
Qualitätskontrolle der mitochondrialen DNA in *S. cerevisiae*

Sean Christopher Jakubke



München, 2023

Qualitätskontrolle der mitochondrialen DNA in *S. cerevisiae*

Sean Christopher Jakobke

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Im Fachbereich Zellbiologie
zur Erlangung des Doktorgrades

Eingereicht von
Sean Christopher Jakobke

München, den 02.02.2023

Erstgutachter: Prof. Dr. Christof Osman
Zweitgutachter: PD Dr. Cordelia Bolle
Drittgutachter: Prof. Dr. Niels Dingemanse
Viertgutachter: Prof. Dr. Charles N. David
Fünftgutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung
Sechstgutachter: Dr. Dejana Mokranjac

Tag der Abgabe: 02.02.2023

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2023

Eidesstattliche Versicherung und Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 17.07.2023 Sean Christopher Jakubke

Hiermit erkläre ich,

dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

München, den 17.07.2023 Sean Christopher Jakubke

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Auflistung der Publikationen	8
Publikation 1:.....	8
Publikation 2:.....	8
Bestätigung über die Co-Autorenschaft.....	9
Übergreifende Zusammenfassung	10
Combined Abstract	12
Zielsetzung dieser Arbeit	14
Einleitung.....	15
Ursprung der Mitochondrien und der mitochondrialen DNA.....	15
Aufbau und Funktion der Atmungskette in Hefe	17
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	20
Mitochondriale Struktur	22
Mitochondriale Fusion und Fission in Hefe	24
Cristae-Morphologie und Funktion	26
Mitochondriale Krankheiten	29
Qualitätssicherung der mtDNA	30
Publikation 1: „Cristae-dependent quality control of the mitochondrial genome”	33
Publikation 2: „YeastMate: Neural network-assisted segmentation of mating and budding events in <i>S. cerevisiae</i> ”	80

Diskussion	83
Verteilung der Proteine während der Fusion zweier mitochondrialer Netzwerke in Hefe .	83
Qualitätssicherung der mitochondrialen DNA	84
Markierung von mtDNA kodierten Proteinen der Atmungskette.....	86
Einfluss der Cristae-Struktur auf die mitochondriale Qualitätssicherung.....	88
Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit.....	91
Modell zum Einfluss der Cristae-Morphologie auf die mtDNA Qualitätssicherung.....	92
Einordnung der Ergebnisse in die bisherige Forschung	93
Experimenteller Ausblick.....	94
Klinische Relevanz	98
Literaturverzeichnis	99
Danksagung	117

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
COX	Cytochrom C Oxidase
Curt1	Curvature Thylakoid 1
DNA	Desoxyribonukleinacid
EM	Elektronenmikroskop
IMM	innere mitochondriale Membran
IMR	Intermembranraum
MGM1	Mitochondrial Genome Maintanance 1
MICOS	mitochondrial contact site and cristae organizing system
mtDNA	mitochondriale DNA
NG	NeonGreen
OMM	äußere mitochondriale Membran
ORF	Open-Reading-Frame
Pi	freies Phosphat
ROS	Reactive Oxygen Spezies
SU	Untereinheit
TIM	Transporter der inneren mitochondrialen Membran
TOM	Transporter der äußeren mitochondrialen Membran
WT	Wildtyp

Auflistung der Publikationen

Publikation 1:

C. Jakubke, R. Roussou, A. Maiser, C. Schug, F. Thoma, D. Bunk, D. Hörl, H. Leonhardt, P. Walter, T. Klecker and C. Osman. Cristae-dependent quality control of the mitochondrial genome. *Sci Adv.* 2021 Sep 3;7(36):eabi8886. doi: 10.1126/sciadv.abi8886. Epub 2021 Sep 1. PMID: 34516914; PMCID: PMC8442932.

Publikation 2:

D. Bunk, J. Moriasy, F. Thoma, C. Jakubke, C. Osman and D. Hörl. YeastMate: neural network-assisted segmentation of mating and budding events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics.* 2022 Apr 28;38(9):2667-2669. doi: 10.1093/bioinformatics/btac107. PMID: 35179572; PMCID: PMC9048668.

Bestätigung über die Co-Autorenschaft

Im Rahmen dieser kumulativen Dissertation wurde die erste Publikation mit dem Titel: „Cristae-dependent quality control of the mitochondrial genome“ als Co-Autor zusammen mit Rodaria Roussou angefertigt.

Die Abbildungen 1 und 2 wurden eigens von mir angefertigt und die dazugehörigen Experimente wurden ebenfalls eigens von mir durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Abbildungen 3E und 3F im Hauptteil dieser Arbeit, sowie die Aufnahmen in der Abbildung S8 im Anhang, wurden von Christina Schug und Till Klecker aus der Universität Bayreuth angefertigt und ausgewertet.

Moritz Kröker und Rodaria Roussou haben maßgeblich zu der Datenerhebung und der statistischen Auswertung der Experimente in den Abbildungen 3A – 3D beigetragen.

Rodaria Roussou übernahm die komplette inhaltliche Überarbeitung des Textes, nach der ersten Einreichung bei den Editoren. Alle Experimente, die daraufhin nachträglich von den Editoren gefordert wurden, wurden ebenfalls von Rodaria Roussou und Felix Thoma durchgeführt. Dies beinhaltet ebenfalls die Abb. S1B und S1C sowie S2A und S8 im Anhang.

Prof. Dr. Christof Osman übernahm den Großteil der experimentellen Planung dieses Projektes. Felix Thoma war maßgeblich an der statistischen Auswertung beteiligt.

Rodaria Roussou

München, den 17.07.2023

Christopher Jakobke

München, den 17.07.2023

Übergreifende Zusammenfassung

Die mitochondriale DNA (mtDNA) kodiert für essentielle Untereinheiten der Atmungskette. Mutationen der mtDNA können dazu führen, dass die Zelle ihre Fähigkeit verliert Energie über die Atmungskette zu generieren. Des Weiteren können solche mtDNA Mutationen im Menschen schwerwiegende Krankheiten wie Alzheimer oder Huntington fördern. Wie die Zelle die Integrität und Qualität ihrer mtDNA gewährleistet ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollkommen aufgeschlüsselt worden.

In dieser Arbeit wird untersucht, inwiefern der einzellige eukaryotische Organismus *Saccharomyces cerevisiae* im Stande ist zwischen mutierter und intakter mtDNA zu unterscheiden. Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass Tochterzellen im Vergleich zu deren Mutterzellen, über signifikant mehr intakte mtDNA verfügen. Weiterhin wird aufgezeigt, welche Gene und strukturelle Veränderungen innerhalb der Zellen zu einer Beeinträchtigung der Qualitätssicherung beitragen.

Auf Basis der durchgeführten Experimente wurde ersichtlich, dass die Qualitätssicherung der mtDNA, entgegen einer verbreiteten Annahme, nicht auf dem Prozess der Fission, sondern mehr auf der Aufrechterhaltung einer intakten mitochondrialen Struktur beruht. Der Prozess der Autophagie stellt ebenfalls für die Detektion intakter mtDNA keine Relevanz dar. Ein Kernelement bildet die Erkenntnis, dass vor allem die Cristae-Morphologie maßgeblich an der Qualitätssicherung der mtDNA beteiligt ist. Eine Deletion der an der Cristae-Struktur involvierten Gene $\Delta atp20$, $\Delta atp21$, $\Delta mic10$ oder $\Delta mic60$ führt zu einem Verlust der Qualitätskontrolle gegenüber dem Wildtyp (WT). Außerdem wurde genetisch veränderte Hefe verwendet, um zu beweisen, dass die mtDNA ihre Proteine an nahegelegene Atmungsketten-Komplexe überträgt. Diese Abgabe, welche auf einer intakten Cristae-Morphologie basiert, ist lokal streng kontrolliert und limitiert.

Die Diffusion der mtDNA wird hingegen in den untersuchten Mutanten nicht beeinträchtigt. Dies könnte auf eine interne Verankerung der mtDNA hindeuten.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der untersuchten $\Delta atp20$, $\Delta atp21$ und $\Delta atp20\Delta atp21$ Mutanten weisen Septen als dominierende interne Strukturen auf. Innerhalb dieser Strukturen ist es der Zelle nicht möglich, die nun stark diffundierenden Proteine eindeutig der mutierten oder intakten mtDNA zuzuordnen.

Abschließend kann somit aufgezeigt werden, dass Hefezellen eine Unterscheidung zwischen intakter und defekter mtDNA vornehmen. Dies konnte sowohl in größeren Populationen als auch auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Defekte Cristae-Strukturen führen zu einer Beeinträchtigung der Qualitätssicherung. Somit ist eine intakte mitochondriale Struktur der Cristae der Schlüsselpunkt zur mitochondrialen Qualitätssicherung.

Im Laufe dieser Arbeit wurden wir mit einigen limitierenden Faktoren in der Daten- und Bildanalyse konfrontiert. Eine Erhöhung der Probenanzahl, die in einigen der mikroskopischen Experimenten verwendet wurden, führte zu einer aussagekräftigeren Statistik. Das Alignment der zwei Fluoreszenzkanäle, die Nachbearbeitung der Bilder, sowie die finale Statistik, stellte uns vor neue Herausforderungen. Im Rahmen einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Leonhardt der LMU haben wir die erwähnten limitierenden Faktoren adressieren können. Die AG Leonhardt kombiniert ein umfangreiches Verständnis verschiedenster mikroskopischer Verfahrenstechniken, mit dem Wissen große Datenmengen über Deep-Learning Algorithmen auszuwerten. So entwickelten wir gemeinsam den YeastMate-Algorithmus.

Basierend auf den aufgenommenen Hellfeldaufnahmen überlagerte die Software die mit separaten Kameras aufgenommenen Fluoreszenzkanäle auf den Pixel genau und erstellte eine Maske, um Hefezellen zu identifizieren, welche unseren vorab definierten Kriterien entsprachen. Die Software sollte ausschließlich Bereiche mit Hefezellen detektieren, welche aus zwei verpaarten Zellen inklusive einer neu entstandenen Tochterzelle bestanden. Diese Zellen wurden anschließend einzeln aus dem Gesamtbild ausgeschnitten und für die weitere Analyse abgelegt. Die Software ermöglichte es ebenfalls Zellen über mehrere Zellteilungen hinweg zu verfolgen und Knospungsereignisse zu detektieren.

Am Ende hat uns dieser Algorithmus geholfen, alle Prozesse der Bildbearbeitung erheblich zu vereinfachen und zu beschleunigen, so konnte die Anzahl der verwendeten Proben für einige Analysen drastisch erhöht werden. Ein weiterer positiver Effekt war es, dass subjektive Einflüsse minimiert werden konnten, da alle Bilder identisch über die Software verarbeitet und bearbeitet wurden.

Combined Abstract

The mitochondrial genome (mtDNA) encodes for essential subunits of the mitochondrial respiratory chain and the ATP synthase. Mutations of the mtDNA can cause shortage in cellular energy supply, which can contribute to a multitude of mitochondrial diseases in humans, like metabolic strokes, arrhythmias or cognitive disabilities. Therefore, it is essential for a cell and its progeny, to promote a healthy mtDNA state. How cells secure mtDNA integrity over generations remains still unclear. In this work, we show that the single-celled yeast *Saccharomyces cerevisiae* can intracellularly distinguish between intact and defective mtDNA and promote a generation of daughter cells with healthy mtDNA content. Selection for intact mtDNA occurs in a continuous mitochondrial network in the absence of mitochondrial fission and autophagy, but requires normal cristae morphology. A deletion of genes, which are essential for a normal cristae-morphology, e.g. $\Delta atp20$, $\Delta atp21$, $\Delta mic10$ or $\Delta mic60$, cause a defect in detection and selection towards healthy mtDNA. Using genetically modified mtDNA, we show that mtDNA supplies proteins to mitochondrial subdomains, whose stability depends on normal cristae morphology. Here we propose that mtDNA determines functionality of mitochondrial subdomains in a cristae dependent manner, which facilitates clearance of mutant mtDNA from daughter cells. Furthermore, the diffusion of mtDNA is not affected by the deletion of cristae-morphology proteins, indicating the presence of a mtDNA tether, holding the mtDNA at distinct places in the mitochondrial network. Electron microscopic images illustrate septea in $\Delta atp20$, $\Delta atp21$ and $\Delta atp20\Delta atp21$ deletion strains. Those strains show increased diffusion of mtDNA-encoded and nuclear-encoded proteins of the respiratory chain compared to WT cells. This could explain the defect in mtDNA quality control, which could be a direct result of the altered cristae morphology.

During this work we were facing some limiting factors in the data and imaging analysis. We had to drastically increase the number of samples, which have been analyzed in some of the microscopic assays, to perform more powerful and valid statistics. We were faced with new technical problems due to the alignment of the used fluorescent channels, the post processing of the images, as well as the final statistics. We collaborated with the group of Prof Leonhardt. The AG Leonhardt of the LMU combines a good understanding of fluorescent microscopy as well as large sample analysis and deep learning algorithms. During this collaboration we created the user-friendly YeastMate-Software. The YeastMate-Algorithm was the solution to

the mentioned problems. Based on the brightfield images, the Software created a mask to identify and crop yeast cells which were matching our expectations. It also performs the alignment of the two used fluorescent channels and could also follow cells in their lifespan and detect a budding event.

In the end the algorithm helped us to significantly simplify and speed up this process and also it helped us to reduce the risk of a bias in image editing and post processing of the microscopic images. It drastically increase the amount of samples which were used for the finals plots and statistics.

Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit zielt darauf ab, offene Fragestellungen im Feld der mtDNA Qualitätssicherung zu beantworten. So wird eingangs untersucht, ob Hefen überhaupt in der Lage sind zwischen intakter oder defekter mtDNA zu unterscheiden. Denn wie bereits oben beschrieben, könnten Mutationen in der mtDNA zu einer Verringerung der mitochondrialen Leistung führen. Diese Mutationen würden begünstigen, dass die Atmungskette ineffizient Energie produziert. Dieser Defekt im Protonengradienten oder in der Gewinnung von ATP könnte von der Zelle dafür genutzt werden, um Bereiche der Mitochondrien zu detektieren in denen mutierte mtDNA vorliegt. Um diese Theorie zu untersuchen, müssen folgende Experimente durchgeführt werden. Zu Beginn muss ein experimentelles heteroplasmatisches System der mtDNA in den Hefezellen erzeugt werden. Dies bedeutet, dass vorab sichergestellt werden muss, dass die zu untersuchenden Zellen, sowohl intakte als auch defekte mtDNA aufweisen. Dies stellt die Grundlage für alle weiteren Experimente dar. Denn nur in solch einem heteroplasmatischen Setup ist es den Hefezellen überhaupt ermöglicht, zwischen intakter und defekter mtDNA zu unterscheiden. Weiterführend sollten die Auswirkungen auf das tubuläre Netzwerk analysiert werden, um die zugrundeliegenden Mechanismen der mitochondrialen Qualitätssicherung in Hefen zu untersuchen.

Zudem wurde zuvor gezeigt, dass Mutationen von Atp20 oder Atp21 zu großen Veränderungen in der Cristae Morphologie führen. Daher wird versucht eine Verbindung der Cristae Morphologie zur Qualitätssicherung in Hefe aufzuzeigen.

All diese Fragestellungen wurden primär über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Videos beantwortet. Aufgrund der enormen Daten- und Bildmenge der einzelnen Experimente wurde in Zusammenarbeit mit der AG Leonhardt der YeastMate Algorithmus entworfen und vielfach angewendet. Dieser Algorithmus vereinfachte die Bildbearbeitung und die Auswertung deutlich und reduzierte zugleich menschliche Fehler. Nur aufgrund dieses Algorithmus konnte ein großes Datenvolumen generiert und ausgewertet werden.

Einleitung

Ursprung der Mitochondrien und der mitochondrialen DNA

Mitochondrien sind vor 1,5 Milliarden Jahren durch den Prozess der Endosymbiose entstanden. Hierbei wurde ein Alphaproteobakterium von einem Archaeobakterium als Wirt aufgenommen. Dieses Bakterium übernahm für die Zelle wichtige Prozesse der Energiegewinnung und wurde im Gegenzug von der Wirtszelle mit essentiellen Nährstoffen versorgt. Aus dieser Symbiose gingen die ersten Mitochondrien hervor (Dyall, 2014). Im Laufe der Evolution sind immer größere Teile der bakteriellen Ursprungs-DNA an den Wirt abgegeben worden. Ein kleiner Teil des Ausgangs-Genoms blieb jedoch in den neu entstandenen Mitochondrien zurück. Die Abb. 1 zeigt exemplarisch den oben beschriebenen Prozess der Endosymbiose und den Transfer der Bakterien-DNA an den Wirt.

Die mtDNA der Bäcker- und Brauereihefen *Saccharomyces cerevisiae* beinhaltet acht

Protein-kodierende Gene. Jedes einzelne dieser Gene ist essentiell für die Energiegewinnung über die Mitochondrien. Folglich resultiert ein Schaden, eine Mutation oder ein Verlust eines dieser Gene darin, dass die Hefen keinerlei Energie über die Atmungskette generieren können. Die acht mtDNA kodierten Gene sind: *ATP6*, *ATP8*, *ATP9*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *COB* und *VAR1*. Sieben der Gene kodieren für essentielle Proteine der Atmungskette. Ohne deren Existenz könnten die Multi-Protein-Komplexe nicht assembliert werden. Im Detail bilden Atp6, Atp8 und Atp9 Kernelemente des Komplex V der ATP-Synthase. Cox1, Cox2 und Cox3 bilden den strukturellen Kern des Komplex IV, die Cytochrom-c-Oxidase. Das Cytochrom b (Cob) ist

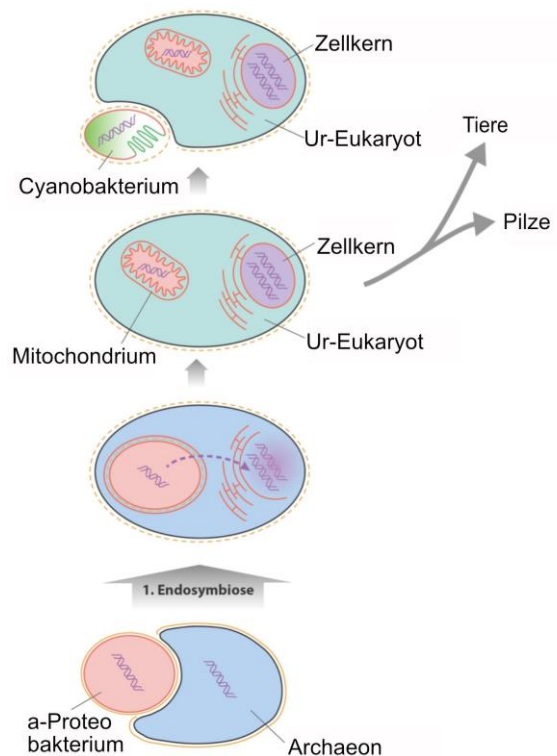


Abbildung 1: Entstehung der ersten Mitochondrien. Die Aufnahme eines alpha-Proteobakteriums und die Abgabe der DNA des Wirtes führen zu der Entstehung der ersten Mitochondrien und der mtDNA. Die Mitochondrien innerhalb der Zelle sind von einer Doppelmembran umschlossen, welche essentiell für die Energiegewinnung ist. In einem nachfolgenden endosymbiotischen Ereignis, wurde zudem ein Cyanobakterium von dem neu entstandenen Eukaryoten aufgenommen. Dies resultierte in den ersten Chloroplasten. Entnommen und abgeändert von Evolutionsweg.de (2021).

maßgeblich für die erfolgreiche Assemblierung des Komplex III, auch Cytochrome-c-Reduktase genannt. Das achte Gen, *Var1*, kodiert für ein Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen und ist daher essentiell für die mitochondriale Translation (Hudspeth, 1984). Des Weiteren kodiert die mtDNA für 2 rRNAs, 24 tRNAs und die 9s RNA-Untereinheit der RNaseP (Miyakawa, 2017). Die Beteiligung dieser Elemente an der Transkription und Translation der mtDNA kodierten Proteine ist substantiell. Die mtDNA liegt im Unterschied zu der nukleären DNA, welche im Zellkern nur in einer einzigen Kopie vorliegt, über das gesamte mitochondriale Netzwerk in mehreren Kopien vor.

Im nachfolgenden Abschnitt wird der Aufbau und die Funktion der Atmungskette zusammengefasst. Primär stehen die Gene *ATP6* und *COB* im Fokus der durchgeführten Experimente dieser Arbeit.

Aufbau und Funktion der Atmungskette in Hefe

Die Atmungskette ist der Ort der Zellen in dem die Zellatmung, oder auch Respiration genannt, stattfindet. Sie ist einer der wichtigsten zellulären Stoffwechselprozesse in Eukaryoten um Energie zu gewinnen. Um freies Phosphat (P_i) an Adenosindiphosphat (ADP) zu binden und somit Adenosintriphosphat (ATP) zu erzeugen sind folgende Prozesse notwendig:

1. Die Erzeugung eines Protonengradienten entlang der IMM
2. Eine Weitergabe von Elektronen über Enzymkomplexe um Energie für den Aufbau des Protonengradienten zu erzeugen
3. Die Verwendung von Sauerstoff als Elektronenakzeptor (Devenish, 2000)

Diese Prozesse werden in Hefen über vier Proteinkomplexe gewährleistet, welche fest in der IMM inseriert vorliegen (Boumans, 1998). Dieser Prozess kann nur gewährleistet werden, weil die Mitochondrien, wie in der Abb. 1 gezeigt, über eine innere Membran verfügen. Diese innere mitochondriale Membran ist selektiv permeabel und undurchlässig für alle geladenen Teilchen wie Wasserstoffprotonen (Lemasters, 2007). Diese physikalische Eigenschaft ist essentiell, um einen Gradienten aufzubauen. Der Aufbau der Atmungskette, der oben genannte Protonengradient und die Energiegewinnung in den Mitochondrien, werden im nächsten Abschnitt genauer beleuchtet.

Das übergeordnete Ziel der Atmungskette ist es, mit Hilfe der Übertragung von Elektronen, H^+ -Protonen von der Matrix in den Intermembranraum (IMR) zu befördern. Diese Elektronen werden schlussendlich an Sauerstoff übertragen, welches zu Wasser reduziert wird (Joseph-Horne, 2001; Tielens, 1998; Ohnishi, 1966). Außerdem werden diese Protonen- und Elektronen-Gradienten dazu genutzt um ATP zu generieren (Devenish, 2000; Nilsson, 2016). ATP ist einer der wichtigsten Energieträger der Zellen und wird für viele Stoffwechselprozesse verwendet (Neupane, 2019).

Im Zitratzyklus, welcher in der Matrix der Mitochondrien abläuft, werden jeweils freie Wasserstoffprotonen (H^+) an FAD^+ und NAD^+ gebunden, um aus ihnen $FADH_2$ und $NADH$ zu erzeugen (Kanetsuna, 1966). Diese Moleküle $FADH_2$ und $NADH$ werden anschließend in der Atmungskette verstoffwechselt.

Im Gegensatz zu weiterentwickelten Säugetieren wie den Menschen, besitzen Hefen keinen Komplex I, der ebenfalls Protonen in das IMR-Lumen pumpt (Boumans, 1998). Als Ausgleich für den Komplex I besitzen Hefen die NADH-Dehydrogenase. Diese wird auch als Ndi1p bezeichnet und liegt ebenfalls in der IMM verankert vor (Lasserre, 2015). $FADH_2$ gibt die

Elektronen wiederum an den Komplex II, NADH gibt Elektronen an den Ndi1p Komplex der Atmungskette ab.

Diese Komplexe pumpen aktiv H^+ -Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum und entgegen des dort vorkommenden Gradienten an H^+ -Protonen. Dieser Transport von Elektronen verläuft verkettet über die Komplexe II, III und IV und wird daher als Elektronentransportkette bezeichnet (De Vries, 1987). Anfangs werden jeweils zwei Elektronen pro $FADH_2$ -Molekül an den Komplex II (Succinatdehydrogenase) übertragen. Weitere zwei Elektronen werden pro NADH-Molekül über den Ndi1p-Komplex transportiert. Dieser Elektronenfluss wird über das, ebenfalls in die IMM inserierte, Coenzym Q bewerkstelligt (Tielens, 1998). Die Weitergabe der Elektronen zum Komplex IV, findet über das Cytochrom c statt. Der Komplex IV wird als Cytochrom c Oxidase (COX) bezeichnet, da dieser nun den Sauerstoff als finalen Elektronenakzeptor nutzt und diesen schlussendlich zu Wasser reduziert (Tielens, 1998; Van der Blik, 2017).

Der über die Komplexe III und IV erzeugte Protonengradient zwischen der Matrix und dem Cristae-Lumen wird im letzten Schritt durch den Komplex V (FoF1-ATP-Synthase) genutzt. Hierbei wird eine Rotation der beweglichen Untereinheit des Komplex V angetrieben, welche ein "freies Phosphat" (P_i) an ADP bindet und somit ein Molekül ATP generiert (Ito, 2013 und Stock, 1999 und Abrahams, 1994). Später werden die erzeugten ATP-Moleküle über die ADP-ATP-Translokasen aus der Matrix der Mitochondrien in den IMR und weiter in das Zytosol der Zelle befördert (Pereira, 2007; Boumans, 1998). Die Abb. 2 zeigt den Aufbau der in der IMM inserierten Enzymkomplexe, die Übertragung und den Weg der H^+ -Protonen in den IMR, sowie die Funktion der Atmungskette von Hefen. Außerdem wird hier die finale Produktion des ATPs, sowie der ADP/ATP-Austausch über beide mitochondrialen Membranen hinweg verdeutlicht.

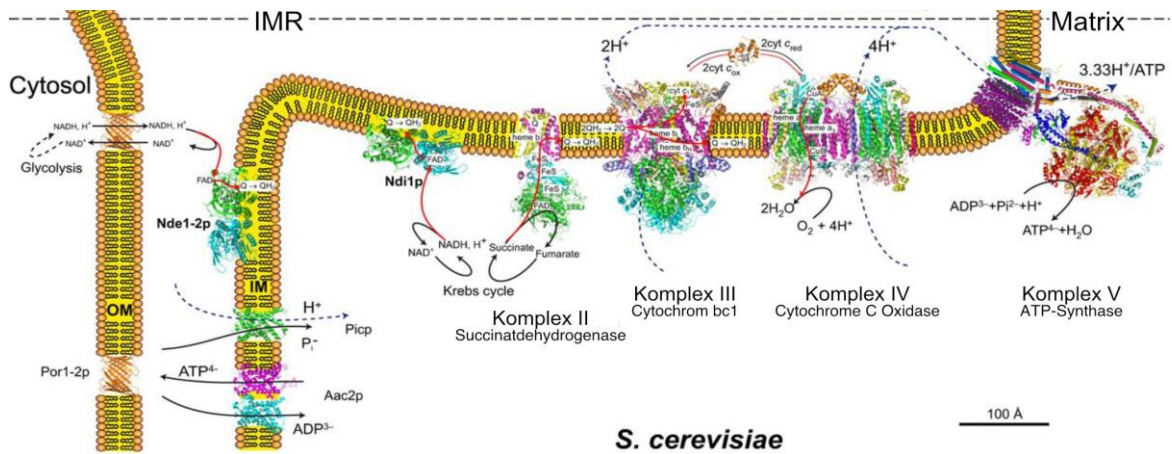


Abbildung 2: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung und der Atmungskette der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die in der mtDNA kodierte Proteine werden in die Cristae-Membranen inseriert. Sie dienen als Kernelemente der Atmungsketten-Komplexe. In Hefen dienen die Komplexe III und IV dazu H^+ Protonen in das Cristae Lumen zu pumpen. Dadurch entsteht ein Protonengradient, welcher vom Komplex V dazu genutzt wird freies Phosphat an ADP zu binden, wodurch ATP generiert wird. Entnommen und modifiziert von Lasserre et al. (2015)

Saccharomyces cerevisiae als Modellorganismus

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein Modellorganismus für diverse zellbiologische Forschungsgebiete. Sie findet in der mitochondrialen Forschung Anwendung, da Hefen leicht zu kultivieren sind und sich ihr Genom einfach verändern lässt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass nicht nur die nukleäre DNA, sondern auch ihre mtDNA verändert werden kann (Lasserre, 2015). So können zum Beispiel einzelne Gene der mtDNA deletiert werden, oder wie in dieser Arbeit gezeigt wird, auch mtDNA kodierte Untereinheiten mit Fluoreszenz-Proteinen markiert werden.

Ein weiterer positiver Aspekt dieses Modellorganismus ist die Tatsache, dass sowohl die nukleäre DNA, als auch die mtDNA der Hefen sequenziert vorliegt. Somit können die DNA-Sequenzen von Mutanten mit denen des WT verglichen werden, um artifiziell induzierte oder zufällige Mutationen zügig zu erkennen. Dies hat den Effekt, dass Veränderungen zum Beispiel im Metabolismus oder der Energiegewinnung von Mutanten auf die jeweiligen Bereiche in der DNA zurückverfolgt werden können. Zudem können zielgerichtet Punktmutationen in das Genom eingeführt werden, da sowohl das Genom, als auch das Proteom bekannt sind. Daraus resultiert, dass Mutanten mit einem gewissen Phänotypen oder einem gezielten Defekt zielgerichtet und artifiziell erzeugt werden könnten.

Der Großteil der mitochondrialen und nukleären Gene ist im Laufe der Evolution stark konserviert. Dieser Umstand führt dazu, dass die selben Proteine, die in den Hefen für die Energiegewinnung zuständig sind, auch in höher entwickelten Spezies eine essentielle Rolle in der Energiegewinnung spielen. Somit können Erkenntnisse aus der mitochondrialen Hefeforschung auf den Menschen übertragen werden (Shadel, 1999).

Ein Kernelement dieser Arbeit stellt die Fähigkeit von *S. cerevisiae* dar, ohne die mtDNA oder essentielle und kernkodierte Proteine der Atmungskette, dennoch Energie produzieren zu können (Botstein, 2011). Die Energiegewinnung ohne Mitochondrien wird über die Fermentation von Einfachzuckern wie Glukose sichergestellt. Als Abfallprodukt entsteht bei dieser Gärung Alkohol in Form von Ethanol, welcher schon seit Jahrhunderten von den Menschen verwendet wird und der Bäcker- und Brauereihefe ihren Namen verleiht.

Werden Hefen jedoch unter der Abwesenheit von Glukose, beispielsweise auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol oder Glycerol angezogen, können sie Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) nur über die Atmungskette erzeugen. Dies setzt jedoch voraus, dass die Hefen über ein intaktes mitochondriales Genom und eine

funktionierende Atmungskette verfügen. Somit kann untersucht und verglichen werden, welchen Effekt Deletionen von Genen auf die Energieproduktion der Mitochondrien und den Stoffwechsel der Zelle hat, indem jeweilige Mutanten entweder auf fermentierbaren oder nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen angezogen werden (Lippuner, 2014).

Mitochondriale Struktur

Anknüpfend an den vorher beschriebenen Prozess der Endosymbiose resultieren die Mitochondrien aus der Aufnahme eines Bakteriums in die Wirtszelle. Während des Vorgangs der Endosymbiose wurde das Alphaproteo-Bakterium von einem Archaeobakterium umschlossen. Dieser Vorgang wird auch Phagozytose genannt. Während der Phagozytose wurde das Alphaproteo-Bakterium von einer phagozytotischen Membran umschlossen (Martin, 2017). Da der Endosymbiont ebenfalls von einer eigenen Membran umschlossen war, resultiert daraus, dass die heutigen Mitochondrien von einer Doppelmembran umgeben sind (Martin, 2017). Diese zwei Membranen werden als äußere mitochondriale Membran (OMM) und innere mitochondriale Membran (IMM) bezeichnet. Der Zwischenraum dieser Membranen wird Intermembranraum (IMR) genannt. Das Zentrum der Mitochondrien, die Matrix, beinhaltet die mtDNA. Hier werden die mtDNA kodierten Proteine der Atmungskette transkribiert und translatiert und über den Oxa1- und Mba1-Proteinkomplex nach der Translation direkt in die IMM inseriert (Ott, 2010).

Die Tatsache, dass die Mitochondrien über zwei Membranen verfügen, führt dazu, dass alle Proteine und Substrate die aus den Mitochondrien heraus, sowie in die Mitochondrien importiert werden sollen, zwei Membranen überqueren müssen um zielgerichtet an ihren Platz zu gelangen. Um dies zu gewährleisten, verfügen die Membranen der Mitochondrien über hoch spezialisierte Kanäle, welche Stoffe durch die Membran befördern und aktiv gesteuerte Transporter, welche größere Stoffe und Proteine mittels einer Konformationsänderung auf die andere Seite einer Membran befördern können. Die Kanäle sind sowohl in der äußere- sowie in der innere mitochondriale Membran verankert. Sie bestehen aus Multiproteinkomplexen und gehören zu den Translokasen (Tokatidlis, 2000). Um zum Beispiel kernkodierte Proteine der Atmungskette in die Matrix der Mitochondrien zu befördern müssen diese Proteine beide Membranen überwinden. Die Translokasen der äußeren Membran werden TOM und die Translokasen der inneren Membran werden TIM genannt. Die TOM- und TIM-Komplexe sind hoch spezialisiert. Daher verfügen alle Proteine, die in die Mitochondrien hinein transportiert werden müssen, über spezielle Signal-Sequenzen. Diese Sequenzen leiten die Proteine zu deren Zielort, entweder in die OMM, die IMM, den IMR oder in die Matrix weiter (Jacobs, 2005; Mokranjac, 2010).

Beispielhaft für solch eine Präsequenz ist die Untereinheit 9 (SU9). Diese leitet Proteine nach deren Translation im Zytosol durch beide Translokasen in die Matrix der Mitochondrien

(Schmidt, 1983). In dieser Arbeit wird dieser Transportweg genutzt, um im Nukleus kodierte Fluoreszenz-Proteine gezielt in die Mitochondrien zu befördern (Horie, 2003). So wird beispielsweise ein SU9-mKate2 oder SU9-NeonGreen Fusionsprotein genutzt, um die gesamten Matrix der Mitochondrien in rot (mKate2) oder grün (NeonGreen) zu visualisieren.

Mitochondriale Fusion und Fission in Hefe

Anders als hinlänglich beschrieben, zeigt sich die Struktur intakter Mitochondrien der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als stark verzweigtes Netzwerk und nicht als einzelne Kompartimente (Egner, 2002). Dieses komplexe Netzwerk unterliegt ständigen Remodellierungsprozessen. Darunter fallen die Fusion und Abtrennung, auch Fission genannt, von Teilen oder Fragmenten des Netzwerks. Regelmäßige Teilungs- und Fusionsevents sind ein Anzeichen für ein intaktes und gesundes mitochondriales Netzwerk (Youle, 2012).

Die Fusion mitochondrialer Enden, respektive die Fusion der IMM, ist maßgeblich an der Neubildung von Cristae beteiligt. Die Cristae sind ausschlaggebend für die Energiegewinnung in den Mitochondrien. Denn sie sind der Ort, an dem die vorher beschriebenen Multiproteinkomplexe inseriert sind und über die Elektronentransportkette Energie erzeugt wird (Zick, 2009). Auf die genaue Funktion und die Morphologie der Cristae werde ich im nachfolgenden Abschnitt genauer eingehen.

Die Fusion der äußeren Membran erfolgt über die GTPase *FZO1*, die der inneren Membran über die GTPase "Mitochondrial Genome Maintenance 1" (*MGM1*) (Colina-Tenorio, 2020). Neuere Studien in Mäusen konnten zudem einen Zusammenhang der Fusion mit der Transkription der mtDNA herstellen. Hierbei führt ein Verlust der Fusion zu einem Verlust der stöchiometrischen Verteilung des Replisomes und damit zu einem Verlust an mtDNA (Ramos, 2019). Die mtDNA ist, wie bereits oben beschrieben, maßgeblich für die mitochondriale Energiegewinnung, da auf ihr die essentiellen Gene der Atmungskette kodiert vorliegen. Somit ist zu schlussfolgern, dass intakte Remodellierungsprozesse der mitochondrialen Membranen ebenfalls für die Energiegewinnung unabdingbar sind.

Die Fission hingegen beschreibt den Prozess, bei dem ein Teil der Mitochondrien aus dem bestehenden Netzwerk abgetrennt wird (Bleazard, 2013). An der Fission der Mitochondrien ist hauptsächlich das Protein Dnm1 beteiligt (Kondadi, 2019). Es wird angenommen, dass die Fission unter anderem an der Qualitätskontrolle der mitochondrialen DNA beteiligt sein könnte. Hierbei könnten mögliche Bereiche, welche defekte oder mutierte DNA beinhalten, aus dem bestehenden Netzwerk herausgetrennt werden und über den späteren Prozess der Mitophagie verdaut und beseitigt werden (Anzell, 2018).

Wie bereits oben beleuchtet, sind ständige Teilungs- und Fusionsprozesse ein Indikator für intakte Mitochondrien. So konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der OMM Fusion zu einer Cluster-Bildung der mtDNA führt. Bei der Fusion der IMM konnte dies nicht beobachtet

werden (Ramos, 2019). Weiterhin wurde gezeigt, dass auch die Verteilung von mtDNA im Netzwerk auf kontinuierlichen Fusionsereignissen beruht (Delerue, 2019). Zusammengefasst lässt sich daher annehmen, dass sowohl die Fusion als auch die Fission einen starken Einfluss auf die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität hat.

Cristae-Morphologie und Funktion

Die Energiegewinnung in Form von ATP ist eine der Kernaufgaben der Mitochondrien. Diese verläuft über die Atmungskette. Die innere mitochondriale Membran ist, verglichen zur äußeren mitochondrialen Membran, nicht geradlinig und rund. Sie weist regelmäßige Einstülpungen auf. Diese Einstülpungen werden auch Cristae genannt. Die Cristae sind der Ort an dem die Energieproduktion stattfindet und die Atmungskettenkomplexe in der IMM inseriert vorliegen (Boumans, 1998). Ferner dienen die Cristae dazu die Oberfläche der inneren mitochondrialen Membran zu erhöhen. Durch diese Vergrößerung der IMM können erhöhte Mengen an Atmungskettenkomplexen in die IMM inseriert werden (Afzal, 2021).

Die Spitzen der Cristae weisen eine hohe Membranbiegung von ca. 86 Grad auf (Harner, 2016). Diese starke Biegung wird durch Dimere des gesamten Komplex-V, der ATP-Synthase, hergestellt. Eine Dimerisierung der ATP-Synthase über die Proteine Atp20 (Untereinheit g (SU g)) und Atp21 (Untereinheit e (SU e)) führen zu dieser starken Biegung (Arselin, 2004). Es wurde gezeigt, dass ein Verlust von SU g oder SU e dazu führt, dass die Biegung der Cristae nicht länger gewährleistet werden kann und somit die typische Form der Cristae verloren geht (Arselin, 2004). In elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen wurden solche Stämme untersucht (Davies, 2012). Dabei fiel auf, dass $\Delta atp20$ und $\Delta atp21$ Mutanten über keine Cristae-Spitzen verfügen. Vielmehr zeigen die Mitochondrien in diesen Mutanten Strukturen, welche parallel zur Matrix-Achse verlaufen und teilweise die gesamte Matrix der Mitochondrien durchspannen. Intakte WT Cristae hingegen zeigen deutliche Ausstülpungen der IMM, welche in das innere der Matrix hineinragen (Harner, 2016). Die Cristae werden an ihrer Basis durch den "mitochondrial contact site and cristae organizing system" (MICOS) stabilisiert. Der MICOS-Komplex ist ein Multiproteinkomplex und wird aus den kernkodierten Proteinen Mic10, Mic12, Mic19, Mic26, Mic27 und Mic60 gebildet (Friedman, 2015 und Mehrotra, 2017). Vor allem die Proteine Mic10 und Mic60 sind ausschlaggebend, da diese die Stabilität des gesamten Komplexes sicherstellen. Daher führt hier, ähnlich zu den beschriebenen SU e- und SU g-Mutanten, ein Verlust dieser Proteine ebenfalls zu einer starken phänotypischen Veränderung der Cristae. Hier konnte in Hefe gezeigt werden, dass $\Delta mic10$ und $\Delta mic60$ Stämme losgelöste Cristae aufweisen, die nicht länger mit der IMM verbunden sind. Außerdem führt ein Verlust des *MGM1* Gens dazu, dass sich keinerlei Cristae innerhalb der Mitochondrien bilden können, da eine intakte Fusion der IMM nicht stattfinden kann

(Klecker, 2021) (Abb. 3). Studien konnten zeigen, dass Mgm1 die Morphologie der IMM reguliert und somit an der Cristae-Bildung beteiligt ist (Wong, 2000).

Zusammengefasst sind der MICOS-Komplex, die Dimerisierung der ATP-Synthase, sowie das Protein *MGM1* unabdingbar für eine intakte Cristae Morphologie und Funktion (Klecker, 2021).

Wie es diese Zellen dennoch sicherstellen, dass kernkodierte Proteine zielgerichtet in die Cristae transportiert werden können, ist bisher noch nicht aufgeklärt worden (Kondadi, 2019).

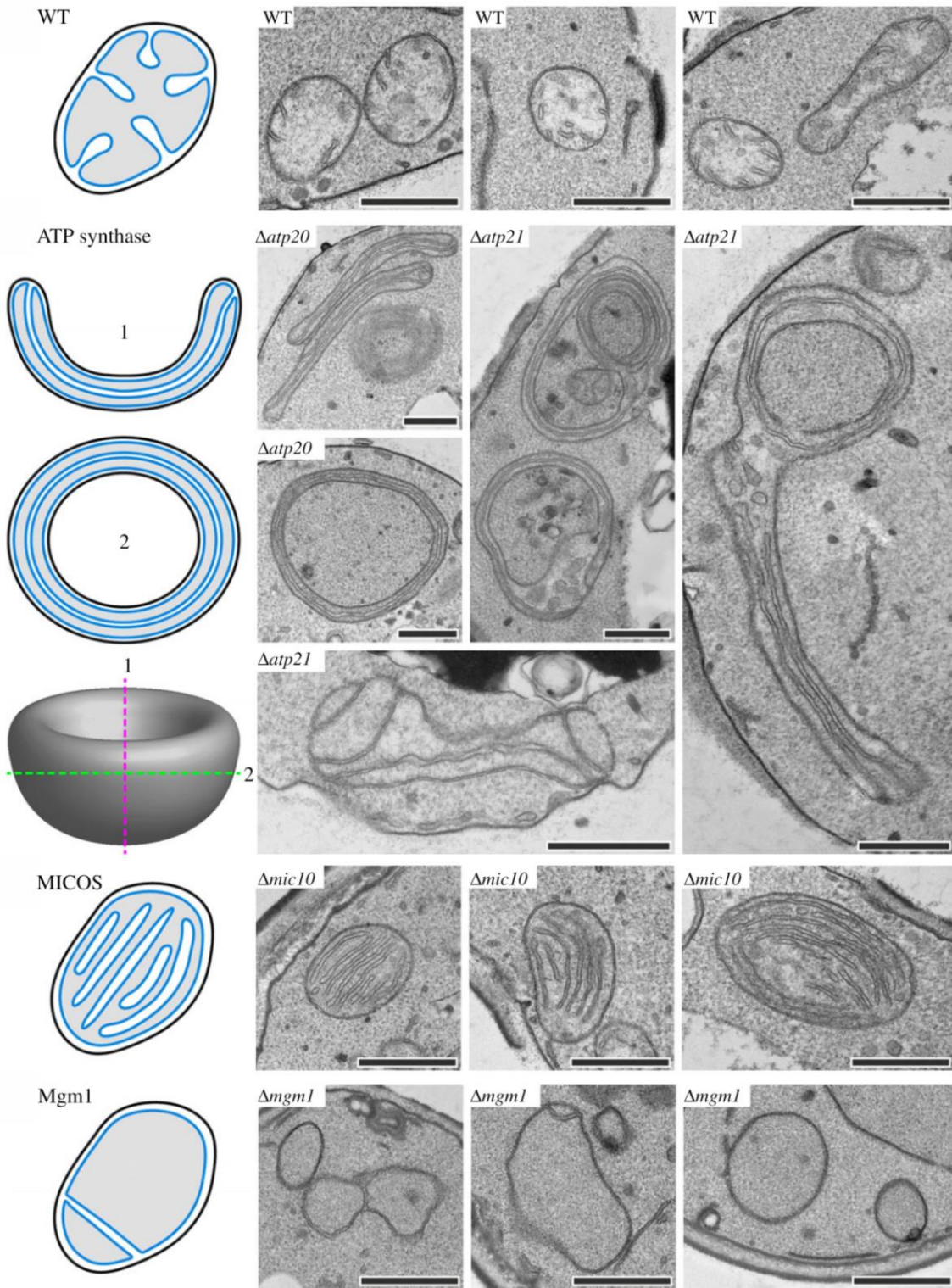


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Cristae in $\Delta mgm1$ Mutanten so wie in $\Delta atp20$ und $\Delta atp21$ Zellen und der MICOS-Mutante $\Delta mic10$. Ein Verlust von *MGM1* führt dazu, dass sich keinerlei Cristae bilden können. MICOS Mutanten hingegen verfügen über Cristae. Diese sind jedoch nicht an der IMM verankert und liegen ungebunden in der Matrix vor. ATPase-Mutanten hingegen bilden Strukturen, welche keine Spitzen aufweisen und das gesamte Lumen der Mitochondrien durchspannen. Manche dieser Strukturen ähneln einem Zwiebelquerschnitt. Entnommen und abgeändert von Klecker and Westermann (2021). Maßstab: 500 nm.

Mitochondriale Krankheiten

Die bereits oben beschriebene Invagination der IMM zu Cristae ist sehr wichtig für eine intakte Funktion der Mitochondrien, da in den Cristae die Atmungsketten Proteine sitzen. In neueren Untersuchungen wurde aufgeklärt, dass ein Defekt des MICOS-Komplexes oder ein Verlust des FOF1-ATPase-Dimeres zu erheblichen Zellschäden führt (Colina-Tenorio, 2020; Eramo, 2020). Wie bereits oben beschrieben, führen solche Mutationen zu einem Defekt in der Struktur der Cristae. Es konnte gezeigt werden, dass in solchen Zelllinien die Anzahl an ROS signifikant erhöht ist (Denoth and Lippuner, 2014). ROS besitzen, aufgrund ihrer hohen chemischen Reaktivität, ein besonders hohes Potential DNA Schäden zu verursachen. ROS sind ein Abfallprodukt der Atmungskette und kommen somit vermehrt in den Cristae vor. Die mtDNA, welche dem Entstehungsort der ROS demnach am nächsten liegen, zeigt vermehrt ROS abhängige DNA Schäden. So haben Untersuchungen gezeigt, dass die Chance einer auftretenden Mutation der mtDNA um ein vielfaches höher ist, als die der Kern-DNA (Haag-Liautard, 2008; Lynch, 2008).

Ein erhöhter ROS-Anteil kann folglich in den Zellen eine apoptotische Reaktion antreiben. Die Apoptose ist der selbsthervorgerufene Zelltod. Darüber hinaus können ROS dazu führen, dass sowohl die nukleäre, als auch die mitochondriale DNA beschädigt wird. Im Falle der mtDNA würde dies dazu führen, dass die Zelle keine Energie mehr produzieren kann. Vor allem die Hauptelemente der Elektronentransportkette, Komplex III und IV, sind besonders stark von ROS betroffen, da hier der Protonengradient erzeugt wird (Bleier, 2013).

Die Zahl der Krankheiten, die sich auf Defekte in der mtDNA zurückführen lassen, beläuft sich auf ca. 0,02 Prozent aller Patienten weltweit (Gorman, 2016). Durchgeführte Patientenstudien erhärten den Verdacht, dass sowohl neurodegenerative Krankheiten, als auch einige Krebsarten auf defekte mtDNA zurückgeführt werden können (Clay, 2009; Liu, 2006; Pyle 2016). Trotz des maßgeblichen Beitrags der mitochondrialen Qualitätssicherung an der Erhaltung der Integrität und Qualität der mtDNA und damit an intakten Zellen, ist bisher nur wenig über die genauen Abläufe bekannt. Aus diesem Grund bildet das nachfolgenden Kapitel einen kurzen Überblick über den bisherigen Stand der Forschung ab.

Qualitätssicherung der mtDNA

Häufig liegt die mtDNA in allen Organismen nicht ausschließlich intakt vor. Spontan auftretende Mutationen oder DNA Schäden welche über ROS entstehen führen zu defekter mtDNA. Das gleichzeitige Vorkommen von intakter und defekter mtDNA wird als Heteroplasmie bezeichnet (Karavaeva, 2017). Alle auf der mtDNA kodierten Proteine sind essentiell für die Energieproduktion und das Überleben der Zellen, welche die Mitochondrien als alleinige Energiequelle besitzen. Sollten alle Kopien der mtDNA gleichzeitig ein Defekt von nur einem Gen aufweisen, würde dies zu einem kompletten Verlust der Elektronentransportkette und der Zellatmung führen. Daher ist es für die Zelle von enormer Bedeutung sicherzustellen, dass die mtDNA intakt bleibt. Die mutierte mtDNA im intakten Netzwerk zu behalten, könnte für das Mitochondrium weitreichende Folgen haben. Defekte mtDNA produziert unter anderem in großem Maße die mutagenen ROS und die Mitochondrien verlieren ihre Eigenschaft Energie über die Atmungskette zu generieren (Green, 2011). Die Mitochondrien der Hefen verfügen über 40 – 60 Kopien der mtDNA (Chen, 2005). Diese sind homogen über das gesamte mitochondriale Netzwerk verteilt (Osman, 2015). Diese Zuordnung stellt sicher, dass zum einen alle Bereiche der Mitochondrien mit den nötigen essentiellen mtDNA kodierten Proteinen versorgt werden, zum anderen ist dies eine Strategie der Zelle, um mögliche mutierte mtDNA-Moleküle kompensieren zu können.

In humanen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass der *PINK1*-Parkin-Pathway genutzt wird, um mitochondriale Fragmente mit einer niedrigeren Leistung und einem Verlust des Protonengradienten zu identifizieren (Ge, 2020). Eine Verringerung des Protonengradienten kann in diesem Fall durch defekte Atmungskettenkomplexe, die wiederum durch defekte mtDNA hervorgerufen werden, entstehen. Solch eine Depolarisation der Membran führt zu einer vermehrten Anlagerung des Checkpoint-Proteins *PINK1* an der OMM. Diese vermehrte Anlagerung führt wiederum dazu, dass sich das Parkin Protein an den bereits angehafteten *PINK1*-Proteinen anlagert und somit den Prozess der Mitophagie in Gang setzt (Ge, 2020).

Studien welche zum einen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und zum anderen in Mäusen durchgeführt worden sind, konnten zeigen, dass mutiere Kopien von mtDNA erfolgreich in der weiblichen Keimbahn entfernt werden konnten. Dieser Prozess wird als "purifying selection" zu Deutsch natürliche Selektion bezeichnet (Fan, 2008; Hill 2014; Steward, 2008).

Solch ein Qualitätsmechanismus wie der oben beschriebenen *PINK1*-Parkin-Pathway, ist jedoch in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht vorhanden was dazu führt, dass hier andere bisher nicht erforschte Mechanismen an der mitochondrialen Qualitätssicherung beteiligt sein müssen. Untersuchungen in Hefen konnten zeigen, dass die Menge an ROS in neu gebildeten Tochterzellen signifikant geringer ist, als die der Mutterzellen (McFaline-Figueroa, 2011).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass leistungsfähigere Mitochondrien bevorzugt in die neu entstehenden Tochterzellen transportiert werden (Pernice, 2016; Higuchi-Sanabria, 2016). Das Transportprotein Mmr1 ist maßgeblich an der Weitergabe und dem Transport von Mitochondrien in die neu gebildete Tochterzelle verantwortlich (McFaline-Figueroa, 2011). Ein Verlust von *MMR1*, *PHB1* oder *PHB2* führt zu einem defekten Transport von Mitochondrien in die Tochterzelle (Obara, 2022; Piper 2002). Die Mikrotubuli bilden zusammen mit den Intermediärfilamenten und den Mikrofilamenten das Zytoskelett der Zelle aus. Diese Multiproteinkomplexe sind an der Bewegung und dem Transport von Zellbestandteilen oder Proteinen in nahezu allen höher entwickelten Organismen beteiligt, da sie die Leitbahnen des Transportes darstellen. In Hefe sind die Proteine Mmr1, Ypt11 und das Transportprotein Myo2 maßgeblich an einem zielgerichteten Transport der Mitochondrien in eine neu entstehende Tochterzelle involviert (Itoh, 2004).

Untersuchungen haben gezeigt, dass die mtDNA in 87 % der Fälle in mitochondrialen Spitzen anzutreffen ist und ein mtDNA-Molekül einen regelmäßigen Abstand von 0,5 - 1 µm zum nächstgelegenen mtDNA-Molekül aufweist (Osman, 2015). Sofern die mtDNA in den Spitzen der Mitochondrien vorliegt ist sichergestellt, dass Mitochondrien welche in eine neue Zelle transportiert werden auch immer mtDNA in sich tragen. Nur mit einer intakten mtDNA ist es der Zelle möglich die für die Energieproduktion essentiellen Komplexe herzustellen.

Ein weiterer Qualitätssicherungsmechanismus der mtDNA könnte auf Grundlage der Fission beruhen. So könnten Bereiche mit defekter mtDNA aus dem Netzwerk abgetrennt werden. Diese abgetrennten Fragmente könnten in einem späteren Prozess über die Mitophagie von der Zelle verdaut werden. Die Abb. 4 zeigt schematisch diesen hypothetischen Vorgang.

Nachdem Bereiche der Mitochondrien mit defekter mtDNA oder einem niedrigen Protonengradienten detektiert worden sind könnte die Zelle die nahegelegene mtDNA selektionieren und entfernen (Wang, 2015). Dieser Vorgang in Hefen beruht aktuell jedoch nur auf Theorien und konnte nicht weiter bestätigt werden.

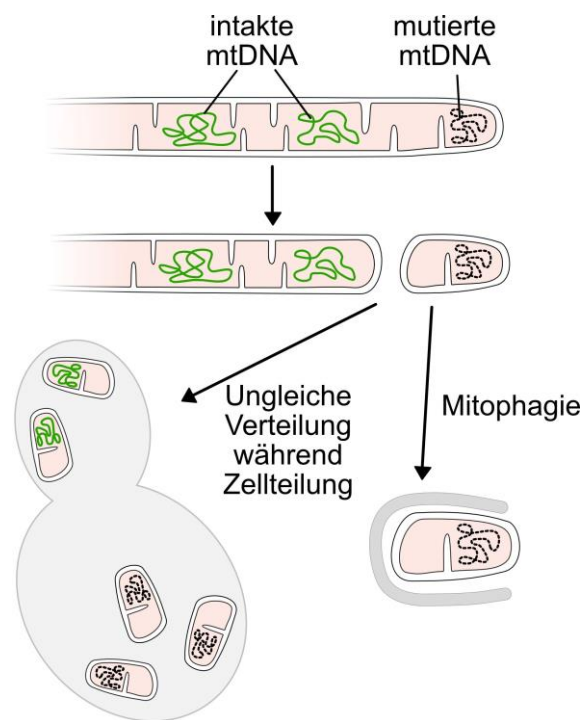


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Qualitätskontrolle in Hefe. Es wird angenommen, dass Fragmente mutierter DNA über Fission aus dem Netzwerk abgetrennt werden können. Diese Fragmente könnten entweder über die Mitophagie verdaut werden oder in der Mutterzelle zurückgehalten werden. Somit würden nur Bereiche mit intakter mtDNA an die Tochterzellengeneration weitergegeben. Entnommen von Aretz et al. (2018)

Publikation 1: „Cristae-dependent quality control of the mitochondrial genome”

SCIENCE ADVANCES | RESEARCH ARTICLE

GENETICS

Cristae-dependent quality control of the mitochondrial genome

Christopher Jakubke^{1,2†}, Rodarla Roussou^{1,2†}, Andreas Maiser¹, Christina Schug³, Felix Thoma^{1,2}, David Bunk¹, David Höri¹, Heinrich Leonhardt¹, Peter Walter^{4,5}, Till Klecker³, Christof Osman^{1*}

Mitochondrial genomes (mtDNA) encode essential subunits of the mitochondrial respiratory chain. Mutations in mtDNA can cause a shortage in cellular energy supply, which can lead to numerous mitochondrial diseases. How cells secure mtDNA integrity over generations has remained unanswered. Here, we show that the single-celled yeast *Saccharomyces cerevisiae* can intracellularly distinguish between functional and defective mtDNA and promote generation of daughter cells with increasingly healthy mtDNA content. Purifying selection for functional mtDNA occurs in a continuous mitochondrial network and does not require mitochondrial fission but necessitates stable mitochondrial subdomains that depend on intact cristae morphology. Our findings support a model in which cristae-dependent proximity between mtDNA and the proteins it encodes creates a spatial “sphere of influence,” which links a lack of functional fitness to clearance of defective mtDNA.

INTRODUCTION

Mitochondria contain their own genome, known as mitochondrial DNA (mtDNA), which in most organisms encodes core subunits of the respiratory chain and the adenosine triphosphate (ATP) synthase as well as transfer RNAs (tRNAs) and ribosomal RNAs (rRNAs) required for mitochondrial protein translation. Multiple copies of mtDNA are distributed throughout the mitochondrial network. Mutations in mtDNA can have detrimental consequences for mitochondrial function and can lead to a multitude of mitochondrial diseases, which have a prevalence of ~20 cases per 100,000 individuals (1). How cells maintain the integrity of mtDNA over generations, despite high mitochondrial mutation rates, has remained unclear. Studies in *Drosophila melanogaster* and mice have revealed that mutant copies of mtDNA are removed in the female germline in a process known as purifying selection (2–4). Mitochondrial fission has been proposed to contribute to this process in *D. melanogaster* (5, 6). Generation of small mitochondrial fragments containing only one or a few mitochondrial genomes is believed to separate mtDNA copies from one another to prevent complementation of mutant mtDNA by gene products of intact mtDNA. Subsequently, mitochondrial fragments containing mutated mtDNA are proposed to be detected on the basis of a decreased membrane potential or ATP content and removed by mitophagy. In addition, it has been found that compromised protein import efficiency into damaged mitochondria leads to a decrease in mtDNA replication and hence disfavors propagation of mutated mtDNA copies (3, 7). Despite this progress, many questions remain about the cellular mechanisms that facilitate selection against mutant mtDNA. By exploiting the possibility to genetically manipulate mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*, we establish budding yeast as a model system to study mtDNA quality control.

RESULTS

A pedigree analysis reveals mtDNA quality control in *S. cerevisiae*

First, we asked whether the single-celled *S. cerevisiae* intracellularly distinguishes between intact and mutant mtDNA and supports generation of young progeny with a healthy mtDNA content. We devised an approach to genetically follow segregation of wild-type (WT) and mutant mtDNA copies from heteroplasmic single yeast cells. Two yeast strains of opposing mating types were used for this approach. The first strain is of mating type *a* and harbors WT mtDNA and a deletion of the nuclear-encoded *ARG8* gene that encodes the mitochondrially localized Arg8 protein and is required for synthesis of arginine. Therefore, this strain is able to grow on medium containing nonfermentable carbon sources but not on medium lacking arginine. The second strain is of mating type *alpha* and harbors a deletion of the nuclear-encoded *ARG8*, but contains mtDNA in which the *COB* gene is replaced by the *ARG8* gene ($\Delta cob::ARG8$) (8). This latter strain can thus grow in the absence of arginine but not on nonfermentable carbon sources due to the deletion of the mtDNA-encoded *COB* gene. The open reading frames (ORFs) of *COB* and *ARG8* are 1158 and 1294 base pairs (bp) in size, respectively. Replacement of the *COB* gene, therefore, results in a minor increase of the overall size of the mtDNA of less than 0.2%, which is unlikely to confer a replicative disadvantage on the $\Delta cob::ARG8$ mtDNA due to larger size. Both strains contained comparable amounts of mtDNA as determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR; fig. S1A).

Both yeast strains were mated to obtain heteroplasmic diploid zygotes containing WT and $\Delta cob::ARG8$ mtDNA. Microdissection was used to transfer single zygotes to a cell-free area on an agar plate containing rich medium and glucose as a fermentable carbon source, which supports growth of cells containing WT, $\Delta cob::ARG8$, or both mtDNA species. Once the first daughter cell had budded from the zygote, it was moved to a new location on the agar plate. Growth of this former daughter cell was again monitored, until the second-generation daughter cell had budded, which was again transferred to a new position. This procedure was repeated for up to five generations, and isolated cells were incubated to allow growth of colonies (Fig. 1, A and B). The mtDNA genotype in such colonies was inferred by

Copyright © 2021 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC).

Downloaded from https://www.science.org on August 29, 2022

¹Faculty of Biology, Ludwig-Maximilians-Universität München, 82152 Planegg-Martinsried, Germany. ²Graduate School Life Science Munich, Planegg, Germany. ³Zellbiologie, Universität Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany. ⁴Howard Hughes Medical Institute and Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA. ⁵Department of Physiology, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA. *Corresponding author. Email: osman@bio.lmu.de †These authors contributed equally to this work.

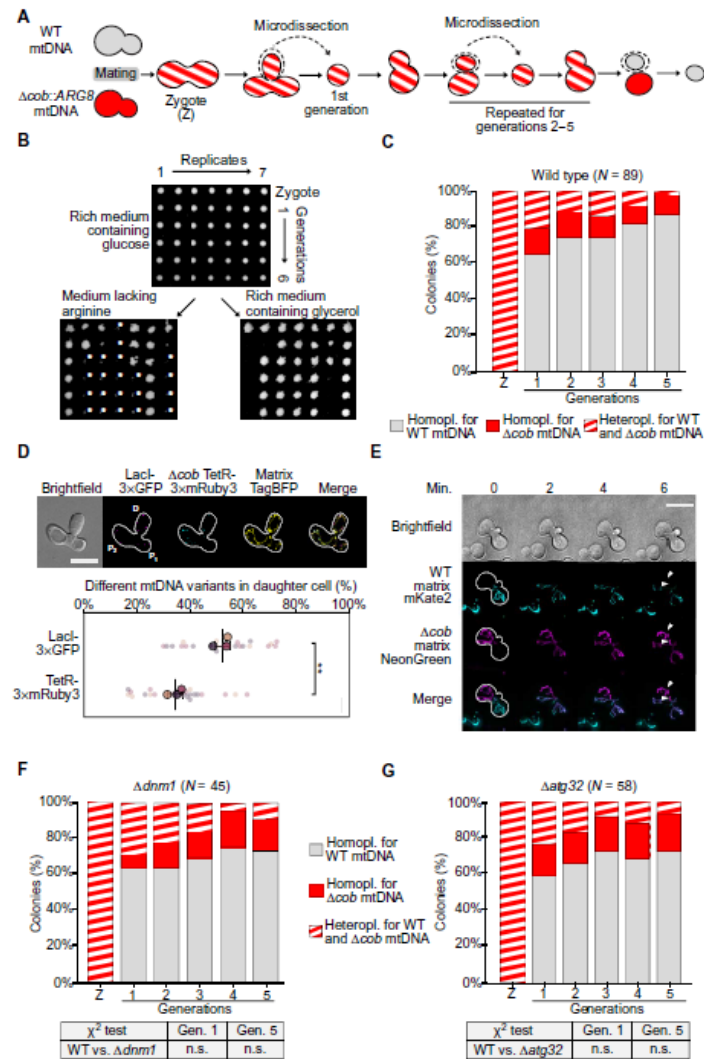


Fig. 5. *S. cerevisiae* cells distinguish between WT and mutant mtDNA. (A) Schematic illustration of the pedigree analysis. Two $\Delta arg8$ yeast strains harboring WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA were mated. Zygotes were isolated, and daughter cells from up to five consecutive generations were separated and placed on free spots on the agar plate by microdissection. (B) Growth pattern of the pedigree analysis after microdissection. Colonies were initially grown on rich medium containing glucose. The mtDNA genotype was inferred from the ability of colonies to grow on synthetic arginine lacking medium ($\Delta cob::ARG8$ mtDNA) or on medium containing the nonfermentable carbon source glycerol (WT mtDNA). Asterisks indicate cell material that was carried over by replica plating and failed to produce obvious colonies upon further incubation. For further illustrative explanation and confirmation of the pedigree analysis, refer to fig. S1 (B to D). (C) Pedigree analysis of WT cells. Striped bars indicate percentage of heteroplasmic cells containing WT and $\Delta cob::ARG8$ mtDNA. Gray or red bars indicate percentage of homoplasmic cells containing WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA, respectively. (D) Inheritance of either intact or mutated mtDNA. Mating events between two cells either with WT-LacO (GFP, P₁) or $\Delta cob::ARG8$ -TetO (mRuby3, P₂) mtDNA. Both cells expressed a nuclear-encoded, matrix-targeted TagBFP. The percentage of either GFP or mRuby3 spots in the daughter cells relative to total number of the respective mtDNA variant have been plotted. Big circles represent the mean values from individual experiments. **P<0.01, t test. (E) Mitochondrial morphology during mating. Mating events between two cells containing either WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA. Cells expressed either matrix-targeted mKate2 or mNeonGreen (NG). Mating events were monitored by live-cell microscopy. Time point before mixing of the matrix contents has been defined as T₀. (F and G) Pedigree analysis of $\Delta dnm1$ or $\Delta atg32$ cells. Scale bars, 10 μ m (D and E).

their ability to grow on medium containing a nonfermentable carbon source or medium lacking arginine, indicative of the presence of WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA, respectively (Fig. 1B and fig. S1B). The presence or absence of mtDNA was further corroborated by PCR analysis of selected lineages (fig. S1C). Of note, this growth-based assay cannot distinguish whether mtDNA variants are entirely absent or present in insufficient amounts to support growth on the respective selective medium. Previous analyses in *S. cerevisiae* have revealed rapid segregation of mtDNA variants containing neutral genetic markers within less than 10 and often within one generation (9). We similarly observe rapid segregation; notably, however, we detected a strong bias for the WT mtDNA copy. More than 60% of the colonies derived from the first-generation daughter contained exclusively the WT mtDNA, while only about ~15% of the colonies contained exclusively the $\Delta cob::ARG8$ mtDNA and ~25% remained in a heteroplasmic state (Fig. 1C). A further segregation toward WT mtDNA was observed in following generations. More than 80% of colonies derived from daughters of the fifth generation contained only the WT mtDNA (Fig. 1C). Only 3% of the colonies of the fifth generation were heteroplasmic, indicating virtually complete segregation of both mtDNA types. Very similar results were obtained in pedigree analyses, where the mating types of the WT and the $\Delta cob::ARG8$ mtDNA containing strains had been switched, indicating that selection for WT mtDNA over $\Delta cob::ARG8$ mtDNA is independent of the mating type (fig. S2A). Furthermore, we did not observe selection against mtDNA variants with an *ARG8* gene inserted into a non-coding region of mtDNA, indicating that the *ARG8* gene does not impart a strong selective disadvantage on the mtDNA (fig. S2B).

We developed a microscopic approach to visualize selection of WT over Δcob mtDNA during budding of daughter cells from zygotes. To this end, we used our previously generated strain that harbors tandem LacO repeats in a noncoding region of mtDNA upstream of *COX2* and expresses a nuclear-encoded LacI-3xGFP (green fluorescent protein) fusion protein harboring an N-terminal mitochondrial targeting sequence (10). In a separate strain, we replaced the mtDNA-encoded *COB* gene with tandem TetO repeats and introduced a gene encoding a mitochondrially targeted Tet-repressor fused to three repeats of the fluorescent protein mRuby3 into the nuclear genome. This strain contained very similar mtDNA levels compared to a reference strain, indicating that the TetO-TetR system does not lead to major defects in mtDNA maintenance (fig. S3A). In the strains used for this analysis, LacI-3xGFP and TetR-3xmRuby3 bind to the LacO and TetO repeats, respectively. To visualize mitochondria, both strains express the mitochondrially targeted blue fluorescent protein TagBFP. Both strains were mated, and zygotes were analyzed by fluorescence microscopy. We detected mutant mtDNA in the daughter cell. Quantitative image analysis, however, revealed that relative amounts of WT LacO-mtDNA were more abundant in the daughter cell than the Δcob TetO-mtDNA (Fig. 1D and fig. S3B). While we cannot entirely rule out that the LacO-LacI or the TetO-TetR systems affect the mtDNA selection process or lead to biased results in this imaging approach, these data support the conclusion that *S. cerevisiae* cells can distinguish between WT and mutant mtDNA and promote generation of progeny with predominantly healthy mtDNA content.

Selection against mutant mtDNA occurs in a continuous mitochondrial network

Like in higher eukaryotes, mitochondria form a continuous tubular network in *S. cerevisiae* that is constantly rearranged by fusion and fission events. A simple explanation for rapid segregation of WT

and mutant mtDNA could be that dysfunctional mitochondria do not fuse with healthy mitochondria to form a continuous network upon mating. In such a scenario, mutant and WT copies of mtDNA would not mix but be kept in separated mitochondrial compartments, which could facilitate efficient segregation. To examine this possibility, we used live-cell microscopy to monitor mitochondrial fusion during mating of two yeast strains expressing either mNeonGreen (NG) or mKate2 targeted to the mitochondrial matrix. We first examined mating events between two cells, both containing WT mtDNA. In line with previous observations, we observed fusion of mitochondria in newly formed zygotes (11–13). Fusion was characterized by quick and mostly complete equilibration of mKate2 and NG within 2 min throughout virtually all parts of the mitochondrial network in zygotes (fig. S4A). Similarly, we observed rapid fusion of mitochondrial networks in mating events between cells containing either WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA (Fig. 1E, fig. S4B, and movie S1). Detection of both fluorescent proteins throughout the mitochondrial network was the result of fusion rather than ongoing translation, because unfused fragments could be distinguished during the mitochondrial fusion process in zygotes (arrowheads in Fig. 1E). Despite content mixing of mitochondria, our pedigree analysis reveals that yeast zygotes can still distinguish between mutant and WT mtDNA to produce daughter cells that predominantly contain WT mtDNA.

Mitochondrial fission or Atg32-mediated mitophagy is not required for selection against mutant mtDNA

We asked whether mitochondrial fission could facilitate selection against mutant mtDNA, as has been proposed for *D. melanogaster* (5, 6). We did not observe increased mitochondrial fragmentation after mating between cells containing WT mtDNA or mating between cells containing either WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA. Thus, excessive mitochondrial fragmentation does not occur during selection against mutant mtDNA in yeast zygotes (Fig. 1E; fig. S4, A and B; and movie S1).

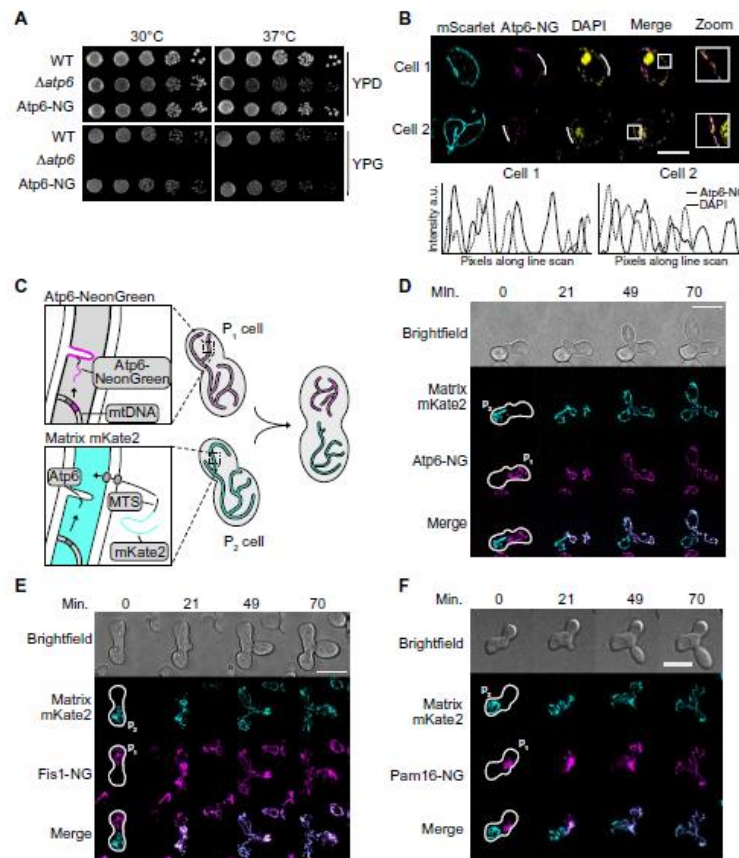
To further assess the role of mitochondrial fission in selection against mutant mtDNA, we performed pedigree analyses of crosses between cells lacking the fission protein Dnm1 and harboring either WT or mutant $\Delta cob::ARG8$ mtDNA. Notably, the absence of mitochondrial fission did not compromise rapid selection for WT mtDNA in a colony produced by the first daughter cell of heteroplasmic yeast zygotes (Fig. 1F). Furthermore, live-cell microscopy of mating events between two $\Delta dnm1$ strains harboring either WT or mutant mtDNA and expressing matrix-targeted mKate2 or NG, respectively, revealed that mitochondria from both parental cells rapidly fused in zygotes (fig. S4C and movie S2). We also tested the importance of the mitophagy receptor Atg32 (14, 15) for selection against mutant mtDNA. $\Delta atg32$ cells behaved similar to WT cells in pedigree analyses and exhibited complete mitochondrial fusion during the mating process (Fig. 1G, fig. S4D, and movie S3). Thus, neither mitochondrial fission nor Atg32-mediated mitophagy is essential for selection against mutant mtDNA during mating events of *S. cerevisiae* cells. Notably, selection for WT mtDNA in generations 2 to 5 appeared less prominent in pedigree analyses of $\Delta dnm1$ or $\Delta atg32$ cells compared to matings between WT cells. This observation could indicate that selection toward WT mtDNA in daughter cells of zygotes is independent of fission and mitophagy, whereas further selection in dividing diploids may be supported by these processes.

The mtDNA-encoded protein Atp6 exhibits severely limited diffusion rates

The fact that selection occurs in a continuous network that shares WT and mutant mtDNA presents a conundrum. How can cells distinguish between WT and mutant mtDNA if mitochondrial content equilibrates in a continuous network? We hypothesized that selection can only occur when subdomains are maintained within the mitochondrial network, whose functionality is determined by nearby copies of mtDNA. In such a scenario, it is important that mtDNA-encoded respiratory chain subunits do not exhibit rapid diffusion, because this would allow complementation of dysfunctional subdomains by gene products from WT mtDNA. To examine diffusion of an mtDNA-encoded protein, we modified mtDNA and fused an

NG-tag to the C terminus of the mtDNA-encoded *ATP6* gene (fig. S5A). Yeast strains exclusively expressed the NG-tagged variant of Atp6 and did neither show growth defects on medium containing fermentable or nonfermentable carbon sources at 30° or 37°C nor exhibit increased formation of so-called petite cells that are respiratory deficient or display altered mtDNA or Atp6 protein levels (Fig. 2A and fig. S5, B to D). These observations indicate full functionality of the NG-tagged Atp6.

Fluorescence microscopy of diploid cells harboring the *ATP6-NG* mtDNA and expressing a nuclear-encoded matrix-targeted mScarlet revealed that, in contrast to the uniformly distributed mScarlet signal, Atp6-NG exhibited a patchy distribution in the mitochondrial network (fig. S5E). This distribution has also been observed previously



using nuclear-encoded GFP-tagged variants of ATP synthase subunits, and it has been proposed that these patches report on mitochondrial cristae, in which the ATP synthase is enriched (16). We used structured illumination microscopy of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained cells to query the relationship between Atp6-NG and mtDNA. Atp6-NG foci were spatially linked to mtDNA and were detected in the immediate surroundings of DAPI spots rather than directly colocalizing with them (Fig. 2B). This finding demonstrates that the ATP synthase localizes close to mtDNA but is largely excluded from areas occupied by mtDNA itself. This observation is in line with recent super-resolution data in HeLa cells that showed a lack of cristae in close proximity to mtDNA (17).

To further test whether Atp6-NG remains close to the copy of mtDNA by which it is encoded, we examined diffusion of Atp6-NG in living cells during a mating experiment. Cells harboring mtDNA encoding Atp6-NG were mated with cells expressing a nuclear-encoded matrix-targeted mKate2 and harboring nonmodified mtDNA. Equilibration of both fluorescent signals throughout the mitochondrial network of zygotes was studied over time by live-cell microscopy (Fig. 2C). In line with our previous observation, soluble mKate2 rapidly equilibrated throughout the mitochondrial network upon fusion of parental mitochondria. Notably, the Atp6-NG signal remained localized to mitochondria from the cell of its origin (Fig. 2D, fig. S6A, and movie S4). Only very small Atp6-NG amounts were present in the mitochondrial network of the mating partner ~80 min after mitochondrial fusion, when a daughter bud had already emerged at midpoint between both parental cells and had been invaded by mitochondria. To quantify equilibration of Atp6-NG in late zygotes harboring a large medial bud, we first segmented the mitochondrial network based on the mitochondrial mKate2 signal and assigned mitochondrial parts to either the parental Atp6-NG (P_1), the parental mKate2 (P_2), or the daughter cell. The Atp6-NG signal was then determined along the mitochondrial network parts that had been assigned to P_1 , P_2 , and daughter cell. The Atp6-NG signal was further normalized to the length of the subnetwork localized to the respective cells. This analysis revealed that on average only approximately 20% of the Atp6-NG was detected in the mitochondrial network of the other parental cell (Fig. 3B). In contrast, no difference in the mKate2 signal in both parental cells was apparent in this analysis, indicating complete mitochondrial fusion and full equilibration of this soluble matrix protein (fig. S7A). We cannot distinguish between preexisting and newly synthesized Atp6-NG in this assay but conclude that proteins from neither group efficiently populate the mitochondrial network of the parental cell that did not contain the Atp6-NG mtDNA.

To examine diffusion of another protein component of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes, we created a strain expressing an NG-tagged version of the nuclear-encoded protein Cox4, which is a subunit of complex IV. Cells expressing Cox4-NG cells were mated with cells expressing matrix-targeted mKate2. Of note, upon mating of these cells, continued cytosolic synthesis of Cox4-NG will lead to import of Cox4 into all parts of the mitochondrial network at later time points. Despite this complication and similar to our results obtained with Atp6-NG, Cox4-NG exhibited strongly reduced diffusion throughout the mitochondrial network of zygotes compared to the soluble matrix-targeted mKate2 and remained largely restricted to the cell of its origin during the duration of the microscopy experiment (fig. S6B).

Next, we asked whether limited diffusion of Atp6-NG or Cox4-NG was general to transmembrane (TM) proteins of mitochondrial

membranes. We mated cells expressing matrix-targeted mKate2 with cells either expressing NG fused to the TM-domain of the outer membrane protein Fis1 or a functional Pam16-NG fusion protein (Fig. 2, E and F, and fig. S6, C and D). Pam16 is a subunit of the translocase of the inner mitochondrial membrane, which localizes predominantly to the inner boundary membrane (18). Time-lapse microscopy of such mating events revealed that diffusion of Fis1-TM-NG and Pam16-NG was slightly delayed compared to the soluble matrix protein mKate2, but both proteins equilibrated much faster than Atp6-NG throughout mitochondrial networks and no difference in signal intensity in both parental cells could be observed ~10 min after fusion of mitochondria in zygotes (fig. S6, E and F, and movies S5 and S6). In summary, mtDNA-encoded Atp6-NG and nuclear-encoded Cox4-NG, which are both subunits of respiratory chain complexes consisting of nuclear- and mtDNA-encoded subunits, are severely limited in equilibration throughout mitochondrial tubules compared to proteins of the inner boundary or the outer mitochondrial membranes.

Components important for cristae morphology affect diffusion rates of Atp6-NG

We hypothesized that components involved in maintenance of cristae morphology could be important for hindering diffusion of OXPHOS subunits and particularly mtDNA-encoded proteins within the mitochondrial network. Mic60 and Mic10 are components of the mitochondrial contact site (MICOS) complex, which stabilizes cristae junctions (19–21). Lack of Mic60 leads to cristae that are detached from the inner mitochondrial membrane but maintain their sheet-like morphology in the matrix. Atp20 and Atp21 are crucial for dimerization of the ATP synthase, which, in turn, stabilizes strongly bent cristae rims (22). Lack of the dimeric ATP synthase has been described to lead to an onion-like morphology of mitochondria, where uncontrolled proliferation of cristae membranes leads to a multilayered appearance (23). To examine the role of cristae in limiting equilibration of OXPHOS proteins, we quantified Atp6-NG mobility in our mating assay in $\Delta atp20$, $\Delta atp21$, $\Delta atp20\Delta atp21$, $\Delta mic10$, or $\Delta mic60$ strains. Both parental cells contained the respective deletion in these crosses. In all mating events, the nuclear-encoded mKate2 equilibrated across the mitochondrial network (fig. S7A). We could observe a slightly less complete equilibration of mKate2 in zygotes lacking the dimeric ATP synthase, which is likely explained by septae that may create separate matrix compartments (24) and thereby may decrease efficiency of matrix content exchange. $\Delta mic10$ and $\Delta mic60$ cells exhibited increased diffusion of Atp6-NG between mitochondrial networks of parental cells compared to WT cells in our mating assay, which was characterized by a greater amount of Atp6-NG detected in the mating partner harboring the WT mtDNA (~35% compared to ~25% in WT cells; Fig. 3, A and B). Cells lacking Atp20, Atp21, or both proteins showed a strongly increased diffusion of Atp6-NG across the mitochondrial network in zygotes. In many cases, the source cell that contained Atp6-NG-mtDNA was hardly discernible from the mKate2 source cell in the zygotes. On average, ~45% of Atp6-NG was detected in the mating partner harboring the WT mtDNA in the absence of Atp20, Atp21, or both proteins (Fig. 3, A and B). In contrast to limited diffusion within the mitochondrial network formed by parental cells, Atp6-NG was readily detected in the budding daughter cells. In daughters from zygotes, the Atp6-NG signal was at ~70% compared to the Atp6-NG signal from the Atp6-NG parental cell in all mutants,

Downloaded from https://www.science.org on August 29, 2022

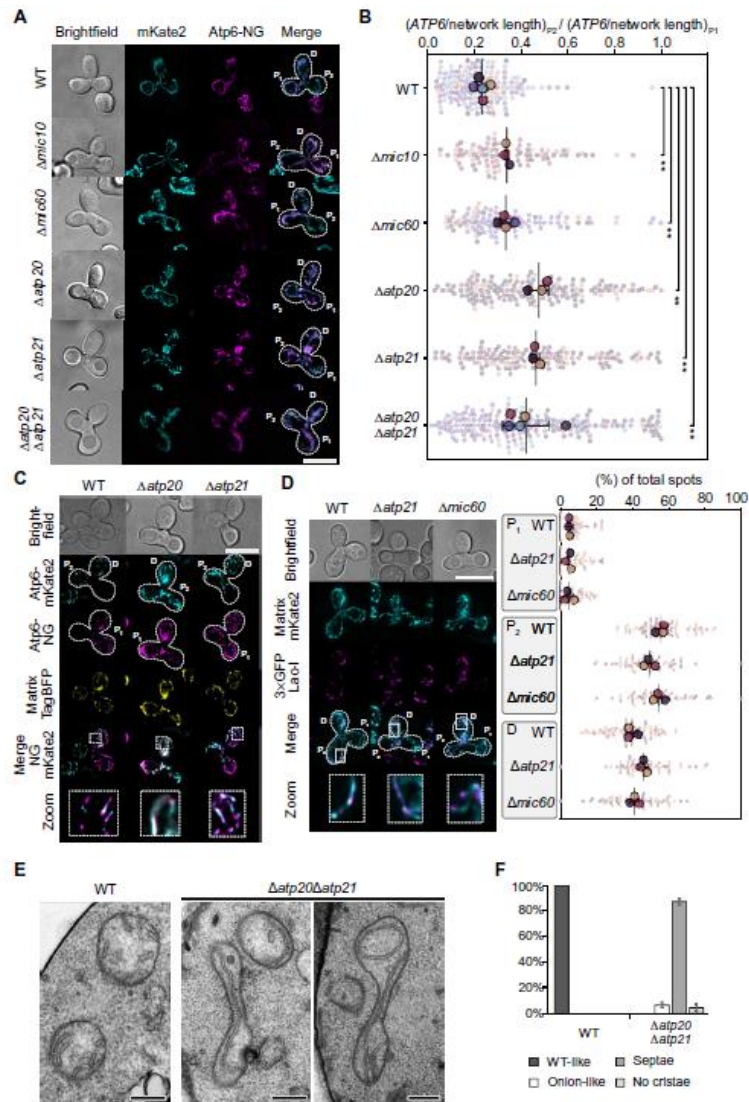


Fig. 3. Intact cristae morphology limits diffusion of mtDNA-encoded Atp6-NG. (A) Zygotes derived from mating events between WT or indicated mutant cells. In each mating event, one cell contained *ATP6*-NG mtDNA (P_1) and the other cell contained WT mtDNA and expressed matrix-targeted mKate2 (P_2). D, daughter cell. (B) The Atp6-NG signal was quantified in both parental cells of zygotes and normalized to the mitochondrial network length. The ratio of Atp6-NG signals in P_2 cells to P_1 cells of the same zygote is plotted; each point represents one zygote; $**P < 0.01$, t test. (C) Mating events between WT, $\Delta atp20$, or $\Delta atp21$ cells. Mating cells harbored either Atp6-NG mtDNA and nuclear-encoded Su9-TagBFP (P_1) or Atp6-mKate2 (P_2) mtDNA (D, daughter cell). (D) Mating events between WT, $\Delta atp21$, and $\Delta mic60$ cells. Parental cell P_1 contained WT mtDNA and expressed matrix-targeted mKate2, whereas parental cell P_2 contained mtDNA with integrated LacO repeats (D, daughter cell). mtDNA-LacO spots in P_1 , P_2 , and D cells were counted and plotted as percentage of total number of spots in the zygote. Each data point in the plot represents one zygote. (E) Electron microscopic analysis of mitochondrial ultrastructure in WT and $\Delta atp20 \Delta atp21$ cells. (F) Quantification of electron microscopy data shown in (E). Scale bars, 10 μ m (A, C, and D) and 250 nm (E).

with the exception of $\Delta mic60$ cells, where Atp6-NG levels only amounted to ~60% (fig. S7B). The reason why less Atp6-NG is found in the daughter cells of matings between $\Delta mic60$ cells is currently unclear. In summary, we observe increased diffusion of Atp6-NG in mutants lacking intact cristae morphology across existing mitochondrial networks of yeast zygotes. Because $\Delta mic10$ or $\Delta mic60$ mutants still have the dimeric form of the ATP synthase (25, 26), our results strongly suggest that Atp6-NG mobility is increased due to compromised cristae morphology rather than conversion of the ATP synthase into the monomeric form in cells lacking Atp20 or Atp21.

We developed an additional assay to test the generation of mtDNA autonomous domains and the role of cristae therein. Cells expressing mtDNA-encoded Atp6-NG and nuclear-encoded matrix-targeted TagBFP were mated with cells expressing mtDNA-encoded Atp6-mKate2, and the patterns produced by the differently tagged Atp6 proteins were examined in zygotes. The Atp6-mKate2 strain grew normally on medium containing fermentable or nonfermentable carbon sources, and no increase in *petite* formation was observed, indicating that the mKate2-tagged variant of Atp6 was functional (fig. S7C). In line with our previous observations, the Atp6 proteins remained localized to their respective origin cells in zygotes in crosses between WT cells (Fig. 3C). Notably, we often observed an alternating, mostly nonoverlapping pattern of green and red signals along the TagBFP-stained mitochondrial network in the daughter cell produced by the zygote (Fig. 3C, zoom, and fig. S7D). Thus, Atp6-NG and Atp6-mKate2 occupy separate domains in the mitochondrial network and exhibit limited mixing. This result indicates that mtDNA copies encoding Atp6-NG or Atp6-mKate2 maintain semi-autonomous mitochondrial subdomains. The alternating pattern in the daughter cell further suggests a complex procedure in which mitochondrial domains from both parental cells are sorted into the daughter cell. In mating events between $\Delta atp20$ and $\Delta atp21$ cells expressing either Atp6-NG or Atp6-mKate2, both fluorescently tagged Atp6 variants showed a stronger colocalization in daughter cells and separate domains were hardly discernible (Fig. 3C and fig. S7D). These observations show that cristae are required for maintenance of inner membrane domains and prevent extensive mixing between gene products of different mtDNA copies.

mtDNA diffusion is limited in WT, $\Delta atp21$ and $\Delta mic60$ cells

Cristae could support mtDNA-mediated formation of mitochondrial subdomains via at least two mutually nonexclusive mechanisms: (i) Cristae could limit mobility of mtDNA within the mitochondrial matrix by forming physical barriers and thereby promote local synthesis of mtDNA-encoded proteins. (ii) Cristae could corral mtDNA-encoded proteins by preventing their diffusion through cristae junctions into the inner boundary membrane. To determine the importance of cristae in restricting mtDNA mobility, we used our recently developed mtDNA LacO-LacI-GFP system (10) to specifically mark mtDNA in one of the parental cells in a mating experiment (P_2 cell). The other parental strain used in the mating assay contained WT mtDNA lacking the LacO repeats and expressed the matrix-targeted mKate2 protein (P_1 cell). In mating events between two WT cells, two $\Delta atp21$, or $\Delta mic60$ cells, LacO-marked mtDNA was evident in the daughter cells produced by zygotes, indicating efficient transport of mtDNA into daughter cells. Of note, we observed a slight increase of the percentage of LacO mtDNA spots in the daughter cell in matings between $\Delta atp21$ cells compared to matings between WT or $\Delta mic60$ cells (Fig. 3D). The underlying reason for this observation remains

to be determined. LacO-marked mtDNA did not accumulate in the P_1 parental cell even at late zygotic stages in any of the matings (Fig. 3D). Thus, mobility of mtDNA remains limited in the mitochondrial network of parental cells in matings between $\Delta atp21$ or $\Delta mic60$ cells that contain strongly compromised cristae architecture. We conclude that WT-like cristae architecture plays a crucial role in limiting equilibration of the Atp6-NG protein, rather than diffusion of mtDNA.

To find a potential explanation for the rapid equilibration of Atp6-NG in the absence of dimer-specific ATP synthase subunits, we carefully examined WT, $\Delta atp20$, $\Delta atp21$, and $\Delta atp20\Delta atp21$ cells by electron microscopy and also performed serial sectioning to obtain three-dimensional (3D) information about the mitochondrial ultrastructure. Mitochondria of WT cells showed cristae with the typical perpendicular orientation to the mitochondrial tubular axis. In mutant cells lacking dimeric ATP synthase, however, inner membrane structure was markedly altered and virtually no WT-like cristae were apparent. Instead, mitochondria exhibited onion- and balloon-like inner membrane profiles, as previously described. In accordance with previous work, we frequently observed strongly elongated cristae-like structures that traversed the whole mitochondrion (Fig. 3, E and F, and fig. S8) (22, 23, 27).

These observations provide a possible explanation for the inability of cells lacking dimeric ATP synthase to constrain diffusion of Atp6-NG. While respiratory chain complexes get trapped in cristae in WT cells, they are free to diffuse along the altered cristae membranes in $\Delta atp20$, $\Delta atp21$, and $\Delta atp20\Delta atp21$ mutants.

Cristae morphology is required for mtDNA quality control

Having determined that mtDNA-encoded subunits exhibit a severely reduced mobility in the inner mitochondrial membrane that is dependent on normal cristae biogenesis, we asked whether mutants defective in cristae biogenesis would have problems to distinguish between WT and mutant mtDNA. We applied our pedigree analysis to follow inheritance of WT over $\Delta cob::ARG8$ mtDNA from heteroplasmic zygotes in the absence of *ATP20*, *ATP21*, *MIC10*, or *MIC60*. Deletion of these genes did not lead to greatly altered mtDNA levels in strains containing WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA (fig. S9A). In particular, mtDNA levels of the mating partners of each pedigree mating pair did not differ significantly to one another. Notably, clearance of the mutant mtDNA was significantly delayed in the absence of any of these proteins. While 60% of lineages for the WT were already homoplasmic for WT mtDNA in the first generation, this value dropped to 40% in cristae mutants. Moreover, while only ~20% of cells of the first generation in WT cells still maintained a heteroplasmic state, ~40% of such cells were detected in the first generation of matings between cristae mutants. After five generations, a significantly smaller proportion of the lineages were homoplasmic for WT mtDNA in the cristae mutants (Fig. 4, A to F). Thus, the ability to choose WT over mutant mtDNA is severely compromised in mutants with defective cristae architecture. In line with these pedigree results and in accordance with previous work, $\Delta atp20$, $\Delta atp21$, $\Delta atp20\Delta atp21$, $\Delta mic10$, or $\Delta mic60$ strains harboring exclusively WT mtDNA exhibit increased formation of *petites*, revealing a reduced ability to maintain a healthy mtDNA population in cells (fig. S9B) (23).

DISCUSSION

Our data reveal that the unicellular *S. cerevisiae* is able to promote generation of progeny with a healthy mtDNA population from

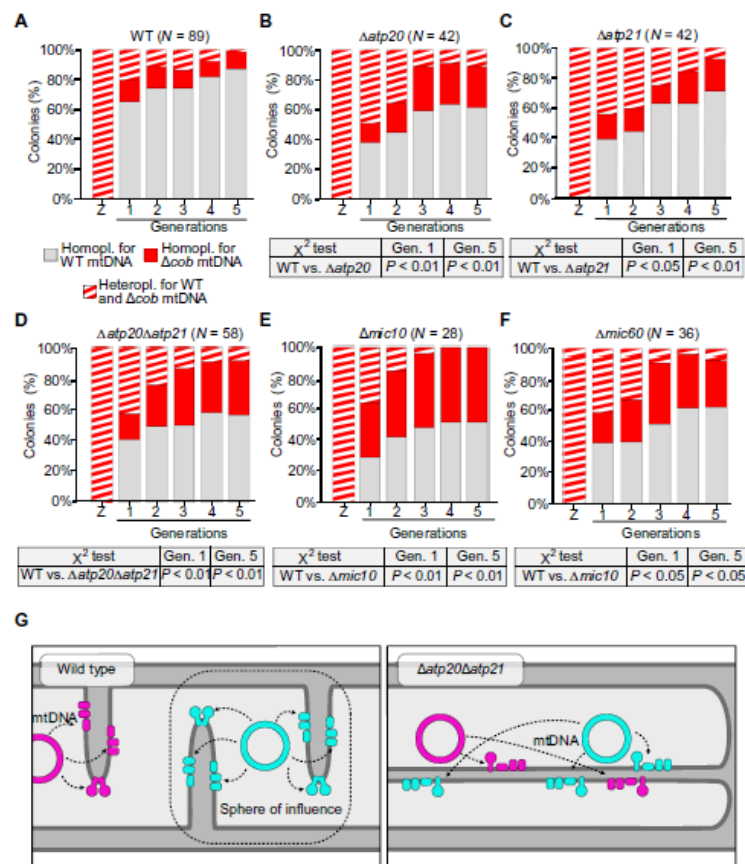


Fig. 4. mtDNA quality control depends on normal cristae morphology. (A–F) Pedigree analyses of strains lacking indicated genes. WT pedigree (A) is identical to Fig. 1C, shown to allow comparison to mutant analyses in (B) to (F). χ^2 test has been applied as statistical hypothesis tests to compare first- and fifth-generation data of mutant strains to the WT. (G) Model for quality control of mtDNA in a fused mitochondrial network. mtDNA copies in WT cells supply only the cristae in their immediate surrounding with mtDNA-encoded proteins. Respiratory chain complex containing mtDNA-encoded subunits has limited diffusion capability and is trapped within cristae, which leads to a sphere of influence of mtDNA. Limited diffusion of respiratory chain complexes is compromised in cells with compromised cristae structure.

heteroplasmic zygotes that contain WT and mutant mtDNA. So far, our demonstration of the purifying selection in yeast is limited to a model mutant mtDNA variant that entirely lacks the *COB* gene. It will be interesting to examine in future studies how yeast cells deal with deletions of other mtDNA-encoded genes or milder point mutations. Unexpectedly, we show that the purifying selection occurs in a continuous mitochondrial network and does not require mitochondrial fission. This finding raised the question how cells can detect mutant mtDNA copies among WT copies in a mitochondrial network, where soluble matrix proteins rapidly equilibrate and potentially even out physiological differences and thus conceal mutant copies.

A possible solution for this problem is provided by our finding that diffusion of OXPHOS components, namely, the mtDNA-encoded protein Atp6-NG and the nuclear-encoded Cox4-NG, is severely

limited in WT cells compared to proteins localized to the inner boundary membrane, the outer membrane, or the matrix. Of particular interest in this respect is the observation that the mtDNA-encoded Atp6-NG forms subdomains that remain in the vicinity of the mtDNA by which it is encoded. These findings are in line with analyses in HeLa cells that have similarly demonstrated reduced mobility of OXPHOS proteins along the longitudinal axis of mitochondrial tubules (28, 29). A previously proposed plausible explanation for the restricted mobility is that OXPHOS proteins, likely aided through their assembly into complexes and supercomplexes (30), get trapped within cristae membranes and are prevented from diffusion past cristae junctions into the inner boundary membrane (18, 31). In strong support of this hypothesis, we find that the mtDNA-encoded Atp6-NG exhibits increased equilibration across the mitochondrial

network in mutants with defective cristae architecture, while movement of the mtDNA from which it originates remains restricted. Notably, our pedigree analysis revealed that mutants with defective cristae biogenesis are incapable of distinguishing effectively between WT and mutant mtDNA to support progeny with functional mtDNA.

Together, our findings are in line with a previously proposed model in which each mtDNA copy has a “sphere of influence” and remains spatially linked to its gene products (32, 33). Our data support the hypothesis that such a sphere of influence is dependent on normal cristae architecture (Fig. 4G). According to this model, mutations in mtDNA would lead to mitochondrial subdomains with physiological defects that could flag such areas and facilitate purging of the linked mtDNA copy. In line with this idea, it has recently been shown that individual cristae within the same mitochondrial tubule can maintain independent membrane potentials (34). Defective cristae biogenesis would lead to defective subdomain formation and a weakened link between mtDNA and its gene products, which, in turn, would blur physiological differences caused by mtDNA mutations (Fig. 4G). As a consequence, detection and purging of mutated mtDNA would be hindered.

For such a system to work, not only the proteins but also their mRNAs need to remain close to the mtDNA copy from which they originate. In matings between two WT cells containing either regular or *ATP6-NG* mtDNA, we observe very low levels of *Atp6-NG* protein in parts of the mitochondrial network that does not contain the *ATP6-NG* mtDNA, even more than 80 min after mitochondria of both parental cells have fused (fig. S6A). This result indicates that little synthesis of *Atp6-NG* occurs in these parts of the network within the time frame of this analysis. It is, however, possible that biogenesis of OXPHOS complexes is generally low in the mitochondrial network of parental cells because of little OXPHOS turnover. In this case, we would see little synthesis of *Atp6-NG* even if its mRNA would be present. Not much is known from the literature about the mobility of mitochondrial mRNAs. It was recently proposed that mitochondrial transcription and translation may occur in a coupled manner in *S. cerevisiae* (35). Taking into account that insertion of mtDNA-encoded proteins into the mitochondrial inner membrane occurs cotranslationally (36, 37) and, at least in part, at cristae membranes (38), all steps of mitochondrial gene expression from transcription to insertion of proteins into cristae membranes could be spatially linked. Nevertheless, characterization of mRNA mobility in mitochondria awaits further studies.

We demonstrate that yeast cells can distinguish between mutant and WT mtDNA and propose that cristae-dependent subdomains are an important prerequisite for efficient purging of mutant mtDNA. It remains an outstanding and exciting question how cells mechanistically detect and remove mutant mtDNA. Plausible physiological parameters that may serve as signals on dysfunctional mitochondria are a reduced membrane potential (39), decreased ATP levels (5), or altered redox states (40). What processes may remove mutant mtDNA from cells? Our microscopic analyses suggest that mutant mtDNA transfer to daughter cells of heteroplasmic zygotes may be reduced, but not entirely prevented (Fig. 1D). Preferential transport of fit mitochondria into daughter cells has been demonstrated in yeast previously (40). In combination with our pedigree analysis, where a large percentage of first-generation colonies appears homoplasmic (Fig. 1C), we suggest that further rounds of selection against mutant mtDNA likely occur in the daughter cells that eventually entirely purge mutant mtDNA. While we find that

mitochondrial fission or Atg32-mediated mitophagy is not absolutely essential for selection against mutant mtDNA, especially during production of the first daughter cell of heteroplasmic zygotes, these processes may contribute to efficient clearance during further growth and cell divisions. Furthermore, WT mtDNA could also be preferentially replicated as suggested for *D. melanogaster* (3, 7) or mutant mtDNA could be selectively degraded within mitochondria by nucleases. It was demonstrated in yeast that the mtDNA polymerase Mip1 degrades mtDNA through its exonuclease domain upon prolonged starvation (41). It remains to be determined whether such a mechanism could also be involved in clearance of mutant mtDNA. Together, selection against mutant mtDNA could entail a combination of mechanisms that may include selective transport of mitochondria containing healthy mtDNA to daughter cells, mitophagic removal of mitochondrial fragments containing mutant mtDNA, selective replication of healthy mtDNA, or selective degradation of mutant mtDNA by nucleases. The discovery of a purifying selection in *S. cerevisiae* combined with the tools we developed in this study will be of great value in elucidating molecular mechanisms responsible for clearance of mutant mtDNA.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and plasmids

All yeast strains are derived from W303 background. Strain information can be found in table S1. Deletions of genes and C-terminal tagging of nuclear-encoded genes were performed in haploid strains using homologous recombination as described previously (42). For the experiment presented in fig. S3A, the mating type of strain yCO354 had to be switched from *Mat alpha* to *Mat a*. Mating type switching was performed by transient (90 min) galactose-induced expression of the HO endonuclease from the plasmid pJH132 (43). Subsequently, a *Mat a* strain that had lost the plasmid pJH132 was isolated. Primer and plasmid information can be found in tables S2 and S3, respectively.

Pedigree analysis

Approximately 1.85×10^7 cells from early post-log phase [optical density at 600 nm (OD_{600}) ~ 1.5] growing cultures of strains with opposing mating types were combined in a 1.5-ml reaction tube, vortexed, centrifuged at 3000 rpm for 3 min, and resuspended in 50 μ l of rich medium containing glucose [yeast extract peptone dextrose (YPD)]. Subsequently, the cell suspension was spotted onto a YPD plate and incubated for 2 to 3 hours to allow mating of strains. A small amount of cells was scraped off the plate and was resuspended in 200 μ l of YPD medium. From this mated cell suspension, 30 μ l was spread as a line on a YPD plate. Individual zygotes were identified on the basis of their characteristic shape and transferred to free areas on the agar plate. Cell growth was monitored, and daughter cells were separated from zygotes or mother cells and transferred to free areas on the agar plate. This procedure was repeated for five generations (Fig. 1, A and B). After incubation for 2 days at 30°C, the grown colonies were replica-plated onto plates containing synthetic defined medium lacking arginine (SD-Arg) and plates containing rich medium and glycerol as a carbon source [yeast extract peptone glycerol (YPG)]. Those plates were again incubated for 24 to 48 hours, and growth was scored. Of note, colonies were scored as “growing” for SD-Arg or YPG even when only parts of the replicated colony displayed growth. Growth rates were not considered in this

Downloaded from https://www.science.org on August 29, 2022

experiment. The presence or absence of growth was verified by restreaking of cell material from selected colonies onto YPG or SD-Arg plates (fig. S1B). In addition, a mating-type test was performed to confirm that the initially picked cells were zygotes. Lineages were only considered when the starting zygotes were able to grow on YPG and SD-Arg plates, indicating a heteroplasmic state. Of note, we sporadically observed that mtDNA species were lost in one generation but reappeared at a later generation (e.g., replicate 2 in Fig. 1B). We attribute this observation to cases in which all copies of one particular mtDNA species are passed on to the daughter cell. In such a scenario, a mother cell lacking this mtDNA species is produced, whereas this species will be present in the daughter cell (fig. S1D).

Live-cell microscopy

For all live-cell microscopy experiments, yeast cells were imaged in ibidi 8-well μ -Slides (ibidi GmbH, Gräfelfing). For immobilization of yeast cells during microscopy, wells were coated with concanavalin A, a lectin that can bind the cell wall of yeast cells. In brief, wells were filled with 200 μ l of concanavalin A (0.5 μ g/ml) and incubated for 30 min. Concanavalin A was removed, and wells were dried for 30 min at room temperature. For single-frame images and videos of mating events, 1000 μ l from two cultures with strains of opposing mating types was combined in a reaction tube, vortexed thoroughly, and centrifuged for 3 min at 5000 rpm. The pellet was resuspended in 50 μ l of YPD medium and spotted onto a YPD plate to allow cells to mate. Plates were incubated for 3 hours for single-frame images and for 1.5 hours for videos. The pre-mated cells were scraped off and resuspended in 400 μ l of sterile-filtered 1 \times phosphate-buffered saline (PBS) buffer, and 200 μ l was transferred into a concanavalin A-coated well of ibidi 8-well μ -Slide. The slides were centrifuged for 2 min at 2000 rpm to promote adherence of the cells to the bottom of the well. Wells were washed twice with 400 μ l of filtered synthetic complete (SC) medium to remove floating cells and eventually resuspended in SC medium for imaging. Microscopy was performed at 30°C on a Nikon Ti2-Eclipse microscope equipped with a CFI Apochromat TIRF 100 \times /1.49 numerical aperture (NA) oil objective and a TwinCam LS dual-camera splitter attached to two Photometrics Prime 95B 25-mm cameras. The dual-camera setup enabled simultaneous imaging of red and green fluorophores. Specifications of filters and dichroics can be made available upon request. For time-lapse microscopy, cells were imaged every 2 or 7 min for indicated total periods of time. For quantification of the imaging presented in Fig. 1D, zygotes were only considered when patchy structures were apparent for GFP and mRuby3 signals. Cells harboring the TetO repeats often showed a diffuse red staining of mitochondria, which is likely explained by recombination of the TetO repeats.

Image processing and analysis

All images, except those obtained by structured illumination microscopy, were postprocessed by deconvolution with the Huygens software (Scientific Volume Imaging). Fluorescent channels acquired simultaneously on two different cameras were aligned using a custom-built Python script. Alignment parameters were obtained from simultaneous imaging in bright-field mode. For quantification of Atp6-NG levels presented in Fig. 3A, mitochondria were first segmented in 3D based on the matrix-mKate2 signal using the mitograph software (44). Binary masks for parental and daughter cells were manually created in Fiji by drawing outlines on the bright-field image. Masks were used in a next step to assign coordinates of

the mitochondrial network to the respective cells. Then, Atp6-NG intensities were determined and summed up along the mitochondrial network of parental or daughter cells using custom-built Python scripts. To account for differences in the mitochondrial amount in different cells, the Atp6-NG signal was normalized to the mitochondrial network length present in the respective cell.

Quantification of colocalization of Atp6-NG and Atp6-mKate2, presented in fig. S7D, was performed as follows. The mitochondrial network was first segmented in 3D based on the matrix-TagBFP signal using the mitograph software. Manually created binary masks were used to assign parts of the mitochondrial network to parental or daughter cells. Fluorescent intensities of Atp6-NG and Atp6-mKate2 were then determined for pixels along the mitochondrial network. Next, Manders and Pearson correlation coefficients were determined between both signals. For determination of the Manders correlation coefficient, signals along the mitochondrial network were thresholded beforehand with Yen *et al.*'s method (45).

Genetic manipulation of mtDNA

Strains harboring mtDNA in which the *COB* gene was replaced with an arginine marker and a nonrecombinable TetO array were generated as follows. First, a synthesized TetO array, in which 21 TetO repeats are separated by spacers of varying length and sequence, was inserted after the stop codon of the *ARG8* gene in the plasmid pCOB-ST5 (8). This cloning step resulted in the plasmid pCO307, which thus contains an insert in which sequences homologous to the up- and downstream regions of the *COB* gene flank the ORF of *ARG8* followed by the TetO array. pCO307 was introduced into the *kar1-1* strain α DFS160 ρ^0 by biolistic transformation with the PDS-1000/He particle delivery system (Bio-Rad Laboratories), and transformants were selected by their ability to rescue the *cox2-62* mutation of the strain NB40-3C (46). pCO307 was then cytotected into a Δ *arg8* W303 WT strain, which resulted in the deletion of the *COB* gene by *ARG8*-TetO through homologous recombination. Cells containing the Δ *cob::ARG8-TetO*-mtDNA were selected on the basis of their arginine prototrophy. Last, a construct (pCO407) consisting of the Cup1 promoter driving expression of an ORF in which the Su9 mitochondrial targeting sequence was fused to the TetR gene, which, in turn, was followed by three copies of the red fluorescent protein mRuby3, was chromosomally integrated into the HO locus (strain yCO460).

Strains harboring mtDNA in which the *ATP6* is tagged with either NG or mKate2 were generated as follows. First, synthesized gene fragments encoding NG and mKate2 compatible with the mitochondrial genetic code (Twist Bioscience, San Francisco) were fused to the C terminus of the coding region of *ATP6*, which was amplified from genomic DNA. *ATP6*-NG or *ATP6*-mKate2 was flanked with an 806-bp region homologous to the upstream region of *ATP6* and a 60-bp region homologous to the downstream region of *ATP6*. The entire fragments were then cloned into the Xho I site of the plasmid pPT24 (47), which resulted in either plasmid pCO444 or pCJ013 for *ATP6*-NG and *ATP6*-mKate2, respectively. pCO444 and pCJ013 were introduced into the *kar1-1* strain α DFS160 ρ^0 by biolistic transformation, and transformants were selected by their ability to rescue the *cox2* mutation of NB40-3C (46). pCO444 and pCJ013 were then cytotected into the strain MR10 (48). Colonies in which *ATP6*-NG (yCJ043) or *ATP6*-mKate2 (yCJ120) had successfully integrated into the *ATP6* locus were identified by their ability to grow on a non-fermentable carbon source. A strain containing *ATP6*-NG-mtDNA

and mating type *alpha* was obtained by mating yCJ043 with a ρ^0 W303 WT strain followed by sporulation and tetrad dissection (yCJ084).

Primer sequences used for cloning and plasmid maps can be made available upon request.

DAPI staining and structured illumination microscopy

Coverslips (no. 1.5) were coated with 50 μ l of concanavalin A (0.5 μ g/ml) and air-dried for 1 hour. Residual concanavalin A was removed, and coverslips were dried for 45 min before fixation. $OD_{600} = 0.5$ of log phase yeast cells were harvested at 5000 rpm for 3 min and washed using 1 \times PBS + 0.02% Tween 20. Cells were resuspended in 20 μ l of 1 \times PBS + 0.02% Tween 20. Subsequently, all cells were placed on the concanavalin A-coated coverslips and incubated for 45 min to let cells settle on the coverslip. Then, cells were washed for 2 min with filtered SC medium. Cells were fixed using a 4% formaldehyde solution + DAPI (1 μ g/ml) in filtered SC medium for 30 min. Cells were washed once more for 2 min using filtered SC medium. Twenty microliters of MOVIOL 4-88 (Roth) was added to the coverslips, and microscope slides were put onto the coverslips. Fixed immobilized cells were used for super-resolution imaging by structured illumination microscopy. The acquisition was performed on a 3D SIM DeltaVision OMX V3 microscope (General Electric) equipped with a 10 \times 1.4 NA oil immersion objective UPlanSApo (Olympus), 405-, 488-, and 593-nm diode lasers, and Cascade II electron-multiplying charge-coupled device (CCD) cameras (Photometrics). After acquisition with an appropriate refractive index oil, raw data were first reconstructed and corrected for color shifts using the provided software softWoRx 6.0 Beta 19 (unreleased). In a second step, a custom-made macro in Fiji (49) finalized the channel alignment and established composite TIFF (tag image file format) stacks, which were used for image analysis.

Electron microscopy

For electron microscopy, all strains were pregrown in YPG medium to select for functional mtDNA. Subsequently, cells were grown to log phase in YPD or rich medium containing galactose medium, as indicated. Sample preparation for electron microscopy was essentially performed as previously described (50) with two minor changes: The fixation with glutaraldehyde was performed for 1 hour, and all centrifugation steps were carried out at 1610g for 5 min. Ultrathin sectioning was performed using a Leica Ultracut UCT (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ultramicrotome and an ultra 35 $^\circ$ diamond knife (Diatome, Nidau, Switzerland). Ultrathin 50- to 70-nm sections were placed on Pioloform-coated copper slot grids (Plano, Wetzlar, Germany) and poststained for 15 min with uranyl acetate and 3 min with lead citrate, as previously described (50). Electron microscopy was performed using a JEOL JEM-1400 Plus transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) operated at 80 kV. Images were taken with a JEOL Ruby CCD camera (3296 \times 2472 pixels) and the TEM Center software Ver.1.7.12.1984 (JEOL, Tokyo, Japan).

Miscellaneous

Western blot analyses were performed with isolated mitochondria. Fifty micrograms of isolated mitochondria was preheated on 95 $^\circ$ C for 5 min in 1 \times SDS loading buffer and separated on a 12% SDS gel. After transfer to polyvinylidene difluoride membranes, membranes were incubated with the following primary antibodies in 5% milk and tris-buffered saline: mouse anti-NG (1:1000; Chromotek GmbH), rabbit anti-acontitase I (1:1000), and rabbit anti-Atp6 (1:1000).

Quantitative real-time PCR experiments to determine mtDNA levels were performed as described previously (51). For the petite analysis, cells were grown overnight at 30 $^\circ$ C, then freshly diluted to an $OD_{600} = 0.2$, and grown for another 3 hours. A total of 200 cells were plated onto YPG plates containing 0.1% glucose. Plates were incubated for 3 days at 30 $^\circ$ C. Only cells proficient in respiratory growth are able to continue growth after all glucose has been consumed.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <https://science.org/doi/10.1126/sciadv.abi8886>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

- G. S. Gorman, P. F. Chinnery, S. DiMauro, M. Hirano, Y. Koga, R. McFarland, A. Suomalainen, D. R. Thorburn, M. Zeviani, D. M. Turnbull, Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2**, 16080 (2016).
- W. Fan, K. G. Waymire, N. Narula, P. Li, C. Rocher, P. E. Coskun, M. A. Vannan, J. Nanula, G. R. MacGregor, D. C. Wallace, A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science* **319**, 958–962 (2008).
- J. H. Hill, Z. Chen, H. Xu, Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. *Nat. Genet.* **46**, 389–392 (2014).
- J. B. Stewart, C. Freyer, J. L. Elson, A. Wredenberg, Z. Cansu, A. Trifunovic, N.-G. Larsson, Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biol.* **6**, e10 (2008).
- T. Lieber, S. P. Jeedigunta, J. M. Palozzi, R. Lehmann, T. R. Hurd, Mitochondrial fragmentation drives selective removal of deleterious mtDNA in the germline. *Nature* **570**, 380–384 (2019).
- Z. Chen, Z.-H. Wang, G. Zhang, C. K. E. Bleck, D. J. Chung, G. P. Madison, E. Lindberg, C. Combs, R. S. Balaban, H. Xu, Mitochondrial DNA segregation and replication restrict the transmission of detrimental mutation. *J. Cell Biol.* **219**, e201905160 (2020).
- Y. Zhang, Z. H. Wang, Y. Liu, Y. Chen, N. Sun, M. Gucek, F. Zhang, H. Xu, PINK1 inhibits local protein synthesis to limit transmission of deleterious mitochondrial DNA mutations. *Mol. Cell* **73**, 1127–1137.e5 (2019).
- S. Gruschke, K. Römpler, M. Hildenbeutel, K. Kehrein, I. Köhl, N. Bonnetoy, M. Ott, The Cbp3–Cbp6 complex coordinates cytochrome *b* synthesis with bc₁ complex assembly in yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* **193**, 1101 (2011).
- P. S. Phillip, C. William Birky, R. L. Strausberg, Segregation of mitochondrial markers in yeast. *Methods Enzymol.* **56**, 139–154 (1979).
- C. Osman, T. R. Norlega, V. Okreglak, J. C. Fung, P. Walter, Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E947–E956 (2015).
- J. Nunnari, W. F. Marshall, A. Straight, A. Murray, J. W. Sedat, P. Walter, 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 (1997).
- K. Okamoto, P. S. Perlman, R. A. Butow, The sorting of mitochondrial DNA and mitochondrial proteins in zygotes: Preferential transmission of mitochondrial DNA to the medial bud. *J. Cell Biol.* **142**, 613–623 (1998).
- R. Azpilroz, R. A. Butow, Patterns of mitochondrial sorting in yeast zygotes. *Mol. Biol. Cell* **4**, 21–36 (1993).
- K. Okamoto, N. Kondo-Okamoto, Y. Ohsumi, Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell* **17**, 87–97 (2009).
- T. Kanki, K. Wang, Y. Cao, M. Baba, D. J. Klionsky, Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell* **17**, 98–109 (2009).
- L. Jimenez, D. Laporte, S. Duvezin-Caubet, F. Courtout, I. Sagot, Mitochondrial ATP synthases cluster as discrete domains that reorganize with the cellular demand for oxidative phosphorylation. *J. Cell Sci.* **127**, 719–726 (2014).
- T. Stephan, A. Roesch, D. Riedel, S. Jakobs, Live-cell STED nanoscopy of mitochondrial cristae. *Sci. Rep.* **9**, 12419 (2019).
- F. Vogel, C. Bornhövd, W. Neupert, A. S. Reichert, Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* **175**, 237–247 (2006).
- S. Hopplins, S. R. Collins, A. Cassidy-Stone, E. Hummel, R. M. Devay, L. L. Lackner, B. Westermann, M. Schuldiner, J. S. Weissman, J. Nunnari, A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* **195**, 323–340 (2011).

20. K. von der Malsburg, J. M. Müller, M. Bohnert, S. Oeljeklaus, P. Kwiatkowska, T. Becker, A. Loniewska-Lwowska, S. Wiese, S. Rao, D. Milenkovic, D. P. Hutu, R. M. Zerbies, A. Schütze-Speckling, H. E. Meyer, J.-C. Martinou, S. Rospert, P. Rehling, C. Melsinger, M. Veenhuis, B. Warscheld, L. J. van der Klei, N. Pfanner, A. Chacinska, M. van der Laan, Dual role of mitofillin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev. Cell* **21**, 694–707 (2011).
21. M. Harner, C. Kömer, D. Walther, D. Mokranjac, J. Kaesmacher, U. Welsch, J. Griffith, M. Mann, F. Reggiori, W. Neupert, The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* **30**, 4356–4370 (2011).
22. K. M. Davies, C. Anselmi, I. Wittig, J. D. Faraldo-Gomez, W. Kuhbrandt, Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 13602–13607 (2012).
23. P. Paumard, J. Vaillier, B. Couliary, S. Schaefer, V. Soubannier, D. M. Mueller, D. Bréthes, J. P. di Rago, J. Velours, The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **21**, 221–230 (2002).
24. M. E. Harner, A.-K. Unger, W. J. Geerts, M. Mart, T. Izawa, M. Stenger, S. Gelmer, F. Reggiori, B. Westermann, W. Neupert, An evidence based hypothesis on the existence of two pathways of mitochondrial crista formation. *eLife* **5**, e18853 (2016).
25. R. Rabi, V. Soubannier, R. Scholz, F. Vogel, N. Mendi, A. Vasiljev-Neumeyer, C. Kömer, R. Jagasia, T. Keil, W. Baumeister, M. Cyrklaff, W. Neupert, A. S. Reichert, Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fc1 and Su e/g. *J. Cell Biol.* **185**, 1047–1063 (2009).
26. H. Rampelt, M. Bohnert, R. M. Zerbies, S. E. Horvath, B. Warscheld, N. Pfanner, M. van der Laan, Mic10, a core subunit of the mitochondrial contact site and cristae organizing system, interacts with the dimeric F1Fo-ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **429**, 1162–1170 (2017).
27. J. Velours, A. Dautant, B. Sallin, I. Sagot, D. Bréthes, Mitochondrial F1Fo-ATP synthase and organellar internal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1783–1789 (2009).
28. V. Wilkens, W. Kohl, K. Busch, Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution. *J. Cell Sci.* **126**, 103–116 (2013).
29. T. Appelhans, C. P. Richter, V. Wilkens, S. T. Hess, J. Plehler, K. B. Busch, Nanoscale organization of mitochondrial microcompartments revealed by combining tracking and localization microscopy. *Nano Lett.* **12**, 610–616 (2012).
30. H. Schägger, K. Pfeiffer, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777–1783 (2000).
31. R. W. Gilkerson, J. M. Selker, R. A. Capaldi, The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **546**, 355–358 (2003).
32. A. Kowald, T. B. L. Kirkwood, Evolution of the mitochondrial fusion-fission cycle and its role in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 10237–10242 (2011).
33. K. B. Busch, A. Kowald, J. N. Speilbrink, Quality matters: How does mitochondrial network dynamics and quality control impact on mtDNA integrity? *Philos. Trans. R. Soc. B* **369**, 20130442 (2014).
34. D. M. Wolf, M. Segawa, A. K. Kondadi, R. Anand, S. T. Bailey, A. S. Reichert, A. M. van der Bliek, D. B. Shackelford, M. Liesa, O. S. Shirihai, Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *EMBO J.* **38**, e101056 (2019).
35. K. Kehrein, R. Schilling, B. V. Möller-Hergt, C. A. Wurm, S. Jakobs, T. Lamkemeyer, T. Langer, M. Ott, Organization of mitochondrial gene expression in two distinct ribosome-containing assemblies. *Cell Rep.* **10**, 843–853 (2015).
36. Y. Itoh, J. Andréll, A. Choi, U. Richter, P. Matti, R. B. Best, A. Barrientos, B. J. Battersby, A. Amunts, Mechanism of membrane-tethered mitochondrial protein synthesis. *Science* **371**, 846–849 (2021).
37. G. Szyrach, M. Ott, N. Bonney, W. Neupert, J. M. Herrmann, Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* **22**, 6448–6457 (2003).
38. S. Stoldt, D. Wenzel, K. Kehrein, D. Riedel, M. Ott, S. Jakobs, Spatial orchestration of mitochondrial translation and OXPHOS complex assembly. *Nat. Cell Biol.* **20**, 528–534 (2018).
39. S. M. Jin, M. Lazarou, C. Wang, L. A. Kane, D. P. Narendra, R. J. Youle, Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J. Cell Biol.* **191**, 933–942 (2010).
40. J. R. McFalline-Figueroa, J. Vevea, T. C. Swayne, C. Zhou, C. Liu, G. Leung, I. R. Boldogh, L. A. Pon, Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell* **10**, 885–895 (2011).
41. T. C. Medeiros, R. L. Thomas, R. Ghillebert, M. Graef, Autophagy balances mtDNA synthesis and degradation by DNA polymerase POLG during starvation. *J. Cell Biol.* **217**, 1601–1611 (2018).
42. C. Janke, M. M. Maglera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel, M. Knop, A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–962 (2004).
43. J. A. Nickoloff, J. D. Singer, M. F. Hoekstra, F. Heffron, Double-strand breaks stimulate alternative mechanisms of recombination repair. *J. Mol. Biol.* **207**, 527–541 (1989).
44. S. M. Rafelski, M. P. Vlana, Y. Zhang, Y.-H. M. Chan, K. S. Thom, P. Yam, J. C. Fung, H. Li, L. da F. Costa, W. F. Marshall, Mitochondrial network size scaling in budding yeast. *Science* **338**, 822–824 (2012).
45. J. C. Yen, F. J. Chang, S. Chang, A new criterion for automatic multilevel thresholding. *IEEE Trans. Image Process.* **4**, 370–378 (1995).
46. D. F. Steele, C. A. Butler, T. D. Fox, Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5253–5257 (1996).
47. P. E. Thorsness, T. D. Fox, Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. *Genetics* **134**, 21–28 (1993).
48. M. Rak, E. Tetaud, F. Godard, I. Sagot, B. Sallin, S. Duvezin-Caubert, P. P. Slonimski, J. Rytka, J.-P. di Rago, Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* **282**, 10853–10864 (2007).
49. J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Plettsch, S. Preiblsch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
50. A. K. Unger, S. Gelmer, M. Harner, W. Neupert, B. Westermann, Analysis of yeast mitochondria by electron microscopy. In *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc., 2017), vol. 1567, pp. 293–314.
51. A. Göke, S. Schrott, A. Mizrak, V. Belyy, C. Osman, P. Walter, *Mrx6* regulates mitochondrial DNA copy number in *Saccharomyces cerevisiae* by engaging the evolutionarily conserved Lon protease Pim1. *Mol. Biol. Cell* **31**, 511–545 (2019).

Acknowledgments: We thank T. Kautzleben and N. Lebedeva for technical assistance, L. Heiderscheidt and M. Kroker for help with the experimental work, and S. Gelmer for help with electron microscopy. OMX microscopy was performed at the Center for Advanced Light Microscopy (CALM). We thank M. Schuldiner and members of the Osman laboratory for critically reading the manuscript. We are grateful for stimulating discussions within the “Mito-Club” throughout the course of this project. We thank Martin Ott and Jean Velours for providing reagents. **Funding:** C.O., C.J., R.R., and F.T. are supported by a grant from the European Research Council (ERC-STG-714739 IliUMITODNA). T.K. is supported by the Elitenetzwerk Bayern through the “Biological Physics” program and by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, project number 459304237). A.M., D.B., D.H., and H.L. are supported by the SPP 2202 Priority Program of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, project number 422857584). **Author contributions:** C.O. and C.J. designed the project. C.O., C.J., R.R., A.M., F.T., C.S., and T.K. performed experiments and/or analyzed experimental data. D.B. and D.H. developed a software to automatically detect yeast zygotes in microscopy images. C.O., C.J., R.R., and T.K. wrote the manuscript, with contributions from all coauthors. H.L. supervised super-resolution microscopy experiments and development of zygote detection software. P.W. supervised early stages of the project. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.

Submitted 7 April 2021
Accepted 8 July 2021
Published 1 September 2021
10.1126/sciadv.abi8886

Citation: C. Jakubke, R. Roussou, A. Malsner, C. Schug, F. Thoma, D. Bunk, D. Hörl, H. Leonhardt, P. Walter, T. Klecker, C. Osman, Cristae-dependent quality control of the mitochondrial genome. *Sci. Adv.* **7**, eabi8886 (2021).

Downloaded from https://www.science.org on August 29, 2022

Supplementary Materials for

Cristae-dependent quality control of the mitochondrial genome

Christopher Jakubke, Rodaria Roussou, Andreas Maier, Christina Schug, Felix Thoma, David Bunk, David Hörl,
Heinrich Leonhardt, Peter Walter, Till Klecker, Christof Osman*

*Corresponding author. Email: osman@bio.lmu.de

Published 1 September 2021, *Sci. Adv.* 7, eabi8886 (2021)
DOI: 10.1126/sciadv.abi8886

The PDF file includes:

Figs. S1 to S9
Tables S1 to S3
Legends for movies S1 to S6

Other Supplementary Material for this manuscript includes the following:

Movies S1 to S6

Supplementary materials

Figure legends S1 to S9

Movie legends S1 to S6

Table legends S1 to S3

Supplementary figure S1-S9

Tables S1 to S3

Movie S1 to S6

Figure S1

(A) Quantitative PCR analysis of mtDNA levels of WT or $\Delta cob::ARG8$ strains, which were used in the pedigree analysis (Fig. 1C). No difference in mtDNA levels between both strains are apparent. The average value is derived from three biological replicates. The value for each biological replicate was derived from three technical replicates; Error bars indicate SD. n. s. - non significant, t-test.

(B) Carry-over cell material does not support growth upon restreaking. Replica plating during the pedigree analysis results in carry-over of cell material. While such cell material is easily distinguished from growing cells by direct visual inspection of plates, it is difficult to discern on photos. For this experiment, cell material was restreaked on selective plate to demonstrate the difference between carry-over cell material and cell growth. Asterisks indicate carry-over cell material.

(C) PCR analysis corroborates results from the growth-based pedigree assay. Genomic DNA was extracted directly from YPD grown colonies without further incubation from three pedigree lineages and remaining cell material was replica plated onto YPG or SC-ARG (lacking arginine) plates. Presence of the *COB* gene (present in WT mtDNA, which supports growth on YPG) or the *ARG8* gene (present in $\Delta cob::ARG8$ mtDNA, which supports growth on SC-Arg) was tested by PCR using specific oligos for the respective genes. PCR results correlate perfectly with the growth based analysis.

(D) Schematic illustration of the pedigree analysis, explaining the skipping of generations on a respective medium. YPG - rich medium containing the non-fermentable carbon source glycerol, SC-Arg - synthetic defined medium lacking arginine.

Figure S2

(A) Pedigree analysis of WT cells. The experiment is virtually identical to the experiment presented in Fig. 1C with the difference that the starting strains for the pedigree analysis had switched mating types. Specifically, in this experiment the strain containing WT mtDNA had mating type *alpha*, whereas the strain containing $\Delta cob::ARG8$ had mating type *a*. Striped bars indicate percentage of heteroplasmic cells containing WT and $\Delta cob::ARG8$ mtDNA. Grey or red bars indicate percentage of homoplasmic cells containing WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA, respectively.

(B) Pedigree analysis of cells containing *ARG8* inserted neutrally into mtDNA upstream of the *COX2* gene. We cannot distinguish between cells that are heteroplasmic for both mtDNA species and cells where *ARG8* had recombined into WT mtDNA. The shown result, however, indicates that *ARG8* does not confer a strong disadvantage on mtDNA, which could lead to its removal.

Figure S3

(A) Quantitative PCR analysis of mtDNA levels of WT or $\Delta cob::ARG8-TetO$ -TetR-3xmRuby3 strains, which were used for the microscopy experiments presented in Fig. 1D. A slight increase in the mtDNA levels of the $\Delta cob::ARG8-TetO$ -TetR-3xmRuby3 is apparent. The average value is derived from three biological replicates. The value for each biological replicate was derived from three technical replicates; Error bars indicate SD. n. s. - non significant, t-test.

(B) Additional microscopic images of the inheritance of either LacO-marked intact or TetO-marked $\Delta cob::ARG8-TetO$ mtDNA. Images complement data shown in Fig. 1D.

Scale bar: D 10 μ m.

Figure S4

(A and B) Time-lapse microscopy of mating events between WT cells expressing either matrix-targeted NG or matrix-targeted mKate2. Mating events are shown, where either both cells contained WT mtDNA (A) or one cell contained WT mtDNA and the other contained $\Delta cob::ARG8$ mtDNA (B). Selected time-frames for (B) are shown in Fig. 1E.

(C and D) Similar to (A), except that cells with deletions of the nuclear-encoded $\Delta dnm1$ (C) or $\Delta atg32$ (D) were used.

Scale bars: A-D 10 μm .

Figure S5

(A) Schematic illustration of the NG-tagged *ATP6* within mtDNA.

(B) Quantitative PCR analysis of mtDNA levels of WT or strains expressing the Atp6-NG protein. The average value is derived from three biological replicates. The value for each biological replicate was derived from three technical replicates; Error bars indicate SD. n. s. - non significant, t-test.

(C) Petite frequency of the Atp6-NG strain in comparison to WT and the $\Delta atp21$ strains.

(D) Westernblot analysis of strains harbouring either WT or *ATP6-NG* mtDNA. Aconitase (Aco1) was used as a loading control.

(E) Widefield fluorescence microscopy images of diploid cells harbouring *ATP6-NG* mtDNA and expressing nuclear-encoded matrix-targeted mScarlet.

Scale bar: E 10 μm .

Figure S6

(A) Time-lapse microscopy of mating events between WT cells harbouring *ATP6*-NG mtDNA and WT cells harbouring WT mtDNA and expressing nuclear-encoded matrix-targeted Kate2.

(B) Time-lapse microscopy of mating events between cells expressing NG-tagged Cox4 and cells expressing nuclear-encoded matrix-targeted mKate2.

(C) Growth analysis of strains expressing NG fused to Pam16 or the transmembrane domain of Fis1 in comparison to WT. Strains were used in the time-lapse experiment presented in Fig. 2, E and F and Fig. S4D and E.

(D) Westernblot analysis of strains harbouring the NG-tagged version of Pam16. Aconitase was used as a loading control. Note that no signal for free NG is detectable indicating that NG is not cleaved off.

(E) Time-lapse microscopy of mating events between WT cells expressing NG fused to the transmembrane domain of Fis1 and WT cells expressing nuclear-encoded matrix-targeted mKate2.

(F) Time-lapse microscopy of mating events between cells expressing NG-tagged Pam16 and cells expressing nuclear-encoded matrix-targeted mKate2.

Scale bars: A and D-E 10 μm .

Figure S7

(A) Quantification of the equilibration of soluble Su9-mKate2 protein in mating experiments shown in Fig. 3A and B; ** $P < 0.01$, t-test.

(B) Quantification of the Atp6-NG in the daughter cells of zygotes from mating experiments shown in Fig. 3A and B; * $P < 0.05$, t-test.

(C) Spot test of strains expressing Atp6-NG or Atp6-mKate2 compared to the WT and a strain harbouring $\Delta atp6$ mtDNA.

(D) Quantification of the co-localization of Atp6-NG and Atp6-mKate2 in daughter cells derived from matings between WT, $\Delta atp20$ or $\Delta atp20$ cells, in which parental cells contained either *ATP6-NG* or *ATP6-mKate2* mtDNA. The Pearson (PCC) and Manders (MCC) correlation coefficients between Atp6-NG and Atp6-mKate2 signals along the mitochondrial network of daughter cells were determined for multiple cells in three independent experiments; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test.

Figure S8

(A) Electron micrographs of mitochondria from WT, $\Delta atp20$, $\Delta atp21$, and $\Delta atp20 \Delta atp21$ cells grown in rich medium containing glucose.

(B) Quantification of cristae shape from cells grown in rich medium containing glucose. For each strain, mitochondria from 50 cells were scored for mitochondrial ultrastructure and grouped into the indicated categories. Shown is the mean \pm standard deviation from three independent experiments. Examples of mitochondria with altered cristae shape are depicted on the right.

(C) Electron micrographs of mitochondria from $\Delta atp20 \Delta atp21$ cells grown in rich medium containing galactose. Shown are two representative cells. For each cell, the same mitochondrion was imaged in consecutive 70 nm ultrathin sections.

Scale bars: A and C 500 nm; B 200 nm.

Figure S9

(A) Quantitative PCR analysis of mtDNA levels of WT, $\Delta atp20$, $\Delta atp21$, $\Delta atp20\Delta atp21$, $\Delta mic10$, or $\Delta mic60$ strains containing WT or Δcob mtDNA. Strains were used for the pedigree analysis presented in Figure 4A-F. The average value is derived from three biological replicates. The value for each biological replicate was derived from three technical replicates; Error bars indicate SD. n. s. - non significant, t-test.

(B) Petite frequency of the indicated deletion strains.

Movie S1

Mitochondrial morphology during mating events of WT cells. Mating events between two cells containing either WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA. Cells expressed either matrix-targeted mKate2 (WT mtDNA, cyan) or NG ($\Delta cob::ARG8$ mtDNA, magenta). Mating events were monitored by live-cell microscopy. Brightfield, single fluorescent channels and a merge from both fluorescent channels are shown.

Movie S2

Mitochondrial morphology during mating events of $\Delta dnm1$ cells. Mating events between two $\Delta dnm1$ cells containing either WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA. Cells expressed either matrix-targeted mKate2 (WT mtDNA, cyan) or NG ($\Delta cob::ARG8$ mtDNA, magenta). Mating events were monitored by live-cell microscopy. Brightfield, single fluorescent channels and a merge from both fluorescent channels are shown. Images were taken in 7 min intervals.

Movie S3

Mitochondrial morphology during mating events of $\Delta atg32$ cells. Mating events between two $\Delta atg32$ cells containing either WT or $\Delta cob::ARG8$ mtDNA. Cells expressed either matrix-targeted mKate2 (WT mtDNA, cyan) or NG ($\Delta cob::ARG8$ mtDNA, magenta). Mating events were monitored by live-cell microscopy. Brightfield, single fluorescent channels and a merge from both fluorescent channels are shown. Images were taken

in 7 min intervals.

Movie S4

Diffusion of mitochondrial-encoded Atp6-NG throughout the mitochondrial network of zygotes. Cells expressing matrix-targeted mKate2 (cyan) were mated with cells expressing mtDNA-encoded Atp6-NG (magenta) and were monitored by live cell imaging. Brightfield, single fluorescent channels and a merge from both fluorescent channels are shown. Images were taken in 7 min intervals.

Movie S5

Diffusion of Fis-NG throughout the mitochondrial network of zygotes. Cells expressing matrix-targeted mKate2 (cyan) were mated with cells expressing nuclear-encoded Fis1-NG (magenta) and were monitored by live cell imaging. Brightfield, single fluorescent channels and a merge from both fluorescent channels are shown. Images were taken in 7 min intervals.

Movie S6

Diffusion of Pam16-NG throughout the mitochondrial network of zygotes. Cells expressing matrix-targeted mKate2 (cyan) were mated with cells expressing nuclear-encoded Pam16-NG (magenta) and were monitored by live cell imaging. Brightfield, single

fluorescent channels and a merge from both fluorescent channels are shown. Images were taken in 7 min intervals.

Table S1

Yeast strains used in this study.

Table S2

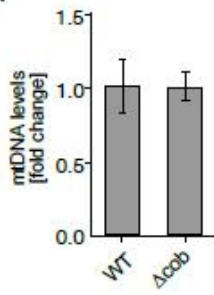
Primers used in this study.

Table S3

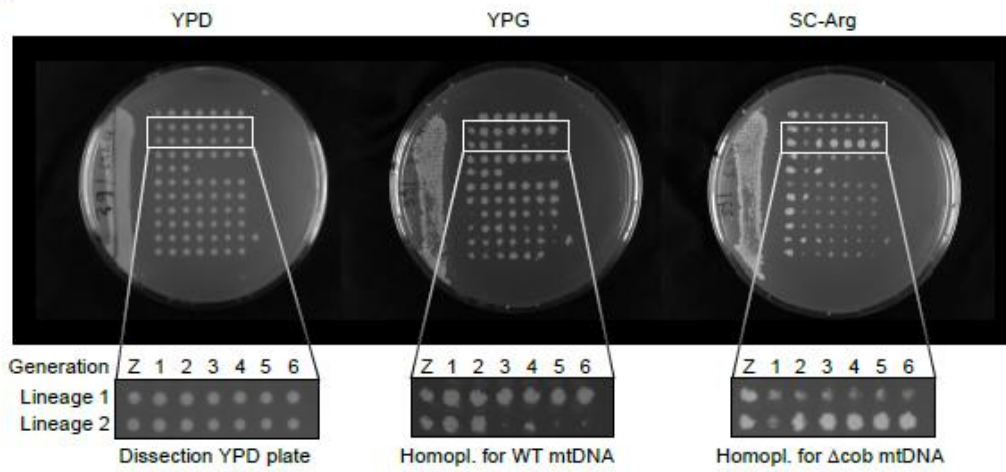
Plasmids used in this study.

Supplemental Figure 1

A

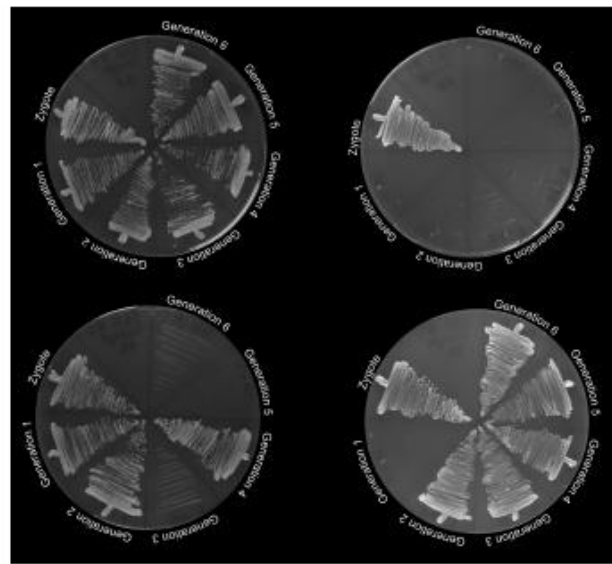


B



Lineage 1

Lineage 2

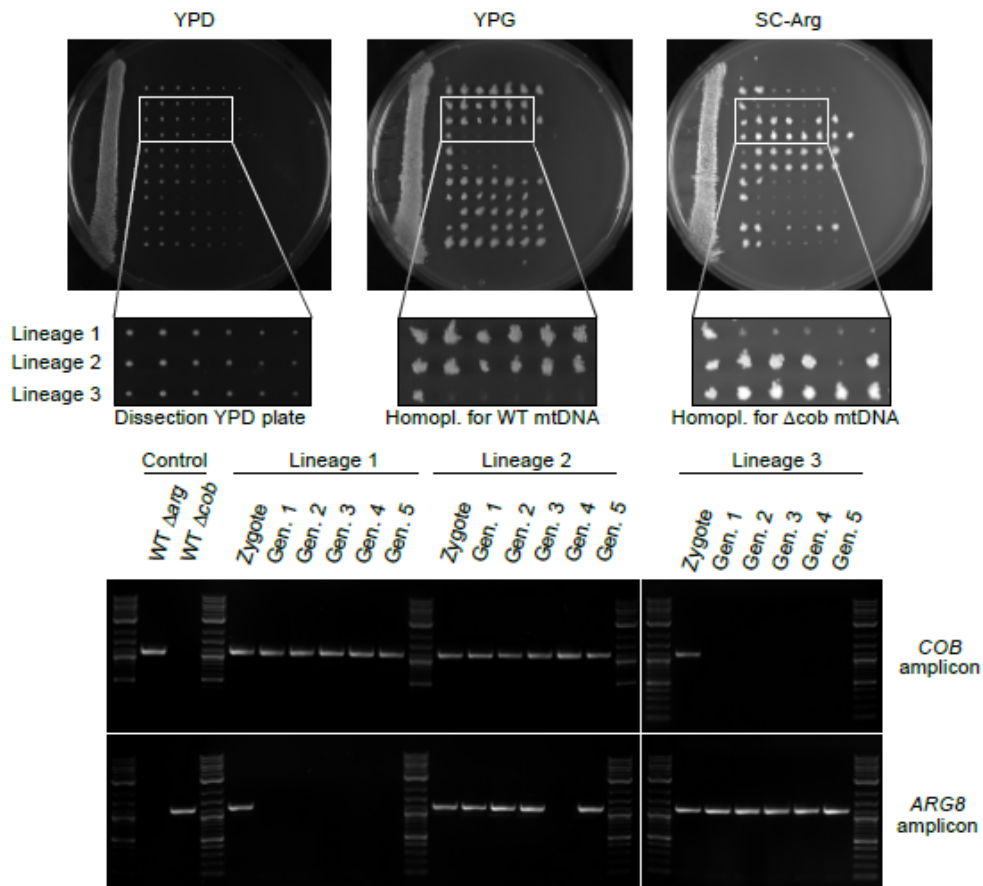


YPG

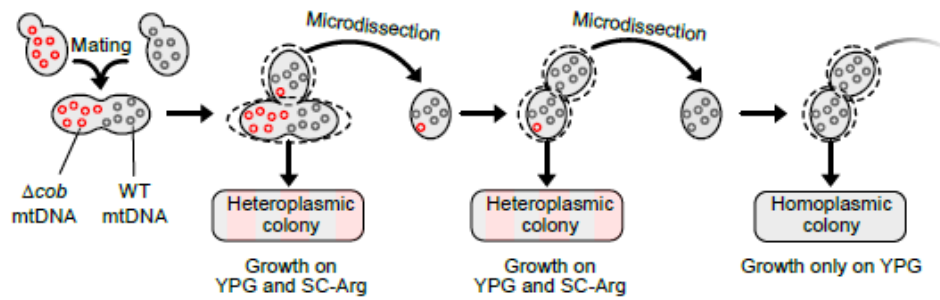
SC-Arg

Supplemental Figure 1

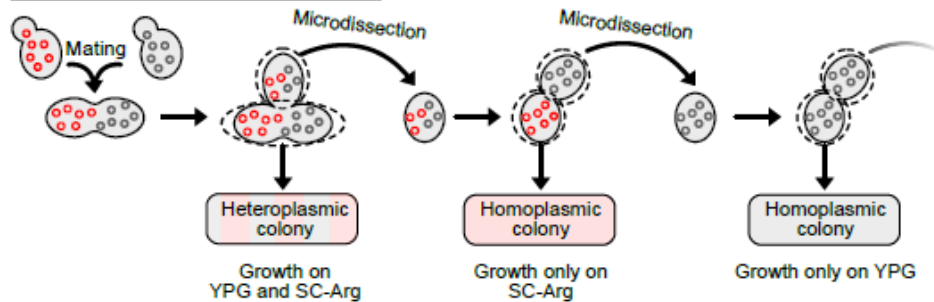
C



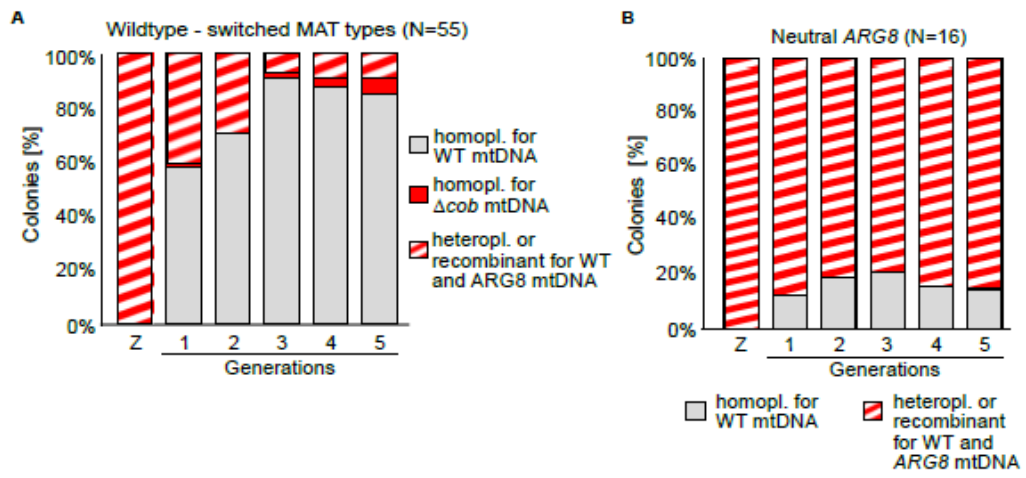
D Pedigree analysis, most often observed pattern



Pedigree analysis, generation skipping

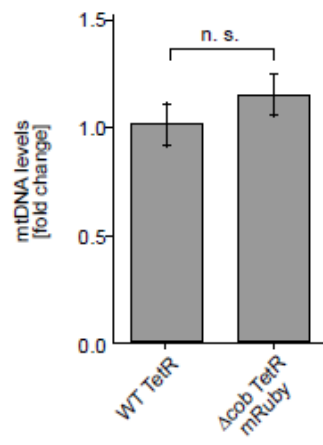


Supplemental Figure 2

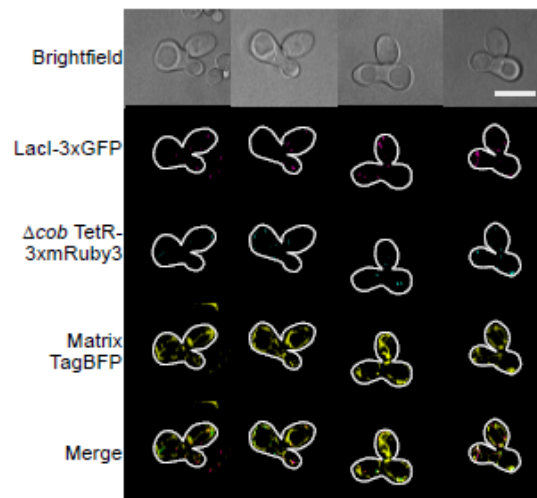


Supplemental Figure 3

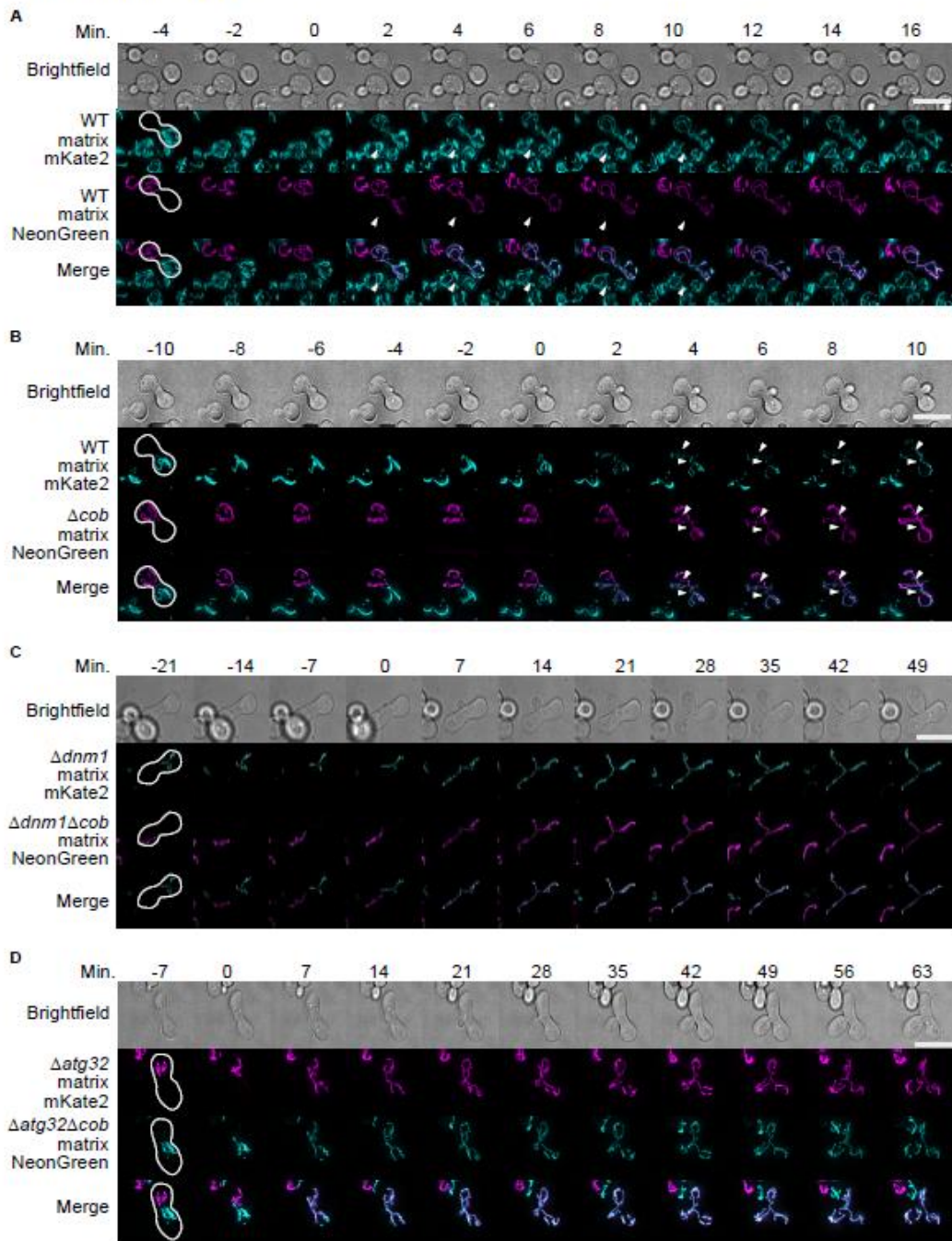
A



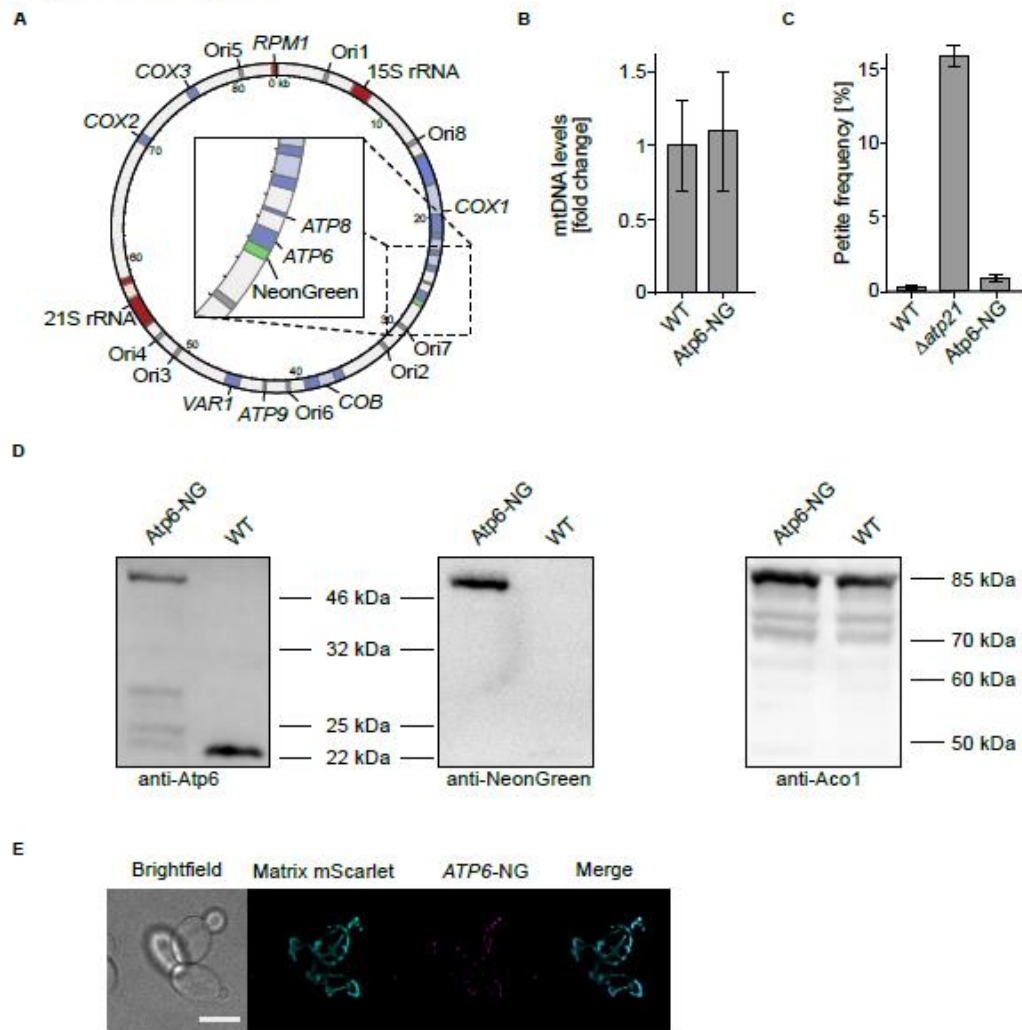
B



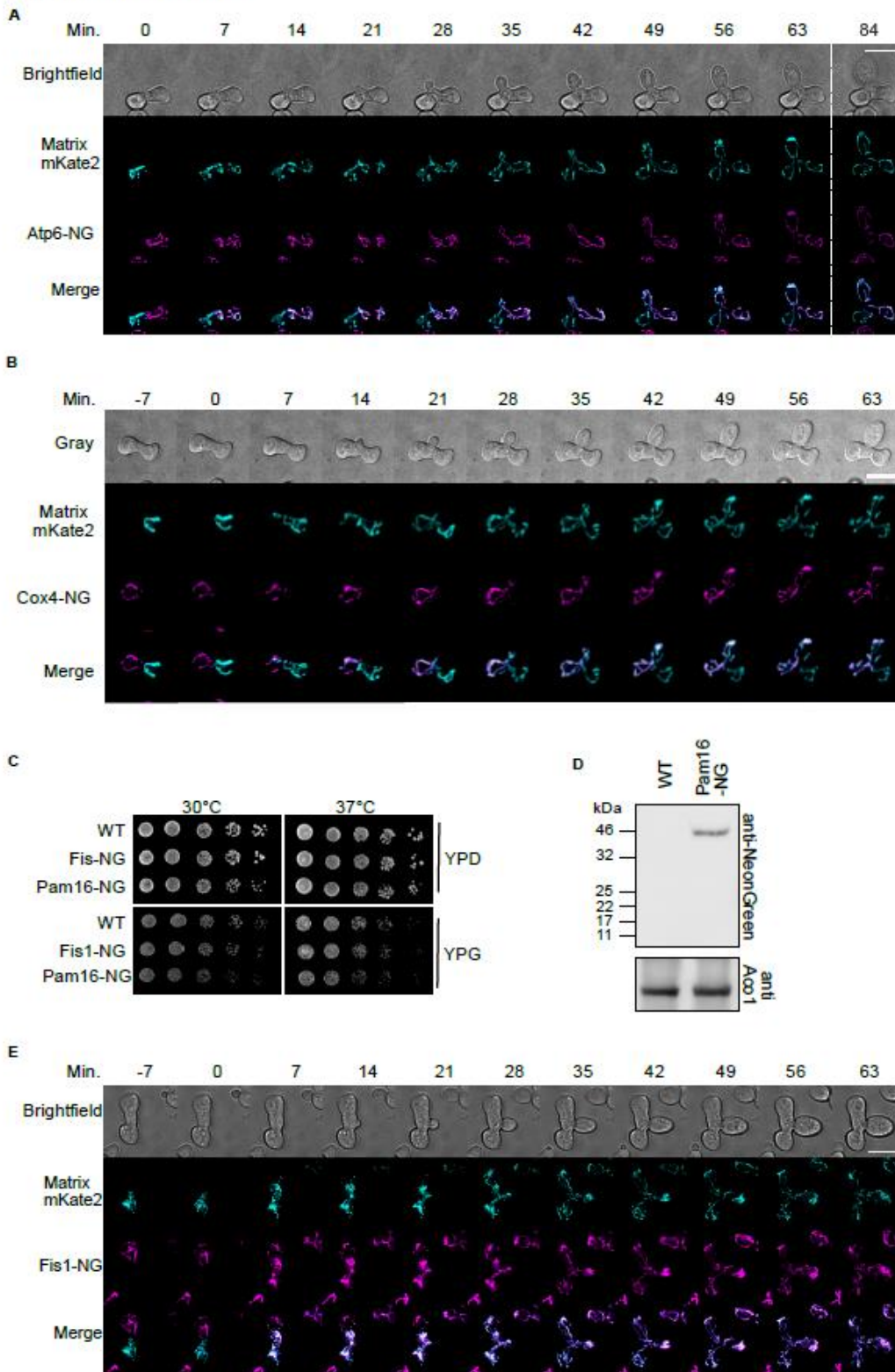
Supplemental Figure 4



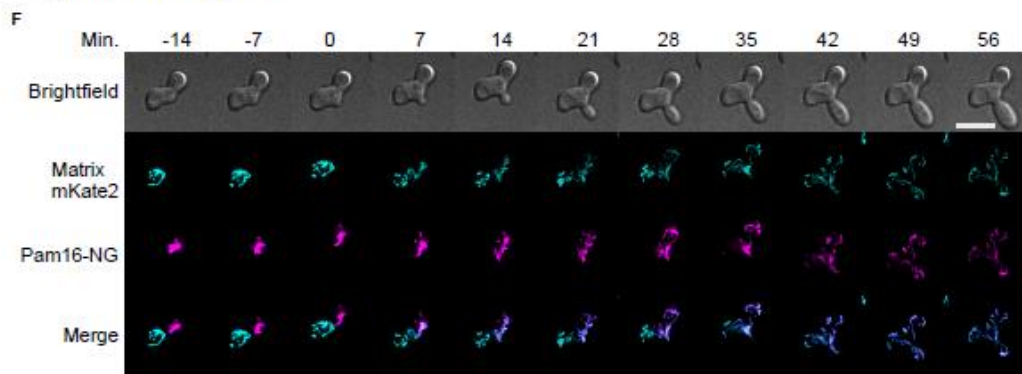
Supplemental Figure 5



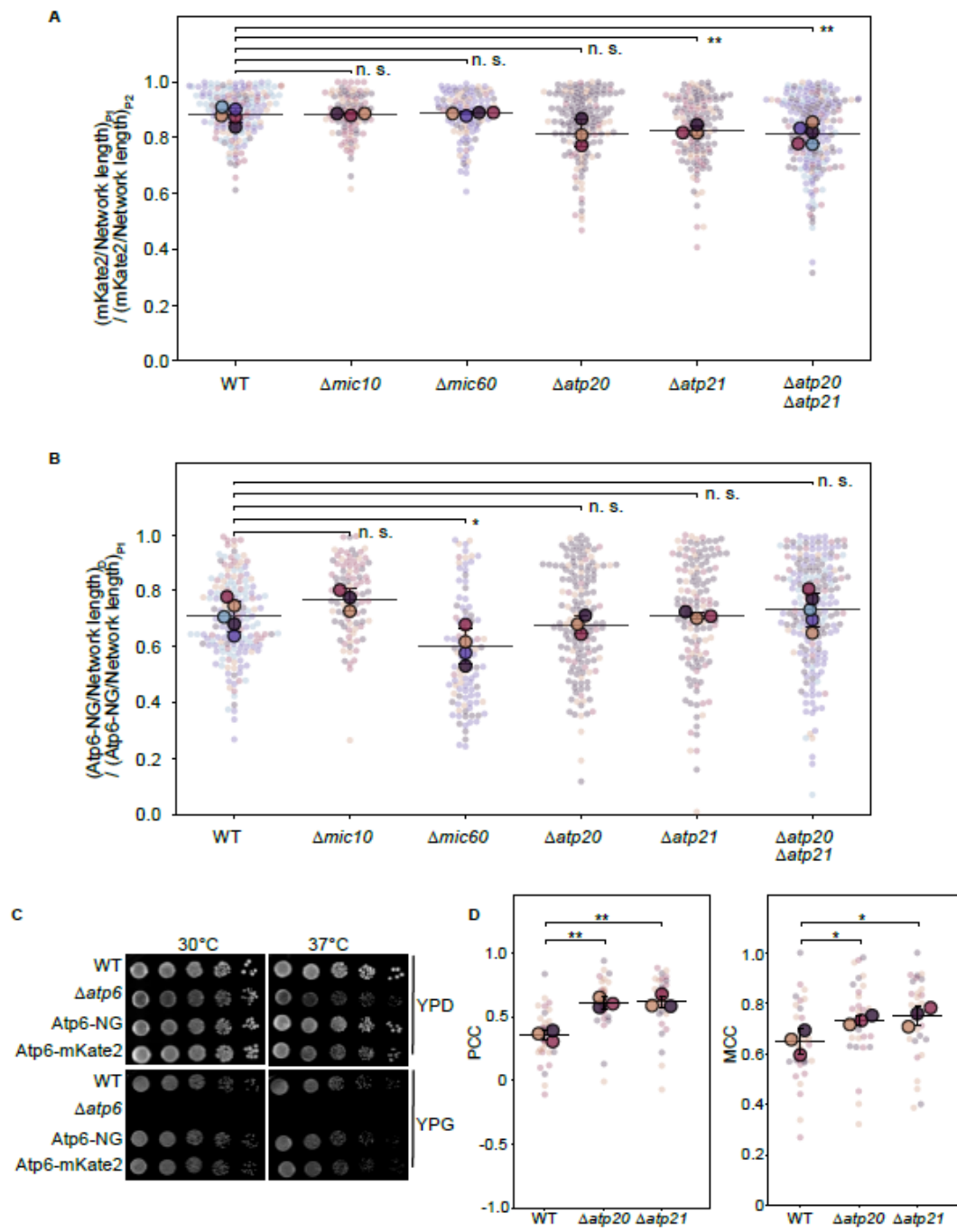
Supplemental Figure 6



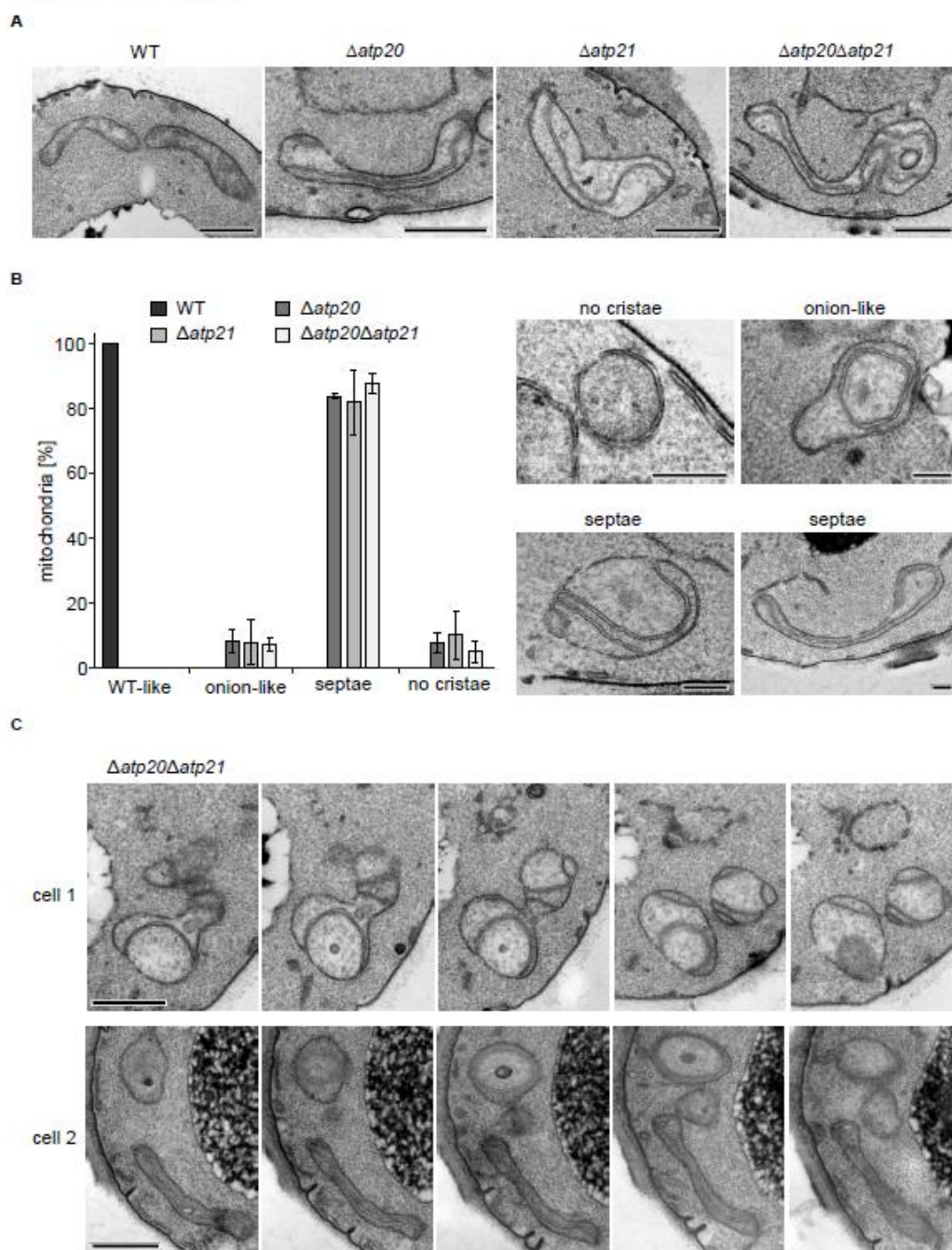
Supplemental Figure 6



Supplemental Figure 7



Supplemental Figure 8



Supplemental Figure 9

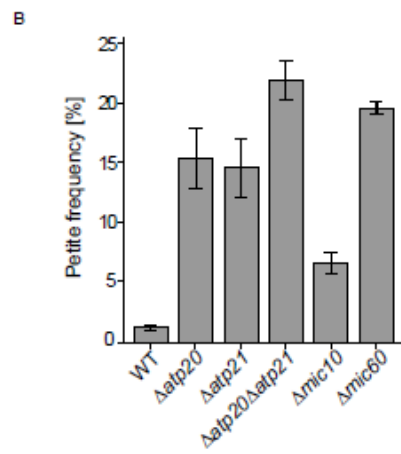
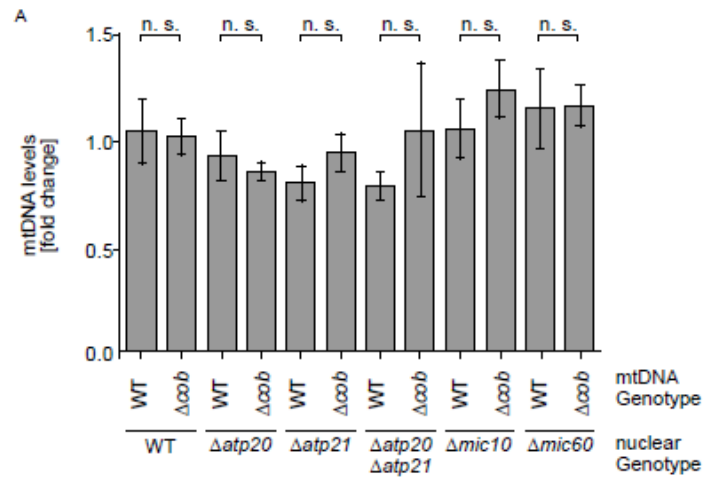


Table 1 - Yeast Strains used in this study

Name / Alias	Short description	Mating type	Genotype	Source
yCO380	WT	<i>Mat a</i>	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO</i>	1
yCO381	WT	<i>Mat alpha</i>	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO</i>	1
yCO391	$\Delta arg8$	<i>Mat a</i>	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA</i>	2
yCO354	<i>$\Delta arg8::HIS3$ $\Delta cob::ARG8M$</i>	<i>Mat alpha</i>	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA</i>	2
yCJ048	Neutral ARG8	<i>Mat alpha</i>	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 $\Delta arg8::hphNT1$ ARG8::mtDNA</i>	This study
yCO392	$\Delta arg8$	<i>Mat alpha</i>	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA</i>	This study
yCO969	<i>$\Delta arg8::HIS3$ $\Delta cob::ARG8M$</i>	<i>Mat a</i>	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA</i>	This study
yCO460	<i>$\Delta cob::ARG8$-TetO-TetR-3xRuby</i>	<i>Mat a</i>	<i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 his3-11,15 $\Delta arg8::hphNT$ pvt100u-mtTagBFP HO-Su9-TetR-3xmRuby3--KanMX4-HO $\Delta cob::ARG8$-TetO</i>	This study
yCJ033	LacO-LacI-3xGFP	<i>Mat alpha</i>	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO HO-Su9-TagBFP-Pcup-Su9-3xGFP-LacI::kanMX4</i>	This study
yCJ009	HO::Su9-mKate2	<i>Mat a</i>	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO HO::Su9-mKate2::kanMX6</i>	This study

yCJ010	HO::Su9-NG	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO HO::Su9-NG::kanMX6</i>	This study
yCJ078	<i>Δarg8::HIS3 Δcob::ARG8M HO::Su9-NG</i>	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M HO::Su9-NG-kanMX6 intronless mtDNA</i>	This study
yCJ081	<i>Δarg8::HIS3 HO::Su9-mKate2</i>	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA HO::Su9-mKate2::kanMX6</i>	This study
yCJ002	<i>Δdnm1 Δarg8::HIS3 Δcob::ARG8M</i>	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA Δdnm1::hphNT1</i>	This study
yCJ004	<i>Δdnm1 Δarg8</i>	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA Δdnm1::hphNT1</i>	This study
yCJ085	<i>Δdnm1 Δarg8::HIS3 Δcob::ARG8M HO::Su9-NG</i>	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA Δdnm1::hphNT1 HO::Su9-NG-kanMX6</i>	This study
yCJ086	<i>Δdnm1 Δarg8 HO::Su9-mKate2</i>	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA Δdnm1::hphNT1 HO::Su9-mKate2-kanMX6</i>	This study
yCJ074	<i>Δatg32 Δarg8::HIS3 Δcob::ARG8M</i>	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA Δatg32::hphNT1</i>	This study
yCJ075	<i>Δatg32 Δarg8</i>	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA Δatg32::hphNT1</i>	This study
yCJ076	<i>Δatg32 Δarg8::HIS3 Δcob::ARG8M HO::Su9-NG</i>	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA Δatg32::hphNT1 HO::Su9-NG-kanMX6</i>	This study

yCJ077	<i>Δatg32 Δarg8</i> <i>HO::Su9- mKate2</i>	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112</i> <i>ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless</i> <i>mtDNA Δatg32::hphNT1 HO::Su9- mKate2-kanMX6</i>	This study
yCO114	<i>rho⁰</i>	Mat alpha	<i>leu2 ura3-52 ade2-101 arg8::URA3</i> <i>kar1-1 rho⁰</i>	3
yCO115	<i>rho⁺ Δcox2</i>	Mat a	<i>lys2 leu2-3,112 ura3-52 his3HinDIII</i> <i>arg8::hisG rho⁺ cox2-62</i>	3
yCJ025	MR6 WT	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112</i> <i>ura3-1 CAN1 arg8::HIS3</i>	4
yCJ026	MR10 <i>Δatp6</i>	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112</i> <i>ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 Δatp6</i>	4
yCJ043	ATP6-NG	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112</i> <i>ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6-NG</i>	This study
yCJ126	<i>HO::Su9- mScarlet</i> <i>ATP6-NG</i>	Mat a/ alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112</i> <i>ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6-NG</i> <i>HO::Su9-mScarlet-URA3</i>	This study
yCJ045	<i>HO::Su9- mKate2</i>	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1</i> <i>his3-11,15 mt-LacO HO::Su9- mKate2-kanMX6</i>	This study
yCJ019	COX4- NeonGreen	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1</i> <i>his3-11,15 mt-LacO Cox4-NeonGreen</i>	This study
yCJ072	Fis1-NG	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112</i> <i>ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless</i> <i>mtDNA FIS1-NG::kanMX6</i>	This study
yCJ114	Pam16-NG	Mata	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1</i> <i>his3-11,15 mt-LacO PAM16- NG::kanMX</i>	This study
yCJ051	<i>Δatp21 ATP6- NG</i>	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112</i> <i>ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6-NG</i> <i>Δatp21::hphNT1</i>	This study
yCJ052	<i>Δatp21</i> <i>HO::Su9- mKate2</i>	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1</i> <i>his3-11,15 mt-LacO Mito</i> <i>Δatp21::hphNT1 HO::Su9-mKate2- kanMX6</i>	This study

yCJ053	$\Delta atp20$ ATP6-NG	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6-NG $\Delta atp20::hphNT1$</i>	This study
yCJ054	$\Delta atp20$ HO::Su9-mKate2	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO Mito $\Delta atp20::hphNT2$ HO::Su9-mKate2-kanMX6</i>	This study
yCJ057	$\Delta atp20\Delta atp21$ ATP6-NG	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6-NG $\Delta atp21::hphNT1$ $\Delta atp20::hphNT2$</i>	This study
yCJ058	$\Delta atp20\Delta atp21$ HO::Su9-mKate2	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO Mito $\Delta atp21::hphNT1$ $\Delta atp20::hphNT2$ HO::Su9-mKate2-kanMX6</i>	This study
yCO754	$\Delta mic10$ ATP6-NG	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6-NG $\Delta mic10::hphNT1$</i>	This study
yCO755	$\Delta mic10$ HO::Su9-mKate2	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO Mito $\Delta mic10::hphNT1$ HO::Su9-mKate2-kanMX6</i>	This study
yCJ066	$\Delta mic60$ ATP6-NG	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6-NG $\Delta mic60::hphNT1$</i>	This study
yCJ067	$\Delta mic60$ HO::Su9-mKate2	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO Mito $\Delta mic60::hphNT1$ HO::Su9-mKate2-kanMX6</i>	This study
yCJ120	ATP6-mKate2	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6-mKate2</i>	This study
yCJ084	ATP6-NG	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 ATP6-NG</i>	This study
yCJ123	ATP6-NG pvt100u-TagBFP	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 ATP6-NG pvt100u-TagBFP</i>	This study

yCJ124	ATP6-mKate2 pvt100u- TagBFP	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6- mKate2 pvt100u-TagBFP</i>	This study
yCJ127	ATP6-NG Δ atp20 pvt100u- TagBFP	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 ATP6-NG Δatp20::NatNT2 pvt100u-TagBFP</i>	This study
yCJ128	ATP6-mKate2 Δ atp20 pvt100u- TagBFP	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6- mKate2 Δatp20::NatNT2 pvt100u- TagBFP</i>	This study
yCJ130	ATP6-NG Δ atp21 pvt100u- TagBFP	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 ATP6-NG Δatp21::hphNT1 pvt100u-TagBFP</i>	This study
yCJ132	ATP6-mKate2 Δ atp21 pvt100u- TagBFP	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 ATP6- mKate2 Δatp21::hphNT1 pvt100u- TagBFP</i>	This study
yCJ103	WT LacO-LacI	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO Su9-3xGFP- LacI::kanMX6</i>	This study
yCJ104	WT matrix- mKate2	Mat a	<i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 HO-Su9-mKate2</i>	This study
yCJ105	LacO-LacI Δ atp21	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO Su9-3xGFP- LacI::kanMX6 Δatp21::NatNT2</i>	This study
yCJ106	matrix-mKate2 Δ atp21	Mat a	<i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 HO-Su9-mKate2 Δatp21::NatNT2</i>	This study
yCJ134	LacO-LacI Δ mic60	Mat alpha	<i>leu2-3,112 can1-100 ura3-1 his3-11,15 mt-LacO Su9-3xGFP- LacI::kanMX6 Δmic60::hphNT1</i>	This study
yCJ135	matrix-mKate2 Δ mic60	Mat a	<i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 HO-Su9-mKate2 Δmic60::hphNT1</i>	This study
yCJ020	Δ atp20 Δ arg8::HIS3 Δ cob::ARG8M	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA Δatp20::hphNT1</i>	This study

yCJ022	$\Delta atp20 \Delta arg8$	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA $\Delta atp20::hphNT1$</i>	This study
yCJ046	$\Delta atp20 \Delta atp21 \Delta arg8::HIS3 \Delta cob::ARG8M$	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA $\Delta atp21::hphNT1 \Delta atp20::kanMX6$</i>	This study
yCJ047	$\Delta atp20 \Delta atp21 \Delta arg8$	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA $\Delta atp21::hphNT1 \Delta atp20::kanMX6$</i>	This study
yCJ005	$\Delta atp21 \Delta arg8::HIS3 \Delta cob::ARG8M$	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA $\Delta atp21::hphNT1$</i>	This study
yCJ007	$\Delta atp21 \Delta arg8$	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA $\Delta atp21::hphNT1$</i>	This study
yCO756	$\Delta mic10 \Delta arg8::HIS3 \Delta cob::ARG8M$	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA $\Delta mic10::hphNT1$</i>	This study
yCO757	$\Delta mic10 \Delta arg8$	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA $\Delta mic10::hphNT1$</i>	This study
yCJ070	$\Delta mic60 \Delta arg8::HIS3 \Delta cob::ARG8M$	Mat alpha	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 cob::ARG8M intronless mtDNA $\Delta mic60::hphNT1$</i>	This study
yCJ071	$\Delta mic60 \Delta arg8$	Mat a	<i>ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 arg8::HIS3 intronless mtDNA $\Delta mic60::hphNT1$</i>	This study

¹ Osman et al. 2015

² Gruschke et al. 2011

³ Steele et al. 1996

⁴ Rak et al. 2007

Tabel 2 - Primers used in this study

Name / Alias	Sequence
CO356 <i>Δdnm1</i> S1	CATTAAGTAGCTACCAGCGAATCTAAATACGACGGATAAAGAATG CGTACGCTGCAGGTCGAC
CO357 <i>Δdnm1</i> S2	CGCAATGTTGAAGTAAGATCAAAAATGAGATGAATTATGCAATTA ATCGATGAATTCGAGCTCG
CO573 <i>Δatg32</i> S1	TCACAAAAGCAAAAAAATCTGCCAGGAACAGTAAA CATATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
CO574 <i>Δatg32</i> S2	GTGAGTAGGAACGTGTATGTTTGTGTATATTGGAA AAAGGTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
CO888 <i>Δmic10</i> S1	TGCTACGAGAGGGAATAAACACGGAAAAAGACAAAATATACCAT GCGTACGCTGCAGGTCGAC
CO889 <i>Δmic10</i> S2	TATTTTTTTTTTTGAATATATATAAAGCATCGTCGCTTAAGACTAAT CGATGAATTCGAGCTCG
CO986 <i>Δatp20</i> S1	ACCTGCCGATAAATCATATTTT CAGAACGCTAATCAATTCATC ATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
CO987 <i>Δatp20</i> S2	ACGAATATACAAGGGTTTTGCGAATAGATAGAATTA AAAAGCT TAATCGATGAATTCGAGCTCG
CO1104 <i>Δatp21</i> S1	CGGAACATAACGTATATAGGAACTAGCTGAGTGAGTTAAAG GATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
CO1105 <i>Δatp21</i> S2	TAATGTGCATTTTTAGTATCCTATTTATGTTGAAGCTTCTATTTA ATCGATGAATTCGAGCTCG
CO1114 qPCR <i>Cox1</i> fv	CTACAGATACAGCATTTC CAAGA
CO1115 qPCR <i>Cox1</i> rv	GTGCCTGAATAGATGATAATGGT
CO1116 qPCR <i>Act1</i> fv	CACCCTGTTCTTTT GACTGA
CO1117 qPCR <i>Act1</i> rv	CGTAGAAGGCTGGAACGTTG
CO1196 <i>Δmic60</i> S1	GGCATAAGAACGCATTGAAAAGTCTAAAAACTAATATTCGT ATGCGTACGCTGCAGGTCGAC

CO1197 <i>Δmic60</i> S2	AGGTGTAATGACGTACATCTCTTTTCTCTTTGTATTATTCTTTC AATCGATGAATTCGAGCTCG
CO1268 tagging of <i>Fis1</i> fw	GTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAACAATGGTCTCAA AAGGGGAGG
CO1269 tagging of <i>Fis1</i> rv	CCAAGCTTCTTATATAATTCATCCATTCCCATGACA
CO1270 backbone for <i>Fis1</i> -NG fw	GGATGAATTATATAAGAAGCTTGGTCATGGTACTGA
CO1271 backbone for <i>Fis1</i> -NG rv	GCAAGCTAAACAGATCTTACCTTCTCTTGTTCCTTAAGAAGAAAC
CO1677 tagging of <i>Pam16</i> fw	CGAATTCAACAAATTCATCTGGTGCAGATAATAGTGCAAGC AGCAATCAGCGTACGCTGCAGGTCGAC
CO1678 tagging of <i>Pam16</i> rv	GCTGCATGCTTTTCGATAACACTTGTGACGTAATGATGGAGGCTT CCTTGAATCGATGAATTCGAGCTCG
CO562 Amplification of <i>COB</i> for	AATCAAATGTGTATTTAAGTTTAGTG
CO562 Amplification of <i>COB</i> rev	TTATTTATTAACTCTACCGATATAGAAT
CO891 Amplification of <i>ARG8</i> for	TCAAGACCTGAAGATTTATGTATCACAAGAGG
CO601 Amplification of <i>ARG8</i> rev	TTAAGCATATACAGCTTCGATAGC
CO982 S3 tagging of Cox4	TACAAACTAAACCCTGTTGGTGTTCCAAATGATGACCACCATCA CGGTGACGGTGCTGGTTTA
CO982 S2 tagging of Cox4	AAAAAGTAAAAGAGAAACAGAAGGGCAACTTGAATGATAAGATT AATCGATGAATTCGAGCTCG

Table 3 - Plasmids used in this study

Name / Alias	Needed for	Source
pCO021	Janke deletion cassette G418 resistance	1
pCO059	Janke deletion cassette NAT resistance	1
pCO074	Janke deletion cassette hygromycin resistance	1
pCO151	pvt100u-TagBFP	This study
pCO282	pCOB-ST5	2
pCO441	HO-P _{PGK1} -Su9-mKate2-kanMX6-HO	This study
pCO442	HO-P _{PGK1} -Su9-NG-kanMX6-HO	This study
pCO307	pCOB/ST5 Arg8+Term+synth-TetO	This study
pCO408	HO-P _{CUP} -Su9-3xGFP-LacI—P _{PGK} -Su9-TagBFP-KanMX	This study
pCO407	HO-P _{CUP} -Su9-TetR-3xRuby3—P _{PGK1} -Su9-TagBFP-KanMX4-HO	This study
pCO444	Plasmid for biolistic transformation and generation of <i>ATP6</i> -mtNeonGreen	This study
pCO494	C-Terminal tagging of proteins with NeonGreen	This study
pCJ013	Plasmid for biolistic transformation and generation of <i>ATP6</i> -mtNeonGreen	This study

¹ Janke et al. 2004

² Gruschke et al. 2011

Cristae-dependent quality control of the mitochondrial genome

Christopher JakubkeRodaria RoussouAndreas MaiserChristina SchugFelix ThomaDavid BunkDavid HörlHeinrich LeonhardtPeter WalterTill KleckerChristof Osman

Sci. Adv., 7 (36), eabi8886. • DOI: 10.1126/sciadv.abi8886

View the article online

<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abi8886>

Permissions

<https://www.science.org/help/reprints-and-permissions>

Downloaded from <https://www.science.org> on August 29, 2022

Use of this article is subject to the [Terms of service](#)

Science Advances (ISSN) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science Advances* is a registered trademark of AAAS.
Copyright © 2021 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC).



Publikation 2: „YeastMate: Neural network-assisted segmentation of mating and budding events in *S. cerevisiae*”

Bioinformatics, 38(9), 2022, 2667–2669
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac107>
Advance Access Publication Date: 18 February 2022
Applications Note

OXFORD

Bioimage informatics

YeastMate: neural network-assisted segmentation of mating and budding events in *Saccharomyces cerevisiae*

David Bunk , Julian Moriasy, Felix Thoma, Christopher Jakubke, Christof Osman and David Hörl *

Faculty of Biology, Ludwig-Maximilians-Universität München, 82152 Planegg-Martinsried, Germany

*To whom correspondence should be addressed.

Associate Editor: Jinbo Xu

Received on October 21, 2021; revised on January 14, 2022; editorial decision on February 7, 2022; accepted on February 16, 2022

Abstract

Summary: Here, we introduce *YeastMate*, a user-friendly deep learning-based application for automated detection and segmentation of *Saccharomyces cerevisiae* cells and their mating and budding events in microscopy images. We build upon Mask R-CNN with a custom segmentation head for the subclassification of mother and daughter cells during lifecycle transitions. *YeastMate* can be used directly as a Python library or through a standalone application with a graphical user interface (GUI) and a Fiji plugin as easy-to-use frontends.

Availability and implementation: The source code for *YeastMate* is freely available at <https://github.com/hoerlteam/YeastMate> under the MIT license. We offer installers for our software stack for Windows, macOS and Linux. A detailed user guide is available at <https://yeastmate.readthedocs.io>.

Contact: hoerl@bio.lmu.de

Supplementary information: [Supplementary data](#) are available at *Bioinformatics* online.

1 Introduction

An important experimental approach when working with the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is to examine the effects of mutations on morphological features or protein localization either by brightfield or fluorescent microscopy (Ohya *et al.*, 2015). Such experiments can also be performed in a systematic manner by combining automated microscopy with strain libraries comprising thousands of yeast strains that carry gene deletions or express fluorescently tagged proteins (Giaever *et al.*, 2002; Huh *et al.*, 2003; Weill *et al.*, 2018), which, however, calls for robust automated image analysis pipelines. In recent years, tools based on convolutional neural networks (CNNs) have become state-of-the-art for many tasks in biomedical image analysis (von Chamier *et al.*, 2019), including segmentation of individual *S. cerevisiae* cells (Dietler *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2019; Salem *et al.*, 2021). Many experimental strategies facilitated by the yeast system also make use of specific transitions in the yeast lifecycle like budding and mating to study things like organelle inheritance and mitochondrial quality control (Jakubke *et al.*, 2021; Rafelski *et al.*, 2012). Detection of matings and buddings is often done by hand or through dedicated post-processing routines on the output of a single-cell segmentation tool (e.g. tracking of cells in a time series of images), highlighting the need for easy-to-use end-to-end solutions for these more complex tasks.

Here, we present *YeastMate*, a novel deep learning-based tool for end-to-end segmentation of single cells and detection of transitions in the lifecycle of *S. cerevisiae* in single transmitted light images.

YeastMate performs three tasks: instance segmentation of single cells, object detection of zygotes and budding events and automatic assignment of mother and daughter cells involved in a mating or budding event. The detection backend is based on Mask R-CNN (He *et al.*, 2017) and is complemented by a user-friendly frontend using modern web technologies as well as a Fiji plugin. In the task of detecting mating and budding events, we achieve accuracies comparable to manual human reannotation and we can also perform single-cell segmentation robustly across various datasets. *YeastMate* is already being used in ongoing research in our lab (Jakubke *et al.*, 2021). In addition to the software, we also provide a new dataset of images with manually annotated cells and mating and budding events.

2 Materials and methods

CNN architecture and training: Our network architecture builds upon Mask R-CNN with a modified mask segmentation head producing multiclass semantic segmentations (Supplementary Fig. S1) for each detected object. Instead of individually detecting mother and daughter cells, we first detect the whole mating and budding events as well as single cells. In a postprocessing step, we resolve the roles of the cells involved in budding or mating events based on the multiclass segmentation masks (Supplementary Fig. S2). We used 80% of our images for training our network and cross-validation and 20% as a hold-out test set for the final performance assessment.

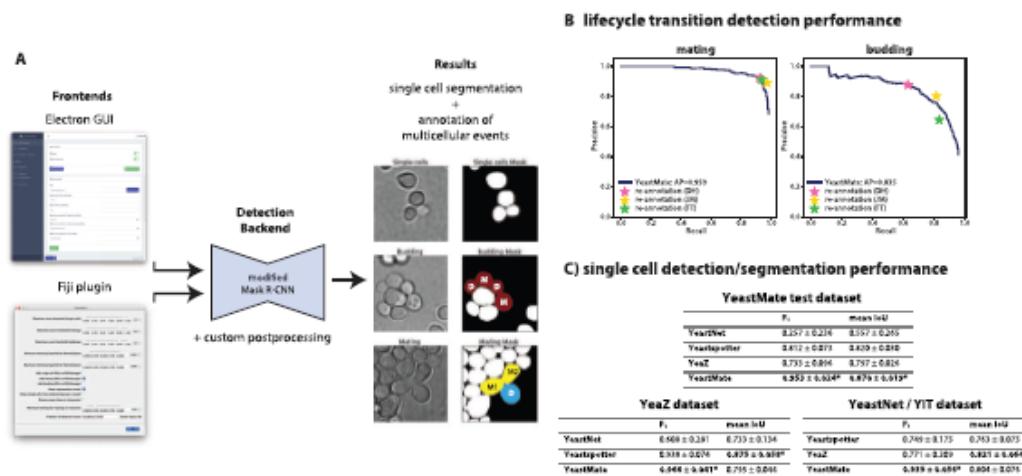


Fig. 1. (A) Main components and output of YeastMate. We perform instance segmentation of single cells and detection of lifecycle transitions using a modified Mask R-CNN (middle), which can either be used directly from Python code or via two GUI frontends (left) to provide instance segmentation of single cells as well as detection of budding events and mating events with identification of the mother (M) and daughter (D) cells involved in the event (right). (B) Precision-recall (PR) curves of YeastMate performance for detection of mating and budding events in our test dataset. Human precision and recall during reannotation by three different authors are plotted as colored stars. (C) Single-cell detection performance (F_1 score) and segmentation performance (mean intersection-over-union of true positive detections) of YeastNet, YeastSpotter, YeaZ and YeastMate on our own test dataset as well as datasets from Dietler et al. (2020) and Salem et al. (2021). The values in the table are mean \pm standard deviation across all images in a dataset.

Software architecture: YeastMate is implemented in a modular way: the detection backend can be used as a Python library but also runs as a webservice to provide its capabilities to client applications. As clients, we provide a Fiji plugin that directly interfaces with the server via HTTP requests as well as a standalone GUI Desktop application (Fig. 1 and Supplementary Figs S3–S5). We provide the whole YeastMate stack as a single installable file for use on a local workstation.

For more details, please refer to the Supplementary Methods.

3 Results

Dataset: For training YeastMate, we collected 147 brightfield and differential interference contrast (DIC) images of *S.cerevisiae* acquired on two different microscopes at various imaging conditions and generated curated single-cell segmentation masks and mating and budding annotations. In total, our data contain 17 058 individual cells, 3615 buddings and 2380 zygotes (Supplementary Table S1).

Object detection performance: Our network achieves a mean average precision (mAP) of 0.878 as well as favourable APs for the individual classes of objects when applied to our test set (Fig. 1B and Supplementary Fig. S6). We also assessed interhuman reproducibility by comparing the annotations for mating and budding events of four different annotators (with the most experienced one chosen as the reference). On our test dataset, mean interhuman precision and recall are (0.908, 0.946) for mating events and (0.774, 0.763) for budding events. These values lie close to the PR-curves of our network, indicating that YeastMate can achieve object detection performance comparable to manual human annotation.

Single-cell segmentation performance: YeastMate also compares favourably to existing CNN-based solutions in single-cell segmentation, showing consistent performance not only on our own test dataset, but also two publicly available datasets (Fig. 1C, Supplementary Results, Supplementary Fig. S7 and Table S2). Based on the robust Mask R-CNN architecture, YeastMate achieves the highest single-cell detection performance of all tools as well as competitive results in segmentation.

4 Conclusion

With YeastMate, we introduce an easy-to-use application to not only perform single-cell segmentation in images of *S.cerevisiae* with high robustness across datasets, but also detect transitions in the cell cycle in single images with accuracies comparable to human annotation. YeastMate is implemented in a modular way and can be run on local workstations but the detection server can also be run on a remote compute server. Additionally, we provide two user-friendly frontends to make the tool available without the need to write code. We can envision YeastMate to be expanded to detect other life cycle states, such as meiotic asci, similar to existing work in *Arabidopsis thaliana* (Lim et al., 2020). YeastMate can provide a considerable improvement to high-throughput studies of yeast, facilitating not only the automated analysis of large image datasets of single cells, but also enabling the study the complex interplay of cellular components during both sexual and asexual reproduction of *S.cerevisiae*.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mikhail Slivinskiy for advice on the React.js frontend and Heinrich Leonhardt and Hartmann Harz (LMU) for comments on the manuscript and support. Some of the images in our dataset were acquired in the lab of Maya Schuldiner (Weizmann Institute) as part of an ongoing collaboration.

Data availability

The data underlying this article are available in Open Science Framework (OSF), at <https://doi.org/10.17605/osf.io/287fr>

Funding

This work was supported by the European Research Council [ERC-StG-714739 IlluMitoDNA to C.O.]; and the Deutsche Forschungsgemeinschaft [SPP 2202 422857584].

Conflict of Interest: none declared.

References

- Dietler, N. *et al.* (2020) A convolutional neural network segments yeast microscopy images with high accuracy. *Nat. Commun.*, **11**, 1–8.
- Giaever, G. *et al.* (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387–391.
- He, K. *et al.* (2017) Mask R-CNN. In: *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)*, Venice, Italy, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), New York, NY, pp. 2961–2969.
- Huh, W.-K. *et al.* (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686–691.
- Jakubke, C. *et al.* (2021) Cristae-dependent quality control of the mitochondrial genome. *Sci. Adv.*, **7**, eabi8886.
- Lim, E.-C. *et al.* (2020) DeepTetrad: high-throughput image analysis of meiotic tetrads by deep learning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **101**, 473–483.
- Lu, A.X. *et al.* (2019) YeastSpotter: accurate and parameter-free web segmentation for microscopy images of yeast cells. *Bioinformatics*, **35**, 4525–4527.
- Ohya, Y. *et al.* (2015) Single-cell phenomics in budding yeast. *Mol. Biol. Cell*, **26**, 3920–3925.
- Rafelski, S.M. *et al.* (2012) Mitochondrial network size scaling in budding yeast. *Science*, **338**, 822–824.
- Salem, D. *et al.* (2021) YeastNet: deep-learning-enabled accurate segmentation of budding yeast cells in bright-field microscopy. *Appl. Sci.*, **11**, 2692.
- von Chamier, L. *et al.* (2019) Artificial intelligence for microscopy: what you should know. *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 1029–1040.
- Weill, U. *et al.* (2018) Genome-wide swap-tag yeast libraries for proteome exploration. *Nat. Methods*, **15**, 617–622.

Diskussion

Verteilung der Proteine während der Fusion zweier mitochondrialer Netzwerke in Hefe

Bevor die Hypothese aufgestellt werden kann, dass Hefen zwischen intakter und defekter mtDNA unterscheiden können, musste vorab untersucht werden, welche Prozesse an der mitochondrialen Qualitätssicherung beteiligt sein könnten. Weiterhin verifizierten wir, ob sich zwei Hefezellen und deren Netzwerke, sowie die mtDNA bei einem Mating effizient verteilen. Denn in diesen Verpaarungen wurden zwei parentale Zelllinien verpaart die zum einen intakte und zum anderen defekte mtDNA beinhalten. Diese Vermischung würde die Heteroplasmie der mtDNA hervorrufen. Dies bedeutet, dass in einem kontinuierlichen mitochondrialen Netzwerk sowohl intakte, als auch defekte mtDNA vorliegen muss. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass bei einem Mating solch eine Durchmischung der löslichen Matrixproteine stattfindet (Nunnari, 1997; Okamoto, 1998). Um diese Untersuchungen reproduzieren zu können, wurden in den jeweiligen Mitochondrien Fluoreszenz-Proteine exprimiert, welche mit einer mitochondrialen Zielsequenz markiert wurden. Somit sind diese Proteine jeweils in die Matrix der Mitochondrien transportiert worden und färben hier die gesamte Matrix der Mitochondrien an. Anfangs wurden zwei WT- Hefezellen verpaart, welche sowohl roten (SU9-mKate2) als auch grünen Farbstoff (SU9-NeonGreen) beinhalten (Paper 1 Abb. S4A). In einem nachfolgenden Schritt wurde eine WT- Zelle mit einer Zelle verpaart, welche defekte mtDNA (Δcob mtDNA) beinhaltet (Paper 1 Abb. S4B). Alle Paarungen wurden mittels lebend-Zell Mikroskopie von mindestens 90 Minuten untersucht. In diesen Experimenten konnte eine rapide und effiziente Vermischung der löslichen Matrixproteine gezeigt werden. Dies ebnet die Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen, denn die neu entstandene Zelle kann nun als eine Ausgangszelle angesehen werden, welche zu gleichen Teilen sowohl die intakte als auch die defekte mtDNA beinhaltet.

Qualitätssicherung der mitochondrialen DNA

Eine der wichtigsten Schlüsselfragen, nämlich ob Hefezellen überhaupt in der Lage sind intakte von defekter mitochondrialer DNA zu unterscheiden wurde mit Hilfe der Pedigree-Analyse untersucht. Diese Analyse konnte zeigen, dass die Bäckerhefe *S. cerevisiae* effizient zwischen defekter und intakter mtDNA unterscheiden kann, wenn eine Zelle mit intakter mtDNA (WT mtDNA), mit einer zweiten Zelle mit defekter mtDNA (Δcob mtDNA) verpaart wird. Der Vorgang der Verpaarung und die anschließende Mikrodisektion ist in der Abb. 1A des ersten Papers zu sehen. Die Ergebnisse der Pedigree-Analyse konnte zeigen, dass selbst innerhalb der ersten Tochtergeneration der Anteil der intakten WT mtDNA bei allen untersuchten 89 Zellen bei 60 Prozent lag. Nach fünf Generationen betrug der Anteil der intakten mtDNA sogar 80 Prozent in allen untersuchten Zellen. Somit konnte abschließend festgestellt werden, dass Hefezellen in der Tat in der Lage sind zwischen intakter und defekter mtDNA zu unterscheiden (Paper 1 Abb. 1C).

Eine zudem durchgeführte qPCR konnte bestätigen, dass beide Ausgangszellen über dieselben Mengen an mtDNA verfügen (Paper 1 Abb. S1A). Falls in einer heteroplasmatischen Zelle nahezu ausschließlich intakte mtDNA vorliegt, hätte diese intakte mtDNA eine deutlich höhere Chance in die neue Tochterzelle inseriert zu werden. Diese Analyse unterstreicht jedoch, dass die Selektion tatsächlich auf Grundlage eines aktiven Transports der intakten mtDNA in die Tochterzelle erfolgt und nicht aufgrund eines statistischen Vorteils der intakten mtDNA gegenüber der defekten mtDNA. Dies verdeutlichte auch die Abb. 1C des Papers 1 in der die intakte mtDNA präferiert aus der heteroplasmatischen Ausgangszelle in die neue Tochterzelle inseriert wird. Statistisch gesehen hätten bei einer neutralen Weitergabe sowohl die intakte, als auch die defekte mtDNA dieselbe Wahrscheinlichkeit in die Tochterzelle übertragen zu werden. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Weitergabe der intakten mtDNA nicht zufällig erfolgt.

Da in der Pedigree-Analyse immer nur ganze Kolonien betrachtet werden konnten, wurden die Ergebnisse ebenfalls fluoreszenz-mikroskopisch auf Einzelzellebene untersucht (Paper 1 Abb. 1D und Paper 1 Abb. S3B). Hier konnte ebenfalls aufgezeigt werden, dass signifikant mehr intakte mtDNA (LacI-3xGFP) in der ersten Tochtergeneration zu finden war, als defekte mtDNA (TetR-3xmRuby3) (Paper 1 Abb. 1D). Dieses Ergebnis unterstützt die Pedigree-Analyse und zeigt zudem auf, dass die Aussagen welche auf ganze Kolonien

zutreffen, auch auf der Einzelzellebene relevant und reproduzierbar sind. Somit haben auch nachfolgende Analysen eine Aussagekraft.

Es besteht die Theorie, dass der Fission-Prozess essentiell für diese Qualitätssicherung ist. Durchgeführte Studien in der Fruchtfliege *D. melanogaster* brachten die Hypothese auf, dass die Fission essentiell an der mitochondrialen Qualitätssicherung beteiligt sei (Lieber, 2019; Chen, 2020). Um diese Theorie auch in Hefen zu untersuchen wurde die zuvor eingeführte Pedigree-Analyse auch mit einer *DNM1* Knock-Out-Version, durchgeführt. Dnm1 ist in Hefen für den mitochondrialen Fissions-Prozess zuständig. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in Paper 1 Abb. 1F gezeigt. Die positive Selektion der intakten WT-mtDNA gegenüber der defekten (Δcob mtDNA) wird hier verdeutlicht. Diese Analyse zeigt, dass die Möglichkeit einzelne Bereiche der Mitochondrien abzutheilen, nicht essentiell für die Qualitätssicherung der mtDNA ist. Weitere Studien in Hefen hatten die Hypothese aufgestellt, dass der Prozess der Mitophagie, respektive der Mitophagie-Rezeptor Atg32, an der Qualitätssicherung der mtDNA beteiligt sei (Kanki, 2009; Okamoto, 2009). Um auch diese Hypothese aufzugreifen, wurde erneut eine Pedigree-Analyse durchgeführt. In einem weiteren Experiment wurde das Gen, welches für die Mitophagie essentielle Protein Atg32 kodiert, ausgeschaltet. Atg32 steht am Anfang des Mitophagie-Pathways und nimmt hier eine Schlüsselrolle ein. Die in Paper 1 Abb. 1G gezeigten Ergebnisse spiegeln, wie auch die Ergebnisse der $\Delta dnm1$ -Analyse, die des WT wieder. Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Mitophagie nicht wesentlich für die mitochondrialen Qualitätssicherung ist.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Hefezellen aktiv zwischen defekter und intakter mtDNA unterscheiden können und das weder die Autophagie, noch der Prozess der mitochondrialen Fission an der Qualitätssicherung beteiligt sind. Ob jedoch diese Erkenntnisse und die damit verbundene Qualitätssicherung auf Grundlage eines spezifischen und selektiven Transports in die Tochterzellen erfolgt oder die Grundlage auf replikativen Nachteilen für die Δcob mtDNA zurückzuführen ist, kann in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Es ist denkbar, dass die defekte Δcob -mtDNA gegenüber der intakten WT-mtDNA einen replikativen Nachteil aufweist. So ist es möglich, dass die intakte mtDNA von der Zelle favorisiert vervielfältigt wird und dadurch die defekte mtDNA über die Zeit verschwindet.

Markierung von mtDNA kodierten Proteinen der Atmungskette

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig ein mtDNA kodiertes Protein erfolgreich mit einem Fluoreszenz-Protein markiert werden. Da die Triplet-Reihenfolge der mtDNA, verglichen zur nuklearen DNA, anders kodiert vorliegt, wurden spezielle codon-optimierte Formen des mKate2 (mtmKate2) und NeonGreen (mtNeonGreen) angefertigt. Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl der Hefestamm, welcher das Atp6-NG als auch das Atp6-mKate2 beinhaltet, über eine intakte Atmungskette verfügt und keinerlei Wachstumsdefekt, verglichen zum WT, zeigt (Paper 1 Abb. S5D und Abb. S7C). Die Atp6-Signale der untersuchten Stämme zeigen punktuelle Signale (Paper 1 Abb. S5E), welche darauf schließen lassen, dass die markierten Proteine in den Cristae lokalisiert vorliegen. Denn vorherige Untersuchungen konnten zeigen, dass dieses punktuelle Signal bei der Markierung von Atmungsketten-Proteinen auftritt (Jimenez, 2014).

Ein DAPI-Staining mit anschließenden Aufnahmen am Super-Resolution-Mikroskop konnte zeigen, dass diese Signale sich jeweils in räumlicher Nähe zur mtDNA befinden. Es ist in den Abbildungen zu erkennen, dass jeweils eine mtDNA in räumlicher Nähe zu einem Atp6-NG-Protein liegt (Paper 1 Abb. 2B). Es ist außerdem zu erkennen, dass immer eine zentrale mtDNA zwischen zwei Atp6-NG Signalen liegt. Dies lässt einen ersten Hinweis zu, dass mtDNA-kodierte Proteine immer nahe ihres Ursprungs bleiben. Solch eine räumliche Nähe könnte einen Schlüsselpunkt für eine mögliche Qualitätskontrolle bieten. Bereiche, welche defekte mtDNA beinhalten, könnten somit von der Zelle effizienter aus dem Netzwerk entfernt werden. Die zuvor gewonnenen Erkenntnisse, dass sich die löslichen Proteine während des Matings rapide verteilen und mtDNA-kodierte Proteine nahe ihres Ursprungs bleiben, wurden in den darauffolgenden Untersuchungen miteinander verknüpft. In einem nachfolgenden Experiment wurde eine Hefezelle, welche das Atp6-NG beinhaltet, mit einer Hefezelle, welche das lösliche mKate2 beinhaltet, verpaart. In der Abb. 2D des ersten Papers ist zu erkennen, dass sich erneut das mKate2-Signal homogen in der Zelle verteilt, das Atp6-NG-Signal verbleibt jedoch lokal. Selbst über 1,5 Stunden nach dem Mating verbleibt das Atp6-NG-Signal in der jeweiligen Ursprungszelle.

Ein daraufhin durchgeführtes Mating mit einem nuklear kodierten Protein der Atmungskette (Cox4) konnte die oben genannte Erkenntnis zudem bestätigen (Paper 1 Abb. S6B). In diesem Experiment wurde das kernkodierte Protein Cox4 ebenfalls mit NeonGreen markiert. Cox4 ist ein essentielles Protein der Atmungskette und wird ebenfalls in die Cristae transportiert.

Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass sich während eines Matings zwar die löslichen Matrix-Proteine vermischen, die in die IMM inserierten Proteine der Atmungskette hingegen bleiben in der jeweiligen Ausgangszelle lokalisiert. Solch ein Mechanismus könnte einen Hinweis darauf zulassen, dass die mitochondriale Qualitätskontrolle auf Basis der Atmungskettenproteine abläuft.

Um diese Theorie weiter zu untersuchen, wurden kernkodierte, frei bewegliche Proteine (SU9-mKate2) (Paper 1 Abb. S4A und S4B), sowie Proteine der OMM (Fis1) (Paper 1 Abb. S6E) und IMM (Pam16) (Paper 1 Abb. S6F) mit dem nukleär kodierten Protein der Atmungskette (Cox4) (Paper 1 Abb. S6B) und dem mtDNA kodierten Protein der Atmungskette (Atp6) (Paper 1 Abb. S6A) und mit Hilfe der Mating-Experimente untersucht. Sowohl die Proteine der OMM und der IMM, als auch die frei beweglichen Proteine in der Matrix, verteilen sich innerhalb des fusionierten Netzwerks innerhalb von Minuten. Cristae könnten für solch eine räumliche Trennung der in die IMM inserierten Proteine sorgen. Nach den von uns durchgeführten Experimenten und den daraus gewonnenen Erkenntnissen, sowie nach den Theorien von Chapman im Jahr 2020, wurde von uns die Theorie aufgebracht, dass die Cristae an der Qualitätssicherung der Mitochondrien beteiligt sein könnten. Denn die Cristae können als Barrieren dienen, um die Diffusion von mtDNA kodierten Proteinen zu verhindern. Diese Theorie wurde aufgegriffen und mit der Zuhilfenahme der Pedigree-Analyse, des neuen Atp6-NG Stammes, sowie der Mating-Videos untersucht.

Einfluss der Cristae-Struktur auf die mitochondriale Qualitätssicherung

Um die oben genannte Theorie zu untersuchen, wurden nun Cristae-Morphologie Gene deletiert. Die untersuchten Proteine sind zum einen die Kernkomponenten des MICOS-Komplexes, Mic10 und Mic60, und zum anderen die SU g (Atp20) und SU e (Atp21) der FOF1-ATPase. Der MICOS-Komplex verankert und stabilisiert die Basis der Cristae an der IMM (Li, 2016). Die Proteine Atp20 und Atp21 sind Kernelemente der Cristae-Biegung (Harner, 2011). Ein Verlust dieser Proteine führt zu Cristae, welche die gesamte Matrix durchspannen, losgelöst von der Membran vorliegen, oder keine klare Struktur mehr aufweisen (Harner, 2016; Li, 2016). EM-Aufnahmen zeigen, dass Deletionen von $\Delta atp20$, $\Delta atp21$ und $\Delta atp20\Delta atp21$ zu einem Verlust der Cristae-Strukturen führen (Paper 1 Abb. 3E und S8A). Hier sind primär Septen erkennbar, welche die gesamte Membran durchspannen (Paper 1 Abb. S8B und S8C). Diese Veränderungen der Cristae-Morphologie, nach einem Verlust der oben beschriebenen Proteine, konnten bereits gezeigt werden und sind kongruent mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Kominsky, 2002; Arnold, 1998). Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit, wurde nun die Diffusion der mtDNA kodierten Proteine in die Partnerzelle untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in WT-Zellen die mtDNA kodierten Proteine lokal und in räumlicher Nähe zu der mtDNA verbleiben und während des Matings nicht in die Partnerzelle diffundieren (Paper 1 Abb. S6A). Nach einer Deletion der Cristae-Morphologie Gene konnte nun gezeigt werden, dass signifikant mehr mtDNA kodierte Proteine in die Partnerzelle diffundieren (Paper 1 Abb. 3A). Dieses Experiment zeigt sehr deutlich, dass die Cristae die Verteilung von Proteinen der Atmungskette effizient steuern. Hier könnten die Cristae eine Art physische Barriere aufbauen, welche eine Diffusion durch das Netzwerk verhindern könnte. Aufgrund der phänotypischen Strukturen der Cristae, welche vertikal in die Matrix der Mitochondrien ragen, kann so eine Barriere aufgebaut werden die die jeweilige mtDNA lokal hält und diese an einer Diffusion hindern könnte.

Die Atmungskettenproteine liegen primär an den Cristae lokalisiert vor. In der Abb. S8A im ersten Paper, welche EM-Aufnahmen der Cristae eines WT und diverser Mutanten zeigt, könnte einen Indikator dafür geben, weshalb im WT ein punktuell Signal und in den Mutanten keine klaren Abgrenzungen mehr erkennbar sind (Schägger, 2001; Kondadi, 2020). Denn hier könnten die Atmungskettenproteine quer über die Cristae verteilt vorliegen, welche in diesen Mutanten die gesamte Matrix durchspannen. Somit würden keine klaren Bereiche der Cristae mehr erkennbar sein. Daher erscheint das Atp6-NG in den mikroskopischen

Aufnahmen der Abb. 3A und der Abb. 3C im Paper 1 auch nicht mehr als punktuelles Signal bei den untersuchten Mutanten.

Nachfolgend wurde ebenfalls bei diesen Mutanten eine Pedigree-Analyse durchgeführt, um zu untersuchen ob diese Veränderungen der Cristae Morphologie einen Einfluss auf die mitochondriale Qualitätssicherung haben. Die Abb. 4A im Paper 1 zeigt sehr deutlich, dass alle untersuchten Stämme nun nicht mehr in der Lage sind effizient zwischen intakter WT- und defekter Δcob -mtDNA zu unterscheiden. Innerhalb der ersten Tochtergeneration waren nur 40 Prozent der Zellen in der Lage effizient die intakte mtDNA in die neu entstandene Tochterzelle zu transportieren.

Um nicht nur Aussagen über die Diffusion auf Proteinebene treffen zu können, sondern auch auf die mtDNA-Diffusion, wurde in weiteren Untersuchungen die Diffusion der mtDNA während des Matings analysiert. Diese Untersuchungen mit markierter mtDNA *in vivo* konnte zeigen, dass die mtDNA ebenfalls nicht in die unmarkierte Partnerzelle diffundiert (Paper 1 Abb. 3D). Faszinierend ist jedoch, dass sowohl in $\Delta atp21$ - als auch in $\Delta mic60$ -Zellen, die mtDNA keine Diffusion in die Partnerzelle zeigt. Dies könnte darauf hinweisen, dass die mtDNA lokal an der IMM verankert vorliegen könnte. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass in $\Delta mic60$ Mutanten die Cristae nicht länger an der IMM gebunden sind und das Signale der mtDNA weiterhin lokal in der Matrix ersichtlich bleibt. Hier konnte gezeigt werden, dass diese Cristae auch frei beweglich in der Matrix vorliegen (Friedman, 2015). Dennoch konnte auch hier keine verstärkte Diffusion von mtDNA in die Partnerzelle detektiert werden.

Zusammengefasst erklärt dies die nun stattfindende starke Diffusion der Atmungskettenproteine, die sich nun über die gesamten Septen verteilen und somit nicht mehr lokalisiert erscheinen können. Die mtDNA selbst bleibt hingegen lokal und zeigt keine Diffusion in die Partnerzelle, auch wenn die Cristae-Morphologie Gene deletiert worden sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl mtDNA, als auch nukleare kodierte Proteine der Atmungskette durch die Cristae an einer Diffusion gehindert werden. Diese Erkenntnisse und Theorien werden nachfolgend in der Abb. 2.1 zusammengefasst.

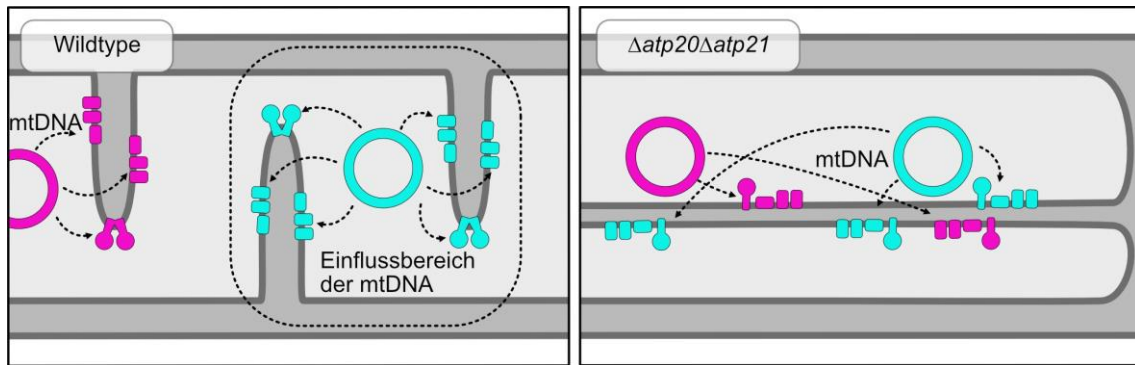


Abbildung 2.1: Zusammenfassendes Modell der Ergebnisse dieser Arbeit

links: Eine intakte Cristae-Morphologie führt zur Bildung der Einflussbereiche der mtDNA. Die mtDNA gibt die kodierten Proteine zu den benachbarten Cristae ab. Daraus resultiert die limitierte Diffusion der Atmungskettenproteine. Eine klare Zuordnung von Proteinen zum Ursprung ist möglich. Eine Qualitätssicherung der mtDNA kann stattfinden.

rechts: Beispielhafte Darstellung der Cristae-Morphologie in $\Delta atp20\Delta atp21$ -Doppeldeletionsmutanten und die daraus resultierende Vermischung der Atmungskettenkomplexe von deren Ausgangs-mtDNA. Die parallel zur inneren Achse verlaufenden Cristae sorgen für eine Vermischung der kodierten Proteine. Eine klare Zuordnung von Proteinen und der Ursprungs-mtDNA ist nicht mehr möglich. Diese Stämme verfügen über eine eingeschränkte Fähigkeit der mtDNA-Qualitätskontrolle.

Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit

Deletionen der Cristae-Morphologie Gene führen dazu, dass die Qualitätssicherung der mtDNA beeinträchtigt ist. Eine Pedigree-Analyse aller verwendeten Stämme zeigt, dass *Δatp20*, *Δatp21* und *Δatp20Δatp21* sowie *Δmic10* und *Δmic60*, nicht aber *Δdnm1* oder *Δatg32*, zu einer starken Beeinträchtigung der mtDNA Qualitätskontrolle führen. Hierbei ist es der Zelle nicht möglich zwischen intakter und defekter mtDNA zu unterscheiden. Die Zelle inseriert zufällig mtDNA in die Tochterzelle. Weder ein Verlust der Fission, noch der Autophagie führt in den Zellen, verglichen zum WT, zu einer Beeinträchtigung der mtDNA Qualitätskontrolle. Zusammenfassend ist zu sagen, dass ein Verlust von Proteinen oder Proteinkomplexen, die essentiell für eine normale Cristae-Morphologie sind, zu einer Beeinträchtigung der Qualitätssicherung der mtDNA führt. Ferner geben die Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass die mtDNA an der IMM verankert sein könnte.

Modell zum Einfluss der Cristae-Morphologie auf die mtDNA Qualitätssicherung

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und neuer Erkenntnisse über die mitochondriale Qualitätssicherung und den Einfluss der Cristae, wird nachfolgend ein Modell aufgestellt, um diese Erkenntnisse zu vereinen (Abb. 2.1). Das Modell schlägt vor, dass eine intakte, in einem WT vorkommende Cristae-Struktur, von den Zellen genutzt werden kann, um unterschiedliche mtDNA Moleküle und die von den jeweiligen mtDNAs kodierten Proteine lokal voneinander zu separieren. Dadurch entstehen Einflussbereiche der mtDNA. Diese Einflussbereiche können von der Zelle genutzt werden, um effizient defekte mtDNA im mitochondrialen Netzwerk zu erkennen und diese anschließend zu beseitigen. Ein Verlust der Cristae-Strukturen und damit der Einflussbereiche der mtDNA führt nun dazu, dass die mtDNA kodierten Proteine nicht mehr ihrem Ursprung zugeordnet werden können und nun frei durch die Matrix diffundieren würden. Somit ist es der Zelle nicht mehr möglich, effizient die defekte mtDNA zu erkennen und in einem nachfolgenden Schritt diese defekte mtDNA zu beseitigen. Defekte Bereiche der Mitochondrien, welche ebenfalls defekte mtDNA beinhalten, könnten auf Grundlage eines reduzierten Protonengradienten erkannt werden. Es wäre denkbar, dass die Zelle Bereiche der Mitochondrien erkennt, welche eine verringerte Leistung der Atmungskette aufweisen. Defekte mtDNA würde dementsprechend defekte Proteine erzeugen, welche wiederum die Leistung der Atmungskette vermindern könnte. Dies würde sich in Form eines geringeren Protonengradienten oder einer geringeren ATP-Produktion zeigen. Diese ATP-Produktion oder eine Verringerung des Protonengradienten könnte so von der Zelle genutzt werden, um defekte mtDNA im mitochondrialen Netzwerk zu erkennen.

Einordnung der Ergebnisse in die bisherige Forschung

Im Folgenden möchte ich die neu gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit in den bisherigen Forschungsstand und Wissensstand der Wissenschaft einordnen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, dient die Hefe als perfekter Modellorganismus für die mitochondriale Forschung, da es der Hefe möglich ist, aufgrund der Fähigkeit der Fermentation, ohne Mitochondrien zu überleben (Malina, 2018). Studien in *Drosophila melanogaster* und Mäusen konnten zeigen, dass defekte Kopien von mtDNA während der Vererbung deletiert wurden. Dieser Vorgang ist als "purifying selection" bekannt (Stewart, 2008; Fan, 2011). Es wurde angenommen, dass der Prozess der mitochondrialen Fission essentiell an dieser Qualitätssicherung der mtDNA beteiligt ist (Chen, 2020). So wurde angenommen, dass Bereiche mit defekter mtDNA über die Fission in kleinere mitochondriale Subkompartimente abgeschnürt werden, welche anschließend abgebaut und über die Mitophagie verdaut werden. Eine weitere Annahme besagt, dass die Detektion von Bereichen mit defekter mtDNA aufgrund eines reduzierten Membranpotentials der Atmungskette oder einer verringerten Menge an produzierten ATPs geschieht (Zhang, 2020).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten maßgeblich dazu beitragen, eine weitere Lücke im Wissensstand zu schließen. So können die in Mäusen und Fruchtfliegen gewonnenen Erkenntnisse nun auf genetischer und molekularbiologischer Weise Aufschluss über die Wichtigkeit einer intakten Cristae-Morphologie geben. Der hier in Hefen aufgezeigte Prozess der Cristae-abhängigen Qualitätskontrolle sollte nachfolgend nun auch etwa in Mäusen oder Fruchtfliegen untersucht werden. Es ist denkbar, dass sich das in dieser Arbeit beschriebene Einflussbereich-Modell und eine Selektion über den Fission Prozess nicht gänzlich ausschließen. Diese beiden Mechanismen könnten weiterhin parallel stattfinden und vor allem in höher entwickelten Tieren wie der Fruchtfliege oder in Mäusen zusammen wirken und somit eine Selektion der intakten mtDNA sogar noch effizienter gestalten. Trotz der Tatsache, dass die Fission in dem hier präsentierten experimentellen Setup keine Relevanz für mtDNA Qualitätssicherung darstellt, kann dennoch eine Beteiligung beider Prozesse und Modelle an der Qualitätssicherung der mtDNA nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Experimenteller Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen weitere Fragen auf, die über weitere Ergebnisse und einer Fortsetzung der Forschung aufgeklärt werden müssen. Das durchgeführte Experiment der mtDNA Diffusion zeigt, dass trotz eines Verlust des MICOS-Komplexes, die mtDNA weiterhin lokal bleibt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die mtDNA an der IMM gebunden ist und nicht an den Cristae. Um dies jedoch zu analysieren, kann zum Beispiel die mtDNA mittels des LacO Systems über einen Pulldown-Assay analysiert werden. Hierfür könnte das bereits beschriebene LacO-LacI System genutzt werden, um zielgerichtet die mtDNA, nach vorhergehender Isolation der Mitochondrien, aufzureinigen. In einer nachfolgenden massenspektroskopischen Analyse kann gezielt nach Proteinen der IMM oder der Atmungskette gesucht werden. Somit kann untersucht werden, welche Proteine mit der mtDNA assoziiert sind und bei einer solchen Extraktion zusätzlich nachweisbar sind. Sollten zum Beispiel ausschließlich Proteine der Atmungskette zu finden sein, könnte dies einen Rückschluss darüber geben, dass die mtDNA höchstwahrscheinlich hier eine stärkere Bindung aufweist.

Ein weitere Möglichkeit ist es die mtDNA ebenfalls über das LacO-LacI-GFP Fusionskonstrukt im EM zu analysieren. Hierfür könnten das GFP, welches an der mtDNA gebunden vorliegt, visualisiert werden, um somit die Lokalisation der mtDNA zu untersuchen. Hierfür würden, wie bereits in dieser Arbeit gezeigt, Schnitte durch die Mitochondrien aufgenommen. Die Detektion des GFPs erfolgt über Goldpartikel welche an Anti-GFP Antikörper gebunden wären. Die finale Detektion der Aufnahmen würde über ein Immunogold-EM erfolgen. Solche Aufnahmen konnten in anderen Experimenten bereits erfolgreich erzeugt werden (Kawai-Noma, 2010; Frankl, 2015; Binder, 1996). Mit diesem Experiment könnte die Lokalisation der mtDNA während verschiedener Zellstadien, im Prozess der Verpaarung oder während einer stattfindenden Zellteilung verfolgt werden. Außerdem könnte die in dieser Arbeit aufkommende Fragestellung adressiert werden, ob die mtDNA nun an der IMM assoziiert vorliegt oder frei in der Matrix der Mitochondrien anzutreffen ist.

Wie im Laufe der Arbeit gezeigt werden konnte, ist eine intakte Cristae-Morphologie essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität der mtDNA und somit auch einer intakten Atmungskette. Darauf folgend wurde von uns die Hypothese aufgestellt, dass eine weitere Erhöhung der Cristae-Anzahl dementsprechend zu einer noch geringeren Mobilität der

mtDNA kodierten Proteine führen könnte. Somit könnte in solchen Zellen gegebenenfalls ein noch höherer Anteil an intakter mtDNA, verglichen zum WT, beobachtet werden. Des Weiteren könnten Gene manipuliert oder in das System inseriert werden, um einen Verlust der Cristae-Morphologie Gene *SU g* (*Atp20*) oder *SU e* (*Atp21*) zu kompensieren. Ein möglicher Kandidat für solche Fragestellungen wäre das pflanzliche Protein Curvature Thylakoid 1 (*Curt1*). Das pflanzliche *Curt1* Protein führt zu einer Membranbiegung der inneren Membran der Chloroplasten (Li, 2021). Dazu müsste das entsprechende pflanzliche Gen in die nukleäre DNA inseriert und zielgerichtet in die IMM importiert werden. Fraglich ist jedoch, ob das Protein sowohl in Hefen, als auch generell in Mitochondrien, überhaupt dieselbe Funktion wie in den Chloroplasten übernehmen könnte. Einige vorhergehende Experimente konnten bereits pflanzliche Proteine erfolgreich in Hefen inserieren. Diese Proteine haben überwiegend in Hefen einen erzeugten Phänotypen kompensieren können (Edens, 1984; Alderson, 1991). Um weitere Überlegungen durchzuführen, müsste vorab auch diese Kompensation und Funktionalität für mitochondriale Gene gezeigt werden.

Über die hier gezeigten Experimente zur Diffusion von *Atp6-NG* und der Pedigree-Analyse könnten weitere Gene untersucht werden. Es ist davon auszugehen, dass an der mtDNA Qualitätssicherung weitere Gene beteiligt sein könnten. Um diese zu identifizieren, könnten weitere Gene der Autophagie neben *Atg32*, wie etwa *Atg10*, oder weitere Komponenten des MICOS Komplexes, wie etwa *Mic13*, *Mic19* oder *Mia40* analysiert werden (Khosravi, 2020; Phillips, 2008).

Ein weiterer wichtiger Aspekt, welcher in dieser Arbeit nicht vollumfänglich aufgeklärt werden konnte, ist der zelluläre Mechanismus der Qualitätskontrolle. Funktion des Mechanismus ist die Sicherstellung der Detektion und die erfolgreiche Beseitigung der Bereiche mit defekter mtDNA aus dem mitochondrialen Netzwerk. Ob diese Detektion auf Grundlage eines punktuell verringerten Protonengradienten erfolgt, ist bisher nicht untersucht worden. Auch spielt die Tatsache, dass ein Mechanismus der Qualitätskontrolle beide mitochondrialen Membranen überqueren oder durchspannen muss, eine entscheidende Rolle und wirft zugleich weitere Fragen auf. Hierbei könnte ein mikroskopischer Ansatz, wie in der Abb. 1D des ersten Papers genutzt werden, um die Aussage der Pedigree-Analyse zu unterstreichen. Hierfür könnten die Zellen über mehrere Generationen hinweg unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. So könnte eine Aufnahme alle 1,5 Stunden Aufschluss darüber geben, ob entweder die intakte WT oder die

defekte Δcob mtDNA in die Tochterzellen transportiert wird. Solch ein Screening könnte nachfolgend für eine größere Anzahl an möglichen Genen erfolgen, welche eine wichtige Rolle in der mtDNA Qualitätssicherung spielen. Bei solch einem Experiment ist zum einen darauf zu achten, dass die Zellen durchweg mit genügend Nährstoffen versorgt werden müssen, um sich erfolgreich paare zu können und eine Zellteilung vorantreiben können. Zum anderen ist es wichtig, die Exposition der Zellen zu den Lasern der Kameras möglichst gering zu halten, um zu vermeiden, dass die Zellen aufgrund eines phototoxischen Effekts, DNA Schäden akkumulieren.

Eingangs ist zu erwähnen, dass alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme für die defekte mtDNA, eine Mutation im Δcob Gen aufweisen. Die erwähnte Problematik der Weitergabe von entweder intakter oder defekter mtDNA und dessen Ursprung, könnte über einen Single-Cell-Sequenzier-Ansatz gelöst werden. Aus den Ergebnissen ist bislang nicht bekannt, ob entweder die selektive Weitergabe von intakter mtDNA oder die nicht stattfindende Replikation von defekter mtDNA eine Schlüsselrolle in der Qualitätssicherung einnimmt. Somit könnte die mtDNA, von zuvor über das Tetraden-Mikroskop einzelner Zellen, über PCR vervielfältigt werden, um anschließend das Genom zu sequenzieren. Hierbei würde die DNA von einzelnen Zellen extrahiert und sequenziert werden. Nachfolgen würden die gewonnenen Sequenzierdaten mit denen einer WT Kontrolle verglichen werden. Dies könnte auf einer Einzelzellebene Aufschluss über die genauen Genbereiche geben, welche zum einen präferiert vererbt werden. Zum anderen könnte diese Methode aufzeigen, welche Prozesse an der mtDNA Qualitätssicherung beteiligt sein könnten. Außerdem könnte dieser Sequenzieransatz spontan auftreten Mutationen, welche nicht zwingend einen Effekt mit sich bringen, sowohl im intakten WT Genom, als auch im defekten Δcob Genom aufzeigen. In nachfolgenden Experimenten wäre es äußerst spannend, auch andere mtDNA kodierte Gene zu entfernen, um deren Effekt auf die mtDNA genauer zu untersuchen. Außerdem könnten auch schwächere Punktmutationen in das mitochondriale Genom eingeführt werden. Diese Stämme könnten nachfolgend einen schwächeren Effekt in der bereits oben beschriebenen „purifying selection“ aufzeigen. Es ist zudem denkbar, dass solch ein Sequenzieransatz einen Defekt im Genom der Δcob Zellen aufweist, was wiederum dazu führen könnte, dass die defekte mtDNA weniger Moleküle aufweist.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass diese Arbeit einige interessante Punkte in der mitochondrialen Qualitätskontrolle aufzeigt. Zudem werden neue Techniken vorgestellt, um

weiterführende Analysen erst zu ermöglichen. Weitere Experimente müssen nun die oben beschriebenen neu entstandenen Fragestellungen bewältigen, um die mitochondriale Qualitätssicherung der Hefen vollumfänglich zu verstehen.

Klinische Relevanz

Abschließend könnten die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit eine Grundlage zur Erforschung möglicher Therapien von mitochondrialen Krankheiten darstellen. Die Kernkomponenten der mtDNA sind im Laufe der Evolution streng konserviert, jedoch gibt es drastische Unterschiede in der jeweiligen Größe und der Struktur zwischen verschiedenen Arten. So umfasst die mtDNA der Hefen etwa 85 kB, die der Menschen gerade einmal 16 kB (Shadel, 1999). Dieselben Gene und Prozesse, die an der mitochondrialen Qualitätssicherung in Hefe beteiligt sind, könnten auch in weiterentwickelten Säugetieren aktiv sein. Zuvor muss allerdings untersucht werden, ob sich die Ergebnisse dieser Arbeit in andere Organismen übertragen lassen.

Die nachfolgenden Annahmen und Theorien sind aktuell rein spekulativer Natur und benötigen weitere intensive Forschung, um einen möglichen klinischen Einsatz zu gewähren. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit aufgeführt, sind diverse Krankheiten im Menschen auf defekte mtDNA zurückzuführen. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass eine Anhäufung von defekter mtDNA zum Auftreten von neurodegenerativen Krankheiten und auch einigen Krebsarten führen kann (Grazina, 2006; Wang, 2015; Clay, 2009; Liu, 2006; Pyle 2016). Bevor weiterführende klinische Studien geplant werden können, muss zuvor untersucht werden, ob die Mitochondrien von Patienten mit mitochondrialen Krankheiten ebenfalls eine veränderte Cristae-Morphologie aufweisen. Nachdem dies geklärt wäre, könnten spezifische Gentherapien entwickelt werden, die zu einer Überproduktion von Cristae-Proteinen führen. Dies könnte dazu führen, dass sich neue Cristae bilden und somit die Qualitätssicherung wieder funktionsfähig abläuft. Hierfür könnte die Phosphorylierung der SU e und der SU g der ATP-Synthase genauer betrachtet werden. Es gibt Anzeichen, dass die Phosphorylierung maßgeblich an der Dimerisierung und damit an der intakten Cristae-Biegung beteiligt ist. So konnten Untersuchungen von Jörg Reinders im Jahr 2007 zeigen, dass die Phosphorylierung der SU e und SU g maßgeblich an einer intakten Cristae-Struktur beteiligt ist (Reinders, 2007). Eine zielgerichtete Phosphorylierung, respektive eine zielgerichtete Erhöhung der Phosphorylierung, könnte ebenfalls eine interessante Stellschraube für weitere Therapieverfahren liefern.

Literaturverzeichnis

J. P. Abrahams, A. G.W. Leslie, R. Lutter and J. E. Walker. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370(6491):621–628, 1994. ISSN 00280836. doi: 10.1038/370621a0.

A. R. Anzell, R. Maizy, K. Przyklenk and T. H. Sanderson. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Molecular neurobiology*, 55(3):2547–2564, 2018. ISSN 1559-1182. doi: 10.1007/s12035-017-0503-9.

N. Afzal, W. J. Lederer, M. S. Jafri and C. A. Mannella. Effect of crista morphology on mitochondrial ATP output: A computational study. *Current Research in Physiology*, 4(January):163–176, 2021. ISSN 26659441. doi: 10.1016/j.crphys.2021.03.005.

A. Alderson, P. A. Sabelli, J. R. Dickinson, D. Cole, M. Richardson, M. Kreis, P. R. Shewry and N. G. Halford. "Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88.19 (1991): 8602-8605.

P. Allison, A. Suttangkakul and R. D. Vierstra. "The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*." *Genetics* 178.3 (2008): 1339-1353.

G. Arselin, J. Vaillier, B. Salin, J. Schaeffer, M. F. Giraud, A. Dautant, D. Brethes and J. Velours. The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39):40392–40399, 2004. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.M404316200.

I. Aretz, C. Jakubke and C. Osman. Wie Zellen den Erhalt des mitochondrialen Genoms sicherstellen. *BioSpektrum*, 24(6), 2018. ISSN 18686249. doi: 10.1007/s12268-018-0961-2.

I. Arnold, K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart and H. Schägger. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* 1998 Dec 15;17(24):7170-8. doi: 10.1093/emboj/17.24.7170. PMID: 9857174; PMCID: PMC1171063.

W. Back, M. Artal Sanz, L. J. De Koning, A. O. Muijsers, H. Van Der Spek, L. De Jong and C. G. De Koster. A structure for the yeast prohibitin complex: Structural prediction and evidence from chemical cross-linking. *Proceedings 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, pages 457–458, 2002. doi: 10.1110/ps.0212602.Coates.

M. Binder, A. Harting and T. Sata. Immunogold labeling of yeast cells: an efficient tool for the study of protein targeting and morphological alterations due to overexpression and inactivation of genes. *Histochem Cell Biol.* 1996 Jul;106(1):115-30. doi: 10.1007/BF02473206. PMID: 8858371.

W. Bleazard, J. M. McCaffery, E. J. King, S. Bale, A. Mozdy, Q. Tieu, J. Nunnari and J. M. Shaw: The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep;1(5):298-304. doi: 10.1038/13014. PMID: 10559943; PMCID: PMC3739991.

L. Bleier and S. Drose. Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1827(11-12):1320–1331, 2013. ISSN 00052728. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.12.002.

D. Botstein and G. R. Fink. Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, 189(3):695–704, 2011. ISSN 00166731.doi:10.1534/genetics.111.130765.

H. Boumans, L. A. Grivell and J. A. Berden. The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (9):4872–4877, 1998. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.273.9.4872. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.9.4872>.

C. X. Butow. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 6, 815–825 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrg1708>.

J. Chapman, Y. S. Ng and T. J. Nicholls. The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity and Dynamics by Mitochondrial Membranes. *Life (Basel)*. 2020 Aug 26;10(9):164. doi: 10.3390/life10090164. PMID: 32858900; PMCID: PMC7555930.

Z. Chen, Z. H. Wang, G. Zhang, C. K. E. Bleck, D. J. Chung, G. P. Madison, E. Lindberg, C. Combs, R. S. Balaban and Hong Xu. Mitochondrial DNA segregation and replication restrict the transmission of detrimental mutation. *The Journal of Cell Biology*, 219(7), 2020. ISSN 15408140. doi: 10.1083/JCB.201905160.

L. L. Clay Montier, J. J. Deng and Y. Bai, Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number, *Journal of Genetics and Genomics*, Volume 36, Issue 3, 2009, Pages 125-131, ISSN 1673-8527, [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60099-5](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60099-5).

L. Colina-Tenorio, P. Horten, N. Pfanner and H. Rampelt. Shaping the mitochondrial inner membrane in health and disease. *Journal of Internal Medicine*, 287(6): 645–664, 2020. ISSN 13652796. doi: 10.1111/joim.13031.

E. M. Conneally and J. E. Gusella. The Role of Mitochondrial DNA in Huntington's Disease. pages 129–136, 1989.

K. M. Davies, C. Anselmi, I. Wittig, J. D. Faraldo-Gomez and W. Kühlbrandt. Structure of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34):13602–13607, 2012. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.1204593109.

T. Delerue, D. Tribouillard-Tanvier, M. Daloyau, F. Khosrobakhsh, L. J. Emorine, G. Friocourt, P. Belenguer, M. Blondel and L. Arnaune-Pelloquin. A yeast-based screening assay identifies repurposed drugs that suppress mitochondrial fusion and mtDNA maintenance defects. *Disease models & mechanisms*, page dmm.036558, jan 2019. ISSN 1754-8411. doi: 10.1242/dmm.036558. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30658998>.

R. J. Devenish, P. Nagley, X. Roucou and M. Prescott. Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *1458(6):428–442*, 2000. doi: doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00092-X.

S. D. Dyll. Ancient Invasions : From Endosymbionts. 253(2004), 2014. doi:10.1126/science.1094884.

L. Edens, I. Bom, A. M. Ledebor, J. Maat, M. Y. Toonen and C. T. Verrips "Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast." *Cell* 37.2 (1984): 629-633.

A. Egner, S. Jakobs and Stefan W. Hell. Fast 100-nm resolution threedimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6):3370–3375, 2002. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.052545099.

M. J. Eramo, V. Lisnyak, L. E. Formosa and Michael T. Ryan. The 'mitochondrial contact site and cristae organising system' (MICOS) in health and human disease. *Journal of Biochemistry*, 167(3):243–255, 2020. ISSN 17562651. doi: 10.1093/jb/mvz111.

Evolutionsweg.de. MS Windows NT kernel description, 2021. URL <http://evolutionsweg.de/zellen-mitzellkern-eukaryoten/>.

W. Fan, K. G. Waymire, N. Narula, P. Li, C. Rocher, P. E. Coskun, M. A. Vannan, J. Narula, G. R. Macgregor and D. C. Wallace. NIH Public Access. 319(5865):958–962, 2011. doi:10.1126/science.1147786.A.

W. Fan, K. G. Waymire, N. Narula, P. Li, C. Rocher, P. E. Coskun, M. A. Vannan, J. Narula, G. R. Mac Gregor and D. C. Wallace, A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science* 319, 958-962 (2008).

J. R. Friedman, A. Mourier, J. Yamada, J. Michael McCaffery and Jodi Nunnari. MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *eLife*, 2015(4):1–61, 2015. ISSN 2050084X. doi: 10.7554/eLife.07739.

P. Ge, V. L. Dawson and T. M. Dawson. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: A source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1):1–18, 2020. ISSN 17501326. doi: 10.1186/s13024-020-00367-7.

G. S. Gorman, P. F. Chinnery, S. DiMauro, M. Hirano, Y. Koga, R. McFarland, A. Suomalainen, D. R. Thorburn, M. Zeviani and D. M. Turnbull. Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 10 2016. ISSN 2056676X. doi: 10.1038/nrdp.2016.80. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27775730/>.

M. Grazina, J. Pratas, F. Silva and S. Oliveira. Genetic basis of Alzheimer's dementia: role of mtDNA mutations. 5:92–107, 2006. doi: 10.1111/j.1601-183X.2006.00225.x.

D. R. Green and B. Van Houten. SnapShot: Mitochondrial quality control. *Cell*, 147(4):950, 950.e1, nov 2011. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.036. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078889>.

S. Gruschke, K. Kehrein, K. Rompler, K. Gröne, L. Israel, A. Imhof, J. M. Herrmann and Martin Ott. Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *The Journal of cell biology*, 193(6):1101–14, 6 2011. ISSN 15408140. doi: 10.1083/jcb.201103132.

C. Haag-Liautard, N. Coffey, D. Houle, M. Lynch, B. Charlesworth and P. D. Keightley. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS biology*, 6(8):e204, aug 2008. ISSN 1545-7885. doi: 10.1371/journal.pbio.0060204.

M. Harner, C. Korner, D. Walther, D. Mokranjac, J. Käsmacher, U. Welsch, J. Griffith, M. Mann, F. Reggiori and W. Neupert. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *The EMBO Journal*, 30(21):4356–4370, 11 2011. ISSN 02614189. doi: 10.1038/emboj.2011.379.

M. E. Harner, A. K. Unger, W. J. C. Geerts, M. Mari, T. Izawa, M. Stenger, S. Geimer, F. Reggiori, B. Westermann and W. Neupert. An evidence based hypothesis on the existence of two pathways of mitochondrial crista formation. *eLife*, 5(NOVEMBER2016):1–25, 2016. ISSN 2050084X. doi: 10.7554/eLife.18853.

R. Higuchi-Sanabria, J. K. Charalel, M. P. Viana, E. J. Garcia, C. N. Sing, A. Koenigsberg, T. C Swayne, J. D. Vevea, I. R. Boldogh, S. M. Rafelski and L. A. Pon. Mitochondrial anchorage and fusion contribute to mitochondrial inheritance and quality control in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 27(5):776–87, mar 2016. ISSN 1939-4586. doi: 10.1091/mbc.E15-07-0455.

J. H. Hill, Z. Chen and H. Xu, Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. *Nat. Genet.* 46, 389–392 (2014).

C. Horie, H. Suzuki, M. Sakaguchi and K. Mihara. Targeting and assembly of mitochondrial tail-anchored protein tom5 to the tom complex depend on a signal distinct from that of tail-anchored proteins dispersed in the membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 278:41462–41471, 10 2003. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M307047200.

M. E. S. Hudspeth, R. D. Vincent and P. S. Perlman. Expandable var1 gene of yeast mitochondrial DNA: In-frame insertions can explain the strain-specific protein size polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(10 1):3148–3152, 1984. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.81.10.3148.

Y. Ito, T. Yoshidome, N. Matubayasi, M. Kinoshita and M. Ikeguchi. Molecular dynamics simulations of yeast F1-atpase before and after 16 rotation of the γ subunit. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(12): 3298–3307, 2013. ISSN 15205207. doi: 10.1021/jp312499u.

T. Itoh, A. Toh-E and Y.Matsui. Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast. *The EMBO journal*, 23(13):2520–30, jul 2004. ISSN 0261-4189. doi: 10.1038/ sj.emboj.7600271.

H. T. Jacobs and D. M. Turnbull. Nuclear genes and mitochondrial translation: A new class of genetic disease. *Trends in Genetics*, 21(6):312–314, 2005. ISSN 01689525. doi: 10.1016/j.tig.2005.04.003.

C. Janke, M. M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel and Michael Knop. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 2004. ISSN 0749503X. doi: 10.1002/yea.1142.

L. Jimenez, D. Laporte, S. Duvezin-Caubet, F. Courtout and I. Sagot. Mitochondrial ATP synthases cluster as discrete domains that reorganize with the cellular demand for oxidative phosphorylation. *Journal of Cell Science*, 127(4):719–726, 2014. ISSN 0021-9533. doi: 10.1242/jcs.137141.

T. Joseph-Horne, D. W. Hollomon and P. M. Wood. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Apr 2;1504(2-3):179-95. doi: 10.1016/s0005-2728(00)00251-6. PMID: 11245784.

F. Kanetsuna and L. M. Carbonell. Enzymes in glycolysis and the citric acid cycle in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of bacteriology*, 92(5):1315–1320, 1966. ISSN 00219193. doi: 10.1128/jb.92.5.1315-1320.1966.

T. Kanki, K. Wang, Y. Cao, M. Baba and D. J. Klionsky. Atg32 Is a Mitochondrial Protein that Confers Selectivity during Mitophagy. *Developmental Cell*, 17(1):98–109, 2009. ISSN 15345807. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.014.

S. Kawai-Noma, C. G. Pack, T. Kojidani, H. Asakawa, Y. Hiraoka, M. Kinjo, T. Haraguchi, H. Taguchi and A. Hirata. In vivo evidence for the fibrillar structures of Sup35 prions in yeast cells. *Journal of Cell Biology*, 190(2):223–231, 2010. ISSN 00219525. doi: 10.1083/jcb.201002149.

I. E. Karavaeva, S. A. Golyshev, E. A. Smirnova, S. S. Sokolov, F. F. Severin, D. A. Knorre; Mitochondrial depolarization in yeast zygotes inhibits clonal expansion of selfish mtDNA. *J Cell Sci* 1 April 2017; 130 (7): 1274–1284. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.197269>.

S. Khosravi and M. E. Harner. "The MICOS complex, a structural element of mitochondria with versatile functions." *Biological Chemistry* 401.6-7 (2020): 765-778.

T. Klecker and B. Westermann. Pathways shaping the mitochondrial inner membrane. *Open biology*, 11(12):210238, 2021. ISSN 20462441. doi: 10.1098/rsob.210238.

A. K. Kondadi, R. Anand, S. Hansch, J. Urbach, D. M. Wolf, M. Segawa, M. Liesa and O. S. Shirihai. Cristae undergo continuous cycles of fusion and fission in a MICOS-dependent manner. (0), 2019.

A. K. Kondadi, R. Anand and A. S. Reichert. Cristae Membrane Dynamics – A Paradigm Change. *Trends in Cell Biology*, 30(12):923–936, 2020. ISSN 18793088. doi: 10.1016/j.tcb.2020.08.008. URL <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.008>.

D. J. Kominsky, M. P. Brownson, D. L. Updike and P. E. Thorsness, Genetic and Biochemical Basis for Viability of Yeast Lacking Mitochondrial Genomes, *Genetics*, Volume 162, Issue 4, 1 December 2002, Pages 1595–1604, <https://doi.org/10.1093/genetics/162.4.1595>.

J. P. Lasserre, A. Dautant, R. S. Aiyar, R. Kucharczyk, A. Glatigny, D. Tribouillard-Tanvier, J. Rytka, M. Blondel, N. Skoczen, P. Reynier, L. Pitayu, A. Rotig, A. Delahodde, Lars. M. Steinmetz, G. Dujardin, V. Procaccio and J. P. Di Rago. Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 8(6):509–522, 2015. ISSN 17548411. doi:10.1242/dmm.020438.

J. J. Lemasters. Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 22(SUPPL. 1), 2007. ISSN 14401746. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04643.x.

A. D. Lippuner, T. Julou and Yves Barral. Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2): 300–325, 2014. ISSN 01686445. doi: 10.1111/1574-6976.12060.

H. Li, Y. Ruan, K. Zhang, F. Jian, C. Hu, L. Miao, L. Gong, L. Sun, X. Zhang, S. Chen, H. Chen, D. Liu and Z. Song. Mic60/mitofilin determines micos assembly essential for mitochondrial dynamics and mtdna nucleoid organization. *Cell Death Differ*, 23(3):380–92, 2016. ISSN 1476-5403 (Electronic) 1350-9047 (Linking). doi: 10.1038/cdd.2015.102.

T. Lieber, S. P. Jeedigunta, J. M. Palozzi, R. Lehmann and T. R. Hurd. Mitochondrial fragmentation drives selective removal of deleterious mtDNA in the germline. *Nature*, 570(7761):380–384, 6 2019. ISSN 14764687. doi: 10.1038/s41586-019-1213-4.

C. S. Liu, W. L. Cheng, C. F. Lee, Y. S. Ma, C. Y. Lin, C. C. Huang and Y. H. Wei (2006). Alteration in the copy number of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Acta Neurol Scand* 113, 334–341.

M. Lynch, W. Sung, K. Morris, N. Coffey, C. R. Landry, E. B. Dopman, W. J. Dickinson, K. Okamoto, S. Kulkarni, D. L. Hartl and W. K. Thomas. A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27):9272–7, jul 2008. ISSN 10916490. doi: 10.1073/pnas.0803466105.

C. Malina, C. Larsson and J. Nielsen. Yeast mitochondria: An overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS Yeast Research*, 18(5):1–17, 2018. ISSN 15671364. doi: 10.1093/femsyr/foy040.

F. A. Mari and M. Reggiori. Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell*. 2015 Oct 12;2(11):412-428. doi: 10.15698/mic2015.11.237. PMID: 28357267; PMCID: PMC5349205.

J. R. McFaline-Figueroa, J. Vevea, T. C. Swayne, C. Zhou, C. Liu, G. Leung, I. R. Boldogh and L. A. Pon. Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell*, 2011. ISSN 14749718. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00731.x.

A. Mehrotra, G. Rigoni and M. E. Soriano. Who and how in the regulation of mitochondrial cristae shape and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017. ISSN 0006-291X. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.088. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.088>.

T. A. Mentel, M. Garg, S. G. Gould and S. B. Martin The Physiology of Phagocytosis in the Context of Mitochondrial Origin. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2017. doi: 10.1128/MMBR.00008-17.

I. Miyakawa. Organization and dynamics of yeast mitochondrial nucleoids. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 93(5):339–359, 2017. ISSN 1349-2896. doi: 10.2183/pjab.93.021.

D. Mokranjac and W. Neupert. *Biochimica et Biophysica Acta* The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *BBA - Bioenergetics*, 1797(6-7):1045– 1054, 2010. ISSN 0005-2728. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.026.

P. Neupane, S. Bhujju , N. Thapa and H. Kumar Bhattarai. ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomolecular Concepts*, 10(1): 1–10, 2019. ISSN 1868503X. doi: 10.1515/bmc-2019-0001.

A. Nilsson and J. Nielsen. Metabolic Trade-offs in Yeast are Caused by F1F0-ATP synthase. *Scientific Reports*, 6(February):1–11, 2016. ISSN 20452322. doi: 10.1038/srep22264. URL <http://dx.doi.org/10.1038/srep22264>.

J. Nunnari, W. F. Marshall, A. Straight, A. Murray, J. W. Sedat and P. Walter. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Molecular biology of the cell*, 8(7):1233–42, 7 1997. ISSN 1059.

K. Obara, T. Yoshikawa, R. Yamaguchi, K. Kuwata, K. Nakatsukasa, K. Nishimura and T. Kamura. Proteolysis of adaptor protein Mmr1 during budding is necessary for mitochondrial homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun.* 2022 Apr 14;13(1):2005. doi: 10.1038/s41467-022-29704-8. PMID: 35422486; PMCID: PMC9010424.

T. Ohnishi, K. Kawaguchi, and B. Hagihara. Preparation and some properties of yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 241(8):1797–1806, 1966. ISSN 00219258. doi: 10.1016/s0021-9258(18)96706-2.

K. Okamoto, P. S. Perlman and R. A. Butow. The sorting of mitochondrial DNA and mitochondrial proteins in zygotes: preferential transmission of mitochondrial DNA to the medial bud. *The Journal of cell biology*, 142(3):613–23, 8 1998. ISSN 0021-9525.

K. Okamoto, N. Kondo-Okamoto and Y. Ohsumi. Mitochondria Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Developmental Cell*, 17(1):87–97, 2009. ISSN 15345807. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.013.

C. Osman, T. R. Noriega, V. Okreglak, J. C. Fung and P. Walter. Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1501737112.

M. Ott and J. M. Herrmann. Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1803(6):767–775, 2010. ISSN 01674889. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.11.010.

C. Pereira, N. Camougrand, S. Manon, M. J. Sousa and M. Corte-Real. ADP/ATP carrier is required for mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome c release in yeast apoptosis. *Molecular Microbiology*, 66(3):571–582, 2007. ISSN 0950382X. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05926.x.

W. M. Pernice, J. D. Vevea and L. A. Pon. A role for Mfb1p in region-specific anchorage of high-functioning mitochondria and lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Communications*, 7, 2016. ISSN 20411723. doi:10.1038/ncomms10595.

M. D. W. Piper, P. Daran-Lapujade, C. Bro, B. Regenber, S. Knudsen, J. Nielsen and J. T. Pronk. Reproducibility of oligonucleotide microarray transcriptome analyses. An interlaboratory comparison using chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40):37001–37008, 2002. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M204490200.

P. W. Piper, G. W. Jones, D. Bringloe, N. Harris, M. MacLean and M. Mollapour. The shortened replicative life span of prohibitin mutants of yeast appears to be due to defective

mitochondrial segregation in old mother cells. *Aging Cell*. 2002 Dec;1(2):149-57. doi: 10.1046/j.1474-9728.2002.00018.x. PMID: 12882345.

A. Pyle, H. Anugrha, M. Kurzawa-Akanbi, A. Yarnall, D. Burn and G. Hudson. Reduced mitochondrial DNA copy number is a biomarker of Parkinson's disease, *Neurobiology of Aging*, Volume 38, 2016, Pages 216.e7-216.e10, ISSN 0197-4580, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.033>.

L. Qiuxin, W. Chi, and D. Ji. "Research Progress of CURT1 on Regulating Thylakoid Membrane Curvature." *Chinese Bulletin of Botany* 56.4 (2021): 462.

M. Rak, E. Tetaud, F. Godard, I. Sagot, B. Salin, S. Duvezin-Caubet, P. P. Slonimski, J. Rytka and J. P. Di Rago. Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15):10853–10864, 4 2007. ISSN 1083351X. doi: 10.1074/jbc.M608692200.

E. S. Ramos, E. Motori, C. B. Serid, I. K. Hlid, A. Yeroslavizid, B. Ruzzenenteid, J. H. K. Kauppila, J. D. Busch, K. Hultenby, B. H. Habermannid, S. Jakobsid, N. R. Larssonid and A. Mourierid. Mitochondrial fusion is required for regulation of mitochondrial DNA replication. 2019. doi: 10.1371/journal.pgen.1008085.

J. Reinders, K. Wagner, R. P. Zahedi, D. Stojanovski, B. E. M. van der Laan, P. Rehling, A. Sickmann, N. Pfanner and C. Meisinger "Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase." *Molecular & Cellular Proteomics* 6.11 (2007): 1896-1906.

H. Schagger. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life*, 52(3-5):119–128, 2001. ISSN 15216543. doi: 10.1080/15216540152845911.

B. Schmidt, B. Hennig, H. Köhler, W. Neupert. Transport of the precursor to neurospora ATPase subunit 9 into yeast mitochondria. Implications on the diversity of the transport mechanism., *Journal of Biological Chemistry*, Volume 258, Issue 8, 1983, Pages 4687-4689, ISSN 0021-9258, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32474-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32474-8).

G. S. Shadel. Yeast as a model for human mtDNA replication. *American journal of human genetics*. *PLoS Biology*, 65(1):1230–1237, 1999. ISSN 15449173. doi: 10.1086/302630.

J. M. Shaw and J. Nunnari. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends in Cell Biology*, 12(4):178–184, 2002. ISSN 09628924. doi: 10.1016/ S0962-8924(01)02246-2.

D. F. Steele, C. A. Butler and T. D. Fox. Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (11):5253–7, 5 1996. ISSN 0027-8424.

J. B. Stewart, C. Freyer, J. L. Elson, A. Wredenberg, Z. Cansu, A. Trifunovic and N. G. Larsson. Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS biology*, 6(1):e10, 1 2008. ISSN 1545-7885. doi: 10.1371/journal.pbio.0060010.

D. Stock, A. G. Leslie, J. E. Walker, Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286, 1700–1705 (1999).

A. G.M. Tielens and J. J. Van Hellemond. The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1365(1-2):71–78, 1998. ISSN 00052728. doi: 10.1016/S0005-2728(98)00045-0.

K. Tokadidis, S. Vial, P. Luciano, M. Vergnolle and S. Clemence. Moving signals and molecules through membranes membrane protein import in yeast mitochondria, 2000.

A. M. Van Der Blik, M. M. Sedensky and P. G. Morgan. Cell biology of the mitochondrion. *Genetics*, 207(3):843–871, 2017. ISSN 19432631. doi: 10.1534/genetics.117.300262.

S. de Vries and C. A.M. Marres. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *BBA Reviews On Bioenergetics*, 895(3):205–239, 1987. ISSN 03044173. doi: 10.1016/S0304-4173(87)80003-4.

C. Wang, W. Du, Q. P. Su, M. Zhu, P. Feng, Y. Li, Y. Zhou, N. Mi, Y. Zhu, D. Jiang, S. Zhang, Z. Zhang, Y. Sun and L. Yu. Dynamic tubulation of mitochondria drives mitochondrial network formation. *Cell research*, 25(10):1108–20, oct 2015. ISSN 1748-7838. doi: 10.1038/cr.2015.89.

E. D. Wong, J. A. Wagner, S. W. Gorsich, J. M. McCaffery, J. M. Shaw, J. Nunnari. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol.* 2000 Oct 16;151(2):341-52. doi: 10.1083/jcb.151.2.341. PMID: 11038181; PMCID: PMC2192650.

R. J. Youle and A. M. Van Der Blik. Good for Discussion: Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science*, 337(6098):1062–1065, 2012. doi: 10.1126/science.1219855.Mitochondrial.

Y. Zhang, Z. H. Wang, Y.Liu, Y. Chen, N. Sun, M. Gucek, F. Zhang and H. Xu. HHS Public Access. 73(6):1127–1137, 2020. doi: 10.1016/j. molcel.2019.01.013.PINK1.

M. Zick, R. Rabl and A. S. Reichert. Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* 2009;1793:5–19. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.06.013.

Danksagung

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Christof Osman für die Durchführung dieses Projektes und die Zeit in seiner Arbeitsgruppe und dem Labor danken. Danke Christof, dass du immer ein offenes Ohr und bei allen Fragen immer eine fundierte Antwort hattest.

Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe, die bei allen technischen und inhaltlichen Fragen sehr gutes Feedback eingebracht haben. Vor allem Rodaria Roussou und Nadja Lebedeva haben bei einigen Experimenten einen maßgeblichen Beitrag geleistet.

Herzlichen Dank auch an die zahlreichen Studierenden, die im Rahmen eines Forschungspraktikums Teil der AG Osman waren und jederzeit tatkräftig unterstützt haben. Dazu gehören vor allem Felix Thoma, Moritz Kröker, Lea Rosenhammer und Soham Bharadwaj. Des Weiteren möchte ich hier meiner Partnerin Lisa Sophia Grundl danken. Sie stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hat mich in diesem Projekt unterstützt. Vielen Dank an Lisa dafür, dass du mir eine Stütze bist und mir sehr bei dieser Arbeit geholfen hast. Du warst wie immer eine exzellente Sparringspartnerin und Lektorin.