

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut für  
Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-  
Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

**Identifizierung und Charakterisierung neuer  
Komponenten der mitochondrialen Morphogenese in  
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Nadja Weinbach**  
aus Grünstadt

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. W. Neupert
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Th. Klopstock
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J. Müller-Höcker Prof. Dr. K.-D. Gerbitz
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. B. Westermann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2005

*Für meine Eltern*

## Abkürzungen

A	Ampère
AAC	ADP/ATP-Carrier
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cm	Zentimeter
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Farad
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung $m/s^2$
G418	Geneticin
GAL	Galaktose
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin-Peptid
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfat
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria Bertani ( <i>E. coli</i> -Nährlösung)
M	Mol pro Liter
mA	Milliampère
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol pro Liter

mtGFP	Fusionsprotein aus GFP und der mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 des Fo-Teils der mitochondrialen ATP-Synthase von <i>Neurospora crassa</i>
m/v	Masse pro Volumen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD <sub>578</sub>	Optische Dichte bei 578 nm
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Medium	Synthetisches Minimalmedium
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TIM-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Innenmembran
TOM-Komplex	Translokationskomplex der mitochondrialen Außenmembran
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
YPD	Yeast-Extrakt/Pepton/Glukose
YPG	Yeast-Extrakt/Pepton/Glycerin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Aufbau und Funktion von Mitochondrien.....</b>	<b>2</b>
1.1.1	Funktion von Mitochondrien.....	2
1.1.2	Aufbau von Mitochondrien.....	2
1.1.3	Morphologie und Lokalisation von Mitochondrien.....	3
1.1.4	Morphologie der Mitochondrien in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....	3
<b>1.2</b>	<b>Dynamik der Mitochondrien.....</b>	<b>5</b>
1.2.1	Die Fusionsmaschinerie in <i>S. cerevisiae</i> - Fzo1 und andere wichtige Proteine sind an der Fusion der Mitochondrien beteiligt.....	5
1.2.2	Wichtige an der Teilung von Mitochondrien beteiligte Proteine.....	7
1.2.3	Identifizierung von Hefemutanten mit einem Defekt der mitochondrialen Morphologie.....	8
<b>1.3</b>	<b>Zusammenhang von Ubiquitin/26S-Proteasom und Mitochondrien.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>Die medizinische Relevanz mitochondrialer Membranfusion/-teilung.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5</b>	<b>Andere mitochondriale Erkrankungen.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Methoden der Molekularbiologie.....</b>	<b>15</b>
2.1.1	Präparation von DNA.....	15
2.1.2	Enzymatische Modifikation von DNA.....	16
2.1.3	Reinigung und Analyse von DNA.....	17
2.1.4	Transformation von Mikroorganismen.....	18
<b>2.2</b>	<b>Methoden der Hefegenetik.....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	20
2.2.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	20
2.2.3	Nachweis chromosomaler Insertionen/Deletionen in <i>S. cerevisiae</i> .....	21
2.2.4	Kreuzung und Tetradenanalyse von <i>S. cerevisiae</i> .....	22
2.2.5	Analyse des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> (Tüpfeltest).....	22
2.2.6	Verwendete Hefestämme.....	23
<b>2.3</b>	<b>Methoden der Zellbiologie.....</b>	<b>25</b>

2.3.1	Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe .....	25
2.3.2	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	25
2.3.3	Fluoreszenzmikroskopie .....	26
2.3.4	Durchmusterung einer Hefestammsammlung nach Mutanten mitochondrialer Morphologie .....	27
<b>2.4</b>	<b>Methoden der Proteinbiochemie .....</b>	<b>28</b>
2.4.1	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure .....	28
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	28
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen .....	28
2.4.4	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose .....	29
2.4.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen .....	29
<b>2.5</b>	<b>Puffer und Medien .....</b>	<b>31</b>
<b>2.6</b>	<b>Chemikalien und Geräte .....</b>	<b>32</b>
2.6.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	32
2.6.2	Geräte .....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifizierung neuer, für die mitochondriale Morphologie in Hefe relevanter Gene durch einen genomweiten Screen .....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Strategie .....	34
3.1.2	Durchführung .....	34
3.1.3	Ergebnis .....	36
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung von <i>MDM30</i>, einem für die Morphologie der Mitochondrien in Hefe wichtigen Gen .....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Mdm30 ist ein F-Box-Protein .....	40
3.2.2	Mdm30 ist zum Teil mit Mitochondrien assoziiert .....	41
3.2.3	Die Mitochondrien der $\Gamma$ <i>mdm30</i> -Mutante sind aggregiert oder fragmentiert .....	42
3.2.4	Die Morphologie der Mitochondrien ist bei Überexpression von <i>MDM30</i> nicht verändert .....	44
3.2.5	Die Funktion von Mdm30 ist spezifisch für Mitochondrien .....	44
3.2.6	Das Wachstumsverhalten der $\Gamma$ <i>mdm30</i> -Mutante .....	46
3.2.7	Interaktion von Mdm30 mit Fzo1 und Dnm1 .....	47
3.2.8	Mdm30 kontrolliert als regulierender Faktor die intrazelluläre Menge von Fzo1 ...	51
3.2.9	Der Abbau von Tom6-DHFR wird durch Mdm30 nicht beeinflusst .....	53

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>56</b>
4.1	Die Identifizierung neuer Komponenten für die mitochondriale Morphogenese.	56
4.2	Mdm30 und seine Rolle bei der mitochondrialen Fusion .....	58
4.3	Die medizinische Relevanz mitochondrialer Fusion .....	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>64</b>

## Veröffentlichungen

## Danksagung

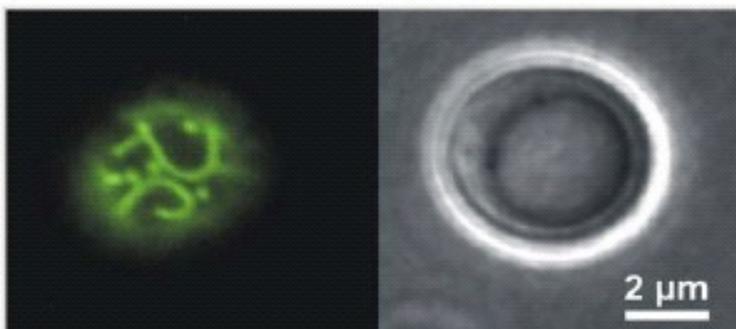
## Lebenslauf

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Mitochondrien der Hefe <i>S. cerevisiae</i> mit mtGFP gefärbt. ....	1
Abb. 2:	Übersicht über die bei der Fusion, der Teilung und dem Transport von Mitochondrien beteiligten Proteine in <i>S. cerevisiae</i> (Abbildung nach B. Westermann, unveröffentlicht).....	6
Abb. 3:	F-Box-Proteine dienen als Adapterproteine im Skp1-Cdc53p-F-Box-Protein-Komplex (modifiziert nach Patton <i>et al.</i> , 1998).....	10
Abb. 4:	Der Ablauf des genomweiten Screens zur Beantwortung der Frage, welche Gene essentiell für eine intakte Mitochondrienmorphologie sind. ....	36
Abb. 5:	Die mitochondriale Morphologie der neu identifizierten <i>mdm</i> -Mutanten $\uparrow$ <i>mdm35</i> und der $\uparrow$ <i>num1</i> -Mutante.....	39
Abb. 6:	Das F-Box-Motiv von Mdm30 im Aminosäuresequenzvergleich.....	40
Abb. 7:	Das Mdm30-Protein ist zum Teil mit Mitochondrien assoziiert.....	41
Abb. 8:	Die $\uparrow$ <i>mdm30</i> -Mutante zeigt aggregierte, teils fragmentierte Mitochondrien. ....	43
Abb. 9:	Die Morphologie der Vakuolen, des ER und von F-Aktin ist in der $\uparrow$ <i>mdm30</i> -Mutante identisch mit der des Wildtyps.....	45
Abb. 10:	Die Deletion von <i>MDM30</i> führt bei erhöhter Temperatur auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle zu einem Wachstumsdefekt. ....	46
Abb. 11:	Die Wachstumsphänotypen und die mitochondriale Morphologie der Doppelmutanten $\uparrow$ <i>mdm30</i> / $\uparrow$ <i>fzo1</i> und $\uparrow$ <i>mdm30</i> / $\uparrow$ <i>dnm1</i> : $\uparrow$ <i>fzo1</i> und $\uparrow$ <i>dnm1</i> überlagern $\uparrow$ <i>mdm30</i> .....	50
Abb. 12:	Die Proteinmenge von Fzo1 ist von Mdm30 abhängig. ....	53
Abb. 13:	Der Abbau von HA-DHFR-Tom6 <i>in vivo</i> ist in der $\uparrow$ <i>mdm30</i> -Mutante nicht beeinträchtigt.....	55

## 1 Einleitung

Mitochondrien wurden in der Mitte des 19. Jahrhunderts von Fleming als anfärbbare Granula im Cytoplasma entdeckt. Seitdem haben wir eine Menge über ihre Funktion im Zellhaushalt gelernt. Schon vor mehr als 50 Jahren war bekannt, dass sie das „Kraftwerk“ der Zelle darstellen, indem sie die Zelle mit Energie in Form von ATP versorgen. In Lehrbüchern findet man häufig eine schematische Darstellung des Mitochondrions als eiförmiges, starres Gebilde. Mit der Zeit musste dieses vereinfachte Bild revidiert werden, da Mitochondrien unglaublich dynamische Organellen sind. In vielen eukaryotischen Zellen bewegen sie sich entlang des Cytoskeletts, teilen sich und verschmelzen miteinander (Yaffe, 1999a; Boldogh *et al.*, 2001a). Die Fluoreszenzmikroskopie lieferte wichtige Erkenntnisse über die Dynamik der Mitochondrien (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994). Man arbeitet hier mit sehr milden Färbetechniken, so dass die Mitochondrien lebender Zellen untersucht werden können. Die am weitesten verbreitete Gruppe an Fluoreszenzfarbstoffen sind die Rhodamine, welche in Abhängigkeit vom Membranpotential in die Mitochondrien aufgenommen werden (Johnson *et al.*, 1980). Ein Meilenstein in der Fluoreszenzmikroskopie war in der Mitte der neunziger Jahre die Entdeckung des *green fluorescent proteins*, abgekürzt GFP (Rizutto *et al.*, 1996). Dieses Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* besitzt fluoreszierende Eigenschaften. Wenn GFP an Proteine fusioniert wird, können deren Dynamik und Lokalisation in der Zelle beobachtet werden. Um Mitochondrien zum Leuchten zu bringen, reicht es aus, GFP mit einer mitochondrialen Präsequenz zu versehen. Das daraus entstandene Fusionsprotein mtGFP wird mittels dieser Zielsequenz in die mitochondriale Matrix dirigiert (Abbildung 1 aus Westermann und Neupert, 2000).



**Abb. 1: Mitochondrien der Hefe *S. cerevisiae* mit mtGFP gefärbt.**

Man sieht links in der Fluoreszenzaufnahme ein verzweigtes mitochondriales Netzwerk; rechts die zugehörige Phasenkontrastaufnahme (Abbildung aus Westermann und Neupert, 2000).

## 1.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien

### 1.1.1 Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien spielen eine wesentliche Rolle in der ATP-Synthese, dem Lipidmetabolismus und der Assemblierung von Eisen/Schwefel-Gruppen. Weiterhin enthalten sie Enzyme für den Abbau von Fettsäuren und für Teile des Harnstoffzyklus. Sie sind beteiligt an der Biosynthese des Häm, der Pyrimidine, der Nukleotide und der Phospholipide (Attardi und Schatz, 1988). In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Mitochondrien darüber hinaus wichtige Aufgaben bei der Apoptose, dem Alterungsprozess und anderen medizinisch relevanten Fragestellungen übernehmen (Susin *et al.*, 2001; Wang, 2001; siehe 1.4).

### 1.1.2 Aufbau von Mitochondrien

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgebene Organellen mit eigener DNA und eigenen 70S-Ribosomen. Die äußere Membran umschließt das gesamte Mitochondrion und enthält Kanäle aus Proteinkomplexen, welche den Austausch von Molekülen und Ionen zwischen dem Intermembranraum und dem Cytosol ermöglichen. Die Innenmembran begrenzt nach innen den Matrixraum, nach außen zusammen mit der Außenmembran den Intermembranraum. Einstülpungen der Innenmembran in den Matrixraum werden als Cristae bezeichnet. Die Innenmembran ist undurchlässig für Ionen und Proteine. Nur über spezielle Transportmechanismen können Proteine in die Mitochondrien eingeschleust werden. In der Hefe *S. cerevisiae* sind hierbei 4 verschiedene Proteinkomplexe beteiligt: in der Außenmembran der TOM-Komplex und in der Innenmembran der TIM22-, der TIM23- und der OXA-Komplex (Bauer *et al.*, 2000; Neupert, 1997). Diese Proteinkomplexe fungieren als Transporter der Proteine, die im Cytoplasma synthetisiert, aber im Mitochondrion benötigt werden. Nur noch die Untereinheiten I, II und III der Cytochromoxidase, Cytochrom b, drei Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATPase, ein ribosomales Protein (Var1), RNA-Maturasen, Endonukleasen, zwei mitochondriale rRNA-Moleküle sowie die mitochondrialen tRNAs werden in Mitochondrien synthetisiert (Grivell, 1995). Alle übrigen Proteine sind im Zellkern kodiert, da im Laufe der Evolution das mitochondriale Genom zusehends Information an den Zellkern abgegeben hat.

### 1.1.3 Morphologie und Lokalisation von Mitochondrien

Zahl und Gestalt der Mitochondrien können sich unterschiedlichen Wachstumsbedingungen anpassen und sind je nach Zelltyp variabel (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994). Man findet zum Teil kugelige Organellen, zum Teil fadenförmige Netzwerke. Einfluss auf die Morphologie haben die jeweils unterschiedlichen Funktionen in diversen Zelltypen (Scheffler, 2001). In Hepatozyten oder Fibroblasten findet man z.B. längliche Mitochondrien mit einer Länge von rund 4  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$ . In Zellen mit hohem Energieverbrauch bilden die Mitochondrien Netzwerke aus und ordnen sich entlang der energieverbrauchenden Strukturen an, so dass der Ort der ATP Bereitstellung mit dem Ort, an dem die Energie benötigt wird, möglichst dicht beisammen liegt. So richten sich die Mitochondrien in der Muskelzelle parallel zu den ATP-verbrauchenden Aktin-Myosin-Fibrillen aus (Bakeeva *et al.*, 1978, siehe 1.4). Auch in Nervenzellen im Bereich der Synapsen und in Nierentubuluszellen im Bereich der Plasmamembran finden sich zahlreiche Mitochondrien, um die Energie für die Transportsysteme bereitzustellen.

### 1.1.4 Morphologie der Mitochondrien in der Hefe *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* dient als experimentell einfach zu handhabender Modellorganismus der Klärung grundlegender, zellulärer Funktionen. Bis zu 30 % der Gene, die im Menschen mit Krankheiten in Verbindung stehen, haben Homologe in Hefe (Basset *et al.*, 1997). Wenn man die Funktion aller Hefegenprodukte kennt, ist eine wichtige Grundlage für ein besseres Verständnis zellulärer Vorgänge auch in anderen Organismen gelegt. Dass die Bäckerhefe *S. cerevisiae* als Modellorganismus dient, hat mehrere Gründe: zum einen ist ihr Genom nur 3,5 mal so groß wie das von *E. coli*, zum anderen lässt sie sich leicht kultivieren und besitzt als Eukaryont trotzdem Eigenschaften, die einen Vergleich mit menschlichen Zellen möglich machen. Die Bäckerhefe ist gentechnischen Manipulationen leicht zugänglich und es stehen eine Reihe biochemischer Methoden zu ihrer Untersuchung zur Verfügung. Auch für die Beobachtung und Untersuchung von Mitochondrien ist die Bäckerhefe ein geeigneter Organismus, da Hefezellen als fakultativ anaerober Organismus ihren Energiebedarf durch Fermentation decken können und somit nur wenige Proteine für ein Überleben der Hefezelle essentiell sind. So können gezielte Mutationen und Deletionen von Genen, die für die Funktion von Mitochondrien wichtig sind, untersucht werden.

Je nach Wachstumsphase und Wachstumsbedingungen liegen die Mitochondrien von *S. cerevisiae* entweder als kleine fragmentierte Partikel vor oder aber als ein Netzwerk, welches durch ständige Fusion und Teilung dynamisch ist. Wächst *S. cerevisiae* auf einer nicht-fermentablen Kohlenstoffquelle, wie z.B. Glycerin, so ist sie auf die in den Mitochondrien stattfindende oxidative Phosphorylierung angewiesen. Es bildet sich ein verzweigtes, in der Peripherie der Zelle lokalisiertes mitochondriales Netzwerk aus, welches die Energie für die Transportsysteme der Plasmamembran bereitstellt. Steht hingegen Glucose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, ist das mitochondriale Netzwerk weniger ausgeprägt, da Energie über die Glykolyse gewonnen werden kann (Egner *et al.*, 2002).

Unter anaeroben Bedingungen bilden die Mitochondrien kleine Organellen aus, die auch als „Promitochondrien“ bezeichnet werden (Criddel und Schatz, 1969). Steht Sauerstoff zur Verfügung, verlängern sich die Mitochondrien und bilden mitochondriale Netzwerke aus, welche sich in der Zellperipherie positionieren. Neben den Wachstumsbedingungen hat auch die Wachstumsphase einen Einfluß auf die mitochondriale Morphologie: in der stationären Phase finden wir kleine, runde, fragmentierte Mitochondrien, in der logarithmischen Phase ein mitochondriales Netzwerk.

Diese morphologischen Veränderungen werden durch Teilungs- und Fusionsereignisse, die sich ungefähr alle 2 Minuten ereignen, aufrechterhalten (Nunnari *et al.*, 1997). Die Teilung findet hierbei an einem Tubulus statt und wird durch das Dnm1-Protein vermittelt, das während der Teilung mit Mitochondrien assoziiert ist (Otsugo *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999; siehe 1.2.2). Die mitochondriale Fusion ereignet sich zwischen zwei mitochondrialen Spitzen oder einer Spitze und einem Tubulus und wird durch das Fzo1-Protein reguliert, welches in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert ist (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994; Fritz *et al.*, 2001; siehe 1.2.1).

## 1.2 Dynamik der Mitochondrien

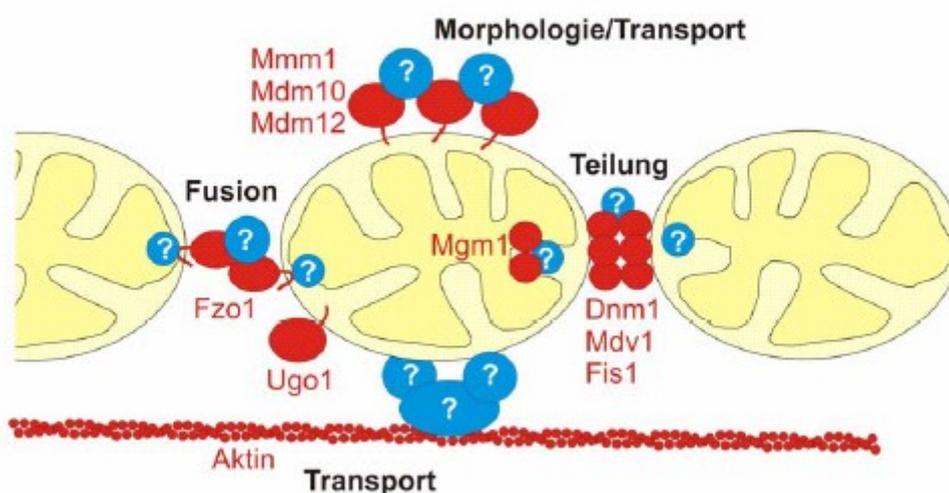
### 1.2.1 Die Fusionsmaschinerie in *S. cerevisiae* - Fzo1 und andere wichtige Proteine sind an der Fusion der Mitochondrien beteiligt

Das erste entdeckte Protein, welches für die Fusion von Mitochondrien notwendig ist, ist das *fuzzy-onions*-Protein. Dieses wurde in *Drosophila melanogaster* entdeckt und spielt dort während der Spermatogenese eine wichtige Rolle. Während der Differenzierung der Spermatiden machen die Mitochondrien ausgeprägte morphologische Veränderungen durch. Diese beginnen damit, dass Mitochondrien in der Nachbarschaft zum haploiden Zellkern aggregieren. Sie fusionieren zu zwei riesigen, mitochondrialen Strukturen, die umeinander gewunden sind und als Nebenkern bezeichnet werden (Hales und Fuller, 1997). Im Elektronenmikroskop ähnelt diese Struktur einer aufgeschnittenen Zwiebel. Während sich das Flagellum verlängert, lösen sich die beiden Mitochondrien voneinander und ordnen sich entlang des wachsenden Flagellums an. Dort stellen sie die Energie für die Fortbewegung der Spermazelle bereit. In der *fuzzy-onions*-Mutante, die eine Mutation in der GTPase-Domäne des neuen gefundenen Proteins trägt, können die Mitochondrien der Spermatiden nicht mehr fusionieren (Hales und Fuller, 1997). Die fragmentierten Mitochondrien aggregieren und bilden eine Struktur aus, die einer deformierten Zwiebel ähnelt.

Auch in anderen Organismen, in Säugern, Würmern und Pilzen, wurden verwandte Gene identifiziert (Hales und Fuller, 1997). Fzo1 ist das Homologe in *S. cerevisiae*. Es erfüllt auch hier Aufgaben während der Fusion von Mitochondrien. Eine Deletion des *FZO1*-Gens führt dazu, dass die Mitochondrien fragmentieren und ihre DNA verlieren (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Fzo1 ist ein integrales Außenmembranprotein. Es besitzt 2 Transmembrandomänen und eine GTPase, welche zum Cytosol exponiert ist (Fritz *et al.*, 2001; Hermann *et al.*, 1998). Es ist Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes von 800 kD, der vermutlich den Fusionsapparat der mitochondrialen Außenmembran darstellt (Rapaport *et al.*, 1998). Die Homologen im Menschen sind die sogenannten Mitofusine, Mfn1 und Mfn2. Auch hier führen Mutationen in der GTPase-Domäne zu einer veränderten mitochondrialen Morphologie (Legros *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2002). Es ist noch unklar, ob die beiden Proteine synergistisch bei der Mitochondrienfusion arbeiten. Es wurde gezeigt, dass Mutationen im Mfn2-Protein bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit auftreten (Züchner *et al.*, 2004; siehe 4.3).

Auch Ugo1 nimmt an der Fusion der Mitochondrien der Hefe *S. cerevisiae* teil. Es ist ein 58 kD großes Protein, welches die Außenmembran der Mitochondrien mit nur einer Transmembrandomäne durchspannt (Sesaki und Jensen, 2001). Das N-terminale Ende liegt im Cytosol, der C-Terminus befindet sich im Intermembranraum. Die Deletion des *UGO1*-Gens zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie die  $\Gamma$  *fzo1*-Deletionsmutante. Von Ugo1 sind keine homologen Proteine in anderen Organismen bekannt.

Mgm1 besitzt wie Fzo1 eine GTPase-Domäne und ist im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert (Wong *et al.*, 2000). Die Zellen der  $\Delta$  *mgm1*-Mutante zeigen ähnlich wie die Zellen der  $\Gamma$  *fzo1*-Mutante fragmentierte und aggregierte Mitochondrien (Wong *et al.*, 2000). Es kommt zum Verlust der mitochondrialen DNA (Guan *et al.*, 1993; Shepard und Jaffe, 1999; Wong *et al.*, 2000). Ein menschliches homologes Protein zu Mgm1 ist das Opa1-Protein. Mutationen im *OPA1*-Gen bedingen die autosomal-dominante Optikusatrophie und führen morphologisch zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2002; siehe 1.4 und 4.3).



**Abb. 2: Übersicht über die bei der Fusion, der Teilung und dem Transport von Mitochondrien beteiligten Proteine in *S. cerevisiae* (Abbildung nach B. Westermann, unveröffentlicht).**

Die mitochondriale Morphologie wird vom Transport der Mitochondrien entlang des Cytoskeletts sowie von Fusions- und Teilungsprozessen beeinflusst. Bislang wurden schon einige Komponenten identifiziert, die in der Abbildung rot dargestellt und im Text näher beschrieben sind. Noch unbekannte Faktoren sind für den Transport am Aktinskelett verantwortlich. Auch Fusionskomponenten der Innenmembran sind ebenso wie Teilungskomponenten der Innenmembran noch nicht charakterisiert. Bisher unbekannte Komponenten sind blau dargestellt.

## 1.2.2 Wichtige an der Teilung von Mitochondrien beteiligte Proteine

Auch die Teilung der Mitochondrien in Hefe wird von einem GTP-bindenden Protein vermittelt. Das Dnm1-Protein, welches zur Familie der Dynamine gehört, ist zum Teil im Cytosol lokalisiert, zum Teil mit Mitochondrien assoziiert (Gammie *et al.*, 1995; Otsuga *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999).

Dynamamin, das am besten charakterisierte Familienmitglied, wird während der Endocytose benötigt. Es schnürt als Mechanoenzym nach Hydrolyse von GTP Clathrin-beschichtete Vesikel von der Plasmamembran ab, so dass diese in das Cytosol freigesetzt werden (De Camilli *et al.*, 1995; Takei *et al.*, 1996). Eine ähnliche Rolle wird für Dnm1 bei der Teilung von Mitochondrien in Hefe postuliert: Dnm1 könnte Ringe um das Organell bilden und durch ein Zusammenschnüren der Membranen das Organell teilen. Durch ausbleibende Teilung der Mitochondrien kommt es in der Deletionsmutante von *DNM1* durch immer wieder stattfindende Fusionsprozesse zur Ausbildung von feinen, mitochondrialen Netzen, welche sich in einer Zellhälfte ansammeln (Otsuga *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999; Yaffe, 1999a). Interessanterweise bildet die Doppelmutante von *fzo1* und *dnm1* wieder ein netzwerkartiges Mitochondriengeflecht aus (Sesaki und Jensen, 1999). Dies unterstreicht die Bedeutung der beiden an den antagonistisch ablaufenden Prozessen der mitochondrialen Teilung und Fusion beteiligten Proteine Fzo1 und Dnm1. Weitere Proteine der Teilungsmaschinerie sind Mdv1 und Fis1 (Fekkes *et al.*, 2000; Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Cerveny *et al.*, 2001). Fis1 ist ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran mit einem Molekulargewicht von 18 kDa (Mozdy *et al.*, 2000). Es findet sich gleichmäßig über die gesamte Oberfläche des Mitochondrions verteilt. Es fungiert in einem frühen Stadium der Teilung als Rezeptor für das cytosolische Mdv1, welches dann erfolgreich mit Dnm1 interagieren kann (Tieu und Nunnari, 2000). Man findet Dnm1 zusammen mit Mdv1 in fleckenähnlichen Strukturen der Außenmembran, an denen die Teilung stattfindet (Bleazard *et al.*, 1999). Diese drei Proteine scheinen durch Interaktion miteinander den komplexen Vorgang der Separation der Membranen zu ermöglichen (van der Blik, 2000; Shaw und Nunnari, 2002; Cerveny und Jensen, 2003).

### 1.2.3 Identifizierung von Hefemutanten mit einem Defekt der mitochondrialen Morphologie

Die bei der Teilung und der Fusion von Mitochondrien beteiligten Proteine sind mitochondriale und cytosolische Komponenten, die im komplexen Vorgang der Mitochondrienfusion und der Mitochondrienteilung zusammenspielen (Hermann und Shaw, 1998; Jensen *et al.*, 2000; Griparic und van der Blik, 2001).

In den vergangenen 15 Jahren wurden eine Reihe von Mutanten von *S. cerevisiae* identifiziert, die einen Defekt in der Morphologie und Vererbung von Mitochondrien zeigen. Diese *mdm*-Mutanten (*mitochondrial distribution and morphology*) wurden aus Stammsammlungen temperatursensitiver Mutanten isoliert (Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994; Hermann *et al.*, 1997; McConnell *et al.*, 1990; Sesaki und Jensen, 1999; Boldogh *et al.*, 2001b). Hierzu wurden die Mitochondrien dieser Stämme mit fluoreszierenden Farbstoffen gefärbt und mikroskopisch in Hinblick auf die mitochondriale Morphologie untersucht. Durch diese Analyse wurde als erstes das an der mitochondrialen Verteilung und Morphologie beteiligte Protein Mdm1 identifiziert (McConnell und Yaffe, 1992). Weitere identifizierte Proteine, die die Motilität der Mitochondrien beeinflussen, sind Mdm10, Mdm12 und Mmm1, alles Proteine der mitochondrialen Außenmembran (Sogo und Yaffe, 1994; Berger *et al.*, 1997; Boldogh *et al.*, 1998; Aiken Hobbs *et al.*, 2001). Auch Mdm20 beeinflusst die Morphologie der Mitochondrien und zeigt einen zusätzlichen Defekt im Aufbau des Aktincytoskeletts (Hermann *et al.*, 1997). Dies weist auf eine enge Beziehung zwischen Aktin und Mitochondrien hin (Simon *et al.*, 1995).

Eine Veränderung der mitochondrialen Morphologie geht häufig mit einem Verlust der mitochondrialen DNA einher (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 2001; Wong *et al.*, 2000). Diese ist normalerweise an der Innenmembran in der Matrix angeheftet. Geht die mitochondriale DNA verloren, fehlen in der Atmungskette Proteine, so dass es zu einem Atmungsdefekt kommt. Diesen Zellen ist es nicht möglich, auf nicht-fermentablen Kohlenstoffquellen zu wachsen. Sie werden als *petite*-Mutanten bezeichnet (Tzagoloff und Dieckmann, 1990).

### 1.3 Zusammenhang von Ubiquitin/26S-Proteasom und Mitochondrien

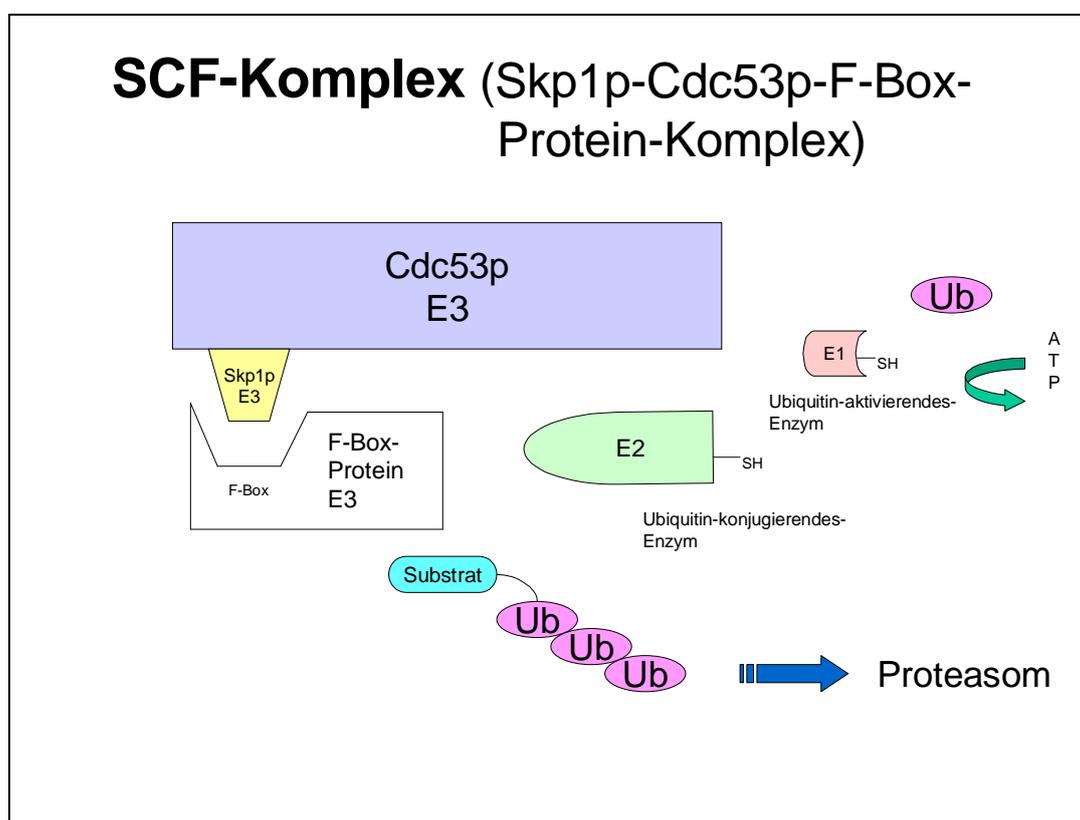
Ubiquitin ist ein kleines Protein, das in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist und eine wichtige Rolle beim Proteinabbau spielt. Es markiert Proteine für deren Zerstörung durch das 26S-Proteasom. Verantwortlich für die Ubiquitinierung abzubauenender Proteine ist ein Multi-Protein-Komplex, der sich aus 3 verschiedenen Enzymen zusammensetzt (Hershko *et al.*, 1983). Ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym, als E1 bezeichnet, nutzt ATP, um eine Thioesterbindung zwischen sich und Ubiquitin zu bilden. E1 transferiert das aktivierte Ubiquitin zu einem das Ubiquitin konjugierenden Enzym, E2. Schließlich überträgt E2 gemeinsam mit einer Ubiquitin-Protein-Ligase, E3, das Ubiquitin an das Substratprotein, welches durch das Anhängen von Ubiquitineinheiten zum Abbau durch das Proteasom markiert wird. Hierbei ist die E3 Ubiquitin-Protein-Ligase verantwortlich für den kritischen Schritt der spezifischen Substraterkennung. Bei einer speziellen Klasse von E3-Enzymen, dem SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex, wird die Substratspezifität über F-Box-Proteine vermittelt. Dieser E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex ist nach seinen Komponenten Skp1, Cdc53 und dem F-Box-Protein benannt (siehe Abbildung 3; Patton *et al.*, 1998; Kipreos und Pagano, 2000). F-Box-Proteine sind durch ein ca. 50 Aminosäuren langes Motiv, die sogenannte F-Box, gekennzeichnet. Mit diesem Motiv können F-Box-Proteine an das Skp1-Protein binden, welches neben Cdc53 eine weitere Untereinheit des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes darstellt. F-Box-Proteine fungieren somit als Adapterproteine zwischen dem Substrat und dem SCF-Ubiquitinligase-Komplex und gewährleisten die Spezifität der Ubiquitinierung, indem nur ein einziges Substratprotein erkannt wird (Bai *et al.*, 1996; Deshaies, 1999; Skowyra *et al.*, 1997). In der Hefe *S. cerevisiae* existieren 11 bekannte F-Box-Proteine (Kipreos und Pagano, 2000). Auch in Säugern wurde eine entsprechende Familie von F-Box-Proteinen charakterisiert (Cenciarelli *et al.*, 1999; Winston *et al.*, 1999).

Der Zusammenhang zwischen der Ubiquitinierung und der Morphologie von Mitochondrien wird an Mutantenstämmen der Hefe *S. cerevisiae* deutlich, die eine Mutation der Ubiquitin-Ligase, Rsp5, aufweisen. Aufgrund fehlerhafter Ubiquitinierung durch den oben beschriebenen Enzymkomplex bilden die Mitochondrien hier kleine runde Strukturen aus, deren Motilität beeinträchtigt ist (Fisk und Yaffe, 1999; 4.3).

Des Weiteren gibt es auch eine Verbindung zwischen dem 26S-Proteasom und der mitochondrialen Morphologie. Das 26S-Proteasom erkennt polyubiquitinierte Proteine und baut diese ab. Es ist ein aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzter Komplex, der

wichtige Funktionen im Zellzyklus, während der Apoptose, bei der Immunantwort und der Signaltransduktion übernimmt (Tanaka, 1998). Mutationen in *MPRI*, einem essentiellen Gen, welches eine proteasomale Untereinheit kodiert, bedingen eine veränderte mitochondriale Morphologie. Die Mitochondrien aggregieren und das tubuläre Netzwerk ist fragmentiert. Es kommt zur Anhäufung mitochondrialer DNA und einem beeinträchtigten Wachstum auf Glycerin-haltigem Medium (Rinaldi *et al.*, 1998; 4.3).

Ein weiterer interessanter Aspekt, der den Zusammenhang zwischen Ubiquitinierung und Mitochondrien verdeutlicht, ist folgender: mitochondriale Membranen des Spermiums werden während der Befruchtung ubiquitiniert. Die Ubiquitinierung führt zum Abbau der väterlichen Mitochondrien (Sutovsky *et al.*, 1999; Sutovsky, 2003). Somit wird nur das mütterliche mitochondriale Erbgut an die Nachkommenschaft weitergegeben.



**Abb. 3: F-Box-Proteine dienen als Adapterproteine im Skp1-Cdc53p-F-Box-Protein-Komplex (modifiziert nach Patton *et al.*, 1998).**

Der E3-Komplex, bestehend aus Cdc53p, Skp1 und einem F-Box-Protein, ist für den kritischen Schritt der spezifischen Substraterkennung verantwortlich. Das F-Box-Protein erkennt ein spezifisches Substrat und bindet an Skp1. Cdc53p vernetzt das zu ubiquitinierende Substrat mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym, E2. E1 ist für die Aktivierung des Ubiquitin zuständig.

## 1.4 Die medizinische Relevanz mitochondrialer Membranfusion/-teilung

Fusion und Teilung von Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle bei einer Reihe von zellulären Prozessen mit medizinischer Relevanz, wie der Apoptose, dem Alterungsprozess und mitochondrialen Erkrankungen, wie z.B. der dominanten optischen Atrophie (Delettre *et al.*, 2000 und 2002; Alexander *et al.*, 2000; Raha *et al.*, 2000; 4.3).

Auch wird die mitochondriale Fusion für die Erhaltung eines mitochondrialen Netzwerks benötigt, welches eine schnelle Energieübertragung zwischen weit entfernten Stellen in der Zelle ermöglicht (Skulachev, 2001). In Muskelzellen liegen die Mitochondrien schichtweise der Außenmembran, dem Sarkolemm, der Zelle an. Sie sind mit den Mitochondrien, die zwischen dem Aktin-Myosin-System liegen, verbunden. So können die subsarkolemmal liegenden Mitochondrien Sauerstoff aus den Kapillaren aufnehmen und mittels der Atmungskette ein Membranpotential erzeugen, welches zu den Mitochondrien weitergeleitet wird, denen die Aufnahme von Sauerstoff durch die intrazelluläre Lage verwehrt ist. Hier wird das Membranpotential zur Gewinnung von ATP verwendet, welches dann direkt an den Aktin-Myosin-Komplex weitergegeben wird (Skulachev, 2001).

Darüberhinaus wirkt die Fusion von Mitochondrien der Zellalterung entgegen (Lenaz, 1998). Die Entstehung von Sauerstoffradikalen während des oxidativen Metabolismus der Mitochondrien schädigt das mitochondriale Genom, mitochondriale Proteine und die mitochondrialen Membranen (Raha *et al.*, 2000). Es kommt zu Veränderungen der Polypeptidketten der Atmungskettenenzyme und folglich zu einer Abnahme des Elektronentransfers, was wiederum zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen führt. Der Rückgang der Energieproduktion und der oxidative Stress werden als Ursache für Alterung und degenerative Erkrankungen angesehen (Raha *et al.*, 2000; Genova *et al.*, 2004). Durch Fusion der Mitochondrien kann eine Rekombination der mitochondrialen DNA stattfinden, wodurch das Auftreten von mit mitochondrialer DNA-Mutation assoziierten Erkrankungen reduziert wird (Nakada *et al.*, 2001). Außerdem können geschädigte Proteine durch die mitochondriale Fusion durch intakte Proteine ersetzt werden (Ono *et al.*, 2001). Bei der neurodegenerativen Parkinson-Erkrankung wurde kürzlich eine Mutation in einem mitochondrialen Protein, PINK1, nachgewiesen (Valente *et al.*, 2004). Man nimmt an, dass das PINK1-Protein einen protektiven Effekt für die Zelle hat, indem es die Zelle weniger empfindlich für oxidativen Stress macht.

Auch für die Apoptose ist die Teilung von Mitochondrien eine wichtige Voraussetzung (Susin *et al.*, 1998; Wang, 2001). Nach Aktivierung mehrerer Signalfaktoren kommt es während der Apoptose zur Fragmentierung der Mitochondrien durch Teilungsprozesse und schließlich zum Auftreten einzelner runder, punktförmiger Mitochondrien. Apoptose dient der Anpassung des Gewebes an wechselnde Belastungen, der Eliminierung von Zellen während der Embryonalentwicklung, von Tumorzellen und virusbefallener Zellen. Das Ausbleiben der Apoptose ist Mitursache für die Entstehung von Krebs und autoimmunen Erkrankungen. Bei der Apoptose spielt das in Säugetieren charakterisierte Drp1, ein mitochondriales Protein der Teilungsmaschinerie, eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass in Zellen, die ein mutiertes Drp1-Protein exprimieren, der apoptotische Zelluntergang inhibiert ist (Frank *et al.*, 2001). Sein Homologes in *S. cerevisiae* ist das Dnm1-Protein, welches als wichtige Komponente der mitochondrialen Teilung in Hefe charakterisiert ist (siehe 1.2.3).

Die medizinische Relevanz mitochondrialer Membranfusionen wird auch an der autosomal dominanten Optikusatrophie (adOA, Kjer-Typ) deutlich. Als geläufigste Form erblicher Optikus-Neuropathie kommt es durch den Untergang retinaler Ganglienzellen und Atrophie des *Nervus opticus* bei den betroffenen Patienten zur Erblindung. Bei der autosomal dominanten Optikusatrophie ist ein nukleäres Gen defekt, welches für das Opa1-Protein, ein Homologes des Mgm1-Protein in *S. cerevisiae*, kodiert (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2002). Eine verminderte Expression des Opa1-Proteins führt zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks, wie es auch bei der Deletion von *MGM1* in *S. cerevisiae* zu sehen ist (siehe 1.2.2). Es kommt zusätzlich zu einem Verlust des Membranpotentials und begleitend zu einer Desorganisation der Cristae (Olichon *et al.*, 2002). Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol, wodurch die Apoptose eingeleitet wird. Als pathophysiologischer Prozess der autosomal dominanten optischen Atrophie ist also ein fehlgeleiteter Zelltod denkbar. Warum nur retinale Ganglienzellen betroffen sind, bleibt noch unklar. Vermutet wurde, dass Opa1 vorwiegend in den retinalen Ganglienzellen exprimiert wird (Delettre *et al.*, 2001). Erst kürzlich wurde diese Theorie jedoch widerlegt, nachdem die Expression von Opa1 auch in den anderen Schichten der Netzhaut erfolgt (Aijaz *et al.*, 2004).

## 1.5 Andere mitochondriale Erkrankungen

Mitochondropathien sind Multisystemerkrankungen, da Mitochondrien Bestandteil aller Zellen sind. Allerdings sind klinisch meistens mitochondrienreiche Organe mit hohem Energiebedarf wie Muskelgewebe und Nervenzellen betroffen. Der Herzmuskel, die Skelettmuskulatur und das Gehirn sind die Gewebe des Körpers, die am empfindlichsten auf Veränderung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), durch die der größte Teil an synthetisiertem ATP bereitgestellt wird, reagieren (Bauer *et al.*, 1999; Wallace, 1999). Insgesamt zeigen mitochondriale Erkrankungen ein breites Spektrum an klinischen Symptomen: Myopathien, Paraplegien, Enzephalopathien, Ophthalmoplegie, Epilepsie, Demenz, Visusverlust, Hypakusis und viele andere mehr. Die jeweils phänotypische Ausprägung ist dabei höchst variabel. Sie reicht von einer milden Symptomatik bis zum letalen Ausgang.

Nicht alle mitochondrialen Erkrankungen zeigen ein morphologisches Korrelat im Sinne einer veränderten Morphologie der Mitochondrien. Bekannte, vererbte Erkrankungen, die auch die mitochondriale Morphologie betreffen, sind das MELAS- (Mitochondriale Myopathie, Enzephalopathie, Laktatazidose und schlaganfallähnliche Episoden) und das MERFF-Syndrom (Myoklonus-Epilepsie mit „ragged-red-Fasern“), welche durch Mutationen in der tRNA oder rRNA der Mitochondrien verursacht sind. Bei beiden Erkrankungen kommt es zur massiven Proliferation der Mitochondrien. Wird eine Muskelbiopsie eines Patienten mit MERFF- oder MELAS-Syndrom gefärbt, zeigt sich am Rand jeder Muskelfaser eine verstärkte Färbung aufgrund der enormen mitochondrialen Proliferation. Diese Muskelfasern werden als „ragged red fibers“ bezeichnet.

Umgekehrt können Erkrankungen, die primär nicht in die Funktion der Mitochondrien eingreifen, die Morphologie der Mitochondrien beeinträchtigen. So kommt es bei der Alzheimer-Erkrankung indirekt zu einer Schädigung der mitochondrialen Morphologie (Bonilla *et al.*, 1999; Eckert, *et al.*, 2003).

## 1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Das Verstehen der Prozesse, die nötig sind, um eine intakte Morphologie und Vererbung der Mitochondrien zu gewährleisten, bedarf der Identifizierung und Charakterisierung beteiligter Komponenten. Nach kompletter Sequenzierung des Hefegenoms und Herstellung einer

Deletionsmutanten-Bibliothek sind heute genomweite Screens auf der Suche nach Genen mit bestimmter Funktion möglich (Giaver *et al.*, 2002; Winzeler *et al.*, 1999). Im ersten Teil der Arbeit sollte durch das Screening einer Deletionsmutanten-Bibliothek, die sämtliche nicht-essentielle Gene der Hefe *S. cerevisiae* umfasst, nach neuen Mutanten gesucht werden, die Defekte in der mitochondrialen Verteilung und Morphologie zeigen. So sollten neue *MDM*-Gene (*mitochondrial distribution and morphology*) identifiziert werden (siehe 1.2.3).

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine der gefundenen Mutanten, die eine veränderte mitochondriale Morphologie zeigte, mittels biochemischer Verfahren und genetischer Methoden näher charakterisiert werden. Es wurde die  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante ausgewählt, da die fragmentierten Mitochondrien dieser Deletionsmutante daraufhin deuteten, dass diese Komponente bei der mitochondrialen Fusion eine wichtige Rolle spielen könnte.

Ob dem Mdm30-Protein eine Funktion als Schlüsselkomponente der Fusion zukommt, oder ob es nur als regulierender Faktor dient, sollte durch Analyse der Aminosäuresequenz und dadurch entdeckter Homologien zu anderen bekannten Proteinen geklärt werden.

Nachdem Mdm30 als F-Box-Protein erkannt wurde und F-Box-Proteine zum Teil im SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex für die Ubiquitinierung von Proteinen und damit direkt auch für deren Abbau zuständig sind, sollte untersucht werden, ob Mdm30 die Proteinmenge bekannter Fusions- bzw. Teilungskomponenten reguliert.

Ferner sollte die Lokalisation von Mdm30 in der Zelle aufgeklärt werden. Ist es wie andere F-Box-Proteine im Cytosol oder Kern lokalisiert, oder findet es sich noch in einer anderen zellulären Fraktion? Diese Frage ist insbesondere wegen der in der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante veränderten mitochondrialen Morphologie interessant. In diesem Zusammenhang wurde außerdem überprüft, ob neben Mitochondrien auch andere Organellen in ihrer Morphologie beeinträchtigt sind.

Um einen detaillierteren Einblick zu erhalten, inwieweit das Mdm30-Protein in die antagonistisch ablaufenden Prozesse der mitochondrialen Fusion und Teilung involviert ist, wurden Doppelmutanten mit bekannten bei der Fusion oder Teilung von Mitochondrien beteiligten Genen hergestellt. Hierbei wurde Dnm1 als Komponente der mitochondrialen Teilung und Fzo1 als Komponente der mitochondrialen Fusion ausgewählt. Der Wachstumsphänotyp und die mitochondriale Morphologie der Doppelmutanten sollten untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

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

### 2.1 Methoden der Molekularbiologie

(Sambrook *et al.*, 1989)

#### 2.1.1 Präparation von DNA

##### 2.1.1.1 Plasmidreinigung aus *E. coli*

(Birnboim und Doly, 1979)

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

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

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

### **2.1.1.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion**

DNA-Fragmente wurden durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase in einem programmierbaren Thermostaten vervielfältigt (Saiki *et al.*, 1988). Ein typischer Reaktionsansatz von 50 µl enthielt zusätzlich zu dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer 0,2 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate,  $10^5$  bis  $10^6$  DNA-Moleküle des Matrizenstranges, 10 bis 50 pmol Oligonukleotide und 2 U Pfu-DNA-Polymerase aus *Pyranococcus furiosus*. Das Gemisch wurde mit Mineralöl überschichtet und in einem programmierbaren Thermostaten inkubiert. Ein typischer Reaktionsablauf begann mit einer 4-minütigen Vorinkubation bei 95°C zur vollständigen Denaturierung der Matrizenstränge. Dann wurde eine Reaktionsfolge 20-30 mal wiederholt, die aus Denaturieren der DNA (30 s bei 95°C), Anlagern der Oligonukleotide (40 s bei 40 bis 50°C) und Synthese der DNA (2 min/kb bei 72°C) bestand. Schließlich wurde während einer 4-minütigen Nachinkubation bei 72°C die DNA-Synthese vervollständigt.

Die Bildung des amplifizierten Fragments wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert (2.1.3.1).

## **2.1.2 Enzymatische Modifikation von DNA**

### **2.1.2.1 Restriktionsverdau von DNA**

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

### **2.1.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Zur Dephosphorylierung der Enden von Vektor-DNA vor Ligationsreaktionen wurde Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm verwendet (Calf Intestine Phosphatase, CIP). Es wurden 5-10 µg DNA in 50 µl CIP-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM

ZnCl<sub>2</sub>; 10 mM Spermidin) mit 1 U Enzym bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurde abermals 1 U Enzym zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Bei glatten DNA-Enden, sog. blunt ends, erfolgte die 2. Inkubation bei 56°C. Um die Reaktion zu beenden, wurden 35 µl Wasser, 5 µl 10% SDS und 10 µl 10fach STE-Puffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,0; 1M NaCl; 10 mM EDTA) zugegeben. Nach Inaktivierung durch eine Inkubation für 20 min bei 75°C wurden die dephosphorylierten Vektoren nach Herstellerangabe mit Quiaquick®-Säulen von Quiagen isoliert.

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

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

## **2.1.3 Reinigung und Analyse von DNA**

### **2.1.3.1 Gelelektrophorese von DNA**

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

### **2.1.3.2 Isolierung von DNA 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 Quiaquick®-Säulen von Quiagen isoliert.

## 2.1.4 Transformation von Mikroorganismen

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

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

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

40 µl transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, zusammen mit der DNA (1-2 µl Ligationsansatz oder 1 ng Plasmid-DNA) in eine vorgekühlte Transformationsküvette (0,2 cm) gegeben und in einem Elektroporationsgerät durch einen Stromstoß transformiert (2,5 kV, 400  $\Sigma$ , 25  $\mu$ F, Zeitkonstante 8-9 ms). Anschließend wurde zu dem Ansatz 1 ml SOC-Medium gegeben, dieses dann 60 min bei 37°C geschüttelt, dann abzentrifugiert, in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und auf LB<sup>amp</sup>-Platten ausgestrichen. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.1.4.3 Verwendete Plasmide

#### a) Klonierungsstrategie des in dieser Arbeit hergestellten Plasmids zur Überexpression von Mdm30

pYES-MDM30 (diese Arbeit)

Das *MDM30*-Gen wurde durch PCR mit den Primern YLR368-orf-n und YLR368-orf-c aus genomischer DNA amplifiziert und über BamHI/KpnI-Schnittstellen in den Vektor pYES2 (Invitrogen, Groningen, Niederlande) kloniert. In dem fertigen Plasmid befindet sich die codierende Sequenz hinter einem *GAL*-Promotor. Als Selektionsmarker dient das *URA3*-Gen.

YLR368-orf-n: 5'-AAC CCA TGG GTA CCA TGA CAA AGA GGA GAA ACC TTC

YLR368-orf-c: 5'-AAA GGA TCC CTA TAA ATT ATG TAA AGG CTG TTC

**b) andere verwendete Plasmide**pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)

Zur Färbung von Mitochondrien wurde ein Fusionsprotein aus GFP und einer mitochondrialen Präsequenz der Untereinheit 9 des F<sub>0</sub>-Teils der mitochondrialen ATP-Synthase von *Neurospora crassa* verwendet, die das GFP zur mitochondrialen Matrix dirigiert. pVT100U-mtGFP verfügt über den konstitutiven ADH-Promotor.

pHS55 (Sesaki und Jensen, 2001)

Für Ugo1 gab es keinen Antikörper. Um die Proteinmenge von Ugo1 messen zu können, wurden der Wildtyp und die *r mdm30*-Mutante mit pHS55 transformiert. pHS55 ist ein single-copy-Plasmid mit einem CEN- und LEU2-Marker, welches für das Ugo1-Protein mit einem 3fachen Hämagglutinin-Epitop kodiert. Durch chromosomale Integration des linearisierten Vektors konnte der immunologische Nachweis mit einem gegen Hämagglutinin gerichteten Antikörper durchgeführt werden.

pFA6a-3HA-kanMX6 (Bähler *et al.*, 1998)

Um das Mdm30-Protein über ein HA-Epitop in der Zelle lokalisieren zu können, wurde von diesem Plasmid eine DNA-Sequenz amplifiziert, die für ein 3faches HA-Epitop (Hämagglutinin) und eine kanMX6 Transformationsmarker-Kassette kodiert. Nach Amplifizierung dieser Sequenz mittels PCR mit Primern, die eine Insertion in die genomische DNA am C-Terminus des *MDM30* ermöglichen, wurde das entstandene DNA-Fragment in Wildtyp-Hefezellen transformiert und über homologe Rekombination am C-Terminus des *MDM30*-Gens integriert. Die richtige Insertion wurde mittels PCR überprüft.

Folgende Primer wurden zur Amplifizierung des HA-Epitops verwendet:

5'-AGC TTT CCA ATC TAG CGA ATG ATG AAC AGC CTT TAC ATA ATT TAC GGA  
TCC CCG GGT TAA TTA A

5'-CGG GCT GAT AAA AAA AGG TGT AAT AGA ATG TGT CAG GAT GCT ACT  
GAA TTC GAG CTC GTT TAA AC

pWP1055 (Prinz *et al.*, 2000)

Zur Färbung des endoplasmatischen Retikulums wurde pWP1055 verwendet, welches für ein GFP mit Lokalisierungssequenzen für das endoplasmatische Retikulum kodiert. Die Expression des ss-GFP-HDEL erfolgte unter dem *MET25*-Promotor.

### YIp351-GAL10-HA-DHFR-TOM6 (Käser, 2001)

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von Mdm30 am Abbau von Außenmembranproteinen wurde dieses Plasmid verwendet, welches freundlicherweise von M. Käser zur Verfügung gestellt wurde. Es kodiert für das Außenmembranprotein Tom6, welches für einen immunologischen Nachweis mit einem Hämagglutinin-Epitop fusioniert ist. Die zu kodierende Sequenz befindet sich hinter einem *GAL*-Promotor.

## **2.2 Methoden der Hefegenetik**

(Sherman *et al.*, 1986; Rose *et al.*, 1990; Guthrie und Fink, 1991; Gietz *et al.*, 1992)

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

4

Das Standardmedium für die Kultivierung von *S. cerevisiae* war YPD. Zur Selektion auf mitochondriale Funktionen wurde YPG-Medium verwendet. Um die Expression von Genen zu induzieren, die hinter einen *GAL*-Promotor kloniert waren, wurde YPGal-Medium verwendet. Zur Selektion auf Auxotrophiemarker wurde SD-Medium verwendet, das den Selektionsbedingungen entsprechend supplementiert war. Zur Induktion der Sporulation wurden spezielle Sporulationsplatten verwendet. Die Standardtemperatur betrug 30°C. Flüssig-Kulturen wurden im Erlenmeyer-Kolben unter Schütteln (120 bis 160 rpm) inkubiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 2% Bacto-Agar zugesetzt. Für die Isolierung von Mitochondrien wurde Hefe in Laktat-Medium kultiviert. Atmungsdefiziente Hefestämmen wurden in Laktat-Medium mit 1% Galaktose oder in YPD-Medium kultiviert. Die Kultur wurde immer im logarithmischen Wachstum gehalten.

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

### **2.2.2 Transformation von *S. cerevisiae***

#### **2.2.2.1 Herstellung transformationskompetenter Hefezellen**

Hefestämmen wurden in einem Erlenmeyerkolben in 50 ml YPD-Medium unter Schütteln bei 30°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 angezogen. Anschließend wurden sie bei RT 3 min bei 1000 g abzentrifugiert, in 25 ml sterilem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die

isolierten Zellen wurden in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen, in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 s bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und zu je 50 µl aliquotiert.

### **2.2.2.2 Transformation von Hefe**

DNA (2 mg/ml) aus Lachsspermien wurde 5 min lang bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. 50 µl Suspension kompetenter Zellen wurden 5 min bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Den Hefezellen wurden folgende Substanzen zugegeben: 240 µl PEG 3350 (50% (v/v)), 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 gelöst war. Der Ansatz wurde 1 min lang kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 30 min bei 30°C inkubiert. Darauf folgte eine 20- bis 25-minütige Inkubation bei 42°C. Nun wurden die Hefezellen 15 s bei 8000 rpm abzentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Die Selektion transformierter Zellen erfolgte über Auxotrophiemarker auf SD-Platten oder über Geneticinresistenz auf YPD-Platten, die 500 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.

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

Die Genome einiger der verwendeten Hefestämme waren durch chromosomale Insertionen/Deletionen modifiziert worden, um Gene zu disruptieren oder Promotoren und zusätzliche Proteinabschnitte (Tags) einzufügen.

Zur Disruption von Genen im Hefegenom wurden eine Kassetten mit Genen für eine Kanamycinresistenz bzw. Enzyme der Histidinbiosynthese in das Hefegenom eingefügt. Die korrekte Integration der Markerkassette wurde mittels PCR kontrolliert. Dazu wurden Primer verwendet, die auf der 5' bzw. 3'-Seite des entsprechenden Genlokus hybridisieren. Es entstand ein Fragment, dessen Größe sich bei erfolgter Integration von dem des Wildtyp-Stammes unterschied. Dies wurde auf einem Agarosegel kontrolliert. Die PCR wurde mit einer kleinen Menge Hefezellen als DNA-Matrize durchgeführt. Die Anfangsinkubationszeit zur Denaturierung wurde auf 15 min erhöht.

#### **2.2.4 Kreuzung und Tetradenanalyse von *S. cerevisiae***

Zum Kreuzen wurden zwei Stämme entgegengesetzten Paarungstyps als Strich auf zwei getrennten YPD-Platten aufgetragen, über Nacht inkubiert, mit Samt über Kreuz auf eine neue YPD-Platte überstempelt, erneut inkubiert und auf Selektivmedium gestempelt. Das Selektivmedium wurde so gewählt, dass nur die diploiden Zellen der Kreuzungsstelle wachsen konnten. Diploide Zellen wurden anschließend auf Selektivmedium als Einzelkolonien ausgestrichen. Die Bestimmung des Paarungstyps wurde mithilfe von Teststämmen entgegengesetzten Paarungstyps durchgeführt. Dazu wurden die haploiden Stämme wie beschrieben mit den Teststämmen gekreuzt und auf Selektivmedium das Wachstum getestet.

Für die Tetradenanalyse wurden die diploiden Hefestämme auf sog. Sporulationsplatten, die relativ nährstoffarm sind, zur Sporulation angeregt. Die Platten wurden solange bei 30°C inkubiert, bis sich unter dem Mikroskop erkennbare Asci gebildet hatten. Diese besitzen eine Kapsel, die vor Trennung der Sporen mit Zymolyase entfernt wird. Dazu wurden die Zellen in Wasser aufgenommen und 10 min mit 250 µg/ml Zymolyase bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Asci mit einem Mikromanipulator aufgenommen. Die Sporen wurden getrennt und einzeln an definierte Positionen auf der Platte übertragen. Nachdem die Sporen zu Kolonien hochgewachsen waren, wurde der Phänotyp und die Aufspaltung von Auxotrophiemarkern auf selektiven Medien untersucht.

#### **2.2.5 Analyse des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae* (Tüpfeltest)**

Das Wachstum von *S. cerevisiae* wurde unter unterschiedlichen Bedingungen hinsichtlich der Kohlenstoffquelle und der Temperatur untersucht. Hefestämme wurden über 2 Tage in Flüssigmedium passagiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in Wasser zu einer OD<sub>578</sub> von 1 resuspendiert. Es wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt: 1; 0,1; 0,01; 0,001 OD<sub>578</sub>. Je 5 µl des Verdünnungsansatzes wurden auf zwei YPD- und YPG-Platten aufgetragen und bei 30°C bzw. 37°C für 2-3 Tage inkubiert.

## Verwendete Hefestämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Teil einer Sammlung von Hefestämmen durchmustert. Diese Hefe-Bibliothek bestand aus 4794 homozygoten, diploiden Deletionsmutanten und war das Resultat einer weltweiten Kooperation von Hefelabors (Giaever *et al.*, 2002; Winzeler *et al.*, 1999). Eine Auflistung sämtlicher Stämme befindet sich auf der Webpage der Firma Research Genetics ([ftp.resgen.com/pub/deletions/Homo\\_diploids\\_061101.txt](ftp.resgen.com/pub/deletions/Homo_diploids_061101.txt)).

Für weitere Untersuchungen der Deletionsmutanten der Hefe-Bibliothek wurden die haploiden Stämme der Stammsammlung EUROSCARF verwendet (<http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>). Eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Stämme und ihrer Genotypen findet sich in der folgenden Tabelle.

**Tabelle 1: Die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Hefestämme**  
Eckige Klammern zeigen Gene auf Plasmiden an.

Stamm	Genotyp	Referenz
BY4743	<i>MATa/a, his3/his3, leu2/leu2, ura3/ura3, met15/MET15, lys2/LYS2</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002; Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4742	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002; Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4741	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002; Brachmann <i>et al.</i> , 1998
◻ <i>mdm30</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ylr368w::Kanr</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002 EUROSCARF
◻ <i>fzo1</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, fzo1::Kanr</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002 EUROSCARF
◻ <i>dnm1</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, dnm1::Kanr</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002 EUROSCARF
◻ <i>mdm30-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ylr368w::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit,
◻ <i>mdm35-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ykl053c-a::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit,
◻ <i>fzo1-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, fzo1::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit
◻ <i>dnm1-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, dnm1::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit
◻ <i>mdm30/◻ fzo1-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, ura3, fzo1::Kanr, ylr368w::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit
◻ <i>mdm30/◻ dnm1-GFP</i>	<i>MATa, his3, leu2, ura3, dnm1::Kanr, ylr368w::Kanr [URA3/mtGFP]</i>	diese Arbeit
BY4742 mit <i>pYES-MDM30</i>	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3 [pYES-MDM30]</i>	diese Arbeit
BY4741 mit <i>pWP1055</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3 [pWP1055]</i>	diese Arbeit
◻ <i>mdm30</i> mit <i>pWP1055</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ylr368w::Kanr [pWP1055]</i>	diese Arbeit
BY4741 mit <i>pHS55</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3 [pHS55]</i>	diese Arbeit
◻ <i>mdm30</i> mit <i>pHS55</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ylr368w::Kanr [pHS55]</i>	diese Arbeit
3 Hämagglutinin epitope (aus <i>pFA6a-3HA kanMX6</i> ) chromosomal integriert hinter <i>MDM30</i> in BY4742	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3</i>	diese Arbeit
BY4741 mit <i>YIp351-GAL10-HA-DHFR-TOM6</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3 [YIp351-GAL10-HA-DHFR-TOM6]</i>	diese Arbeit
◻ <i>mdm30</i> mit <i>YIp351-GAL10-HA-DHFR-TOM6</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, ylr368w::Kanr [YIp351-GAL10-HA-DHFR-TOM6]</i>	diese Arbeit

## 2.3 Methoden der Zellbiologie

### 2.3.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe

1 ml einer Flüssigkultur mit einer  $OD_{578}$  von 0,2 wurde in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und in 200  $\mu$ l SDS-Probenpuffer aufgenommen. Im Anschluß wurden dem Ansatz 40-100  $\mu$ l Glaskügelchen ( $\varnothing$  0,3 mm) zugegeben. Dann wurde das Reaktionsgefäß 20 s gevortext, 5 min auf 95°C erhitzt, nochmals gevortext und erhitzt und schließlich 10  $\mu$ l pro Spur für eine SDS-PAGE (2.4.3) eingesetzt.

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

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

Um die Zellen in Sphäroblasten zu verwandeln, wurden sie in 7 ml/g 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 mit 3 mg/g Zymolyase resuspendiert und 30 bis 60 min bei 30°C geschüttelt. Die Bildung von Sphäroblasten wurde nach 30 min durch osmotische Lyse in Wasser kontrolliert. Dafür wurden 20  $\mu$ l Zellsuspension in 1 ml Wasser gegeben und das Klarwerden der Suspension beobachtet. Wurde die Suspension klar, war die Zymolyasebehandlung ausreichend. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Geräten. Die Sphäroblasten wurden bei 2°C durch Zentrifugation (s.o.) geerntet und mit 40 bis 100 ml 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 gewaschen.

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

und vorsichtig in 0,25 bis 1 ml 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4 resuspendiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.4.2), und die Mitochondrien wurden mit 10 mg/ml fettsäurefreiem BSA in 20 bis 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse der Morphologie der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums, des Aktincytoskeletts und der Vakuolen erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Die Mitochondrien wurden mit fluoreszierenden Proteinen oder Farbstoffen sichtbar gemacht (Westermann und Neupert, 2000; Dimmer *et al.*, 2002; siehe 2.3.4). Als Farbstoff für Mitochondrien wurde Rhodamin B Hexylester verwendet, als fluoreszierendes Protein ein GFP-Fusionsprotein, welches eine mitochondriale Targetingsequenz enthielt (siehe 2.1.5). Zur Untersuchung des endoplasmatischen Retikulums wurde ein Plasmid, welches ein GFP-Fusionsprotein mit einer ER-Targetingsequenz enthält, verwendet (siehe 2.1.5). Die Vakuolen wurden mit 5-(und-6)-carboxy-2'-7'-dichlorofluoresceindiacetat (DCFDA, Molecular Probes) gefärbt. Das Aktincytoskelett wurde mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht (Amberg, 1998).

Für die Analyse mit dem Mikroskop wurde eine Zellsuspension durch Zugabe von 0,5% (m/v) Low Melting Point Agarose auf dem Objektträger fixiert. Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen wurden mit einem Axioplan Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 100x/1,30 Öl-Objektiv (Carl Zeiss, Jena GmbH) erstellt. Es wurde eine 100 W Quecksilberlampe verwendet. Für die Analyse von mtGFP wurde Filtersatz No. 09 verwendet (Anregung: 450 bis 490 nm, Emission: >515 nm) (Heim und Tsien, 1996). Für Rhodamin B Hexylester wurde Filtersatz No. 15 verwendet (Anregung: 534 bis 558 nm, Emission: >590 nm).

Zur Untersuchung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums mit GFP wurden die Hefezellen in YPD-Medium bzw. Methionin-freiem Medium zur Selektion auf das Plasmid pWP1055 zu einer OD<sub>578</sub> von 0,3 bis 0,7 angezogen und wie oben beschrieben analysiert. Zur Untersuchung der Mitochondrien mit Rhodamin B Hexylester wurden die Hefezellen in YPD-Medium zu einer OD<sub>578</sub> von 0,3 bis 0,7 angezogen und wie unter 2.3.4 beschrieben untersucht.

Zur Untersuchung der Vakuolen wurden Zellen in YPD-Medium bis zu einer  $OD_{578}$  von 0,3 bis 0,7 angezogen. Nach Zentrifugation der Zellen wurden  $10^6$  Zellen/ml in 50 mM Natriumcitrat-Pufferlösung (pH 5; 2% Glucose) resuspendiert. Anschließend wurde der in DMSO gelöste Farbstoff DCFDA in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M zugegeben. Die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch wie oben beschrieben untersucht.

Zur Untersuchung des Aktincytoskeletts wurden Zellen in 25 ml YPD-Medium bis zu einer  $OD_{578}$  von 0,3 bis 0,7 angezogen und durch Zugabe von 4% Formaldehyd fixiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in PBS (4% Formaldehyd) resuspendiert und für eine Stunde bei 25°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 500  $\mu$ l PBS resuspendiert. Zu je 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden 10  $\mu$ l Rhodamin-Phalloidin hinzugegeben. Der Farbstoff war nach Anweisung des Herstellers mit Methanol versetzt (Molecular Probes, Eugene, OR). Die Zellen wurden für eine Stunde im Dunkeln inkubiert, mehrmals gewaschen und anschließend fluoreszenzmikroskopisch wie oben beschrieben untersucht.

### **2.3.4 Durchmusterung einer Hefestammsammlung nach Mutanten mitochondrialer Morphologie**

Für die Identifizierung von Mutanten mit veränderter mitochondrialer Form wurden 0,5 ml flüssiges YPD-Medium mit einer Hefekolonie beimpft. Dazu wurde die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von einer YPG-Platte, die *petite*-Mutanten von einer YPD-Platte in ein Kulturröhrchen überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C im Schüttler wurden die Kulturen mit 3 ml YPD verdünnt, um ein logarithmisches Wachstum zu garantieren. Nach weiteren 3 h Schütteln wurden die Mitochondrien durch Zugabe von 0,1  $\mu$ M Rhodamin B Hexylester und 15 minütiger Inkubation bei RT im Drehrad gefärbt. Die Analyse der gefärbten Mitochondrien erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (2.3.3).

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 bei einer dritten Durchmusterung mit dem Plasmid pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) transformiert. Die transformierten Mutanten wurden in YPD-Medium angezogen und mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die Gendisruption von Mutanten mit eindeutig veränderter Form wurde mittels PCR überprüft. Der mitochondriale Phänotyp wurde im genetischen Hintergrund der haploiden Stämme von EUROSCARF nochmals durch Anfärben mit Rhodamin B Hexylester und Transformation mit pVT100U-mtGFP getestet.

## **2.4 Methoden der Proteinbiochemie**

### **2.4.1 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure**

Proteine wurden durch Zugabe von TCA (10% (m/v) Endkonzentration) und einer Inkubation von mindestens 20 min auf Eis ausgefällt. Die Proben wurden im Anschluss daran 20 min bei 2°C bei 30.000 g abzentrifugiert, ein- bis zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen und nach dem Trocknen bei 37°C in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

### **2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

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

### **2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

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

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

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

#### **2.4.4 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose**

Proteine, die durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.4.3) aufgetrennt worden waren, wurden nach der von Towbin (Towbin *et al.*, 1979) beschriebenen Methode elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Membran und das Gel wurden zwischen mehrere mit Blotpuffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,05% SDS) getränkte Whatman-3MM-Filterpapiere gelegt und zwischen zwei Graphitelektroden eingeklemmt. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 1 mA/cm<sup>2</sup>. Anschließend wurden die Proteine durch Anfärben mit Ponceau S (0,2% in 3% TCA) sichtbar gemacht.

#### **2.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen**

Die Nitrozellulose-Membran mit den darauf übertragenen Proteinen wurde für 30 min mit 5% Magermilchpulver in TBS (9 g/l NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) abgesättigt. Die Immundekoration erfolgte für eine Stunde mit spezifischen Antiseren, die 1:200 bis 1:5000 in Milchpulver/TBS verdünnt waren. Die Antiseren stammten aus der Seren-Sammlung des Neupert-Labors. Im Anschluss an die Immundekoration wurden die Nitrozellulose-

Membranen dreimal gewaschen: 10 min in TBS-Puffer, 10 min in TBS-Puffer mit 0,05% (v/v) TritonX-100 und wieder 10 min in TBS-Puffer. Um die gebundenen Antikörper nachzuweisen, wurden sekundäre Antikörper der Maus verwendet, welche gegen IgG von Kaninchen gerichtet sind. Diese waren mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und wurden in einer Konzentration von 1:10.000 in TBS-Puffer verwendet. Die Inkubation dauerte 1 h. Nach anschließendem Waschen (s.o.) wurde die Peroxidase mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham) nachgewiesen. Die Membranen wurden mit der Lumineszenz-Lösung inkubiert und 1 s bis 10 min auf Röntgenfilmen exponiert.

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

Für die Immundekoration des Hämagglutinin-Epitops (HA) wurde ein monoklonaler Antikörper 12CA5 der Firma Roche verwendet (Roche, Mannheim, Deutschland). Die verwendeten sekundären Antikörper waren gegen IgG der Maus gerichtet.

## 2.5 Puffer und Medien

**Importpuffer:** 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2; 0,5 M Sorbitol; 80 mM Kaliumchlorid; 10 mM Magnesiumacetat; 2 mM Kaliumphosphat, pH 7,4; 1 mM Manganchlorid; 3% (m/v) BSA (fettsäurefrei).

**Laktat-Medium:** 3 g Hefeextrakt, 1 g Glucose, 1 g K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0,5 g NaCl, 1,1 g MgSO<sub>4</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 0,3 ml 1% FeCl<sub>3</sub>, 22 ml 90% Milchsäure, H<sub>2</sub>O dest. ad 1 l, pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen.

**LB-Medium:** 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid; für LB<sup>Amp</sup> wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

**LB-Platten:** 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Natriumchlorid; 1,5% (m/v) Agar. Für LB<sup>Amp</sup>-Platten wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

**PBS-Puffer:** 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4; 1 % NaCl.

**S-Medium:** 1,7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, 5 g Ammoniumsulfat, H<sub>2</sub>O dest. ad 900 ml, nach dem Autoklavieren: Zugabe von 100 ml 20% Galaktose (SGal) oder + 100 ml 20% Glucose (SD) oder + 100 ml 20% Raffinose (SR). Von den Stammlösungen der Markersubstanzen wurden unter Berücksichtigung der zu selektierenden Auxotrophiemarker 2 ml Tryptophan und Histidin, bzw. 3 ml Leucin und Lysin (Stammlösung 10 g/l), sowie je 10 ml Adenin- und Uracil-Lösung (Stammlösung 2 g/l) pro Liter Medium zugesetzt.

**SDS-Probenpuffer:** 2% (m/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerin; 0,02% (m/v) Bromphenolblau.

**SEM-Puffer:** 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 10 mM MOPS/KOH, pH 7,4.

**SEMK-Puffer:** SEM-Puffer mit 80 mM KCl.

**SOB-Medium:** 20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,58 g/l Natriumchlorid; 0,19 g/l Kaliumchlorid.

**SOC-Medium:** SOB-Medium mit 20 mM Glucose und 10 mM Magnesiumchlorid.

**Sporulationsplatten:** 1% (m/v) Kaliumacetat; 2% (m/v) Agarose; mit ¼ der für S-Medium angegebenen Menge von Aminosäuren supplementiert.

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

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

**YP-Medium:** 10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, H<sub>2</sub>O dest. ad 900 ml, nach dem Autoklavieren: + 100 ml 20% Galaktose (YPGal) oder + 100 ml 20% Glucose (YPD) oder + 100 ml 30% Glycerin (YPG).

**YPD-G418-Platten:** 2% (m/v) Hefeextrakt; 4% (m/v) Pepton; 2% (m/v) Agar; mit HCl, pH 5 einstellen; autoklavieren; auf unter 65°C abkühlen lassen; in Wasser vorgelöstes G418 ad 500 mg/l und Glucose ad 2% (m/v) zugeben.

## 2.6 Chemikalien und Geräte

### 2.6.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

*Agfa-Gevaert, München*: Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme  
*ARK-Sigma, Darmstadt*: Oligonukleotide  
*Amersham-Buchler, Braunschweig*: ECL-Immunoblot-Detektionssystem  
*Biometra, Göttingen*: Reagenzien für Polymerase-Kettenreaktion (PrimeZyme.)  
*Biorad, München*: Reagenzien zur Proteinbestimmung, Anti-Kaninchen-IgG-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase  
*Boehringer, Mannheim*: dNTPs, Ethidiumbromid, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, NTPs, Proteinase K, Restriktionsenzyme, Tris  
*Braun, Melsungen*: Kanülen, Spritzen  
*Clontech, Heidelberg*: *E. coli*-Stämme  
*DIFCO, Detroit, USA*: Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt  
*EUROSCARF, Frankfurt*: Hefestämme  
*Fluka, Buchs, Schweiz*: Trichloressigsäure  
*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  
*Kodak, München*: Röntgenfilme X-Omat MD  
*Molecular Probes, Eugene, USA*: Rhodamin B Hexylester  
*Nestlé-Alete, München*: Magermilchpulver  
*NEB, Schwalbach*: Restriktionsenzyme  
*Qiagen, Homburg*: Gel Extraction Kit., *E. coli* XL1-Blue  
*Research Genetics, Huntsville, USA*: Hefestammsammlung  
*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, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Ponceau S, Raffinose, Saccharose, SDS, Spermidin, TEMED  
*Sigma, München*: Aminosäuren, Ammoniumperoxodisulfat, BSA (fettsäurefrei), Glycerin, Lachsspermien-DNA, β-Mercaptoethanol, Mineralöl; Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE, PMSF, Triton X-100, Valinomycin A  
*United States Biochemical, Cleveland, USA*: Pepton, Trypton, Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)  
*Whatman, Maidstone, England*: DE52-Zellulose  
 Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

## 2.6.2 Geräte

*Abimed, Düsseldorf:* Kolbenhubpipetten

*Agfa-Gevaert, München:* Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Gevamic. 60

*Appligene, Heidelberg:* Imaging-System The ImagerTM

*Carl Zeiss, Jena GmbH:* Axioplan Fluoreszenzmikroskop

*Beckman, München:* Kühlzentrifuge J2-21 und Ultrazentrifugen Optima TLX und Optima MX-E, L8-50M/E und L8-M, Rotoren, Zentrifugationsröhrchen

*Bender und Hobein, München:* Vortex-Mixer

*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

*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, für die mitochondriale Morphologie in Hefe relevanter Gene durch einen genomweiten Screen

#### 3.1.1 Strategie

*MDM*-Gene kodieren für Proteine, die für eine Wildtyp-ähnliche Verteilung und Morphologie der Mitochondrien benötigt werden. Wie in Abbildung 2 dargestellt, sind eine Reihe von *MDM*-Genen identifiziert, die eine wichtige Rolle bei der Fusion und Teilung der Mitochondrien spielen. Um die Dynamik der Mitochondrien auf molekularer Ebene besser zu verstehen, galt es, nach neuen *MDM*-Genen zu suchen, die Einfluss auf die mitochondriale Morphologie nehmen. Zu diesem Zweck wurde eine Sammlung von Deletionsmutanten nicht-essentieller Hefegene analysiert (Giaver *et al.*, 2002; Winzeler *et al.*, 1999) und nach Deletionsmutanten gesucht, die eine veränderte mitochondriale Morphologie aufweisen. Diese Sammlung umfasst 4794 Deletionsmutanten, weil rund 20% der ca. 6300 Gene der Hefe *S. cerevisiae* essentiell sind.

Führt der Verlust einer wichtigen Komponente zu einer veränderten mitochondrialen Morphologie, so sollte im Fall von Fusionskomponenten das schlauchförmige, mitochondriale Netzwerk fragmentieren. Bei Defekten der an der Teilung mitwirkenden Proteine sollten die Mitochondrien netzartige, ringförmige Gebilde formen, die sich in einer Zellhälfte ansammeln.

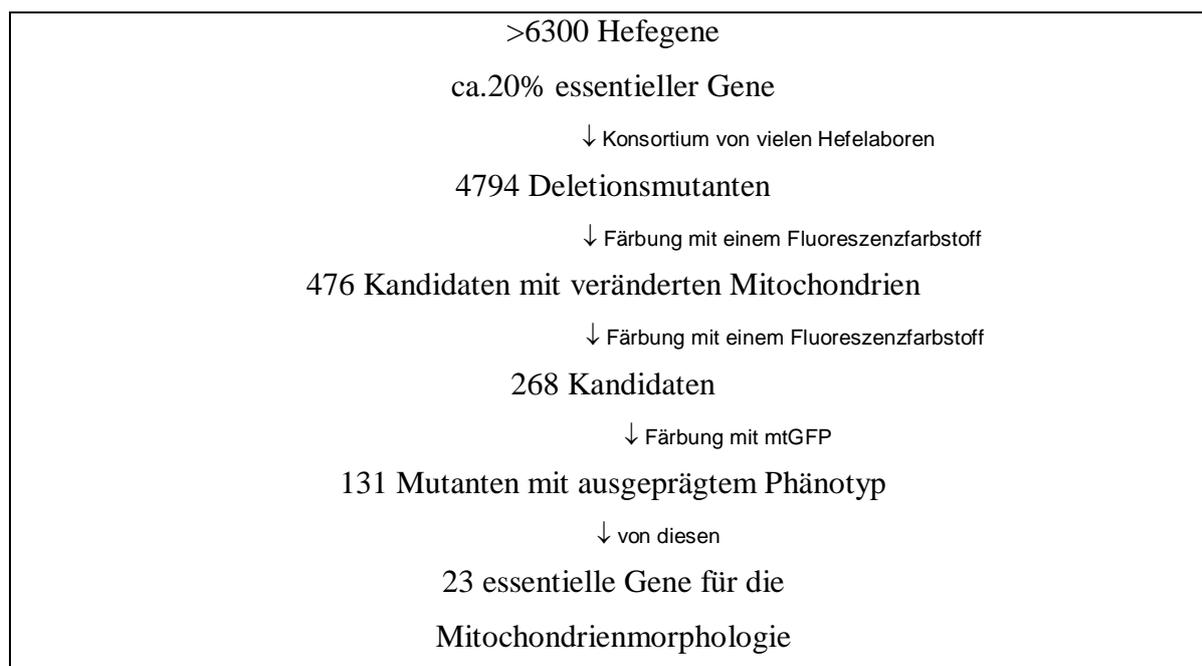
#### 3.1.2 Durchführung

In einem gemeinsamen Projekt mit anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe wurde jeder einzelne Stamm der Deletionsmutanten-Bibliothek mit einem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff angefärbt und mikroskopisch analysiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden rund 900 Stämme untersucht. Dabei wurden die in Mikrotiterplatten vorliegenden Deletionsstämme auf YPD-Platten übertragen und angezchtet. Nach 2-3 Tagen wurden von jedem Stamm Flüssigkulturen in 0,5 ml YPD-Medium angelegt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Stämme am nächsten Tag mit

3 ml YPD verdünnt und in der logarithmischen Wachstumsphase untersucht. Dazu wurden die Zellen nach Zugabe von 0,1  $\mu$ M Rhodamin B Hexylester 15 min im Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde eine Zellsuspension auf einen Objektträger aufgebracht und mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden Mutanten mit ungewöhnlicher Mitochondrienform identifiziert (Tabelle 2; Dimmer *et al.*, 2002). Als Kontrolle diente der isogene Wildtyp-Hefestamm.

Von den untersuchten Deletionsmutanten zeigten ca. 10 % eine auffällige mitochondriale Morphologie, allerdings zeigte ein Großteil der untersuchten Zellen dieser Stämme auch noch wildtypartige Mitochondrien. Als auffällig wurden auch Mutantenstämmen klassifiziert, die keinerlei mitochondriale Färbung zeigten. Diesen Stämmen fehlt das Membranpotential der Mitochondrien, welches für die Aufnahme von Rhodamin B in die Mitochondrien benötigt wird. Um eine engere Auswahl zu treffen, welche Stämme eine deutlich veränderte mitochondriale Morphologie aufweisen, wurden die 10 % der aus der ersten Runde des Screenings auffällig gewordenen Stämme nochmals mit Rhodamin B gefärbt. Hierbei reduzierte sich die Zahl der auffälligen Stämme um die Hälfte. Bei diesen Stämmen zeigten sich eindeutig veränderte Mitochondrien, allerdings zeigte sich auch hier noch in geringem Anteil eine dem Wildtyp-ähnliche mitochondriale Morphologie. Um jetzt auch die bislang nicht gefärbten Stämme untersuchen zu können, wurden alle auffälligen und alle nicht anfärbbaren Stämme mit einem mtGFP-exprimierenden Plasmid transformiert. Nach dem Screening der mit mtGFP gefärbten Stämme waren es wieder rund die Hälfte der Vorrunde, die einen ausgeprägten mitochondrialen Phänotyp zeigten. Es fanden sich unter diesen Mutanten 20%, deren Phänotyp so ausgeprägt war, dass das hier deletierte Gen essentiell für die mitochondriale Morphologie sein muss. Diese Stämme zeigten nie eine dem Wildtyp ähnliche mitochondriale Morphologie.



**Abb. 4: Der Ablauf des genomweiten Screens zur Beantwortung der Frage, welche Gene essentiell für eine intakte Mitochondrienmorphologie sind.**

Die Zahlen beziehen sich auf den gesamten Screen, der von allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. Insgesamt wurden 4794 Deletionsmutanten mikroskopisch auf die mitochondriale Morphologie hin untersucht. Die Pfeile kennzeichnen eine erneute Durchmusterung der übriggebliebenen Mutantenstämme.

### 3.1.3 Ergebnis

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

Zur Klasse I gehören sieben bekannte Gene, deren Produkte als Schlüsselkomponenten der mitochondrialen Morphologie gelten und die im Verlauf des Screens wiedergefunden wurden. Hierzu zählen *DNM1*, *FIS1*, *MDM10*, *MDM12*, *MDV1*, *MGMI* und *MMM1*. Zehn neue, bislang unbekannte als *MDM30-39* benannte Gene, welche essentiell für eine intakte Mitochondrienmorphologie sind, wurden insgesamt identifiziert (Dimmer *et al.*, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *MDM35* und *NUM1* als

Klasse-I-Gen identifiziert. Die Komponente Mdm35, deren Proteinsequenz hoch konserviert ist, besitzt keine typischen mitochondrialen Präsequenzen oder Transmembrandomänen. Die *rmdm35*-Deletionsmutante zeigt sphärische Mitochondrien (Abb. 5B). Die Funktion des Proteins ist bislang unbekannt. Bei der Komponente Num1 zeigen sich höchstgradig aggregierte Mitochondrien (Abb. 5C). Num1 ist ein mit dem Zellkortex assoziiertes Protein, welches an der Wanderung des Zellkerns bei der Zellteilung beteiligt ist (Kormanec *et al.*, 1991; Heil-Chapdelaine *et al.*, 2000). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kommt dem Num1-Protein eine weitere wichtige Funktion in der Verteilung und Morphologie von Mitochondrien zu.

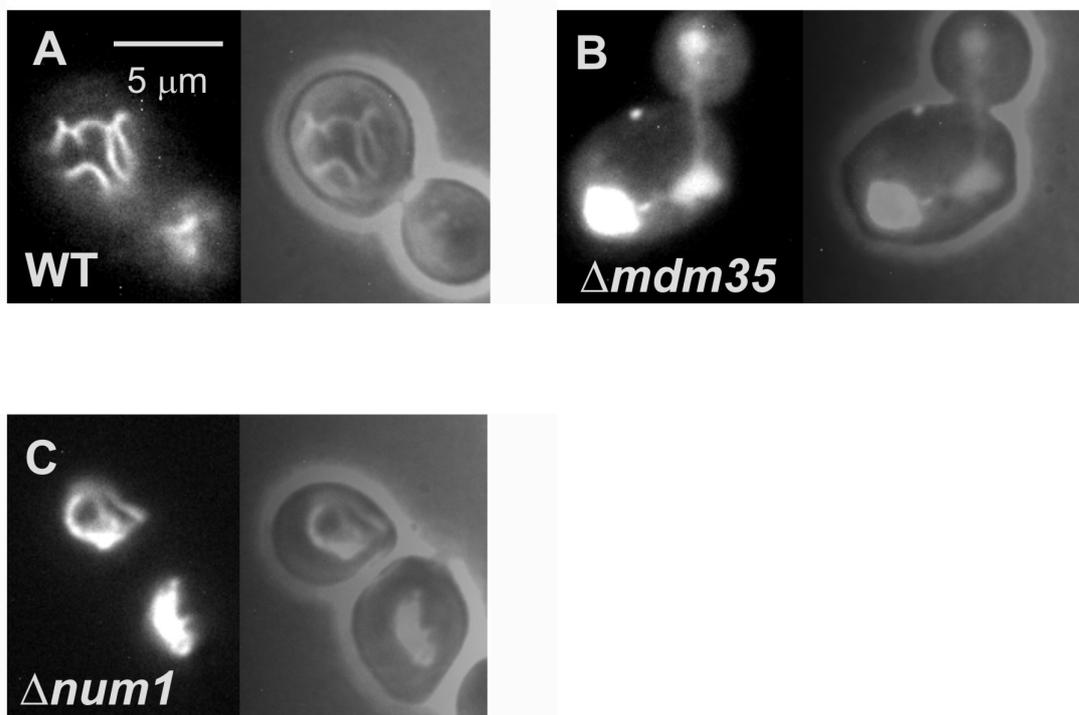
Mutanten der Klasse II sind atemungskompetent. Zu dieser Klasse gehören Stämme, deren mitochondriale Form nur unter bestimmten Bedingungen verändert ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hefemutante mit Deletion des *NUP170*-Gens als Klasse II definiert. Das Nup170-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Trennung der Chromosomen (Kerscher *et al.*, 2001).

Mutanten der Klasse III zeigen neben einem Defekt der mitochondrialen Form einen *petite*-Phänotyp. *Petite*-Stämme haben häufig eine veränderte Innenmembranstruktur, die sich im Verlust ihrer Cristae äußert (Pon und Schatz, 1991). Da die mitochondriale Morphogenese in direktem Zusammenhang mit der Verbindung zwischen Außen- und Innenmembran steht (Aiken Hobbs *et al.*, 2001; Fritz *et al.*, 2001), ist es vorstellbar, dass sich Veränderungen der Innenmembranstruktur auf die Gesamtstruktur des Organells auswirken. Die in dieser Arbeit identifizierten Mutanten der Klasse III sind eine mitochondriale tRNA-Synthetase, Ycr024C, und eine Oxacylreductase, Oar1.

**Tabelle 2: Bei der Untersuchung der Hefebibliothek identifizierte Gene, die wichtig für eine wildtypartige mitochondriale Morphologie und Vererbung sind.**

Die hier aufgeführten Gene wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu identifiziert. Die vollständige Liste mit allen Mutanten befindet sich in Dimmer *et al.*, 2002. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *MDM35* und *NUM1* als Klasse I-Gene, *NUP170* als Klasse II-Gen und *YCR024C* und *OAR1* als Klasse III-Gen identifiziert. In der rechten Spalte ist eine kurze Beschreibung der Funktion der Proteine aufgeführt. Die dazugehörigen Referenzen sind im Text angegeben.

Systematische/gängige Bezeichnung des Gens	Klasse	Funktion des Proteins
<i>YDR150W / NUM1</i>	<b>I</b>	<i>nukleärer Migrationsfaktor</i>
<i>YKL053C-A / MDM35</i>	<b>I</b>	<i>unbekannte Funktion</i>
<i>YBL079W / NUP 170</i>	<b>II</b>	<i>nukleäres Porenprotein</i>
<i>YCR024C</i>	<b>III</b>	<i>mitochondriale tRNA-Synthetase</i>
<i>YKL055C / OAR1</i>	<b>III</b>	<i>Oxoacylreductase</i>



**Abb. 5: Die mitochondriale Morphologie der neu identifizierten *mdm*-Mutanten  $\Delta$  *mdm35* und der  $\Delta$  *num1*-Mutante.**

Der Wildtyp (A), die  $\Delta$  *mdm35*-Mutante (B) und die  $\Delta$  *num1*-Mutante (C) wurden mit einem mtGFP-exprimierenden Plasmid transformiert und in YPD-Medium bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Die Analyse der mitochondrialen Morphologie erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Links ist die mitochondriale Struktur abgebildet; rechts eine Überlagerung mit der dazugehörigen Phasenkontrastaufnahme.

## 3.2 Charakterisierung von *MDM30*, einem für die Morphologie der Mitochondrien in Hefe wichtigen Gen

### 3.2.1 Mdm30 ist ein F-Box-Protein

Im Rahmen des genomweiten Screens nach mitochondrialen Morphologiemutanten wurde Mdm30, dessen systematischer Name Ylr368w ist, identifiziert (Dimmer *et al.*, 2002; Stefan Fritz, pers. Mitteilung). Mdm30 ist ein Protein aus 598 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 66 kDa. Mdm30 besitzt ein F-Box-Motiv am N-Terminus und gehört demnach zur Gruppe der F-Box-Proteine, deren Funktion die Bindung von Substratproteinen an den SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex ist (Patton *et al.*, 1998; Skowyra *et al.*, 1997). Im Hefe Two-Hybrid System interagiert Mdm30 mit Cdc53 (Cullin) und Skp1, beides Komponenten des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (Uetz *et al.*, 2000). Somit könnte Mdm30 eine Rolle bei der Ubiquitinierung und dem Abbau von Proteinen zukommen (siehe 3.2.9). Außer diesem Motiv findet sich keine Übereinstimmung mit einer anderen Proteinsequenz aus der Datenbank.

### Mdm30(16-59)

**I**DH**L**P**P**E**I**W**L**C**I**S**K**L**V**G**T**S**D**I**H**N**L**C**L**I**N**R**R**L**Y**L**T****I**T**S**D**E**I**W**K**R**R

L**S**x**L**P**x**E**I**L**x**K**I**L**S**Y**L**D**x**x**D**I**L**x**I**x**x**V**C**K**R**W**x**L**I**D**D**D**x**L**W**K**x**L  
**I**T V DLI RVF H**V**E EIV V S**R**K**F**R I**A**E**E**E V**F**Q A  
A F VV NLI KIP SVI I **N** **I**N VL**S**S**S** **I**YR V  
V M Q NA T A K **V****I** T FLN F  
F RF Y M  
W

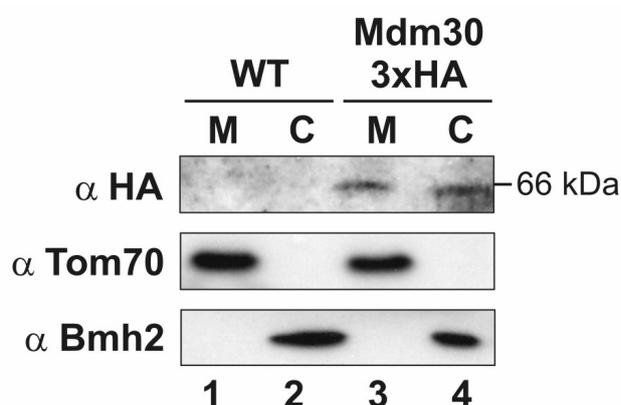
### Consensus

#### Abb. 6: Das F-Box-Motiv von Mdm30 im Aminosäuresequenzvergleich.

Das Alignment des F-Box-Motiv von Mdm30 zeigt strukturelle Ähnlichkeit mit der F-Box-Konsensussequenz nach Patton *et al.*, 1998. Übereinstimmende Aminosäuren sind schwarz unterlegt.

### 3.2.2 Mdm30 ist zum Teil mit Mitochondrien assoziiert

Da F-Box-Proteine häufig im Kern oder im Cytosol gefunden wurden (Cenciarelli *et al.*, 1999; Winston *et al.*, 1999), stellte sich die Frage nach der Lokalisation des Mdm30-Proteins in der Zelle. Um einen immunologischen Nachweis mit einem Antikörper durchführen zu können, wurde ein Stamm konstruiert, der ein Fusionsprotein aus Mdm30 und 3 Hämagglutinin-Epitopen (HA) exprimiert. Nach Amplifizierung des 3fachen HA-Epitops von einem Plasmid wurde die das HA-Epitop-kodierende DNA-Sequenz mittels homologer Rekombination an die den C-terminus-kodierende DNA-Sequenz des *MDM30* angehängt. Die richtige Insertion wurde mittels PCR überprüft. Mdm30-3xHA-Zellen wurden in YPD-Flüssigmedium kultiviert und in Cytosol und Mitochondrien fraktioniert. Die Proben wurden mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Hämagglutinin untersucht. Als Kontrolle dienten Antikörper gegen bekannte Proteine der verschiedene subzellulären Fraktionen: Tom70 (Mitochondrien) und Bmh2 (Cytosol). Mdm30-3xHA wurde im Cytoplasma und in der gereinigten Mitochondrienfraktion nachgewiesen (Abbildung 7). Demnach ist ein Teil der Mdm30-Fraktion mit Mitochondrien assoziiert, der andere Teil befindet sich im Cytosol.



#### Abb. 7: Das Mdm30-Protein ist zum Teil mit Mitochondrien assoziiert.

Wildtyp-Hefezellen (WT, Spuren 1 und 2) und Hefezellen, die ein Fusionsprotein aus Mdm30 und 3 Epitopen des Hämagglutinins (HA) exprimieren (Mdm30 3xHA, Spuren 3 und 4), wurden in Cytosol und Mitochondrien fraktioniert. Anschließend wurden die Proteine (50  $\mu$ g von jeder Fraktion) durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mittels Antikörpern immunodekoriert. Als Marker für die Mitochondrienfraktion wurde Tom70, welches ein integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran ist, verwendet. Für das Cytosol wurde Bmh2 verwendet. M, Mitochondrien (Spuren 1 und 3); C, Cytosol (Spur 2 und 4).

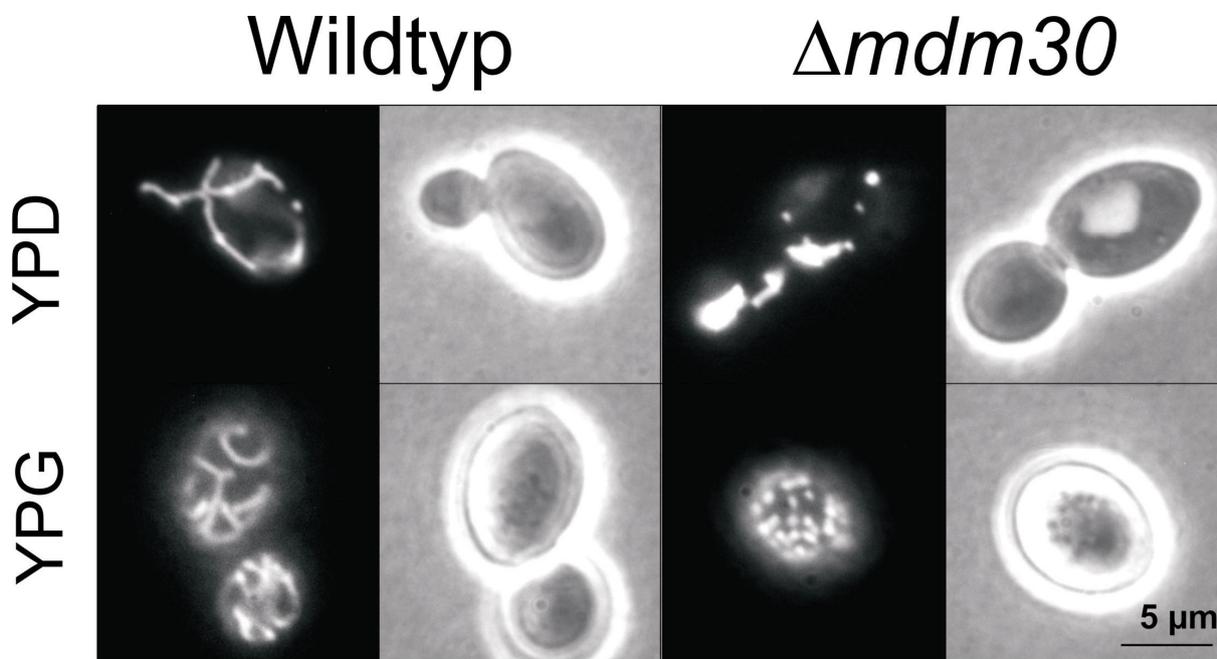
### 3.2.3 Die Mitochondrien der $\Gamma$ *mdm30*-Mutante sind aggregiert oder fragmentiert

In Zellen, in denen *MDM30* deletiert ist und somit kein funktionstüchtiges Protein vorliegt, ist die mitochondriale Morphologie verändert. Man findet aggregierte, teils fragmentierte Mitochondrien (Dimmer *et al.*, 2002).

Es sollte hier eine genauere Untersuchung der mitochondrialen Morphologie des Wildtyps und der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und der Temperatur durchgeführt werden. Hierzu wurden die Stämme, die mit einem mtGFP-exprimierenden Plasmid transformiert worden waren, in YPD- und YPG-Medium über Nacht angezogen und am nächsten Tag durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Im Mikroskop zeigten sich die Mitochondrien des Wildtyps, der in einer nichtfermentierbaren Kohlenstoffquelle (YPG) kultiviert worden war, etwas stärker verzweigt als in YPD. Auch die Mitochondrien der  $\Gamma$  *mdm30*-Zellen zeigten abhängig von der Kohlenstoffquelle eine unterschiedliche Morphologie. So waren die Mitochondrien der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante, die in YPG kultiviert wurden, extrem fragmentiert und gleichmäßig über die Zelle verteilt. Auf YPD hingegen zeigte sich eine stärkere Aggregation der Mitochondrien (Abbildung 8). Eine Erhöhung der Temperatur von 30°C auf 37°C hatte keine Auswirkung auf die mitochondriale Morphologie.

Dieses Experiment zeigt, dass Mdm30 ein essentieller Faktor für die Etablierung einer Wildtyp-ähnlichen Morphologie der Mitochondrien ist. Allerdings ist die  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante noch in der Lage, sich verschiedenen Wachstumsbedingungen anzupassen, was an der unterschiedlichen mitochondrialen Morphologie auf den jeweils unterschiedlichen Kohlenstoffquellen zum Ausdruck kommt.



**Abb. 8: Die  $\Delta mdm30$ -Mutante zeigt aggregierte, teils fragmentierte Mitochondrien.**

Wildtyp-Zellen (WT) und  $\Delta mdm30$ -Zellen, welche mtGFP exprimieren, wurden in Glucose- (YPD) oder Glycerin-haltigem Medium (YPG) kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase durch Fluoreszenz- (links) und Phasenkontrastmikroskopie (rechts) untersucht. Man sieht die Mitochondrien einer repräsentativen Zelle und die jeweils zugehörige Phasenkontrastaufnahme.

### 3.2.4 Die Morphologie der Mitochondrien ist bei Überexpression von *MDM30* nicht verändert

Wie oben gezeigt, hat die Deletionsmutante von Mdm30 fragmentierte und aggregierte Mitochondrien. Das Mdm30-Protein scheint also, ebenso wie das Fzo1-Protein, eine Rolle bei der Fusion von Mitochondrien zu spielen. Die Überexpression von *FZO1* führt ebenso wie die Deletion von *FZO1* zu einer veränderten Mitochondrienmorphologie (Klanner, 2001). Daher sollte untersucht werden, welche Auswirkung eine Überexpression von *MDM30* auf die Mitochondrien und deren Morphologie hat.

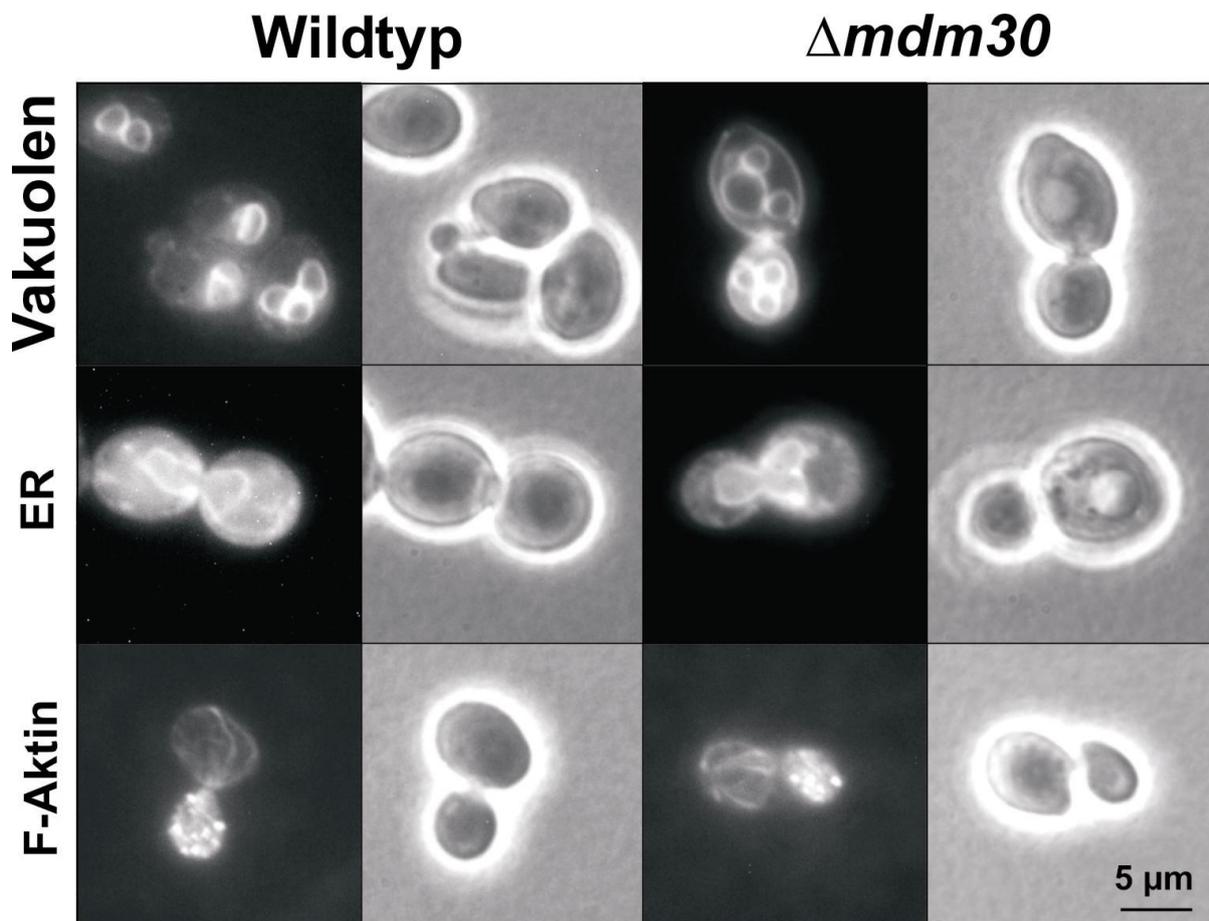
Um einen möglichen Einfluss einer Überexpression des Mdm30-Proteins auf die mitochondriale Morphologie zu untersuchen, wurde ein Plasmid konstruiert, welches *MDM30* hinter einem starken Promotor exprimiert. Nach dessen Transformation in den Wildtyp sollte dieser hinsichtlich der mitochondrialen Morphologie untersucht werden.

Hierzu wurde die DNA-Sequenz des *MDM30* von genomischer DNA amplifiziert und anschließend in das pYES-Plasmid kloniert, so dass das *MDM30*-Gen hinter einem *GAL*-Promotor, einem der stärksten Promotoren in Hefe, zu liegen kam. Das resultierende Plasmid, pYES-*MDM30*, wurde in Wildtypzellen transformiert. Die Mitochondrien wurden wie oben beschrieben gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Nach Überexpression von *MDM30* konnte jedoch keine Veränderung der mitochondrialen Morphologie festgestellt werden (ohne Abbildung).

### 3.2.5 Die Funktion von Mdm30 ist spezifisch für Mitochondrien

Es sollte untersucht werden, ob neben den Mitochondrien auch andere Organellen der Zelle in der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante morphologisch verändert sind. Dazu wurden die Vakuolen, das endoplasmatische Retikulum und das Aktincytoskelett mit einem jeweils spezifischen Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Wildtyp und  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante wurden in YPD-Medium angezogen, gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die Form der untersuchten Organellen wies in der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante keinen Unterschied zum Wildtyp auf (Abbildung 9), so dass angenommen werden kann, dass der Effekt der *mdm30*-Mutation spezifisch für Mitochondrien ist.



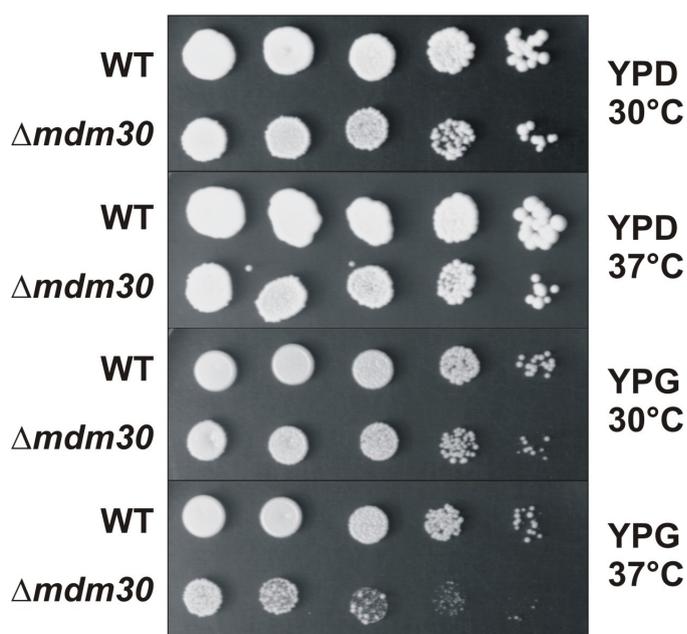
**Abb. 9: Die Morphologie der Vakuolen, des ER und von F-Aktin ist in der  $\Delta mdm30$ -Mutante identisch mit der des Wildtyps.**

Links ist die Form der Organellen einer repräsentativen Zelle des Wildtyps und der  $\Delta mdm30$ -Mutante gezeigt, rechts die entsprechende Phasenkontrastaufnahme. In der ersten Zeile sieht man die Vakuolen, welche in der logarithmischen Wachstumsphase mit 5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluoresceindiacetat gefärbt wurden. Das endoplasmatische Retikulum wurde mittels GFP sichtbar gemacht. Dazu wurden der Wildtyp und die  $\Delta mdm30$ -Mutante mit dem Plasmid pWP1055 (Prinz *et al.*, 2000) transformiert, welches GFP mit einer Zielsequenz für das endoplasmatische Retikulum trägt. Um die Expression des GFP-Fusionsproteins zu induzieren, wurden die Zellen in Methionin-freiem Medium angezüchtet. Zum Färben von Aktin in der logarithmischen Wachstumsphase wurde Rhodamin-Phalloidin verwendet.

### 3.2.6 Das Wachstumsverhalten der $\Gamma$ *mdm30*-Mutante

Um zu testen, ob das *MDM30*-Gen für ein normales Wachstum nötig ist, wurden Verdünnungsreihen von Kulturen des Wildtyps und der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante auf Platten aufgebracht, die entweder Glucose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle enthielten. Die Platten wurden bei 30°C oder 37°C für 2-3 Tage inkubiert und das Wachstumsverhalten verglichen.

Obwohl das Wachstum der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante dem des Wildtyps unter den meisten Bedingungen ähnlich war, konnte auf Glycerin-haltigen Platten bei erhöhter Temperatur eine starke Abnahme des Wachstums der Deletionsmutante beobachtet werden (Abbildung 10). Hieraus folgt, dass Mdm30 für die Erhaltung der Atmungskompetenz bei erhöhter Temperatur benötigt wird.



**Abb. 10: Die Deletion von *MDM30* führt bei erhöhter Temperatur auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle zu einem Wachstumsdefekt.**

Wildtyp und die  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante wurden in Glucose-haltigem Flüssigmedium angezogen. Es wurden Verdünnungsreihen hergestellt und je 5  $\mu$ l der Verdünnung auf YPD- und YPG-Platten aufgebracht. YPD-Platten wurden 2 Tage inkubiert, YPG-Platten 3 Tage, jeweils bei den angegebenen Temperaturen.

### 3.2.7 Interaktion von Mdm30 mit Fzo1 und Dnm1

Herstellung und Aufrechterhaltung wildtypartiger Mitochondrien benötigen ein Gleichgewicht zwischen den antagonistischen Prozessen Teilung und Fusion. Die Blockierung der mitochondrialen Fusion durch Deletion von *FZO1* oder *UGO1* führt zu atmungsinkompetenten Mutanten, welche in höchstem Maße fragmentierte Mitochondrien zeigen (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 2001). Die Blockierung der mitochondrialen Teilung durch Deletion von *DNM1*, *MDV1* oder *FIS1* führt zum Entstehen von langgezogenen, schlauchförmigen Mitochondrien bzw. fein verzweigten mitochondrialen Netzen, die sich in einer Zelhälfte positionieren (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999; Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Um einen detaillierteren Einblick zu erhalten, inwieweit das Mdm30-Protein in die antagonistisch ablaufenden Prozesse der mitochondrialen Fusion und Teilung involviert ist, wurden Doppelmutanten mit bekannten bei der Fusion oder Teilung von Mitochondrien beteiligten Genen hergestellt. Hierbei wurde Dnm1 als Komponente der mitochondrialen Teilung und Fzo1 als Komponente der mitochondrialen Fusion ausgewählt. Der Wachstumsphänotyp und die mitochondriale Morphologie der Doppelmutanten sollten untersucht werden.

#### 3.2.7.1 Interaktion mit Fzo1

Um eine vermutete Teilnahme des Mdm30-Proteins an der Mitochondrienfusion zu überprüfen, wurde eine Doppelmutante  $\uparrow fzo1/\uparrow mdm30$  konstruiert, um deren Wachstumsphänotyp und deren mitochondriale Morphologie zu untersuchen.

Hierzu wurden zwei haploide Disruptionsmutanten von *MDM30* und *FZO1* zu einem diploiden Stamm gekreuzt. Dieser wurde zur Sporulation gebracht, die Sporen getrennt und eine Tetradenanalyse durchgeführt. Die so erzeugte Doppelmutante  $\uparrow fzo1/\uparrow mdm30$  wurde hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens mit dem isogenen Wildtyp und den Einzeldelentionsmutanten verglichen. Hierzu wurden die Stämme in YPD-Flüssigmedium angezogen und in der logarithmischen Wachstumsphase Verdünnungsreihen angelegt. Von diesen Verdünnungen wurden je 5  $\mu$ l auf YPD- und YPG-Platten aufgebracht und diese bei 30°C und 37°C für 2-3 Tage inkubiert. Das Wachstumsverhalten ist in Abbildung 11A dargestellt: die Doppelmutante ist atmungsdefizient, da sie, ebenso wie das  $\uparrow fzo1$ -Elternteil, auf YPG-Platten nicht wachsen kann. Es zeigte sich ein zusätzlicher Wachstumsdefekt der Doppelmutante auf Glucose-haltigem Medium, sowohl bei 30°C als auch bei 37°C

(Abbildung 11A). Dieses Verhalten wurde in 4 unabhängig erzeugten Doppelmutanten beobachtet, so dass es spezifisch für die deletierten Allele gewertet werden kann (ohne Abbildung). Dieser zusätzliche Wachstumsdefekt lässt neben einer möglichen Beteiligung an der mitochondrialen Fusion auf eine Teilnahme des Mdm30-Proteins an einem weiteren, für ein normales Zellwachstum wichtigen Vorgang schließen.

Um die mitochondriale Morphologie zu untersuchen, wurden der Wildtyp, die  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante und die  $\uparrow$  *fzo1*/ $\uparrow$  *mdm30*-Doppelmutante mit einem mtGFP-exprimierenden Plasmid transformiert. Die verschiedenen Stämme wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zu diesem Zweck wurden Übernachtskulturen angelegt, welche am nächsten Tag in der logarithmischen Wachstumsphase analysiert wurden. In der Doppelmutante zeigten sich vorwiegend Zellen mit fragmentierten Mitochondrien, wie sie auch in der  $\uparrow$  *fzo1*-Mutante sichtbar sind. Nur vereinzelt waren Mitochondrien zu finden, die denen der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante ähnlich sahen (Abbildung 11B). Um dieses Ergebnis zu quantifizieren, wurden je 100 Zellen des Wildtyps, der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante, der  $\uparrow$  *fzo1*-Mutante und der  $\uparrow$  *fzo1*/ $\uparrow$  *mdm30*-Doppelmutante ausgewertet und hinsichtlich der mitochondrialen Morphologie untersucht. Die prozentuale Verteilung bezüglich der mitochondrialen Morphologie ist in Tabelle 3 dargestellt. Das Ergebnis der Auszählung bestätigt die Vermutung, dass die Mitochondrien der Doppelmutante morphologisch denen der  $\uparrow$  *fzo1*-Mutante gleichen.

Diese Beobachtungen zeigen, dass der  $\uparrow$  *fzo1*-Phänotyp den  $\uparrow$  *mdm30*-Phänotyp überlagert. In Abwesenheit von Fzo1 hat die Deletion von *MDM30* keinen zusätzlichen Effekt auf die mitochondriale Morphologie. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Mdm30 seine Funktion über Fzo1 ausübt.

**Tabelle 3: Statistische Erfassung der mitochondrialen Phänotypen im Wildtyp, in der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante, der  $\uparrow$  *fzo1*-Mutante und der Doppelmutante.**

Es wurde die prozentuale Verteilung der Zellen in Bezug auf die mitochondriale Morphologie im Wildtyp, der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante der  $\uparrow$  *fzo1*-Mutante und der Doppelmutante untersucht. Es wurden je 100 Zellen des Wildtyps, der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante, der  $\uparrow$  *fzo1*-Mutante und der zugehörigen Doppelmutante mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht und in folgende phänotypischen Klassen gruppiert: wildtypartig (mitochondriales Retikulum unter der Zelloberfläche), aggregiert (Anhäufung fragmentierter Mitochondrien) und fragmentiert (gleichmäßig verteilte fragmentierte Mitochondrien).

<u>Stamm</u>	<u>Mitochondriale Morphologie (% Zellen)</u>		
	<u>wildtypartig</u>	<u>fragmentiert</u>	<u>aggregiert</u>
Wildtyp	95	1	4
$\uparrow$ <i>mdm30</i>	0	8	92
$\uparrow$ <i>fzo1</i>	0	90	10
$\uparrow$ <i>fzo1</i> / $\uparrow$ <i>mdm30</i>	0	92	8

n=100 Zellen

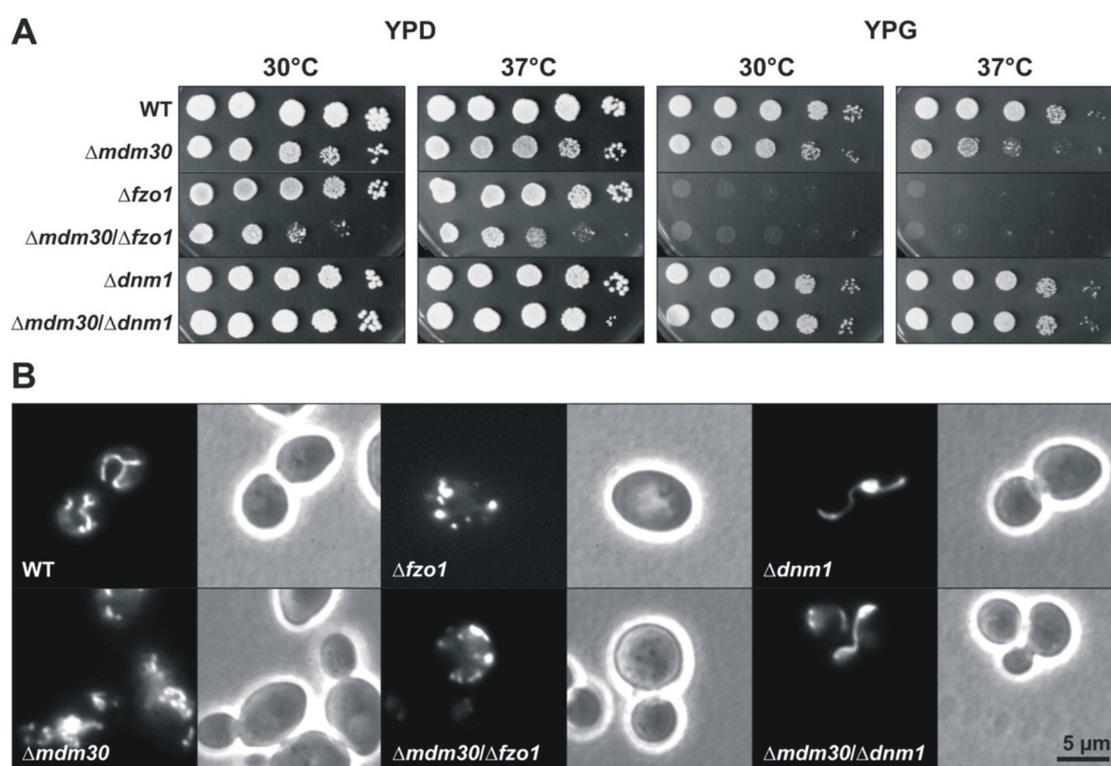
### 3.2.7.2 Interaktion mit Dnm1

Dnm1 ist ein essentieller Faktor für die mitochondriale Teilung in *S. cerevisiae*. Die Deletionsmutante zeigt netzartige mitochondriale Strukturen, die an einer Zellhälfte angehäuft sind (Bleazard *et al.*, 1999). In der Doppelmutante  $\uparrow$  *dnm1*/ $\uparrow$  *fzo1* ist das mitochondriale Netzwerk, wie es im Wildtyp zu beobachten ist, wiederhergestellt (Sesaki und Jensen, 1999). Um zu untersuchen, welchen Effekt die Doppelmutation von *MDM30* und *DNM1* auf die mitochondriale Morphologie und den Wachstumsphänotyp hat, wurde die Doppelmutante  $\uparrow$  *dnm1*/ $\uparrow$  *fzo1* konstruiert. Die Konstruktion des Stammes und die Analyse des Phänotyps erfolgte wie bei der Untersuchung der Interaktion von *MDM30* und *FZO1* beschrieben.

Es konnte folgendes Ergebnis bezüglich des Wachstumsverhaltens festgestellt werden: in der Doppelmutante  $\uparrow$  *dnm1*/ $\uparrow$  *mdm30* wurde der von der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante bekannte, temperatursensitive Wachstumsdefekt aufgehoben. Die Doppelmutante  $\uparrow$  *dnm1*/ $\uparrow$  *mdm30* zeigte ohne Ausnahme ein dem Wildtyp und der  $\uparrow$  *dnm1*-Einzelmutante ähnliches Wachstumsverhalten.

Auch die mitochondriale Morphologie der Doppelmutante war vom  $\uparrow$  *dnm1*-Elternstamm nicht zu unterscheiden (Abbildung 11B). Es bildeten sich elongierte, an beiden Enden netzartige Mitochondrien aus, wie es für Mutanten mit Defekten der mitochondrialen

Teilung typisch ist. Fragmentierte und aggregierte Mitochondrien wurden nicht beobachtet. Offensichtlich überlagert die  $r\ dnm1$ -Mutation die  $r\ mdm30$ -Mutation: Die Fragmentierung der Mitochondrien in der  $r\ mdm30$ -Mutante ist aufgehoben. Dies liefert einen weiteren Hinweis auf die Funktion von Mdm30 in der mitochondrialen Fusion. Mdm30 ist ein wichtiger, aber kein essentieller Faktor im Zusammenspiel der mitochondrialen Fusionskomponenten.



**Abb. 11: Die Wachstumsphänotypen und die mitochondriale Morphologie der Doppelmutanten  $r\ mdm30/r\ fzo1$  und  $r\ mdm30/r\ dnm1$ :  $r\ fzo1$  und  $r\ dnm1$  überlagern  $r\ mdm30$ .**

(A) Der Wachstumsphänotyp der Doppelmutanten  $r\ mdm30/r\ fzo1$  und  $r\ mdm30/r\ dnm1$ . Der Wildtyp, die Einzelmutanten und die Doppelmutanten wurden über Nacht in YPD bei 30°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden während der logarithmischen Wachstumsphase Verdünnungsreihen angelegt. Es wurden der Wachstumsphänotyp auf YPD und YPG bei 30°C und 37°C untersucht. (B) Der mitochondriale Phänotyp der Doppelmutanten  $r\ fzo1/r\ mdm30$  und  $r\ dnm1/r\ mdm30$ . Die Mitochondrien sind mit mtGFP gefärbt. Rechts vom jeweiligen fluoreszenzmikroskopischen Bild ist die zugehörige Phasenkontrastaufnahme gezeigt. Neben Wildtyp und den Doppelmutanten sind die einzelnen Elternstämme dargestellt. Alle Stämme wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium kultiviert und anschließend analysiert.

### 3.2.8 Mdm30 kontrolliert als regulierender Faktor die intrazelluläre Menge von Fzo1

Die genetischen Experimente deuten daraufhin, dass Mdm30 eine wichtige Rolle für die Fusion der Mitochondrien spielt. In Fusionsexperimenten wurde allerdings gezeigt, dass es kein integrales Protein der Fusionsmaschinerie ist (Stefan Fritz, pers. Mitteilung; Fritz *et al.*, 2003). So konnten die Mitochondrien der Doppelmutante  $\Gamma$  *mdm30*/ $\Gamma$  *dnm1* im Gegensatz zu Mitochondrien der  $\Gamma$  *fzo1*/ $\Gamma$  *dnm1*-Mutante wieder fusionieren. Demnach ist Mdm30 nur indirekt an der Fusion beteiligt. Es könnte als irgendein regulatorischer Faktor dienen, der die Proteinmenge eines oder mehrerer Proteine reguliert, welche bei der Teilung und Fusion der Mitochondrien eine wichtige Rolle spielen, indem es als F-Box-Protein in den Abbau eines dieser Proteine involviert ist.

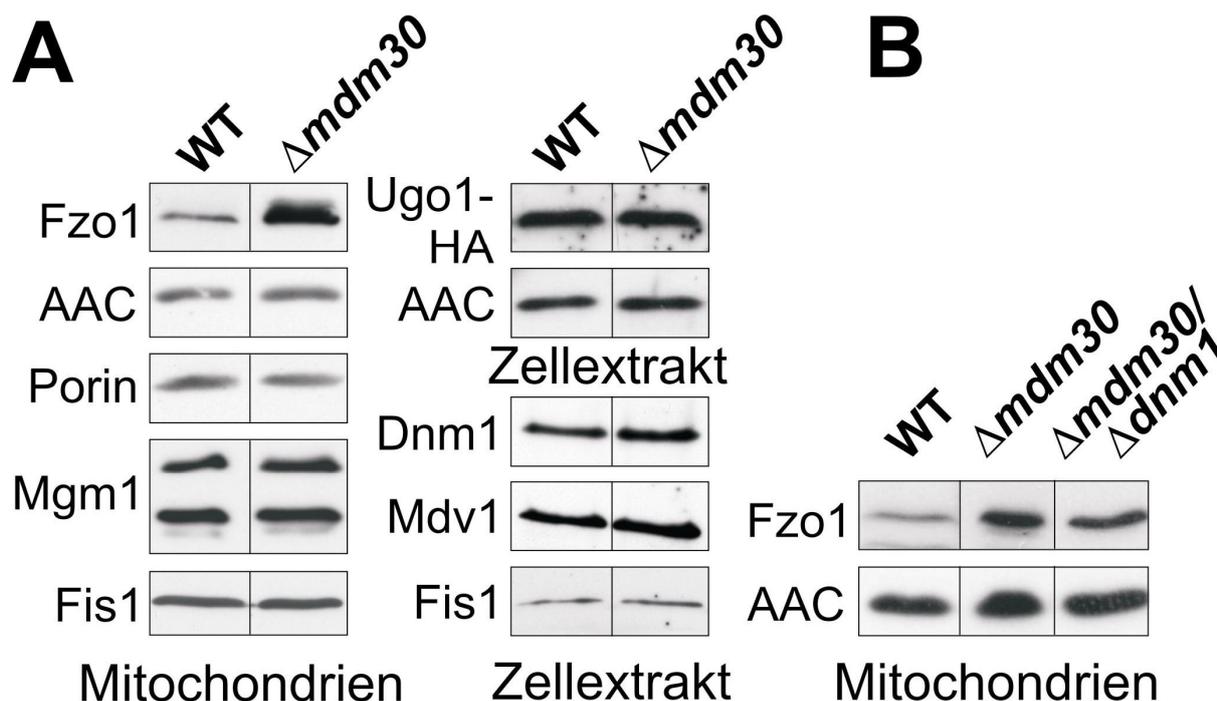
Um diese Idee zu überprüfen, wurden isogene Wildtyp-Zellen und  $\Gamma$  *mdm30*-Zellen mittels Westernblot-Analyse auf unterschiedlichen Gehalt an Proteinen untersucht, die in der Teilungs- und Fusionsmaschinerie eine wichtige Rolle spielen. Die Proteinspiegel von Fzo1, Mgm1 und Ugo1, die für die mitochondriale Fusion benötigt werden, wurden ebenso untersucht wie die Proteinspiegel von den Teilungskomponenten Dnm1, Mdv1 und Fis1. Als Kontrollproteine, die keinen Einfluß auf die Morphologie der Mitochondrien haben, und deren Proteinmenge demnach nicht erhöht sein sollte, dienten der ADP/ATP-Carrier (AAC), ein Protein der mitochondrialen Innenmembran, und Porin, ein Protein der Außenmembran, welches als Kanal für niedermolekulare Stoffe dient. Zur Untersuchung der Proteinmenge mittels Westernblot wurden zum Nachweis von Fzo1, AAC, Porin, Mgm1 und Fis1 isolierte Mitochondrien verwendet. Gleiche Proteinmengen der Wildtyp- und der  $\Gamma$  *mdm30*-Mitochondrien wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen Fzo1, Mgm1, Fis1, AAC und Porin immundekoriert. Wie erwartet war die Proteinmenge von ADP/ATP-Carrier und Porin in den Mutantenmitochondrien nicht verändert. Auch die Menge an Mgm1 und Fis1 entsprach der in Wildtyp-Mitochondrien. Auffällig war die Fzo1-Proteinmenge, die in der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp um ca. das 10 fache erhöht war (Abbildung 12). Um die Proteinmenge von Ugo1 zu beurteilen, wurden Zellen des Wildtyps und der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante mit einem Plasmid transformiert, welches für ein Fusionsprotein von Ugo1 und einem 3 fachen Hämagglutinin-Epitop kodiert (Sesaki und Jensen, 2001). Durch dieses Fusionsprotein konnte ein immunologischer Nachweis von Ugo1 erfolgen, da gegen Ugo1 kein Antikörper zur Verfügung steht, wohl aber gegen Hämagglutinin. Nach Auftrennung des Gesamtzellextrakts

des Wildtyps und der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante über SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde mittels eines Antikörpers gegen Hämagglutinin die Menge von Ugo1 abgeschätzt. Die Proteinmenge von Ugo1 war in beiden Stämmen gleich. Die Deletion von *MDM30* hat also keinen Einfluß auf die Ugo1-Proteinmenge.

Die cytosolischen Proteine Dnm1 und Mdv1 sind nur peripher mit Mitochondrien während der Teilung der Außenmembran assoziiert (Tieu und Nunnari, 2000). Um ein möglicherweise verändertes Bindungsverhalten an Mitochondrien zu berücksichtigen, musste ein kompletter Zellextrakt des Wildtyps und der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante im Westernblot verglichen werden. Die Immunoblot-Analyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Es wurden Antikörper gegen Mdv1 und Dnm1 verwendet. Es zeigte sich kein Unterschied in der Signalintensität der getesteten Proteine. Die Deletion von *MDM30* hat also keinen Einfluß auf die Menge der Proteine des Teilungsapparats.

Interessant war auch die Frage, ob die zusätzliche Deletion von *DNM1* in der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante die Proteinmenge von Fzo1 wieder herunterregelt. Wie im Abschnitt 3.2.7.2 beschrieben kommt es nämlich in der Doppelmutante  $\Gamma$  *mdm30*/ $\Gamma$  *dnm1* wieder zur Fusion von Mitochondrien, vielleicht aufgrund einer veränderten Fzo1-Proteinmenge. Um die Proteinmenge von Fzo1 abschätzen zu können, wurden die Proteine der Mitochondrien der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante, der  $\Gamma$  *mdm30*/ $\Gamma$  *dnm1*-Mutante und des Wildtyps mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Antikörpern gegen Fzo1 und AAC immundekoriert. Hierbei zeigte sich in der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante und in der  $\Gamma$  *mdm30*/ $\Gamma$  *dnm1*-Doppelmutante eine in gleichem Maß erhöhte Proteinmenge von Fzo1. Dies deutet daraufhin, dass die Fzo1-Proteinmenge von der An- bzw. Abwesenheit von Dnm1 unabhängig ist.

Diesen Beobachtungen zufolge ist Fzo1 das molekulare Zielprotein von Mdm30. Die Akkumulation von Fzo1 erklärt den mitochondrialen Phänotyp der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante. Die Anhäufung von Fzo1 in der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante hat zur Folge, dass die Mitochondrien aggregieren und fragmentieren. Aggregierte und fragmentierte Mitochondrien findet man auch in einem Hefestamm, in dem Fzo1 von einem Plasmid überexprimiert wird (Klanner, 2001). Demnach ist der mitochondriale Phänotyp der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante durch eine erhöhte Proteinmenge von Fzo1 verursacht.



**Abb. 12: Die Proteinmenge von Fzo1 ist von Mdm30 abhängig.**

(A) Die intrazelluläre Menge mitochondrialer Proteine in Wildtyp-(WT) und  $r\ mdm30$ -Zellen. Es wurden äquivalente Mengen an Mitochondrien bzw. an Zellextrakt aus Wildtyp- bzw.  $r\ mdm30$ -Zellen mittels Immunoblot analysiert. Dafür wurden Antiseren gegen die aufgeführten Proteine verwendet. Zum Nachweis von Ugo1 wurde ein Stamm verwendet, der ein mit einem Epitop versehenes Protein, Ugo1-HA, exprimiert (Sesaki und Jensen, 2001). Der Nachweis erfolgte mit Antiserum gegen HA. Mgm1 liegt in 2 verschiedenen Größen in Mitochondrien vor, so dass 2 Banden erkennbar sind.

(B) Die intrazelluläre Menge von Fzo1 in  $r\ dnm1/r\ mdm30$ -Zellen. Mitochondrien des Wildtyps und der Doppelmutante  $r\ dnm1/r\ mdm30$  wurden wie oben beschrieben analysiert.

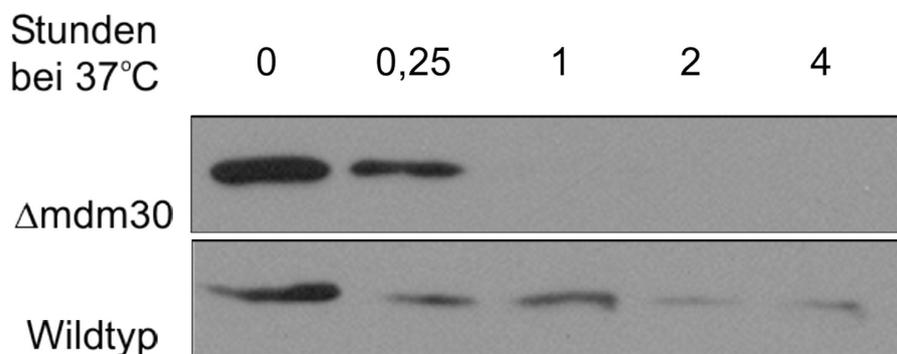
### 3.2.9 Der Abbau von Tom6-DHFR wird durch Mdm30 nicht beeinflusst

Bislang gibt es noch keine Kenntnisse über Komponenten, die an der spezifischen Proteolyse von Proteinen der mitochondrialen Außenmembran beteiligt sind. Mdm30 besitzt eine F-Box und könnte somit Proteine dem SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex zuführen, welcher zum Abbau bestimmte Proteine ubiquitiniert. Da in der Deletionsmutante die mitochondriale Morphologie betroffen ist, könnte Mdm30 bei dem Abbau mitochondrialer Proteine involviert sein. Um eine mögliche Beteiligung von Mdm30 an einer Proteolyse von Außenmembranproteinen zu testen, sollte anhand eines Modellproteins dessen Abbau im Wildtyp und der  $r\ mdm30$ -Mutante untersucht werden. Als Modellprotein wurde ein Fusionsprotein aus DHFR und dem Außenmembranprotein Tom6 verwendet (Käser, 2001).

---

Zum immunologischen Nachweis trägt Tom6 ein Epitop des Hämagglutinins (HA) am N-Terminus. HA-DHFR-Tom6 ist in der mitochondrialen Außenmembran inseriert und exponiert die DHFR- und die N-terminale Tom6-Domäne in das Cytosol (Käser, 2001). Die Stabilität dieses Hybridproteins sollte im Hefestamm mit Mutation im *MDM30*-Gen bestimmt und mit dem Wildtyp verglichen werden.

Um eine mögliche Hemmung des Abbaus von HA-DHFR-Tom6 in der Deletionsmutante  $\uparrow$  *mdm30* zu untersuchen, wurde die Proteinmenge des HA-DHFR-Tom6 nach Hemmung der Proteinbiosynthese im Wildtyp und der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante untersucht. Hierzu wurden der Wildtyp und die  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante mit einem Plasmid transformiert, welches das *HA-DHFR-TOM6* hinter einem *GAL*-Promotor trägt. Die Stämme wurden in Galaktose-haltigem Medium angezchtet und die Proteinbiosynthese einer wachsenden Kultur durch Zugabe von Cycloheximid gehemmt. Die Zellen wurden bei 37°C weiterinkubiert, um so einen Abbau des Proteins zu ermöglichen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die mittels einer Westernblot-Analyse hinsichtlich der Proteinmenge von HA-DHFR-Tom6 untersucht wurden. Abbildung 13 zeigt, dass sowohl im Wildtyp als auch in der  $\uparrow$  *mdm30*-Mutante das HA-DHFR-Tom6 abgebaut wird. Somit scheint das verwendete Modellprotein nicht im Zusammenhang mit einer über Mdm30 vermittelten Proteolyse zu stehen.



**Abb. 13: Der Abbau von HA-DHFR-Tom6 *in vivo* ist in der  $\Delta$ mdm30-Mutante nicht beeinträchtigt.**

Wildtyp-Zellen und  $\Delta$ mdm30-Zellen wurden mit einem Plasmid transformiert, das das HA-DHFR-Tom6-Protein unter einem Galaktosepromotor trägt (Yip351-GAL10-DHFR-TOM6). Galaktose-induzierte Zellkulturen wurden durch Zugabe von Cycloheximid (100  $\mu$ g/ml) in ihrer Proteinbiosynthese gehemmt und bei 37°C bis zu den angegebenen Zeiten inkubiert. Der Abbau des Fusionsproteins HA-DHFR-Tom6 wurde nach Zellaufschluss und TCA-Fällung des Gesamtproteins über SDS-PAGE und immunologischen Nachweis mit einem Antikörper gegen Hämagglutinin analysiert.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit stand die Identifizierung und Charakterisierung von neuen Komponenten, die für die mitochondriale Morphologie eine wichtige Rolle spielen, im Vordergrund. Die Morphologie der Mitochondrien wird durch Fusions- und Teilungsprozesse bestimmt. Hierbei kooperieren mehrere Proteine miteinander, die zum Teil im Cytosol, zum Teil in den mitochondrialen Membranen lokalisiert sind. Erst das Zusammenspiel dieser Komponenten ermöglicht einen reibungslosen Ablauf der Teilung und Fusion der Mitochondrien. Bislang wurden einige molekulare Komponenten entdeckt, die für mitochondriale Teilungs- und Fusionsvorgänge benötigt werden (Hermann und Shaw, 1998; Jensen *et al.*, 2000; Griparic und van der Blieck, 2001; Yoon und McNiven, 2001; Westermann, 2002; Westermann, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde nach weiteren beteiligten Komponenten gesucht, um ein besseres Verständnis der komplexen Vorgänge der Fusion und Teilung von 4 mitochondrialen Membranen zu erhalten. Hierbei spielt die neu identifizierte Komponente Mdm30, deren Deletionsmutante aggregierte, zum Teil fragmentierte Mitochondrien zeigt, eine essentielle Rolle.

### 4.1 Die Identifizierung neuer Komponenten für die mitochondriale Morphogenese

Um neue Komponenten zu identifizieren, die für die mitochondriale Morphologie eine Rolle spielen, haben verschiedene Forschergruppen Mutantenstämme von *S. cerevisiae* charakterisiert, die einen Defekt der mitochondrialen Teilung oder Fusion aufwiesen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Screeningmethoden benutzt, wobei der klassische Ansatz zur Identifizierung von Genen auf der Untersuchung temperatursensitiver Mutanten basiert, die durch zufallsgesteuerte Mutagenese erzeugt worden waren (Hermann und Shaw, 1998). Dieser Ansatz ist mit einem sehr großen Aufwand verbunden, und es werden längst nicht alle Gene identifiziert, da auf Wachstumsdefekte selektioniert wird und nicht jeder Mutantenstamm einen solchen Wachstumsdefekt aufweist. Der hier durchgeführte systematische Ansatz des Screenings einer Deletionsmutantenbibliothek aller nicht-essentieller Gene der Hefe *S. cerevisiae* nach Mutanten mit veränderten Mitochondrien verspricht die Identifizierung vieler weiterer Komponenten, die bei dem klassischen Ansatz nicht gefunden wurden (Dimmer *et al.*, 2002). Die in dem genomweiten Screen neu

identifizierten Gene wurden als *MDM*-Gene (*Mitochondrial Distribution und Morphology*) bezeichnet, beginnend mit *MDM30*. In anderen Screens entdeckte, für die mitochondriale Morphologie zuständige Gene wurden wie folgt bezeichnet: „*Mitochondrial Distribution und Morphology*“ (*MDM*) (Mc Conell *et al.*, 1990), „*Mitochondrial Morphology Maintenance*“ (*MMM*) (Burgess *et al.*, 1994), „*Mitochondrial Genome Maintenance*“ (*MGM*) (Jones und Fangmann, 1992) oder „*Yeast Mitochondrial DNA-Escape*“ (*YME*) (Thorsness und Fox, 1993).

Mit der Durchführung des genomweiten Screens hat sich die Zahl der Gene, die eine essentielle Rolle für die mitochondriale Morphologie spielen, mehr als verdoppelt. Dennoch ist die Zahl der neu entdeckten Gene relativ klein, so dass man davon ausgehen kann, dass der Screen recht spezifisch ist. Ob alle diese Komponenten direkt in der Fusions- und Teilungsmaschinerie eine Rolle spielen oder indirekt über andere zelluläre Mechanismen einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie ausüben, ist noch unklar. Es bedarf weiterer Untersuchungen, welche Funktion die neu entdeckten Proteine bei der Fusion und Teilung von Mitochondrien haben.

Die Mehrzahl der gefundenen Gene kodiert für Proteine, die keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen zeigen. Auch *Mdm35* und *Num1*, die in der vorliegenden Arbeit als essentielle Komponenten für die mitochondrialen Morphologie identifiziert wurden, besitzen keine charakterisierten homologen Proteine. Bei der Durchführung des Screens zeigte die Mutante *mdm35* sphärische, in einer Zellhälfte lokalisierte Mitochondrien. Im Gegensatz zu anderen Mutantenstämmen zeigt die *mdm35*-Mutante jedoch keinen Wachstumsdefekt und wäre somit durch eine konventionelle Screening-Methode mit Selektion auf Wachstumsdefekte nicht auffindbar gewesen. *Num1*, dessen Deletionsmutante aggregierte Mitochondrien zeigt, ist bei der Zellteilung an der Wanderung des Zellkerns beteiligt. Die molekulare Funktion von *Num1* bei der Herstellung und Aufrechterhaltung eines wildtypartigen mitochondrialen Netzwerks ist noch nicht erforscht. Die Aufklärung der molekularen Funktionen dieser neu gefundenen Proteine ist eine Herausforderung für die Zukunft.

Der hier vorgestellte Ansatz eines genomweiten Screenings einer Deletionsmutantenbibliothek nicht-essentieller Hefegene könnte auch für die Untersuchung anderer zellbiologischer Prozesse hilfreich sein.

## 4.2 Mdm30 und seine Rolle bei der mitochondrialen Fusion

In dieser Arbeit wurde mit Mdm30 eine neue Komponente untersucht, die für die Aufrechterhaltung der Fusionsfähigkeit von Mitochondrien notwendig ist. Die Mitochondrien der Deletionsmutante von Mdm30 zeigen typische Eigenschaften einer Mutante, deren mitochondriale Fusion beeinträchtigt ist. Abhängig von der jeweiligen Kohlenstoffquelle sind die Mitochondrien zum Teil stärker aggregiert, zum Teil eher fragmentiert.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Aufgabe des Mdm30 bei der mitochondrialen Fusion zu klären. Grundsätzlich sind zwei Möglichkeiten denkbar, wie Mdm30 die Morphologie der Mitochondrien beeinflusst. Mdm30 könnte zum einen eine essentielle Komponente der Fusionsmaschinerie sein. Es wäre somit zusammen mit Fzo1, Ugo1 und Mgm1 an der Fusion von Mitochondrien beteiligt. Andererseits könnte Mdm30 über einen anderen zellulären Weg, der in der Deletionsmutante beeinträchtigt ist, die wildtypartige Morphologie der Mitochondrien kontrollieren. Mehrere genetische und biochemische Ergebnisse dieser Arbeit weisen daraufhin, dass Mdm30 indirekt die mitochondriale Morphologie verändert und als ein regulatorischer Faktor der mitochondrialen Fusionsmaschinerie fungiert. Ein Hinweis auf die Rolle von Mdm30 als Regulatorprotein ist die wiederhergestellte Fusionskompetenz der Mitochondrien in der Doppelmutante  $\uparrow mdm30/\uparrow dnm1$ . Die zusätzliche Deletion von *DNM1* überlagert sowohl den Phänotyp als auch den Wachstumsdefekt der  $\uparrow mdm30$ -Mutante. Hingegen kommt es in der Doppeldeletionsmutante  $\uparrow dnm1/\uparrow fzo1$  zu keinem Überlagerungseffekt. Vielmehr zeigen sich hier erstaunlicherweise wieder wildtypartige Mitochondrien (Sesaki und Jensen, 1999). Demnach kommt Mdm30 nicht die Funktion einer essentiellen Fusionskomponente wie Fzo1 zu. In einem weiteren Experiment war die Fzo1-Menge der  $\uparrow mdm30$ -Mutante im Vergleich zu der des Wildtyps erhöht. Die Fzo1-Proteinmenge könnte demnach von der Mdm30-Expression abhängig sein. Wenn Mdm30 über die Regulation der Fzo1-Proteinmenge an der mitochondrialen Fusion beteiligt ist, ist dies ein weiterer Hinweis auf die Funktion von Mdm30 als Regulatorprotein.

Die Regulierung mitochondrialer Fusion ist die Hauptaufgabe des Mdm30-Proteins. Zusätzlich zu der Regulation der mitochondrialen Fusion kommt Mdm30 aber noch eine weitere Funktion im Zellhaushalt zu. Im Hintergrund des  $\uparrow fzo1$ -Stammes tritt ein zusätzlicher Wachstumsdefekt nach Deletion des *MDM30*-Gens auf. Dieser Wachstumsdefekt kann nicht allein durch eine Beteiligung des Mdm30 an der mitochondrialen Fusion erklärt

werden. Es muss noch ein anderer zellulärer Vorgang in der Doppeldeletionsmutante  $\uparrow mdm30/\uparrow fzo1$  beeinträchtigt sein, der ein den Elternstämmen ähnliches Wachstumsverhalten der Doppelmutante verhindert.

Die Tatsache, dass Mdm30 eine F-Box besitzt, und die Tatsache, dass Mdm30 in einem Two-Hybrid-Screen mit Skp1 und Cdc53 Interaktionen zeigte (Uetz *et al.*, 2000), legt die Vermutung nahe, dass Mdm30 Teil des SCF-Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplexes ist. Dieser benutzt substratspezifische Adapterproteine, sogenannte F-Box-Proteine, um zwischen den zum Abbau bestimmten Proteinen und den für die Ubiquitinierung zuständigen Enzymen zu vermitteln (Patton *et al.*, 1998; siehe 1.3). Die Fzo1-Proteinmenge könnte über eine Skp1-Cdc53-Mdm30-abhängige Ubiquitinierung und einen darauf folgenden Abbau durch das 26S-Proteasom reguliert werden. Im einfachsten Fall wäre Fzo1 das Substrat der Ubiquitinierung. Hierbei würde Mdm30 das Fzo1-Protein an den E3-Enzymkomplex führen, an dem Mdm30 über das F-Box-Motiv andockt. Eine Beteiligung anderer Faktoren kann aber noch nicht ausgeschlossen werden, da nicht gezeigt wurde, dass Fzo1 ein direktes Substrat für das 26S-Proteasom ist. So konnte in einer konditionalen Proteasommutante, *mpr1-1* (Rinaldi *et al.*, 1998), keine Anhäufung von Fzo1 bei der nicht-permissiven Temperatur nachgewiesen werden (nicht gezeigtes Ergebnis). Eine Akkumulation von Fzo1 in dieser Mutante, in der die Funktion des Proteasoms beeinträchtigt ist, hätte einen Hinweis geliefert, dass Fzo1 ein Substrat des 26S-Proteasom ist. Allerdings liefert dieses Ergebnis keinen eindeutigen Beweis, dass Fzo1 nicht über das 26S-Proteasom abgebaut wird, da in dieser Mutante noch viele andere zelluläre Prozesse betroffen sind, so dass aufgrund der Komplexität der Interaktionen kein monokausaler Zusammenhang gezogen werden darf.

Es sind zwei verschiedene Rollen von Mdm30 bei der Fusion von Mitochondrien vorstellbar, die sich gegenseitig nicht ausschließen. Auf der einen Seite könnte Mdm30 als Regulatorprotein für die Fzo1-Proteinmenge dienen, damit die Fzo1-Proteinmenge in einem fein regulierten Gleichgewicht mit der Dnm1-Proteinmenge steht. Zur Erhaltung einer wildtypartigen Morphologie der Mitochondrien bedarf es nämlich eines genau eingehaltenen Gleichgewichts zwischen Teilungs- und Fusionsprozessen (Nunnari *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite könnte Mdm30 am Abbau unbrauchbarer Fusionskomplexe beteiligt sein, die die geplante Fusion blockieren könnten. Diese unproduktiven Fusionskomplexe entstünden sowohl im Wildtyp wie auch in der Mutante  $\uparrow mdm30$ . Im Wildtyp würden die unproduktiven Fusionskomplexe jedoch durch Mdm30 beseitigt, so dass keine mitochondriale Aggregation stattfindet.

Wie oben beschrieben weist die F-Box des Mdm30 auf einen Zusammenhang der mitochondrialen Morphologie mit der Ubiquitinierung von Proteinen und deren Abbau durch das 26S-Proteasom hin. Über einen solchen Zusammenhang wurde bereits in einer anderen Arbeit berichtet, in der in einem Hefestamm ein verändertes Ubiquitin exprimiert wurde, welches nicht in der Lage war, Polyubiquitinketten zu bilden (Fisk and Yaffe, 1999). In diesem Stamm wurde ein mitochondrialer Phänotyp beobachtet, der dem der *mdm30*-Mutante sehr ähnlich war. Die Mitochondrien waren stark aggregiert. Der Verlust des Mdm30-Proteins und die Überexpression defekter Ubiquitineinheiten könnten demnach denselben Reaktionsweg beeinträchtigen.

Weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen mitochondrialer Morphologie und der Ubiquitinierung von Proteinen liefert eine veränderte Mitochondrienmorphologie in einem Mutantenstamm der Hefe *S. cerevisiae*, in dem eine essentielle Ubiquitin-Ligase, Rsp5, defekt ist (Fisk und Yaffe, 1999). Die Mitochondrien aggregieren und bilden kleine runde Gebilde aus, die nicht an die Tochterzelle weitergegeben werden. In dieser Mutante ist die Expression des *OLE1*-Gens verhindert (Hoppe *et al.*, 2000). Die von dem *OLE1*-Gen kodierte Fettsäuredesaturase ist für die Vererbung von Mitochondrien essentiell (Stewart und Yaffe, 1991).

Es gibt noch viele unbeantwortete Fragen bezüglich des Abbaus von Proteinen der Mitochondrien. Hierbei spielt die Identifizierung proteolytischer Substrate mit regulatorischer Funktion in bezug auf die Mitochondrienmorphologie eine Rolle, sowie das Aufklären der Rolle des 26S-Proteasoms für die mitochondriale Funktion (Käser und Langer, 2000). Die Regulierung von Fzo1 durch ein F-Box-Protein ist ein erster Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Ubiquitinierungsprozessen und einem spezifischen mitochondrialen Substrat.

### 4.3 Die medizinische Relevanz mitochondrialer Fusion

Aufgrund starker Homologie zwischen Proteinen der Hefe *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten, so auch bei Proteinen, die bei der Formgebung der Mitochondrien beteiligt sind, ist die Erforschung grundlegender Funktionen am Modellorganismus *S. cerevisiae* ein wichtiger Schritt zur Aufklärung molekularer Mechanismen in höheren Organismen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist in der Hefe *S. cerevisiae* in Abwesenheit von Mdm30 eine Anhäufung von Fzo1 zu beobachten. Es zeigen sich in der  $\Gamma$  *mdm30*-Deletionsmutante stark aggregierte und fragmentierte Mitochondrien. Diese mitochondrialen morphologischen Veränderungen finden sich sowohl bei der Deletion von *MDM30* als auch bei der Überexpression von *FZO1* von einem heterologen Promoter (Klanner, 2001). Somit liegt nahe, anzunehmen, dass die Aggregation von Mitochondrien in der  $\Gamma$  *mdm30*-Mutante direkte Folge der Anhäufung von Fzo1 ist. Auch in menschlichen Zellen führt die Überexpression von Mitofusinen, welche homolog zu Fzo1 in Hefe sind, zur Aggregation der Mitochondrien in einer ähnlichen Art und Weise, wie es in der Hefe *S. cerevisiae* zu beobachten ist (Santel und Fuller, 2001). In einer Zelllinie, in der Mfn2 überexprimiert wird, finden sich dicht aneinander liegende Mitochondrien, die nicht fusionieren (Rojo *et al.*, 2002). Die Fusion der Mitochondrien dieser Zelllinie könnte in einem frühen Stadium der Fusion gestört sein, in dem die Mitochondrien versuchen, aneinander zu haften bzw. „anzudocken“: Die Akkumulation von Fzo1 oder Mitofusinen führt zur mitochondrialen Aggregation, möglicherweise durch Anhäufung unproduktiver Fusionsintermediate. Die Parallelen der mitochondrialen Fusion in Hefe- und Säugerzellen heben die Relevanz der Erforschung mitochondrialer Fusionsvorgänge und hierbei beteiligten Komponenten hervor.

Die Bedeutung mitochondrialer Membranfusion speziell für medizinische Fragestellungen wird durch die erst kürzlich entdeckte Mutation in einem Mitofusin bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit klar. In mehreren Familien mit Charcot-Marie-Tooth-Krankheit wurden Mutationen in der GTPase-Domäne des Mitofusins2, Mfn2, festgestellt (Züchner *et al.*, 2004). Mfn2 ist ein mitochondriales Protein, welches homolog zu Fzo1 in der Hefe *S. cerevisiae* ist. Zellkulturen von embryonalen Fibroblasten der Maus, die an einem Mangel an funktionstüchtigem Mfn2 leiden, zeigen eine verminderte Dynamik der Mitochondrien (Chen *et al.*, 2003). Nachdem die Mobilität und der Transport von Mitochondrien essentiell für eine regelrechte Funktion der Nervenzelle sind, ist ein möglicher Mechanismus aufgezeigt, der für die Symptome bei Patienten mit Charcot-Marie-Tooth-

Krankheit verantwortlich sein könnte. Neben Nervenzellen reagiert insbesondere auch die Muskulatur empfindlich auf Störungen der mitochondrialen Dynamik und Funktion, so dass es sich bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit um eine senso-motorische Neuropathie handelt.

Wie wichtig das Mitofusin 2 ist, wird auch an homozygoten Knock-Out-Mäusen deutlich, die kein Mfn2 exprimieren. Diese sterben in der Mitte der Schwangerschaft, wahrscheinlich aufgrund einer unzureichenden Funktion der Plazenta (Chen *et al.*, 2003).

Auch am Beispiel der autosomal-dominanten Optikusatrophie wird die medizinische Relevanz mitochondrialer Membranfusion deutlich. Mit Opa1, dessen Homologes das Mgm1 der Hefe *S. cerevisiae* ist, ist bei der Optikusatrophie ein Protein defekt, welches an der Fusion von Mitochondrien beteiligt ist. Durch ausbleibende Fusion kommt es zur Fragmentierung der Mitochondrien in der dazugehörigen Deletionsmutante (Delettre *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000).

Außer bei erblichen Erkrankungen kommt der mitochondrialen Membranfusion auch bei dem Alterungsprozess eine wichtige Rolle zu. Mit zunehmendem Alter häufen sich Punktmutationen im mitochondrialen Genom (Raha und Robinson, 2000). Es kommt zu funktionellen Verlusten, insbesondere durch Schädigung der für eine hinreichende Energieversorgung benötigten Enzyme. Durch regelmäßige Fusion der Mitochondrien kommt es zu einer Durchmischung der Membranen und des Matrixinhalts. So kann geschädigte mitochondriale DNA durch intakte ersetzt bzw. vervollständigt werden (Ono *et al.*, 2001). Damit wird einem Aktivitätsverlust der mitochondrialen Atmungskette entgegengewirkt und die mitochondriale Fusion stellt einen Abwehrmechanismus gegen den Alterungsprozess dar.

## 5 Zusammenfassung

Mitochondrien sind sehr dynamische Organellen, die sich fortwährend teilen und miteinander fusionieren. Fusion und Teilung spielen eine wichtige Rolle für den Aufbau der mitochondrialen Struktur und den Erhalt mitochondrialer Funktionen. Darüber hinaus sind diese Prozesse bedeutsam bei der zellulären Alterung, Apoptose und Zelldifferenzierung. Die ersten molekularen Komponenten der Fusions- und Teilungsmaschinerie wurden in den letzten Jahren in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* als Modellorganismus identifiziert. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung neuer Komponenten und deren funktionelle Charakterisierung in Hefe.

Für die Identifizierung neuer Komponenten der mitochondrialen Morphogenese wurde auf eine Deletionsmutanten-Bibliothek zugegriffen, die sämtliche nicht-essentielle Gene der Bäckerhefe umfasst. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden das zuvor uncharakterisierte Protein Mdm35 und das Zellcortex-assoziierte Protein Num1 als Komponenten identifiziert, die für den Aufbau des mitochondrialen Netzwerks in Hefe essentiell sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das ebenfalls neu identifizierte *MDM30*-Gen funktionell charakterisiert, dessen Deletionsmutante aggregierte, teils fragmentierte Mitochondrien zeigt. Mdm30 gehört zu der Familie der F-Box-Proteine, die an der spezifischen Erkennung von Substratproteinen beteiligt sind, die durch den SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex dem Proteasom zum Abbau zugeführt werden. Das Mdm30-Protein ist zum Teil im Cytosol lokalisiert und zum Teil mit Mitochondrien assoziiert. Die  $\uparrow$  *mdm30*-Deletionsmutante zeigt in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle des Mediums stark aggregierte oder fragmentierte Mitochondrien. Dieser Morphologiedefekt ist spezifisch für Mitochondrien, da andere Organellen nicht betroffen sind. Daneben zeigt die Mutante einen Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen bei erhöhter Temperatur. Doppeldeletionsmutanten von *MDM30* und Genen, die Komponenten der Fusionsmaschinerie (*FZO1*) oder Teilungsmaschinerie (*DNM1*) codieren, liefern genetische Hinweise, dass Mdm30 ein regulatorischer Faktor der Fusionsmaschinerie ist. Die Proteinmenge des Fzo1-Proteins ist in der  $\uparrow$  *mdm30*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. Dieser Effekt ist sehr spezifisch, da eine Reihe anderer mitochondrialer Proteine und der Abbau eines künstlichen Substratproteins nicht betroffen sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mdm30 den Abbau des Fzo1-Proteins durch das Proteasom reguliert und so möglicherweise die Fusionsaktivität der Mitochondrien kontrolliert.

## 6 Literaturverzeichnis

- Amberg, D.C. (1998). Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3259–3262.
- Aiken Hobbs, A.E., Srinivasan, M., McCaffery, J.M. und Jensen, R.E. (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J. Cell Biol.*, **152**, 401-410.
- Aijaz, S., Erskine, L., Jeffery, G., Bhattacharya, S.S. und Votruba, M. (2004). Developmental expression profile of the optic atrophy gene product: OPA1 is not localized exclusively in the mammalian retinal ganglion cell layer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**, 1667-1673.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. und Wissinger, B. (2000). *OPA1*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.*, **26**, 211-215.
- Attardi, G. und Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **4**, 289-333.
- Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. und Pringle, J.R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943–951.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W. und Elledge, S.J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, **86**, 263–274.
- Bakeeva, L., Chentsov, Y. und Skulachev, V. (1978). Mitochondrial framework in rat diaphragm muscle. *Biochem. Biophys. Acta*, **501**, 349-369.
- Bassett, D.E. Jr., Boguski, M.S., Spencer, F., Reeves, R., Kim, S., Weaver, T. und Hieter, P. (1997). Genome cross-referencing and XREFdb: implications for the identification and analysis of genes mutated in human disease. *Nat. Genet.*, **15**, 339-344.
- Bauer, M.F., Gempel, K., Hofmann, S., Jaksch, M., Philbrook und Gerbitz, K.D. (1999). Mitochondrial Disorders: A diagnostic challenge in clinical chemistry. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **37**, 855-876.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W., und Brunner, M. (2000). Protein translocation into mitochondria: the role of the TIM complexes. *Trends Cell Biol.* **10**, 25–31.
- Bereiter-Hahn, J. und Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.*, **27**, 198-219.
- Berger, K.L., Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1997). Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J. Cell Biol.*, **136**, 545-553.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. und Shaw, J. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 298-304.
- Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S. und Pon, L.A. (1998). Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J. Cell Biol.*, **141**, 1371-1381.

- Boldogh, I.R., Yang, H.-C., Nowakowski, W.D., Karmon, S.L., Hays, L.G., Yates III, J.R. und Pon, L.A. (2001a). Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 3162-3167.
- Boldogh, I.R., Yang, H.-C. und Pon, L.A. (2001b). Mitochondrial inheritance in budding yeast. *Traffic*, **2**, 368-374.
- Bonilla, E., Tanji, K., Hirano, M., Vu, T.H., DiMauro, S. und Schon, E.A. (1999). Mitochondrial involvement in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1410**, 171-182.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**, 115-132.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Burgess, S.M., Delannoy, M. und Jensen, R.E. (1994). *MMM1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell. Biol.*, **126**, 1375-1391.
- Cenciarelli, C., Chiaur, D.S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M. und Pagano, M. (1999). Identification of a family of human F-box proteins. *Curr. Biol.*, **9**, 1177-1179.
- Cervený, K.L., McCaffery, J.M. und Jensen, R.E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DNM1-interacting protein, Net2p. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 309-321.
- Cervený, K.L. und Jensen, R.E. (2003). The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol. Biol. Cell.*, **14**, 4126-4139.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewals, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E. und Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 und Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.*, **160**, 189-200
- Criddel, R.S. und Schatz, G. (1969). Promitochondria of anaerobically grown yeast. I. Isolation and biochemical properties. *Biochemistry*, **8**, 322-334.
- Daum, G., Böhni, P.C. und Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13028-13033.
- De Camilli, P., Takei, K. und McPherson, P.S. (1995). The function of dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**, 559-565.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelléc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. und Hamel, C.P. (2000). Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.*, **26**, 207-210.
- Delettre, C., Lenaers, G., Pelloquin, L., Belenguer, P. und Hamel, C.P. (2002). *OPA1* (Kjer-type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.*, **75**, 97-107.
- Deshaies, R.J. (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 435-467.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 847-853.
- Egner, A., Jakobs, S. und Hell, S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3370-3375.
- Eckert, A., Keil, U., Marques, C.A., Bonert, A., Frey, C., Schussel, K. und Muller, W.E.

- (2003). Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 1627-1634.
- Fekkes, P., Shepard, K.A. und Yaffe, M.P. (2000). Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J. Cell Biol.*, **151**, 333-340.
- Fisk, H.A. und Yaffe, M.P. (1999). A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **145**, 1199-1208.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L. und Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell*, **1**, 515-525.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. und Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.*, **152**, 683-692.
- Fritz, S., Weinbach, N. und Westermann, B. (2003). Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2303-2313.
- Gammie, A.E., Kurihara, L.J., Vallee, R.B. und Rose, M.D. (1995). *DNM1*, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J. Cell Biol.*, **130**, 553-566.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. und Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387-391.
- Gietz, D., Jean, A.S., Woods, R.A. und Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1425.
- Griparic, L. und van der Blik, A.M. (2001). The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic*, **2**, 235-244.
- Grivell, L.A. (1995). Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 121-64.
- Guan, K., Farh, L., Marshall, T.K. und Deshenes, R.J. (1993). Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the *MGMI* gene. *Curr. Genet.*, **24**, 141-148.
- Guthrie, C. und Fink, G.R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Meth. Enzymology*, **194**.
- Hales, K.G. und Fuller, M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, **90**, 121-129.
- Heil-Chapdelaine, R.A., Oberle, J.R. und Cooper, J.A. (2000). The cortical protein Num1p is essential for dynein-dependent interactions of microtubules with the cortex. *J. Cell Biol.*, **151**, 1337-1344.
- Heim, R. und Tsien, R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.*, **6**, 178-182.
- Hermann, G.J., King, E.J. und Shaw, J.M. (1997). The yeast gene, *MDM20*, is necessary for

- mitochondrial inheritance and organization of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, **137**, 141-153.
- Hermann, G.J. und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**, 265-303.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J. und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.*, **143**, 359-373.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D. und Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*, **102**, 577-586.
- Jensen, R.E., Hobbs, A.E., Cervený, K.L. und Sesaki, H. (2000). Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc. Res. Tech.*, **51**, 573-583.
- Johnson, L.V., Walsh, M.L. und Chen, L.B. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **77**, 990-994
- Jones, B.A. und Fangman, W.L. (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.*, **6**, 380-389.
- Käser, M. und Langer, T. (2000). Protein degradation in mitochondria. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **11**, 181-190.
- Käser, M. (2001). Untersuchungen proteolytischer Prozesse in der Innen- und Außenmembran von Mitochondrien. *Dissertation, LMU, München*
- Kerscher, O., Hieter, P., Winey, M. und Basrai, M.A. (2001). Novel role for a *Saccharomyces cerevisiae* nucleoporin, Nup170p, in chromosome segregation. *Genetics*, **157**, 1543-1553
- Kipreos, E.T. und Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biol.*, **1**, REVIEWS3002.1-3002.7
- Klanner, E. (2001). Das mitochondriale Fusionsprotein Fzo1: Potentielle Interaktionspartner und Bedeutung für die mitochondriale Morphologie. *Dissertation, LMU, München*
- Kormanec, J., Schaaff-Gerstenschlager, I., Zimmermann, F.K., Perecko, D. und Kuntzel, H. (1991). Nuclear migration in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the highly repetitive 313 kDa NUM1 protein. *Mol. Gen. Genet.*, **230**, 277-287.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. und Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 4343-4354.
- Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 53-67.
- McConnell, S.J., Stewart, L.C., Talin, A. und Yaffe, M.P. (1990). Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.*, **111**, 967-976.
- McConnell, S.J. und Yaffe, M.P. (1992). Nuclear and mitochondrial inheritance in yeast depends on novel cytoplasmic structures defined by the MDM1 protein. *J. Cell Biol.*, **118**, 385-395.
- Mozdy, A., McCaffery, J.M. und Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fusion is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.*, **151**, 367-379.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I. und Hayashi, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA, *Nat. Med.*, **7**, 934-940.

- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 863-917.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W. und Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1233-1242.
- Okamoto, K., Perlman, P.S. und Butow, R.A. (2001). Targeting of green fluorescent protein to mitochondria. *Methods Cell Biol.*, **65**, 277-283.
- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., Ducommun, B., Lenaers, G. und Belenguer, P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the intermembrane space, *FEBS Lett.*, **523**, 171-176.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. und Hayashi, J.I. (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.*, **28**, 272-275.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W. und Shaw, J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.*, **143**, 333-349.
- Patton, E.E., Willems, A.R. und Tyers, M. (1998). Combinatorial control in ubiquitin dependent proteolysis: Don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.*, **14**, 236-243.
- Pon, L. und Schatz, G. (1991). Biogenesis of yeast mitochondria. In Broach, J.R., Pringle, J.R. und Jones, E.W. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Genome dynamics, protein synthesis, and energetics. *Cold Spring Harbor Press*, 333-406.
- Prinz, W.A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J.A., Silver, P.A. und Rapoport, T.A. (2000). Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **150**, 461-474.
- Raha, S. und Robinson B. H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends biochem. Sci.*, **25**, 502-508.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. und Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20150-20155.
- Rinaldi, T., Ricci, C., Porro, D., Bolotin-Fukuhara, M. und Frontali, L. (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.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. und Lombes, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.*, **115**, 1663-1674.
- Rose, M.D., Winston, F. und Hieter, P. (1990). Methods in Yeast Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Santel, A. und Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.*, **114**, 867-874.
- Scheffler I. E. (2001). Mitochondria: Structure and Morphology: Integration into the cell. *Mitochondrion* 3, 15-45.
- Sesaki, H. und Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.*, **147**, 699-706.

- Sesaki, H. und Jensen, R.E. (2001). *UGO1* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.*, **152**, 1123-1134.
- Shaw, J.M. und Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.*, **12**, 178-184.
- Shepard, K.A. und Yaffe, M.P. (1999). The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.*, **144**, 711-720.
- Sherman, F., Fink, G.R. und Hicks, J. (1986). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sikorski, R.S. und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Simon, V.R., Swayne, T.C. und Pon, L.A. (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.
- Skowrya, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J. und Harper, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, **91**, 209-219.
- Skulachev, V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 23-29.
- Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1994). Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.*, **130**, 1361-1373.
- Stewart, L.C. und Yaffe, M.P. (1991). A role for unsaturated fatty acids in mitochondrial movement and inheritance. *J. Cell Biol.*, **115**, 1249-1257.
- Susin, S.A., Zamzami, N. und Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 151-165.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. und Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, **402**, 371-372.
- Sutovsky, P. (2003). Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc. Res. Tech.*, **61**, 88-102.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. und De Camilli, P. (1996). The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J. Cell Biol.*, **133**, 1237-1250.
- Thorsness, P.E. und Fox, T.D. (1993). Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. *Genetics.*, **134**, 21-28
- Tieu, Q. und Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.*, **151**, 353-365.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350-4354.
- Tzagoloff, A. und Dieckmann, C.L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **54**, 211-225.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. und Rothberg, J.M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-627.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali,

- Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Latchmann, D.S., Harvey, R.J., Dalla piccola, B., Auburger, G. und Wood, N. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutation in PINK1. *Science*, **304**, 1158-1160.
- van der Bliek, A.M. (2000). A mitochondrial division apparatus takes shape. *J. Cell Biol.*, **151**, F1-4.
- Wallace, D. (1999). Mitochondrial disease in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1488.
- Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes. Dev.*, **15**, 2922-2933.
- Westermann, B. (2002). Merging mitochondria matters: Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep.*, **3**, 527-531.
- Westermann, B. und Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **16**, 1421-1427.
- Winston, J.T., Koepf, D.M., Zhu, C., Elledge, S.J. und Harper, J.W. (1999). A family of mammalian F-box proteins. *Curr. Biol.*, **9**, 1180-1182.
- Winzler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Leibundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. und Davis, R.W. (1999). Functional Characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901-906.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. und Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.*, **151**, 341-352.
- Yaffe, M.P. (1999a). Dynamic mitochondria. *Nat. Cell. Biol.*, **1**, E149-E150.
- Yaffe, M.P. (1999b). The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science*, **283**, 1493-1497.
- Yoon, Y. und McNiven M.A. (2001). Mitochondrial division: new partners in membrane pinching. *Curr. Biol.*, **11**, R67-R70.
- Züchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M., Vance, J.M. und Battaloglu, E. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.*, **36**, 660.

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

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

Fritz, S.\*, Weinbach, N.\* und Westermann, B. (2003). Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2303-2313

\*diese Autoren lieferten jeweils gleichwertige Beiträge

## **Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die lehrreiche und schöne Zeit an seinem Institut, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für seine Unterstützung.

Besonders herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Benedikt Westermann, in dessen Arbeitsgruppe meine Arbeit entstand. Durch seine vielfältigen Anregungen und Ideen hat er am Gelingen meiner Arbeit einen entscheidenden Anteil. Für seine Unterstützung und Geduld bin ich sehr dankbar.

Bei Kai-Stefan Dimmer, Stefan Fritz, Florian Fuchs und Marlies Messerschmitt möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Besonderer Dank gilt auch Gabi Ludwig, unter deren Anleitung ich mein erstes Experiment im Institut durchführte.

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

## Lebenslauf

15.06.1977	geboren in Grünstadt als Tochter von Dr. med. Walter Weinbach und Ass. jur. Heike Weinbach, geb. Fehlinger
1983-1987	Grund- und Hauptschule Westhofen
1987-1996	Rudi-Stephan-Gymnasium Worms
1996	Abitur
10/1996-03/1997	Studium der Pharmazie an der Johannes Gutenberg Universität
03/1997-03/1999	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg Universität Mainz
03/1999-03/2004	Studium der Humanmedizin an der TU München
05/2004	Abschluss des Studiums mit dem 3. Staatsexamen
seit 11/2000	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München
seit 10/2004	Wissenschaftliche Assistentin an der Klinik für Nuklearmedizin des Klinikums rechts der Isar in München