1999) |
| Ugo1 | Fragmentierte, aggregierte Mitochondrien; Fusionsdefekt | Mitochondriale Außenmembran | Transmembranprotein | (Sesaki und Jensen, 1999) |
| Mgm1 | Fragmentierte, aggregierte Mitochondrien; Fusionsdefekt | Mitochondrialer Intermembranraum und mitochondriale Innenmembran | Dynaminähnliche GTPase, zwei Varianten | (Guan <i>et al.</i> , 1993; Jones und Fangman, 1992; Shepard und Yaffe, 1999; Wong <i>et al.</i> , 2000; Herlan <i>et al.</i> , 2003; Sesaki <i>et al.</i> , 2003a) |
| Mdm30 | Fragmentierte, aggregierte Mitochondrien; Fusionsdefekt | Zytosol | F-Box-Protein | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002) (Fritz <i>et al.</i> , 2003) |
| Dnm1 | Netzartige Mitochondrien, Teilungsdefekt | Zytosol und Mitochondrien | Dynaminähnliche GTPase | (Bleazard <i>et al.</i> , 1999; Otsuga <i>et al.</i> , 1998; Sesaki und Jensen, 1999) |
| Mdv1 | Netzartige Mitochondrien, Teilungsdefekt | Zytosol und Mitochondrien | WD40-repeats Domäne | (Fekkes <i>et al.</i> , 2000; Mozdy <i>et al.</i> , 2000; Tieu und Nunnari, 2000) |
| Fis1 | Netzartige Mitochondrien, Teilungsdefekt | Mitochondriale Außenmembran | Transmembranprotein | (Mozdy <i>et al.</i> , 2000; Tieu und Nunnari, 2000) |
| Mmm1 | Riesenmitochondrien, Vererbungsdefekt | Mitochondriale Außenmembran | Transmembranprotein | (Burgess <i>et al.</i> , 1994; Aiken Hobbs <i>et al.</i> , 2001) |
| Mdm10 | Riesenmitochondrien, Vererbungsdefekt | Mitochondriale Außenmembran | Transmembranprotein | (Sogo und Yaffe, 1994) |
| Mdm12 | Riesenmitochondrien, Vererbungsdefekt | Mitochondriale Außenmembran | Transmembranprotein | (Berger <i>et al.</i> , 1997) |
| Mmm2 (Mdm34) | Riesenmitochondrien, Vererbungsdefekt | Mitochondriale Außenmembran | Transmembranprotein | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002; Youngman <i>et al.</i> , 2004) |
| Mdm31 | v.a. Riesenmitochondrien, Vererbungsdefekt | Mitochondriale Innenmembran | Transmembranprotein | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002; diese Arbeit) |
| Mdm32 | v.a. Riesenmitochondrien, Vererbungsdefekt | Mitochondriale Innenmembran | Transmembranprotein | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002; diese Arbeit) |
| Mdm33 | Ring- und kugelförmige Mitochondrien, Innenmembranteilungsdefekt | Mitochondriale Innenmembran | Transmembranprotein | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002; Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003) (diese Arbeit) |
| Mdm35 | Riesenmitochondrien | - | - | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002) |
| Mdm36 | z.T. aggregierte, z.T. netzartige Mitochondrien (ähnlich zu $\Delta dnm1$) | - | - | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002) |
| Pcp1 (Mdm37) | Fragmentierte, aggregierte Mitochondrien | Mitochondriale Innenmembran | Transmembranprotein, Protease | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002; Esser <i>et al.</i> , 2002; Herlan <i>et al.</i> , 2003; McQuibban <i>et al.</i> , 2003) |
| Mdm38 | Große Mitochondrien mit wenigen Verzweigungen | Vorhergesagtes Membranprotein | - | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002) |
| Mdm39 | Fragmentierte Mitochondrien | Vorhergesagtes Membranprotein | - | (Dimmer <i>et al.</i> , 2002) |

Tabelle 1: *S. cerevisiae*-Proteine des mitochondrialen Morphologie- und Vererbungsapparates. Als Referenzen sind die Arbeiten angegeben in denen die Komponenten zum ersten Mal beschrieben wurden, sowie wichtige Arbeiten zur funktionellen Charakterisierung.

1.2 Physiologische Bedeutung der Mitochondrienmorphologie

Viele verschiedene Zelltypen in unterschiedlichsten Spezies weisen ein vernetztes mitochondriales System auf. In einigen Zellen kommen morphologisch und funktionell unterschiedliche Mitochondrienpopulationen vor (Collins *et al.*, 2002). Ständig unterliegen Mitochondrien Fusions- und Teilungsvorgängen. Die Morphologie und intrazelluläre Verteilung der Mitochondrien variiert auch zwischen den verschiedenen Zelltypen eines Organismus (Bereiter-Hahn, 1990; Bereiter-Hahn und Vöth, 1994; Griparic und van der Blik, 2001; Warren und Wickner, 1996). Verschiedenste zelluläre Funktionen werden durch die mitochondriale Morphologie, Dynamik und Verteilung entscheidend beeinflusst.

Teilungsvorgänge sind für die Vererbung von Mitochondrien von großer Bedeutung (Labrousse *et al.*, 1999). Ferner spielt die Teilung von Mitochondrien bei der Apoptose eine entscheidende Rolle (Frank *et al.*, 2001). Es könnten zwei Subpopulationen an Mitochondrien entstehen, wobei die eine für die Freisetzung des Apoptose auslösenden Cytochrom c, die andere für die Aufrechterhaltung der Energiebereitstellung verantwortlich ist. Die Fusion von Mitochondrien dient dazu, mitochondriale Membranen und deren Inhalte zu vermischen. Für das mitochondriale Genom bedeutet dies die Möglichkeit der Rekombination. Bei der sauerstoffabhängigen ATP-Produktion (oxidative Phosphorylierung) an der mitochondrialen Innenmembran entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die die mitochondriale DNA (mtDNA) schädigen. Durch Rekombination könnten somatische Mutationen, die einen Defekt der Atmungskettenproteine zur Folge haben könnten, eliminiert werden (Ono *et al.*, 2001). Dies würde einen Schutzmechanismus gegen verfrühte Zellalterung darstellen. Eine weitere wichtige Bedeutung kommt der mitochondrialen Fusion bei der Differenzierung bestimmter Zellen zu. So erfolgt bei der Ausbildung der Spermien in *Drosophila melanogaster* eine drastische Umstrukturierung der Mitochondrien, bei der Fusionsvorgänge essentiell sind (Hales und Fuller, 1997).

In humanen Fibroblasten wurde ein einheitliches Membranpotential entlang der mitochondrialen Schlauchsysteme nachgewiesen (Amchenkova *et al.*, 1988). Folglich könnte über ein „mitochondriales Kabelsystem“ chemiosmotische Energie in verschiedene Bereiche

der Zelle übertragen werden. So werden in Muskelzellen mehrere Schichten von Mitochondrien direkt unterhalb der Plasmamembran (Sarkolemma) gefunden, die über mitochondriale Filamente mit den Mitochondrien im sauerstoffarmen Zellinneren verbunden sind (Skulachev, 2001).

1.3 Teilung und Fusion von Mitochondrien

Zwei grundlegende Prozesse der Ausbildung der mitochondrialen Gestalt sind die Teilung sowie die Fusion der Mitochondrien. Als erstes Protein des mitochondrialen Teilungsapparates wurde die dynaminähnliche GTPase Dnm1 (Drp1 in Mammalia) identifiziert (Otsuga *et al.*, 1998; Smirnova *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae* weisen Deletionsstämme von *DNM1* eine veränderte Mitochondrienmorphologie auf. Durch fehlende Teilung der Mitochondrien bei fortschreitender Fusion entsteht ein netzförmiges mitochondriales System, welches sich nur auf einer Seite der Hefezelle befindet (Bleazard *et al.*, 1999). In den letzten Jahren wurden v.a. in *S. cerevisiae* weitere Proteine des mitochondrialen Teilungsapparates entdeckt und charakterisiert. Fis1 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran (Mozdy *et al.*, 2000). Mdv1 ist ein lösliches Protein, das sich wie Dnm1 an spezifischen Positionen der Mitochondrienoberfläche findet (Fekkes *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Es wird angenommen, dass Dnm1 und Mdv1 an Fis1 binden und an mitochondriale Teilungsstellen rekrutiert werden. Dieser trimere Proteinkomplex leitet daraufhin die Teilung ein (Tieu *et al.*, 2002).

Die erste Proteinkomponente der mitochondrialen Fusion wurde in *Drosophila melanogaster* entdeckt. Das „fuzzy onions“-Gen (*fzo*) kodiert eine membranständige GTPase, die in *Drosophila* bei der Spermatogenese eine Rolle bei der korrekten Strukturierung der Mitochondrien am Flagellum spielt (Hales und Fuller, 1997). Die Deletion des *FZO1*-Gens in Hefe führt zu fragmentierten Mitochondrien (Rapaport *et al.*, 1998). Ferner wird ein Verlust der mitochondrialen DNA beobachtet (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Fzo1 besitzt zwei Transmembrandomänen nahe dem C-Terminus, die beide durch die mitochondriale Außenmembran führen. Sowohl der N-Terminus mit der GTPase-Domäne sowie der C-Terminus ragen ins Zytosol. Der Abschnitt zwischen den beiden Transmembrandomänen sorgt durch die Interaktion mit einem bislang unbekanntem Innenmembranprotein für die Assoziation der beiden mitochondrialen Membranen (Fritz *et al.*, 2001). Diese Verknüpfung der beiden Membranen spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Koordinierung der Lipidmembranen bei Fusionsvorgängen. Zwei

weitere Proteine, die bei der Fusion von Mitochondrien eine Funktion besitzen, sind Ugo1 und Mgm1. Während Ugo1 ein mitochondriales Außenmembranprotein ist (Sesaki und Jensen, 2001), kommt Mgm1 in zwei verschiedenen Formen vor, als Innenmembranprotein und als kürzere Intermembranraumspezies (Guan *et al.*, 1993; Herlan *et al.*, 2003; Jones und Fangman, 1992; Sesaki *et al.*, 2003b; Shepard und Yaffe, 1999; Wong *et al.*, 2000). Nach jüngsten Ergebnissen sind Fzo1, Ugo1 und Mgm1 als funktionelle Einheit an der mitochondrialen Fusion beteiligt (Sesaki und Jensen, 2004; Wong *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* sind die Fusion und die Teilung der Mitochondrien antagonistische Prozesse. Werden sowohl *FZO1* als auch *DNMI* deletiert, zeigt der Doppeldeletionsstamm wieder das verzweigte tubuläre mitochondriale Netzwerk des Wildtyps (Sesaki und Jensen, 1999).

Über die Regulationsmechanismen der Teilungs- und Fusionsprozesse ist relativ wenig bekannt, allerdings nimmt der Proteinabbau durch das Proteasom Einfluss auf die mitochondriale Fusion. Mutationen im Gen *RPNI/MPRI*, welches eine Untereinheit des Hefeproteasoms kodiert, führen zu fragmentierten Mitochondrien (Rinaldi *et al.*, 1998). Mutationen im *RSP5*-Gen, welches eine essentielle Ubiquitinligase kodiert, bewirken ebenfalls einen mitochondrialen Morphologiedefekt (Fisk und Yaffe, 1999).

1.4 Vererbung der Mitochondrien und mitochondrialer DNA

Früh im Zellzyklus nähern sich Mitochondrien der Stelle, an der eine neue Knospe der Hefezelle entsteht. Während der S- und G₂-Phase werden Mitochondrien in die wachsende Knospe transportiert. Neu vererbte Mitochondrien scheinen zunächst an der Spitze der Knospe immobilisiert zu sein (Simon *et al.*, 1997), andere Mitochondrien werden am gegenüberliegenden Ende der Mutterzelle verankert (Yang *et al.*, 1999). Nach Abschluss der Mitose und Zytokinese werden die Mitochondrien wieder freigegeben und verteilen sich neu. Die temporäre Fixierung der Mitochondrien dient der gleichmäßigen Verteilung auf Mutter- und Tochterzelle (Boldogh *et al.*, 2001b).

Die meisten Erkenntnisse über die Vererbung der Mitochondrien und deren Genom wurden im Modellorganismus *S. cerevisiae* gewonnen. Als fakultativ anaerobe Hefespezies kann dieser Organismus Defekte bzw. den kompletten Verlust der mitochondrialen DNA (mtDNA) bei Wachstum auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen tolerieren. Mutanten, die keine oder keine funktionelle mtDNA mehr besitzen, werden als *petite* (*pet*) bezeichnet. Dies resultiert aus der Beobachtung, dass mtDNA defiziente (respiratorisch inaktive) Hefen auf Medien mit einer limitierenden Menge an fermentierbaren Kohlenstoffquellen kleinere

Kolonien ausbilden als respiratorisch aktive Stämme (zur Übersicht siehe Tzagoloff und Dieckmann, 1990). Die *pet*-Stämme werden unterteilt in ρ^- -Stämme, die allgemein einen Defekt der mtDNA aufweisen und in ρ^0 -Stämme, die ihre mtDNA komplett verloren haben.

Hefezellen enthalten 50-100 Kopien des mitochondrialen Genoms (mtDNA). Diese DNA wird in Protein-DNA-Partikel, so genannte Nukleoide, verpackt (Williamson und Fennell, 1979). Die Nukleoide (ca. 10-20 je Zelle) sind entlang der Mitochondrienröhren verteilt. Die Verteilung der mtDNA auf Mutter- und Tochterzelle erfolgt nicht passiv, sondern in einem aktiven, kontrollierten Prozess. Dies zeigten schon frühe Untersuchungen an Zygotenknospen. Werden haploide Hefen mit markierter mtDNA nach der „Paarung“ (sog. Mating) untersucht, so findet sich in mittelständigen Knospen, d. h. in Knospen, die sich am Zygotenhals bilden ein mtDNA-Gemisch der Elternzellen (heteroplasmische Knospen). Endständige Knospen, die an einer der Elternzellen entstehen, besitzen fast ausschließlich die mtDNA dieser Elternzelle (homoplasmische Knospen) (Birky, 2001). MtDNA eines Elternstammes, die mit 5-Bromodeoxyuridin markiert wurde, verbleibt nach dem Mating zunächst in einer Hälfte der Zygote, während sich sowohl Matrix- als auch Membranproteine auf die gesamte Zygote verteilten (Nunnari *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen lassen auf eine Verankerung der Nukleoide an der Innenmembran und eine aktive, kontrollierte Verteilung schließen. Werden heteroplasmische Stämme (Stämme mit zwei verschiedenen mtDNA-Typen) kultiviert, so entstehen durch mitotische Teilungen homoplasmische Zellen (ein mtDNA-Typ) schneller, als es statistisch zu erwarten wäre. Des Weiteren beobachtet man bei der Kreuzung eines Wildtyp-Stammes (ρ^+) mit einem Stamm der keine mtDNA besitzt (ρ^0) in allen Knospen mtDNA (Azpiroz und Butow, 1993). Es existiert folglich ein Kontrollmechanismus, der dafür Sorge trägt, dass mtDNA auf die Tochterzelle übertragen wird.

Eine Reihe von Genen ist bekannt, die für den Erhalt mitochondrialer DNA von Bedeutung sind. Meist handelt es sich um Gene, die Proteine kodieren, welche eine Funktion bei der Replikation, der Reparatur, der Rekombination, der Expression der mitochondrialen DNA oder der oxidativen Phosphorylierung besitzen (Dimmer *et al.*, 2002; zur Übersicht siehe Berger und Yaffe, 2000). Manche Mutationen, die einen Einfluss auf die mtDNA haben, betreffen Gene, die Komponenten der mitochondrialen Morphogenese kodieren. So führen Deletionen von *FZO1* und *MGMI* (s.o.) rasch zum Verlust des mitochondrialen Erbgutes (Guan *et al.*, 1993; Hermann *et al.*, 1998; Jones und Fangman, 1992; Rapaport *et al.*, 1998). Hierbei handelt es sich um einen Sekundäreffekt der Morphologieaberration. Ein Verlust von *MMM1*, *MDM10*, *MDM12* oder *MMM2* führt zu veränderter Nukleoidstruktur und

verringertes Nukleoidstabilität (Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003; Youngman *et al.*, 2004) (s.u.). Bisher ist jedoch kein Protein bekannt, welches für die kontrollierte, aktive Verteilung der mtDNA verantwortlich ist.

Eine in dieser Hinsicht interessante Komponente stellt das Protein Mgm101 dar. *MGM101* wurde als essentielles Gen für den Erhalt der mtDNA identifiziert. Das Translationsprodukt wurde in Nukleoidpräparationen nachgewiesen. *In vivo* wurde gezeigt, dass Mgm101 mit Nukleoiden kolokalisiert, *in vitro* bindet es an isolierte DNA. Weitere Versuche weisen auf eine Funktion von Mgm101 bei der Reparatur von mtDNA-Schäden, die durch UV-Licht oder ROS verursacht wurden hin (Meeusen *et al.*, 1999). In einer weiteren Arbeit zeigten dieselben Autoren, dass Mgm101 eine Untereinheit eines Proteinkomplexes darstellt, der beide mitochondrialen Membranen durchspannt und für den Erhalt der mtDNA von Bedeutung ist (Meeusen und Nunnari, 2003). Dieser Komplex enthält ebenso die mitochondriale DNA-Polymerase Mip1.

Abf2 ist ein Protein der HMG-Familie (*high mobility group*) der DNA-bindenden Proteine und kolokalisiert *in vivo* mit Nukleoiden (Diffley und Stillman, 1991). Der Expressionsstatus des Proteins hat Einfluss auf die Organisation, den Erhalt, die Kopienzahl und die Rekombination der mtDNA (zur Übersicht siehe Contamine und Picard, 2000). Über seine genaue Funktion ist nichts bekannt. Eine den Histonproteinen des Kerns entsprechende Bedeutung wird diskutiert.

1.5 Motilität und Dynamik der Mitochondrien

1.5.1 Die Bedeutung des Zytoskelettes für Mitochondrien in *S. cerevisiae*

Wie die meisten Organellen unterliegen auch Mitochondrien einem aktiven Transportprozess in der Zelle. Während für viele Organismen ein Transport entlang des Mikrotubulizytoskelettes nachgewiesen wurde, z.B. in *S. pombe* (Yaffe *et al.*, 1996), *Drosophila melanogaster* (Pereira *et al.*, 1997) und *Mus musculus* (Tanaka *et al.*, 1998), werden Mitochondrien in *S. cerevisiae* entlang des Aktinzytoskelettes bewegt. In der Gegenwart von Nocodazol, einem Mikrotubuli destabilisierendem Agens, sowie bei Mutationen, die in nichtfunktionellen Mikrotubuli resultieren, werden Mitochondrien nach wie vor in die Tochterzelle transportiert (Huffaker *et al.*, 1988; Jacobs *et al.*, 1988). Mutationen im *ACT1*-Gen, welches Aktin kodiert, oder eine Behandlung mit Latrunculin A, einer monomeres Aktin stabilisierenden Chemikalie, führen zur Fragmentierung der

Mitochondrien und einem verminderten Transport in die Tochterzelle (Smith *et al.*, 1995) (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994). In einem *in vitro*-System wurde eine mit der Außenmembran von Mitochondrien peripher assoziierte Proteinfraction nachgewiesen, welche für die ATP-abhängige Interaktion des Organells mit filamentösem Aktin verantwortlich ist (Boldogh *et al.*, 1998). Von den zwei Hauptkomponenten des Aktinzytoskelettes, Aktin-Bündel und Aktin-Patches, scheinen die Aktin-Bündel (mehrere Stränge von filamentösem Aktin) für die Interaktion mit den Organellen von Bedeutung zu sein. Diese dienen als „Schienen“ für Myosin-Motorproteine, und es wurde außerdem eine Kolokalisation von Mitochondrien mit diesen filamentartigen Strukturen gezeigt (Drubin *et al.*, 1993). Des Weiteren destabilisiert eine Deletion des Tropomyosins (*TPM1*) diese Aktin-Bündel und führt zum Verlust des gerichteten Mitochondrientransportes in die Tochterzelle (Simon *et al.*, 1997). Neben *tpm1*-Mutanten weisen auch *mdm20*-Mutanten sowohl destabilisierte Aktin-Bündel als auch verminderten mitochondrialen Transport auf (Hermann *et al.*, 1997).

Auch das System der Intermediärfilamente, einer heterogenen Gruppe verschiedener Proteine des Zytoskelettes, scheint an der Morphogenese der Mitochondrien beteiligt zu sein. *MDMI* kodiert ein Protein, welches Homologien zu anderen Intermediärfilamentproteinen aufweist, *in vitro* in 10 nm Fibrillen polymerisiert und eine punktierte Verteilung über die gesamte Zelle zeigt (McConnell und Yaffe, 1993; McConnell und Yaffe, 1992). Mutationen in *MDMI* führen zu kleinen, abgerundeten Mitochondrien (Fisk und Yaffe, 1997). Da keine Intermediärfilament-abhängigen Motoren bekannt sind, wird für Mdm1 eine Rolle bei der Fixierung der Mitochondrien in der Zelle und damit der Formgebung angenommen.

1.5.2 Der Transportmechanismus für Hefemitochondrien

Die Aktinabhängigkeit der Mitochondrienmorphologie in *S. cerevisiae* spricht für eine Rolle eines Myosin-Motorproteins beim aktiven Transport der Organellen. In Hefe sind fünf Myosine bekannt (*MYO1-5*), jedoch ist die mitochondriale Motilität in allen bekannten Einzelmutanten (*myo1*, *myo2*, *myo3*, *myo4* und *myo5*), sowie in den Doppelmutanten *myo2-myo4* und *myo3-myo5* unverändert (Goodson *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1995). Diese Beobachtungen legen einen aktinabhängigen, aber myosinunabhängigen Mechanismus nahe. Unlängst wurde eine Funktion des Myosins Myo2 bei der Fixierung neu vererbter Mitochondrien in der Tochterzelle gezeigt. Sowohl Myo2 als auch sein Rab-ähnlicher Bindungspartner Ypt11 sind dafür verantwortlich, dass Mitochondrien an der Tochterzellenspitze fixiert werden (Boldogh *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2002). Im selben Prozess

scheint ein weiteres Protein, Mmr1, durch eine Interaktion mit Myo2 in der Tochterzelle eine Rolle zu spielen (Itoh *et al.*, 2004). Myosine sind folglich für die Vererbung von Mitochondrien an die Tochterzelle notwendig, allerdings nicht für den Transport entlang der Aktin-Bündel.

In einer anderen Arbeit wurde in der peripher mit der Außenmembran assoziierten Proteinfraction, die für die Interaktion von Mitochondrien mit filamentösem Aktin verantwortlich ist, das Protein Arc15 nachgewiesen, welches eine Untereinheit des Arp2/3-Komplexes ist (Boldogh *et al.*, 2001a). Der Arp2/3-Komplex findet sich in allen eukaryotischen Zellen und besteht aus Arp2 und Arp3 (zwei aktinähnlichen Proteinen) sowie fünf weiteren Untereinheiten. Der Proteinkomplex ist in menschlichen Zellen für die Bewegung von intrazellulären bakteriellen Erregern, wie z.B. *Listeria monocytogenes*, verantwortlich (zur Übersicht siehe Frischknecht und Way, 2001). Der Arp2/3-Komplex bindet an Rezeptoren auf der Oberfläche des Bakteriums und induziert die Polymerisierung von Aktin. Eine Kometenschweif-ähnliche Aktinstruktur bewegt das Bakterium vorwärts. Mehrere Beobachtungen weisen auf eine ähnliche Funktion des Arp2/3-Komplexes bei der Bewegung von Mitochondrien in *S.cerevisiae* hin. Untereinheiten des Arp2/3 Komplexes finden sich auf isolierten Mitochondrien und können auch *in vivo* auf dem Organell nachgewiesen werden (Boldogh *et al.*, 2001a). Mutationen in Komponenten des Proteinkomplexes schränken die Motilität von Mitochondrien ein. Wie für die Bewegung von *L. monocytogenes* ist auch für die Bewegung von Mitochondrien in Bäckerhefe eine permanente Polymerisierung und Depolymerisierung von Aktin nötig. Wird die Aktindynamik gehemmt, kommt zum einen die Bewegung von *L. monocytogenes* zum Erliegen (Sanger *et al.*, 1995), zum anderen nehmen sowohl die Geschwindigkeit als auch die Häufigkeit der mitochondrialen Bewegung in *S. cerevisiae* ab (Boldogh *et al.*, 2001a). So genannte „Aktin-Wolken“, wie sie sich in mit *L. monocytogenes* infizierten Zellen beobachten lassen, findet man jedoch lediglich in Hefezellen, in welchen die Aktin-Bündel destabilisiert wurden. Da im Gegensatz zur bakteriellen Bewegung bei Mitochondrien eine gerichtete, durch Aktin-Bündel vermittelte Bewegung beobachtet wird, wird spekuliert, dass die Aktin-Kabel die Richtung vorgeben, während der Arp2/3 Komplex durch Polymerisierung von Aktin die Energie bereit stellt (Boldogh *et al.*, 2001a). Für die Interaktion der Mitochondrien mit Aktin-Kabeln sind vermutlich noch unbekannte Komponenten der Außenmembran verantwortlich.

1.5.3 Morphologiekomponenten der mitochondrialen Außenmembran

Im Rahmen von genetischen Screens auf der Suche nach Proteinen, welche einen Einfluss auf die Vererbung von Mitochondrien ausüben, wurden vier integrale mitochondriale Außenmembranproteine gefunden: Mmm1 (Burgess *et al.*, 1994), Mdm10 (Sogo und Yaffe, 1994), Mdm12 (Berger *et al.*, 1997) und Mmm2 (Mdm34) (Dimmer *et al.*, 2002; Youngman *et al.*, 2004). Mmm1, Mdm10 und Mdm12 bilden einen Proteinkomplex in der mitochondrialen Außenmembran (Boldogh *et al.*, 2003). Deletionsmutanten zeigen für alle drei Proteine einen veränderten mitochondrialen Phänotyp. Sie bilden Riesenmitochondrien aus. Daneben akkumulieren die Zellen mitotische Knospen, in denen keine Mitochondrien nachweisbar sind. Dies weist auf einen Defekt der Motilität und daraus resultierend der Vererbung der Organellen hin. Mutationen in den Genen *MMM1* und *MDM10* führen zum Verlust der gerichteten Bewegung der Mitochondrien. Außerdem geht die Aktininteraktion im zellfreien System verloren (Boldogh *et al.*, 1998). Des Weiteren werden Veränderungen in der Nukleoidstruktur beobachtet. Mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden wurde gezeigt, dass Mmm1, Mdm10 und Mdm12 an definierten Positionen der Außenmembran in Nachbarschaft zu Nukleoiden lokalisiert sind (Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003). Alle diese Beobachtungen deuten auf eine Funktion des Mmm1/Mdm10/Mdm12-Komplex bei der Interaktion der Mitochondrien mit dem Aktinzytoskelett und bei der Vererbung der mtDNA hin.

Wenn Hefezellen allerdings mit Latrunculin A behandelt werden, um das Aktinzytoskelett zu destabilisieren, findet man keine Riesenmitochondrien sondern kleine fragmentierte Einheiten des Organells (Boldogh *et al.*, 1998). Ferner zeigt die Deletion des Homologen von *MMM1* in *Neurospora crassa*, in dem das Tubulinsystem für den Transport von Mitochondrien verantwortlich ist, einen ähnlichen mitochondrialen Phänotyp wie $\Delta mmm1$ -Mutanten von *S. cerevisiae* (Prokisch *et al.*, 2000), jedoch keinen Verlust der Interaktion mit Mikrotubuli im *in vitro*-System (Fuchs *et al.*, 2002). Das homologe Protein aus *N. crassa* kann die Deletion von *MMM1* in *S. cerevisiae* kompensieren (Kondo-Okamoto *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Funktion von Mmm1 bei der Interaktion mit dem Aktinzytoskelett.

Mmm2 (Mdm34) ist ein Protein der mitochondrialen Außenmembran, das als höhermolekularer Komplex vorliegt. Eine Interaktion mit dem Mmm1/Mdm10/Mdm12 Komplex konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings hat Mmm2 einen Einfluss auf den Mmm1-Gehalt der Zelle. Mmm1 ist verantwortlich für die punktierte Lokalisierung von Mmm2 auf Mitochondrien. Der Deletionsphänotyp ähnelt hinsichtlich der

Mitochondrienmorphologie und der veränderten Nukleoidstruktur dem der Gene *MMMI*, *MDM10* und *MDM12*. (Youngman *et al.*, 2004). Die Vermutung liegt nahe, dass die vier Außenmembranproteine an demselben Prozess beteiligt sind.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Obwohl einige Komponenten der mitochondrialen Morphogenese und Vererbung bereits bekannt sind, sind noch viele Zusammenhänge ungeklärt. So ist über die Koordination der beiden Membranen des Organells bei den Prozessen der mitochondrialen Morphogenese kaum etwas bekannt. Welche Proteine der mitochondrialen Innenmembran treten in Kontakt zu den bekannten Morphologiekomponenten der Außenmembran? Welche Mechanismen liegen der aktiven, kontrollierten Vererbung der mitochondrialen Erbinformation zu Grunde? Wie ist die Vererbung der mitochondrialen DNA an die Vererbung der Mitochondrien per se gekoppelt? Wie erfolgt die Regulation der mitochondrialen Morphogenese? Die Identifizierung und Charakterisierung neuer Komponenten sowie deren Einordnung in das Gesamtsystem der mitochondrialen Morphogenese sollen dazu beitragen, das Bild des mitochondrialen Morphologie- und Vererbungsapparates zu erweitern und gleichzeitig abzurunden.

1.6.1 Identifizierung neuer Gene der Mitochondrienmorphologie

Als fakultativ anaerobe Hefeart stellt *S. cerevisiae* einen idealen Modellorganismus zur Untersuchung mitochondrialer Funktionen dar. Viele Mutationen in Genen, die mitochondriale Proteine kodieren, sind nicht letal, da der Energiehaushalt durch die Glykolyse gedeckt und somit eine reduzierte mitochondriale Funktionalität kompensiert werden kann. Methoden zur Gendisruption und zur Integration spezifischer Elemente in das Genom sind etabliert. Eine vielfältige Auswahl an Vektoren zur Expression von Proteinen steht zur Verfügung. Viele biochemische Methoden für Studien an isolierten Mitochondrien sind bekannt. Ferner lassen sich Mitochondrien für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durch so genannte „vital dyes“ anfärben. Dies sind meistens Farbstoffe, die auf Grund ihrer Ladung vom Membranpotential abhängig in Mitochondrien inkorporiert werden. Die Verwendung von GFP (grün fluoreszierendes Protein), gekoppelt an eine mitochondriale Zielsteuerungssequenz (Westermann und Neupert, 2000), erlaubt eine stabile Färbung der Mitochondrien auch in Stämmen, die ein verringertes mitochondriales Membranpotential aufweisen.

Seit 1996 ist das Genom von *S. cerevisiae* bekannt. Es umschließt ca. 6300 Gene, die ein Protein kodieren könnten. Hiervon sind ca. 1500 Gene essentiell. Von einem internationalen Konsortium wurde eine Stammsammlung erstellt, die alle nichtessentiellen Gene als Deletionsmutanten enthält (Giaever *et al.*, 2002; Winzeler *et al.*, 1999).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten in einer Kooperation der Arbeitsgruppe die 4794 Disruptionsmutanten der nicht essentiellen Gene auf einen Defekt sowohl der Zellatmung als auch der mitochondrialen Morphologie und Vererbung untersucht werden. Dabei sollten bislang unbekannte Proteine, die einen Einfluss auf die mitochondriale Gestalt nehmen, identifiziert werden.

1.6.2 Charakterisierung von Mdm31 und Mdm32, zweier neuer Komponenten der Mitochondrienmorphogenese

Die bisher bekannten Proteine des mitochondrialen Vererbungs- und Morphologieapparates sind v.a. in der mitochondrialen Außenmembran (Fzo1, Ugo1, Fis1, Mmm1, Mdm10, Mdm12 etc.) oder im Zytosol lokalisiert und peripher an Mitochondrien assoziiert (Dnm1 und Mdv1). Lediglich für Mgm1 ist eine Lokalisation in der Innenmembran und im Intermembranraum beschrieben (s.o.). Alle Prozesse, die die mitochondriale Morphologie bestimmen, benötigen jedoch eine Koordination der Außen- und Innenmembran des Organells. Bei Durchmusterung der Stammsammlung wurde eine veränderte Mitochondrienmorphologie für die Deletionsstämme der ORFs (*open reading frame*) *YHR194W* und *YOR147W* beobachtet. Die beiden Gene kodieren potentielle mitochondriale Innenmembranproteine. Damit sind die Translationsprodukte dieser Gene Kandidaten für Interaktionspartner einer der bekannten Außenmembrankomponenten. Es sollten Informationen über die generellen Eigenschaften dieser Proteine erhalten, sowie ihre Bedeutung und Funktion für den mitochondrialen Morphologie- und Vererbungsapparat untersucht werden.

2 Material und Methoden

Häufig verwendete Puffer und Medien, die nicht im Zusammenhang mit den jeweiligen Methoden beschrieben sind, werden in Kapitel 2.5 aufgelistet. Hersteller der verwendeten Chemikalien werden in Kapitel 2.6 aufgeführt.

2.1 Molekularbiologische Methoden

(Sambrook *et al.*, 1989)

2.1.1 Präparation von DNA

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

(Birnboim und Doly, 1979)

Kleine Mengen an Plasmid-DNA wurden nach der Methode der alkalischen Lyse aus *E. coli*-Zellen gewonnen. Die Bakterien wurden in 3 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden 30 sec bei 15.000 g bei RT in einer Eppendorf-Tischzentrifuge geerntet und in 300 µl der Lösung E1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Es wurden 300 µl Lösung E2 (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Lösung E3 (3,2 M Kaliumacetat pH 5,5) zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Ausgefällene Proteine und chromosomale DNA wurden 10 min bei 15.000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abgetrennt. Der Überstand wurde mit 650 µl Isopropanol gemischt und 10 min bei 15.000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach Waschen mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol und anschließendem Trocknen wurde die gefällte Plasmid-DNA in 20 bis 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde der Jetstar®-Kit der Firma Genomed mit 50 ml Ausgangskultur verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Als Ausgangskultur dienten 40 ml einer über Nacht bei 30°C im Schüttler inkubierten YPD-Kultur des entsprechenden Stammes. Die Zellen wurden bei RT in einer Zentrifuge bei 5.000 g 5 min geerntet. Nach Resuspendieren in 3 ml 0,9 M Sorbitollösung mit 0,1 M EDTA, pH 7,5, wurde Zymolyase der Firma Seigaku mit einer Endkonzentration von 300 µg/ml zugegeben und der Ansatz zur Sphäroblastengewinnung eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Sphäroblasten wurden pelletiert (5.000 g, 5 min) in 5 ml Trispuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 20 mM EDTA) aufgenommen und mit 1% (w/v) SDS versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 65°C wurden 1,5 ml einer 5 M Kaliumacetatlösung zugegeben und der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (12.000 g, 10 min) wurde der Überstand abgenommen und mit 2 Vol. Ethanol p.a. gemischt. Nach Zentrifugation (15.000 g, 15 min) und Trocknen des Pellets wurde dieses in 3 ml TE-Puffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (12.000 g, 15 min) wurde dem Überstand 150 µl einer RNase-A-Lösung (1 mg/ml) in 50 mM Kaliumacetat (pH 5,5) zugegeben. Dem Ansatz wurde nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C 1 Vol. 100% (v/v) Isopropanol zugegeben und vorsichtig gemischt. Die DNA bildete eine „Wolke“ feiner Fasern, die mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig abgenommen und in einem Reaktionsgefäß an der Luft getrocknet wurde. Die DNA wurde in 0,5 ml TE-Puffer aufgenommen.

2.1.1.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird durch den wiederholten Ablauf von Doppelstrangtrennung, Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNA-Synthese mit hitzestabiler DNA-Polymerase eine exponentielle Synthese von DNA-Molekülen aus Desoxynukleosidtriphosphaten erreicht (Saiki *et al.*, 1988).

Für präparative Zwecke wurde die Pfu-DNA-Polymerase aus *Pyranococcus furiosus* der Firma Promega, für analytische Zwecke die Taq-DNA-Polymerase Gtaq aus *Thermus aquaticus* der Firma Thermus Bioscience verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz von 100 µl enthielt zusätzlich zu dem vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer 0,2 mM der Desoxynukleosidtriphosphate, DNA des Matrizenstranges, jeweils 100 pmol Oligonukleotide (Primer) und 2 U Polymerase. Das Gemisch wurde mit Mineralöl überschichtet und in einem programmierbaren Thermostaten inkubiert. Eine typische PCR-Reaktion bestand aus einer 5-minütigen Denaturierungsphase und 30-35 Reaktionszyklen (95°C, 1 min; 55-60°C, je nach

Primer, 1 min; 72°C, 1-4 min, je nach Länge des Amplifikates und nach Polymerase). Die Bildung des amplifizierten Fragments wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert (2.1.3.1) und bei Bedarf mittels eines Agarosegels (2.1.3.2) oder eines Anionenaustauschersäulchens (2.1.3.3) gereinigt.

2.1.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

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 (bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml Oligonucleotide). Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Präparation. Er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.1.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.1.2.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur Analyse von DNA wurden Agarose-Flachgele mit 30 bzw. 100 ml Bettvolumen verwendet. 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% (w/v) gewählt. Der Agarose wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die Proben wurden in Auftragspuffer (2 mM EDTA pH 8,0, 4% (w/v) Saccharose, 0,025% (w/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.

2.1.2.2 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®-Säulen von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.1.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Anionenaustauschersäulen

Die Reinigung erfolgte mittels QIAquick®-Säulen der Firma QIAGEN nach den Angaben des Herstellers.

2.1.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Die spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern. Es wurden 1 bis 2 U Enzym für 1 µg zirkuläre DNA eingesetzt und 60 min bei der für das Enzym angegebenen Temperatur inkubiert. Mit wenigen Ausnahmen wurde das System der Firma NEB (New England Biolabs) verwendet. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese analysiert (2.1.2.1) und bei Bedarf mittels eines Agarosegels (2.1.2.2) oder eines Anionenaustauschersäulchens (2.1.2.3) gereinigt.

2.1.2.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation der Vektorenden zu verhindern, wurden diese nach Restriktionsverdau v.a. bei Restriktionen mit einem einzelnen Enzym oder bei glatten Enden (*blunt ends*) dephosphoryliert. Verwendet wurde die Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) der Firma Roche. In einer typischen Reaktion wurden zunächst die Restriktionsenzyme hitzeinaktiviert. Danach wurde der Ansatz auf 80 µl mit H₂O bidest. aufgefüllt, mit 9 µl 10x SAP-Puffer und 1 µl (1 U) SAP versetzt. Nach 10 min bei 37°C (60 min bei *blunt ends*) wurde die SAP bei 65°C 15 min inaktiviert. Der dephosphorylierte Vektor wurde über ein Agarosegel (2.1.2.2) oder eine Anionenaustauschersäule (2.1.2.3) gereinigt und in die Ligationsreaktion (2.1.2.6) eingesetzt.

2.1.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Zur Verknüpfung von DNA-Enden wurde T4-DNA-Ligase der Firma NEB verwendet. Es wurden 50 bis 200 ng DNA des linearisierten Vektors mit einem 3-7 fachen molaren Überschuss des DNA-Fragmentes und mit 1 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer (10x T4-Puffer) versetzt und mit H₂O bidest auf 9 µl aufgefüllt. Zum Ansatz wurde 1 µl (1 U) T4-Ligase zugegeben. Die Inkubation erfolgte 2 h bei 25°C oder über Nacht bei 16°C.

2.1.2.7 TA-Klonierung von PCR-Produkten

Bei komplexen Klonierungen, z.B. bei großen Vektoren, großen Inserts oder bei geringer PCR-Ausbeute, wurde das PCR-Produkt zunächst in die kommerziell erhältlichen, linearisierten Vektoren pCRII-TOPO (Invitrogen) oder pGEM-T (Promega) kloniert. Diese Vektoren besitzen an den 3'-Enden ungepaarte Thymidinnucleotide. Durch Taq-Polymerase erzeugte PCR-Produkte tragen an den 5'-Enden überhängende Adeninnucleotide und können direkt in diese Vektoren eingebaut werden. Die Pfu-Polymerase-Produkte wurden durch eine Inkubation mit Taq-Polymerase und dATP bei 72°C, 10-30 min, mit freien Adeninnucleotiden an den 5'-Enden versehen. Die Ligationsreaktionen wurden nach den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

Für die Ligation in den Vektor pPCR-Skript™ Amp SK (+) (Stratagene) ist keine Vorbehandlung mit der Taq-Polymerase nötig, da in diesem System „glatte“ DNA-Fragmente eingebaut werden. Die Taq-PCR-Produkte wurden mit der Pfu-Polymerase vor der Ligationsreaktion geglättet.

2.1.2.8 Präparation transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Über Nacht wurde in 5 ml LB-Medium eine Kultur des entsprechenden *E. coli*-Stamms (meist XL-1 blue) angezogen und am nächsten Morgen damit 1,0 l desselben Mediums angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert und 15 min durch Zentrifugation bei 2°C und 4.400 g geerntet. Alle verwendeten Behälter und Lösungen wurden bei 4°C vorgekühlt. 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.

2.1.2.9 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 der Firma Biorad 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 bei 37°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und in 100 µl SOC-Medium aufgenommen. Die

transformierten Zellen wurden auf LB-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthalten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.1.2.10 Verwendete *E. coli*-Stämme

Für die Klonierung und Synthese von Plasmiden (2.1.1.1) wurde in der Regel der Stamm XL1-blue (Stratagene) verwendet. Für die rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli* wurden die Stämme BL21(DE3) (Stratagene) und M15[pREP4] (QIAGEN) verwendet.

2.1.2.11 Für Klonierungen verwendete Primer

Tabelle 2 gibt die verwendeten Primer wieder. Restriktionsschnittstellen sind kursiv hervorgehoben.

| Primer | Klonierung/Plasmid | Sequenz |
|-------------------|------------------------|--|
| KSD111s (forward) | pQE30-Mdm31frag | 5' AAA <i>GAG CTC</i> AAG GTC TCG CGC GGC TTT A 3' |
| KSD111a (reverse) | pQE30-Mdm31frag | 5' AAA <i>AAG CTT</i> GTA CGC TTC CGC ACT TAG AT 3' |
| KSD 211s | pQE30-Mdm32frag | 5' AAA <i>GAG CTC</i> TGG GAG TCA AAT TCA ATA CTT AT 3' |
| KSD 211a | pQE30-Mdm32frag | 5' AAA <i>AAG CTT</i> ATC AAC ATA TAG CTC CAT GGT A 3' |
| KSD3skozak | pGEM Klonierung Mdm31 | 5' AAA <i>GAG CTC</i> ACC ATG TCC CTT TTT ACC AGG C 3' |
| KSD3a | pGEM Klonierung Mdm31 | 5' AAA <i>AAG CTT</i> TCA CGC GAT AGC ACC GAG AC 3' |
| KSD12s | pGEM Klonierung Mdm32 | 5' AAA <i>GAG CTC</i> ACC ATG CAT ATT AAA GTT GAC AGT AG 3' |
| KSD12a | pGEM Klonierung Mdm32 | 5' AAA <i>AAG CTT</i> TCA AAC CAT GGC ACC AAA CC 3' |
| KSD4s | pRS-Mdm31 | 5' AAA <i>TCT AGA</i> GTA TGT GGG TGT GTG GTT G 3' |
| KSD7a | pRS-Mdm31 pYX-Mdm31 | 5' AAA <i>GAG CTC</i> CGC AAC AGT TGT TGG TTC C 3' |
| KSD10s | pRS-Mdm32 | 5' AAA <i>TCT AGA</i> TTA TTT TCA CTT CAA GTC TTT TTC 3' |
| KSD10a | pRS-Mdm32 pYX-Mdm32 | 5' AAA <i>GAG CTC</i> GCA CTA AAG TTG ATG ACG AC 3' |

| | | |
|----------|--------------|---|
| KSD5s | pYX-Mdm31 | 5' AA ACC ATG GGC CTT TTT ACC AGG CCT TTT C 3' |
| KSD15s | pYX-Mdm32 | 5' AAA GAA TTC ATG CAT ATT AAA GTT GAC AGT AG 3' |
| KSD200s1 | pYX-Abf2-GFP | GGG GAA TTC ATG AAC AGT TAC AGC CTA TTA A 3' |
| KSD200a | pYX-Abf2-GFP | GGG GGA TCC GTT GAG AGG GTA GCG AGC 3' |

Tabelle 2: Primer für die Herstellung neuer Plasmide im Rahmen dieser Arbeit

2.1.2.12 Verwendete Plasmide

2.1.2.12.1 Überexpression von Mdm31/Mdm32-Fragmenten zur Antigen-gewinnung aus *E.coli*

Die Bereiche der Aminosäuresequenz zwischen den Transmembrandomänen der Proteine Mdm31 und Mdm32 (vgl. Ergebnisteil, Abb. 4 B) wurden in einen His₆-Tag (N-terminal) einführenden Vektor pQE30 von QIAGEN kloniert:

pKSD008: pQE30-Mdm31 frag., Primer: KSD111s/KSD111a; *SacI/HindIII*

pKSD012: pQE30-Mdm32 frag., Primer: KSD211s/KSD211a; *SacI/HindIII*

2.1.2.12.2 Klonierung von *MDM31* und *MDM32* für *in vitro*-Translation

Die komplette kodierende Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert und zunächst in pGEM-T (Mdm31) und pPCR-Skript™ Amp SK (+) (Mdm32) kloniert.

pKSD009: pGEM-T-Mdm31; Primer: KSD3skozak/KSD3a; (*SacI/HindIII*)

pKSD011: pPCRScript™ Amp SK (+)-Mdm32; Primer: KSD12s/KSD12a; (*SacI/HindIII*)

Die Orientierung von pGEM-T-Mdm31 war für die *in vitro*-Transskription mit der SP6-Polymerase korrekt, und es wurde mit diesem Konstrukt in der *in vitro*-Translation ein zufrieden stellendes Ergebnis erzielt. pPCRScript™ Amp SK (+)-Mdm32 ergab mit der T3-Polymerase unbefriedigende Ergebnisse. *MDM32* wurde daher in pGEM4 umkloniert (SP6-Orientierung)

pKSD010: pGEM4-Mdm32; *SacI/HindIII*-Fragment aus pKSD011 in pGEM4.

2.1.2.12.3 Klonierung von *MDM31* und *MDM32* mit endogenen Promotoren in Hefevektoren (pRS-Serie)

Die komplette kodierende Sequenz inklusive 5' und 3' der Gene *MDM31* und *MDM32* wurden in pRS-Vektoren kloniert. Die Konstrukte in pRS316 (Sikorski und Hieter, 1989) dienen zur Expression endogener Proteinmengen von Mdm31 und Mdm32. Der Vektor pRS426 (Christianson *et al.*, 1992) ist ein „multicopy“ Plasmid und dient einer leichten Überexpression des entsprechenden Proteins.

pKSD001: pRS316-Mdm31; Primer KSD4s/KSD7a; *XbaI/SacI*

pKSD002: pRS426-Mdm31; Primer KSD4s/KSD7a; *XbaI/SacI*

pKSD003: pRS316-Mdm32; Primer KSD10s/KSD10a; *XbaI/SacI*

2.1.2.12.4 Klonierung von *MDM31* und *MDM32* in Hefeexpressionsvektoren zur Überexpression in *S. cerevisiae* (pYX-Vektoren)

Für die Überexpression von Mdm31 und Mdm32 in *S. cerevisiae* wurden die kodierenden Sequenzen von *MDM31* und *MDM32* in die Vektoren pYX223 und pYX232 kloniert (R&D Systems). pYX223 besitzt einen induzierbaren GAL-Promotor, während pYX232 den konstitutiv aktiven TPI-Promotor aufweist.

pKSD004: pYX223-Mdm31; Primer KSD5s/KSD7a; *NcoI/SacI*

pKSD006: pYX232-Mdm31; Primer KSD5s/KSD7a; *NcoI/SacI*

pKSD005: pYX223-Mdm32; Primer KSD15s/KSD10a; *EcoRI/SacI*

pKSD007: pYX223-Mdm32; Primer KSD15s/KSD10a; *EcoRI/SacI*

2.1.2.12.5 Klonierung von *ABF2* mit C-terminalem GFP-Tag in Hefeexpressionsvektoren

Um Nukleoide durch Fluoreszenzmikroskopie untersuchen zu können, wurde *ABF2* mit einem C-terminalen GFP-Tag in ein Hefeexpressionsvektor kloniert. Verwendet wurde ein pYX113-mtGFP Konstrukt (Westermann und Neupert, 2000). Die mitochondriale

Präsequenz der Untereinheit 9 der F₁F₀-ATPase wurde durch Restriktionsverdau mit *EcoRI/BamHI* entfernt und durch die kodierende Sequenz des *ABF2*-Genes ohne Stop-Codon ersetzt.

pKSD013: pYX113-Abf2-GFP; Primer KSD200s1/KSD200a; *EcoRI/BamHI*

2.2 Methoden der Hefegenetik

(Guthrie, 1991; Rose, 1990)

2.2.1 Verwendete Hefestämme

Als Wildtypstamm dienten YPH501, YPH500 und YPH499 (Sikorski und Hieter, 1989) sowohl für genetische als auch biochemische Untersuchungen. Einige Experimente wurden mit Mitochondrien der Wildtypstämme W303 und D273-10B durchgeführt. Eine Aufstellung aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Stämme bietet Tabelle 3.

| Stamm/ Alias | Genotyp | Referenz |
|--------------|---|---|
| YPH501 | <i>MATa/α, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2</i> | (Sikorski und Hieter, 1989) |
| YPH500 | <i>MATα, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2</i> | (Sikorski und Hieter, 1989) |
| YPH499 | <i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2</i> | (Sikorski und Hieter, 1989) |
| W303a | <i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3, ade2, CAN1</i> | Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen |
| W303α | <i>MATα, his3, leu2, trp1, ura3, ade2, CAN1</i> | Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen |
| D273-10B | Wildtyp | Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen |
| BY4743 | <i>MATa/α, his3, leu2, ura3</i> | (Giaever <i>et al.</i> , 2002; Winzeler <i>et al.</i> , 1999) |

Material und Methoden

| | | |
|---|---|---|
| BY4743 diploide homozygote Deletionsstammsammlung | <i>MATa/α, his3, leu2, ura3</i> | (Giaever <i>et al.</i> , 2002; Winzeler <i>et al.</i> , 1999) |
| YKSD001/ Δmdm31(Kan)499 | YPH499 <i>mdm31::kanMX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD002/ Δmdm31(HIS)499 | YPH499 <i>mdm31::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD003/ Δmdm31(Kan)500 | YPH500 <i>mdm31::kanMX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD004/ Δmdm31(HIS)500 | YPH500 <i>mdm31::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD005/ Δmdm32(Kan)499 | YPH499 <i>mdm32::kanMX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD006/ Δmdm32(HIS)499 | YPH499 <i>mdm32::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD007/ Δmdm32(Kan)500 | YPH500 <i>mdm32::kanMX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD008/ Δmdm32(HIS)500 | YPH500 <i>mdm32::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD009/ Δmdm31(Kan)499 + mtGFP | YPH499 <i>mdm31::kanMX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD010/ Δmdm31(HIS)499 + mtGFP | YPH499 <i>mdm31::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD011/ Δmdm31(Kan)500 + mtGFP | YPH500 <i>mdm31::kanMX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD012/ Δmdm31(HIS)500 + mtGFP | YPH500 <i>mdm31::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD013/ Δmdm32(Kan)499 + mtGFP | YPH499 <i>mdm32::kanMX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD014/ Δmdm32(HIS)499 + mtGFP | YPH499 <i>mdm32::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD015/ Δmdm32(Kan)500 + mtGFP | YPH500 <i>mdm32::kanMX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD016/ Δmdm32(HIS)500 + mtGFP | YPH500 <i>mdm32::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD017/ Δdnm1(HIS)500 | YPH500 <i>dnm1::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD018/ Δfzo1(HIS)500 | YPH500 <i>fzo1::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD019/ Δmdm33(HIS)500 | YPH500 <i>mdm33::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD020/ Δatp21(HIS)500 | YPH500 <i>atp21::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD021/ Δmmm1(HIS)500 | YPH500 <i>mmm1::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD022/ Δmdm36(HIS)500 | YPH500 <i>mdm36::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD023/ Δmas37(HIS)500 | YPH500 <i>mas37::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD024/ Δmdm10(HIS)500 | YPH500 <i>mdm10::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD025/ Δmdm12(HIS)500 | YPH500 <i>mdm12::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD026/ Δmmm2(HIS)500 | YPH500 <i>mmm2::HIS3MX6</i> | diese Arbeit |
| YKSD027/YPH501Δmdm31Δmdm32 + mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6 mdm32::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD028/YPH501Δmdm31Δdnm1 + mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6 dnm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD029/YPH501Δmdm31Δfzo1 + mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6 fzo1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |

Material und Methoden

| | | |
|------------------------------------|---|--------------|
| YKSD030/YPH501Δmdm31Δmdm33 + mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm33::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD031/YPH501Δmdm31Δatp21 + mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>atp21::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD032/YPH501Δmdm31Δmmm1+ mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mmm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD033/YPH501Δmdm31Δmdm36+ mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm36::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD034/YPH501Δmdm31Δmas37+ mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mas37::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD035/YPH501Δmdm31Δmdm10+ mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm10::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD036/YPH501Δmdm31Δmdm12+ mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm12::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD037/YPH501Δmdm31Δmmm2+ mtGFP | YPH501 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mmm2::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD038/YPH501Δmdm32Δdnm1 + mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>dnm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD039/YPH501Δmdm32Δfzo1 + mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>fzo1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD040/YPH501Δmdm32Δmdm33 + mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mdm33::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD041/YPH501Δmdm32Δatp21 + mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>atp21::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD042/YPH501Δmdm32Δmmm1+ mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mmm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD043/YPH501Δmdm32Δmdm36+ mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mdm36::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD044/YPH501Δmdm32Δmas37+ mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mas37::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD045/YPH501Δmdm32Δmdm10+ mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mdm10::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD046/YPH501Δmdm32Δmdm12+ mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mdm12::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD047/YPH501Δmdm32Δmmm2+ mtGFP | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mmm2::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD048/YPH500Δmdm31Δmdm32 + mtGFP | YPH500 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm32::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD049/YPH500Δmdm31Δdnm1 + mtGFP | YPH500 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>dnm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD050/YPH500Δmdm31Δfzo1 + mtGFP | YPH500 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>fzo1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD051/YPH500Δmdm31Δmdm33 + mtGFP | YPH500 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm33::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD052/YPH500Δmdm31Δatp21 + mtGFP | YPH500 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>atp21::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD053/YPH500Δmdm31Δmdm36+ mtGFP | YPH500 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm36::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD054/YPH500Δmdm31Δmas37+ mtGFP | YPH500 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mas37::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD055/YPH500Δmdm32Δdnm1 + mtGFP | YPH500 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>dnm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD056/YPH500Δmdm32Δfzo1 + mtGFP | YPH500 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>fzo1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD057/YPH500Δmdm32Δmdm33 + mtGFP | YPH500 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mdm33::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD058/YPH500Δmdm32Δatp21 + mtGFP | YPH500 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>atp21::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD059/YPH500Δmdm32Δmdm36+ mtGFP | YPH500 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mdm36::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |

Material und Methoden

| | | |
|--|--|--------------|
| YKSD060/YPH500 Δ mdm32 Δ mas37+ mtGFP | YPH500 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mas37::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD061/YPH499 Δ mdm31 Δ mdm32 + mtGFP | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm32::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD062/YPH499 Δ mdm31 Δ dnm1 + mtGFP | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>dnm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD063/YPH499 Δ mdm31 Δ fzo1 + mtGFP | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>fzo1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD064/YPH499 Δ mdm31 Δ mdm33 + mtGFP | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm33::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD065/YPH499 Δ mdm31 Δ atp21 + mtGFP | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>atp21::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD066/YPH499 Δ mdm31 Δ mdm36+ mtGFP | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm36::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD067/YPH499 Δ mdm31 Δ mas37+ mtGFP | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mas37::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD068/YPH499 Δ mdm32 Δ dnm1 + mtGFP | YPH499 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>dnm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD069/YPH499 Δ mdm32 Δ fzo1 + mtGFP | YPH499 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>fzo1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD070/YPH499 Δ mdm32 Δ mdm33 + mtGFP | YPH499 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mdm33::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD071/YPH499 Δ mdm32 Δ atp21 + mtGFP | YPH499 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>atp21::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD072/YPH499 Δ mdm32 Δ mdm36+ mtGFP | YPH499 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mdm36::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD073/YPH499 Δ mdm32 Δ mas37+ mtGFP | YPH499 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mas37::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD074/ Δ mmm1(HIS)500+ mtGFP | YPH500 <i>mmm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD075/ Δ mdm10(HIS)500+ mtGFP | YPH500 <i>mdm10::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD076/ Δ mdm12(HIS)500+ mtGFP | YPH500 <i>mdm12::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD077/ Δ mmm2(HIS)500+ mtGFP | YPH500 <i>mmm2::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD078/ Δ mmm1(HIS)499+ mtGFP | YPH499 <i>mmm1::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD079/ Δ mdm10(HIS)499+ mtGFP | YPH499 <i>mdm10::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD080/ Δ mdm12(HIS)499+ mtGFP | YPH499 <i>mdm12::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD081/ Δ mmm2(HIS)499+ mtGFP | YPH499 <i>mmm2::HIS3MX6</i> + pVT100UmtGFP | diese Arbeit |
| YKSD082/ Δ mdm31(Kan)499 + pWP1055 | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> +pWP1055 (Prinz <i>et al.</i> , 2000) | diese Arbeit |
| YKSD083/ Δ mdm32(Kan)499 + pWP1055 | YPH499 <i>mdm32::KanMX6</i> +pWP1055 (Prinz <i>et al.</i> , 2000) | diese Arbeit |
| YKSD084/ Δ mdm31(Kan)499 + pYX113- mtGFP | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> + pYX113-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) | diese Arbeit |
| YKSD085/ Δ mdm31(Kan)500 + pRS416- GAL1+PrF0ATP9-RFP | YPH500 <i>mdm31::KanMX6</i> + pRS416- GAL1+PrF0ATP9-RFP (Mozdy <i>et al.</i> , 2000) | diese Arbeit |
| YKSD086/ Δ mdm32(Kan)499 + pYX113- mtGFP | YPH499 <i>mdm32::KanMX6</i> + pYX113-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) | diese Arbeit |
| YKSD087/ Δ mdm32(Kan)500 + pRS416- GAL1+PrF0ATP9-RFP | YPH500 <i>mdm32::KanMX6</i> + pRS416- GAL1+PrF0ATP9-RFP (Mozdy <i>et al.</i> , 2000) | diese Arbeit |

Material und Methoden

| | | |
|---|---|--------------|
| YKSD088/ Δ mdm31(Kan) Δ mdm32(HIS)499 + pYX113-mtGFP | YPH499 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm32::HIS3MX6</i> + pYX113-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) | diese Arbeit |
| YKSD089/ Δ mdm31(Kan) Δ mdm32(HIS)500 + pRS416- GAL1+PrF0ATP9-RFP | YPH500 <i>mdm31::KanMX6</i> <i>mdm32::HIS3MX6</i> + pRS416- GAL1+PrF0ATP9-RFP (Mozdy <i>et al.</i> , 2000) | diese Arbeit |
| YKSD090/ YPH501 Δ mdm32 Δ mmm1+ pRS316-Mdm32 | YPH501 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mmm1::HIS3MX6</i> + pRS316-Mdm32 | diese Arbeit |
| YKSD091/ YPH500 Δ mdm32 Δ mmm1+ pRS316-Mdm32 | YPH500 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mmm1::HIS3MX6</i> + pRS316-Mdm32 | diese Arbeit |
| YKSD092/ YPH499 Δ mdm32 Δ mmm1+ pRS316-Mdm32 | YPH499 <i>mdm32::KanMX6</i> <i>mmm1::HIS3MX6</i> + pRS316-Mdm32 | diese Arbeit |
| YKSD094/ YPH500 Δ mmm1+ pRS316- Mdm32 | YPH500 <i>mmm1::HIS3MX6</i> + pRS316- Mdm32 | diese Arbeit |
| YKSD095/ YPH499 Δ mmm1+ pRS316- Mdm32 | YPH499 <i>mmm1::HIS3MX6</i> + pRS316- Mdm32 | diese Arbeit |

Tabelle 3: Verwendete *S.cerevisiae*-Stämme

2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S.cerevisiae* erfolgte wie bei Rose *et al.* (1990) und Guthrie und Fink (1991) beschrieben. Das Standardmedium war YPD (1% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, 2% (w/v) Glucose). Zur Selektion auf mitochondriale Funktionen wurde YPG-Medium (1% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, 3% (v/v) Glycerin) verwendet. Um die Expression von Genen zu induzieren, die hinter einen GAL-Promotor kloniert waren, wurde YPGal-Medium (1% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, 2% (w/v) Galaktose) verwendet. Zur Selektion auf Auxotrophiemarker wurde SD-Medium (0,67% (w/v) Bacto-Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren, 2% (w/v) Glucose) verwendet, das den Selektionsbedingungen entsprechend supplementiert war (20 mg/l Adenin, 20 mg/l Uracil, 20 mg/l Tryptophan, 20 mg/l Histidin, 30 mg/l Leucin, 30 mg/l Lysin). Für den Mating Assay (2.3.8) wurden Stämme unterschiedlichen Paarungstyps unter selektiven Bedingungen in SR-Medium (0,67% (w/v) Bacto-Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren, 2% (w/v) Raffinose) vorkultiviert, um Plasmid-Verluste und die Repression des GAL-Promotors durch Glucose zu vermeiden. Induktion des GAL-Promotors erfolgte dann über Nacht in SR-Medium mit 2% (w/v) Galaktose. Um bei diploiden Stämmen Sporulation zu induzieren, wurden Sporulationsplatten (1% (w/v) Kaliumacetat, 0,1% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt, 0,05% (w/v) Glucose, 2% (w/v) Bacto-Agar) verwendet, denen ¼ der für SD-Medium angegeben Menge an Supplementen zugegeben wurden. Die Selektion gegen das Wildtyp-*URA3*-Allel erfolgte auf 5-FOA-Medium (SD-Medium mit 0,1% (w/v) 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% (w/v) Bacto-Agar zugesetzt.

Für die Isolierung von Mitochondrien wurde Hefe in Laktat-Medium (3 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,5 g/l CaCl₂·2H₂O, 0,5 g/l MgSO₄·H₂O, 3 mg/l FeCl₃, 2% (v/v) Milchsäure pH 5,5 mit NaOH) kultiviert. Atmungsdefiziente Hefestämme wurden in Laktat-Medium mit 1% (w/v) Galaktose oder in YPD-Medium kultiviert. Die Kulturen wurden immer im logarithmischen Wachstum gehalten.

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

2.2.3 Kreuzung und Tetradenanalyse von *S. cerevisiae*

Zum Kreuzen wurden zwei Stämme entgegengesetzten Paarungstyps (*MATa* und *MATα*) als Strich auf zwei getrennte 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 einer „Mating-Type-PCR“ durchgeführt (Huxley *et al.*, 1990). Eine kleine Menge Hefezellen wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, einmal mit H₂O gewaschen und direkt als Matrize für die Taq-Polymerase eingesetzt. Die verwendeten Primer waren MAT1, MAT2 und MAT3 (Tabelle 4). Das *MATa*-Allel lieferte ein 544 bp-Produkt, das *MATα*-Allel ein 404 bp-Produkt.

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 200 µl H₂O aufgenommen, so dass die Suspension leicht trübe war, und 10 min mit 100 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 abgelegt. Nachdem die Sporen zu Kolonien herangewachsen waren, wurden der Phänotyp und die Aufspaltung von Auxotrophiemarkern auf selektiven Medien untersucht.

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

Hefestämme wurden in flüssigem Medium ca. zwei Tage passagiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in H₂O aufgenommen. Eine Zellsuspension von 1 OD₆₀₀ in H₂O wurde hergestellt und folgende Verdünnungsreihe in H₂O angesetzt: 1; 0,1; 0,01; 0,001 OD₆₀₀. Von jeder Verdünnung wurden 5 µl auf je drei YPD- und YPG-Platten aufgetragen und bei 15°C, 30°C und 37°C inkubiert.

2.2.5 Transformation von *S. cerevisiae* mit Hefepiasmiden

„Quick and Easy“ – Protokoll:

(<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Quick.html>)

Der zu transformierende Stamm wurde zwei Tage auf einer YPD-Platte bei 30°C inkubiert. Für jeden Transformationsansatz wurden ca. 20 µl Zellmaterial von der Platte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, einmal mit sterilem Wasser gewaschen und durch kurze Zentrifugation in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die Zellen wurden in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert und 5 min bei 30°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zunächst mit 240 µl 50 % (w/v) PEG 3350 überschichtet. Danach folgte die Zugabe von 36 µl 1 M LiAc, 10 µl 10 mg/ml Lachsspermien-DNA und 2-5 µl Plasmid-DNA (0,1 – 5 µg). Der Ansatz wurde mit H₂O auf 350 µl aufgefüllt und durch Trituieren mit einer sterilen Pipettenspitze gemischt. Die Zellen wurden bei 42°C 20 min transformiert, 10 sec bei Maximalbeschleunigung in der Tischzentrifuge sedimentiert, in ca. 200 µl H₂O aufgenommen und auf den entsprechenden Selektionsmediumplatten ausgestrichen.

Ausführliches Protokoll mit höherer Transformationseffizienz:

Dieses Protokoll diente v. a. bei der Transformation von PCR-Produkten zur genetischen Rekombination (vgl. 2.2.6 und 2.2.7) aber auch bei Plasmiden, mit denen bei Anwendung des „Quick and Easy“ – Protokolls keine Transformanden erhalten wurden.

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurden die Hefestämme über Nacht in 50 ml YPD kultiviert. Die Zellen wurden bei OD₆₀₀ von 0,5 bei RT 3 min bei 1.000 g abzentrifugiert, in 25 ml sterilem Wasser gewaschen. 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 sec sedimentiert. Danach wurden die Zellen in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und die Zellsuspension zu je 50 µl portioniert. Die kompetenten Zellen wurden sofort transformiert.

DNA (2 mg/ml) aus Lachsspermien wurde 5 min lang bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. 50 µl Suspension kompetenter Zellen wurden 5 min bei 3.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Hefezellen wurden mit Lösungen in der folgenden Reihenfolge überschichtet: 240 µl 50% (v/v) PEG 3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 25 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNA (2 mg/ml), 50 µl steriles Wasser, in dem 0,1 bis 10 µg der zu transformierenden DNA (Plasmid oder PCR-Produkt) 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 sec bei 8.000 rpm zentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte über Auxotrophiemarker auf SD-Platten oder über Geneticinresistenz auf YPD-Platten, die 500 µg/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.

2.2.6 Deletion nicht essentieller Gene in *S. cerevisiae*

Deletionsmutanten wurden hergestellt, indem die entsprechenden Gene über homologe Rekombination durch eine den Kanamycin- oder den Histidinmarker tragende Kasette ersetzt wurden. Primer wurden entworfen, die an ihren äußeren Enden mit den flankierenden Regionen des zu deletierenden Gens und mit ihren inneren Enden mit den Plasmiden pFA6a-kanMX6 (Bähler *et al.*, 1998) und pFA6a-His3MX6 (Wach *et al.*, 1994) hybridisierten. Durch PCR (2.1.1.3) konnte eine entsprechende Disruptionskasette amplifiziert werden. Nach Transformation und Selektion (2.2.5) wurden mehrere Kolonien nach 2-4 Tagen erneut auf Selektionsplatten ausgestrichen und nach 1-2 Tagen auf die korrekte Insertion der DNA-Kasette mittels PCR überprüft (2.2.8). Deletionen wurden in den Stämmen YPH499, 500, und 501 durchgeführt. Die Deletionen wurden, wenn ein entsprechender Antikörper vorlag, auch auf Proteinebene nach Mitochondrien-Schnellpräparation (2.3.3), SDS-PAGE (2.4.2) und Westernblot (2.4.4) überprüft.

Die verwendeten Primer für die Deletion verschiedener Gene des mitochondrialen Morphologie- und Vererbungsapparates sind in Tabelle 4 aufgeführt. Mit der Markerkasette hybridisierende Sequenzabschnitte sind kursiv hervorgehoben. Der Genotyp der resultierenden Stämme ist in Tabelle 3 in Abschnitt 2.2.1 aufgeführt.

Material und Methoden

| Primer | Deletion (Kassette) | Sequenz |
|-------------------|------------------------|---|
| KSD601s (forward) | <i>MDM31</i> (KanMX6) | 5' GTG TCA TGA CTA CGC ATT ATC ACG TAG GCA TAT ATA TGT AAA TTC <i>CGG ATC CCC GGG TTA ATT</i> AA 3' |
| KSD601a (reverse) | <i>MDM31</i> (KanMX6) | 5' CCG CAG TGT AGA AAG AAG AAA GAT GCG TCA CAA ATT AGA TAA ACT <i>GAA TTC GAG CTC GTT TAA</i> AC 3' |
| KSD602s (forward) | <i>MDM31</i> (His3MX6) | 5' GTG TCA TGA CTA CGC ATT ATC ACG TAG GCA TAT ATA TGT AAA TTC <i>CGT ACG CTG CAG GTC GAC</i> 3' |
| KSD602a (reverse) | <i>MDM31</i> (His3MX6) | 5' CCG CAG TGT AGA AAG AAG AAA GAT GCG TCA CAA ATT AGA TAA ACT <i>ATC GAT GAA TTC GAG CTC</i> G 3' |
| KSD701s (forward) | <i>MDM32</i> (KanMX6) | 5' CTT CTC GTT ATT GGT TCT AGC TGA TCC TTG ACT TAC TAT GGA GGG <i>CGG ATC CCC GGG TTA ATT</i> AA 3' |
| KSD701a (reverse) | <i>MDM32</i> (KanMX6) | 5' GTT TGG CTT TTT TTT CTT ATT TTT TCT TCA ATT TAC TTG ATA AAT GAA ATG <i>GAA TTC GAG CTC GTT</i> TAA AC 3' |
| KSD702s (forward) | <i>MDM32</i> (His3MX6) | 5' CTT CTC GTT ATT GGT TCT AGC TGA TCC TTG ACT TAC TAT GGA GGG <i>CGT ACG CTG CAG GTC GAC</i> 3' |
| KSD702a (reverse) | <i>MDM32</i> (His3MX6) | 5' GTT TGG CTT TTT TTT CTT ATT TTT TCT TCA ATT TAC TTG ATA AAT GAA ATG <i>ATC GAT GAA TTC GAG</i> <i>CTC G 3'</i> |
| KSD87s (forward) | <i>DNM1</i> (His3MX6) | 5' GTT TAT CAT TAA GTA GCT ACC AGC GAA TCT AAA TAC GAC GGA TAA AGA ATG <i>CGT ACG CTG</i> <i>CAG GTC GAC 3'</i> |
| KSD87a (reverse) | <i>DNM1</i> (His3MX6) | 5' CAC GCC CGC AAT GTT GAA GTA AGA TCA AAA ATG AGA TGA ATT ATG CAA TTA <i>ATC GAT GAA TTC</i> <i>GAG CTC G 3'</i> |
| KSD87k (control) | <i>DNM1</i> (His3MX6) | 5' ATC TTA GAA AAT GCA TGT TTG TAT 3' |
| KSD86s (forward) | <i>FZO1</i> (His3MX6) | 5' CAT TAT CTG ATA TCA CGG ATA GAG GCA AAA CGG TAG GCT CAT TTA ACG ATG <i>CGT ACG CTG</i> <i>CAG GTC GAC 3'</i> |
| KSD86a (reverse) | <i>FZO1</i> (His3MX6) | 5' ACA TTA TGT ATA TTG ATT TGA AAA GAC CTC ATA TAT TTA CAA GAA TAT CTA <i>ATC GAT GAA TTC</i> <i>GAG CTC G 3'</i> |
| KSD86k (control) | <i>FZO1</i> (His3MX6) | 5' GAT CCC TTA TCT GGC AAG ATA 3' |
| KSD89s (forward) | <i>MDM33</i> (His3MX6) | 5' TCG TTG TGA AAT TGT AAC GGG TGA ACT CAG |

Material und Methoden

| | | |
|------------------|------------------------|---|
| | | TGA TTA AAA AAT TGC GTG ATG <i>CGT ACG CTG</i> <i>CAG GTC GAC</i> 3' |
| KSD89a (reverse) | <i>MDM33</i> (His3MX6) | 5' AAA ATG CAT GCG TGT TTT TTT AAC GAT ATT CTT GCG CAG TAT ATC ATG TCA <i>ATC GAT GAA TTC</i> <i>GAG CTC G</i> 3' |
| KSD89k (control) | <i>MDM33</i> (His3MX6) | 5' GGC ATA GGG CTT TGA CCA A 3' |
| KSD88s (forward) | <i>ATP21</i> (His3MX6) | 5' TTA TAT CGG AAC ATA ACG TAT ATA GGA ACT AGC TGA GTG AGT TAA AGG ATG <i>CGT ACG CTG</i> <i>CAG GTC GAC</i> 3' |
| KSD88a (reverse) | <i>ATP21</i> (His3MX6) | 5' GCG AGC TAA TGT GCA TTT TTA GTA TCC TAT TTA TGT TGA AGC TTC TAT TTA <i>ATC GAT GAA TTC</i> <i>GAG CTC G</i> 3' |
| KSD88k (control) | <i>ATP21</i> (His3MX6) | 5' GAA CTT AGA AGA ATT GCA CTC A 3' |
| KSD85s (forward) | <i>MMMI</i> (His3MX6) | 5' AAA GAA CTT TGA GAG AGT CAA TAT AAT ACC TGT AGC CTT TTT CTG AAA ATG <i>CGT ACG CTG CAG</i> <i>GTC GAC</i> 3' |
| KSD85a (reverse) | <i>MMMI</i> (His3MX6) | 5' GCA GAG AAG ATA GGA AAA AGA TAG AAC AAA AAA TTT GTA CAT AAA TAT TTA <i>ATC GAT GAA</i> <i>TTC GAG CTC G</i> 3' |
| KSD85k (control) | <i>MMMI</i> (His3MX6) | 5' CTA TTT TCC TAC TGA TGA CAC A 3' |
| KSD90s (forward) | <i>MDM10</i> (His3MX6) | 5' AAA TAT ACG TTA GGA AAA AGA CAC GAA CAG AGA AGA CCG ATC TTG <i>CGT ACG CTG CAG GTC</i> <i>GAC</i> 3' |
| KSD90a (reverse) | <i>MDM10</i> (His3MX6) | 5' TGG AAG AAG TTG TTA AAG AAA TGG AAA AAA TTC TGC AAA TTG GTA <i>ATC GAT GAA TTC GAG CTC</i> <i>G</i> 3' |
| KSD90k (control) | <i>MDM10</i> (His3MX6) | 5' CAA GTA TCA ACA AAT TCC TGA 3' |
| KSD91s (forward) | <i>MDM12</i> (His3MX6) | 5' ATG TAA CGG TTG AAA CAG ATC ATA AGC TGG CTT CAA CTA ATC CAA <i>CGT ACG CTG CAG GTC GAC</i> 3' |
| KSD91a (reverse) | <i>MDM12</i> (His3MX6) | 5' TTT GTT TTT TTA TGT AGA CAC TAT TTT CAA ACT ATC TTT GTT AAA <i>ATC GAT GAA TTC GAG CTC</i> <i>G</i> 3' |
| KSD91k (control) | <i>MDM12</i> (His3MX6) | 5' GCT GTT CCC TAA TAG TGT GA 3' |
| KSD80s (forward) | <i>MDM36</i> (His3MX6) | 5' CAA AGA AAC AGT TAA AAA CCC TCC AGA GAG AAC ACT TAC TAC TAT AGC ATG <i>CGT ACG CTG CAG</i> <i>GTC GAC</i> 3' |
| KSD80a (reverse) | <i>MDM36</i> (His3MX6) | 5' AAC CCT CGC ATT TAG TTT GTT TAC ATA GCA ATG ATA TCC TTA TTC TTA TCA <i>ATC GAT GAA TTC</i> <i>GAG CTC G</i> 3' |

Material und Methoden

| | | |
|------------------|--------------------------------|---|
| KSD80k (control) | <i>MDM36</i> (His3MX6) | 5' TCC ACA TGC CAT CCC GTA C 3' |
| KSD81s (forward) | <i>MMM2</i> (His3MX6) | 5' AAC AAT TAT AAC AAA AAA AAC ACA ACT GCA AGA AAC TTC AGC ATC GTC ATG <i>CGT ACG CTG</i> <i>CAG GTC GAC</i> 3' |
| KSD81a (reverse) | <i>MMM2</i> (His3MX6) | 5' CGG AGA GTA TGT ATT TGT GTA GTT ATG TAC TTA GAT ATG TAA CTT AAT TTA <i>ATC GAT GAA TTC</i> <i>GAG CTC G</i> 3' |
| KSD81k (control) | <i>MMM2</i> (His3MX6) | 5' GTA ATG ACC TAG GGT GAA TAG 3' |
| KSD92s (forward) | <i>MAS37</i> (His3MX6) | 5' GTA TTT TTC AAA TAA ACG CAA AGC AAG GCT ATT ATC GAG TCA GTA <i>CGT ACG CTG CAG GTC GAC</i> 3' |
| KSD92a (reverse) | <i>MAS37</i> (His3MX6) | 5' AAA TGA ACT TAA AGA CAC CTT TCT GCA TTA TTT TGT TTA TTT TTA <i>ATC GAT GAA TTC GAG CTC G</i> 3' |
| KSD92k (control) | <i>MAS37</i> (His3MX6) | 5' GTG GGA TTG TCT TTA ATC CTT 3' |
| MAT1 | Bestimmung des Paarungstyps | 5' AGT CAC ATC AAG ATC GTT TAT GG 3' |
| MAT2 | Bestimmung des Paarungstyps | 5' GCA CGG AAT ATG GGA CTA CTT CG 3' |
| MAT3 | Bestimmung des Paarungstyps | 5' ACT CCA CTT CAA GTA AGA GTT TG 3' |

Tabelle 4: Oligonukleotide für die Deletion verschiedener Gene von *S. cerevisiae*. Primer mit der Bezeichnung k dienen der Kontrolle der korrekten Insertion via PCR mit dem in der Resistenzkassette hybridisierenden Primer KanB 5' CTG CAG CGA GGA GCC GTA AT 3'. Die Primer MAT1, MAT2 und MAT3 dienen zur Bestimmung des Paarungstyps (2.2.3).

2.2.7 Einfügen von DNA-Abschnitten in das Genom von *S. cerevisiae*

2.2.7.1 Anfügen von Peptid-Markern und GFP am C-Terminus („Epitope Tagging“)

Mit Hilfe der genomischen Rekombination können Peptid oder Proteinsequenzen an ein Hefeprotein angehängt werden. Die Plasmide Plasmide pFA6a-3HA-kanMX6, pFA6a-13Myc-kanMX6 oder pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 (Bähler *et al.*, 1998) wurden verwendet, um ein PCR-Amplifikat zu erhalten, welches an das jeweilige Protein 3 Kopien des HA-Epitops, 13 Kopien des Myc-Epitops oder eine GFP-Domäne fusioniert. Die Primer wurden so gewählt, dass ihre äußeren Enden mit der 3' flankierenden Region und der C-terminalen

kodierenden Region des Gens, ihre inneren Enden mit den Plasmiden hybridisierten. Nach Transformation des PCR-Produktes und Selektion auf YPD-G418-Platten wurden die Transformanten via PCR (2.2.8) und Westernblot (2.5.1) mit entsprechenden Antikörpern gegen das HA-, das Myc-Epitop und gegen GFP auf korrekte Integration kontrolliert.

In Tabelle 5 sind die Primer aufgeführt, die für das so genannte „Epitope-Tagging“ verwendet wurden, sowie die Primer, die zur Kontrolle der Insertion dienten.

| Primer | Gen | Sequenz |
|----------------------|--------------|---|
| mdm31pFA6f (forward) | <i>MDM31</i> | 5' AAC TTA TAC TCC AGG TGA TTT TGA TGA GTC TCG GTG CTA TCG CGC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A 3' |
| mdm31pFA6r (reverse) | <i>MDM31</i> | 5' CCG CAG TGT AGA AAG AAG AAA GAT GCG TCA CAA ATT AGA TAA ACT GAA TTC GAG CTC GTT TAA AC 3' |
| mdm32pFA6f (forward) | <i>MDM32</i> | 5' CTT TTG CAT CCC AAT TAT TGT TGT TGG GGT TTG GTG CCA TGG TTC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A 3' |
| mdm32pFA6r (reverse) | <i>MDM32</i> | 5' GTT TGG CTT TTT TTT CTT ATT TTT TCT TCA ATT TAC TTG ATA AAT GAA ATG GAA TTC GAG CTC GTT TAA AC 3' |
| KSD7a (reverse) | <i>MDM31</i> | 5' AAA <i>GAG CTC</i> CGC AAC AGT TGT TGG TTC C 3' |
| KSD10a (reverse) | <i>MDM32</i> | 5' AAA <i>GAG CTC</i> GCA CTA AAG TTG ATG ACG AC 3' |

Tabelle 5: Für das „Epitope-Tagging“ verwendete Primer. Die Primer KSD4a und KSD10a dienten zusammen mit dem Primer KanC 5' TGA TTT TGA TGA CGA GCG TAA T 3' zur Kontrolle der korrekten Insertion ins Genom.

2.2.7.2 Einfügen eines *GAL10*-Promotors vor einem Gen

Um die Expression eines Proteins durch Glucose und Galaktose regulieren zu können, wird auf genomischer Ebene vor das entsprechende Gen ein Galaktose-Promotor eingebaut. Die Expression wird durch Glucose im Medium reprimiert, durch Galaktose induziert. Verwendet wurde das Plasmid pTL26 (Lafontaine und Tollervey, 1996), welches den *GAL10*-Promotor in einer den *HIS3*-Marker integrierenden Kasette enthält. Die Primer wurden so gewählt, dass ihre äußeren Enden mit der 5' flankierenden Region und der N-terminal kodierenden Region des Gens und ihre inneren Enden mit der Kasette des Plasmids hybridisierten. Nach Transformation des PCR-Produktes und Selektion auf Selektionsplatten ohne Histidin wurden die Transformanten via PCR (2.2.8) und Westernblot (2.5.1) mit entsprechenden Antikörpern auf korrekte Integration überprüft.

In Tabelle 6 sind die Primer aufgeführt, die für die Amplifikation der HIS3-*GAL10*-Kassette verwendet wurden, sowie die Primer, die zur Kontrolle der Insertion dienten.

| Primer | GAL10 Promotor für: | Sequenz |
|---------------------|---------------------|---|
| KSDGAL31s (forward) | <i>MDM31</i> | 5' CCT CAG TAA GAG TTG ATC GGA AAT GTG TCA TGA CTA CGC ATT ATC ACG <i>CTC TTG GCC</i> <i>TCC TCT AG</i> 3' |
| KSDGAL31a (reverse) | <i>MDM31</i> | 5' AGA AAA CTG CCG GGG GCT CCT TAG AAA AGG CCT GGT AAA AAG GGA CAT <i>CGA ATT CCT</i> <i>TGA ATT TTC AAA</i> 3' |
| KSDGAL32s (forward) | <i>MDM32</i> | 5' GGT TAA AAA ATT CGT ATA AAG ACA CAT TTG ACT TTT TGT CAC TTT TTT <i>CTC TTG GCC TCC</i> <i>TCT AG</i> 3' |
| KSDGAL32a (reverse) | <i>MDM32</i> | 5' TGT TTT AAT ACT TCT TGA CGC AAA TCT ACT GTC AAC TTT AAT ATG CAT <i>CGA ATT CCT TGA</i> <i>ATT TTC AAA</i> 3' |
| His3 reverse | <i>MDM31/MDM32</i> | 5' CCG AGA GCA ATC CCG CAG TCT TCA G 3' |
| KSD10s (forward) | <i>MDM31</i> | 5' AAA <i>TCT AGA</i> GTA TGT GGG TGT GTG GTT G 3' |
| KSD15s (forward) | <i>MDM32</i> | 5' AAA <i>TCT AGA</i> TTA TTT TCA CTT CAA GTC TTT TTC 3' |

Tabelle 6: Oligonucleotide für die Einführung eines *GAL10*-Promotors vor den Genen *MDM31* und *MDM32*. Der kursive Bereich gibt die Sequenzen an, die mit dem den Promotor tragenden Plasmid hybridisieren. Die Primer His3reverse, KSD10s und KSD15s dienen zur Kontrolle der korrekten Insertion ins Genom.

2.2.8 Nachweis chromosomaler Insertionen/Deletionen in *S. cerevisiae*

Die Genome einiger der verwendeten Hefestämme wurden durch chromosomale Insertionen oder Deletionen modifiziert, um Gene zu disruptieren oder Promotoren und zusätzliche kodierende Sequenzen (Tags) einzufügen. Dabei wurde meistens eine KanMX6 oder eine His3MX6 Kassette in das Hefegenom eingefügt (2.2.6, 2.2.7). Mittels PCR (2.1.1.3) wurde die korrekte Integration der Markerkassette kontrolliert. Dabei wurden Primer so ausgewählt, dass ein Oligonucleotid in der Kassette hybridisiert und einer im flankierenden Bereich des Genoms. Ein Fragment der entsprechenden Größe zeigt die korrekte Integration an. 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 10

min bei 95°C gestartet, um die Zellen aufzuschließen. Nach erfolgter PCR wurden 10 µl des Überstands auf einem Agarosegel analysiert (2.1.2.1).

2.3 Methoden der Zellbiologie

2.3.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe

1 ml einer Flüssig-Kultur (0,2 OD₆₀₀) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert und in 200 µl SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen. Dem Ansatz wurden Glasperlen (Ø 0,3 mm) entsprechend dem Volumen des Zellpellets (ca. 40 bis 100 µl) zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden 20 sec gevortext und anschließend 20 sec auf Eis gekühlt. Vortexen und Kühlen wurde insgesamt dreimal hintereinander durchgeführt. Dann wurden die Ansätze 10 min bei 95°C erhitzt und konnten in einer SDS-PAGE (2.4.2) eingesetzt werden.

2.3.2 Subfraktionierung von Hefezellen

Für Untersuchungen zur Lokalisierung von Proteinen wurden Mitochondrien wie unter 2.3.4 beschrieben isoliert und wie unter 2.3.5 beschrieben mittels eines Saccharose-Stufengradienten gereinigt.

Die Isolierung von Mikrosomen und Zytosol erfolgte im Wesentlichen nach (Rowley *et al.*, 1994). Hefezellen wurden wie unter 2.3.4 beschrieben in Sphäroplasten überführt, in Lysepuffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 500 mM Saccharose, 1 mM DTT, 3 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, je 1 µg/ml Leupeptin, Aprotinin, Chymostatin) resuspendiert, mit einem Dounce-Homogenisator aufgebrochen (15 Stöße, „tight fitting“ Stempel) und zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4°C). Das resultierende Pellet wurde unter den gleichen Bedingungen nochmals homogenisiert und zentrifugiert, die beiden Überstände vereinigt und erneut bei 10.000 g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde in zwei Hälften aufgeteilt. Die erste Hälfte wurde auf einen 30% Percoll-Gradienten (v/v) in Lysepuffer gegeben und zentrifugiert (76.000 g, 50 min, 4°C, Beckman Ti50-Rotor). Es waren zwei Banden im Gradienten zu erkennen. Die obere wurde entnommen und durch Zentrifugation (150.000 g, 1 h, 4°C, Beckman Ti50-Rotor) konzentriert. Die mikrosomalen Membranen bildeten eine Bande über dem transparenten Percoll-Pellet und wurden abgenommen.

Die andere Hälfte des 10.000 g Überstandes wurde direkt bei 150.000 g zentrifugiert (1h, 4°C, Beckman Ti50-Rotor). Der Überstand enthielt die zytosolischen Proteine.

2.3.3 Mitochondrien-Schnellpräparation

Eine einfache analytische Methode, um mitochondriale Proteine für die Detektion durch Westernblot anzureichern ist die Mitochondrien-Schnellpräparation in kleinem Maßstab. Von einer *S. cerevisiae*-Kultur wurden Zellen aus 30 ml mit einer OD₆₀₀ 1,0 oder einem entsprechenden Volumen einer anderen OD₆₀₀ durch Zentrifugation (5.000 g, 5 min, RT) geerntet, in 1 ml H₂O aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (13.000 g, 15 sec, RT, Eppendorf Tischzentrifuge). Es wurden ca. 20 µl Glasperlen (Ø 0,3 mm) und 200 µl Lyse-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM EDTA, 2 mM PMSF) zugegeben. Es wurde 3 mal 30 sec kräftig gevortext. Dazwischen wurde 30 sec auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 600 µl Lysepuffer wurden die Glasperlen und nicht aufgebrochene Zellen durch Zentrifugation (370 g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (16.000 g, 10 min, 4°C). Der zweite Überstand enthält Mikrosomen und das Zytosol und wurde mit TCA gefällt (2.4.6). Das Pellet enthält u. a. die angereicherten Mitochondrien. Es wurde in SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen und mittels SDS-PAGE (2.4.2) und Westernblot (2.4.4 und 2.5.1) analysiert.

2.3.4 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung erfolgte nach der von (Daum *et al.*, 1982) beschriebenen Methode. Die Hefekulturen wurden bei einer OD₆₀₀ von 1,0 bis 2,0 geerntet. Die Zellen wurden zentrifugiert (3.000 rpm, 5 min, RT, Beckman-JA10-Rotor), mit destilliertem Wasser gewaschen und ihr Feuchtgewicht bestimmt. Sie wurden in 2 ml/g 0,1 M Tris/HCl pH 9,4, 10 mM DTT resuspendiert und 10 min bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3.000 rpm, 5 min, RT, Beckman-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 überführen, wurden sie in 4 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 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 (3.000 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% (w/v) fettsäurefreies BSA; 1 mM PMSF) und durch 13 bis 15 Stöße in einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation (3.000 rpm, 5 min, RT, Beckmann-JA10-Rotor) wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Ausbeute an Mitochondrien zu erhöhen, wurde das erhaltene Pellet nochmals homogenisiert. Die in den Überständen enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (12.000 rpm, 12 min, 2°C, Beckmann-JA20-Rotor) gesammelt. Die Pellets wurden in 3 ml/g Homogenisierungspuffer ohne PMSF resuspendiert (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,6 M Sorbitol, 0,5% (w/v) fettsäurefreies BSA) und erneut zuerst bei 3.000 rpm und danach der Überstand bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Mitochondrienpellet wurde 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). Die Mitochondrien wurden mit 10 mg/ml fettsäurefreiem BSA in 50 bis 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.5 Reinigung isolierter Mitochondrien mittels Saccharose-Stufen-Gradient

Um die unter 2.3.4 erhaltenen Mitochondrien weiter aufzureinigen, wurden sie auf einen Gradienten mit 20%, 30%, 40%, 50% und 60% (w/w) Saccharose in 10 mM MOPS/KOH pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF geladen und zentrifugiert (240.000 g, 15 min, 4°C, Beckman SW41-Rotor). Die Mitochondrien in der Bande zwischen der 40% und der 50% Saccharose-Phase wurden gesammelt, durch Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4°C) konzentriert, mit SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH pH 7,2) gewaschen, erneut zentrifugiert und in SEM resuspendiert. Die Proteinkonzentration (2.4.7) wurde bestimmt, die Suspension zu 20-50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.6 *In vitro*-Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien

In einem Standard-Importansatz wurden 100 µg Mitochondrien in 100 µl Importpuffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,2, 3 % (w/v) fettsäurefreies BSA, 0,5 M Sorbitol, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM MnCl₂, 2 mM KP_i pH 7,2) eingesetzt. Die Mitochondrien

wurden durch Vorinkubation mit 5 mM NADH, 2,5 mM ATP, 10 mM Creatinphosphat und 10 mg/ml Creatinkinase 5 min bei 25°C energetisiert. Die Importreaktion wurde durch Zugabe des radioaktiven Vorstufenproteins (0,2-10 µl, je nach Intensität des Autoradiographiesignals) gestartet und 20 min bei 25°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Überführen auf Eis beendet, die Mitochondrien durch Zentrifugation (12.000 g, 5 min, 4°C) geerntet, mit SEM gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Mitochondrien wurden in SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen und mittels SDS-PAGE (2.4.2), Übertragung auf Nitrozellulose (2.4.4) und Autoradiographie mit Kodak BioMax MR-Film (12 h bis zu mehreren Wochen) analysiert.

Lokalisierung der importierten Vorstufenproteine in Mitochondrien

Um die intramitochondriale Lokalisierung importierter Proteine nachzuweisen, wurden die Mitochondrien nach der Importreaktion unterschiedlichen Behandlungen unterzogen. Nicht importierte Vorstufenproteine und zytosolische Proteindomänen wurden durch Proteaseverdau in SEM resuspendierter Mitochondrien mit 50-200 µg/ml Proteinase K oder Trypsin abgebaut. Um Proteine und Proteindomänen des Intermembranraums zu verdauen, wurden die Mitochondrien vor Proteasezugabe (s.o.) in 50 µl SEM resuspendiert und mit 20 mM HEPES/KOH pH 7,4 1:20 verdünnt. Durch die Hypoosmolarität des Milieus im Vergleich zur Mitochondrienmatrix dehnt sich die Innenmembran aus, und es kommt zur Ruptur der Außenmembran, wodurch der Intermembranraum für Proteasen zugänglich wird. Zur vollständigen Lyse der Mitochondrien wurde einem entsprechenden Ansatz 0,2% (w/v) Triton X-100 als Detergenz zugesetzt. Die Proteine dieser Ansätze wurden mit Trichloressigsäure gefällt (2.4.6) und mittels SDS-PAGE (2.4.2), Übertragung auf Nitrozellulose (2.4.4) und Autoradiographie mit Kodak BioMax MR-Film (12 h bis zu mehreren Wochen) analysiert.

2.3.7 Nachweis integraler Membranproteine, Carbonatextraktion

Mit Hilfe der Carbonatextraktion lassen sich membranassoziierte Proteine von den Membranen (hier Mitochondrien) ablösen, während integrale Membranproteine in den Membranen verankert bleiben und mit diesen reisoliert werden können.

200 µg Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (12.000 g, 5 min, 4°C) pelletiert und in 1 ml 0,1 M NaHCO₃ resuspendiert. Die Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (45.000 rpm, 45 min, 4°C, Beckman TLA-45-Rotor) wurden Membranen sedimentiert. Der Überstand wurde einer TCA-Fällung (2.4.6) unterzogen und

enthielt alle extrahierten Proteine. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen und enthielt alle integralen Membranproteine. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE (2.4.2), Übertragung auf Nitrozellulose (2.4.4) und Detektion mit den entsprechenden Antikörpern (2.5.1) oder für importierte Vorstufenproteine mittels Autoradiographie mit Kodak BioMax MR-Film (12 h bis zu mehreren Wochen).

2.3.8 *In vivo*-Nachweis der mitochondrialen Fusion („Mating Assay“)

Um mitochondriale Fusion *in vivo* nachzuweisen wurde der so genannte „Mating Assay“ durchgeführt (Nunnari *et al.*, 1997). Haploide Stämme beider Paarungstypen wurden mit den Plasmiden transformiert, die mtGFP (pYX113-mtGFP) (Westermann und Neupert, 2000) bzw. mtRFP (pRS416-GAL-mtRFP) (Mozdy *et al.*, 2000) kodieren (2.2.5). Die Expression der fluoreszierenden Proteine wurde mit Galaktose induziert (2.2.2). Die Kulturen wurden bei 0,2 OD₆₀₀ geerntet, in YPD pH 3,5 resuspendiert und weitere 2 h bei 30°C im Schüttler inkubiert, um die durch den *GAL*-Promotor vermittelte Proteinexpression zu stoppen.

Danach 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-Wertes wurden die Zellzyklen der Hefen synchronisiert. Diese Beeinflussung des Zellzyklus steigert die Paarungseffizienz mindestens um 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 überführt und gevortext. Die Auswertung der Zygoten erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.3.11).

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

Für die Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden außer den Mitochondrien die Vakuole, das Endoplasmatische Retikulum und das Aktin-Zytoskelett mit spezifischen fluoreszierenden Farbstoffen sichtbar gemacht.

Vakuolenfärbung

Die Färbung mit 5-(und-6-)Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (Molecular Probes, Eugene, OR) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 10^6 Zellen in 1 ml 50 mM Natriumcitrat, pH 5,0; 2% (w/v) Glucose resuspendiert und der Farbstoff in einer Endkonzentration von 10 μ M zugegeben. Nach 15-30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.3.11) analysiert.

Färbung des Endoplasmatischen Retikulums

Zur Visualisierung des ER wurden die Hefestämme mit dem Plasmid pWP1055 (Prinz *et al.*, 2000) transformiert (2.2.5). Dieses Plasmid führt zur Expression von GFP, welches in das ER importiert wird. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.3.11).

Färbung des Aktinzytoskeletts

Das Aktinzytoskelett wurde mit Rhodamin-Phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) angefärbt (Amberg, 1998). Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von ca. 0,3 herangezogen, 10 min in Medium mit 4 % Formaldehyd fixiert, geerntet (3.500 g, 5 min, RT) und in PBS mit 4 % Formaldehyd resuspendiert. Nach 1 h Inkubation bei 25°C unter leichtem Schütteln wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und in 500 μ l PBS aufgenommen. Zu 100 μ l der Zellsuspension wurden 10 μ l des nach Angaben des Herstellers in Methanol gelösten Farbstoffes zugegeben. Es folgten eine einstündige Inkubation im Dunkeln und 5 Waschschrte mit jeweils 1 ml PBS. Das Zellpellet wurde in 100 μ l „Mounting Medium“ (90% (v/v) Glycerol, 0,1x PBS, 92,5 μ M p-Phenylendiamin (Sigma), pH > 8,0 mit 0,5 M Na_2CO_3 , pH 9,0 eingestellt) resuspendiert und bis zur Analyse (2.3.11) bei -20°C gelagert.

Mitochondrienfärbung

Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff Rhodamin B Hexylester (Molecular Probes, Eugene, OR) angefärbt, der nach Angaben des Herstellers eingesetzt wurde. Zur stabilen Färbung für mikroskopische Aufnahmen standen eine Reihe von Hefeexpressionsvektoren zur Verfügung, welche GFP mit mitochondrialer Zielsteuerungssequenz (mtGFP) kodieren (Westermann und Neupert, 2000).

2.3.10 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 *et al.*, 1990; Williamson und Fennell, 1979).

1 ml einer Hefekultur, die im gewünschten Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 1 kultiviert wurde, wurde 20 sec bei 13.000 rpm und 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) 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 bis 300 µl PBS resuspendiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (2.3.11).

2.3.11 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Analyse am Mikroskop wurden Suspensionen lebender oder fixierter Zellen durch Zugabe von 0,5% (w/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 und ER-GFP (2.3.9) wurde Filtersatz No. 09 verwendet (Anregung: 450 bis 490 nm, Emission: >515 nm). Für mtRFP, Rhodamin B hexylester und Rhodamin-Phalloidin (2.3.9) wurde Filtersatz No. 15 verwendet (Anregung: 534 bis 558 nm, Emission: >590 nm). Die Färbungen mit DAPI wurden mit Filtersatz No. 01 analysiert (Anregung: 353 bis 377 nm, Emission: >397 nm) (2.3.10).

2.3.12 Durchmusterung einer Hefestammsammlung nach Mutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie

Für die Identifizierung von *S. cerevisiae* Mutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie wurde 0,2 ml flüssiges YPD-Medium mit einer Hefekolonie beimpft. Dazu wurde die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze 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 logarithmisches Wachstum zu garantieren. Nach weiteren 3 h Schütteln wurden die Mitochondrien durch Zugabe von 0,1 µM Rhodamin B Hexylester und 15-minütige Inkubation bei RT im Drehrad gefärbt. Die Analyse der gefärbten Mitochondrien erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (2.3.11). Hefestämme, deren

Mitochondrien verändert waren, oder deren Mitochondrien sich aufgrund eines fehlenden Membranpotentials nicht anfärben ließen, wurden ein zweites Mal durchmustert. Mutanten, die wiederholt keine Wildtyp-Mitochondrien zeigten, wurden in einer dritten Durchmusterung mit dem Plasmid pVT100UmtGFP (Westermann und Neupert, 2000) transformiert (2.2.5). Die transformierten Mutanten wurden in YPD-Medium angezogen und im Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich ihrer mitochondrialen Morphologie untersucht.

Die Gendisruption von Mutanten mit eindeutig veränderter mitochondrialer Morphologie wurde mittels PCR (2.2.8) überprüft, und der mitochondriale Phänotyp wurde im genetischen Hintergrund der haploiden Stämme BY4741 und BY4742 von EUROSCARF nochmals durch Anfärben mit Rhodamin B Hexylester und Transformation mit pVT100UmtGFP überprüft.

2.4 Methoden der Proteinbiochemie

2.4.1 Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro*

Um Vorstufenproteine, die mit [³⁵S]-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 [³⁵S]-Methionin translatiert (Pelham und Jackson, 1976).

2.4.1.1 *In vitro*-Transkription

Ein Standardansatz (100 µl) enthielt 20 µl 5x Transkriptionspuffer (Promega), 10 µl 100 mM DTT, 3,6 µl RNasin, 100 µM GTP, je 500 µM ATP, CTP, UTP, 250 µM m⁷G(5')ppp(5')G, 10-20 µg DNA. Anschließend wurde die Reaktion mit 1,6 µl SP6-Polymerase (25 U/µl) gestartet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 12 µl 10 M Lithiumchlorid und 400 µl 96%-igem (v/v) Ethanol (-20°C) wurde die RNA über Nacht bei -80°C gefällt und 30 min zentrifugiert (20.000 g, 2°C). Der Überstand wurde abgenommen, und das Pellet mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und in 60 µl Wasser mit 2 µl RNasin (40 U/µl) gelöst. Die RNA wurde in Portionen zu je 30 µl bei -80°C eingefroren.

2.4.1.2 *In vitro*-Translation in Retikulozytenlysat

Für die Translation von Vorstufenproteinen *in vitro* wurden 140 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 4 µl RNasin (40 U/µl), 4 µl Aminosäurengemisch (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 16 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml) und 30 µl RNA gemischt. Der Ansatz wurde 60 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 8 µl 0,2 M Methionin und 30 µl 1,5 M Saccharose zugegeben und 5 min bei 30°C inkubiert. Durch eine 30-minütige Zentrifugation des Translationsansatzes bei 100.000 g bei 2°C wurden an Ribosomen gebundene, unvollständig translatierte Polypeptidketten entfernt. Der Translationsansatz wurde in Portionen zu je 11 µl aliquotiert, 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 ca. 5 x 72 x 0,75 mm und das Trenngel von ca. 55 x 72 x 0,75 mm. Die Endkonzentration von Acrylamid betrug 11 bis 20% (w/v). Die Proben wurden in 1 x SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) gelöst und 5 min auf 95°C erhitzt.

Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei konstant 10-20 mA. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert (2.4.4) oder einer Proteinfärbung unterzogen (2.4.3).

Trenngellösung:

20% (w/v) Acrylamid, 0,13% (w/v) Bisacrylamid

(für Proteine mit einer molekularen Masse bis ca. 60 kDa)

14% (w/v) Acrylamid, 0,08% (w/v) Bisacrylamid

(für Proteine mit einer molekularen Masse über 60 kDa)

375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,01% (v/v) TEMED.

Sammelgellösung:

5% (w/v) Acrylamid, 0,03% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,01% (v/v) TEMED.

10x-Laufpuffer:

0,5 M Tris/HCl pH 8,3, 3,8 M Glycin, 1% (w/v) SDS.

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

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt. Das Trenngel wurde in 50 ml Färbelösung (30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) Coomassie Brillant Blau R-250) bei RT mindestens 20 min geschüttelt. Daraufhin wurde die Färbelösung abgegossen, das Gel mehrmals in 50 ml Entfärber (30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Sobald die Proteinbanden sichtbar wurden, wurde das Gel zur längeren Lagerung in Einmachfolie getrocknet.

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% (w/v) SDS) getränkt. Zwei bis drei Bögen des Filterpapiers wurden auf die untere Graphitelektrode (Anode) gelegt. Die Nitrozellulose-Membran wurde auf das getränkte Filterpapier gelegt. Nachdem das Gel auf die Nitrozellulose-Membran platziert wurde, wurde es erst mit mehreren Lagen Filterpapier und dann mit der oberen Graphitelektrode (Kathode) abgedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte 1,5 h bei 1 mA/cm². Proteine mit weniger als 20 kDa wurden 1,3 h bei 0,7 mA/cm² transferiert. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran anschließend mit entsalztem Wasser gewaschen und in Ponceau S-Färbelösung (0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA) geschwenkt.

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

2.4.5 Reinigung von Inclusion-Bodies aus *E. coli*

Sowohl das Mdm31-Fragment als auch das Mdm32-Fragment ergaben nach Expression mit dem pQE30-System (Induktion mit 1 mM IPTG) in XL1-blue Zellen

unlösliche Inclusion-Bodies. Diese wurden als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen (2.5.2) gereinigt.

500 ml einer *E. coli*-Kultur wurden bei einer OD_{600} von 0,5 mit 1 mM IPTG induziert und nach 3 h Expressionswachstum durch Zentrifugation (5.000 g, 10 min, RT) geerntet. Das Zellpellet wurde in 10 ml Lysepuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 8,0) aufgenommen. Nach einmaligem Einfrieren ($-70^\circ C$) und langsamen Auftauen (kaltes Wasser) wurden 10 mg Lysozym und 1 mM PMSF zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Branson-Sonifier 250 mit Makrospitze zum vollständigen Aufschluss beschallt (Stufe 3, 80% Duty Cycle, 18 Impulse von je 10 sec, durch 10 sec Intervalle auf Eis unterbrochen). Danach wurde das Lysat 20 min zentrifugiert (15.000 g, $4^\circ C$). Das Pellet wurde in 10 ml Puffer K1 (1x PBS mit 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF) aufgenommen und erneut mit dem Branson-Sonifier beschallt (gleiche Einstellung, 6 Impulse von je 10 sec, 10 sec Pausen). Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 15.000 g, $4^\circ C$) wurde das Pellet erneut in Puffer K1 aufgenommen und der Reinigungsschritt wiederholt. Im nächsten Schritt wurde das Pellet in 10 ml Puffer K2 (1x PBS mit 0,1% Triton X-100, 1 mM PMSF) aufgenommen und entsprechend dem Ansatz in K1-Puffer behandelt. Auch dieser Reinigungsschritt wurde einmal wiederholt. Puffer K3 (1x PBS, 2 M Harnstoff, 1 mM PMSF) diente zur Resuspension für den nächsten Reinigungsvorgang. Nach Beschallung und Zentrifugation (s.o.) wurde das Pellet für den letzten Reinigungsschritt in Puffer K4 (1x PBS, 1 mM PMSF) aufgenommen. Zuletzt wurde das Pellet in 2 ml 1xPBS mit 0,1 % (w/v) SDS resuspendiert, die Proteinkonzentration bestimmt (2.4.7), in geeigneten Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-20^\circ C$ gelagert.

2.4.6 Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine wurden durch die Zugabe von TCA (10% (w/v) Endkonzentration) und einer nachfolgenden Inkubation von mindestens 30 min auf Eis gefällt. Die Proben wurden abzentrifugiert (20 min, 30.000 g, $4^\circ C$), ein- bis zweimal mit Aceton ($-20^\circ C$) gewaschen und nach Trocknen bei $37^\circ C$ 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“ (Biorad). Das Farbstoffkonzentrat wurde 1:5 verdünnt und zu den Proben gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die

Extinktion bei 595 nm bestimmt. 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. Es wurden DSG (Disuccinimidylglutarat), DSS (Disuccinimidylsuberat), DSP (Dithiobis[succinimidylpropionat]) und DFDNB (1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol) als Quervernetzungsreagenzien verwendet, die durch die Membranen diffundieren können. Sie erlauben eine Vernetzung benachbarter Proteine über freie Aminogruppen. Isolierte Mitochondrien (300 µg) wurden in SHKCl-Puffer resuspendiert und mit einer 100 mM Quervernetzer-Stammlösung (gelöst in DMSO) versetzt. Die Endkonzentration des Quervernetzers betrug 100-500 µM. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit reinem DMSO. Nach einer Inkubation 30 min auf Eis wurde die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von 1 M Glycin, pH 8,0 mit einer Endkonzentration von 0,1 M beendet. Nach weiterer Inkubation (10 min, 4°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 (2.5.1) 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 pelletiert (12.000 g, 5 min, 4°C), in 200 µl Lysepuffer (1% (w/v) Digitonin, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM PMSF) resuspendiert und 30 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden unlösliche Aggregate durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 90.000 g entfernt. Der lösliche Überstand wurde auf eine Superose 6-Gelfiltrationssäule (Amersham-Pharmacia) aufgetragen, die mit 4 Säulenvolumina Laufpuffer (0,05% (w/v) Digitonin, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM PMSF) äquilibriert war. Der Lauf wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Fraktionen zu je 500 µl wurden gesammelt und die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt (2.4.6). Nach SDS-PAGE (2.4.2) wurden die Proteine 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: Thyreoglobulin (670 kDa), Apoferritin (440 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa).

2.4.10 *In vitro*-Testsystem der Interaktion von *S.cerevisiae*-Mitochondrien mit filamentösem Aktin (Aktin Sedimentationsassay)

Zur *in vitro*-Analyse der Interaktion von Mitochondrien mit dem Aktinzytoskelett, wurde ein modifiziertes Testsystem verwendet, welches auf einem bereits beschriebenen System (Lazzarino *et al.*, 1994) basiert. Anstatt gereinigtem Hefeaktin wurde humanes nichtmuskuläres Aktin aus Thrombozyten (tebu-bio) verwendet. Das Lyophilisat wurde nach den Angaben des Herstellers in H₂O mit einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und in 10 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C für bis zu 6 Monate. Ferner wurde anstatt 200 µg im Orginalsystem lediglich 100 µg F-Aktin je Reaktion eingesetzt (s.u.).

Polymerisierung von Aktin

Die Aktinlösung (10 mg/ml) wurde in Aktin-Puffer (5 mM Tris, pH 8,0, 0,2 mM CaCl₂, 0,5 mM DTT, 0,2 mM ATP) 1:10 verdünnt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 1/10 Volumen Polymerisierungslösung 10x PP (500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM ATP) versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf Eis überführt. Polymerisiertes F-Aktin lässt sich bis zu zwei Wochen bei 4°C lagern. Durch Zugabe von 1/50 Volumen Phalloidinlösung (in Ethanol, 0,5 mg/ml) und 30 min Inkubation wurde das F-Aktin stabilisiert und mit einem Volumen 2xRM-Puffer (s.u.) verdünnt. Um Aktin-Aggregate abzutrennen, wurde dieser Ansatz 10 min zentrifugiert (12.500 g, 4°C). Der Überstand wurde im Aktin-Sedimentationsassay verwendet.

Aktin-Sedimentationsassay

In der Regel wurden zwei Bedingungen getestet, nämlich die Aktinbindung durch Mitochondrien in Anwesenheit von ATP und bei ATP-Depletion. Ein Standardreaktionsansatz in Gegenwart von ATP enthielt 22,5 µl 2xRM-Puffer, 2 mM ATP, 0,1 mg/ml Creatinkinase, 10 mM Creatinphosphat, 100 µg/ml F-Aktin bei einem Gesamtvolumen von 60 µl. Der Ansatz der ATP-Depletion enthielt lediglich 22,5 µl 2xRM-Puffer, 12,5 U/ml Apyrase und 100 µg/ml F-Aktin. Die Aktinbindung wurde durch Zugabe von 20 µl Mitochondrien (10 mg/ml in RM-Puffer) gestartet und die Ansätze 10 min bei 30°C

inkubiert. Die Reaktion wurde durch Überführen der Proben auf Eis beendet. Danach wurden die Ansätze auf 500 µl eines Saccharosekissens (s.u.) gegeben und 10 min zentrifugiert (12.500 g, 4°C). Mitochondrien mit gebundenem F-Aktin wurden pelletiert, nicht gebundenes F-Aktin verblieb über dem Saccharosekissen. Das Mitochondrienpellet wurde vorsichtig mit 100 µl RM0-Puffer (s.u.) überschichtet, der Überstand wurde vorsichtig sofort wieder abgenommen. Danach wurde das Mitochondrienpellet in 22,5 µl RM0-Puffer resuspendiert, mit 7,5 µl 4xSDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE (2.4.2) und Westernblot (2.4.4 und 2.5.1) analysiert.

Vorbehandlung der Mitochondrien

Die im Testsystem verwendeten Mitochondrien waren über einen Saccharosegradienten aufgereinigt worden (2.3.5). Die gereinigten Mitochondrien wurden pelletiert (12.000 g, 5 min, 4°C) und mit einer Konzentration von 10 mg/ml in RM-Puffer resuspendiert.

Um periphere Membranproteine zu extrahieren, wurden Mitochondrien in Gegenwart von 1 M KCl in RM1-Puffer (s.u.) in einer Konzentration von 10 mg/ml resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Reisolierung der Mitochondrien (12.000 g, 5 min, 4°C) wurden diese in RM-Puffer in einer Konzentration von 10 mg/ml resuspendiert und direkt im Aktin-Sedimentationsassay eingesetzt.

Durch Vorinkubation von salzextrahierten Mitochondrien mit mitochondrialem Salzextrakt konnte die Aktinbindung wiederhergestellt werden. Der Salzextrakt wurde wie folgt hergestellt. Mitochondrien wurden pelletiert und in einer Konzentration von 33 mg/ml in RM1-Puffer resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (12.000 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und mit RM0-Puffer (4 Volumen) bis zu einer KCl-Konzentration von 200 mM verdünnt (Salzextrakt).

200 µg salzextrahierte Mitochondrien wurden mit 300 µl Salzextrakt 15 min auf Eis inkubiert, die Mitochondrien bei 12.000 g und 4°C 5 min zentrifugiert und mit einer Konzentration von 10 mg/ml in RM-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde direkt in den Aktin-Sedimentationsassay eingesetzt.

Puffer und Lösungen

2xRM-Puffer: 1,2 M Sorbitol, 40 mM HEPES/KOH pH 7,4, 4 mM MgCl₂, 0,2 M KCl, 2x Proteaseinhibitormix PI1, 2x Proteaseinhibitormix PI2, 2 mg/ml (w/v) fettsäurefreies BSA, 2 mM PMSF

RM-Puffer: 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 0,1 M KCl, 1x Proteaseinhibitormix PI1, 1x Proteaseinhibitormix PI2, 1 mg/ml (w/v) fettsäurefreies BSA, 1 mM PMSF

RM0-Puffer: 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 0,1 M KCl, 1x Proteaseinhibitormix PI1, 1x Proteaseinhibitormix PI2, 1 mM PMSF

RM1-Puffer: 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 1 M KCl, 1x Proteaseinhibitormix PI1, 1x Proteaseinhibitormix PI2, 1 mM PMSF

1000x PI1: 0,5 mg/ml Pepstatin A (10 mg/ml Ausgangslösung in DMSO), Chymostatin (10 mg/ml Ausgangslösung in DMSO), Antipain (10 mg/ml Ausgangslösung in H₂O), Leupeptin (10 mg/ml Ausgangslösung in H₂O), Aprotinin (10 mg/ml Ausgangslösung in H₂O)

1000x PI2: 10 mM Benzamidin-HCl, 1 mg/ml 1,10-Phenanthrolin in Ethanol

Saccharosekissen: 25% (w/v) Saccharose, 20 mM HEPES pH 7,4, 1x Proteaseinhibitormix PI1, 1x Proteaseinhibitormix PI2, 1 mM PMSF

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Nitrozellulose-Membranen nach dem Proteintransfer (2.4.4) bei RT mindestens 30 min in TBS-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Es folgte eine 60-minütige Immundekoration bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen Antiserum, das je nach Titer zwischen 1:100 und 1:2.000 in TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt war. Danach wurden die Membranen 10 min in TBS-Puffer, ebenfalls 10 min in 0,05% (v/v) Tween20 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 ist (Biorad). Diese Antikörper wurden 1:10.000 in TBS-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt und die Membranen 60 min mit dieser Lösung bei Raumtemperatur 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.

2.5.2 Gewinnung polyklonaler Antikörper in Kaninchen

Zur Herstellung spezifischer Antiseren wurden Fragmente der Proteine Mdm31 und Mdm32, die als Inclusion-Bodies gereinigt wurden (2.4.5), als Antigene eingesetzt (vgl. Ergebnisse, Abb. 4 B). Für die Erstinjektion der Kaninchen wurden etwa 200 µg des Antigens in insgesamt 400 µl Volumen mit 400 µl TiterMax™ (Sigma) vermischt und subkutan im Rückenbereich injiziert. Weitere Injektionen erfolgten in einem Abstand von 4 Wochen, bei denen TiterMax™ (Sigma) durch inkomplettes Freundsches Adjuvans (Sigma) ersetzt wurde. 10-12 Tage nach jeder Injektion wurde den Kaninchen 20-30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes bei RT wurde das Serum durch zweimalige Zentrifugation (erst 5 min bei 3.000 g, dann 15 min bei 40.000 g) gewonnen. Anschließend wurde das Komplementsystem inaktiviert, indem das Serum 20 min auf 56°C erhitzt wurde. Die Lagerung des Serums erfolgte bei -20°C.

2.5.3 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper

Unspezifische Kreuzreaktionen bei Westernblot-Experimenten (2.5.1) mit den Antiseren wurden durch Affinitätsaufreinigung der polyklonalen Antikörper reduziert. Dazu wurde das zur Immunisierung verwendete Antigen an Trägermaterial gebunden.

Darstellung der Affinitätssäulen

0,24 g CNBr-aktivierte Sepharose (Amersham-Pharmacia) wurden in 10 ml 1 mM HCl resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Säulenmaterial wurde nach Zentrifugation (200 g, 1 min, RT) dreimal mit 10 ml 1mM HCl gewaschen und der Überstand abgenommen. 1,5 mg Antigen wurden in 3 ml 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH 8,3 aufgenommen und der aktivierten Sepharose zugegeben. Zuvor wurde eine 10 µl Probe entnommen. Danach wurde der Ansatz 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde in eine 10 ml Poly-Prep Chromatographie-Säule (Biorad) überführt und der Durchlauf aufgefangen. 10 µl des Durchlaufes und die 10 µl Probe vor der Bindung wurden auf vollständige Bindung des Antigens an das Säulenmaterial mittels SDS-PAGE (2.4.2) und Coomassie-Färbung (2.4.3) überprüft. Das Säulenmaterial wurde mit dreimal 3 ml

0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl pH 8,3 gewaschen. Zur Blockierung der verbliebenen Bindungsstellen wurde die Matrix mit 5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 gewaschen und in 10 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 5 ml 0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl pH 4,0 und 0,1 M Tris/HCl, 0,5 M NaCl pH 8,0 wurde die Säule in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 mit 10 mM NaN₃ bei 4°C gelagert.

Affinitätsreinigung der Antikörper

Die Affinitätssäule wurde durch mehrere Waschschritte mit 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5, 10 ml Tris/HCl pH 8,8, 10 ml 100 mM Natriumphosphat pH 11,5 und 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 für die Bindung des Antikörpers äquilibriert. Ein Standardansatz enthielt 4 ml Serum, 16 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 µl 200 mM PMSF (in Ethanol), 40 µl 0,5 M EDTA, 80 µl 0,5 M EGTA. Dieser Ansatz wurde dreimal über die Säule gegeben, um den Antikörper an die Affinitätsmatrix zu binden. Danach wurde die Säule mit 20 ml Tris/HCl pH 7,5 und 20 ml Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte unter drei verschiedenen pH-Bedingungen mit 10 ml 100 mM Natriumcitrat pH 4,0, 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5 und nach Waschen mit 10 ml mM Tris/HCl pH 8,8 mit 10 ml 100 mM Natriumphosphat pH 11,5. Alle Eluate wurden als 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Citratfraktionen wurden durch Vorlegen von 160 µl 1 M Tris Base, die Glycinfraktionen durch 70 µl 1 M Tris Base und die Phosphatfraktionen durch 300 µl 1 M Glycin pH 2,5 sofort neutralisiert. Abschließend wurde die Säule mit 30 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen und in 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 0,05% (w/v) NaN₃ bei 4°C gelagert.

Die Elutionsfraktionen wurden mit Bradfordreagenz (Biorad) auf Antikörpergehalt getestet. Hierzu wurden in einer Mikrotiterplatte 200 µl des Proteinfärbereagenz mit 20 µl der Fraktion gemischt und ca. 10 min inkubiert. Eine deutliche Blaufärbung zeigte den Verbleib des Antikörpers an. In der Regel waren die ersten drei Glycinfraktion positiv.

Die entsprechenden Fraktionen wurden a 100 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Qualität der Affinitätsreinigung wurde unter Verwendung eines Westernblots (2.4.2, 2.4.4 und 2.5.1) mitochondrialer Proteine getestet.

2.5.4 Koimmunfällung

Zur Koimmunfällung wurden Mitochondrien, Mitochondrien mit importierten Vorstufenproteinen (2.3.6) oder quervernetzte Mitochondrien (2.4.8) (200 µg) in 1 ml Lysepuffer (1% (w/v) Digitonin, 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) 1,5 h bei 4°C lysiert. Ungelöste und aggregierte Anteile wurden durch Zentrifugation (30 min, 45.000 rpm, 4°C, Beckman TLA-45 Rotor) abgetrennt. Der Überstand wurde zu äquibrierter Protein A-Sepharose (PAS, Amersham-Pharmacia) gegeben, an welche die entsprechenden Immunglobuline gebunden waren. Die Kopplung der IgGs erfolgte entweder kovalent (s.u.) oder wie folgt beschrieben. 10-20 µl PAS wurden zunächst dreimal in 1 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurden 10-100 µl affinitätsgereinigter Antikörper in 1 ml 1x PBS an die PAS gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS und zweifachem Äquilibrieren mit 1 ml Lysepuffer wurden die Überstände der Lyseansätze zu der PAS gegeben. Die Bindung erfolgte 2-4 h unter Bewegung bei 4°C. Danach wurde die PAS mit 3 mal 1 ml Lysepuffer gewaschen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Kovalente Kopplung der Immunglobuline an Protein A-Sepharose

Für Experimente, bei denen IgGs im Westernblotexperiment stören, wurden die IgGs kovalent an PAS gekoppelt. Es wurden 500 µl PAS zweimal mit 5 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl affinitätsgereinigtem Antikörper und 4 ml 1x PBS mindestens 1 h bei 4°C unter Bewegung inkubiert, um die IgGs zu binden. Dann wurde die PAS zweimal mit 10 ml 0,2 M Natriumborat pH 9,0 gewaschen und anschließend in 10 ml Natriumborat pH 9,0 aufgenommen. Durch Zugabe von 52 mg Dimethylpimelidat (DMP) und 30 min Schütteln bei Raumtemperatur wurden die IgGs an das Protein A kreuzvernetzt. Um die Reaktion zu beenden, wurde die PAS mit 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 gewaschen, in 10 ml 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 aufgenommen und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschritten, zweimal 10 ml 1x TBS, 10 ml 0,1 M Glycin/HCl pH 2,5, zweimal 5 ml 0,1 M Tris pH 8,8, zweimal 5 ml 1x TBS, wurde die Sepharose-Matrix mit den gekoppelten Antikörpern bei 4°C in 1x TBS (9 g/l NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) gelagert. Diese mit Antikörpern kovalent gekoppelte PAS wurde nach äquilibrieren mit Lysepuffer in der Koimmunfällung eingesetzt.

2.5.5 Verwendete Antikörper

Alle verwendeten Antikörper wurden durch die Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Die polyklonalen Seren wurden für Westernblot-Analysen und Immunfällungen eingesetzt.

| Antikörper | Antigen | Organismus |
|------------|---|----------------------|
| Mdm31 #278 | Mdm31-Fragment AS190-540 , N-terminaler 6xHis-Tag, Inclusion-Bodies | <i>S. cerevisiae</i> |
| Mdm31 #305 | Mdm31-Fragment AS190-540 , N-terminaler 6xHis-Tag, Inclusion-Bodies, aus Nitrozellulose ausgeschnitten | <i>S. cerevisiae</i> |
| Mdm32 #304 | Mdm32-Fragment AS237-617 , N-terminaler 6xHis-Tag, Inclusion-Bodies | <i>S. cerevisiae</i> |

Alle anderen, v.a. für Kontrollen verwendeten Antikörper entstammen der Antikörpersammlung der Abteilung Prof. Neupert und sind in früheren Publikationen und Dissertationen beschrieben.

2.6 Puffer und Medien

2.6.1 Puffer

| | |
|-------------------|---|
| 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% (w/v) BSA (fettsäurefrei). |
| 1x PBS: | 50 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 1% NaCl. |
| SDS-Probenpuffer: | 2% (w/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. |
| 1x TBS: | 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM Natriumchlorid. |
| TE-Puffer: | 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0. |

2.6.2 Medien

- Laktat-Medium:** 3 g Hefeextrakt, 1 g Glucose, 1 g K_2HPO_4 , 1 g NH_4Cl , 0,5 g $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 0,5 g NaCl, 1,1 g $MgSO_4 \times 6 H_2O$, 0,3 ml 1% $FeCl_3$, 22 ml 90% Milchsäure, H_2O 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 LBamp wurde nach dem Autoklavieren 100 μ g/ml Ampicillin zugegeben.
- LB-Platten:** 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 1,5% (w/v) Agar. Für LBamp-Platten wurden nach dem Autoklavieren 100 μ g/ml Ampicillin zugegeben.
- S-Medium:** 1,7 g Bacto-Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, 5 g Ammoniumsulfat, H_2O dest. ad 900 ml, nach dem Autoklavieren: Zugabe von 100 ml 20% (w/v) Galaktose (SGal) oder 100 ml 20% (w/v) Glucose (SD) oder 100 ml 20% (w/v) Raffinose (SR). Von den Stammlösungen der Markersubstanzen wurden unter Berücksichtigung der zu selektierenden Auxotrophiemarker 2 ml Tryptophan- und Histidinlösung bzw. 3 ml Leucin- und Lysinlösung (Stammlösung 10 g/l), sowie je 10 ml Adenin- und Uracillösung (Stammlösung 2 g/l) pro Liter Medium zugesetzt.
- 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% (w/v) Kaliumacetat, 0,1% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt, 0,05% (w/v) Glucose, 2% (w/v) Bacto-Agar.
- YP-Medium:** 10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, H_2O dest. ad 900 ml, nach dem Autoklavieren: + 100 ml 20% (w/v) Galaktose (YPGal) oder + 100 ml 20% (w/v) Glucose (YPD) oder + 100 ml 30% (v/v) Glycerin (YPG).
- YPD-G418-Platten:** 2% (w/v) Hefeextrakt, 4% (w/v) Pepton, 2% (w/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% (w/v) zugeben.

2.7 Chemikalien und Geräte

2.7.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

| | |
|---------------------------------|---|
| Agfa-Gevaert, München: | Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme |
| ARK-Sigma, Darmstadt: | Oligonukleotide |
| Amersham-Buchler, Braunschweig: | ECL-Immunoblot-Detektionssystem |
| 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: | Hefestämme |
| Fuji, Düsseldorf: | Röntgenfilme |
| Genomed, Bad Oeynhausen: | Jetstar®-Reagenzien und -Säulen zur Plasmidisolierung |
| Gerbu, Gaiberg: | Acrylamid, Ampicillin, DTT, NADH |
| GIBCO-BRL, Eggenstein: | Agarose, T4-Ligase, Restriktionsenzyme |
| ICN Pharmaceuticals, Eschwege: | [³⁵ S]-Methionin (1100 bis 1400 Ci/mmol) |
| Invitrogen, Groningen: | pCRII-TOPO-Vektor |
| Kodak, München: | Kodak BioMax MR-Film |
| Metabion, Martinsried: | Oligonukleotide |
| Molecular Probes, Eugene, USA: | Rhodamin B Hexylester |
| Nestlé-Alete, München: | Magermilchpulver |
| NEB, Schwalbach: | Restriktionsenzyme |
| Pharmacia, Freiburg: | m7G(5')ppp(5')G |
| Pierce, Rockford, USA | Quervernetzungsreagenzien DSG, DSS, DFDNB und DSP |
| Promega, Heidelberg: | RNasin, Kaninchen-Retikulozytenlysat, pGEM-Vektoren, Pfu-Polymerase |
| Qiagen, Homburg: | Gel Extraction Kit®, <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 µm, Faltenfilter, Filterpapier, Sterilfilter |
| Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan: | Zymolyase 20T |
| Serva, Heidelberg: | Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brillant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Ponceau S, Raffinose, Saccharose (Sucrose), SDS, Spermidin, TEMED |
| Sigma, Taufkirchen: | Aminosäuren, APS, BSA (fettsäurefrei), Glycerin, Lachsspermien-DNA, β-Mercaptoethanol, Mineralöl, Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE, PMSF, Triton X-100, Valinomycin A |
| Stratagene, Heidelberg: | pBluescript II KS |
| Thermus Bioscience, Hude: | Taq-Polymerase |
| United States Biochemical, Cleveland, USA: | Pepton, Trypton, Yeast Nitrogen Base (Bacto Hefe Stickstoffbase ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat) |
| Whatman, Maidstone, England: | DE52-Zellulose |

Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt und Sigma, Taufkirchen bezogen.

2.7.2 Geräte

| | |
|------------------------|--|
| Abimed, Düsseldorf: | Kolbenhubpipetten |
| Agfa-Gevaert, München: | Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Gevomatic® 60 |
| Appligene, Heidelberg: | Imaging-System The Imager™ |
| Carl Zeiss, Jena GmbH: | Axioplan Fluoreszenzmikroskop |

Material und Methoden

| | |
|-----------------------------------|--|
| Beckman, München: | Kühlzentrifugen J2-21, Avanti, Ultrazentrifugen Optima TLX, 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) |
| 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 Identifizierung neuer *MDM*-Gene

MDM-Gene kodieren Proteine, die für die mitochondriale Verteilung und Morphologie (engl.: *mitochondrial distribution and morphology*) essentiell sind. Einige *MDM*-Gene wurden bereits in den vergangenen 14 Jahren identifiziert und funktionell charakterisiert (vgl. Abbildung 1 und Tabelle 1). Im Rahmen dieser Arbeit sollte als Gemeinschaftsarbeit der Arbeitsgruppe eine Sammlung von *S.cerevisiae*-Deletionsmutanten, die von einem Internationalen Konsortium erstellt wurde (Winzeler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002), auf weitere, bislang unbekannte *MDM*-Gene durchsucht werden. Das Genom von *S. cerevisiae* umfasst insgesamt ca. 6300 Gene, von denen 4794 nicht essentiell und in dieser Stammsammlung enthalten sind. Um diese Hefebibliothek zu untersuchen, wurden die einzelnen Stämme mit dem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff Rhodamin B Hexylester angefärbt. Stämme, die kein oder ein verringertes Membranpotential der Mitochondrien besitzen, ließen sich mit diesem Farbstoff nicht analysieren und wurden mit einem mitochondriales GFP exprimierenden Plasmid transformiert (pVT100UmtGFP) (Westermann und Neupert, 2000). In mehreren Runden wurden Deletionsmutanten identifiziert, die einen veränderten mitochondrialen Phänotyp aufweisen (Dimmer *et al.*, 2002). Als Kontrolle diente der entsprechende WT-Stamm BY4743. Dieser systematische Ansatz war bisherigen genetischen Screens weit überlegen. Zum einen wurde das komplette Genom von *S. cerevisiae* durchsucht, und jeder Mutante konnte das entsprechende Gen direkt zugeordnet werden. Bisherige Arbeiten (Berger *et al.*, 1997; Hermann *et al.*, 1997; McConnell *et al.*, 1990; Sogo und Yaffe, 1994) verwendeten klassische Ansätze, bei denen eine Sammlung temperatursensitiver Mutanten untersucht wurde. Diese wurden durch zufällige Mutagenese erstellt, sodass die Zuordnung des entsprechenden Gens aufwendig war. Ferner konnten auch Mutanten ohne auffälligen Wachstumsphänotyp identifiziert werden, die mit herkömmlichen genetischen Screens nicht nachweisbar waren.

Deletionsstämme, deren mitochondrialer Phänotyp sich vom WT-Phänotyp unterschied, wurden in drei Klassen eingeteilt (Dimmer *et al.*, 2002). Gene der Klasse I sind für die Ausprägung der Wildtyp-Morphologie essentiell. Bei Verlust dieser Proteine konnten keine WT-ähnlichen Mitochondrien beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu waren die Mitochondrien der Stämme der Klassen II und III meist aggregiert und/oder fragmentiert, wobei ein Teil der Zellen dieser Stämme WT-ähnliche

Mitochondrien aufwies. Von diesen Genen kodierte Proteine sind folglich für die mitochondriale Gestalt wichtig, aber nicht essentiell (Dimmer *et al.*, 2002). Die Stämme der Klasse II besitzen eine intakte Atmungskette und sind in der Lage, auf Medien mit nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. Der mitochondriale Morphologiedefekt tritt nur unter bestimmten Bedingungen auf. Die zuvor mit der mitochondrialen Morphogenese in Zusammenhang gebrachten Gene *CLUI*, *MDM20*, *PTC1*, *YME1* (Campbell *et al.*, 1994; Fields *et al.*, 1998; Hermann *et al.*, 1997; Roeder *et al.*, 1998) sind Beispiele dieser Kategorie. *ERG6*, *ERG24*, *ERG28* kodieren Enzyme der Ergosterolbiosynthese und gehören ebenfalls in diese Kategorie. Die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen scheint folglich Einfluss auf die Organellenmorphologie zu nehmen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Ergosterolbiosynthese eine Rolle bei der Fusion von Membranen spielt. Dies wurde für die Vererbung von Vakuolen gezeigt (Kato und Wickner, 2001).

Mutanten der Klasse III wiesen zusätzlich zu ihrem mitochondrialen Morphologiedefekt einen *pet*-Phänotyp auf. Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass der Verlust der Zellatmung mit einem Verlust der Cristae der inneren mitochondrialen Membran einhergeht (Pon und Schatz, 1991). Da die Vererbung und die Morphogenese von Mitochondrien von der Koordinierung der inneren mit der äußeren mitochondrialen Membran abhängig sind (Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Fritz *et al.*, 2001; Meeusen und Nunnari, 2003; Sesaki und Jensen, 2004), ist anzunehmen, dass die Gestalt der inneren Membran Auswirkungen auf das gesamte Organell haben kann (Wong *et al.*, 2000).

Als Gene der Klasse I wurden fast alle bereits bekannten Komponenten des Morphologieapparates gefunden (z.B. *DNMI*, *MDM10*, *MDM12*, *MDV1*, *MGM1* im Rahmen dieser Arbeit). Zusätzlich wurden zehn *MDM*-Gene entdeckt, deren Funktion bis dato unbekannt ist. Die neuen Komponenten wurden als *MDM30* bis *MDM39* bezeichnet. Fünf Gene, *ARG82*, *MOT2*, *NUM1*, *REF2* und *TOM7*, die in einem anderen physiologischen Kontext charakterisiert wurden, wurden zum ersten Mal in Zusammenhang mit der mitochondrialen Morphogenese gebracht (Dimmer *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *MDM31*, *MDM32*, *MDM38*(*Y-LETM1*), *ARG82* und *REF2* als Klasse I-Gene identifiziert. Die mitochondrialen Phänotypen der Deletionsstämme sind in Abbildung 2 dargestellt. *MDM31*, *MDM32* und *MDM38* kodieren Proteine, für die eine Lokalisierung in der mitochondriale Innenmembran vorhergesagt wird (Dimmer *et al.*, 2002). Die Mutanten $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$ (Abbildung 2B und C) weisen

ein oder mehrere sphärische Mitochondrien auf. Ihre Gestalt erinnert an die Phänotypen der Deletionsmutanten $\Delta mmm1$, $\Delta mdm10$ und $\Delta mdm12$ (Berger *et al.*, 1997; Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994). Zellen, denen das hochkonservierte Protein Mdm38 fehlt (Abb. 2 D), besitzen vergrößerte Mitochondrien mit wenigen Verzweigungen sowie Ring- und Lariatstrukturen. Ein vergleichbarer Phänotyp wurde bislang nicht beobachtet.

Arg82 (Abb. 2E) ist eine kernlokalisierte Inositol-1,4,5-Triphosphat-Kinase (Dubois und Messenguy, 1994) und Ref2 (Abb. 2F) ein Prozessierungsfaktor für mRNA (Russnak *et al.*, 1995). Beide beeinflussen die Expressionslevel vieler verschiedener Proteine. Somit kann der mitochondriale Phänotyp der beiden Deletionsstämme durch eine veränderte Expressionsrate von Proteinen erklärt werden, die direkt die mitochondriale Morphologie und Dynamik beeinflussen.

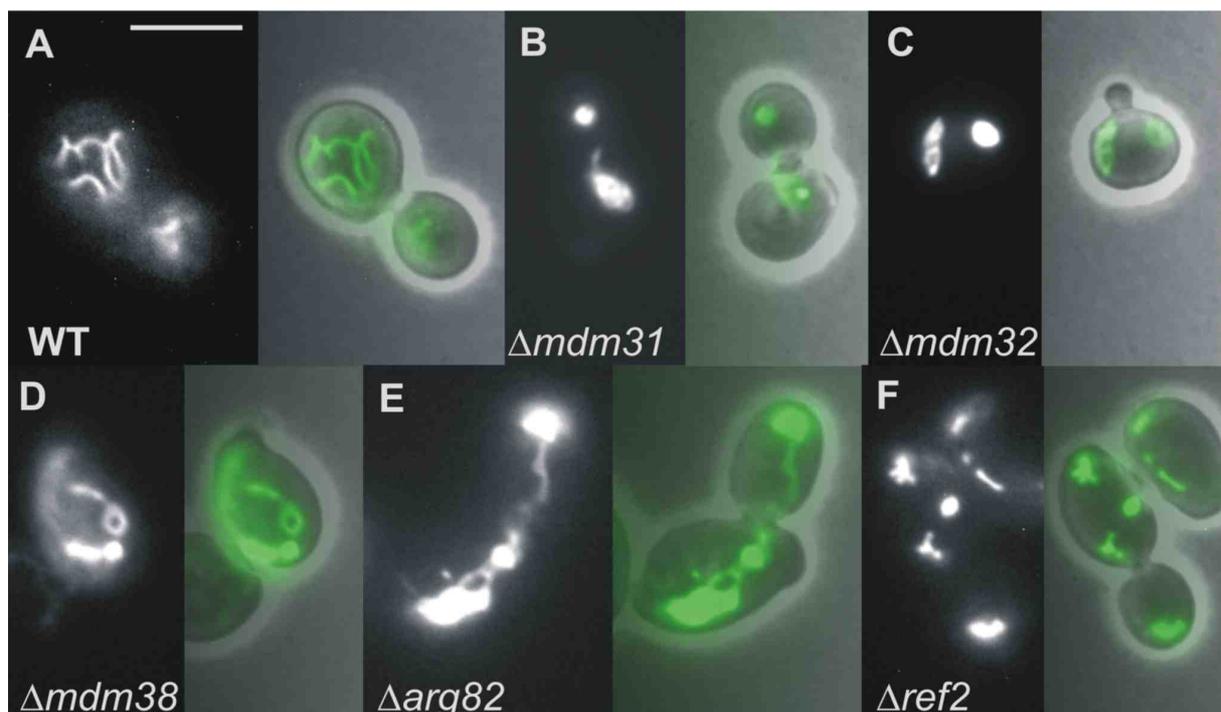


Abbildung 2: Mitochondriale Phänotypen der neu identifizierten Morphologiekomponenten. Stämme, die mtGFP exprimieren, wurden in YPD bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Im linken Bild sind die Mitochondrien, im rechten Bild eine Überlagerung mit dem entsprechenden Phasenkontrast zu sehen. Erläuterung siehe Text. Zum Vergleich: (A) WT-Stamm BY4743. Der Längsstandard (A) entspricht 5 µm.

Ergebnisse

Tabelle 7 gibt zusammenfassend einen Überblick über die hier beschriebenen Gene der Klasse I. Für eine weiterführende Analyse im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene *MDM31* und *MDM32* ausgewählt.

| Systematische/gebräuchliche Bezeichnung | Funktion | Referenz |
|---|--|---|
| <i>YLL001W/DNM1</i> | Mitochondriale Teilung | (Bleazard <i>et al.</i> , 1999; Otsuga <i>et al.</i> , 1998; Sesaki und Jensen, 1999) |
| <i>YAL010C/MDM10</i> | Mitochondriale Morphologie und Vererbung | (Sogo und Yaffe, 1994) |
| <i>YOL009C/MDM12</i> | Mitochondriale Morphologie und Vererbung | (Berger <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>YJL112W/MDV1</i> | Mitochondriale Teilung | (Fekkes <i>et al.</i> , 2000; Mozdy <i>et al.</i> , 2000; Tieu und Nunnari, 2000) |
| <i>YOR211C/MGM1</i> | Mitochondriale Fusion | (Guan <i>et al.</i> , 1993; Jones und Fangman, 1992; Shepard und Yaffe, 1999; Wong <i>et al.</i> , 2000; Herlan <i>et al.</i> , 2003; Sesaki <i>et al.</i> , 2003a) |
| <i>YHR194W/MDM31</i> | Unbekannt | diese Arbeit |
| <i>YOR147W/MDM32</i> | Unbekannt | diese Arbeit |
| <i>YOL027C/MDM38</i> | Unbekannt | diese Arbeit |
| <i>YDR173C/ARG82</i> | Inositol-1,4,5-Triphosphat-Kinase | (Dubois und Messenguy, 1994) |
| <i>YDR195W/REF2</i> | mRNA-Prozessierungsfaktor | (Russnak <i>et al.</i> , 1995) |

Tabelle 7: Im Rahmen dieser Doktorarbeit gefundene *MDM*-Gene. Für die komplette Liste siehe (Dimmer *et al.*, 2002).

3.2 Zwei neue Komponenten des mitochondrialen Morphologie- und Vererbungsapparates: Mdm31 und Mdm32

3.2.1 *In silico* Analyse von Mdm31 und Mdm32

Um erste Anhaltspunkte über die Lokalisierung, die Topologie und die Funktion der Translationsprodukte von *MDM31* (systematisch: *YHR194W*) und *MDM32* (systematisch: *YOR147W*) zu erhalten, wurden die Aminosäuresequenzen analysiert. Mdm31 stellt ein Protein von 579 Aminosäuren und einer Masse von 66,7 kDa dar. Mdm32 besitzt 653 Aminosäuren und eine molekulare Masse von 75,5 kDa (<http://www.yeastgenome.org>). Die Aminosäuresequenzen von Mdm31 und Mdm32 weisen eine signifikante Homologie auf. Auf Primärsequenzebene sind beide Proteine zu 16,7% identisch. Homologe wurden u.a. in den Pilzen (Ascomyceten) *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Neurospora crassa* gefunden. Abbildung 3 zeigt den Aminosäuresequenzvergleich der verschiedenen Homologen, Abbildung 4 A einen anhand der Sequenzhomologien ermittelten Stammbaum. Während andere Spezies der Familie *Saccharomycetaceae* zwei homologe Proteine enthalten (Cliften *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2003), besitzen die hier aufgeführten entfernt verwandten Pilze nur ein Homologes. Dies ließe sich durch ein Genduplikationsereignis in der jüngeren Evolutionsgeschichte der *Saccharomycetaceae* erklären.

Die grundlegende Domänenstruktur ist für alle Proteine dieser neuen Proteinfamilie sehr ähnlich (Abbildung 4 B). Der Aminoterminus weist typische Merkmale mitochondrialer Zielsteuerungssequenzen auf. Diese Sequenzen besitzen viele positiv geladene und hydroxylierte Aminosäurenreste, während negativ geladene Aminosäurenreste eine seltene Ausnahme darstellen (von Heijne, 1986). Mit dem Programm MitoProt II (Claros und Vincens, 1996) lassen sich N-terminale mitochondriale Zielsteuerungssequenzen vorhersagen. Laut Vorhersage enthalten alle Mitglieder der Mdm31/Mdm32-Proteinfamilie eine solche Sequenz (Werteskala 0-1: *S. cerevisiae* Mdm31: 0,9986; Mdm32: 0,9989; *C. albicans* Mdm31: 0,9518; *S. pombe* Mdm31: 0,9989; *N. crassa* Mdm31: 0,9912). Eine Computeranalyse der Hydrophathie der Mitglieder der Proteinfamilie (Hofmann und Stoffel, 1993) sagt fast immer zwei Transmembrandomänen voraus, eine in der Nähe des N-Terminus des reifen Proteins, eine unmittelbar am C-Terminus (Abb. 4 B). Die einzige Ausnahme stellt das Protein aus *S. pombe* dar, dem der C-terminale hydrophobe Bereich fehlt.

Ergebnisse

```
SC-MDM31 1 -----MSL-----FRPFLRSPROFSVARYVYV-----ARSPARSRNLRIPSTIAAASLRAYSNESKIGRDAPED
CA-MDM31 1 -----MSLKNILG--LQKQLNRQTLLEFSKTCQKSL-----TR-PTVISAIQPHRQFSASLPSADRKQANQSDKQEK
NC-MDM31 1 MGHARQAALLRIRQNTTATTLQNTGKRFQSSGKEKGDHDE-TRAEAKSSTISPOOKSEQPQPNTETASGSGSOFT
SP-MDM31 1 -----MLESRAKNIARIVQAKKPYLISYHVRASIQN--A--LLKQTVLQSSSFSPPTLPRLAARNISNGILSRIT
SC-MDM32 1 -----MHKIVDSRFASRSIKTNGTYRLSGGGRFIKFMILTRLRVPTIKRPLLEITSHLVRHCIRTYVATNHGNVREF

SC-MDM31 60 KKS-KK-----LSN-----LKYITE---RDSLLVQTNNIPTKLLKINIRWFLKKSSTRPFNS
CA-MDM31 64 LHS-KE-----QSEDKPKHE-----TE---KEQLLAKANNMYSRLLIPTLKIIRLKWLLKKSNRPFNT
NC-MDM31 80 PAH-ES-----IADSMKYLHLPHLPHLPHRPT---KEELLAAASGEFWSRLKVRFKWFSISRMRPWNA
SP-MDM31 70 PVIIKQ-----ISMVRSYSSGDVENPELNLKNE---SNQSSGVKRAMPFVRVLKMKSEFLKQNKPLTV
SC-MDM32 73 ITPYKSSLPVRCLIAQRHIRTFFPSNDKFTTKASNIETILRLRNNREFFQSLADAKNFQERFKINLKWLLKKNRPFSL

SC-MDM31 106 DDISAFTSWILVSNIFIFLFWTTTFVSLILYLINTVFAQEVLAISKICKFTKNESSLIVFESAIVPDWSSGKISFOKVFV
CA-MDM31 116 DDYSAFESWLVVGNVLFVATTTTFVSIIVFTANTVFAQEFVARKLGEFTKNSNLVTFENAIIVPGWSDCKISFRKCFV
NC-MDM31 139 DQWGAFFVSFFLFGHLVWLVGTTTFESLLILFINTVFAQETLAKWIGDYLTQSAGLTVVFESAIVPKWGDGVTIFRNVEV
SP-MDM31 130 DNVTAFFSWLVSHIIVWLVGTTTFESLLLYTLNTVSAQELLGRWIGQLMFKNTGFQVFESAIVENNRKGLITFNKISV
SC-MDM32 153 NEISITASWLIISQILWLIISTTTTIFSYLVFVINSVFSQEYIH-----E-KK-----IYERLKWLLKDKHCKSNQDLEI

SC-MDM31 186 SRRPKVSRGF-TK-GSQQDALORAKIA-SERILVNQODF---DNGNYTQFDLTIDQVDI-SLNERKWIINGKGIIDDEVITIN
CA-MDM31 196 SRRPKRVEKF-IK-GSQQEAEEESLQNEGTVNEDEEDIFE---DDGNYTQFDLTIPEVNI-SLSLNKWNVTGMLETLEBK
NC-MDM31 219 SRRPGQPKSS-VKKGSSSEAAEAAAKQAAEQGTAVEE---DDGNYTQFDVITIDTVNVALSFLKWNKGLLKVDEIK
SP-MDM31 210 IRRPDTLNGIGAQNPNKSDVEKEYMALRKRYDSNEEPTTEALSQGNVTFELSDKADYSESEAFRLNGKIVKELQIK
SC-MDM32 221 TFSPEDKASM---LVLSPDSESNSLILKRLNVRDEILD-----LDLKFHHININVLKKNWLLGRGLITNVSHY

SC-MDM31 260 GLRGVDRTHVWKKOD---DPKNYLVNYOPGDFEISKFTMNDVLCITLYQPNGFRPFQVSI-FNCDLPQLRKHWLFYDILN
CA-MDM31 270 GHRGVDRTHVWKPDD---DATNYKNIHOPGDFEFESFRMEDVLFITLMQPNGFRKFNVAIYNCELSLKRKHWFYDFLN
NC-MDM31 294 GVRGVDRTSVWGNDDL---NPLDFROEHNPGDFELDFKMEDLLVTVHQPGGFRPFVSIFSCLELPQLRKQWLFYDFLS
SP-MDM31 290 GVRGVDRRFVLEWDPSS---DPRDYRRKHNGWDFEIEKFKLEDLRVITLQPKGFRKFPVSVFFCELPLRKQWLFYDLMN
SC-MDM32 286 GHRGCLNLSNFVNLVNSFQDQKTENFLITLNVETIDSEILLKQSLSAQETPSLKE--SIYNLSLPRLRNLHFISDILS

SC-MDM31 337 ANNINGTYDNSMFTIHKKFR-----TDDQHOD-PT---LLWKOITRFRVDNIDIDHLNAGLEG
CA-MDM31 347 ANVMMSGAYDNSLFTIHKKOR-----LNDFDEYTPMNSNLQKWKVTRMRVDSLNDHLNITGLEG
NC-MDM31 372 ANRMMSGEDGSLFTIHPROI-----HGVSAADNGRRHQDEFGSPSAWKFESRLRIDGKIDHLNRGVEG
SP-MDM31 367 AKTITGSEFDNSMFTIHRLO-----LRPYSPLYKVG-KQLDDMRHSRLRIDNVAIDHLNRGVS
SC-MDM32 364 AKTFSGSINNSLFLFKRQOKLTAVIENNNKNRMASSKFDFTDNNQENYRVTWHQDDPNYVTLRLNFININDLKFNGDG

SC-MDM31 391 PFGWINSGRVNMGDVLPPDD-AASDSLQLTEITTEIGDRLIKAK--RYTS-SLPLVGEFGFSP-----A
CA-MDM31 406 PFGWITSGRVDMIGDVMVQDE---NNEINVSELVGMITDAIKKEAS--RYKNPEVQEKHPNMRTRL-----TA
NC-MDM31 436 PFGWIYEGNVDMIADIMFPAD---PEEGLSKVVAEFYDKMEEAVTSNRYLKILDGNISENSRNTNSPTLES GPI PES
SP-MDM31 424 AFGWINDGSVDLVLNLSFPEE---PSENSFOKAWISMDKIKKKEK-----
SC-MDM32 444 KFNWIKDGOVEILADIMLTNSTSHLSSESKYAVVDLKVTCRDLKTTFFQPEPPVLSTGDSIVSLDELKPIITFINSYEGMA

SC-MDM31 454 V-DEIDPN-----DMFTMDFSLRLYVVKAEVPLFT-SGLTYINSALIRPIVGY
CA-MDM31 469 D-DYHDIS-----KVEVLDLTLRLNNVRAKVPFKS-PELSYINVALIRPIVAY
NC-MDM31 511 A-SDIDLGHHDELPTSEQHFPPPIPPATPKPEAPIEETPSYLVMDLRHILNDVRAAVPLENNEHMSYNOALVRPIVAY
SP-MDM31 467 ---DEDVY-----KDVHFDVNVQLENPKAVIPLETF-NQVSYINNALIRPIVAY
SC-MDM32 524 NPILKDFE-----EN-----ERLTNSLIWNSPNVSNRQRKSYPLTKVTSNSTKEIKK

SC-MDM31 500 INSERT---YIPIKCRIVKKSDFEGSWTIYDSYMLRDLSAEAYDAFADYVADDEKRTLRRLRVGFWSLQOLIQVILMSL
CA-MDM31 515 INSKNT---FIEIENRIVKKNLQDFEGSWTIYDSYMLMDDISEEYVDNFAEYVADEEARLIRLKRIGFWSLQOLVQLVLFV
NC-MDM31 590 INAKRT---YIPISCRIVKRLTDFGAWTVWDCGLMDDMSAEVYRAFARNVEDQOSRVRREKRVGLWTVSLVHALLAGV
SP-MDM31 511 INSTRT---FIPILCHVSKPLSDFEGSWTFYDSYVQLQETISAQVYESFARDVILNOEIRRKRIQKGVYWSLRRLFHLVLSL
SC-MDM32 574 HNQPNTNANELVLRCKMVKNLSDLQ---LININIGLDQITMELYVDLTKIVEDWERK-NQNDWKQWGTTFASQLLLEGF

SC-MDM31 576 GATA-----
CA-MDM31 592 GAVA-----
NC-MDM31 667 ACDLM-----
SP-MDM31 588 QELAPTTSSISNFE-----
SC-MDM32 649 GAVV-----
```

Abbildung 3: Alignment der Aminosäuresequenzen von Mdm31 und Mdm32 aus *S. cerevisiae* (SC-MDM31, SC-MDM32) mit den Homologen aus *Candida albicans* (CA-MDM31, Ca49C10.08), *Schizosaccharomyces pombe* (SP-MDM31, SPAC3H1.04c) und *Neurospora crassa* (NC-MDM31, NCU07955.1). Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche grau. Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) erstellt.

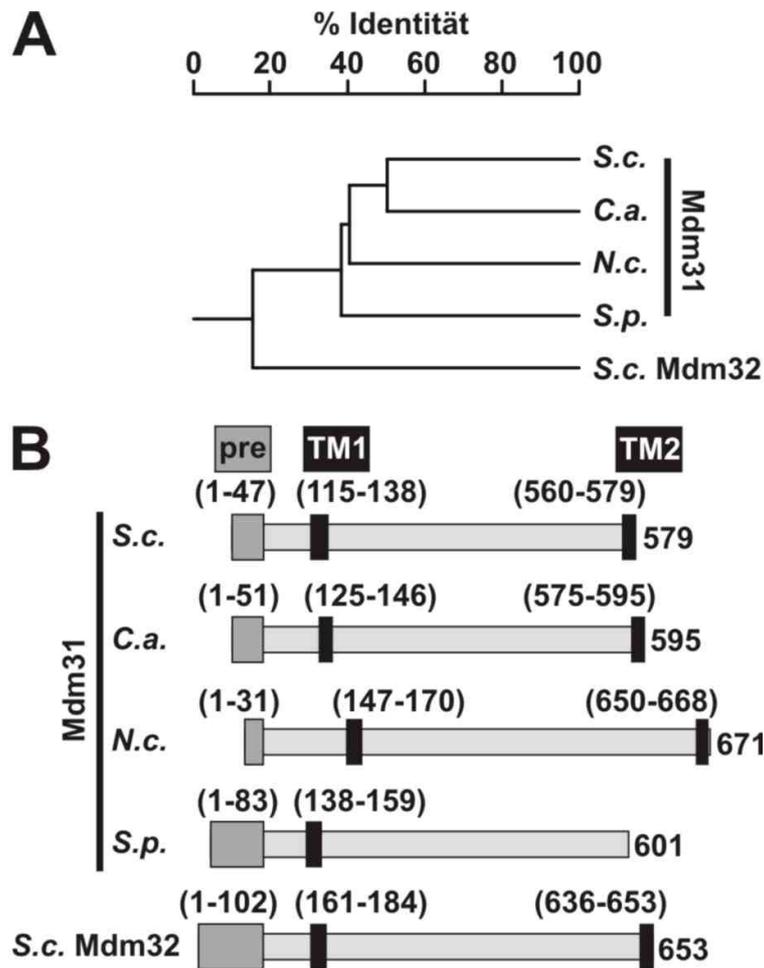


Abbildung 4: (A) Homologie-Stammbaum der Mdm31/Mdm32-Proteinfamilie. Homologe Proteine wurden mittels der BLAST-Suchfunktion (Altschul *et al.*, 1997) identifiziert, der Stammbaum mittels DNAMAN Software (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada) erstellt. **(B) Domänenstruktur der Mdm31/Mdm32-Proteinfamilienmitglieder.** Als dunkelgraue Boxen sind mitochondriale Präsequenzen (pre), als schwarze Balken Transmembranhelices (TM) dargestellt. Domänengrenzen sind durch Aminosäurerestenummern definiert. Erläuterung vgl. Text.

3.2.2 Mitochondrialer Phänotyp von $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Zellen

Den ersten Hinweis auf einen veränderten mitochondrialen Phänotyp in $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämmen lieferte die Durchmusterung der Hefedeletionsstammsammlung (3.1) im genetischen Wildtyp-Hintergrund BY4743. Von Euroscarf (<http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf>) bezogene haploide Deletionsstämme (BY4741 und BY4742, $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$) zeigten allerdings keinen eindeutigen mitochondrialen Phänotyp. Nur ca. 40-50% aller Zellen besaßen ein oder mehrere sphärische Mitochondrien, während die restlichen Zellen Tubuli aufwiesen, die an WT-Zellen erinnerten. Um zu zeigen, dass es sich bei dieser Beobachtung um einen stammspezifischen Effekt handelt, wurde der Wildtyp-Stammhintergrund gewechselt. Eine Erklärung für dieses Verhalten der Deletionsstämme wäre die Akkumulierung von Suppressoren in den BY-Stämmen, die den Deletionsphänotyp unterdrücken. Im Hinblick auf weitere Untersuchungen wurde ein Stammhintergrund verwendet, der für biochemische und hefegenetische Experimente besser geeignet ist. Im Folgenden wurden die Gene *MDM31* und *MDM32* in den Stämmen YPH499 und YPH500 (Sikorski und Hieter, 1989) mit der KanMX6- und der His3MX6-Kassette (Bähler *et al.*, 1998; Wach *et al.*, 1994) deletiert. Zur Analyse der mitochondrialen Morphologie wurden alle vier Disruptionsstämme mit pVT100UmtGFP (Westermann und Neupert, 2000) transformiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Übereinstimmend mit den ersten Beobachtungen (3.1) wiesen die Zellen einen deutlich vom WT unterschiedlichen Phänotyp (Abb. 5) auf, der jedoch etwas heterogener war. Ein Großteil der Mitochondrien war sphärisch (Abb. 5 C, $\Delta mdm31$ und 5 G, $\Delta mdm32$), wobei einige dieser sphärischen Mitochondrien dunkle Bereiche aufwiesen (Abb. 5 D, $\Delta mdm31$ und 5 H, $\Delta mdm32$, Pfeile), die als Löcher oder Einschlüsse interpretiert wurden. Genauere Untersuchungen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie bestätigten diese Annahme (Dimmer *et al.*, im Druck). Ein kleinerer Teil der Zellen besaß ringförmige Mitochondrien (Abb. 5 E, $\Delta mdm31$ und 5 I, $\Delta mdm32$), die vermutlich durch große Einschlüsse zustande kamen. In einigen Zellen traten auch mehrere kleine Kugeln (Abb. 5 F, $\Delta mdm31$ und 5 J, $\Delta mdm32$) auf. Eine statistische Auswertung der verschiedenen Mitochondrienformen findet sich in Tabelle 8.

Die Morphologie und Dynamik der Mitochondrien in *S. cerevisiae* hängt von der korrekten Ausbildung des Aktinzytoskelettes ab (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1995). Ferner ähnelt der mitochondriale Phänotyp der $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Deletionsmutanten Stämmen, denen funktionelles Mmm1 oder Mdm10 fehlt (Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994). Für diese beiden Proteine wird eine Funktion bei der

Interaktion von Mitochondrien mit dem Aktinzytoskelett postuliert (Boldogh *et al.*, 1998). Die beobachteten Morphologiedefekte könnten folglich auf eine Beeinträchtigung des Aktinzytoskelettes in $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämmen zurückzuführen sein. Um dies zu untersuchen, wurde das Aktinzytoskelett mittels Rhodamin-Phalloidin angefärbt. Die Deletionsstämmen zeigten dieselbe Anordnung der zwei dominanten Aktinzytoskelettanteile (Aktin-Bündel und Aktin-Patches) wie der Wildtyp (Abb. 6). Auch andere Zellorganellen wurden durch den Verlust von Mdm31 und Mdm32 nicht beeinflusst. Nach Färbung der Vakuolen und des endoplasmatischen Retikulums, der fluoreszenzmikroskopischen Analyse und dem Vergleich mit dem entsprechenden Wildtyp-Stamm wurden keine Veränderungen dieser Organellen in $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämmen beobachtet (Abb. 6). Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den beobachteten Morphologiedefekten weder um einen pleiotropen Effekt oder um einen Sekundäreffekt handelt. Mdm31 und Mdm32 nehmen also direkt Einfluss auf die mitochondriale Morphogenese.

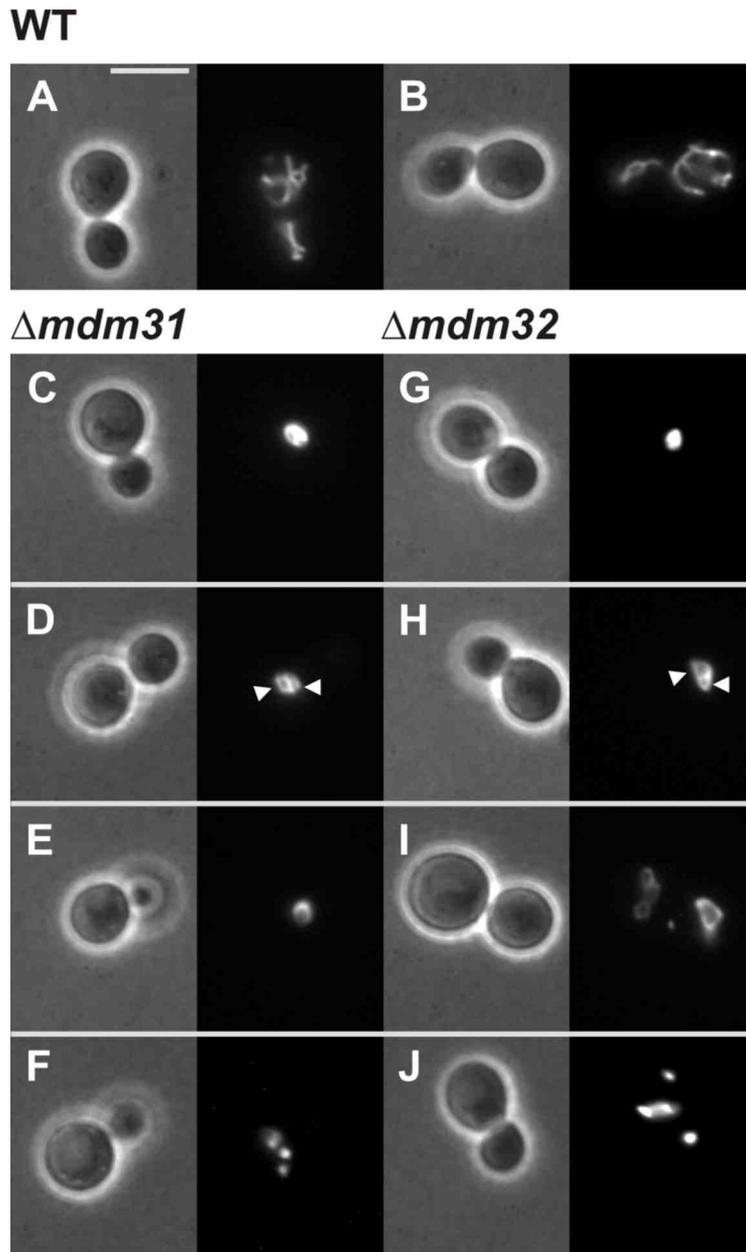


Abbildung 5: Mitochondrialer Phänotyp der Deletionsstämme $\Delta mdm31$ (C-F) und $\Delta mdm32$ (G-J) im YPH-Hintergrund. Die beiden oberen Abbildungen zeigen den WT-Phänotyp zum Vergleich (A, B). Das rechte Bild zeigt die mit mtGFP markierten Mitochondrien, das linke Bild die entsprechende Phasenkontrastaufnahme. Die Pfeile (D, H) deuten auf dunkle Bereiche der sphärischen Riesenmitochondrien. Erläuterungen siehe Text. Der Längensstandard (WT) entspricht 5 μ m.

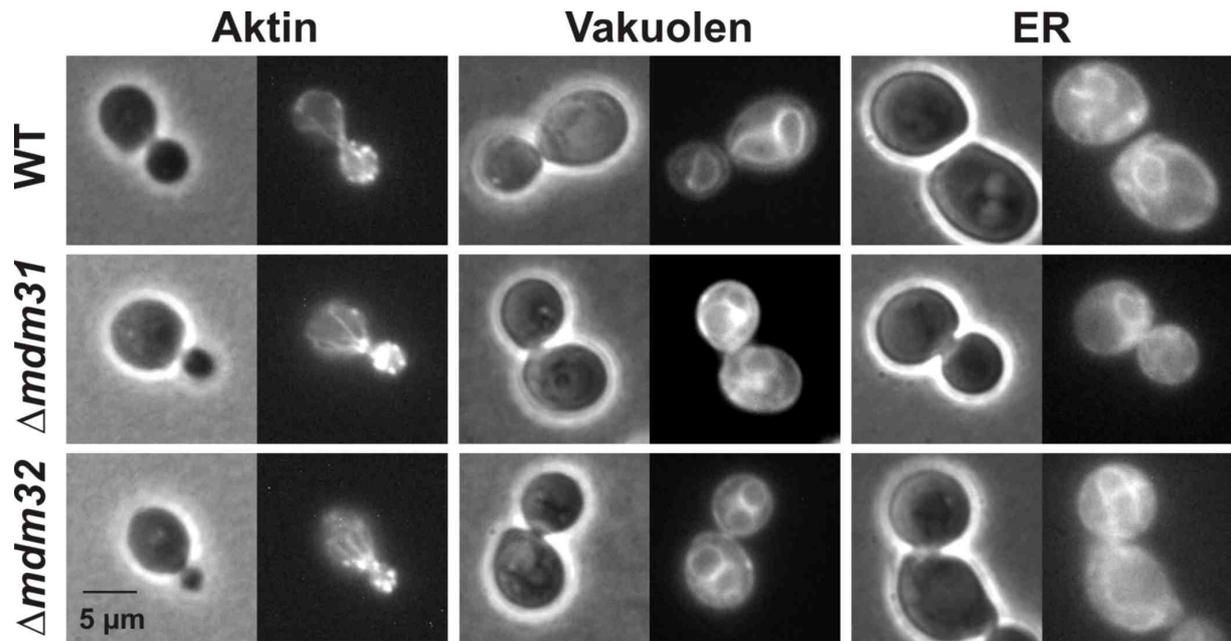


Abbildung 6: Färbung diverser Zellstrukturen: Aktinzytoskelett (erste Spalte), Vakuolen (mittlere Spalte) und ER (letzte Spalte) in WT-, $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Zellen. Die Zellen wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben (2.3.9) angefärbt (Aktin und Vakuolen) oder mit einem GFP-Fusionsprotein exprimierenden Plasmid transformiert (ER).

3.2.3 Lokalisierung von Mdm31 und Mdm32

3.2.3.1 Mdm31 und Mdm32 werden membranpotentialabhängig in Mitochondrien importiert

Den ersten Hinweis auf eine mitochondriale Lokalisation von Mdm31 und Mdm32 ergab die *in silico* Analyse der Polypeptidsequenzen, die eine mitochondriale Präsequenz vorhersagt (3.2.1). Um diese Vorhersage zu testen, wurden zunächst radioaktive Vorstufenproteine synthetisiert und im *in vitro*-Importexperiment eingesetzt. Es sollte getestet werden, ob die Proteine in Abhängigkeit des Membranpotentials importiert werden. Eine Membranpotentialabhängigkeit weist auf eine Importroute via Tim23-Komplex hin (Neupert, 1997). Dieser Importweg wird typischerweise von Proteinen der Matrix und einigen Proteinen der Innenmembran beschränkt. Die Importreaktion wurde in Abwesenheit und Gegenwart von Valinomycin durchgeführt, welches einen Kanal für Kationen ausbildet. Durch die Wirkung des Valinomycins kommt das Membranpotential der inneren Membran zum Erliegen. Ferner wurde parallel ein Proteaseverdau mit Proteinase K durchgeführt. Durch Inkubation der Mitochondrien mit der Protease nach der Importreaktion wird nicht importiertes Vorstufenprotein abgebaut, während das durch mitochondriale Membranen geschützte, importierte Protein erhalten bleibt.

Die *in vitro*-Transkription und Translation ergab für beide Proteine jeweils eine dominante Bande, für Mdm31 bei ca. 60 kDa (vorhergesagt: 66,7 kDa) und für Mdm32 bei ca. 65 kDa (vorhergesagt: 75,5 kDa) (Abb. 7, V, Vorstufenprotein). Beide Proteine wurden in Mitochondrien importiert und durch die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase (MPP) prozessiert (Arretz *et al.*, 1991), welche mitochondriale Präsequenzen abspaltet. Jeweils in Spur 2 in Abb. 7 ist eine kleinere Proteinbande (R, reife Form) zu erkennen, die auch bei Behandlung mit Proteinase K erhalten blieb. Im Falle von Mdm31 war die Prozessierung des Protease-geschützten Anteils (Spur 3) nicht vollständig. Wurde Mdm31-Vorstufenprotein mit rekombinant hergestellter MPP inkubiert, wurde eine ca. 30%-ige Prozessierung des Proteins beobachtet (nicht gezeigt). Die Ursache, weshalb Mdm31 ein schlechtes Substrat der MPP darstellt, ist unbekannt. In beiden Fällen, sowohl für Mdm31 als auch für Mdm32, war nur ein Teil der prozessierten Form vor der Protease geschützt (jeweils Spur 2 und 3 im Vergleich). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die äußere Membran der isolierten Mitochondrien nicht vollständig intakt war. In Gegenwart von Valinomycin (jeweils Spur 4 und 5) wurden die Vorstufenproteine nur zu einem geringen Anteil importiert und folglich

kaum prozessiert. Durch die Behandlung der Mitochondrien mit Proteinase K wurden Mdm31 und Mdm32 fast vollständig abgebaut.

Mdm31 und Mdm32 werden folglich membranpotentialabhängig in Mitochondrien importiert und durch die in der Matrix lokalisierte MPP prozessiert. Eine genauere Analyse der ersten vorhergesagten Transmembrandomäne ließ auf einen „stop-transfer“-Importmechanismus schließen. Dazu wurde die Hydrophobizität der N-terminalen Transmembrandomänen von Mdm31 und Mdm32 mit den Transmembrandomänen anderer mitochondrialer Innenmembranproteine verglichen, deren Importmechanismus bekannt ist (Stephan Meier, persönliche Mitteilung). Mdm31 und Mdm32 werden demnach über den TIM23-Komplex in Mitochondrien importiert. Erreicht die N-terminale Transmembrandomäne den TIM23-Komplex, wird das Protein mit dieser Domäne lateral in die mitochondriale Innenmembran eingebaut.

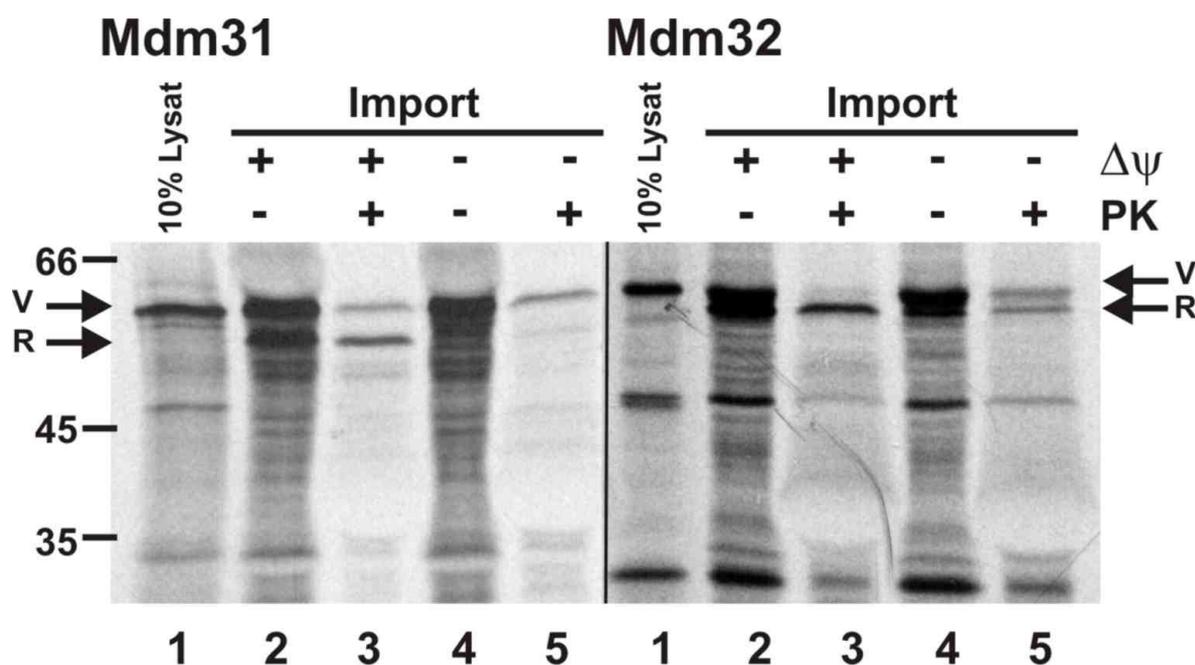


Abbildung 7: Importexperiment für Mdm31 und Mdm32. Jeweils die erste Spur (10% Lysat) zeigt 10% des in der Importreaktion eingesetzten Vorstufenproteins. In der 2. und 3. Spur war das Membranpotential ($\Delta\psi$) der Mitochondrien intakt, in den Spuren 4 und 5 wurde der Import in Gegenwart von Valinomycin durchgeführt. In den Spuren 3 und 5 erfolgte nach der Importreaktion eine Inkubation der Mitochondrien mit Proteinase K (PK). (V) Vorstufenprotein, (R) reife Form. Erläuterung vgl. Text.

3.2.3.2 Mdm31 und Mdm32 sind mitochondriale Proteine

Um endogenes Mdm31 und Mdm32 nachweisen zu können, wurden polyklonale Antikörper gegen beide Proteine erzeugt. Da es nicht möglich war, die vollständigen Proteine in *E.coli* zu exprimieren, wurden die Proteinsequenzabschnitte zwischen den beiden vorhergesagten Transmembranregionen (vgl. Abb. 4 B) zur Überexpression als Antigene ausgewählt. Kaninchen wurden mit den als Inclusion-Bodies gereinigten Proteinen immunisiert. Die entnommenen Seren wurden mittels Affinitätsbindung aufgereinigt. Die gereinigten Antikörper wurden im Westernblotexperiment mit mitochondrialem Protein getestet. Abbildung 8 A zeigt die Immunoblots von mitochondrialem Protein des Wildtyp-Stammes sowie der Deletionsstämme $\Delta m d m 3 1$ und $\Delta m d m 3 2$. Für Mdm31 und Mdm32 wurden Signale der nach den Importexperimenten (vgl. 3.2.3.1) zu erwartenden Größe erhalten, die in den entsprechenden Deletionsstämmen fehlen. Mit beiden affinitätsgereinigten Antikörpern war bei Wildtyp-Mitochondrien eine Kreuzreaktion gegen ein unbekanntes Protein mit einer Größe von ca. 36 kDa zu beobachten.

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Mdm31 und Mdm32 wurden Mitochondrien, die nicht mitochondriale Membranfraktion (Mikrosomen) und Zytosol eines WT-Stammes präpariert. Die Mikrosomen enthalten u.a. Membranvesikel des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgiapparates und der Vakuole. Die Mitochondrien wurden nach der Präparation über einen Saccharosegradienten weiter aufgereinigt. Vergleichbare Mengen einer jeden Fraktion (25 μ g Protein) wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Als Marker für die einzelnen Fraktionen dienten AAC (ADP/ATP Carrier) als Protein der mitochondrialen Innenmembran, Erp1 als Protein des Endoplasmatischen Retikulums und Bmh2 als zytosolisches Protein. Abb. 8 B zeigt, dass sowohl Mdm31 als auch Mdm32 mit Hilfe spezifischer Antikörper nur in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen werden konnten.

Der *in vitro*-Import von Mdm31 und Mdm32 sowie die Kofraktionierung der beiden Proteine mit mitochondrialen Markerproteinen zeigen, dass es sich bei Mdm31 und Mdm32 um mitochondriale Proteine handelt.

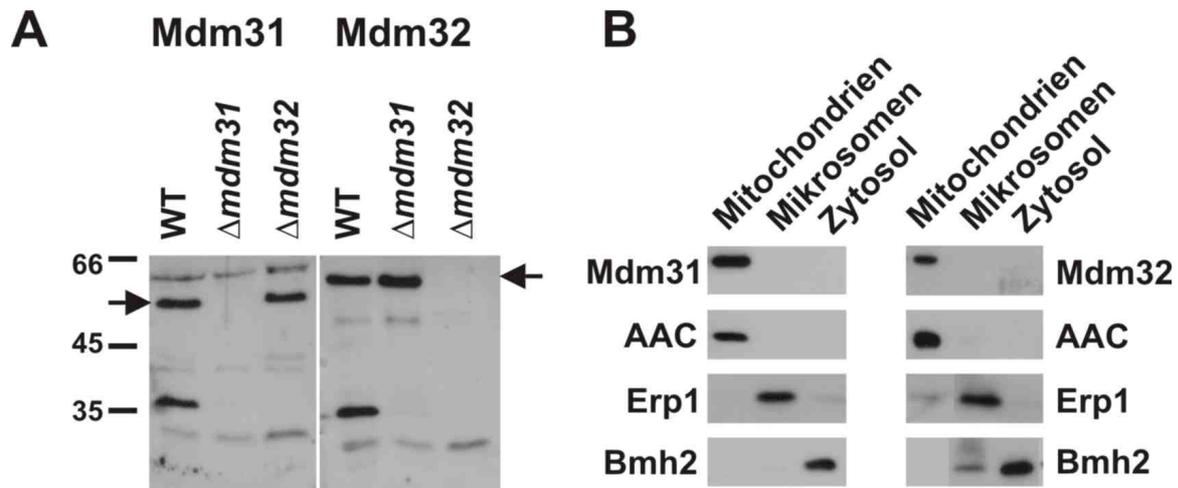


Abbildung 8: (A) Detektion von Mdm31 und Mdm32 durch affinitätsgereinigte Antikörper. Jeweils 25 μ g Mitochondrienprotein des WT-Stammes und der $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämme wurden je Spur aufgetragen. Nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulose-Membran erfolgte die Detektion der Proteine mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Mdm31 (links) und Mdm32 (rechts). Die Pfeile zeigen auf die jeweilige spezifische Bande. **(B) Subzelluläre Lokalisation von Mdm31 und Mdm32.** Jeweils 25 μ g mitochondriales Protein (gereinigt mittels Saccharosegradient), mikrosomales Protein und zytosolisches Protein wurden aufgetragen. Nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulose-Membran erfolgte die Detektion der Proteine mit Antikörpern gegen Mdm31 und Mdm32, sowie gegen AAC (Mitochondrienmarker), Erp1 (ER-Marker) und Bmh2 (zytosolischer Marker).

3.2.3.3 Mdm31 und Mdm32 sind Membranproteine der mitochondrialen Innenmembran, deren Hauptteil im Intermembranraum liegt

Zwei experimentelle Ansätze wurden verfolgt, um die submitochondriale Lokalisierung und die Topologie von Mdm31 und Mdm32 zu bestimmen. Zum einen wurde mit isolierten Mitochondrien eine Carbonatextraktion durchgeführt, bei der alle membranassoziierten Proteine in die lösliche Phase übergehen und die integralen Membranproteine im Membranpellet verbleiben. Zum anderen wurden Mitochondrien durch Inkubation in einem hypotonen Puffer in Mitoplasten überführt, oder mit Triton X-100 als Detergenz komplett lysiert und mit Protease behandelt. Beide Ansätze wurden sowohl für importierte Vorstufenproteine mittels Autoradiographie als auch für die endogenen Proteine mittels Immunoblot analysiert.

Abbildung 9 A zeigt die Protease-Behandlung von Mitochondrien mit importiertem Protein. Mdm31 und Mdm32 waren in Mitochondrien auch nach einer Behandlung mit Proteinase K nachweisbar (Abb. 9 A, Spur 3). Im Gegensatz dazu konnten Mdm31 und Mdm32 nach Überführung der Mitochondrien in Mitoplasten und anschließendem PK-Verdau nicht mehr detektiert werden (Abb. 9 A, Spur 4). Ferner war kein geschütztes Fragment in Mitoplasten erkennbar. Bei Lyse der Mitochondrien mit Detergenz und Verdau mittels PK waren Mdm31 und Mdm32 ebenfalls nicht mehr nachweisbar (Abb. 9 A, Spur 5). Daraus folgt, dass fast die komplette Peptidkette der beiden Proteine im Intermembranraum lokalisiert sein muss.

Die Carbonatextraktion (Abb. 9 B) zeigt, dass es sich bei Mdm31 und Mdm32 um Membranproteine handelt. Beide Proteine kofraktionierten mit mitochondrialen Membranproteinen (wie hier Dld1) im Carbonatextraktionspellet.

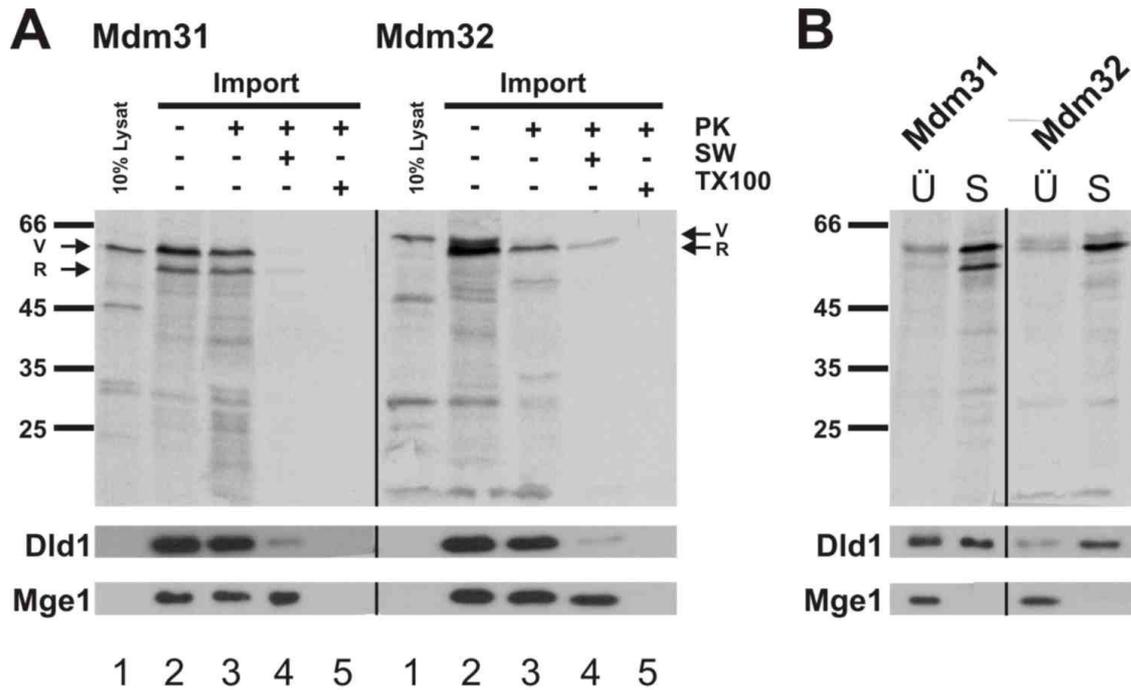


Abbildung 9: Submitochondriale Lokalisation von Mdm31 und Mdm32. *In vitro*-Import von Mdm31 und Mdm32. (A) Nach der Importreaktion wurde ein Ansatz direkt für die Analyse via SDS-PAGE, Westernblot und Autoradiographie verwendet (jeweils Spur 2). Ein Ansatz wurde mit PK inkubiert (Spur 3), ein weiterer wurde durch hypotonen Puffer (SW) in Mitoplasten überführt und mit Proteinase K (PK) behandelt (Spur 4). Zur Kontrolle wurden die Mitochondrien in Spur 5 komplett mit Detergenz (Triton X-100) lysiert und mit Protease behandelt. (B) Carbonatextraktion nach Importreaktion. (Ü) Überstand, (S) Sediment. Zur Kontrolle wurde der Blot nach der Autoradiographie mit spezifischen Antikörpern gegen Dld1 (Intermembranraum) und Mge1 (Matrix) dekoriert.

Zum gleichen Ergebnis führten die Experimente mit endogenem Protein in Wildtyp Mitochondrien (Abb. 10 A). Mdm31 und Mdm32 waren solange vor Proteaseangriff geschützt, wie die äußere mitochondriale Membran intakt war (Abb. 10 A, Spuren 1-4). In der Carbonatextraktion kofraktionierten beide Proteine mit mitochondrialen Membranen (Spuren 5 und 6). Während Mdm31 komplett im Pellet vorlag, fanden sich ca. 50 % des Mdm32 im Überstand der Carbonatextraktion. Ein ähnliches Verhalten wurde auch schon für andere integrale Membranproteine mit einer Transmembrandomäne beobachtet, wie z.B. Dld1 oder Tim50 (Mokranjac *et al.*, 2003).

Einen Überblick über die möglichen Topologien, die sich aus diesen Experimenten für Mdm31 und Mdm32 ergeben, zeigt Abbildung 10 B. Ob es sich bei dem C-terminalen hydrophoben Bereich um eine Transmembrandomäne handelt, und in welcher Membran, der Innenmembran (IM) oder Außenmembran (AM) des Mitochondrions, sie lokalisiert ist, konnte nicht geklärt werden. Ein Ansatz war, am C-Terminus einen Peptidmarker anzubringen (HA, myc, GFP) und durch Proteaseverdau zu zeigen, dass dieser in intakten Mitochondrien abgebaut wird. Dies würde für eine Transmembrandomäne in der Außenmembran sprechen. Im Falle des myc-Tags schien dies für beide Proteine zuzutreffen (nicht gezeigt). Allerdings zeigten Mitochondrien in Stämmen, die diese C-terminale Erweiterung der Proteine besaßen denselben Phänotyp wie die Deletionsstämme $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$, so dass keine Aussage über die korrekte Topologie der Proteine nach Anfügen des myc-Markers getroffen werden kann. In der Regel sind hydrophobe Transmembranhelices von geladenen Aminosäuren flankiert (Deber *et al.*, 2001). Der zweite hydrophobe Sequenzabschnitt befindet sich in der Mdm31- und Mdm32-Sequenz direkt am C-Terminus. C-terminal fehlen folglich flankierende Ladungen. Dies spräche für Topologie 1 (Abb. 10 B). Der C-terminale Proteinabschnitt könnte für eine Interaktion mit einem mitochondrialen Außenmembranprotein zuständig sein.

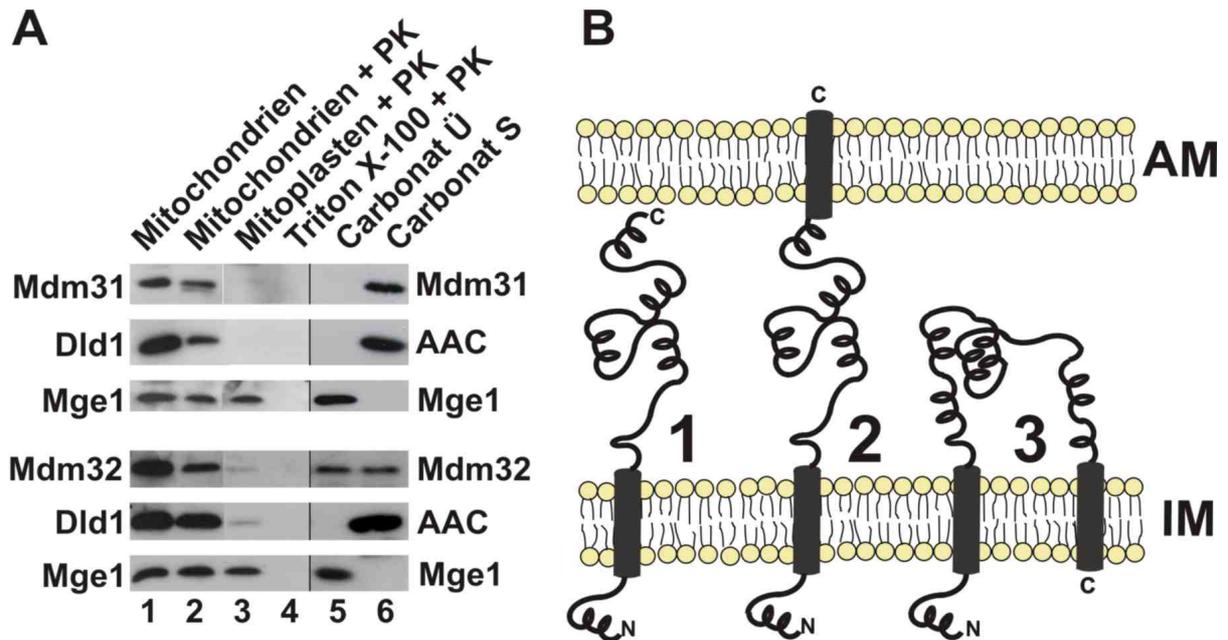


Abbildung 10: (A) Submitochondriale Lokalisation von Mdm31 und Mdm32. 25 μ g Mitochondrien wurden direkt für die Analyse mittels SDS-PAGE und Immunoblot aufgetragen (jeweils Spur 1). Ein Ansatz wurde mit PK inkubiert (Spur 2), ein weiterer wurde durch hypotonen Puffer in Mitoplasten überführt und mit Proteinase K (PK) behandelt (Spur 3). Zur Kontrolle wurden die Mitochondrien in Spur 4 mit Detergenz (Triton X-100) lysiert und mit Protease behandelt. In Spur 5 ist der Überstand der Carbonatextraktion (Ü) von 25 μ g Mitochondrien, in Spur 6 das Sediment (S, Membranfraktion) aufgetragen. Die Immundekoration der Nitrozellulosemembranen erfolgte mit Antikörpern gegen Mdm31 und Mdm32. Als Kontrollen dienten Dld1, AAC und Mge1. **(B) Topologiemodelle für Mdm31 und Mdm32.** Drei verschiedene Möglichkeiten der Topologie und damit Lokalisierung in der mitochondrialen Außen- und Innenmembran (AM, IM) von Mdm31 und Mdm32. Erläuterungen vgl. Text.

3.2.4 Mdm31 und Mdm32 besitzen überlappende Funktionen

Die Deletion von *MDM31* oder *MDM32* führt zu einem fast identischen mitochondrialen Phänotyp (3.2.2). Nur in *S.cerevisiae* liegen zwei Homologe dieser Proteinfamilie vor (3.2.1), während alle anderen entfernt verwandten Pilze nur ein Homolog besitzen. Um einen möglichen funktionellen Zusammenhang von Mdm31 und Mdm32 in Hefe zu untersuchen, wurde zunächst ein Doppeldeletionsstamm $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ durch Kreuzung eines $\Delta mdm31$ -Stammes und eines $\Delta mdm32$ -Stammes und Tetradendisektion hergestellt. Der Doppeldeletionsstamm wurde mit dem Plasmid pVT100UmtGFP transformiert und die Mitochondrien mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Abbildung 11 zeigt den mitochondrialen Phänotyp dieses Stammes. Auch in diesem Stamm liegen dieselben mitochondrialen Phänotypen vor wie in den Einzeldelentionsstämmen (vgl. auch Tabelle 8). Ein Großteil der Mitochondrien ist sphärisch (Abb. 11 A), einige dieser sphärischen Mitochondrien weisen dunkle Bereiche auf (Abb. 11 B), die als Löcher oder Einschlüsse interpretiert wurden. Ein kleinerer Teil der Zellen besitzt ringförmige Mitochondrien (Abb. 11 C), die vermutlich großen Einschlüssen entsprechen. In einigen Zellen treten auch mehrere kleine Kugeln (Abb. 11 D) auf.

Die Tatsache, dass sich der mitochondriale Phänotyp der Doppeldeletionsmutante nicht von den Einzeldelentionsstämmen unterscheidet, legt die Vermutung nahe, dass beide Proteine an ein und demselben Prozess beteiligt sind, der die mitochondriale Morphologie bestimmt.

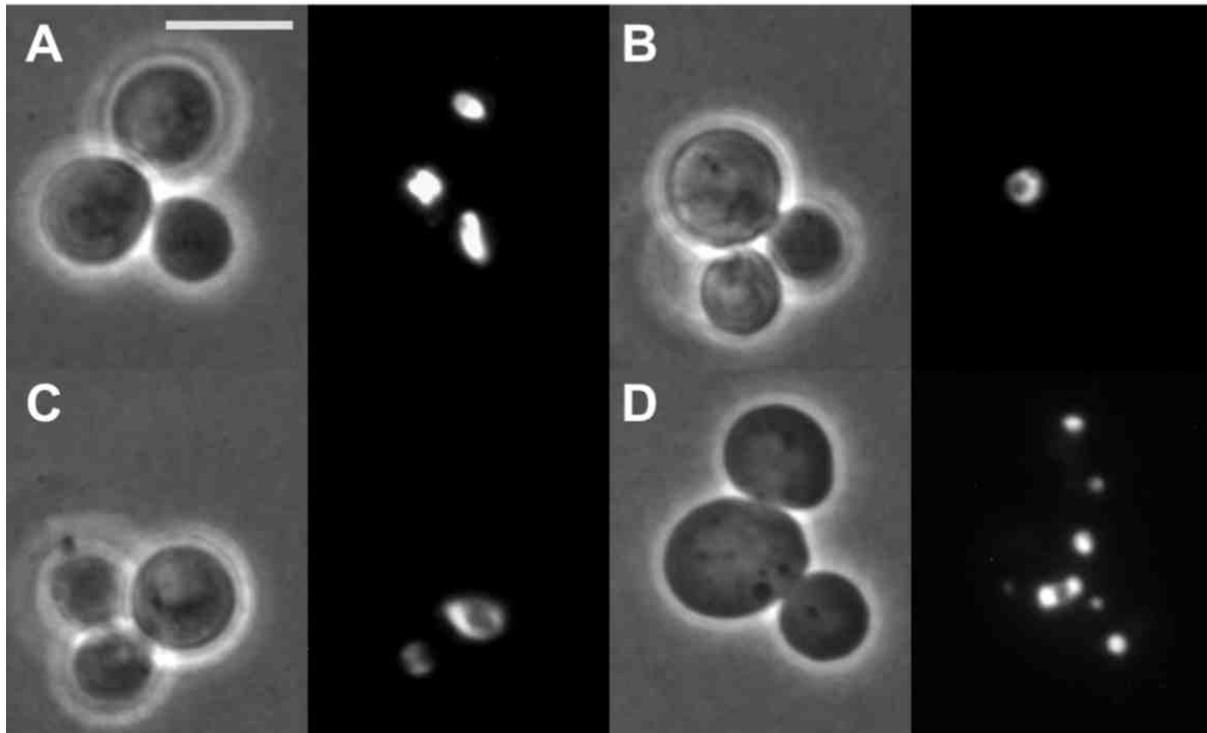
$\Delta mdm31/\Delta mdm32$ 

Abbildung 11: Mitochondrialer Phänotyp des $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ Doppeldeletionsstammes. Untersucht wurde ein haploider Doppeldeletionsstamm im YPH-Hintergrund, welcher mitochondriales GFP (mtGFP) nach Transformation mit pVT100UmtGFP (Westermann und Neupert, 2000) exprimiert. Die Bilderpaare zeigen jeweils die Phasenkontrastaufnahme (links) und die GFP-Fluoreszenzaufnahme (rechts). Der Längenstandard (A) entspricht 5 μm .

3.2.5 Mdm31 und Mdm32 liegen in zwei unterschiedlichen, transient interagierenden, höhermolekularen Komplexen vor

Die phänotypischen Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass es sich bei Mdm31 und Mdm32 um eine funktionelle Einheit handeln könnte. Beide Proteine könnten z.B. Untereinheiten eines gemeinsamen Proteinkomplexes der Innenmembran sein oder zumindest miteinander interagieren. Um diese Hypothese zu testen, wurden drei experimentelle Ansätze verfolgt. Die Ausbildung eines höhermolekularen Proteinkomplexes wurde durch Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) überprüft. Nach der Lyse von Mitochondrien in dem Detergenz Digitonin wurden mitochondriale Proteine und

Ergebnisse

Proteinkomplexe mit einer Superose 6 Säule (Pharmacia) ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht. Als Größenstandard wurden die Proteine Thyreoglobulin (670 kDa), Apoferritin (440 kDa) und Alkoholdehydrogenase (150 kDa) verwendet. Zwischen dem dekadischen Logarithmus der molekularen Masse und dem Elutionsvolumen besteht ein linearer Zusammenhang. Anhand der Markerproteine wurde eine Komplexgröße von ca. 650 kDa für Mdm31 und ca. 180 kDa für Mdm32 bestimmt (Abb. 12). Beide Proteine liegen folglich in zwei unterschiedlichen Komplexen der Innenmembran vor.

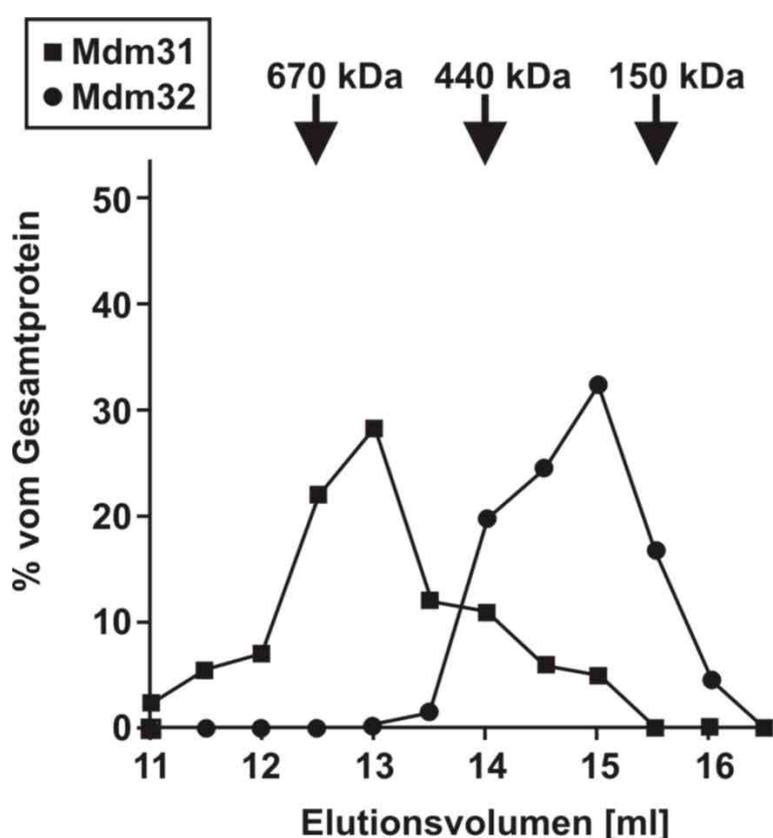


Abbildung 12: Gelfiltrationschromatographie von mitochondrialen Proteinen. Wildtyp-Mitochondrien (1 mg mitochondriales Protein) wurden in 1% Digitonin lysiert und in einem Laufpuffer mit 0,05% Digitonin einer Größenausschlusschromatographie mittels einer Superose 6 Säule unterzogen. Die Proteine der 0,5 ml Fraktionen wurden mit Trichloressigsäure gefällt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörper gegen Mdm31 (■) und Mdm32 (●) analysiert. Die Intensitäten der Signale wurden durch Densitometrie quantifiziert, summiert und für jede Fraktion (Abszisse) der relative Anteil an Mdm31 und Mdm32 berechnet (Ordinate). Als Größenstandards wurden Thyreoglobulin (670 kDa), Apoferritin (440 kDa) und Alkoholdehydrogenase (150 kDa) unter denselben Bedingungen verwendet.

Um zu testen, ob Mdm31 und Mdm32 gegenseitig Einfluss auf die jeweilige endogene Proteinkonzentration nehmen, wurden je 25 μg Mitochondrienprotein des WT-Stammes sowie der Δmdm31 -, Δmdm32 - und $\Delta\text{mdm31}/\Delta\text{mdm32}$ -Stämme mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen Mdm31 und Mdm32 analysiert. Abbildung 13 A zeigt, dass die Proteinmenge jedes der Proteine unabhängig von der Existenz des Anderen ist. Dieses Ergebnis spricht für zwei unabhängige Proteinkomplexe.

Um eine transiente Interaktion von Mdm31 und Mdm32 nachzuweisen, wurde ein Koimmunfällungsexperiment mit importiertem Vorstufenprotein durchgeführt. In Wildtyp-Mitochondrien und Mitochondrien des Δmdm31 -Stammes wurde Mdm32 importiert. Nach der Importreaktion wurden die Mitochondrien mit Digitonin lysiert und nach Abtrennen der unlöslichen und aggregierten Anteile mit Protein A-Sepharose inkubiert, welche affinitätsgereinigten Antikörper gegen Mdm31 oder das entsprechende Präimmenserum gebunden hatte. Parallel wurde auch Mdm31 importiert und der Fällung unterzogen, um zu zeigen, dass der verwendete Antikörper Mdm31 fällen kann. Danach wurde mittels Autoradiographie analysiert, ob das *in vitro* importierte Mdm32 mit dem Antikörper gegen Mdm31 gefällt wurde. Während importiertes Mdm31 mit einem gegen Mdm31 gerichteten Antikörper gefällt werden konnte, wurde importiertes Mdm32 nur aus Wildtyp-Mitochondrien gefällt, welche endogenes Mdm31 besitzen (Abb. 13 B). In der Koimmunfällung von Mdm32 mit Antikörper gegen Mdm31 wird lediglich die prozessierte Form von Mdm32 beobachtet (Abb. 13 B, Stern). Dies deutet darauf hin, dass es sich um eine funktionelle Wechselwirkung zwischen Mdm31 und Mdm32 handelt. Wenn Mdm31 importiert und eine Koimmunfällung mit Antikörper gegen Mdm32 durchgeführt wurde, wurde ein entsprechendes Ergebnis erhalten (nicht gezeigt).

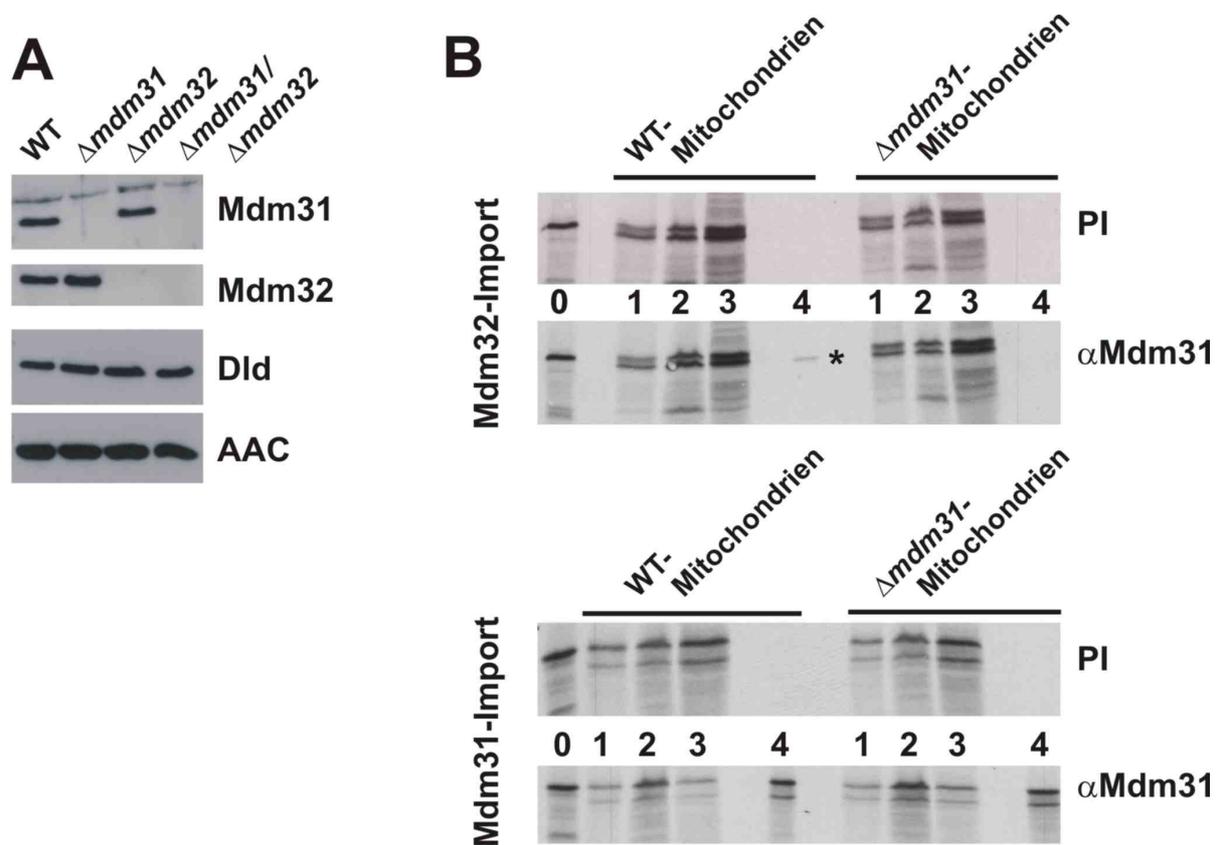


Abbildung 13: (A) Vergleich der Proteinmenge von Mdm31 und Mdm32 in 25 μ g Mitochondrien der Stämme Wildtyp, $\Delta mdm31$, $\Delta mdm32$ und $\Delta mdm31/\Delta mdm32$. Als Kontrolle für identische Mitochondrienmengen dienten Antikörper gegen AAC und Dld1. **(B) Koimmunfällungsexperiment für importiertes Mdm32.** Die beiden oberen Teilausschnitte zeigen den Import von Mdm32, die beiden unteren das Kontrollexperiment mit importiertem Mdm31. (0) 10 % des eingesetzten Vorstufenproteins, (1) 10 % der Importreaktion, (2) 100 % der unlöslichen und aggregierten Anteile nach der Digitoninlyse, (3) 100 % des Überstandes nach der Bindung an die Protein A-Sepharose, die Antikörper gegen Mdm31 (α Mdm31) oder Präimmunserum (PI) gebunden hatte, (4) 100 % der Immunfällung. Die rechten vier Spuren entsprechen Wildtyp-Mitochondrien, die linken vier $\Delta mdm31$ -Mitochondrien.

Die Ergebnisse dieser Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen. Mdm31 und Mdm32 sind Untereinheiten zweier verschiedener Innenmembrankomplexe. Hinsichtlich ihrer Stabilität und ihres Expressionsstatus sind diese beiden Proteinkomplexe voneinander unabhängig. Es wird eine transiente Interaktion der beiden Proteine beobachtet.

3.2.6 Mdm31 und Mdm32 beeinflussen indirekt die mitochondriale Fusionseffizienz

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass für die mitochondriale Fusion eine Interaktion der für die Fusion essentiellen GTPase Fzo1 mit einem bislang unbekanntem Faktor in der mitochondrialen Innenmembran direkt oder indirekt nötig ist (Fritz *et al.*, 2001). Es wurde vorgeschlagen, dass Mdm31 und Mdm32 als Innenmembrankomponenten eine Funktion bei der Fusion der Mitochondrien spielen könnten (Mozdy und Shaw, 2003). Um zu untersuchen, ob Mdm31 und Mdm32 direkt an der Fusion von Mitochondrien beteiligt sind, wurde mit Einzeldelentionsstämmen und Doppeldelentionsstämmen unterschiedlicher Paarungstypen ein *in vivo*-Fusionsexperiment durchgeführt. Dabei wurde jeweils ein Stamm, der mitochondriales DsRed (mtRFP) exprimiert, mit einem Stamm des entgegengesetzten Paarungstyps, welcher mitochondriales GFP (mtGFP) besitzt, gekreuzt. Die entstandenen Zygoten wurden auf die Durchmischung der beiden in der Matrix vorliegenden fluoreszierenden Proteine untersucht. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse für die verschiedenen Stämme zusammengefasst.

In allen Kreuzungsansätzen wurden fusionierte Mitochondrien, d.h. die Vermischung der zwei aus den beiden Elternstämmen stammenden mitochondrialen Marker mtGFP und mtRFP beobachtet (Abb. 14, jeweils obere Bilderreihe). Mdm31 und Mdm32 spielen folglich keine essentielle Rolle bei der mitochondrialen Fusion. Allerdings wurden in einigen Zygoten auch Mitochondrien beobachtet, die nicht fusioniert waren (Abb.14, jeweils untere Bilderreihe). Diese wurden allerdings nie in nächster Nachbarschaft gefunden. Die verringerte Fusionseffizienz scheint auf eine verminderte Motilität der Mitochondrien zurückzuführen sein. Mitochondrien der Deletionsstämmen von *MDM31* und *MDM32* treten auf Grund eingeschränkter Beweglichkeit seltener in Kontakt zueinander. Wenn ein Deletionsstamm von *MDM31* mit einem Deletionsstamm von *MDM32* gekreuzt wurde, bildete sich der WT-Phänotyp in der Zygote wieder aus, und die Fusion der Mitochondrien war wieder effizient.

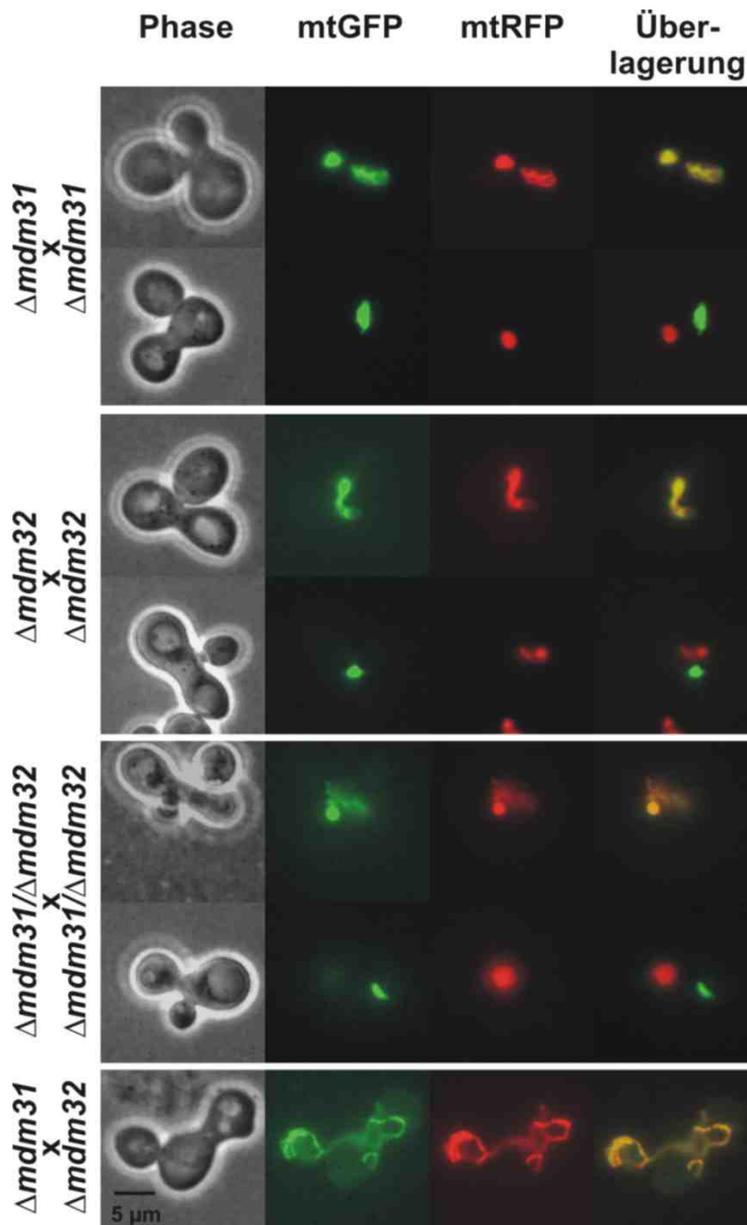


Abbildung 14: *In vivo*-Fusionsnachweis. Sowohl die Einzeldelentionsstämme $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$ als auch die Doppeldelentionsstämme $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ wurden auf Fusion der Mitochondrien untersucht. Es wurden jeweils Stämme entgegengesetzten Paarungstypus verwendet, die mitochondriales GFP (mtGFP, pYX113mtGFP, Westermann und Neupert, 2000) und mitochondriales DsRed (mtRFP, pRS416-GAL1+PrF0ATP9-RFP, Mozdy *et al.*, 2000) exprimierten. Nach Ausbildung der Zygoten wurden diese fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Als Kontrolle wurde die Fusion bei der Kreuzung eines $\Delta mdm31$ -Stammes mit einem $\Delta mdm32$ -Stamm untersucht (unterste Bilderreihe). Jede Bilderreihe besteht aus der Phasenkontrastaufnahme (Phase), der GFP-Fluoreszenzaufnahme (mtGFP), der DsRed-Fluoreszenzaufnahme (mtRFP) und der Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen.

3.2.7 Epistatische Beziehung von *MDM31/MDM32* zu Genen des mitochondrialen Teilungs- und Fusionsapparates

Für Komponenten der mitochondrialen Fusion und Teilung wurden antagonistische Funktionen gezeigt. In hefe-genetischen Experimenten zeigte sich, dass z.B. bei Deletion von *FZO1* (Fusion) und *DNM1* (Teilung) in dem resultierenden Stamm wieder das tubuläre System der Mitochondrien, entsprechend dem Wildtyp zu beobachten war (Sesaki und Jensen, 1999). Es sollte untersucht werden, ob vergleichbares für *MDM31* oder *MDM32* zutrifft. Eine Funktion von Mdm31 und/oder Mdm32 bei der mitochondrialen Teilung könnte dadurch gezeigt werden, dass die Doppeldeletion eines der beiden Gene in Kombination mit *FZO1* in einem WT-Phänotyp der Mitochondrien resultiert. Durch Kreuzung und Tetradendisektion wurden zunächst Doppeldeletionsstämme von *MDM31* und *MDM32* mit *DNM1*, *MDM33* oder *FZO1*, als Komponenten der mitochondrialen Teilung, Teilung der Innenmembran und der mitochondrialen Fusion hergestellt. Der resultierende Doppeldeletionsstamm wurde mit pVT100UmtGFP transformiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Der dominante Phänotyp der jeweiligen Einzeldelentionsmutanten und der Doppeldeletionsmutanten ist in Abbildung 15 zu sehen. Eine quantitative Analyse der Phänotypen ist in Tabelle 8 angegeben.

Alle Doppeldeletionen von *MDM31* und *MDM32* mit *DNM1* (Abb. 15 E, F) und *MDM33* (Abb. 15 H, I) zeigen denselben Phänotyp wie die Einzeldelentionsmutanten von *MDM31* und *MDM32* (Abb. 5). Dieses Ergebnis zeigt, dass die $\Delta m d m 3 1$ und $\Delta m d m 3 2$ Mutationen epistatisch zu den $\Delta d n m 1$ und $\Delta m d m 3 3$ Mutationen sind, d.h. die mitochondriale Morphologie ist in Abwesenheit von Mdm31 und Mdm32 nicht von den Teilungskomponenten abhängig. Mdm31 und Mdm32 sind Dnm1 und Mdm33 in ihrer Funktion übergeordnet. Ferner bestätigt dies das Ergebnis der *in vivo*-Fusionsexperimente (3.2.6). Mdm31 und Mdm32 spielen keine Rolle bei der Fzo1-vermittelten Fusion der Mitochondrien. Die Doppeldeletionen von *MDM31* und *MDM32* mit *FZO1* zeigt Abbildung 15 B und C. Auch bei diesen Gendelentionskombinationen entspricht der mitochondriale Phänotyp den Einzeldelentionsmutanten von *MDM31* und *MDM32*. Mdm31 und Mdm32 sind in ihrer Funktion Fzo1 übergeordnet und spielen keine direkte Rolle bei der Dnm1-vermittelten mitochondrialen Teilung.

Ergebnisse

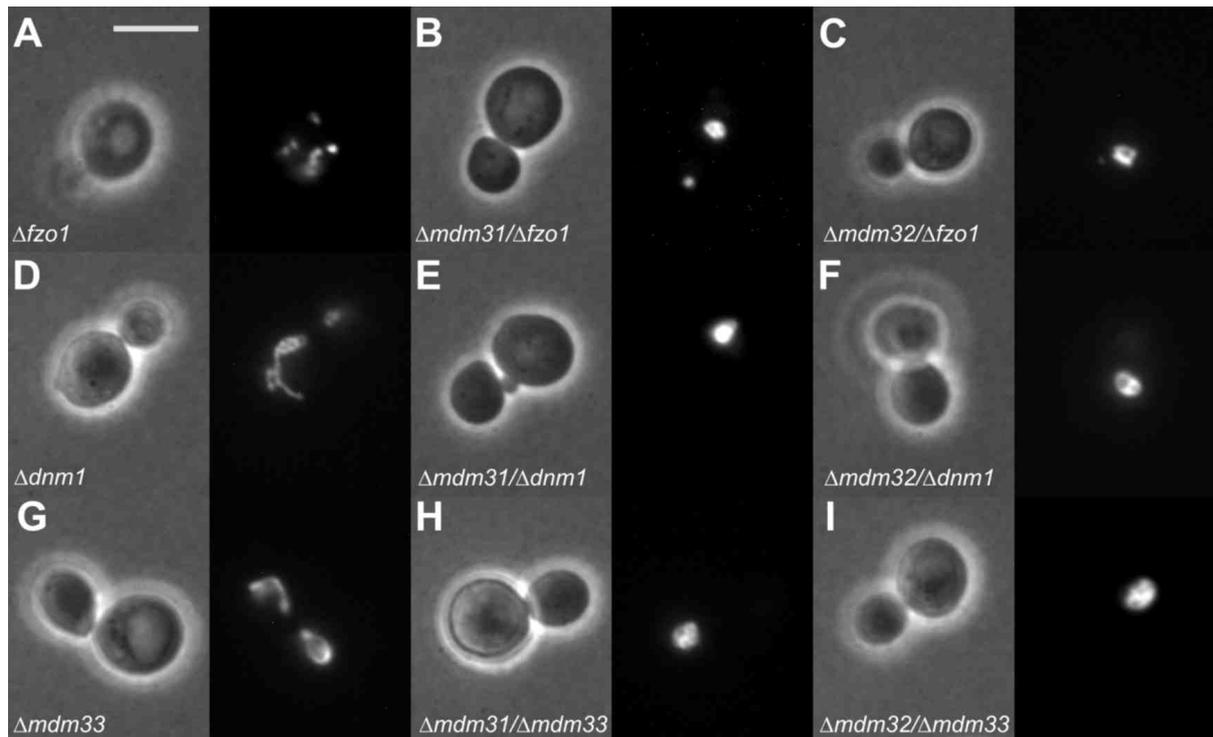


Abbildung 15: Mitochondriale Phänotypen verschiedener Einzel- und Doppeldelentionsmutanten. Dominante Phänotypen der Einzel- und Doppeldelentionen von *MDM31* oder *MDM32* und *FZO1* (obere Bilderreihe A-C), *DNM1* (mittlere Bilderreihe D-F) und *MDM33* (untere Bilderreihe G-H). Der Längensstandard (A) entspricht 5 µm.

| Phänotyp Stamm | WT | einzelner Schlauch | aggregiert | fragmentiert | sphärisch | mehrere Kugeln | große Ringe | kleine Ringe | Netz |
|-----------------------------|-----|--------------------|------------|--------------|-----------|----------------|-------------|--------------|------|
| WT (YPH499) | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| $\Delta mdm31$ | - | 8 | 6 | - | 35 | 19 | 15 | 17 | - |
| $\Delta mdm32$ | - | 7 | - | - | 28 | 26 | 6 | 33 | - |
| $\Delta fzo1$ | - | - | 11 | 88 | - | 1 | - | - | - |
| $\Delta dnm1$ | - | 3 | - | - | - | - | - | - | 97 |
| $\Delta mdm33$ | - | 9 | 4 | 3 | - | 7 | 38 | 39 | - |
| $\Delta mdm31/\Delta fzo1$ | - | 2 | 2 | 12 | 7 | 60 | - | 17 | - |
| $\Delta mdm32/\Delta fzo1$ | - | 1 | 1 | 6 | 9 | 57 | - | 26 | - |
| $\Delta mdm31/\Delta dnm1$ | - | 9 | 4 | - | 41 | 34 | 7 | 5 | - |
| $\Delta mdm32/\Delta dnm1$ | - | 6 | - | - | 28 | 30 | 4 | 31 | 1 |
| $\Delta mdm31/\Delta mdm33$ | - | 4 | - | 1 | 42 | 26 | - | 27 | - |
| $\Delta mdm32/\Delta mdm33$ | - | - | 1 | - | 64 | 14 | 3 | 15 | - |

Tabelle 8: Quantifizierung der Phänotypen der Einzeldelentions- und Doppeldelentionsmutanten von *MDM31* oder *MDM32* und *DNM1*, *FZO1* oder *MDM33*. Es wurden jeweils n>100 Zellen ausgewertet. Angegeben sind die prozentualen Anteile des jeweiligen Phänotyps.

3.2.8 Epistatische Beziehung von *MDM31* und *MDM32* zu *ATP21*, *MDM36* und *MAS37*

Im Rahmen der Untersuchung der genetischen Interaktionen wurden auch die Doppeldeletionsmutanten mit den Genen *ATP21*, welches als Untereinheit der F_1F_0 -ATPase für die Cristae-Entstehung verantwortlich ist (Giraud *et al.*, 2002), mit *MAS37* (Wiedemann *et al.*, 2003), welches als Untereinheit des Tob55-Komplex (Paschen *et al.*, 2003) für die Insertion von β -barrel Proteinen in die mitochondriale Außenmembran von Bedeutung ist, und mit *MDM36*, einer weiteren Morphologiekomponente unbekannter Funktion (Dimmer *et al.*, 2002), hergestellt. Die mitochondrialen Phänotypen der Doppeldeletionsstämme wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Abbildung 16 zeigt die dominanten Phänotypen der durch Tetradendissektion erhaltenen Doppeldeletionen und die der korrespondierenden Einzeldelentionsstämme $\Delta atp21$, $\Delta mas37$ und $\Delta mdm36$. In Tabelle 9 ist die Quantifizierung der Phänotypen angegeben.

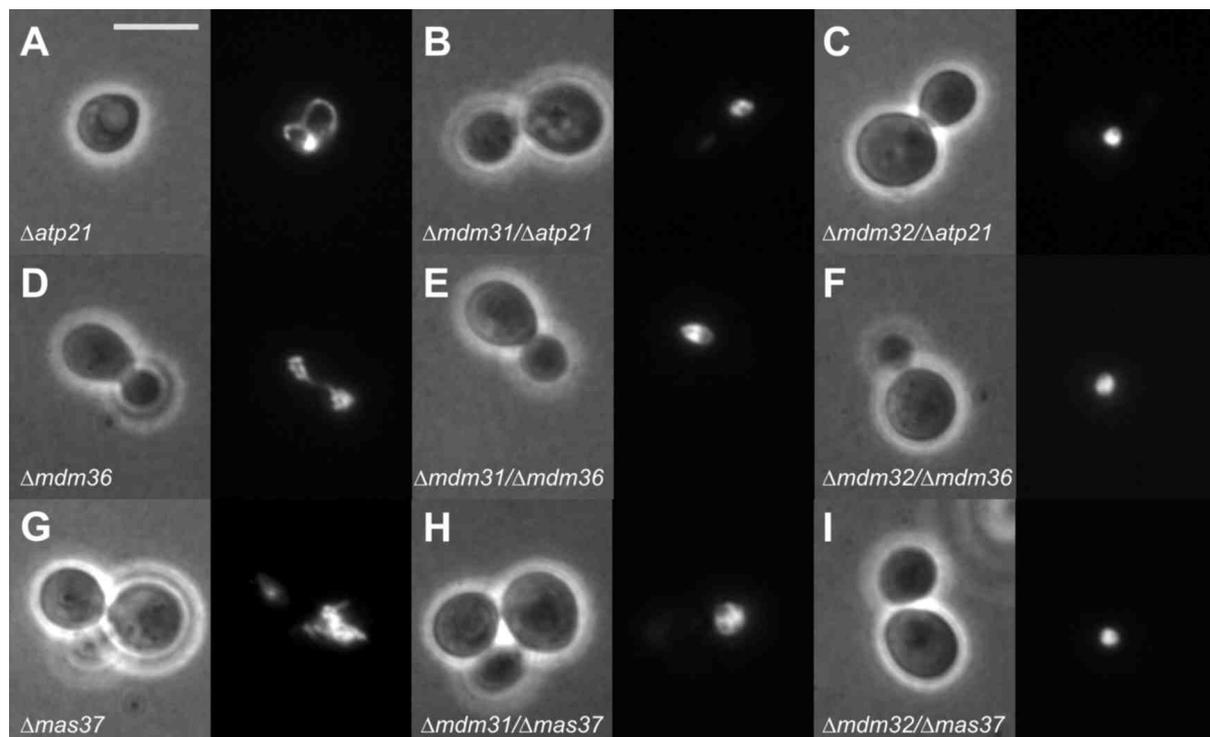


Abbildung 16: Mitochondriale Phänotypen verschiedener Einzel- und Doppeldeletionsmutanten. Dominante Phänotypen der Einzel- und Doppeldeletionen von *MDM31* oder *MDM32* und *ATP21* (obere Bilderreihe A-C), *MDM36* (mittlere Bilderreihe D-F) und *MAS37* (untere Bilderreihe G-I). Der Längenstandard (A) entspricht 5 μ m.

Ergebnisse

| Phänotyp Stamm | WT | Einzelner Schlauch | aggregiert | fragmentiert | sphärisch | mehrere Kugeln | Große Ringe | Kleine Ringe | Netz |
|-----------------------------|-----|--------------------|------------|--------------|-----------|----------------|-------------|--------------|------|
| WT (YPH499) | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| $\Delta mdm31$ | - | 8 | 6 | - | 35 | 19 | 15 | 17 | - |
| $\Delta mdm32$ | - | 7 | - | - | 28 | 26 | 6 | 33 | - |
| $\Delta atp21$ | 95 | - | 4 | - | - | - | - | - | 1 |
| $\Delta mdm36$ | 5 | - | - | - | - | - | - | - | 95* |
| $\Delta mas37$ | 4 | 10 | 69 | 11 | 1 | 5 | - | - | - |
| $\Delta mdm31/\Delta atp21$ | - | 7 | 2 | 7 | 21 | 51 | - | 12 | - |
| $\Delta mdm32/\Delta atp21$ | - | 4 | - | - | 16 | 53 | 1 | 26 | - |
| $\Delta mdm31/\Delta mas37$ | - | 6 | 4 | 2 | 46 | 21 | 5 | 16 | - |
| $\Delta mdm32/\Delta mas37$ | - | 5 | 3 | 2 | 39 | 23 | 3 | 25 | - |
| $\Delta mdm31/\Delta mdm36$ | - | 2 | 1 | - | 54 | 15 | 3 | 24 | - |
| $\Delta mdm32/\Delta mdm36$ | - | 5 | 2 | - | 52 | 21 | - | 20 | - |

Tabelle 9: Quantifizierung der Phänotypen der Einzeldeltions- und Doppeldeltionsmutanten von *MDM31* oder *MDM32* und *ATP21*, *MDM36* oder *MAS37*. Es wurden jeweils n>100 Zellen ausgewertet. Angegeben sind die prozentualen Anteile des jeweiligen Phänotyps. (*) Das bei $\Delta mdm36$ beobachtete Netz schien „grobmaschiger“ und weniger homogen zu sein als bei $\Delta dnm1$ -Stämmen.

Auch bei diesen Kombinationen setzte sich in der Doppelmutante der jeweilige $\Delta mdm31$ - oder $\Delta mdm32$ -Phänotyp durch (Abb. 16 C, D, E, F, H, I).

ATP21 kodiert die Untereinheit e der F_1F_0 -ATPase, die für die Dimerisierung der ATPase notwendig ist (Arnold *et al.*, 1998). Es wurde berichtet, dass die Deletion von *ATP21* in *S. cerevisiae* eine Auswirkung auf die mitochondriale Morphologie und die Cristastruktur hat (Giraud *et al.*, 2002). Die Deletion von *ATP21* im YPH-Hintergrund hatte keinen Einfluss auf die Morphologie gesamter Mitochondrien (Abb. 16A), die korrekte Ausbildung der Cristae wurde nicht überprüft. Die Doppeldeltionsmutanten $\Delta mdm31/\Delta atp21$ und $\Delta mdm32/\Delta atp21$ (Abb. 16 B, C) zeigten denselben Phänotyp wie die Einzeldeltionsstämme $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$.

Der mitochondriale Phänotyp bei Disruption von *MDM36* ähnelt deutlich der Deletion von *DNM1* (Abb. 16D), was schon früher beobachtet wurde (Dimmer *et al.*, 2002). Das beobachtete Netz in $\Delta mdm36$ -Stämmen scheint „grobmaschiger“ und weniger homogen zu sein als in $\Delta dnm1$ -Mutanten. Ein Doppeldeltionsstamm $\Delta mdm36/\Delta fzo1$ zeigt im Gegensatz zu $\Delta dnm1/\Delta fzo1$ -Stämmen aggregierte Mitochondrien (nicht gezeigt) und nicht das tubuläre System, welches typisch für den Wildtyp ist. Diese Beobachtung spricht gegen eine Funktion von Mdm36 im Dnm1-vermittelten Teilungsprozess.

Der auffällige $\Delta mas37$ -Phänotyp (Abb. 16 G) wurde im systematischen Screen der Hefedeletionsstammsammlung (3.1) nicht beobachtet. Möglicherweise wird dieser Phänotyp nach mehreren Generationen durch die Ausbildung von Suppressoren maskiert. Bei den hier beschriebenen genetischen Interaktionsstudien wurden frisch dissektierte Sporen untersucht. Wie viele Generationen die Stämme der Deletionsstammsammlung alt sind, ist nicht bekannt. In jedem Fall unterscheidet sich der $\Delta mas37$ Phänotyp deutlich von WT-Zellen aber auch von dem der $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämme. Die Doppeldeletionsmutanten $\Delta mdm31/\Delta mas37$ und $\Delta mdm32/\Delta mas37$ zeigen denselben Phänotyp wie die Einzeldelentionsstämme $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$.

3.2.9 Wachstumsphänotyp von $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämmen

Beim Erstellen der Einzeldelentionsstämme von *MDM31* und *MDM32* (3.2.2) sowie der Doppeldeletionsstämme (3.2.7 und 3.2.8) fiel auf, dass $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämme ein reduziertes Wachstum auf YPD zeigten. Die $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämme der Deletionsstammsammlung (3.1) wuchsen nur auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Da über das Generationsalter dieser Stämme nichts ausgesagt werden konnte, wurde der Wachstumsphänotyp mit neuen, direkt nach der Tetradendissektion isolierten Stämmen untersucht. Diese zeigten Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Um den Wachstumsphänotyp der Stämme unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, wurden die Stämme über Nacht auf YPG kultiviert und am nächsten Tag in verschiedenen Verdünnungen auf YPD- und YPG-Platten aufgetragen. Das Wachstum wurde bei verschiedenen Temperaturen analysiert. Um zu sehen, ob der Effekt der Deletion von *MDM31* und *MDM32* additiv ist, wurde auch der Doppeldeletionsstamm $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ untersucht.

Unter allen Bedingungen zeigen die Deletionsstämme im Vergleich zum WT ein reduziertes Wachstum (Abb. 17), das auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen ausgeprägter ist. Der Wachstumsphänotyp des $\Delta mdm31$ - und des $\Delta mdm32$ -Stammes ist unter allen Bedingungen nahezu identisch. Am auffälligsten ist das deutlich reduzierte Wachstum des Doppeldeletionsstammes auf YPG bei 37°C.

Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass der reduzierte Wachstumsphänotyp auf den Verlust der mitochondrialen DNA zurückzuführen ist. Um dies zu testen, wurden Zellen der Deletionsstämme über einen längeren Zeitraum auf YPD in der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben der Kulturen

entnommen. Diese wurden auf YPD-Platten in einer geeigneten Verdünnung ausgestrichen, um je Platte 100-200 Kolonien zu erhalten. Von diesen Platten wurden Replikas auf YPD und YPG Platten erstellt und jeweils die Anzahl der Kolonien ermittelt. Der Quotient der auf YPG gewachsenen Kolonien und der Kolonien auf YPD entspricht dem prozentualen Anteil der Zellen, die funktionelle mitochondriale DNA besitzen.

Abbildung 18 zeigt, dass dieser Anteil in Abhängigkeit von der Wachstumszeit für alle Deletionsstämme in gleichem Maße abnimmt. Dieser Anteil geht nach 3 bis 4 Tagen auf ca. 50-60 % zurück. Nach ca. 5-6 Tagen scheint ein Plateau erreicht. Ein signifikanter Teil der Zellen verliert demnach funktionelle mitochondriale DNA. Vermutlich stammten die ursprünglich beschriebenen $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämme der Deletionsmutantensammlung (3.1, Dimmer *et al.*, 2002) von Zellen, die ihre mitochondriale DNA bereits verloren hatten.

Bei längerem Wachstum in YPD (>7 Tage) näherte sich der prozentuale Anteil der ρ^- Zellen der untersuchten Deletionsstämme wieder dem Wildtyp-Wert von ca. 90-95% an. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Suppressoren für den Funktionsverlust von Mdm31 und Mdm32 vorhanden sind, die bei längerem Wachstum den mitochondrialen Morphologiedefekt kompensieren. Wenn ein mtGFP-exprimierender Stamm für dieses Experiment verwendet wurde, konnte in der Tat nach 7-8 Tagen ein hoher Anteil an Zellen in der Kultur beobachtet werden, welche WT-ähnliche Mitochondrien aufwiesen (nicht gezeigt).

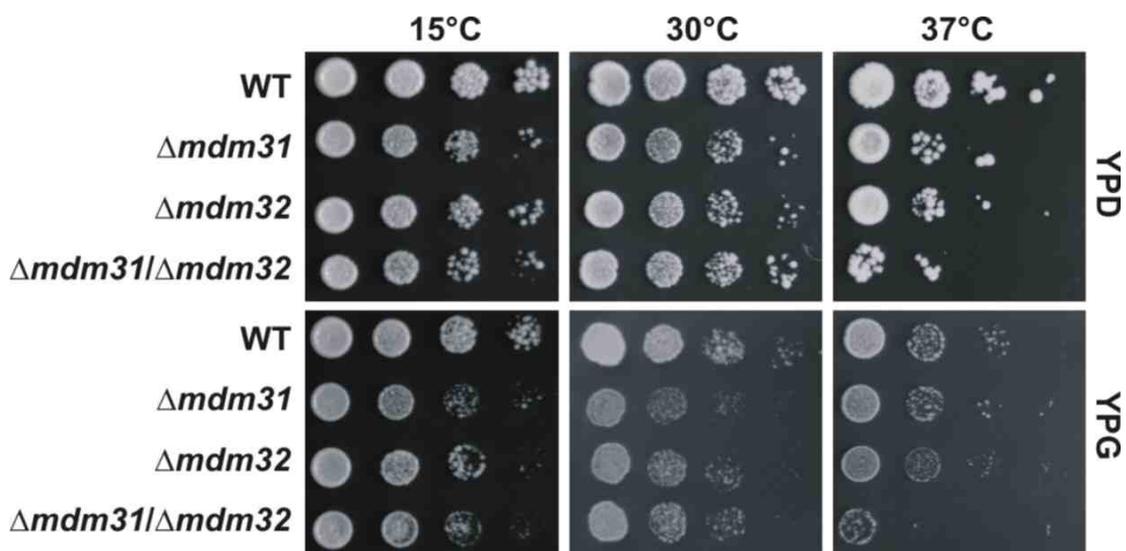


Abbildung 17: Wachstumsphänotyp der $\Delta mdm31$ -, $\Delta mdm32$ - und $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ -Stämme auf YPD und YPG bei verschiedenen Temperaturen. Die Platten wurden 2 Tage (YPD) und 3 Tage (YPG), bzw. bei 15°C 3 Tage (YPD) und 6 Tage (YPG) inkubiert. Die Kulturen entsprechen 5 μ l einer YPG-Vorkultur mit der OD_{600} von (von links nach rechts) 1,0; 0,1; 0,01 und 1×10^{-3} .

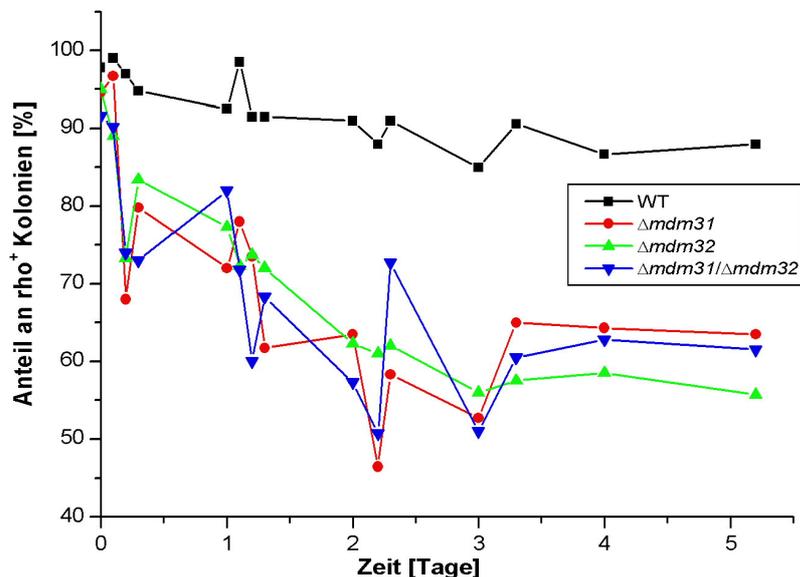


Abbildung 18: Verlust funktioneller mitochondrialer DNA. Untersucht wurden Zellen der Stämme $\Delta mdm31$ (●), $\Delta mdm32$ (▲) und $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ (▼) im Vergleich zum Wildtyp (■). Nach bestimmten Zeitpunkten (Abszisse) wurden Proben entnommen, auf YPD-Platten ausgestrichen und Replikas auf YPD und YPG-Platten erstellt. Der Quotient der Kolonien auf YPG und der Kolonien auf YPD entspricht dem prozentualen Anteil an Zellen, die funktionelle mitochondriale DNA (ρ^+) besitzen (Ordinate).

3.2.10 Verlust der mtDNA und Veränderungen der Nukleoidstruktur in $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ - Stämmen

Um zu untersuchen, ob das verringerte Wachstum und der Verlust funktioneller mitochondrialer DNA auf einen kompletten Verlust der mtDNA zurückzuführen ist, wurden die Zellen der Deletionsstämmen genauer untersucht. Ein Verlust der oxidativen Phosphorylierung kann z.B. auch auf Mutationen in der mitochondrialen DNA zurückzuführen sein, bei denen nur eines der acht Gene, die eine Atmungskettenkomponente kodieren, betroffen sein könnte. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die mitochondriale DNA mit dem für DNA spezifischen Farbstoff DAPI angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. In ungefähr 30% der Zellen ließ sich keine mtDNA nachweisen (nicht gezeigt). Abbildung 19 A zeigt, dass die anderen Zellen der Deletionsstämmen mitochondriale DNA aufwiesen, jedoch in gänzlich anderer Gestalt als der Wildtyp.

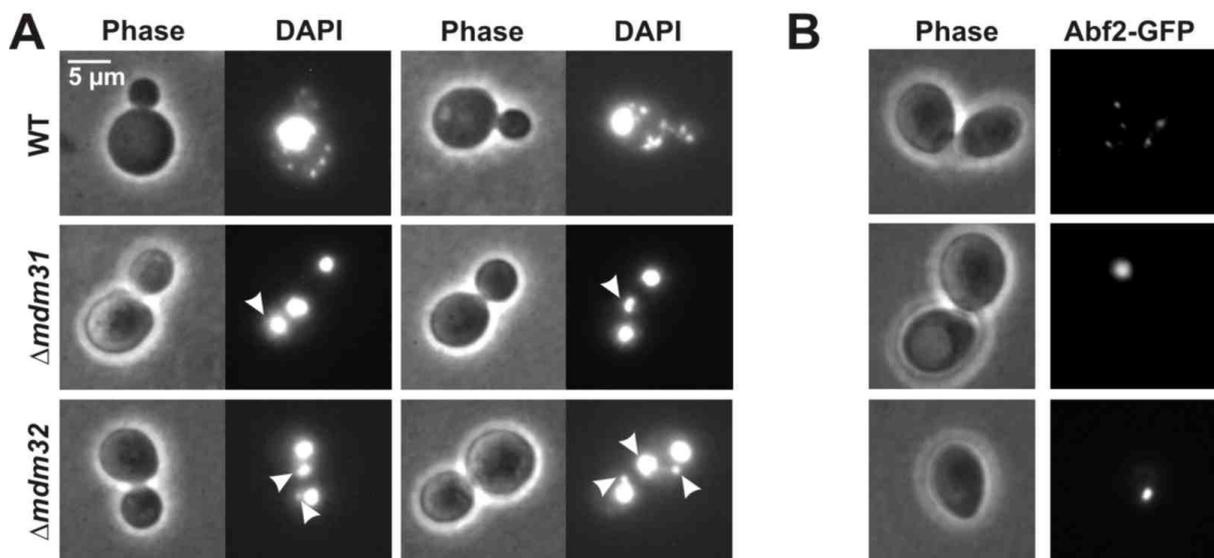


Abbildung 19: (A) DAPI-Färbung von Zellen des WT-, $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stammes. Die Stämme wurden über Nacht in YPD angezogen, in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und es wurde eine DAPI-Färbung (3.2.8) durchgeführt. Die Pfeile deuten auf mtDNA in den Deletionsstämmen hin. Rechts ist die DAPI-gefärbte DNA, links die zugehörige Phasenkontrastaufnahme abgebildet. **(B) Expression des Nukleoidproteins Abf2 mit C-terminalem GFP.** Das linke Bild zeigt die Phasenkontrastaufnahme, das rechte die GFP-Fluoreszenzaufnahme. Die Stämme wurden in YPD über Nacht angezogen, mit Wasser gewaschen und 2 h in YPGal zur Abf2-GFP-Expression inkubiert.

Während in WT-Zellen die mitochondriale DNA 10-15 Nukleole ausbildet, die über das mitochondriale Netzwerk gleichmäßig verteilt vorliegen (Abb. 19 A, obere Bilderreihe), findet sich in Zellen der Deletionsstämmen, welche noch mtDNA besitzen, zusätzlich zum Kern eine einzelne ungewöhnlich große Struktur (Abb. 19 A, mittlere und untere Bilderreihe, Pfeilköpfe). Um zu testen, ob es sich bei dieser Struktur wirklich um mitochondriale DNA handelt, wurde ein Fusionsprotein des mit mtDNA assoziierten Proteins Abf2 mit C-terminalem GFP in den entsprechenden Stämmen exprimiert. Nach kurzer Induktion der Expression dieses Konstruktes, dessen DNA-Sequenz in dem Plasmid pYX113 unter der Kontrolle des *GAL10*-Promotors steht, wurden im Wildtyp-Stamm Nukleole identifiziert (Abb. 19 B, obere Bilder). In den Deletionsstämmen $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$ war, entsprechend der DAPI-Färbung, eine dominante, große Struktur zu beobachten.

Folglich hat der Verlust von Mdm31 und Mdm32 einen Einfluss auf die Struktur der Nukleole. Ob der Verlust der mtDNA in ca. 45% der Zellen (3.2.9) auf eine direkte Interaktion der Nukleole mit den beiden Innenmembranproteinen zurückzuführen ist, oder ob dies eine Konsequenz der veränderten Nukleoidstruktur und damit einhergehenden Problemen bei der Weitergabe des mitochondrialen Genoms während der Zytokinese darstellt, konnte bislang nicht geklärt werden.

3.2.11 Reduzierte Motilität der Mitochondrien in $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämmen

Bei der Untersuchung der mitochondrialen Fusion von $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämmen (3.2.6) wurden Mitochondrien beobachtet, die nach Ausbildung der Zygoten nicht in Kontakt zueinander traten. Dies wurde auf eine reduzierte Motilität der Mitochondrien zurückgeführt. Bei der Auswertung der mitochondrialen Phänotypen der Deletionsstämmen wurden viele Zellen beobachtet, die Knospen aufwiesen, in denen keine Mitochondrien nachweisbar waren (z.B. Abb. 5). Die großen sphärischen Mitochondrien schienen an einer Position in der Zelle zu verharren. Auch diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die Motilität der Mitochondrien in den Deletionsstämmen von *MDM31* und *MDM32* reduziert ist. Dadurch kommt es zu einem Verteilungsdefekt der Mitochondrien während der Zytokinese.

Um das Auftreten mitochondrienfreier Knospen zu quantifizieren, wurden die Phänotypen der Zellen in drei Kategorien eingeteilt (Abb. 20). Die erste Kategorie umfasst Zellen, die Mitochondrien in der Knospe aufweisen (Abb. 20 B). Bei einer Reihe von Zellen war das Mitochondrion scheinbar im Knospenhals immobilisiert. Der Transport des

Mitochondrions schien auf Grund der ungewöhnlichen Größe des Organells an der Verengung des Knospenhalses verzögert zu sein (Kategorie 2, Abb. 20 C). Der dritten Kategorie wurden Zellen zugeordnet, welche eine oder mehrere mitochondrienfreie Knospen aufweisen (Abb. 20 D). Der Wildtyp besaß im Gegensatz zu den Deletionsstämmen grundsätzlich Mitochondrien schon in den frühen Knospen (Abb. 20 A, Pfeil).

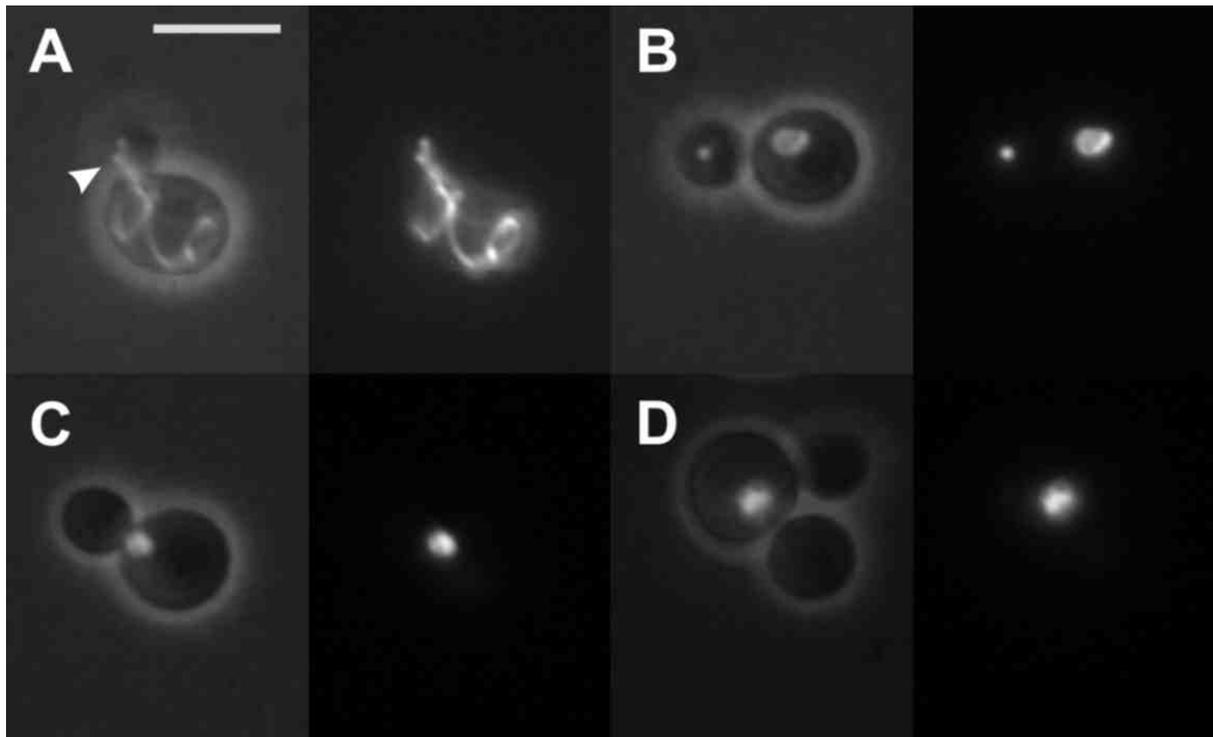


Abbildung 20: Mitochondrienfreie Knospen in $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Deletionsstämmen. Dargestellt sind Überlagerungen der Fluoreszenzaufnahmen von mitochondrialem GFP (mtGFP) und den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen des Wildtyps (A, Pfeil deutet auf Knospenhals) und verschiedenen Phänotypen eines $\Delta mdm31$ -Stammes (B, C, D). Der Längenstandard entspricht 5 μ m.

Zur Quantifizierung des Phänotyps wurden Zellen der Stämme WT, $\Delta mdm31$, $\Delta mdm32$, $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ und $\Delta mmm1$ analysiert. Von jedem Stamm wurden weit über einhundert Zellen untersucht. Der $\Delta mmm1$ -Stamm diente als Referenz, da für diesen Stamm bereits ein ähnlicher Phänotyp beobachtet wurde. Ferner wurde eine reduzierte Motilität der Mitochondrien in einem $\Delta mmm1$ -Stamm nachgewiesen (Aiken Hobbs *et al.*, 2001). Alle Deletionsstämme weisen einen beachtlichen Anteil von 30-40% an Knospen auf, die keine detektierbaren Mitochondrien enthielten (Tabelle 10).

| Phänotyp Stamm | Kategorie 1 (Knospen mit Mitochondrien) | Kategorie 2 (Mitochondrien am Knospenhals) | Kategorie 3 (mitochondrienfreie Knospen) |
|-----------------------------|---|--|--|
| WT (YPH499) | 99 | | 1 |
| $\Delta mdm31$ | 55 | 4 | 41 |
| $\Delta mdm32$ | 67 | 2 | 31 |
| $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ | 60 | 8 | 32 |
| $\Delta mmm1$ | 54 | 10 | 36 |

Tabelle 10: Quantifizierung mitochondrienfreier Knospen in Deletionsstämmen von *MDM31* und *MDM32* und im $\Delta mmm1$ -Stamm. Je Stamm wurden $n > 100$ Zellen untersucht und der jeweilige prozentuale Anteil der verschiedenen Phänotypen bestimmt.

3.2.12 Aktininteraktion

Für einige Morphologiekomponenten der mitochondrialen Außenmembran wird bei Deletion des Genes ein ähnlicher mitochondrialer Phänotyp wie für $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämme beobachtet. Werden *MMM1* und *MDM10* disruptiert, weisen die entsprechenden Stämme Riesenmitochondrien auf (Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994). Beide Proteine scheinen *in vitro* an der Interaktion der Mitochondrien mit filamentösem Aktin beteiligt zu sein (Boldogh *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob Mdm31 und Mdm32 direkt an einer Interaktion mit dem Zytoskelett beteiligt sind oder regulatorisch Einfluss auf diesen Prozess nehmen, wurde ein beschriebenes *in vitro*-Testsystem (Boldogh *et al.*, 1998) modifiziert. Humanes, nicht muskuläres G-Aktin wurde *in vitro* zu F-Aktin polymerisiert und mit isolierten, gereinigten Mitochondrien unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Nach der Bindung des Aktins an Mitochondrien wurde nicht gebundenes Aktin durch Zentrifugation durch ein Saccharosekissen von den Mitochondrien getrennt, während mitochondrial gebundenes F-Aktin mit den Mitochondrien sedimentierte.

Abbildung 21 A zeigt ein typisches Bindungsexperiment für Wildtyp-Mitochondrien. Wenn Mitochondrien in Anwesenheit von ATP mit F-Aktin inkubiert wurden, war keine stabile Bindung zu beobachten. Wenn dagegen ATP durch Zugabe von Apyrase depletiert wurde, kam es zu einer nachweisbaren F-Aktin-Bindung. Dies lässt sich durch eine ATP-abhängige Dissoziation von Mitochondrien vom Aktinzytoskelett erklären. Entsprechend den veröffentlichten Ergebnissen (Boldogh *et al.*, 1998) wurde durch eine Vorbehandlung der Mitochondrien mit hochkonzentrierten Salzlösungen die F-Aktin-Bindung inhibiert, da membranassoziierte Proteine, die für die Interaktion essentiell sind, von der

Mitochondrienoberfläche entfernt werden. Nach Zugabe des Salzextrakts zu den Mitochondrien, ließ sich die Aktinbindung zurückgewinnen (Abbildung 21 A).

Wenn Mdm31 und Mdm32 für die Interaktion mit dem Aktinzytoskelett essentiell wären, wäre zu erwarten, dass Mitochondrien aus den entsprechenden Deletionsstämmen kein F-Aktin binden. Abbildung 21 B zeigt, dass an Mitochondrien, denen Mdm31 bzw. Mdm32 fehlt, F-Aktin gebunden wurde. Dasselbe wurde für Mitochondrien des Doppeldeletionsstammes ($\Delta m d m 3 1 / \Delta m d m 3 2$) beobachtet (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass weder Mdm31 noch Mdm32 unmittelbar an der Interaktion mit dem Aktinzytoskelett beteiligt sind.

Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Beobachtungen (Boldogh *et al.*, 1998) zeigen Mitochondrien des $\Delta m m m 1$ -Stammes (Abb. 21 C) keine reduzierte F-Aktin-Bindung. Mmm1, Mdm10 und Mdm12 wurden in einem Komplex der mitochondrialen Außenmembran nachgewiesen (Boldogh *et al.*, 2003). Deshalb wurden auch Mitochondrien eines $\Delta m d m 1 2$ -Stammes in Hinblick auf die Aktininteraktion untersucht. Auch Mdm12 scheint nicht direkt an der Interaktion mit dem Aktinzytoskelett beteiligt zu sein, da Mitochondrien denen Mdm12 fehlt, in Abwesenheit von ATP an F-Aktin binden (Abb. 21 C).

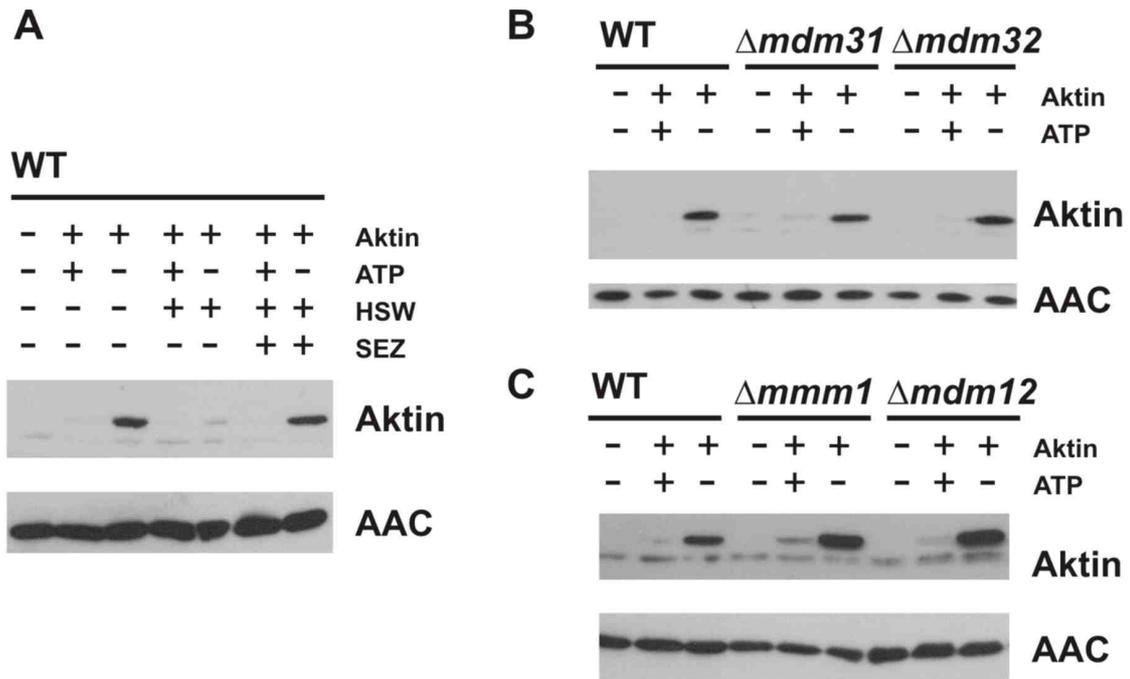


Abbildung 21: Interaktion von Mitochondrien mit F-Aktin *in vitro*. (A) Dargestellt ist ein F-Aktinbindungsassay mit Wildtypmitochondrien unter verschiedenen Bedingungen. Zum einen wurde der Test bei ATP-Anwesenheit und bei ATP-Depletion durchgeführt (ATP+/-). Des Weiteren wurden die Mitochondrien mit einer 1 M KCl-Lösung vorbehandelt (HSW+). Nach der Vorbehandlung wurde der Salzextrakt zu zwei Ansätzen wieder zugegeben (SEZ+). Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen Aktin und AAC. (B) Gezeigt ist ein Standardbindungstest für Mitochondrien des Wildtyp-Stammes und der Deletionsstämme $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$ in Anwesenheit und bei Depletion von ATP (ATP+/-). (C) Dargestellt ist ein Standardbindungstest für WT-, $\Delta mmm1$ - und $\Delta mdm12$ -Mitochondrien wie in (B). Die Ansätze ohne Aktinzugabe (Aktin -) dienten zur Kontrolle des Hintergrundsignals von endogenem Aktin. Als Kontrolle für identische Mengen an mitochondrialem Protein wurde die Menge an AAC bestimmt.

3.2.13 Synthetisch letale Beziehung von *MDM31*, *MDM32* und *MMM1*, *MDM10*, *MDM12*, *MMM2*

Ist ein Organismus nach Disruption zweier verschiedener Gene nicht mehr lebensfähig, so bezeichnet man die Beziehung der beiden Gene zueinander als synthetisch letal. Eine synthetische Letalität von Mutationen zweier Gene weist häufig darauf hin, dass die kodierten Proteine am gleichen zellulären Prozess beteiligt sind (Guarente, 1993; Hartman *et al.*, 2001), und gibt einen Hinweis auf eine funktionelle Beziehung der beiden Proteine zueinander. Im Rahmen der Untersuchungen zur genetischen Interaktion von *MDM31* und *MDM32* mit anderen Proteinen der mitochondrialen Morphologie und Dynamik wurde versucht, Doppeldeletionsmutanten mit den bekannten Morphologiekomponenten der Außenmembran herzustellen. Durch Kreuzung eines haploiden $\Delta mdm31$ - oder $\Delta mdm32$ - Stammes mit einem haploiden $\Delta mmm1$, $\Delta mmm2$, $\Delta mdm10$ oder $\Delta mdm12$ - Stamm des anderen Paarungstyps wurde der heterozygote diploide Doppeldeletionsstamm hergestellt. Dieser wurde sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen. Für alle acht möglichen Doppeldeletionskombinationen konnte kein einziger haploider Doppeldeletionsstamm für eine der Genkombinationen erhalten werden. Dies war der erste Hinweis, dass der Verlust eines der beiden Innenmembranproteine Mdm31 oder Mdm32 in Kombination mit einer dieser Morphologiekomponenten der Außenmembran synthetisch letal ist. Für jeden Stamm wurden mindestens 25 verschiedene Tetraden untersucht. Abbildung 22 A zeigt die aus der Tetradenanalyse hervorgegangenen haploiden Einzeldelentionsphänotypen für die Stämme $\Delta mmm1$, $\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$ und $\Delta mmm2$. Die beobachteten Phänotypen entsprachen den publizierten Ergebnissen, was die korrekte Gendelektion beweist. Tabelle 11 zeigt die statistische Auswertung der Phänotypen. Die verschiedenen Einzelmutanten ähneln sich in ihrem mitochondrialen Erscheinungsbild, besonders wenn man davon ausgeht, dass es sich bei den beobachteten ringförmigen Strukturen in den Stämmen $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$ um große Einschlüsse handelt.

In Abbildung 22 B ist eine typische Tetradendissektionsplatte abgebildet, hier am Beispiel des Stammes YPH501 *MDM32*/ $\Delta mdm32$;*MMM2*/ $\Delta mmm2$. Man beobachtet drei verschiedene Aufspaltungsmöglichkeiten für einen heterozygoten diploiden Doppeldeletionsstamm. Als „*tetratype*“ wird die Aufspaltung in eine Wildtyp-Spore (hier *MDM32*/*MMM2*) eine Doppeldeletionsspore ($\Delta mdm32$ / $\Delta mmm2$) und jeweils eine Einzeldelentionspore ($\Delta mdm32$ /*MMM2* und *MDM32*/ $\Delta mmm2$) bezeichnet. Unter „*nonparental ditype*“ versteht man die Aufspaltung in jeweils zwei Einzeldelentionssporen

Ergebnisse

(zweimal $\Delta mdm32/MMM2$ und zweimal $MDM32/\Delta mmm2$). „Parental ditype“ bedeutet, dass sich zwei WT-Sporen ($MDM32/MMM2$) und zwei Doppeldeletionssporen ergeben ($\Delta mdm32/\Delta mmm2$). Die verschiedenen Kolonien aus der Tetradendisektion wurden mit Hilfe der Deletionsmarker ($MDM31$ und $MDM32$: Deletion mit dem G418-Resistenzmarker, $MMM1$, $MDM10$, $MDM12$ und $MMM2$: Deletion mit dem $HIS3$ -Marker) überprüft und für jede Tetrade der Aufspaltungstyp ermittelt. Das erwartete Aufspaltungsverhältnis beträgt 4:1:1. Bei den verschiedenen Tetradenanalysen der acht Kombinationsmöglichkeiten wurden annähernd die Aufspaltungen 4:1:1 beobachtet (vgl. Tabelle 12). Immer wenn eine Doppeldeletionsspore erwartet wurde, wuchs keine Kolonie aus (Abb. 22 B). Die Tetraden wurden mit dem Mikroskop genauer untersucht und es wurde entweder eine nicht ausgewachsene Spore oder eine Mikrokolonie gefunden (Abb. 22 C). Dabei teilte sich die Zelle einige Male, bevor sich der synthetisch letale Effekt der Doppelmutation manifestierte.

| Phänotyp Stamm | WT | einzelner Schlauch | aggregiert | fragmentiert | sphärisch | mehrere Kugeln | große Ringe | kleine Ringe |
|-----------------------------|------------|-----------------------|------------|--------------|-----------|-------------------|----------------|-----------------|
| WT (YPH499) | 100 | - | - | - | - | - | - | - |
| $\Delta mdm31$ | - | 8 | 6 | - | 35 | 19 | 15 | 17 |
| $\Delta mdm32$ | - | 7 | - | - | 28 | 26 | 6 | 33 |
| $\Delta mmm1$ | - | 6 | 3 | 2 | 84 | 5 | - | - |
| $\Delta mdm10$ | - | 2 | 3 | 4 | 83 | 8 | - | - |
| $\Delta mdm12$ | - | 3 | 4 | 3 | 80 | 10 | - | - |
| $\Delta mmm2(\Delta mdm34)$ | - | 1 | 2 | 1 | 73 | 21 | - | - |

Tabelle 11: Statistische Auswertung der Phänotypen der Einzeldelensionsstämme $\Delta mmm1$, $\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$ und $\Delta mmm2$ im Vergleich zu Wildtyp, $\Delta mdm31$ und $\Delta mdm32$. Je Stamm wurden n>100 Zellen untersucht. Die prozentualen Anteile der verschiedenen Phänotypen sind angegeben. Anteile $\geq 25\%$ sind mit Fettdruck hervorgehoben.

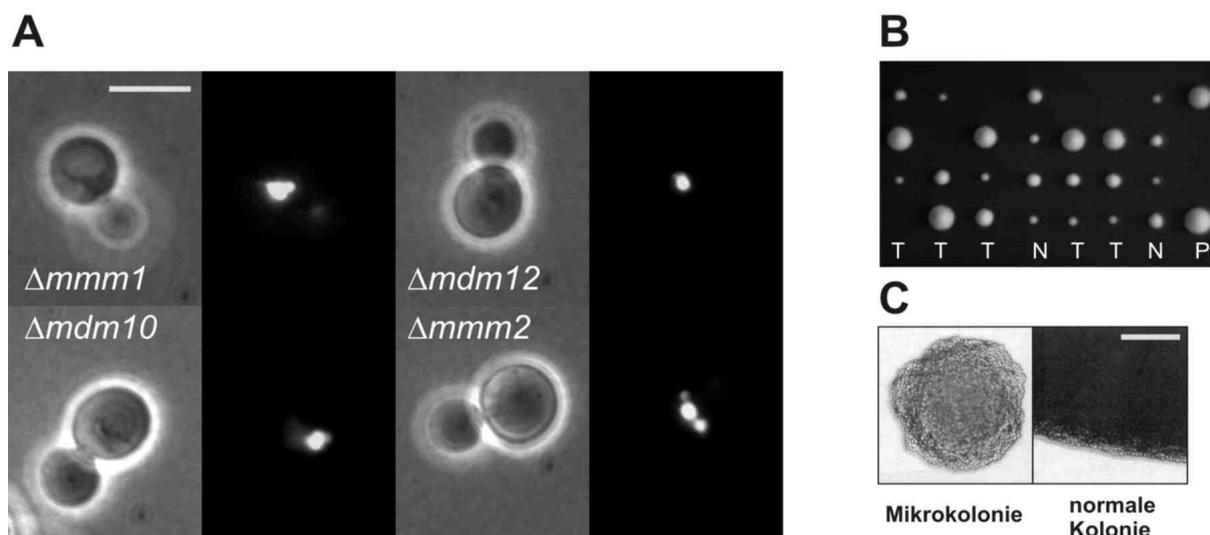


Abbildung 22: (A) Mitochondriale Phänotypen der Einzeldelusionsmutanten $\Delta mmm1$, $\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$ und $\Delta mmm2$. Verwendet wurden Stämme, die mit pVT100UmtGFP (Westermann und Neupert, 2000) transformiert waren und mitochondriales GFP exprimieren. Jeweils das linke Bild entspricht der Phasenkontrastaufnahme, das rechte der Fluoreszenzaufnahme. Der Längensstandard entspricht 5 μm **(B) Ergebnis der Tetradenanalyse nach Sporulation des Stammes YPH501 $mdm32/MDM32$; $mmm2/MMM2$.** Die verschiedenen Aufspaltungstypen sind: (T) *tetatype*, (P) *parental ditype*, (N) *nonparental ditype*. **(C) Beispiel einer Mikrokolonie** (links) im Vergleich zur normalen Kolonie bei der Betrachtung mit dem Mikroskop. Der Längensstandard entspricht 50 μm .

| Tetradentyp Stamm | „parental ditype“ | „nonparental ditype“ | „tetatype“ |
|-----------------------------|-------------------|----------------------|------------|
| theoretisch | 1 | 1 | 4 |
| $\Delta mdm31/\Delta mmm1$ | 0,9 (n=4) | 0,9 (n=4) | 4,2 (n=18) |
| $\Delta mdm32/\Delta mmm1$ | 1,4 (n=8) | 0,7 (n=4) | 3,9 (n=23) |
| $\Delta mdm31/\Delta mdm10$ | 1,2 (n=6) | 1,1 (n=5) | 3,7 (n=18) |
| $\Delta mdm32/\Delta mdm10$ | 0,5 (n=3) | 1,3 (n=8) | 4,2 (n=25) |
| $\Delta mdm31/\Delta mdm12$ | 0,8 (n=4) | 0,6 (n=3) | 4,6 (n=24) |
| $\Delta mdm32/\Delta mdm12$ | 0,6 (n=3) | 1,2 (n=6) | 4,2 (n=21) |
| $\Delta mdm31/\Delta mmm2$ | 0,9 (n=9) | 1,5 (n=15) | 3,6 (n=36) |
| $\Delta mdm32/\Delta mmm2$ | 0,9 (n=5) | 0,3 (n=2) | 4,8 (n=28) |

Tabelle 12: Tetradenanalyse der Doppeldelusionskombinationen $\Delta mdm31$, $\Delta mdm32$ mit $\Delta mmm1$, $\Delta mdm10$, $\Delta mdm12$ und $\Delta mmm2$. Es wurden jeweils mindestens 25 Tetraden analysiert und der Aufspaltungstyp ausgewertet.

Ergebnisse

Um diesen synthetisch letalen Effekt zu beweisen, wurde exemplarisch der diploide heterozygote Doppeldelentionsstamm $\Delta mdm32/\Delta mmm1$ mit einem Plasmid, welches *MDM32* unter Kontrolle des endogenen Promotors trägt (pRS316-Mdm32) transformiert, sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen. Nun wurden haploide Doppeldelentionsstämme $\Delta mdm32/\Delta mmm1$ erhalten, die dieses Plasmid trugen. Wenn diese Stämme auf 5-FOA haltiges Medium übertragen wurden, konnte kein Wachstum beobachtet werden. Stämme die das *URA3*-Gen genomisch oder auf einem Plasmid tragen, bauen 5-FOA zu einem zelltoxischen Intermediat um. In diesem Fall bedeutet dies, dass auf den 5-FOA-Platten nur Zellen wachsen konnten, die das *URA3*-tragende pRS316-Mdm32-Plasmid verloren hatten. Dies wurde für drei unabhängig voneinander erhaltene Sporen gezeigt (Abb. 23). Ein Kontrollstamm (ein Einzeldelentionsstamm von *MMM1*, welcher das Plasmid pRS316-Mdm32 trägt) konnte auf 5-FOA Platten wachsen (Abb. 23). Dieses Verhalten beweist den synthetisch letalen Effekt, den die Doppeldelektion verursacht.

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Innenmembranproteine Mdm31 und Mdm32 in funktioneller Beziehung zu den Außenmembranproteinen Mmm1, Mdm10, Mdm12 und Mmm2 stehen und am gleichen mitochondrialen Prozess beteiligt sind.

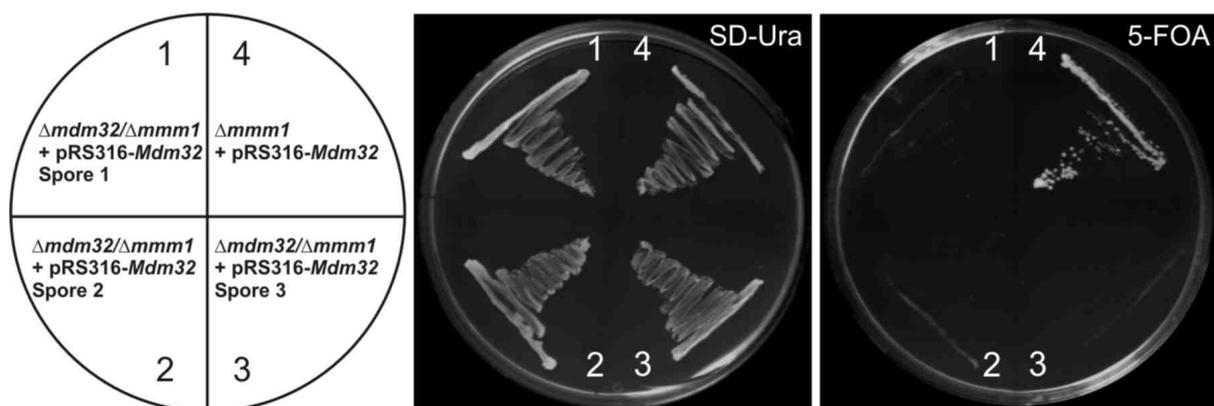


Abbildung 23: Synthetisch letaler Effekt der $\Delta mdm32/\Delta mmm1$ -Doppeldelektion. Drei unabhängig voneinander durch Tetradenanalyse erhaltene $\Delta mdm32/\Delta mmm1$ -Stämme, welche das Plasmid pRS316-Mdm32 tragen, wurden untersucht (1-3). Als Kontrollstamm diente ein $\Delta mmm1$ -Stamm, der mit pRS316-Mdm32 transformiert war.

3.2.14 Untersuchungen zur Interaktion von Mdm31 und Mdm32 mit Morphologiekomponenten der mitochondrialen Außenmembran

Der synthetisch letale Effekt einer Deletion von *MDM31* oder *MDM32* in Kombination mit *MMM1*, *MDM10*, *MDM12* oder *MMM2* kann zwei verschiedene Ursachen haben. Beide Proteingruppen können zwei verschiedene Funktionen ausüben, die zu einem bestimmten Anteil überlappen, so dass der Verlust beider Prozesse zur Letalität des Organismus führt. Es könnten beide Komponenten auch am gleichen Prozess partizipieren. Durch Verlust einer Komponente verringert sich die Effizienz dieses Vorganges, einhergehend mit einem Defekt in der mitochondrialen Morphologie. Wenn beide Komponenten ausgeschaltet werden, wird die Effizienz zu einem Ausmaß reduziert, dass dieser essentielle Prozess zum Erliegen kommt.

In dieser Arbeit wurde Mdm31 in einem Proteinkomplex der Größe von ca. 650 kDa gefunden. Mdm32 war bei ca. 180 kDa in Gelfiltrationsexperimenten nachzuweisen (3.2.5). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass Mmm1 einen Komplex von ca. 650 kDa ausbildet, und Mmm2 bei ca. 700 kDa detektierbar ist (Youngman *et al.*, 2004). Ferner wurde ein Außenmembrankomplex mit den Komponenten Mmm1, Mdm10 und Mdm12 nachgewiesen (Boldogh *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, ob Mdm31 und Mdm32 eine Interaktion mit Mmm1 eingehen, wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Mitochondrien mit Digitonin lysiert und mitochondriale Proteinkomplexe mittels Molekularsiebchromatographie ihrer Größe nach getrennt. Die Fraktionen wurden mittels Trichloressigsäure gefällt und durch SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Der relative Anteil eines Proteins in einer Fraktion wurde bestimmt. Das Experiment mit WT-Mitochondrien ist in Abbildung 24 A gezeigt. Wie bereits gezeigt findet man Mdm31 bei einem Molekulargewicht von ca. 650 kDa, Mdm32 bei 180 kDa und Mmm1 ebenfalls bei 650 kDa. Bei einer stabilen Interaktion wäre anzunehmen, dass die Deletion eines dieser drei Proteine einen Einfluss auf die Komplexgröße eines der anderen Proteine nimmt. Sowohl Mdm31 als auch Mmm1 sind Untereinheiten eines Proteinkomplexes ähnlicher Größe. Folglich könnten beide Proteine Bestandteile desselben Komplexes sein.

Um dies zu überprüfen, wurden Proteine der Mitochondrien der $\Delta m d m 3 1$ - $\Delta m d m 3 2$ -, $\Delta m d m 3 1 / \Delta m d m 3 2$ - und $\Delta m m m 1$ -Mutanten durch Gelfiltration aufgetrennt und die jeweils noch vorhandenen Proteine analysiert. In Abbildung 24 B sind die Ergebnisse aufgeführt. Wenn *MDM31* deletiert wird (Abb. 24 B, $\Delta m d m 3 1$), bleibt sowohl der Mmm1-Komplex als auch der Mdm32-Komplex unverändert. Bei einem Verlust von Mdm32 liegen Mmm1 und

Mdm31 wie im Wildtyp nach wie vor als ca. 650 kDa-Komplexe vor (Abb. 24 B, $\Delta mdm32$). Auch die Deletion von *MDM31* in Kombination mit *MDM32* hatte keine Auswirkung auf die Komplexgröße von Mmm1 (Abb. 24 B, $\Delta mdm31/\Delta mdm32$). Ferner nimmt der Verlust von Mmm1 keinen Einfluss auf Mdm31 und Mdm32 (Abb. 24 B, $\Delta mmm1$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mdm31, Mdm32 und Mmm1 drei verschiedene Komplexe in der inneren und äußeren mitochondrialen Membran ausbilden. Über eine transiente, funktionelle Interaktion der Proteinkomplexe der Außen- und Innenmembran konnte keine Aussage getroffen werden. Wie in den Koimmunfällungsexperimenten von Mdm32 mit Antikörper gegen Mdm31 gezeigt (3.2.5), scheinen Mdm31 und Mdm32 transient zu interagieren. Dasselbe könnte auch für die Außenmembrankomplexe zutreffen. In Koimmunfällungsexperimenten konnte jedoch bislang keine Interaktion von Mdm31 und Mdm32 mit einer der Komponenten der Außenmembran nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment zur Klärung des Verhältnisses zwischen Mdm31 und Mdm32 einerseits und Mmm1, Mdm10 und Mmm2 andererseits wurden die Proteinmengen dieser Außenmembranproteine in Abhängigkeit von Mdm31 und Mdm32 untersucht. Vergleichbare Mengen von mitochondrialem Protein der Stämme $\Delta mdm31$, $\Delta mdm32$, $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ und WT wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert (Abbildung 24 C). Weder der Verlust von Mdm31 noch von Mdm32 oder beider Proteine hatte einen Einfluss auf die endogenen Proteinmengen der Außenmembranproteine Mmm1, Mdm10 oder Mmm2. Mdm12 wurde nicht direkt analysiert, da kein Antikörper vorlag. Da jedoch Mdm12 für die Lokalisation von Mmm1 in Mitochondrien essentiell ist (Boldogh *et al.*, 2003) ist anzunehmen, dass auch der Mdm12-Gehalt in den $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Mitochondrien unverändert ist. Die Vermutung liegt nahe, dass Mdm31 und Mdm32 keinen Einfluss auf die Ausbildung und die Stabilität der Außenmembrankomplexe Mmm1/Mdm10/Mdm12 (Boldogh *et al.*, 2003) und von Mmm2 (Youngman *et al.*, 2004) nehmen.

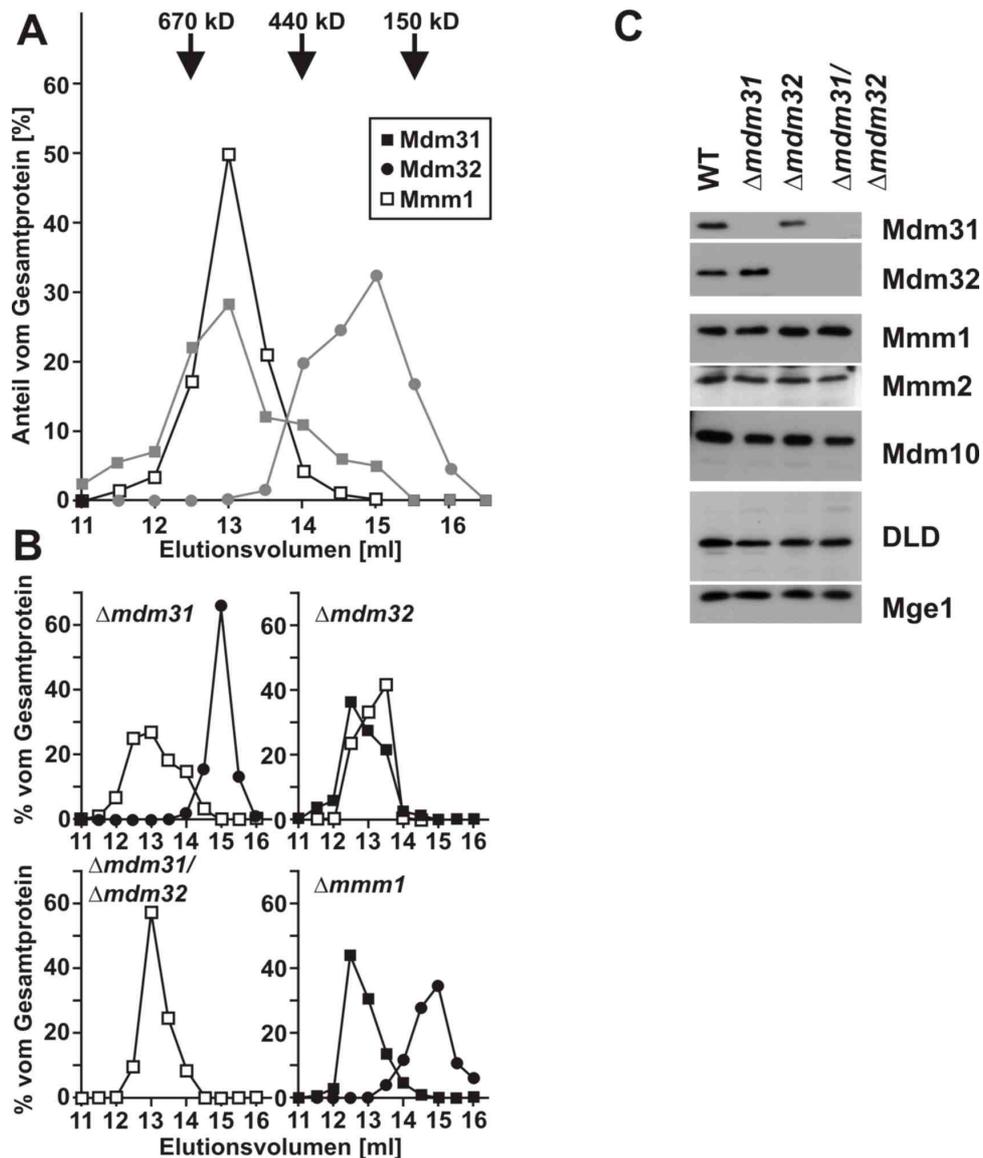


Abbildung 24: Beziehung von Mdm31 und Mdm32 zu Morphologiekomponenten der Außenmembran. (A) Gelfiltrationschromatographie von in Digitonin lysierten Mitochondrien (1 mg). Nach Lyse der Mitochondrien und Auftrennung durch eine Superose 6 Säule (Pharmacia) wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt, mit TCA gefällt und durch SDS-PAGE und Immunoblot gegen Mdm31 (■), Mdm32 (●) und Mmm1 (□) analysiert. Die Intensitäten der Signale wurden durch Densitometrie quantifiziert, summiert und für jede Fraktion (Abszisse) der relative Anteil berechnet (Ordinate). Als Größenstandards wurden Thyreoglobulin (670 kDa), Apoferritin (440 kDa) und Alkoholdehydrogenase (150 kDa) unter denselben Bedingungen verwendet. Die Ergebnisse aus Abbildung 12 sind zum Vergleich mit angegeben (grau). (B) Gelfiltrationschromatographie von lysierten Mitochondrien aus den jeweiligen Deletionsstämmen wie bei A (C) Proteinmengen verschiedener mitochondrialer Proteine in Mitochondrien aus WT-, $\Delta mdm31$ -, $\Delta mdm32$ - und $\Delta mdm31/\Delta mdm32$ -Stämmen. 25 μ g Mitochondrienprotein wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit Antikörpern gegen Mdm31, Mdm32, Mmm1, Mdm10, Mmm2, Dld1 und Mge1 analysiert.

4 Diskussion

Die Morphologie und die Dynamik der Mitochondrien spielen eine Rolle bei der Funktionsweise und Vererbung dieser Organellen. Um die Mechanismen zu verstehen, die der Morphogenese der Mitochondrien zu Grunde liegen, ist es notwendig, die beteiligten Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren. In den vergangenen 14 Jahren wurden v.a. in *Saccharomyces cerevisiae* wichtige Komponenten durch genetische oder morphologische Screens identifiziert und teilweise charakterisiert (Berger und Yaffe, 2000; Boldogh *et al.*, 2001b; Jensen *et al.*, 2000; Mozdy und Shaw, 2003; Westermann, 2003). Die molekularen Grundlagen der Prozesse der mitochondrialen Morphogenese sind weitgehend unbekannt. Neben der Maschinerie, die Mitochondrien an das Aktinzytoskelett koppelt, sind vor allem die Komponenten unbekannt, die die tubuläre Gestalt der Mitochondrien aufrecht erhalten und die Proteine, die bei allen Morphogeneseprozessen eine Koordinierung der beiden Membranen des Mitochondrions bewerkstelligen. Auch die kontrollierte Vererbung des mitochondrialen Genoms stellt ein ungelöstes Rätsel dar. Die Vielzahl der offenen Fragen legte die Vermutung nahe, dass zahlreiche Komponenten der mitochondrialen Morphogenese zu Beginn dieser Arbeit unbekannt waren.

4.1 Identifizierung neuer Morphologiekomponenten

Das systematische Screening einer Deletionsmutantensammlung verdoppelte annähernd die Anzahl der bekannten Proteine, die einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie und Vererbung nehmen. Die neu entdeckten Komponenten waren mit klassischen Ansätzen nicht nachweisbar. Diese bedienten sich meistens Sammlungen temperatursensitiver Mutanten, die durch zufällige Mutagenese erstellt wurden (Berger *et al.*, 1997; Hermann *et al.*, 1997; McConnell *et al.*, 1990; Sogo und Yaffe, 1994; Youngman *et al.*, 2004). Bislang waren neun Komponenten bekannt, die essentiell für die Ausbildung des mitochondrialen Wildtyp Phänotyps sind (Fzo1, Ugo1, Mgm1, Dnm1, Mdv1, Fis1, Mmm1, Mdm10 und Mdm12). Die Überlegenheit des systematischen Ansatzes wird darin deutlich, dass 15 neue Morphologiekomponenten gefunden wurden. Auch bei anderen Fragestellungen war ein ähnlicher systematischer Ansatz von Erfolg gekrönt, wie zum Beispiel bei der Identifizierung neuer Komponenten der Vakuolenfusion (Seeley *et al.*, 2002).

Von den 15 neu entdeckten Morphologiekomponenten wurden im Verlauf der letzten beiden Jahre bereits einige eingehender charakterisiert. *MDM31* und *MDM32* wurden im Rahmen dieser Arbeit eingehend untersucht und sind Gegenstand des nächsten Kapitels.

Über die Regulation der Prozesse, die die mitochondriale Morphologie bestimmen ist nur wenig bekannt. Bislang gab es nur indirekte Hinweise, dass der Proteinabbau durch das Proteasom regulatorischen Einfluss auf die mitochondriale Fusion nimmt (Fisk und Yaffe, 1999; Rinaldi *et al.*, 1998). *MDM30* kodiert ein F-Box Protein (Dimmer *et al.*, 2002). Für eine Reihe von Proteinen der F-Box Familie wurde gezeigt, dass sie Komponenten des SCF Ubiquitin-Ligase Komplexes sind. Sie dienen der Bindung von Substraten, die der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse durch das Proteasom zugeführt werden (Kipreos und Pagano, 2000). Da Mdm30 Einfluss auf den Fzo1-Gehalt der Zelle nimmt, liegt die Vermutung nahe, dass es für den Abbau von Fzo1 durch das Proteasom verantwortlich ist. Damit hätte Mdm30 über den Fzo1-Gehalt regulatorischen Einfluss auf die mitochondriale Fusion (Fritz *et al.*, 2003).

MDM33 kodiert ein mitochondriales Innenmembranprotein. In Deletionsstämmen von *MDM33* werden Mitochondrien beobachtet, die große Hohlkugeln ausbilden. Mdm33 liegt in einem höhermolekularen Komplex der mitochondrialen Innenmembran vor. Verschiedene hefegenetische und elektronenmikroskopische Untersuchungen weisen darauf hin, dass Mdm33 eine Rolle bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran zukommt (Messerschmitt *et al.*, 2003). Damit ist Mdm33 die erste Komponente der mitochondrialen Innenmembran, für die eine Rolle bei der mitochondrialen Teilung diskutiert wird.

Mgm1 ist schon länger als Protein des mitochondrialen Vererbungs- und Morphogeneseapparates bekannt (Guan *et al.*, 1993; Jones und Fangman, 1992). Als Protein des Intermembranraums kommt es in zwei verschiedenen Formen vor (Shepard und Yaffe, 1999; Wong *et al.*, 2000) und ist an der Fusion der Mitochondrien beteiligt (Sesaki und Jensen, 2004; Sesaki *et al.*, 2003b; Wong *et al.*, 2003). Mutationen im humanen homologen *OPA1*-Gen führen zu Typ I optischer Atrophie, einer Krankheit, bei der ein Defekt zentraler Neuronen der Retina beobachtet wird. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass das Auftreten beider Mgm1-Formen für die Wildtyp-Morphologie der Mitochondrien essentiell ist. Das *MDM37*-Gen kodiert die Protease (Pcp1), die die lange Mgm1-Form durch limitierte Proteolyse in die kurze Mgm1-Form überführt (Herlan *et al.*, 2004; Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003).

Mitochondrien eines Deletionsstammes des Gens *MDM38* sind im Vergleich zum Wildtyp vergrößert und besitzen wenige Verzweigungen. Ferner sind Ring- und Lariatstrukturen zu beobachten. Unabhängig wurde von einer anderen Arbeitsgruppe das

allelische *Y-LETMI* identifiziert (Nowikovsky *et al.*, 2004). Das Translationsprodukt von *MDM38* oder *Y-LETMI* stellt ein hochkonserviertes Protein dar. Es wurde gezeigt, dass Mitochondrien eines *y-letm1*-Stammes weitere Besonderheiten aufweisen. Neben den bereits beschriebenen Morphologieveränderungen ist das Membranpotential im Vergleich zum Wildtyp drastisch reduziert, und die Kationenkonzentration ist vor allem für Kaliumionen erhöht. Das humane Homologe *LETMI* kann die Funktion des Hefehomologs bei Expression in einem Δ *mdm38*-Stamm erfüllen (Nowikovsky *et al.*, 2004). Folglich scheinen *MDM38/LETMI* die ersten bekannten Gene zu sein, deren Genprodukte einen regulatorischen Einfluss auf die Kaliumhomöostase und das Organellenvolumen besitzen. Mutationen des humanen *LETMI* sind für das Wolf-Hirschhorn Syndrom verantwortlich (Zollino *et al.*, 2003). Patienten dieser Erkrankung sind mental und körperlich stark retardiert und weisen charakteristische Missbildungen und Anfälle auf. Das Gesicht ist geprägt von einer breiten Stirn, hervorstehenden Augen, verbreitertem Augenabstand, eines auffällig großen Zwischenaugenbrauenbereichs und eines zu kleinen Unterkiefers.

Alle diese Beispiele zeigen, wie wertvoll die Identifizierung und Charakterisierung neuer Komponenten für das Verständnis der Mitochondrienmorphogenese und deren Auswirkung auf zelluläre Funktionen ist. *MGM1/OPA1* und *MDM38/LETMI* sind Beispiele für die Bedeutung der Mitochondrienmorphologie auch in Hinblick auf die humane medizinische Forschung.

Sind weitere Komponenten der mitochondrialen Morphogenese zu erwarten, die im Rahmen dieser Arbeit nicht entdeckt wurden? Ein erster Hinweis auf die Vollständigkeit dieses Screens war die Tatsache, dass ein ähnlicher Ansatz von einer anderen Arbeitsgruppe durchgeführt wurde (Robert E. Jensen, persönliche Mitteilung). Dabei wurden bislang keine weiteren Morphologiekomponenten entdeckt. Die Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit eine relativ kleine Anzahl an Genen identifiziert wurde, deutet auf eine hohe Selektivität dieser Art des Screenings hin. Es wurden jedoch lediglich Deletionsmutanten untersucht. Somit kann es sich bei den beobachteten Morphologieveränderungen bei einigen Deletionsmutanten um Sekundäreffekte handeln. Die mitochondrialen Morphologiedefekte könnten pleiotrope Effekte ganz anderer Funktionsstörungen darstellen. Um die Vollständigkeit der Deletionsstammsammlung zu überprüfen, wurden anhand der mitochondrialen ribosomalen Proteine die Ergebnisse des Screens mit den veröffentlichten Ergebnissen verglichen. Von den 71 bekannten mitochondrialen ribosomalen Proteinen in der Hefegenomdatenbank (Costanzo *et al.*, 2001) waren 62 in der verwendeten Hefedeletionsstammsammlung enthalten. Bei 61 dieser Mutantenstämme entsprach der

Wachstumsphänotyp den publizierten Ergebnissen. Die Stammsammlung weist demnach eine ca. 80-90% Sättigung für nichtessentielle ORFs von *S. cerevisiae* auf. Daraus lässt sich folgern, dass mit der Durchführung dieses Screens auch 80 bis 90% aller nichtessentiellen Morphologiekomponenten des Hefemitochondrions identifiziert sein sollten. Im Rahmen dieses Screens wurden fast alle bislang beschriebenen Morphologiekomponenten wieder gefunden, nämlich Dnm1, Mdv1 und Fis1 als Proteine der mitochondrialen Teilung, Fzo1 und Mgm1 als Komponenten der mitochondrialen Fusion sowie die Außenmembranproteine Mmm1, Mdm10 und Mdm12. Nur der Deletionsstamm von *UGO1* zeigte keinen mitochondrialen Morphologiedefekt. Es stellte sich allerdings heraus, dass es sich hierbei um eine fehlerhafte Gendeletion handelte. Eine weitere Ausnahme stellt *MAS37* dar. Die Veränderung der mitochondrialen Morphologie in einem *mas37*-Stamm wurde erst im weiteren Verlauf dieser Arbeit entdeckt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Expression von Suppressoren im Stamm der Deletionsbank, die den mitochondrialen Phänotyp unterdrückt. Geht man davon aus, dass fehlerhafte Gendeletionen oder die Expression von Suppressoren in den verwendeten Stämmen eher ein seltenes Vorkommnis sind, sollten 80-90% der nichtessentiellen Morphologiekomponenten mit Abschluss dieser Arbeit bekannt sein. Nur Mdm30, Mdm37 und Mdm38 weisen eine Ähnlichkeit zu einem bereits bekannten Protein auf. Die Vermutung liegt nahe, dass Mitochondrien einen, im Vergleich zu den anderen Organellen, einzigartigen Morphogeneseapparat aufweisen.

Ca. 1500 essentielle Gene konnten mit diesem Ansatz nicht analysiert werden. Davon wurden bereits zwei mit der mitochondrialen Morphologie und Vererbung in *S. cerevisiae* in Zusammenhang gebracht. Das Aktin-kodierende *ACT1*-Gen (Simon *et al.*, 1995) und das Klasse V Myosin kodierende *MYO2*-Gen (Boldogh *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2004). Beide Proteine besitzen jedoch neben ihrer Bedeutung für die mitochondriale Morphogenese noch eine Reihe weiterer Funktionen. Es ist anzunehmen, dass weitere essentielle Proteine eine Bedeutung für die mitochondriale Morphogenese besitzen. Allerdings dürfte auch ihre Bedeutung für die Zelle von globaler Natur sein.

4.2 Mdm31 und Mdm32: zwei neue Morphologiekomponenten der mitochondrialen Innenmembran.

Deletionsmutanten von *MDM31* und *MDM32* weisen auffällige Ähnlichkeiten zu Mutanten auf, denen eine der Außenmembrankomponenten *Mmm1*, *Mdm10*, *Mdm12* oder *Mmm2* fehlt (Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Berger *et al.*, 1997; Boldogh *et al.*, 1998; Boldogh *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994; Youngman *et al.*, 2004). Anstatt des verzweigten tubulären Mitochondriensystems des Wildtyps, besitzen sie große sphärische Mitochondrien mit zytosolischen Einschlüssen (Dimmer *et al.*, im Druck). Diese Mitochondrien sind kaum beweglich und scheinen an einem Ort der Zelle zu verharren. Die interne Struktur der Mitochondrien ist drastisch verändert. Auch das mitochondriale Genom ist in allen diesen Deletionsstämmen instabil und geht zum Teil nach einigen Generationen verloren. Die Struktur der Nukleotide all dieser Stämme weist auffällige Unterschiede zu Wildtyp-Zellen auf. Alle acht möglichen Doppeldeletionskombinationen zwischen *MDM31* oder *MDM32* einerseits und *MMMI*, *MDM10*, *MDM12* oder *MMM2* andererseits sind synthetisch letal. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass diese Proteine an ein und demselben Prozess beteiligt sind, der die mitochondriale Morphologie beeinflusst.

Obwohl die oxidative Phosphorylierung für *S. cerevisiae* nicht zwingend notwendig ist und dieser Organismus seine Energiebilanz durch anaerobe Glykolyse decken kann, sind Mitochondrien essentielle Organellen. Eine zentrale Funktion der Mitochondrien ist die Biosynthese von Eisenschwefelclustern (Lill und Kispal, 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Verlust von *Mdm31* und *Mdm32* zu fast unbeweglichen Mitochondrien führt. Während Wildtyp-Mitochondrien einem stetigen Gestaltswandel innerhalb der Zelle unterworfen sind, verbleiben die sphärischen Mitochondrien in Δ *mdm31*- und Δ *mdm32*-Stämmen über einen längeren Zeitraum von bis zu 15 Minuten an einem Ort in der Zelle (Dimmer *et al.*, im Druck). Der Transport der Mitochondrien in Knospen ist drastisch verlangsamt, so dass bis zu 40% der Knospen der Deletionsstämmen keine Mitochondrien aufweisen. Ähnliches wurde für die Deletionsstämmen der Gene *MMMI*, *MDM10*, *MDM12* und *MMM2* beobachtet. Alle diese Ergebnisse weisen auf eine gravierende Einschränkung der mitochondrialen Motilität in diesen Deletionsstämmen hin. Addieren sich nun die Effekte in Doppeldeletionsmutanten, denen *Mdm31* (oder *Mdm32*) und *Mmm1* (oder *Mdm10*, *Mdm12*, *Mmm2*) fehlt, so führt dies zur Letalität.

Der mitochondriale Transport ist in *S. cerevisiae* abhängig vom Aktinzytoskelett. Eine direkte Beteiligung von Mdm31 und Mdm32 an der Interaktion der Mitochondrien mit dem Aktinzytoskelett ist jedoch unwahrscheinlich. In einem *in vitro*-Ansatz wurde gezeigt, dass isolierte Mitochondrien ATP-abhängig an filamentöses Aktin (F-Aktin) binden. Diese Bindungsaktivität bleibt erhalten, auch wenn Mdm31 und Mdm32 fehlen. Entgegen anderen Berichten (Boldogh *et al.*, 1998) wurde auch für Mitochondrien eines $\Delta mmm1$ -, $\Delta mdm10$ - oder $\Delta mdm12$ -Stammes eine unveränderte F-Aktin-Bindung *in vitro* beobachtet. Somit erscheint auch eine direkte Rolle der Außenmembranproteine Mmm1, Mdm10 und Mdm12 bei der Interaktion mit dem Zytoskelett unwahrscheinlich. Andere Ergebnisse stützen diese Annahme. Zum einen ist die Funktion von Mmm1 im filamentösen Pilz *Neurospora crassa* konserviert. Obwohl der mitochondriale Transport in diesem Organismus vom Mikrotubulizytoskelett abhängig ist, zeigen Mitochondrien einer RIP-Mutante des *MMM1*-Gens in *N. crassa* einen ähnlichen mitochondrialen Phänotyp wie *S. cerevisiae* $\Delta mmm1$ -Mutanten (Prokisch *et al.*, 2000; Westermann und Prokisch, 2002). Dies könnte durch eine allgemeine Funktion von Mmm1 bei der Interaktion mit Bestandteilen des Zytoskeletts der Zelle erklärt werden. Allerdings wurde gezeigt, dass Mitochondrien derselben *Neurospora crassa* Mmm1-RIP-Mutante nach wie vor *in vitro* an isolierte Mikrotubuli binden (Fuchs *et al.*, 2002). Somit erscheint auch in *N. crassa* für Mmm1 eine direkte Rolle in der Zytoskelettinteraktion als unwahrscheinlich. Wird das homologe Mmm1 aus *N. crassa* in einem *S. cerevisiae* *MMM1*-Deletionsstamm exprimiert, erfüllt dieses die Funktion des Hefeproteins (Kondo-Okamoto *et al.*, 2003). Diese Beobachtung widerlegt ebenfalls eine direkte Rolle von Mmm1 bei der Interaktion mit dem Aktinzytoskelett. Wird das Aktinzytoskelett durch Zugabe von Aktin depolymerisierenden Substanzen zerstört, werden fragmentierte Mitochondrien beobachtet (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1995). Bei *MDM31*, *MDM32* und *MMM1*-Deletion entstehen jedoch sphärische Riesenmitochondrien. Wenn Mdm31, Mdm32 und Mmm1 an der direkten Interaktion mit dem Aktinzytoskelett beteiligt wären, würde man bei Deletion der Gene einen mitochondrialen Phänotyp erwarten, der dem bei Verlust des Aktinzytoskeletts ähnlich ist. Ferner wurden wie für Mmm1 auch für Mdm31 und Mdm32 Homologe in Organismen wie *N. crassa* und *S. pombe* gefunden, deren Transport der Mitochondrien eine Abhängigkeit vom Mikrotubulisystem aufweist (Steinberg und Schliwa, 1993; Yaffe *et al.*, 1996). Alle diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, dass sowohl Mdm31 und Mdm32 als auch Mmm1, Mdm10 und Mdm12 keinen direkten Einfluss auf die Interaktion mit dem Aktinzytoskelett nehmen.

GFP-Fusionsproteine von Mmm1, Mdm10, Mdm12 (Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003; Meeusen und Nunnari, 2003) und Mmm2 (Youngman *et al.*, 2004) wurden in punktierter Verteilung auf dem Mitochondrion in Nachbarschaft zu Nukleoiden gefunden. Für die Außenmembranproteine wurde vorgeschlagen, dass sie einerseits für die Lokalisierung der Nukleoide an der mitochondrialen Membran und andererseits für eine Koordinierung der mtDNA mit der zytosolischen Verteilungsmaschinerie der Mitochondrien verantwortlich sind. Für Mmm1 wurde des Weiteren gezeigt, dass es in einem Komplex mit dem mtDNA bindenden Protein Mgm101 und der mtDNA-Polymerase Mip1 nachgewiesen werden kann (Meeusen und Nunnari, 2003). Ob Mdm31 und Mdm32 im Intermembranraum eine ähnliche punktierte Verteilung aufweisen, konnte nicht untersucht werden, da der Versuch scheiterte, Mdm31 und Mdm32 C-terminal mit GFP zu fusionieren. Wurde die kodierende Sequenz von GFP genomisch an *MDM31* und *MDM32* am 3'-Ende des Gens fusioniert, so konnten zwar die C-terminalen Fusionsproteine in den resultierenden Stämmen nachgewiesen werden, jedoch zeigten die Stämme einen mitochondrialen Phänotyp, der dem eines Δ *mdm31*- bzw. Δ *mdm32*-Stammes entsprach (nicht gezeigt).

Die Deletion von *MDM31* und *MDM32* führt wie in Δ *mmm1*-, Δ *mdm10*-, Δ *mdm12*-, und Δ *mmm2*-Stämmen zu einer veränderten Nukleoidstruktur. Es werden im Gegensatz zum Wildtyp keine 10-15 Nukleoide in der Zelle beobachtet, sondern ein bis zwei dominante diffuse mtDNA-Strukturen, die fast die Größe des Zellkerns annehmen können. Diese Analogie in der Auswirkung der Deletion von *MDM31*, *MDM32*, *MMM1*, *MDM10*, *MDM12* oder *MMM2* auf die Struktur der Nukleoide weist ebenfalls auf eine ähnliche Funktion der von ihnen kodierten Proteine hin. Ob sie wirklich für die Lokalisierung der Nukleoide an der mitochondrialen Innenmembran und für eine Koordinierung mit der zytosolischen Verteilungsmaschinerie der Mitochondrien verantwortlich sind, bleibt ungeklärt. Ähnlich veränderte Nukleoide werden allerdings auch in Mutanten beobachtet, denen Abf2 fehlt. Abf2 ist ein Protein welches zur HMG „*high mobility group*“ Familie der DNA-bindenden Proteine (Newman *et al.*, 1996) gehört. Es wird angenommen, dass es eine Rolle bei der Verpackung der mitochondrialen DNA in Nukleoide spielt

Mitochondrien, denen Mdm31 und Mdm32 fehlt, zeigen umfassende Veränderungen der internen Struktur. Zellen der Δ *mdm31*-, Δ *mdm32* und Δ *mdm31*/ Δ *mdm32*-Stämme wurden im Vergleich zu Wildtyp-Zellen elektronenmikroskopisch analysiert (in Kooperation mit Dr. Frank Vogel, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin). Werden Zellen auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen kultiviert, zeigen nur ein Teil der sphärischen Mitochondrien der Deletionsstämme wenige verkürzte Cristae. Häufig werden kreisrunde von

einer Doppelmembran umgebene Strukturen beobachtet. Obwohl diese Strukturen unterschiedliche Größe besitzen ist der Abstand der beiden Membranen konstant und entspricht dem des Intermembranraumes. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass sich diese Membranen von der mitochondrialen Innen- und Außenmembran ableiten. Das Innere dieser Strukturen entspräche demnach dem Zytosol. Diese Beobachtung stimmt mit den in der Fluoreszenzmikroskopie beobachteten dunklen Bereichen der sphärischen Riesenmitochondrien überein. Auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsende Zellen besitzen viele Invaginationen der Innenmembran. Eine reduzierte Ausbildung von Cristae ist folglich nicht für die internen strukturellen Veränderungen verantwortlich (Dimmer *et al.*, im Druck). Ein ähnlicher mitochondrialer Phänotyp wurde für Stämme beschrieben, denen Mmm1 fehlt (Aiken Hobbs *et al.*, 2001). Die Anzahl der Cristae im Vergleich zum Wildtyp war deutlich reduziert, während Einschlüsse in den Mitochondrien zu beobachten waren, wie sie auch für $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Stämme gezeigt wurden (Abb. 5 B, F). Es wurde vorgeschlagen, dass Mmm1 ein Bestandteil eines Mitochondrienskelett-Systems ist. Dieses strukturelle Gebilde wäre für die Ausbildung der elongierten Mitochondrienschläuche einerseits und für die korrekte Assoziation der Nukleoide an die Innenmembran andererseits verantwortlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine ähnliche Rolle für Mdm31 und Mdm32, jedoch in der Innenmembran hin. Trotz der Tatsache, dass in Gelfiltrationsexperimenten unabhängige Proteinkomplexe für Mmm1, Mdm31 und Mdm32 gefunden wurden, könnten diese Proteine im Rahmen dieses mitochondrienskelettartigen Systems transient interagieren und so Einfluss auf die Koordination der Außen- und der Innenmembran nehmen, sowie die Verknüpfung der mtDNA mit der Innenmembran bewerkstelligen. Ein System, welches beide mitochondrialen Membranen durchspannt und eine Koordinierung der mitochondrialen Erbinformation mit der zytosolischen Verteilungsmaschinerie bewirken könnte, wurde in einer anderen Arbeit diskutiert (Meeusen und Nunnari, 2003). Die Autoren zeigen eine Verbindung von Mmm1 zu Mgm101 und Mip1. Mgm101 wurde in Nukleoiden gefunden und im Zusammenhang mit der Reparatur von mtDNA, die durch reaktive Sauerstoffspezies beschädigt war, diskutiert (Meeusen *et al.*, 1999). Mip1 ist die mitochondriale DNA Polymerase. Diese Proteinstruktur, bestehend aus Mmm1, Mgm101 und Mip1 wurde auch in Abwesenheit von mtDNA beobachtet und als mtDNA-Replisom interpretiert. Ob Mdm31 und Mdm32 Bestandteil eines solchen Systems sein könnten, werden weitere Experimente klären.

Mdm31 und Mdm32 sind Proteine der mitochondrialen Innenmembran. Der Hauptteil der Peptidkette befindet sich im Intermembranraum. Eine Transmembrandomäne nahe des N-

Terminus des reifen Proteins befindet sich in der mitochondrialen Innenmembran. Ein zweiter hydrophober Abschnitt nahe des C-Terminus könnte theoretisch ebenfalls eine Transmembrandomäne darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob und v.a. welche mitochondriale Membran dieser Abschnitt tatsächlich durchspannt. Wurde an den C-Terminus des Proteins ein Peptidmarker oder GFP fusioniert, war das resultierende Protein nicht mehr funktionell, und Stämme mit dieser Erweiterung von *MDM31* und *MDM32* zeigten denselben mitochondrialen Phänotyp wie die Deletionsmutanten der beiden Gene. Diese Beobachtungen zeigen allerdings, dass der C-Terminus für die Funktion der Proteine essentiell ist. Dem Homologen Mdm31 aus *S. pombe* fehlt der C-terminale hydrophobe Bereich. Eine genauere Analyse der Peptidsequenz des C-Terminus der *S. cerevisiae* Proteine führt zu der Annahme, dass es sich bei den hydrophoben Bereichen nicht um Transmembrandomänen handelt.

Obwohl beide Proteine (Mdm31 und Mdm32) in Gelfiltrationsexperimenten in zwei verschiedenen Proteinkomplexen der inneren Mitochondrienmembran nachgewiesen wurden, konnte in einem Koimmunfällungsexperiment gezeigt werden, dass Mdm31 und Mdm32 miteinander interagieren. Die fast identischen Auswirkungen der Deletionen eines der beiden Gene auf die Morphologie der Mitochondrien, die mtDNA-Stabilität und die Nukleoidstruktur weisen darauf hin, dass Mdm31 und Mdm32 an ein und demselben Prozess partizipieren. Vergleicht man die Genome von *S. cerevisiae* mit anderen Pilzarten wie *C. albicans*, *S. pombe* und *N. crassa*, fällt auf, dass diese nur ein Homolog der Mdm31/Mdm32 Proteinfamilie besitzen. Dieses würde folglich dieselbe Funktion ausüben, wie die beiden Homologen in der Bäckerhefe.

Mdm31 und Mdm32 sind integrale Proteine der Innenmembran. Dies legt die Vermutung nahe, dass sie das fehlende Bindeglied der beschriebenen Außenmembrankomponenten zur mitochondrialen DNA darstellen könnten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Zellen, die kein Mdm31 oder Mdm32 besitzen über einige Generationen ihre mtDNA beibehalten. Nach vielen Generationen nimmt der Anteil der mtDNA besitzenden Zellen sogar wieder zu. In den Deletionsstämmen bildet sich nach 6-7 Tagen logarithmischen Wachstums der WT-Phänotyp wieder aus. Dies ist auf Anpassungsvorgänge zurückzuführen, bei denen vermutlich Suppressoren eine Rolle spielen. Ein ähnliches Verhalten wurde auch schon für $\Delta mdm10$ - und $\Delta mdm12$ -Stämme beschrieben (Berger *et al.*, 1997). Folglich sind Mdm31 und Mdm32 nicht an der Replikation der mtDNA beteiligt. Viel mehr liegt die Vermutung nahe, dass Mdm31 und Mdm32 als Innenmembranproteine an der Assoziation des mitochondrialen Genoms an die

mitochondriale Innenmembran beteiligt sind, wobei der Verlust der mtDNA dadurch zustande kommt, dass mtDNA ohne die Befestigung an der Innenmembran nicht mehr aktiv, sondern passiv in zufälliger Abfolge an die Tochterzelle weitergegeben wird. Ob Mdm31 und Mdm32 eine rein strukturelle, die Nukleotide betreffende Funktion oder eine regulatorische Funktion beim Verteilungsprozess zukommt, muss in folgenden Studien eingehend untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Ansätze verfolgt, um Interaktionen von Mdm31 und Mdm32 mit anderen bekannten Morphologiekomponenten wie Mmm1, Mdm10, Mdm12 und Mmm2 zu zeigen. Koimmunfällungsexperimente mit gereinigten, lysierten Mitochondrien mit Antikörpern gegen Mdm31 und Mdm32 und Immunoblots gegen Mmm1, Mdm10, Mmm2 und Abf2-GFP ergaben keine nachweisbare Interaktion. Durch Koimmunfällungsexperimente mit radioaktiv markiertem und importiertem Mmm1, Mdm10, Mdm12, Mmm2 und Abf2 konnten ebenfalls keine Interaktionen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der genetischen Interaktionen und der biochemischen Experimente ergeben mindestens drei funktionelle Einheiten, die bei der Vererbung der Mitochondrien eine Rolle spielen, und deren Bedeutung für die mitochondriale Morphologie den Prozessen der Teilung und der Fusion übergeordnet ist (Abb. 25). Mmm1, Mdm10 und Mdm12 sind Untereinheiten eines Außenmembrankomplexes (Boldogh *et al.*, 2003). Alle Stämme mit Doppeldeletionskombinationen der entsprechenden Gene verhalten sich ähnlich wie die Einzeldelentionsstämme (Berger *et al.*, 1997; Hanekamp *et al.*, 2002), was auf eine identische Funktion hinweist. Vor kurzem wurde eine Rolle für Mdm10 bei der Biogenese von „ β -barrel“-Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran beschrieben. Dabei wurde Mdm10 in einem Komplex mit Mas37 und Tob55 nachgewiesen (Meisinger *et al.*, 2004). Diese beiden Proteine bilden einen Proteinkomplex, der „ β -barrel“-Proteine nach der Translokation durch den TOM-Komplex in die äußere Membran inseriert. Mmm1, Mdm12 sowie Mdm10 sind allerdings nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in gleichem funktionellen Kontext zu sehen. Während eine Deletion von *MDM10* wie von *MMM1* oder *MDM12* in Kombination mit *MDM31* oder *MDM32* letal ist, ist die Deletion des nicht essentiellen *MAS37* in Kombination mit den hier charakterisierten Proteinen möglich. Ferner zeigen Mitochondrien eines Δ *mas37*-Stammes einen komplett anderen mitochondrialen Phänotyp als die eines Δ *mdm10*-Stammes. Ob Mdm10 eine duale Funktion bei der Biogenese der Außenmembranproteinkomplexe, z. B. des TOM-Komplex einerseits und der mitochondrialen Morphogenese andererseits zukommt, ist bislang nicht geklärt.

Mmm2 (Mdm34) (Dimmer *et al.*, 2002) ist eine Untereinheit eines zweiten, separaten Komplexes der Außenmembran. Eine Doppeldelensionsmutante von Mmm1 und Mmm2 ist auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen nicht lebensfähig. Auf Glucose ist der Wachstumsphänotyp identisch mit dem eines $\Delta mmm2$ -Stammes. Mmm2 fungiert vermutlich in einem parallelen Mechanismus zu Mmm1. Ferner wurde gezeigt, dass Mmm2 keine stabile Interaktion mit der Innenmembran zeigt (Youngman *et al.*, 2004). Deshalb ist eine stabile Interaktion mit Mdm31 und Mdm32 nicht zu erwarten. Trotzdem weisen Mitochondrien, denen Mmm2 fehlt, auffällige Ähnlichkeiten zu $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Mitochondrien auf. Nicht nur die mitochondriale Morphologie ist sehr ähnlich, sondern auch die Auswirkungen der Deletion von *MDM31*, *MDM32* oder *MMM2* auf die Stabilität der mtDNA. Die Hälfte der Zellen aller drei Deletionsstämme verliert nach längerem Wachstum ihr mitochondriales Genom. Mdm31 und Mdm32 sind Untereinheiten zweier neuer Innenmembrankomplexe. Eine transiente Interaktion wurde für beide Proteine durch Koimmunfällungsexperimente nachgewiesen. Sie sind die ersten mitochondrialen Innenmembranproteine, für die gezeigt werden konnte, dass sie mit Komponenten der Außenmembran funktionell kooperieren und einen Einfluss auf die Vererbung von Mitochondrien und mitochondrialer DNA nehmen.

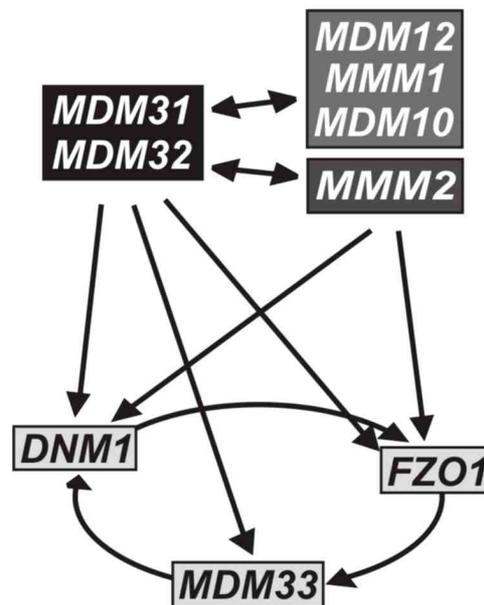


Abbildung 25: Genetische Interaktionen von Komponenten der mitochondrialen Morphologie und Dynamik. Epistatische Beziehungen werden durch einen einfachen Pfeil ausgedrückt. Die Ergebnisse für Mdm31 und Mdm32 dieser Arbeit sind zusammengefasst, *MMM2*-Beziehungen sind aus (Youngman *et al.*, 2004), die Beziehungen zwischen *FZO1*, *DNM1* und *MDM33* aus (Messerschmitt *et al.*, 2003).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse erlauben die Erweiterung der bisher bekannten Komponenten der mitochondrialen Morphologie. Abbildung 26 zeigt die Einordnung von Mdm31 und Mdm32 in die Gesamtzusammenhänge. Es sind zwei neue Komponenten des Morphologieapparates entdeckt worden, und funktionelle Zusammenhänge mit bereits bekannten Komponenten wurden identifiziert.

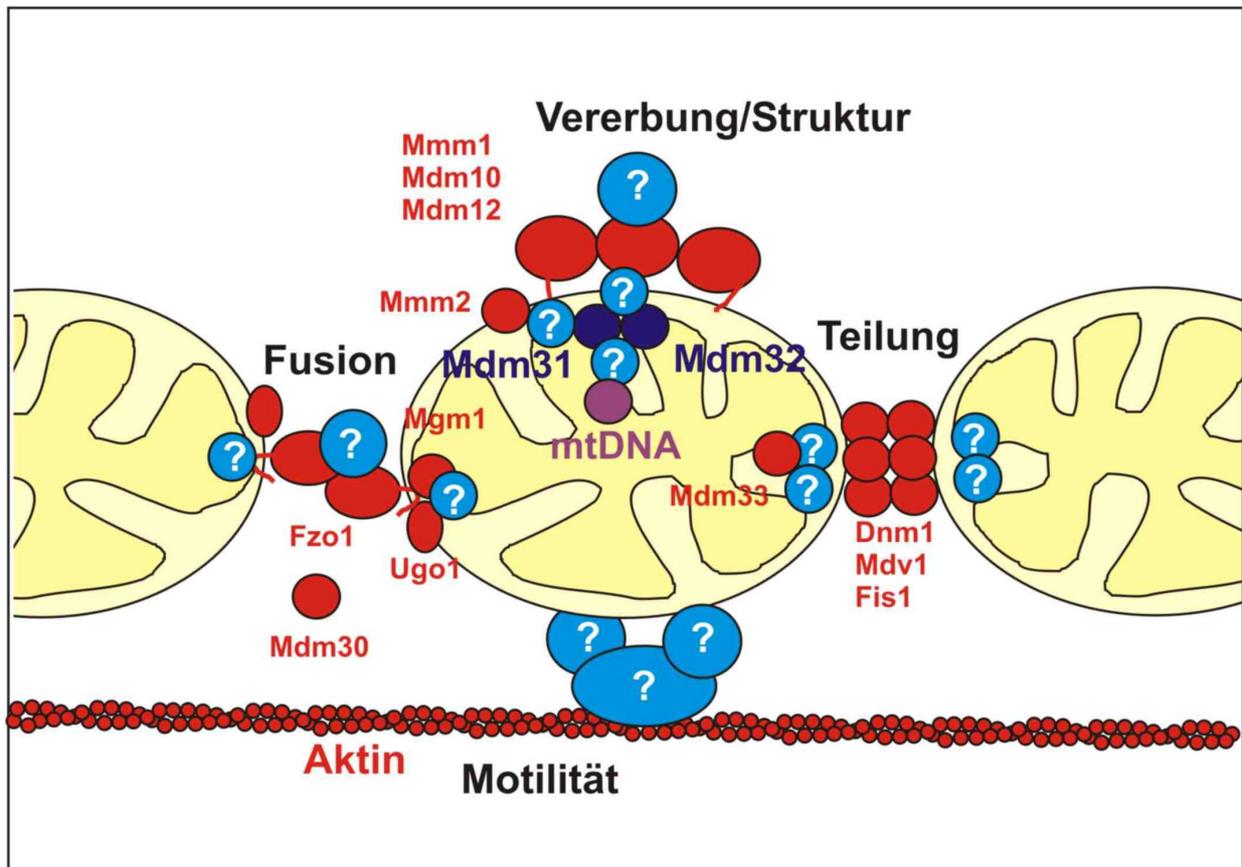


Abbildung 26: Abschließende Übersicht der Morphologiekomponenten der Mitochondrien in *S. cerevisiae* nach dieser Arbeit. Vgl. Abbildung 1.

5 Zusammenfassung

Morphologie und Dynamik der Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle für die Vererbung der Organellen und die korrekte Ausübung ihrer physiologischen Pflichten. Über die molekularen Mechanismen, die der Gestaltgebung und Dynamik der Mitochondrien zugrunde liegen, ist relativ wenig bekannt. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus wurden einige Proteine identifiziert – das Verständnis vieler Prozesse, wie z. B. Fusion, Teilung und Bewegung der Mitochondrien, stellt jedoch nach wie vor eine Herausforderung für die zellbiologische Forschung dar.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein innovativer Ansatz verfolgt, um neue mitochondriale Morphologiekomponenten in *S. cerevisiae* zu identifizieren. Dabei wurde eine Stammsammlung verwendet, die Deletionsmutanten sämtlicher nicht-essentieller Hefegene enthält. Diese Stämme wurden systematisch durch Fluoreszenzmikroskopie nach Mutanten durchsucht, die eine veränderte mitochondriale Morphologie aufweisen. Dadurch konnte die Anzahl der bekannten Proteine, die einen Einfluss auf die mitochondriale Morphogenese besitzen, von bis dato neun auf 24 erhöht werden. Fünf der neuen Komponenten, von denen zehn bislang gänzlich uncharakterisiert waren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit entdeckt.

Für eine eingehende Analyse im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit, wurden die beiden neuentdeckten Proteine Mdm31 und Mdm32 ausgewählt. Diese beiden Proteine sind Mitglieder einer neuen Proteinfamilie und liegen als höhermolekulare Proteinkomplexe in der mitochondrialen Innenmembran vor, die transient miteinander interagieren. Die Topologie von Mdm31 und Mdm32, deren Hauptteil im Intermembranraum liegt, ist ein Hinweis auf eine mögliche Kooperation der beiden Proteine mit Komponenten der mitochondrialen Außenmembran. Deletionsmutanten von *MDM31* und *MDM32* weisen sphärische Riesenmitochondrien auf, deren Motilität drastisch reduziert ist. Durch diesen Motilitätsdefekt kommt es zu einem verringerten Transport der Mitochondrien in die Tochterzellen bei der Zytokinese. Darüber hinaus ist das mitochondriale Genom in $\Delta m d m 3 1$ - und $\Delta m d m 3 2$ -Stämmen instabil und geht nach längerem Wachstum auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen in einem Teil der Zellen verloren. Ferner ist die Struktur der Nukleoide, in denen die mitochondriale DNA verpackt ist, in diesen Stämmen verändert. Während man in Wildtyp-Zellen 10-15 Nukleoide beobachtet, weisen die Mitochondrien der Deletionsstämme ein oder zwei riesige diffuse DNA-Strukturen auf. Diese strukturellen Veränderungen der

Mitochondrien und das Verhalten des mitochondrialen Genoms in den $\Delta mdm31$ - und $\Delta mdm32$ -Deletionsmutanten weisen Ähnlichkeiten zu Zellen auf, denen die Außenmembranproteine Mmm1, Mdm10, Mdm12 oder Mmm2 fehlen. Die Deletion von *MDM31* oder *MDM32* in Kombination mit *MMM1*, *MDM10*, *MDM12* oder *MMM2* ist synthetisch letal, d. h. die Doppelmutanten sind nicht lebensfähig. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beteiligten Komponenten eine Funktion in demselben zellulären Prozess spielen. Wahrscheinlich führt die Addition der Effekte, die die Einzeldelationen auf die Struktur und Motilität der Mitochondrien haben, zur kompletten Hemmung der Vererbung der Organellen. Damit sind Mdm31 und Mdm32 die ersten mitochondrialen Innenmembranproteine, für die ein funktioneller Zusammenhang mit Komponenten der mitochondrialen Außenmembran bei der Vererbung und strukturellen Integrität der Mitochondrien gezeigt werden konnte. Ferner sind sie die ersten Proteine der mitochondrialen Innenmembran, die Einfluss auf die Struktur und Stabilität des mitochondrialen Genoms nehmen.

6 Literatur

- Aiken Hobbs, A.E., M. Srinivasan, J.M. McCaffery, and R.E. Jensen. 2001. Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J. Cell Biol.* 152:401-410.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.
- Amberg, D.C. 1998. Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol. Biol. Cell.* 9:3259-3262.
- Amchenkova, A.A., L.E. Bakeeva, Y.S. Chentsov, V.P. Skulachev, and D.B. Zorov. 1988. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* 107:481-495.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R.A. Stuart, and H. Schagger. 1998. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *Embo J.* 17:7170-8.
- Arretz, M., H. Schneider, U. Wienhues, and W. Neupert. 1991. Processing of mitochondrial precursor proteins. *Biomed. Biochim. Acta.* 50: 403-412.
- Azpiroz, R., and R.A. Butow. 1993. Patterns of mitochondrial sorting in yeast zygotes. *Mol Biol Cell.* 4:21-36.
- Bähler, J., J.Q. Wu, M.S. Longtine, N.G. Shah, A. McKenzie, 3rd, A.B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, and J.R. Pringle. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 14:943-951.
- Bereiter-Hahn, J. 1990. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* 122:1-63.
- Bereiter-Hahn, J., and M. Vöth. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27:198-219.
- Berger, K.H., and M.P. Yaffe. 2000. Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol.* 8:508-513.
- Berger, K.L., L.F. Sogo, and M.P. Yaffe. 1997. Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J. Cell Biol.* 136:545-553.

- Birky, C.W., Jr. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* 35:125-148.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bleazard, W., J.M. McCaffery, E.J. King, S. Bale, A. Mozdy, Q. Tieu, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1:298-304.
- Boeke, J.D., F. LaCrute, and G.R. Fink. 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., N. Vojtov, S. Karmon, and L.A. Pon. 1998. Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J. Cell Biol.* 141:1371-1381.
- Boldogh, I.R., D.W. Nowakowski, H.C. Yang, H. Chung, S. Karmon, P. Royes, and L.A. Pon. 2003. A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell.* 14:4618-27.
- Boldogh, I.R., S.L. Ramcharan, H.C. Yang, and L.A. Pon. 2004. A Type V Myosin (Myo2p) and a Rab-Like G-Protein (Ypt11p) Are Required for Retention of Newly Inherited Mitochondria in Yeast Cells during Cell Division. *Mol Biol Cell.* 15:3994-4002.
- Boldogh, I.R., H.-C. Yang, W.D. Nowakowski, S.L. Karmon, L.G. Hays, J.R. Yates III, and L.A. Pon. 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., H.-C. Yang, and L.A. Pon. 2001b. Mitochondrial inheritance in budding yeast. *Traffic.* 2:368-374.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brandt, J.T., A.P. Martin, F.V. Lucas, and M.L. Vorbeck. 1974. The structure of rat liver mitochondria: a reevaluation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:1097-1104.
- Burgess, S.M., M. Delannoy, and R.E. Jensen. 1994. *MMM1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* 126:1375-1391.

- Campbell, C.L., N. Tanaka, K.H. White, and P.E. Thorsness. 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.
- Christianson, T.W., R.S. Sikorski, M. Dante, J.H. Shero, and P. Hieter. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* 110:119-122.
- Claros, M.G., and P. Vincens. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241:779-786.
- Clifften, P., P. Sudarsanam, A. Desikan, L. Fulton, B. Fulton, J. Majors, R. Waterston, B.A. Cohen, and M. Johnston. 2003. Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science.* 301:71-6.
- Collins, T.J., M.J. Berridge, P. Lipp, and M.D. Bootman. 2002. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* 21:1616-1627.
- Contamine, V., and M. Picard. 2000. Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:281-315.
- Costanzo, M.C., M.E. Crawford, J.E. Hirschman, J.E. Kranz, P. Olsen, L.S. Robertson, M.S. Skrzypek, B.R. Braun, K.L. Hopkins, P. Kondu, C. Lengieza, J.E. Lew-Smith, M. Tillberg, and J.I. Garrels. 2001. YPDTM, PombePDTM and WormPDTM: model organism volumes of the BioKnowledgeTM Library, an integrated resource for protein information. *Nucl. Acids Res.* 29:75-79.
- Daum, G., P.C. Böhni, and G. Schatz. 1982. Import of proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257:13028-13033.
- Deber, C.M., C. Wang, L.P. Liu, A.S. Prior, S. Agrawal, B.L. Muskat, and A.J. Cuticchia. 2001. TM Finder: a prediction program for transmembrane protein segments using a combination of hydrophobicity and nonpolar phase helicity scales. *Protein Sci.* 10:212-9.
- Diffley, J.F., and B. Stillman. 1991. A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:7864-8.
- Dimmer, K.S., S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert, and B. Westermann. 2002. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 13:847-853.

- Dimmer, K.S., S. Jakobs, F. Vogel, K. Altmann, and B. Westermann. Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J. Cell Biol.*, im Druck
- Drubin, D.G., H.D. Jones, and K.F. Wertman. 1993. Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin binding site. *Mol. Biol. Cell.* 4:1277-1294.
- Dubois, E., and F. Messenguy. 1994. Pleiotropic function of ArgRIIip (Arg82p), one of the regulators of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Role in expression of cell-type-specific genes. *Mol. Gen. Genet.* 243:315-324.
- Egner, A., S. Jakobs, and S.W. Hell. 2002. Fast 100 nm resolution 3D-microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:3370-3375.
- Embley, T.M., M. van der Giezen, D.S. Horner, P.L. Dyal, and P. Foster. 2003. Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358:191-201; discussion 201-2.
- Esser, K., B. Tursun, M. Ingenhoven, G. Michaelis, and E. Pratje. 2002. A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J. Mol. Biol.* 323:835-843.
- Fekkes, P., K.A. Shepard, and M.P. Yaffe. 2000. Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J. Cell Biol.* 151:333-340.
- Fields, S.D., M.N. Conrad, and M. Clarke. 1998. The *S. cerevisiae* *CLU1* and *D. discoideum* *cluA* genes are functional homologues that influence mitochondrial morphology and distribution. *J. Cell Sci.* 111:1717-1727.
- Fisk, H.A., and M.P. Yaffe. 1997. Mutational analysis of Mdm1p function in nuclear and mitochondrial inheritance. *J Cell Biol.* 138:485-94.
- Fisk, H.A., and M.P. Yaffe. 1999. A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145:1199-1208.
- Frank, S., B. Gaume, E.S. Bergmann-Leitner, W.W. Leitner, E.G. Robert, F. Catez, C.L. Smith, and R.J. Youle. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell.* 1:515-525.
- Frischknecht, F., and M. Way. 2001. Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol.* 11:30-38.

- Fritz, S., D. Rapaport, E. Klanner, W. Neupert, and B. Westermann. 2001. Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* 152:683-692.
- Fritz, S., N. Weinbach, and B. Westermann. 2003. Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 14:2303-2313.
- Fuchs, F., H. Prokisch, W. Neupert, and B. Westermann. 2002. Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *J. Cell Sci.* 115:1931-1937.
- Giaever, G., A.M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A.P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K.D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D.J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J.H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D.F. Jaramillo, D.E. Kelly, S.L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D.C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S.L. Ooi, J.L. Revuelta, C.J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D.D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, J.N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C.Y. Wang, T.R. Ward, J. Wilhelmy, E.A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J.D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R.W. Davis, and M. Johnston. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.* 418:387-391.
- Giraud, M.F., P. Paumard, V. Soubannier, J. Vaillier, G. Arselin, B. Salin, J. Schaeffer, D. Brethes, J.P. di Rago, and J. Velours. 2002. Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochim Biophys Acta.* 1555:174-80.
- Goodson, H.V., B.L. Anderson, H.M. Warrick, L.A. Pon, and J.A. Spudich. 1996. Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 133:1277-91.
- Gray, M.W., G. Burger, and B.F. Lang. 1999. Mitochondrial evolution. *Science.* 283:1476-1481.
- Griparic, L., and A.M. van der Blik. 2001. The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic.* 2:235-244.

- Guan, K., L. Farh, T.K. Marshall, and R.J. Deshenes. 1993. Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the *MGMI* gene. *Curr. Genet.* 24:141-148.
- Guarente, L. 1993. Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool come of age. *Trends Genet.* 9:362-6.
- Guthrie, C., and G.R. Fink (eds). 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* 194:1-863.
- Hales, K.G., and M.T. Fuller. 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell.* 90:121-129.
- Hanekamp, T., M.K. Thorsness, I. Rebbapragada, E.M. Fisher, C. Seebart, M.R. Darland, J.A. Coxbill, D.L. Updike, and P.E. Thorsness. 2002. Maintenance of mitochondrial morphology is linked to maintenance of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 162:1147-56.
- Hartman, J.L.t., B. Garvik, and L. Hartwell. 2001. Principles for the buffering of genetic variation. *Science.* 291:1001-4.
- Herlan, M., C. Bornhovd, K. Hell, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol.* 165:167-73.
- Herlan, M., F. Vogel, C. Bornhovd, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2003. Processing of Mgm1 by the Rhomboid-type Protease Pcp1 Is Required for Maintenance of Mitochondrial Morphology and of Mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 278:27781-27788.
- Hermann, G.J., E.J. King, and J.M. Shaw. 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., J.W. Thatcher, J.P. Mills, K.G. Hales, M.T. Fuller, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1998. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* 143:359-373.
- Hofmann, K., and W. Stoffel. 1993. TMbase - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 347:166.
- Huffaker, T.C., J.H. Thomas, and D. Botstein. 1988. Diverse effects of beta-tubulin mutations on microtubule formation and function. *J Cell Biol.* 106:1997-2010.
- Huxley, C., E.D. Green, and I. Dunham. 1990. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet.* 6:236.

- Itoh, T., E.A. Toh, and Y. Matsui. 2004. Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast. *Embo J.* 23:2520-30.
- Itoh, T., A. Watabe, A. Toh-e, and Y. Matsui. 2002. Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 22:7744-7757.
- Jacobs, C.W., A.E. Adams, P.J. Szaniszlo, and J.R. Pringle. 1988. Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* 107:1409-26.
- Jensen, R.E., A.E. Aiken Hobbs, K.L. Cerveny, and H. Sesaki. 2000. Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc. Res. Tech.* 51:573-583.
- Johnson, L.V., M.L. Walsh, and L.B. Chen. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:990-994.
- Jones, B.A., and W.L. Fangman. 1992. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* 6:380-389.
- Kato, M., and W. Wickner. 2001. Ergosterol is required for the Sec18/ATP-dependent priming step of homotypic vacuole fusion. *EMBO J.* 20:4035-4040.
- Kellis, M., N. Patterson, M. Endrizzi, B. Birren, and E.S. Lander. 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature.* 423:241-54.
- Kipreos, E.T., and M. Pagano. 2000. The F-box protein family. *Genome Biol.* 1:REVIEWS3002.
- Kondo-Okamoto, N., J.M. Shaw, and K. Okamoto. 2003. Mmm1p spans both the outer and inner mitochondrial membranes and contains distinct domains for targeting and foci formation. *J Biol Chem.* 278:48997-9005.
- Labrousse, A.M., M.D. Zappaterra, D.A. Rube, and A.M. van der Bliek. 1999. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell.* 4:815-826.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lafontaine, D., and D. Tollervy. 1996. One-step PCR mediated strategy for the construction of conditionally expressed and epitope tagged yeast proteins. *Nucleic Acids Res.* 24:3469-3471.

- Lazzarino, D.A., I. Boldogh, M.G. Smith, J. Rosand, and L.A. Pon. 1994. Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity. *Mol. Biol. Cell.* 5:807-818.
- Leon-Avila, G., and J. Tovar. 2004. Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology.* 150:1245-50.
- Lill, R., and G. Kispal. 2000. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 25:352-6.
- McConnell, S.J., L.C. Stewart, A. Talin, and M.P. Yaffe. 1990. Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.* 111:967-976.
- McConnell, S.J., and M.P. Yaffe. 1992. Nuclear and mitochondrial inheritance in yeast depends on novel cytoplasmic structures defined by the MDM1 protein. *J. Cell Biol.* 118:385-395.
- McConnell, S.J., and M.P. Yaffe. 1993. Intermediate filament formation by a yeast protein essential for organelle inheritance. *Science.* 260:687-689.
- McQuibban, G.A., S. Saurya, and M. Freeman. 2003. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature.* 423:537-41.
- Meeusen, S., and J. Nunnari. 2003. Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J Cell Biol.* 163:503-10.
- Meeusen, S., Q. Tieu, E. Wong, E. Weiss, D. Schieltz, J.R. Yates, and J. Nunnari. 1999. Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *J Cell Biol.* 145:291-304.
- Meisinger, C., M. Rissler, A. Chacinska, L.K. Szklarz, D. Milenkovic, V. Kozjak, B. Schonfisch, C. Lohaus, H.E. Meyer, M.P. Yaffe, B. Guiard, N. Wiedemann, and N. Pfanner. 2004. The mitochondrial morphology protein *mdm10* functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell.* 7:61-71.
- Messerschmitt, M., S. Jakobs, F. Vogel, S. Fritz, K.S. Dimmer, W. Neupert, and B. Westermann. 2003. The inner membrane protein *Mdm33* controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 160:553-564.
- Mokranjac, D., S.A. Paschen, C. Kozany, H. Prokisch, S.C. Hoppins, F.E. Nargang, W. Neupert, and K. Hell. 2003. *Tim50*, a novel component of the *TIM23* preprotein translocase of mitochondria. *Embo J.* 22:816-25.

- Mozdy, A., J.M. McCaffery, and J.M. Shaw. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fusion is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* 151:367-379.
- Mozdy, A.D., and J.M. Shaw. 2003. A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:468-78.
- Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66:863-917.
- Neupert, W., and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:555-65.
- Newman, S.M., O. Zelenaya-Troitskaya, P.S. Perlman, and R.A. Butow. 1996. Analysis of mitochondrial DNA nucleoids in wild-type and a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks the mitochondrial HMG box protein Abf2p. *Nucleic Acids Res.* 24:386-93.
- Nowikovsky, K., E.M. Froschauer, G. Zsurka, J. Samaj, S. Reipert, M. Kolisek, G. Wiesenberger, and R.J. Schweyen. 2004. The LETM1/YOL027 Gene Family Encodes a Factor of the Mitochondrial K⁺ Homeostasis with a Potential Role in the Wolf-Hirschhorn Syndrome. *J Biol Chem.* 279:30307-15.
- Nunnari, J., W.F. Marshall, A. Straight, A. Murray, J.W. Sedat, and P. Walter. 1997. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell.* 8:1233-1242.
- Ono, T., K. Isobe, K. Nakada, and J.I. Hayashi. 2001. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.* 28:272-275.
- Otsuga, D., B.R. Keegan, E. Brisch, J.W. Thatcher, G.J. Hermann, W. Bleazard, and J.M. Shaw. 1998. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 143:333-349.
- Paschen, S.A., T. Waizenegger, T. Stan, M. Preuss, M. Cyrklaff, K. Hell, D. Rapaport, and W. Neupert. 2003. Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature.* 426:862-6.
- Pelham, H.R.B., and R.J. Jackson. 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67:247-256.
- Pereira, A.J., B. Dalby, R.J. Stewart, S.J. Doxsey, and L.S. Goldstein. 1997. Mitochondrial association of a plus end-directed microtubule motor expressed during mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 136:1081-1090.

- Pon, L., and G. Schatz. 1991. Biogenesis of yeast mitochondria. *In* The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics. J.R. Broach, J.R. Pringle, and E.W. Jones, editors. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. 333-406.
- Prinz, W.A., L. Grzyb, M. Veenhuis, J.A. Kahana, P.A. Silver, and T.A. Rapoport. 2000. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 150:461-474.
- Prokisch, H., W. Neupert, and B. Westermann. 2000. Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell.* 11:2961-2971.
- Rapaport, D., M. Brunner, W. Neupert, and B. Westermann. 1998. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273:20150-20155.
- Rinaldi, T., C. Ricci, D. Porro, M. Bolotin-Fukuhara, and L. Frontali. 1998. A mutation in a novel yeast proteasomal gene, *RPN11/MPR1*, produces cell cycle arrest, overreplication of nuclear and mitochondrial DNA, and an altered mitochondrial morphology. *Mol. Biol. Cell.* 9:2917-2931.
- Roeder, A.D., G.J. Hermann, B.R. Keegan, S.A. Thatcher, and J.M. Shaw. 1998. Mitochondrial inheritance is delayed in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the serine/threonine phosphatase PTC1. *Mol. Biol. Cell.* 9:917-930.
- Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. 1990. Methods in Yeast Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- Rowley, N., C. Prip-Buus, B. Westermann, C. Brown, E. Schwarz, B. Barrell, and W. Neupert. 1994. Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell.* 77:249-259.
- Russnak, R., K.W. Nehrke, and T. Platt. 1995. *REF2* encodes an RNA-binding protein directly involved in yeast mRNA 3'-end formation. *Mol. Cell. Biol.* 15:1689-1697.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-491.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, J.M., B. Mittal, F.S. Southwick, and J.W. Sanger. 1995. *Listeria monocytogenes* intracellular migration: inhibition by profilin, vitamin D-binding protein and DNase I. *Cell Motil Cytoskeleton.* 30:38-49.

- Seeley, E.S., M. Kato, N. Margolis, W. Wickner, and G. Eitzen. 2002. Genomic analysis of homotypic vacuole fusion. *Mol Biol Cell*. 13:782-94.
- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* 147:699-706.
- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 2001. *UGO1* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 152:1123-1134.
- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 2004. Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem*.
- Sesaki, H., S.M. Southard, A.E.A. Hobbs, and R.E. Jensen. 2003a. Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 308:276-283.
- Sesaki, H., S.M. Southard, M.P. Yaffe, and R.E. Jensen. 2003b. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell*. 14:2342-56.
- Shepard, K.A., and M.P. Yaffe. 1999. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.* 144:711-720.
- Sickmann, A., J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H.E. Meyer, B. Schonfisch, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, P. Rehling, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13207-12.
- Sikorski, R.S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 122:19-27.
- Simon, V.R., S.L. Karmon, and L.A. Pon. 1997. Mitochondrial inheritance: cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motil. Cytoskel.* 37:199-210.
- Simon, V.R., T.C. Swayne, and L.A. Pon. 1995. Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J. Cell Biol.* 130:345-354.
- Skulachev, V.P. 2001. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* 26:23-29.

- Smirnova, E., L. Griparic, D.-L. Shurland, and A.M. van der Blik. 2001. Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell.* 12:2245-2256.
- Smith, M.G., V.R. Simon, H. O'Sullivan, and L.A. Pon. 1995. Organelle-cytoskeletal interactions: actin mutations inhibit meiosis-dependent mitochondrial rearrangement in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 6:1381-1396.
- Sogo, L.F., and M.P. Yaffe. 1994. Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 130:1361-1373.
- Steinberg, G., and M. Schliwa. 1993. Organelle movements in the wild type and wall-less fz;sg;os-1 mutants of *Neurospora crassa* are mediated by cytoplasmic microtubules. *J. Cell Sci.* 106:555-564.
- Tanaka, Y., Y. Kanai, Y. Okada, S. Nonaka, S. Takeda, A. Harada, and N. Hirokawa. 1998. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, *kif5B*, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell.* 93:1147-1158.
- Tieu, Q., and J. Nunnari. 2000. Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 151:353-365.
- Tieu, Q., V. Okreglak, K. Naylor, and J. Nunnari. 2002. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* 158:445-452.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4350-4.
- Tzagoloff, A., and C.L. Dieckmann. 1990. *PET* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 54:211-225.
- von Heijne, G. 1986. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J.* 5:1335-1342.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pöhlmann, and P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 10:1793-1808.
- Warren, G., and W. Wickner. 1996. Organelle inheritance. *Cell.* 84:395-400.
- Westermann, B. 2003. Mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta.* 1641:195-202.

- Westermann, B., and W. Neupert. 2000. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 16:1421-1427.
- Westermann, B., and H. Prokisch. 2002. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 36:91-97.
- Wiedemann, N., V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schonfisch, S. Rospert, M.T. Ryan, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2003. Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature*. 424:565-71.
- Williamson, D.H., and D.J. Fennell. 1979. Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol.* 56:728-33.
- Winzeler, E.A., D.D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J.D. Boeke, H. Bussey, A.M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S.W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S.H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J.H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D.J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J.L. Revuelta, L. Riles, C.J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T.R. Ward, R. Wysocki, G.S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston, and R.W. Davis. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*. 285:901-906.
- Wong, E.D., J.A. Wagner, S.W. Gorsich, J.M. McCaffery, J.M. Shaw, and J. Nunnari. 2000. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* 151:341-352.
- Wong, E.D., J.A. Wagner, S.V. Scott, V. Okreglak, T.J. Holewinski, A. Cassidy-Stone, and J. Nunnari. 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 160:303-311.
- Yaffe, M.P., D. Harata, F. Verde, M. Eddison, T. Toda, and P. Nurse. 1996. Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:11664-11668.
- Yang, H.C., A. Palazzo, T.C. Swayne, and L.A. Pon. 1999. A retention mechanism for distribution of mitochondria during cell division in budding yeast. *Curr Biol*. 9:1111-4.

- Youngman, M.J., A.E. Hobbs, S.M. Burgess, M. Srinivasan, and R.E. Jensen. 2004. Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J Cell Biol.* 164:677-88.
- Zollino, M., R. Lecce, R. Fischetto, M. Murdolo, F. Faravelli, A. Selicorni, C. Butte, L. Memo, G. Capovilla, and G. Neri. 2003. Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet.* 72:590-7.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

- Dimmer, K. S.**, S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert, and B. Westermann. 2002. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 13: 847-853
- Dimmer, K. S.** and B. Westermann. 2002. Solo or networked, mitochondria lead a complex life. *The ELSO Gazette* <http://www.the-also-gazette.org/magazines/issue11.asp> (Issue 11, October 2002)
- Messerschmitt, M., S. Jakobs, F. Vogel, S. Fritz, **K. S. Dimmer**, W. Neupert, and B. Westermann. 2003. The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 160(4): 553-564
- Dimmer, K.S.**, S. Jakobs, F. Vogel, K. Altmann, and B. Westermann. Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J. Cell Biol.* im Druck

Lebenslauf

Kai Stefan Dimmer

14.07.1972 Geboren in Villingen-Schwenningen als Sohn von Hans Jürgen Dimmer und Sigrid Dimmer, geb. Gentner

1979-1983 Besuch der Grundschule Albstadt-Laufen

1983-1992 Besuch des Gymnasiums Albstadt-Ebingen

1992 Abitur

1992-1994 Zivildienst am Kreiskrankenhaus Albstadt-Ebingen

1994-2000 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und der Ludwig-Maximilians-Universität München

1997-2000 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

1999-2000 Diplomarbeit im Labor von Hochschuldozent Dr. Stefan Bröer an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen: „MCT4 ist ein niedrig affiner Monocarboxylattransporter“

März 2000 Diplom in Biochemie

Mai 2000 Beginn der vorliegenden Dissertation im Labor von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert am Institut für physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. Walter Neupert danke ich für die interessante und lehrreiche Zeit an seinem Institut. Ferner möchte ich mich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein Interesse an diesem Projekt bedanken, die zum Erfolg meiner Arbeit maßgeblich beitrugen.

Herrn Professor Dr. Ralf-Peter Jansen danke ich für seine Bereitschaft, meine Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München zu vertreten.

Ein herzliches Dankeschön gebührt Professor Dr. Benedikt Westermann, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Sein Ideenreichtum, seine Anregungen und sein Interesse waren für das erfolgreiche Gelingen dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung. Auch seine konstruktive Kritik und seine Fähigkeit mich an schlechteren Tagen wieder aufzubauen waren immens wertvoll.

Ich danke der DFG für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Jutta Dierolf danke ich für ihre Unterstützung durch außergewöhnliches Engagement für das Projekt und vor allem für die Geduld mit einem ab und an schwierigen Arbeitskollegen. Sie hat durch ihre hervorragende Arbeit, ihre Ideen und ihre Freundschaft einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Ich danke den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Jutta Dierolf, Tung Gia Du, Stefan Fritz, Florian Fuchs, Ravi Jagasia, Gabi Ludwig, Marlies Messerschmitt und Nadja Weinbach, die durch ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft eine großartige Arbeitsatmosphäre in unserem Morphologie-Labor schufen. Frau Regina Lapschansky danke ich dafür, dass sie immer Herr über das Chaos war, welches die wissenschaftlichen Mitarbeiter hinterließen.

Das „technische Team“ der Werkstatt, Willi, Gerd und Peter konnte fast alles, was ein schusseliger Doktorand ab und zu zerstörte, wieder reparieren. Den Mitarbeiterinnen aus dem Hasenstall Eva und Ruth danke ich für ihre Hilfe und ihre Hasen 278, 304, 305 und 320. Danke für den Kaffee und die philosophischen Diskussionen, wenn ich früh morgens auftauchte.

Ich möchte auch den Sekretärinnen Helga Döge, Elke Farsen und Karin Hauck für ihre Hilfe bei Verwaltungsangelegenheiten danken. Frau Margarete Reisenauer danke ich für die hervorragende Logistik bei der Kaffeeversorgung.

Den Mitgliedern der Essensgruppe, Stefan „Billy Ray“ Fritz, Tom „der Tom“ Lutz, Stephan „Wiegetritt“ Meier danke ich für alle höchstintellektuellen wissenschaftlichen Diskussionen am Mittagstisch und von Zeit zu Zeit auch außerhalb des Labors.

Bei allen anderen Mitgliedern des Institutes möchte ich mich bedanken, da sie dazu beigetragen haben, dass mir die Zeit am Institut für Physiologische Chemie immer in guter Erinnerung bleiben wird.

Meinem Bruder Jörg Alexander Dimmer danke ich für die Hilfe bei den Umzügen und die schöne Zeit bei den vielen Bundesliga- und Champions-League-Spielen unseres Vereins im Olympiastadion.

Bei meinem Großvater Rudolf Gentner möchte ich mich für die moralische Unterstützung und das „Zusatzstipendium“ bedanken.

Meinen Eltern Sigrid und Hans-Jürgen Dimmer gebührt der größte Dank. Nach ihrer großartigen Unterstützung während meines Studiums und meiner Diplomarbeit waren sie auch während meiner Promotionszeit immer mit Rat und Tat zur Stelle.