

**Identifizierung und funktionelle Charakterisierung  
von Proteinen, die Fusion und Teilung von  
Mitochondrien vermitteln**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Marlies Messerschmitt  
aus Bad Kissingen

München  
2004

Erstgutachter:	Prof. Dr. Jürgen Soll
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Lutz Eichacker
Sondergutachter:	Prof. Dr. Benedikt Westermann
Tag der mündlichen Prüfung:	25.06.2004

## Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampère
AAC	ATP/ADP-carrier
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BrCN	Bromcyan
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie
CIP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
CME	Chlorimuronethyl
cytRFP	cytosolisches RFP
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
D	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
$\Delta\Psi$	Membranpotential
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Farad
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
×g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GMP-PNP	Guanylyl-Imidodiphosphat-Tetralithium-Salz
GNRP	<i>guanine nucleotide release protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
His <sub>6</sub> -Tag	Hexahistidinsequenz
Hsp	Hitzeschock-Protein
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
k	kilo
Kan	Kanamycin
KOH	Kalilauge

l	Liter
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
Lys	Lysozym
μ	micro
m	Meter
m	milli
M	Mol pro Liter
m/v	Masse pro Volumen
MDM	<i>mitochondrial distribution and morphology</i>
min	Minute(n)
MPP	Matrix-Prozessierungs-Peptidase
ms	milli Sekunde(n)
mt	mitochondrial
mtGFP	mitochondriales GFP
n	nano
NADH	Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid
NaOH	Natronlauge
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
OD..	Optische Dichte bei ... nm
p	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
STI	<i>Soybean trypsin inhibitor</i>
T	Thymin
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	<i>Unit(s)</i>
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
Ω	Ohm

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>1.1</b>	<b>Bedeutung und Funktion der Mitochondrien</b>	1
<b>1.2</b>	<b>Morphologie, Lokalisation und Transport von Mitochondrien</b>	3
<b>1.3</b>	<b>Fusion von Membranen</b>	4
1.3.1	Mitochondriale Fusion	5
1.3.2	Fzo und seine Rolle bei der mitochondrialen Membranfusion	8
<b>1.4</b>	<b>Mitochondriale Teilungsvorgänge</b>	11
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	13
1.5.1	Identifizierung von Hefemutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie	13
1.5.2	Reinigung und Charakterisierung des Fzo1-Komplexes aus <i>N. crassa</i>	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	15
<b>2.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	15
2.1.1	Präparation von DNS	15
2.1.1.1	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	15
2.1.1.2	Isolierung von genomischer DNS aus <i>S. cerevisiae</i>	16
2.1.1.3	Isolierung von genomischer DNS aus <i>N. crassa</i>	16
2.1.1.4	Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.1.2	Klonierung von DNS-Fragmenten	17
2.1.2.1	Restriktionsverdau von DNS	17
2.1.2.2	Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten	18
2.1.2.3	Ligation von DNS-Fragmenten durch T4-DNS-Ligase	18
2.1.2.4	TA-Klonierung von PCR-Produkten	18
2.1.2.5	Präparation von transformationskompetenten <i>E. coli</i> Zellen	19
2.1.2.6	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation	19
2.1.3	Reinigung und Analyse von DNS	19
2.1.3.1	Gelelektrophorese von DNS	19
2.1.3.2	Isolierung von DNS aus Agarosegelen	20
2.1.3.3	Konzentrationsbestimmung von DNS	20
2.1.3.4	Nachweis spezifischer DNS-Fragmente mittels Hybridisierungssonden (Southern Blot)	20
2.1.3.4.1	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNS auf Nylonmembran	20
2.1.3.4.2	Gewinnung einer digoxigeninmarkierten DNS-Sonde	21
2.1.3.4.3	Nachweis von Genfragmenten durch DNS-Hybridisierung	21
2.1.4	Klonierungen	21
2.1.4.1	Plasmide und <i>E. coli</i> -Stämme	21
2.1.4.2	Klonierungsstrategien	22
2.1.4.2.1	Expression von Antigenen/ <i>E. coli</i> Expressionsklonierungen	22
2.1.4.2.2	<i>N. crassa</i> Expressionsvektoren	23
2.1.4.2.3	Klonierung von <i>MDM33</i> für die <i>in vitro</i> -Translation	23
2.1.4.2.4	Hefeexpressionsvektoren	24
<b>2.2</b>	<b>Genetik</b>	25
2.2.1	Hefegenetik	25
2.2.1.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	25
2.2.1.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.2.1.3	Chromosomale Integration	26
2.2.1.4	Kreuzen, Sporulation und Tetradenanalyse von Hefezellen	27
2.2.1.5	Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> („Tüpfeltest“)	27

2.2.1.6	Nachweis chromosomaler Insertionen/Deletionen in <i>S. cerevisiae</i>	28
2.2.1.7	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte <i>S. cerevisiae</i> Stämme	28
2.2.2	<i>Neurospora</i> -Genetik	29
2.2.2.1	Kultivierung von <i>N. crassa</i>	29
2.2.2.1.1	Gewinnung von Konidiosporen	29
2.2.2.1.2	Anzucht der Hyphen	30
2.2.2.1.3	Konservierung der Stämme durch Silikattrocknung	30
2.2.2.2	Transformation von <i>N. crassa</i>	30
2.2.2.2.1	Gewinnung transformationskompetenter Sphäroplasten	30
2.2.2.2.2	Transformation der Sphäroplasten	31
2.2.2.3	Verwendete Stämme von <i>N. crassa</i>	31
<b>2.3</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	31
2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.3.2	Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (TCA)	32
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.3.4	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	32
2.3.5	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulosemembranen (Westernblot)	33
2.3.6	Quantifizierung von Proteinbanden durch Autoradiographie und Phosphorimaging	33
2.3.7	Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine <i>in vitro</i>	33
2.3.8	Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> und <i>N. crassa</i>	34
2.3.9	Gelfiltrationschromatographie	35
<b>2.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	35
2.4.1	Zellbiologische Methoden bei <i>S. cerevisiae</i>	35
2.4.1.1	Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe	35
2.4.1.2	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	36
2.4.1.3	Reinigung von Mitochondrien über einen Saccharosegradienten	36
2.4.1.4	Subfraktionierung von Mitochondrien	37
2.4.1.5	Isolierung von Mikrosomen und Cytosol aus Hefe	37
2.4.1.6	Fluoreszenzmikroskopie	37
2.4.1.7	Screening einer Hefestammsammlung nach Mutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie	38
2.4.1.8	Fixierung von Hefezellen für die Elektronenmikroskopie	38
2.4.2	Zellbiologische Methoden bei <i>N. crassa</i>	39
2.4.2.1	Schnellpräparation von Membranen	39
2.4.2.2	Isolierung von Mitochondrien aus <i>N. crassa</i>	39
2.4.3	Import <i>in vitro</i> -synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien	40
2.4.4	Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranen (Carbonatextraktion)	40
<b>2.5</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	40
2.5.1	Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen	40
2.5.1.1	Gewinnung der Antiseren	41
2.5.1.2	Kovalente Kopplung von Proteinen an BrCN-aktivierte Sepharose	41
2.5.1.3	Affinitätsreinigung des Antiserums	42
2.5.2	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulosemembranen (Westernblot)	42
2.5.3	Koimmunfällungen	43
<b>2.6</b>	<b>Medien und Puffer</b>	43
2.6.1	Medien	43
2.6.1.1	Medien für <i>E. coli</i>	43
2.6.1.2	Medien für Hefe	44

2.6.1.3	Medien für <i>N. crassa</i>	44
2.6.2	Puffer	46
<b>2.7</b>	<b>Chemikalien, Enzyme und Geräte</b>	<b>47</b>
2.7.1	Chemikalien und Enzyme	47
2.7.2	Geräte	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b><i>MDM33</i> ist ein neues Gen, das für die mitochondriale Morphologie in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> wichtig ist</b>	<b>49</b>
3.1.1	Identifizierung neuer <i>mdm</i> -Mutanten	49
3.1.2	Mdm33 ist ein neues Protein von 54 kD	52
3.1.3	Phänotyp von $\Delta$ <i>mdm33</i> -Zellen	54
3.1.3.1	$\Delta$ <i>mdm33</i> -Zellen besitzen veränderte Mitochondrien	55
3.1.3.2	Wachstumsverhalten von $\Delta$ <i>mdm33</i> -Zellen bei verschiedenen Temperaturen	56
3.1.3.3	In $\Delta$ <i>mdm33</i> -Zellen sind das Endoplasmatische Retikulum, das Aktincytoskelett und die Vakuolen unverändert	57
3.1.4	Lokalisation und Topologie von Mdm33	59
3.1.4.1	Mdm33 ist in Mitochondrien lokalisiert	59
3.1.4.1.1	Der N-Terminus von Mdm33 dient als Importsignal für Mitochondrien <i>in vivo</i>	59
3.1.4.1.2	Mdm33 wird in isolierte Mitochondrien importiert	60
3.1.4.1.3	Epitop-markiertes Mdm33 fraktioniert mit Mitochondrien	61
3.1.4.2	Submitochondriale Lokalisierung und Topologie von <i>in vitro</i> importiertem Mdm33 in Mitochondrien	63
3.1.4.2.1	Mdm33 ist ein integrales Membranprotein	63
3.1.4.2.2	Mdm33 ist in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert	64
3.1.5	Die Überexpression von Mdm33 führt zum Wachstumsarrest	66
3.1.6	Epistatische Wechselwirkungen von $\Delta$ <i>mdm33</i> , $\Delta$ <i>fis1</i> , $\Delta$ <i>fzo1</i> und $\Delta$ <i>mgm1</i> -Mutationen	69
3.1.6.1	Der Phänotyp der $\Delta$ <i>mdm33</i> / $\Delta$ <i>fis1</i> -Doppelmutante	69
3.1.6.2	Der Phänotyp der $\Delta$ <i>mdm33</i> / $\Delta$ <i>fzo1</i> -Doppelmutante	71
3.1.6.3	Der Phänotyp der $\Delta$ <i>mdm33</i> / $\Delta$ <i>mgm1</i> -Doppelmutante	72
3.1.7	Mdm33 ist Teil eines höhermolekularen Komplexes mit homooligomeren Interaktionen	72
3.1.7.1	Mdm33 ist Teil eines höhermolekularen Komplexes	72
3.1.7.2	Importiertes Mdm33 kann spezifisch mit GFP-Mdm33 koimmungefällt werden	73
<b>3.2</b>	<b>Reinigung und biochemische Charakterisierung von Fzo1 aus <i>N. crassa</i></b>	<b>75</b>
3.2.1	<i>N. crassa</i> Fzo1 Proteinsequenz	75
3.2.2	Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen <i>N. crassa</i> Fzo1	76
3.2.3	Bestimmung des Molekulargewichts des nativen Fzo1-Komplexes in <i>N. crassa</i>	77
3.2.4	Koimmunpräzipitationsexperimente zum Auffinden von Interaktionspartnern	79
3.2.5	Immunpräzipitationsexperiment zur Feststellung des Fzo1-Anteils am Gesamtproteingehalt der Mitochondrien	80
3.2.2	Reinigung von Fzo1 aus <i>N. crassa</i>	81
3.2.2.1	Herstellung eines N-terminalen His <sub>6</sub> -Fzo1-Stammes	82
3.2.2.2	His <sub>6</sub> -Fzo1 ist Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes	82

3.2.2.3	Reinigung von His <sub>6</sub> -Fzo1 durch NiNTA- und Gelfiltrationschromatographie	83
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>Teilung der mitochondrialen Außenmembran</b>	<b>85</b>
<b>4.2</b>	<b>Teilung der mitochondrialen Innenmembran</b>	<b>86</b>
<b>4.3</b>	<b>Mdm33 und seine Rolle bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran</b>	<b>87</b>
<b>4.4</b>	<b>Die mitochondriale Fusion</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>95</b>



## 1 Einleitung

Die eukaryotische Zelle ist in unterschiedliche Kompartimente aufgeteilt, die es verschiedenen biologischen und chemischen Prozessen erlauben, räumlich voneinander getrennt abzulaufen. Diese Kompartimente sind von Lipidmembranen umgeben. Dabei unterscheidet man Kompartimente, die von einer einfachen Membran umgeben sind (wie z.B. Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Peroxisomen und Lysosomen), und solche, die einen komplexeren Aufbau besitzen (z.B. Zellkern, Mitochondrien und Chloroplasten). Die Proteinsynthese erfolgt hauptsächlich im Cytosol. Der Transport der im Cytosol synthetisierten, kernkodierten Proteine in die Zielkompartimente erfolgt durch spezifische Transportsysteme. Mitochondrien und Chloroplasten besitzen ein eigenes Genom und eine eigene Proteinsynthesemaschinerie, die einen kleinen Teil der organellären Proteine synthetisiert.

### 1.1 Bedeutung und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien stammen von atmungskompetenten Proteobakterien ab, die vor 1,5 Milliarden Jahren eine Symbiose mit anaeroben Archeobakterien eingingen (Endosymbiontentheorie; Gray *et al.*, 1999). Sie können bei der Zellteilung nicht *de novo* entstehen, sondern vermehren sich durch Teilung bereits existierender Organellen. Mitochondrien sind an vielen Stoffwechselprozessen beteiligt, unter anderem am Fettsäureabbau, der Assemblierung von prosthetischen Eisen/Schwefel-Gruppen, bei Schritten des Harnstoffzyklus und der Synthese des Hämoleküls, der Pyrimidine, der Nukleotide und von Phospholipiden (Scheffler, 2001). Eine der Hauptaufgaben der Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie in Form von ATP durch die oxidative Phosphorylierung, die von der Atmungskette katalysiert wird.

Eine bedeutende Rolle kommt den Mitochondrien bei der Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose) zu (Bernardi, 1999; Bernardi *et al.*, 2001). Sie können die Apoptose einleiten, indem sie Cytochrom *c* und AIF (Apoptose induzierender Faktor) ins Cytosol freisetzen. Diese Proteine aktivieren dann die Caspasen, eine Klasse von Proteasen, die Bestandteile des apoptotischen Signalweges sind. Darüber hinaus sind eine Reihe von Erkrankungen beim Menschen bekannt, die auf Mutationen in der mitochondrialen DNS (mtDNS) zurückzuführen sind (LHON, MERF, MELAS u. a.; siehe Tabelle 1) (Larsson und Luft, 1999; Wallace, 1999). Meist sind Gewebe mit hohem Energiebedarf betroffen, wie z. B. das Herz, die Muskeln, das renale und endokrine System. In einer Zelle können sowohl

Mitochondrien mit normaler mtDNS als auch mit mutierter mtDNS vorliegen (Heteroplasmie). Deswegen kann eine Mutation zu unterschiedlichen Schweregraden und auch zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führen. Auch die Inaktivierung kernkodierter Genprodukte, die wichtig für die mitochondriale Funktion und Biogenese sind, führt zu verschiedenen Krankheiten (z. B. der *Friedreich-Ataxie*; siehe Tabelle 1). Von besonderem Interesse ist, dass in Patienten mit der autosomal dominanten optischen Atrophie Typ I (DOA) Mutationen im *OPA1*-Gen gefunden wurden, dem humanen Homolog des *Saccharomyces cerevisiae* Mgm1 (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2002). Dabei handelt es sich um die erste bekannte Erbkrankheit, die auf die Mutation einer Komponente der mitochondrialen Morphogenese zurückzuführen ist.

Krankheit	betroffenes Gen	klinische Symptome
Lebersche Opticus-Atrophie (LHON)	mt <i>ND6</i> -Gen (Untereinheit der NADH-Dehydrogenase)	Blindheit im 2. Lebensjahrzehnt
Myoklonusepilepsie mit Veränderungen in der Muskelhistologie (ragged red fibers) (MERRF)	mt tRNS <sup>Lys</sup> -Gen	Muskelschwäche, Myoklonie, zerebrale Krampfanfälle
Mitochondriale Enzephalopathie mit Laktatazidose (MELAS)	mt tRNS <sup>Leu</sup> -Gen	episodisches Erbrechen, kortikale Blindheit, Hemiparese, Hemianopsie, Muskelschwäche, Demenz, Kleinwuchs
<i>Friedreich-Ataxie</i>	Frataxin-Gen (kernkodiert)	spinozerebellare Heredoataxie, in der späten Kindheit auftretend
Autosomale dominante optische Atrophie Typ I (DOA)	<i>OPA1</i> -Gen (kernkodiert)	Blindheit im 2. Lebensjahrzehnt

**Tabelle 1: Eine Auswahl wichtiger mitochondrialer Erkrankungen**

Mitochondrien enthalten zirkuläre DNS-Moleküle, die in der Matrix mit der Innenmembran assoziiert in Partikelform vorliegen (mitochondriale Nukleoide) (Aiken Hobbs *et al.*, 2001). Der Verlust der mtDNS führt zu atmungsdefizienten Mitochondrien. Zellen mit atmungsdefizienten Mitochondrien sind nicht mehr in der Lage, nichtfermentierbare Kohlenstoffquellen zu verwerten. So bilden atmungsdefiziente Hefestämme auf glyzerinhaltigem Medium, dem nur ein sehr geringer Anteil an Glukose zugesetzt wurde, im Vergleich zum Wildtyp sehr kleine Kolonien. Dieser Wachstums-Phänotyp wird als „petite“ (pet) bezeichnet. Die mtDNS der Hefe kodiert für einige Untereinheiten der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Enzymkomplexe (*ATP6*, *ATP8*, *ATP9*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *COB1*) und für eine Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms (*VARI*). Die übrigen mitochondrialen Proteine sind kernkodiert und werden posttranslational in die Mitochondrien importiert. Der Import der kernkodierten Proteine aus dem Cytosol in die Mitochondrien erfordert das Zusammenspiel mehrerer Translokationsmaschinen (Neupert, 1997).

## 1.2 Morphologie, Lokalisation und Transport von Mitochondrien

Die Anwendung der Elektronenmikroskopie in den 50er Jahren des vorigen Jahrhunderts erlaubte erstmals die Sichtbarmachung der komplexen intramitochondrialen Strukturen (Palade, 1953). Durch ihre zwei Membranen werden Mitochondrien in vier unterschiedliche Kompartimente aufgeteilt: die Außenmembran, den Intermembranraum, die Innenmembran und die Matrix. Darüber hinaus ist die Innenmembran in zwei Subkompartimente aufgeteilt. Als innere Grenzmembran bezeichnet man die Abschnitte der Innenmembran, die in engem Kontakt zur Außenmembran stehen, im Gegensatz zu den Cristae, die in die Matrix ragen. Die röhren- bzw. lamellenförmigen Cristae unterteilen den Intermembranraum noch einmal in physiologisch unterschiedliche Kompartimente (Frey und Mannella, 2000).

Lange Zeit ging man davon aus, dass Mitochondrien in der Regel eine nierenförmige Gestalt besitzen und in der Zelle frei verteilt vorliegen. Erst die Anwendung von spezifischen Farbstoffen in lebenden Zellen und die Technik der konfokalen Mikroskopie zeigte, dass Mitochondrien ein dynamisches Netzwerk ausbilden, das Teilungs- und Fusionsvorgängen unterworfen ist (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994; Hermann und Shaw, 1998; Yaffe, 1999). Während der logarithmischen Wachstumsphase bilden die Mitochondrien in Hefe – ähnlich wie in vielen tierischen Zellen – ein weitverzweigtes Netzwerk unterhalb der Plasmamembran aus. In der stationären Phase hingegen liegen die Mitochondrien fragmentiert in der Zelle verteilt vor.

Nicht nur die Gestalt der Mitochondrien, auch die Verteilung innerhalb der Zelle unterliegt dynamischen Veränderungen und passt sich den energetischen Bedürfnissen und der Polarität der Zelle an: in Muskelzellen liegen Mitochondrien nahe zu den ATP-verbrauchenden Aktin-Myosin-Komplexen vor (Bakeeva *et al.*, 1978). Auch in der Nähe der präsynaptischen Membran der Nervenzellen sind viele Mitochondrien zu finden. Die Bewegung von Mitochondrien in der Zelle erfordert Strukturen des Cytoskeletts sowie verschiedene Motorproteine. Ein besonders eindrucksvolles Beispiel für eine gerichtete Organellenbewegung ist der Transport entlang der Axone von Nervenzellen. Dabei werden die Mitochondrien über lange Strecken vom Zellkörper entlang von Mikrotubuli zu den Synapsen und den Wachstumskegeln der Neuronen transportiert (Hollenbeck, 1996). In Säugerzellen sind bereits einige mitochondrienspezifische Motorproteine der Kinesin-Familie identifiziert worden (Nangaku *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1997; Khodjakov *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu den höheren Organismen ist die Mitochondrienbewegung in *S. cerevisiae* vom

Aktincytoskelett abhängig (Simon *et al.*, 1995; Hermann und Shaw, 1998). Da sich *S. cerevisiae* asymmetrisch teilt, ist ein vektorieller Transport eine Voraussetzung für die Vererbung der Organellen bei der Zellteilung.

Anhand von Mutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie, den sogenannten *mdm*-Mutanten (*mitochondrial distribution and morphology*), wurde eine Reihe von Genen identifiziert, die für die normale Verteilung und Gestalt von Mitochondrien wichtig sind (McConnell *et al.*, 1990; Burgess *et al.*, 1994; Sogo und Yaffe, 1994; Hermann *et al.*, 1997; Sesaki und Jensen, 1999). Zu nennen sind hier die Außenmembranproteine Mmm1 (*maintenance of mitochondrial morphology*), Mdm10 und Mdm12. Die Deletion der entsprechenden Gene führt zur Ausbildung von Riesenmitochondrien, die nicht mehr in der Lage sind, an Aktinfilamente zu binden (Boldogh *et al.*, 1998). Für Mmm1 wurde vorgeschlagen, dass es zusammen mit Mdm10 und Mdm12 einen Rezeptorkomplex für aktinbindende Proteine bildet (Burgess *et al.*, 1994; Boldogh *et al.*, 1998). Nachfolgende Untersuchungen in *Neurospora crassa* zeigten jedoch, dass diese Proteine wahrscheinlich eine generelle Rolle für die Morphogenese der Mitochondrien spielen, unabhängig vom Cytoskelett (Prokisch *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 2002).

### 1.3 Fusion von Membranen

Die Fusion von Membranen ist für eine Reihe verschiedenster zellulärer Prozesse erforderlich. Dazu gehört z.B. die Infektion von Zellen durch membranumhüllte Viren, bei der durch die Fusion der viralen Membran mit dem Endosom der Wirtszelle das virale Genom in das Cytosol gelangt. Die Befruchtung der Eizelle durch das Spermium wäre ohne Membranfusion nicht möglich. Auch innerhalb einer Zelle ist die Verschmelzung von Membranen von größter Bedeutung. Die Fusion von membranumhüllten intrazellulären Kompartimenten und Transportvesikeln spielt eine wichtige Rolle beim gerichteten Transport von Proteinen in der Zelle. Als Beispiel sei hier der Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran erwähnt. Ähnliche Membranfusionsmechanismen vermitteln die Freisetzung von Neurotransmittern an den Synapsen von Nervenzellen.

Die Fusion wird durch spezifische Andock- und Fusionsproteine reguliert und koordiniert. Bei der viralen Fusion wird das Andocken und Fusionieren von einem Protein in der Virushülle übernommen, das durch Konformationsänderung die beiden Membranen in engen

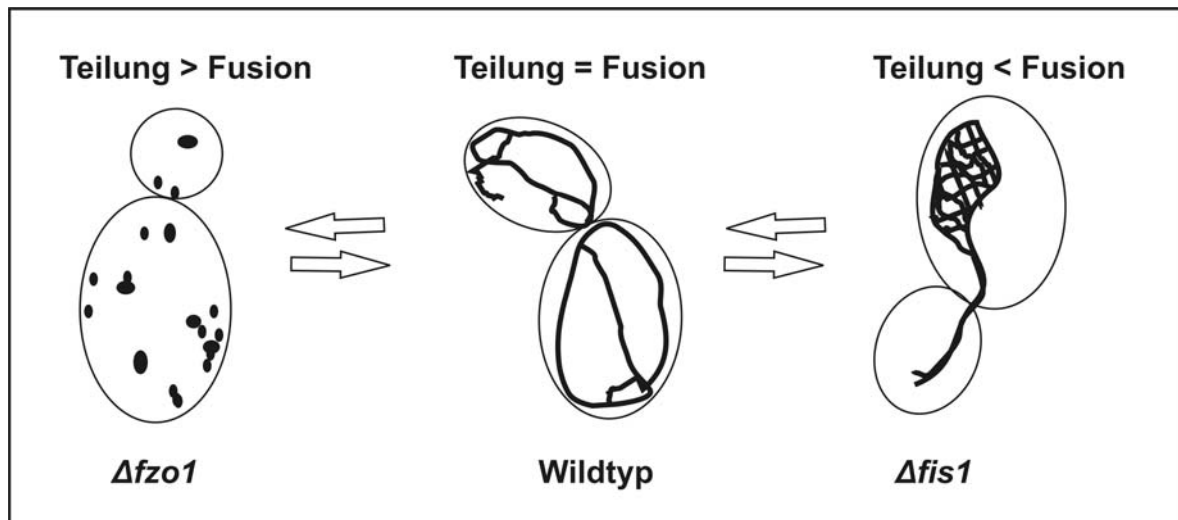
Kontakt bringt und durch Insertion eines Fusionspeptides in die Zielmembran die Fusion ermöglicht. Bei den Fusionsprozessen im sekretorischen Apparat sind Andock- und Fusionsproteine auf beiden Membranen für diese Vorgänge verantwortlich, die sogenannten SNARE-Proteine, welche spezifisch auf den subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Rothman, 1994; Weber *et al.*, 1998). Nur zusammengehörende SNARE-Partner bilden den entsprechenden fusogenen Komplex aus. Charakteristisch für alle SNARE-Komplexe ist die Bildung eines Bündels aus vier parallelen helicalen Strukturen, die von den t-SNAREs (*target membrane* SNARE) und den v-SNAREs (*vesicle* SNARE) beigesteuert werden. Wie bei den viralen Fusionsproteinen spielt auch hier die Konformationsänderung der beteiligten Proteine die entscheidende Rolle bei der anschließenden Fusion (Sutton *et al.*, 1998).

### 1.3.1 Mitochondriale Fusion

Die Fusion von Mitochondrien hat wichtige Funktionen für eine Reihe von zellulären Prozessen (Warren, 1985; Jensen *et al.*, 2000; Osteryoung, 2001; Shaw und Nunnari, 2002; Westermann, 2002). Der oxidative Stoffwechsel der Mitochondrien induziert verstärkt Schäden in der mtDNS und in mitochondrialen Proteinkomplexen. Es wird angenommen, dass dieser Prozess die Zellalterung beschleunigt. Die Fusion der Mitochondrien kann der Zellalterung entgegenwirken, indem sie die Rekombination und Komplementation der mitochondrialen Makromoleküle ermöglicht. Dadurch können Erbgutschäden repariert und die Funktion geschädigter Proteinkomplexe komplementiert werden (Ono *et al.*, 2001). Zudem spielt die Fusion der Mitochondrien bei der Zelldifferenzierung höherer Organismen eine Rolle. Ein eindrucksvolles Beispiel ist die Ausbildung des komplexen mitochondrialen Netzwerks in Herzmuskelzellen während der Differenzierung (David *et al.*, 1981; Smolich, 1995). Dieses Netzwerk ist dafür verantwortlich, den ständig arbeitenden Herzmuskel mit ausreichenden Mengen von ATP zu versorgen.

Die Fusion der mitochondrialen Membranen ist für die Zelle auch deshalb von Bedeutung, da durch das Gleichgewicht von Fusions- und Teilungsvorgängen die Aufrechterhaltung eines tubulären mitochondrialen Netzwerks ermöglicht wird (Abb. 1). Eine verminderte Fusionsaktivität hat eine Fragmentierung der mitochondrialen Tubuli zur Folge. Eine Folge der Fragmentierung des mitochondrialen Retikulums ist der Verlust der mtDNS, da die Vererbung der mtDNS abhängig von der Gestalt der Mitochondrien ist (Nunnari *et al.*, 1997;

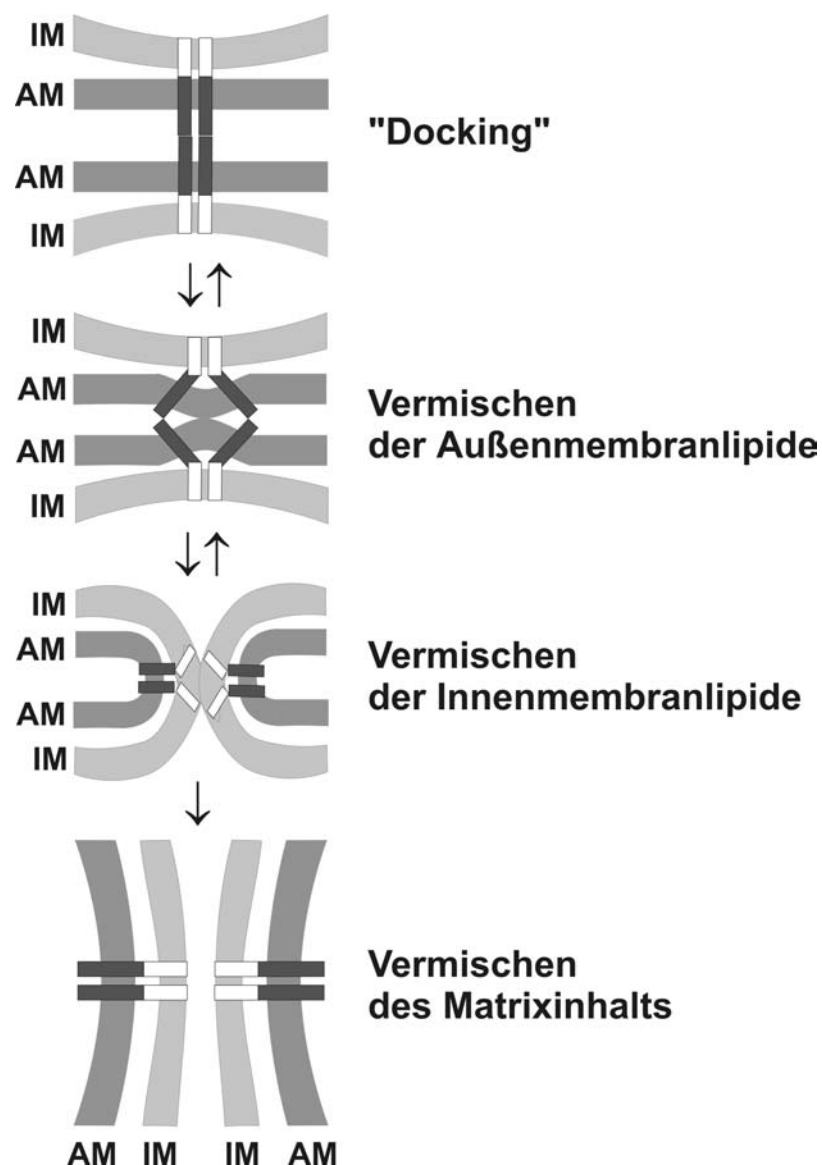
Yaffe, 1997). Der Verlust der mtDNS wiederum bewirkt, dass die Zelle ihre respiratorischen Fähigkeiten verliert.



**Abb. 1: Das mitochondriale Netzwerk wird durch ausbalancierte Fusion- und Teilungsereignisse gebildet**

Während des logarithmischen Wachstums bilden die Mitochondrien in *S. cerevisiae* ein tubuläres, verzweigtes Netzwerk aus. Die Balance zwischen Fusion (kontrolliert durch die GTPase Fzo1) und Teilung (kontrolliert z.B. durch Fis1) sorgt für den Erhalt der Wildtyp-Morphologie (Teilung = Fusion). Überwiegen die Fusionsereignisse über die Teilungsrate, bilden sich netzartige Strukturen aus (Teilung < Fusion). Wird die Teilung der Mitochondrien in den Zellen blockiert (durch Deletion des *FIS1*-Gens), zeigt die Netzbildung an, dass die mitochondriale Fusion weitergeht. Durch eine vermehrte Teilungsrate kommt es zur Fragmentierung der Mitochondrien (Teilung > Fusion). In Zellen mit unveränderter Teilungsrate zeigt diese Fragmentierung der Mitochondrien, dass die Fusion entweder reduziert oder ganz blockiert ist (durch Deletion des *FZO1*-Gens).

Durch die Doppelmembran der Mitochondrien gestaltet sich der Fusionsvorgang wesentlich komplexer als zwischen Organellen mit nur einer umhüllenden Membran, da die Integrität von vier unterschiedlichen Kompartimenten (Außenmembran, Intermembranraum, Innenmembran und Matrix) erhalten bleiben muss. Um ihre Integrität zu erhalten, müssen die Mitochondrien ihre Innenmembranen und ihre Außenmembranen koordiniert und sequentiell fusionieren. Zuerst treten die Außenmembranen miteinander in Kontakt. Nach der Fusion der Außenmembranen kommt es zu einer Verschmelzung der Intermembranräume. Als nächstes fusionieren die Innenmembranen miteinander, wodurch ein einheitlicher Matrixraum entsteht und die Fusion abgeschlossen wird (Abb. 2). Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Fusionsvorgängen im sekretorischen Apparat scheinen an der mitochondrialen Membranfusion keine SNARE-Proteine beteiligt zu sein.



### Abb. 2: Hypothetisches Modell zur mitochondrialen Fusion

Die koordinierte Fusion der Mitochondrien wird vermutlich über einen Mechanismus erreicht, der einen engen Kontakt zwischen Außen- (AM) und Innenmembran (IM) vermittelt. Der erste Schritt der mitochondrialen Membranfusion könnte dem Mechanismus ähneln, der auch für SNARE- oder Hemagglutinin-vermittelte Membranfusion gilt. Zuerst ist ein Andocken der ins Cytosol ragenden Bestandteile der Fusionsmaschine mit dem Partner auf der gegenüberliegenden Membran erforderlich. Die Assemblierung des Fusionskomplexes ist möglicherweise von Konformationsänderungen begleitet, welche die Vermischung der Lipide in den Außenmembranen begünstigen. Die Kopplung der Außenmembran mit der Innenmembran durch den Fusionskomplex in den Kontaktstellen könnte dafür verantwortlich sein, dass die Fusion der Innenmembranen initiiert wird, nachdem die Fusion der Außenmembranen abgeschlossen ist. Dadurch fällt ein Andocken der Innenmembranen weg, da sich die Innenmembranen schon in einer optimalen Position für die Fusion befinden. Zum Schluss beendet die Trennung der fusionierten Innenmembranen und die Vermischung des Matrixinhalts den mitochondrialen Fusionsprozess. Abbildung nach Fritz *et al.* (2001).

### 1.3.2 Fzo und seine Rolle bei der mitochondrialen Membranfusion

Mitochondrien durchlaufen eine stark ausgeprägte Gestaltveränderung während der Spermienentwicklung. In frühen Spermatiden der Taufliege *Drosophila melanogaster* aggregieren die Mitochondrien neben dem Zellkern und fusionieren zu zwei riesigen Organellen, welche sich umeinander wickeln und eine große kugelförmige Struktur, den sogenannten Nebenkern, ausbilden. Dieses Stadium der Spermatidentwicklung wird auch „onion stage“ genannt, weil der Nebenkern in elektronenmikroskopischen Aufnahmen aussieht wie eine Zwiebelscheibe. Während der weiteren Entwicklung strecken sich die beiden Riesenmitochondrien entlang des Flagellums aus, um ausreichend Energie für die Bewegung des reifen Spermiums bereitstellen zu können (Fuller, 1998). Die erste bekannte Komponente der mitochondrialen Membranfusionsmaschine, das Fzo-Protein, wurde durch molekulare und genetische Analysen von Mutanten gefunden, die Defekte in der Nebenkernbildung aufweisen. Frühe Spermatiden dieser *fzo*-Mutanten (*fuzzy onions*) zeigen einen fehlgebildeten Nebenkern aus vielen kleinen Mitochondrien, welche sich umeinander wickeln und eine Struktur ausbilden, die an „fuzzy onions“ erinnert. Die Blockierung der mitochondrialen Fusion während der Nebenkernbildung in *fzo*-Mutanten führt zur Sterilität der Männchen (Hales und Fuller, 1997).

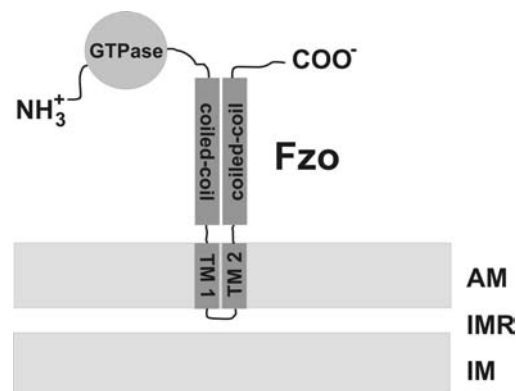
Fzo und seine später entdeckten Homologe, die auch Mitofusine genannt werden, bilden eine Proteinfamilie von großen GTPasen, welche in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert sind (Hales und Fuller, 1997). Sie sind sowohl im Pilz- als auch im Tierreich konserviert. Homologe von Fzo wurden in der Hefe *S. cerevisiae* und in humanen Zellen funktionell charakterisiert. Bis jetzt uncharakterisierte Gene, welche für verwandte Proteine kodieren, kann man auch in den Genomen von *Caenorhabditis elegans*, *Fugu rubripes*, *Neurospora crassa* und *Schizosaccharomyces pombe* finden.

In Hefe ist Fzo gleichmäßig über die Mitochondrien verteilt, und die Expression ist unabhängig vom Zellzyklus (Hermann *et al.*, 1998). Pro Hefezelle ist etwa alle zwei Minuten ein Fusionsereignis zu beobachten (Nunnari *et al.*, 1997). Höhere Metazoen wie Insekten, Fische oder Säuger haben jeweils zwei *fzo*-verwandte Gene. Beide humanen Isoformen, Mfn1 und Mfn2, werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wie z.B. Gehirn, Fibroblasten, Herz, Niere, Leber, Muskel und Testis (Rojo *et al.*, 2002). Die Expression der beiden Isoformen in *D. melanogaster* (*dmfn* und *fzo*) hingegen ist unterschiedlich reguliert. *Dmfn*



wird während verschiedener Stadien der Embryogenese exprimiert und ist nicht geschlechtsspezifisch (Hwa *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wird das *fzo*-Gen nur während des frühen Stadiums der Spermienentwicklung exprimiert. Das *fzo*-Genprodukt zeigt also eine sehr spezifische Funktion während der Spermienentwicklung, wohingegen das Produkt des *dmfn*-Gens möglicherweise eine eher generelle Rolle bei der Kontrolle der mitochondrialen Morphologie spielt.

Durch Untersuchungen an Deletionsmutanten in *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Fzo1 eine Schlüsselrolle bei der mitochondrialen Fusion zukommt. Hefemutanten ohne *FZO1*-Gen weisen fragmentierte Mitochondrien auf, da die Teilung unvermindert stattfindet, ohne durch Fusionsvorgänge ausbalanciert zu werden. Eine Folge der Fragmentierung ist der Verlust der mitochondrialen DNS und daraus resultierend ein atmungsdefizienter Wachstumsphänotyp (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Wenn in *fzo1*-Mutanten gleichzeitig das *DNMI*-Gen deletiert wird, welches für eine Schlüsselkomponente der mitochondrialen Teilungsmaschine kodiert, kann die Fragmentierung und der daraus folgende Verlust der mtDNS verhindert werden (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Das Gleichgewicht zwischen Fusions- und Teilungsereignissen scheint also notwendig zu sein, um das mitochondriale Netzwerk auszubilden.



### Abb. 3: Domänenstruktur und Topologie von Fzo-Proteinen

Dargestellt ist eine von vielen denkbaren Interaktionsmöglichkeiten der coiled-coil Domänen des Fzo, die mit den Ergebnissen von Rojo *et al.* (2002) korrelieren. Für diese Möglichkeit spricht, dass ein lösliches N-terminales Fragment von Mfn2 (ohne Transmembrandomäne) mitochondrial lokalisiert ist, wenn gleichzeitig ein C-terminales Fragment mit Transmembrandomäne von Mfn2 exprimiert wird. Zudem sind in diesem Fall die Mitochondrien in der Lage, sich aneinander zu lagern (Rojo *et al.*, 2002). Es ist aber durchaus möglich, dass auch andere Domänen des Fzo und auch andere Proteine an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). AM: mitochondriale Außenmembran; IM: mitochondriale Innenmembran; IMR: Intermembranraum; TM: Transmembrandomäne; Abbildung nach Westermann (2003).

Alle Fzo-Familienmitglieder haben eine ähnliche Domänenstruktur und Topologie (Abb. 3). Fzo-Proteine sind integrale Außenmembranproteine. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus ragen ins Cytosol (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2001; Rojo *et al.*, 2002). Der N-Terminus enthält eine konservierte GTPase-Domäne. Nahe dem C-Terminus liegen die zwei Transmembransegmente, welche durch ein kurzes Zwischensegment aus vielen positiv geladenen Aminosäureresten getrennt sind. Es wurde gezeigt, dass *S. cerevisiae* Fzo1 an Stellen lokalisiert ist, an denen Innen- und Außenmembran in sehr engen Kontakt miteinander treten (Hermann *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2001). Verantwortlich für diesen Kontakt mit der Innenmembran, entweder direkt oder über Interaktionspartner, ist das Intermembranraumsegment von Fzo1 (Fritz *et al.*, 2001). Auf beiden Seiten der Transmembransegmente sind Domänen zu finden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit coiled-coil-Strukturen ausbilden. Solche Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen entweder zwischen verschiedenen Proteinen oder innerhalb eines Proteins. Coiled-coils bestehen aus zwei oder mehr  $\alpha$ -Helices, die umeinander gewunden sind und eine linksdrehende Supercoil-Struktur bilden. Die Interaktionsfläche der coiled-coils-Regionen ist sehr einfach strukturiert, besitzt aber dennoch die Fähigkeit, höchst spezifische Wechselwirkungen einzugehen. Die Homologe in *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *D. melanogaster* und *C. elegans* besitzen am N-Terminus vor der GTPase-Domäne zusätzlich eine dritte vorhergesagte coiled-coil-Domäne. Durch diese coiled-coil-Motive kann entweder eine Interaktion des Fzo1 mit anderen Proteinen oder auch zwischen zwei Fzo1-Molekülen vermittelt werden. Ebenso ist eine Interaktion innerhalb eines Fzo1-Moleküls denkbar. Für das Hefe Fzo1 wurde gezeigt, dass es in einem hochmolekularen Komplex von ca. 800 kD assembliert (Rapaport *et al.*, 1998).

Durch Koimmunfällungsexperimente in Hefe konnte gezeigt werden, dass Fzo1 mit Mgm1 und Ugo1 interagiert (Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Mgm1 ist eine dynaminähnliche GTPase, die im Intermembranraum lokalisiert ist und sowohl mit der Außen- als auch mit der Innenmembran assoziiert sein kann (Herlan *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Ugo1 ist in der Außenmembran lokalisiert. Ein Verlust des Proteins führt ebenfalls zu fragmentierten Mitochondrien. Bisher wurden Homologe von Ugo1 nur in Hefen gefunden (Sesaki und Jensen, 2001). Dieser Fzo1-Mgm1-Ugo1-Komplex ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Fusionsvorgänge der Außen- und Innenmembran miteinander gekoppelt sind. Möglicherweise ist er für den Kontakt des Fzo1-Komplexes mit der Innenmembran verantwortlich, der durch biochemische Studien nachgewiesen wurde (Fritz *et al.*, 2001).

## 1.4 Mitochondriale Teilungsvorgänge

Da Mitochondrien nicht *de novo* entstehen können, müssen sie für die Vererbung auf die Tochterzellen durch Teilung vermehrt werden. Darüber hinaus ist eine verstärkte Teilungsaktivität und Fragmentierung der Mitochondrien eine Voraussetzung für die Apoptose, bei der morphologisch und funktionell unterschiedliche Organellen benötigt werden, die entweder Apoptose-fördernde Proteine freisetzen oder weiterhin ATP produzieren, welches für die Apoptose gebraucht wird (Frank *et al.*, 2001). Es wurde auch eine Korrelation der Teilungsaktivität der Mitochondrien mit der Zelldifferenzierung bei *Xenopus laevis* Oozyten beobachtet (Schnapp, 1997).

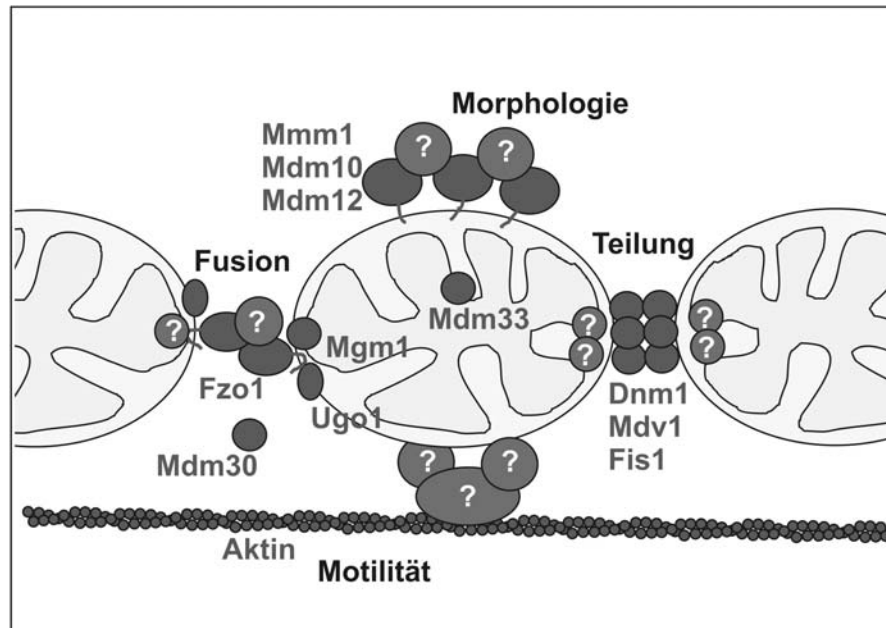
Die Teilung der mitochondrialen Außenmembran wird in Pilzen und tierischen Zellen durch die dynaminähnliche GTPase Dnm1 (Hefe) bzw. Drp1 (höhere Eukaryoten) vermittelt (Otsuga *et al.*, 1998; Smirnowa *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999; Labrousse *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999). In Hefe wurden zwei weitere für die Teilung verantwortliche Proteine identifiziert, Mdv1 und Fis1. Mdv1 (*mitochondrial division*) ist ein cytosolisches Protein mit coiled-coil-Motiven am N-Terminus und WD-40 „repeats“ (Tryptophan- und Aspartat-reiche Domänen) am C-Terminus. Es wurde gezeigt, dass der N-Terminus mit Fis1 interagiert, wohingegen der C-Terminus sowohl Dnm1 als auch Fis1 binden kann (Cervený und Jensen, 2003). *In vivo* kolokalisiert Mdv1 mit Dnm1 in punktförmigen Strukturen an Stellen, an denen die Teilung initiiert wird (Fekkes *et al.*, 2000; Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Fis1 (*mitochondrial fission*) ist ein kleines integrales Protein der mitochondrialen Außenmembran, welches gleichmäßig auf der Mitochondrienoberfläche verteilt ist. Fis1 ist für die Assemblierung eines funktionsfähigen Teilungsapparates erforderlich (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000).

In *C. elegans* wurde gezeigt, dass die Teilungsfähigkeit der Innenmembran nicht verloren geht, wenn der Teilungsapparat der Außenmembran funktionsunfähig ist (Labrousse *et al.*, 1999). Es existieren also zwei unabhängig voneinander agierende Teilungsmechanismen für die Innen- und Außenmembran. Eine vermehrte Teilungsrate der Innenmembran ist häufig in Zelltypen mit sich schnell teilenden Mitochondrien zu beobachten, so zum Beispiel in Fettzellen von metamorphierenden Schmetterlingen (Larsen, 1970). Die Matrix wird dabei durch Septen der Innenmembran aufgeteilt, wobei sich die Außenmembran erst in einem späteren Schritt teilt. Diese Septenbildung ist sehr häufig in Herzmuskelgewebe zu

beobachten und kann bei Ratten durch eine spezielle riboflavinarme Diät ausgelöst werden (Tandler *et al.*, 1969; Tandler und Hoppel, 1972). Die einzige bisher bekannte Komponente, für die eine Rolle bei der Teilung der Innenmembran vorgeschlagen wurde, ist das Mdm33, welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde (Messerschmitt *et al.*, 2003). In Abb. 4 sind einige der bekannten Komponenten der mitochondrialen Morphogenese in *S. cerevisiae* dargestellt.

Protein	Phänotyp der Mutante	Zelluläre Lokalisation	Protein-Eigenschaften	Referenz
<b>Fzo1</b>	Fragmentierte Mitochondrien; Fusionsdefekt	Mitochondriale Außenmembran	GTPase; Transmembranprotein	(Hermann <i>et al.</i> , 1998; Rapaport <i>et al.</i> , 1998; Sesaki und Jensen, 1999)
<b>Ugo1</b>	Fragmentierte Mitochondrien; Fusionsdefekt	Mitochondriale Außenmembran	Transmembranprotein	(Sesaki und Jensen, 2001)
<b>Mgm1</b>	Fragmentierte und aggregierte Mitochondrien; Fusionsdefekt	Mitochondrialer Intermembranraum, assoziiert mit der Innenmembran	dynaminähnliche GTPase	(Jones und Fangman, 1992; Guan <i>et al.</i> , 1993; Shepard und Yaffe, 1999; Wong <i>et al.</i> , 2000; Herlan <i>et al.</i> , 2003; Sesaki <i>et al.</i> , 2003)
<b>Dnm1</b>	Netzartige Mitochondrien; Teilungsdefekt	Cytosol und Mitochondrien	dynaminähnliche GTPase	(Bleazard <i>et al.</i> , 1999; Otsuga <i>et al.</i> , 1998; Sesaki und Jensen, 1999)
<b>Mdv1</b>	Netzartige Mitochondrien; Teilungsdefekt	Cytosol und Mitochondrien	WD-40 repeats (Tryptophan- und Aspartat-reiche Domänen)	(Fekkes <i>et al.</i> , 2000; Mozdy <i>et al.</i> , 2000; Tieu und Nunnari, 2000)
<b>Fis1</b>	Netzartige Mitochondrien; Teilungsdefekt	Mitochondriale Außenmembran	Transmembranprotein	(Mozdy <i>et al.</i> , 2000; Tieu und Nunnari, 2000)
<b>Mmm1</b>	Riesenmitochondrien; Vererbungsdefekt	Mitochondriale Außenmembran	Transmembranprotein	(Burgess <i>et al.</i> , 1994; Aiken Hobbs <i>et al.</i> , 2001)
<b>Mdm10</b>	Riesenmitochondrien; Vererbungsdefekt	Mitochondriale Außenmembran	Transmembranprotein	(Sogo und Yaffe, 1994)
<b>Mdm12</b>	Riesenmitochondrien; Vererbungsdefekt	Mitochondriale Außenmembran	Transmembranprotein	(Berger <i>et al.</i> , 1997)
<b>Mdm30</b>	Fragmentierte Mitochondrien; Fusionsdefekt	Cytosol und Mitochondrien	F-Box-Protein	(Dimmer <i>et al.</i> , 2002; Fritz <i>et al.</i> , 2003)
<b>Mdm31</b>	Riesenmitochondrien	Mitochondriale Innenmembran	Transmembranprotein	(Dimmer <i>et al.</i> , 2002)
<b>Mdm32</b>	Riesenmitochondrien	Mitochondriale Innenmembran	Transmembranprotein	(Dimmer <i>et al.</i> , 2002)
<b>Mdm33</b>	Ring- und kugelförmige Mitochondrien	Mitochondriale Innenmembran	Transmembranprotein	(Dimmer <i>et al.</i> , 2002; Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003)
<b>Mdm34</b>	Riesenmitochondrien	?		(Dimmer <i>et al.</i> , 2002)
<b>Mdm35</b>	Riesenmitochondrien	?		(Dimmer <i>et al.</i> , 2002)
<b>Mdm36</b>	Aggregierte Mitochondrien	?		(Dimmer <i>et al.</i> , 2002)
<b>Pcp1</b>	Fragmentierte, aggregierte Mitochondrien	Mitochondriale Innenmembran	Transmembranprotein; Protease	(Dimmer <i>et al.</i> , 2002; Esser <i>et al.</i> , 2002; Herlan <i>et al.</i> , 2003; McQuibban <i>et al.</i> , 2003)
<b>Mdm38</b>	Große Mitochondrien mit wenigen Verzweigungen	Mitochondriale Innenmembran	wahrscheinlich Transmembranprotein	(Dimmer <i>et al.</i> , 2002)
<b>Mdm39</b>	Fragmentierte Mitochondrien	?	wahrscheinlich Transmembranprotein	(Dimmer <i>et al.</i> , 2002)

**Tabelle 2: An der mitochondrialen Dynamik beteiligte Hefe-Proteine**



**Abb. 4: Die molekulare Maschinerie der mitochondrialen Morphogenese in *S. cerevisiae***  
 Eingezeichnet sind sowohl die bekannten Proteine, die für den jeweiligen Prozess verantwortlich sind, als auch noch zu erwartende Faktoren (durch Fragezeichen gekennzeichnet) (Abbildung nach B. Westermann, unveröffentlicht).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war ein vertieftes Verständnis der molekularen Grundlagen der mitochondrialen Morphogenese. Dabei sollten einerseits neue daran beteiligte Proteine identifiziert werden, andererseits sollte eine schon länger bekannte Komponente, das Fzo1-Protein, funktionell untersucht werden.

### 1.5.1 Identifizierung von Hefemutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie

Es sind bisher nur wenige Proteine bekannt, die direkt oder indirekt an der Formgebung von Mitochondrien beteiligt sind. Um die molekularen Mechanismen des Transports und der Erhaltung der Gestalt von Mitochondrien aufzuklären, wird eine umfassende Kenntnis der beteiligten Proteine benötigt.

*S. cerevisiae* ist für diese Untersuchungen ein besonders guter Modellorganismus. Da die vollständige Genomsequenz bereits seit 1996 bekannt ist, lassen sich genetische

Manipulationen leicht durchführen. Der Organismus lässt sich leicht kultivieren, und die grundlegenden zellulären Prozesse sind mit denen höherer eukaryotischer Organismen oft direkt vergleichbar. Mutationen in Genen, die für die Funktion der Mitochondrien wichtig sind, sind meist nicht letal, da *S. cerevisiae* ein fakultativ anaerober Organismus ist und bei Bedarf seine Energie durch Fermentation decken kann. Man kann also leicht durch Gendisruption Mutanten erhalten, die sich funktionell untersuchen lassen. Zudem ist für Hefe eine große Anzahl an biochemischen Methoden für mechanistische Studien etabliert. Die Verwendung von GFP (grün fluoreszierendes Protein) ermöglicht die mikroskopische Analyse von Mitochondrien in lebenden Zellen (Westermann und Neupert, 2000).

Um neue Komponenten der mitochondrialen Morphogenese zu identifizieren, wurde eine Hefestammsammlung durchmustert, die Deletionsmutanten aller nicht-essentiellen Gene enthält (Winzeler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002). Dabei wurde nach Zellen gesucht, deren mitochondrialer Phänotyp von dem des Wildtyps klar abwich. Einige der neu gefundenen Mutanten sollten anschließend funktionell untersucht werden. Die Charakterisierung eines dieser neuen Proteine, Mdm33, war ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

### **1.5.2 Reinigung und Charakterisierung des Fzo1-Komplexes aus *N. crassa***

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen Charakterisierung des Fzo1-Komplexes und seiner möglichen Interaktionspartner. Dazu sollte ein Verfahren zur Aufreinigung des Komplexes in größeren Mengen etabliert werden. Wenn solch ein Verfahren zur Verfügung steht, können z. B. mitgereinigte Partnerproteine identifiziert werden, die Struktur des Komplexes kann elektronenmikroskopisch analysiert werden, und der Komplex kann in Liposomen rekonstituiert werden, um seine Fusionsaktivität zu untersuchen. Für diese Arbeiten wurde der rote Brotschimmelpilz *N. crassa* als Modellorganismus gewählt. Dieser filamentöse Pilz ist durch sein schnelles Wachstum für biochemische Arbeiten besonders gut geeignet, da sich große Mengen an Biomasse in einem kurzen Zeitraum gewinnen lassen.

## 2 Material und Methoden

Die Zusammensetzung von Puffern und Medien, die nicht mit den jeweiligen Methoden beschrieben wurden, ist in Kapitel 2.6 zu finden. Die Hersteller der verwendeten Chemikalien sind in Kapitel 2.7 aufgelistet.

### 2.1 Molekularbiologische Methoden (Sambrook *et al.*, 1989)

#### 2.1.1 Präparation von DNS

##### 2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNS aus *E. coli* erfolgte nach alkalischer Lyse der Zellen (Birnboim und Doly, 1979) durch Ethanolfällung, gegebenenfalls mit anschließender Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie.

##### *Schnellpräparation in kleinem Maßstab (Minipräp)*

Zur raschen Isolierung von Plasmid-DNS wurden Zellen aus 1,5 ml einer über Nacht in LB-Amp-Medium gewachsenen Kultur in einer Tischzentrifuge (30 sec; 15.000×g) sedimentiert und in 300 µl E1 resuspendiert. Um störende RNS zu entfernen, wurde dem Puffer E1 RNase A zugesetzt. Durch Zugabe von 300 µl E2 und sanftem Mischen wurden die Zellen lysiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit 300 µl E3 neutralisiert und 10 min bei 15.000×g zentrifugiert. Anschließend wurde die DNS aus dem Überstand durch Fällung gereinigt. Dazu wurde der Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol (100%ig) versetzt und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und 15.000×g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das DNS-Pellet mit 0,5 ml einer 70%igen (v/v) Ethanollösung gewaschen.

##### *Plasmid Präparation in großem Maßstab*

Die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNS erfolgte mit Hilfe des „Jetstar“ Kits (Genomed). Die Bakterien aus 50 ml einer über Nacht in LB-Amp-Medium gewachsenen Kultur wurden durch Zentrifugation geerntet (3.000×g; 5 min; RT) und in 4 ml Lösung E1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert, das Zelllysate durch Zugabe von 4 ml Lösung E3 neutralisiert und 10 min bei 15.000×g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand auf

eine Anionenaustauschersäule geladen, die zuvor mit 10 ml Lösung E4 äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 20 ml Lösung E5 gewaschen, und das Plasmid wurde mit 5 ml Lösung E6 eluiert. Die DNS wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und Zentrifugation (15.000×g; 30 min; 4°C) aus dem Eluat gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 µl TE-Puffer resuspendiert.

### 2.1.1.2 Isolierung von genomischer DNS aus *S. cerevisiae*

Um genomische DNS aus *S. cerevisiae* zu gewinnen, wurden die Zellen über Nacht bei 30°C in YPD-Medium inkubiert. Etwa 40 ml dieser Kultur wurden zentrifugiert (5.000×g; 5 min; RT), und die Zellen wurden in 3 ml 0,9 M Sorbitollösung mit 0,1 M EDTA (pH 7,5) resuspendiert. Zur Gewinnung von Sphäroplasten wurde Zymolyase (Endkonzentration von 300 µg/ml) zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Sphäroplasten wurden nach einem Zentrifugationsschritt (5.000×g; 5 min) in 5 ml Trispuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 20 mM EDTA) resuspendiert und mit 1% (m/v) SDS versetzt. Nach Inkubation bei 65°C für 30 min wurden 1,5 ml einer 5 M Kaliumacetatlösung zugegeben und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (12.000×g; 10 min) wurde der Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und das doppelte Volumen an absolutem Ethanol zugegeben. Das Gemisch wurde für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (5.000×g) und der Überstand verworfen. Nach Trocknen und Resuspendieren des Pellets in 3 ml TE-Puffer erfolgte erneut eine Zentrifugation (12.000×g; 15 min), und dem Überstand wurden 150 µl einer 1 mg/ml RNase-A-Lösung in 50 mM Kaliumacetat (pH 5,5) zugegeben. Dasselbe Volumen von 100% Isopropanol wurde nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min zugegeben und vorsichtig gemischt. Die DNS war nun als ein Gespinst von Fasern in der Lösung ausgefallen, welches herausgefischt und an der Luft getrocknet wurde. Das Präzipitat wurde in 0,5 ml TE-Puffer gelöst.

### 2.1.1.3 Isolierung von genomischer DNS aus *N. crassa*

Genomische DNS aus *N. crassa* wurde weitgehend wie bei Lee *et al.* (1988) beschrieben isoliert. 0,5 - 1 g Hyphen wurden aus einer Übernachtskultur geerntet und in einen Mörser überführt. Durch Übergießen der Hyphen mit flüssigem Stickstoff wurden diese schockgefroren und konnten so mit einem Pistill zu einem groben Pulver verrieben werden. Dieses Pulver wurde in ein Eppendorfgesäß überführt und mit 750 µl Lysepuffer [50 mM



Tris/HCl, pH 8; 50 mM EDTA; 3% (m/v) SDS; 1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol] 1 Stunde bei 65°C erhitzt. Zur Abtrennung der Proteine wurde der Ansatz zunächst mit 700  $\mu$ l Chloroform/Phenol (1:1) versetzt, und anschließend wurde die wässrige Phase nochmals mit 700  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNS wurde durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens an Isopropanol ausgefällt. Nach kurzer Zentrifugation wurde die DNS in 300  $\mu$ l TE-Puffer, dem 0,1 mg/ml RNase A zugesetzt worden war, resuspendiert und 10 min bei 65°C inkubiert. Zur weiteren Reinigung wurde die DNS nochmals durch Zugabe von 30  $\mu$ l 3 M Natriumacetat und 600  $\mu$ l Ethanol ausgefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen. 5 - 10  $\mu$ l dieser Lösung waren in der Regel für einen Testverdau der DNS ausreichend.

### 2.1.1.4 Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNS-Fragmente wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit hitzebeständigen DNS-Polymerasen in einem programmierbaren Thermostaten vervielfältigt (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988). Bei der PCR wird durch den wiederholten Ablauf von Strangtrennung, Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNS-Synthese mit hitzestabiler DNS-Polymerase eine exponentielle Synthese von DNS-Molekülen aus Desoxynukleosidtriphosphaten erreicht. In einem Ansatz von 100  $\mu$ l waren folgende Reagenzien enthalten: 1 - 4 U DNS-Polymerase, 10  $\mu$ l 10 $\times$  PCR-Puffer, 2  $\mu$ l dNTPs (je 10 mM), je 50 pmol der entsprechenden Primer und etwa 200 ng Plasmid-DNS bzw. 1  $\mu$ g genomische DNS als Matrize. Zur Synthese von DNS-Fragmenten für analytische Zwecke wurde *Taq*-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*), für Klonierungen *Pfu*-Polymerase (aus *Pyranococcus furiosus*) verwendet. Das amplifizierte DNS-Fragment wurde mittels Gelelektrophorese analysiert. Für weitere Klonierungsschritte wurden die Ansätze mit Hilfe des PCR-Reinigungskits der Firma Qiagen durch Anionenaustauschchromatographie nach Angaben des Herstellers gereinigt, um Salze und Primerdimere abzutrennen.

### 2.1.2 Klonierung von DNS-Fragmenten

#### 2.1.2.1 Restriktionsverdau von DNS

DNS wurde mit 2 - 5 U der entsprechenden Restriktionsenzyme (Gibco-Lifetechnology, New England Biolabs, Boehringer Mannheim) pro  $\mu$ g der eingesetzten DNS in den vom Hersteller

empfohlenen Pufferlösungen inkubiert. Dabei wurde die DNS bei 37°C 1 - 3 Stunden verdaut. Die geschnittene DNS wurde zur Analyse oder weiteren Aufreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### 2.1.2.2 Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten

Mit der Alkalischen Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, CIP) wurden gleiche sowie glatte („*blunt ends*“) Enden der Vektor-DNS vor Ligationsreaktionen dephosphoryliert, um eine Religation der geschnittenen Vektor-DNS zu verhindern. Es wurden 10 µg DNS in 50 µl CIP-Puffer (vom jeweiligen Hersteller) mit 1 U Enzym für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Bei glatten Enden erfolgte die zweite Inkubation bei 56°C. Die Reaktion wurde mit 17 µl TE-Puffer, 2,5 µl 10% (m/v) SDS, 5 µl 1 M NaCl und 0,5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Nach Inaktivierung durch eine Inkubation für 20 min bei 75°C wurden die dephosphorylierten Vektoren nach Herstellerangabe mit Qiaquick<sup>®</sup>-Säulen von Qiagen isoliert.

#### 2.1.2.3 Ligation von DNS-Fragmenten durch T4-DNS-Ligase

Um zwei DNS-Fragmente mit Hilfe der T4-DNS-Ligase zu verknüpfen, wurden 50 - 200 ng DNS des linearisierten Vektors mit einem 2 – 5-fachen molaren Überschuss der DNS des Inserts mit 10× Ligationspuffer und mindestens 1 U der T4-DNS-Ligase versetzt. Der Ansatz wurde mit sterilem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

#### 2.1.2.4 TA-Klonierung von PCR-Produkten

Bei schwierigen Klonierungen oder bei geringer PCR-Effizienz war es vorteilhaft, das PCR-Produkt ohne Restriktionsverdau direkt in die kommerziell erhältlichen, linearisierten Vektoren pCRII-TOPO (Invitrogen) oder pGEM-T (Promega) zu klonieren. Vor allem die geringe Aktivität einiger Restriktionsenzyme an Enden von durch PCR erzeugten DNS-Fragmenten führte zu unvollständigen Restriktionsverdaus, welche die Klonierungseffizienz drastisch reduzieren können. Die oben genannten Vektoren besitzen an den 3'-Enden ungepaarte Thymidinnukleotide. Durch *Taq*-Polymerase erzeugte DNS-Fragmente tragen an den 5'-Enden häufig überhängende Adeninnukleotide und können deshalb direkt in diese

Plasmide eingesetzt werden. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. Bei durch *Pfu*-Polymerase erzeugten PCR-Fragmenten wurden an die 5'-Enden zusätzlich Adeninnukleotide durch eine Nachbehandlung mit 1 U *Taq*-Polymerase für 10 bis 30 min bei 72°C angehängt.

#### **2.1.2.5 Präparation von transformationskompetenten *E. coli* Zellen**

*E. coli*-Zellen wurden in LB-Medium bei 37°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>578</sub> etwa 0,5) kultiviert und anschließend 30 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4400×g; 5 min; 2°C) geerntet und das Zellsediment im Kühlraum mit 500 ml, 250 ml und schließlich mit 50 ml kaltem 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen. Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden in 500 µl 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.1.2.6 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation**

1 µl Ligationsansatz oder 1 ng Plasmid-DNS wurden mit 40 µl auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* Zellen gemischt. Die Bakteriensuspension wurde in eine vorgekühlte Transformationsküvette überführt und in einem Elektroporationsgerät transformiert (2,5 kV; 400 Ω; 25 µF; Zeitkonstante 8 - 9 ms). Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml SOC-Medium gemischt und 30 - 60 min bei 37°C geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden durch Zentrifugation isoliert, in 100 µl SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C über Nacht inkubiert.

### **2.1.3 Reinigung und Analyse von DNS**

#### **2.1.3.1 Gelelektrophorese von DNS**

DNS-Fragmente wurden je nach Größe der Fragmente in 0,8 - 2%igen Agarosegelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurden die Proben mit DNS-Auftragspuffer [4% (m/v) Saccharose; 0,025% (m/v) Bromphenolblau; 2 mM EDTA, pH 8] gemischt und anschließend in die Auftragstaschen des Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte in 1× TAE-Puffer [4,8 g/l Tris; 1,15% (v/v) Eisessig; 1 mM EDTA, pH 8] bei einer Feldstärke von bis zu 13 V/cm. Um die DNS unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde der Agaroselösung vor dem Gelieren Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt.

### **2.1.3.2 Isolierung von DNS aus Agarosegelen**

Durch Restriktionsverdau entstandene DNS-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt, und die entsprechende DNS-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNS aus der Agarose erfolgte anschließend mit Hilfe des Gelextraktionskits der Firma Qiagen durch Anionenaustauschchromatographie nach Angaben des Herstellers.

### **2.1.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNS**

Die Konzentration von DNS wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNS, 33  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNS, 40  $\mu\text{g/ml}$  RNS oder 20  $\mu\text{g/ml}$  Oligonukleotide (linearer Bereich: 0,1 - 1  $OD_{260}$ ). Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der Präparation. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### **2.1.3.4 Nachweis spezifischer DNS-Fragmente mittels Hybridisierungssonden (Southern Blot)**

#### **2.1.3.4.1 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter DNS auf Nylonmembran**

Zum Nachweis spezifischer DNS-Fragmente in einem komplexen DNS-Gemisch wurde das Verfahren nach Southern (1975) verwendet. Genomische DNS wurde durch geeignete Restriktionsenzyme verdaut und das entstandene Fragmentgemisch auf einem Agarosegel aufgetrennt. Zum Transfer dieser Fragmente auf Nylonmembran wurde das Gel zunächst 10 min in 0,25% (v/v) Salzsäure und anschließend zweimal je 20 min in 1,5 M NaCl und 0,5 M Natronlauge inkubiert. Nach Neutralisation mit 1,5 M NaCl, 1 M Tris, pH 8,0 (zweimal 20 min) wurde das Agarosegel auf ein feuchtes Whatman Papier gelegt, das Verbindung zu einer  $2 \times \text{SSC}$ -Pufferlösung hatte. Auf das Gel wurden eine Nylonmembran und ein Stapel Papierhandtücher geschichtet, und diese wurden für 16 - 20 h mit einem Gewicht beschwert. Dabei wurde der Puffer durch Kapillarkräfte durch das Gel in die trockenen Papierhandtücher gesaugt und dabei die DNS aus dem Gel herausgelöst. Diese wurde durch elektrostatische Wechselwirkung an die Nylonmembran gebunden. Durch Erhitzen der Nylonmembran (2 h;  $80^\circ\text{C}$ ) wurde die DNS darauf fixiert. Der Nachweis der Fragmente erfolgte anschließend durch DNS-Hybridisierung.

#### 2.1.3.4.2 Gewinnung einer digoxigeninmarkierten DNS-Sonde

Die Hybridisierungsonde wurde durch Polymerasekettenreaktion in Gegenwart digoxigeningekoppelten dUTPs mit Hilfe des „*PCR-DIG-Probe-Synthesis*“ Kits der Firma Roche gewonnen. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 100 µl des PCR Ansatzes in 50 ml Hybridisierungspuffer [7% (m/v) SDS; 50% (v/v) Formamid; 5 × SSC; 2% (m/v) Blockreagenz der Firma; 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0; 0,1% (m/v) N-Lauroylsarcosin] verdünnt, anschließend 10 min auf 95°C erhitzt, um die Doppelstränge der DNS zu denaturieren, und dann schnell auf Eis abgekühlt, um die DNS-Einzelstränge zu erhalten.

#### 2.1.3.4.3 Nachweis von Genfragmenten durch DNS-Hybridisierung

Die Analyse der auf einer Nylonmembran fixierten DNS erfolgte mit Hilfe des „*Dig-Luminescent-Detection*“ Kits der Firma Roche. Zunächst wurde die Membran 2 h bei 39°C in Hybridisierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht mit Hilfe einer digoxigeninmarkierten Sonde ebenfalls bei 39°C. Anschließend wurde zweimal mit 2 × Waschpuffer [2 × SSC; 0,1% (m/v) SDS] bei Raumtemperatur und zweimal bei 68°C mit 0,5 × Waschpuffer gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Sonde wurde die Membran zunächst 30 min in Blockpuffer [1% (m/v) Blockreagenz der Firma Roche; 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl, pH 7,5] abgesättigt und weitere 30 min mit einer Anti-Digoxigeninlösung ( $\alpha$ -Digoxigenin 1:10.000 in Blockpuffer) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Membran mit CSPD<sup>R</sup>-*detection*-Puffer benetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Durch eine Chemolumineszenz-Reaktion konnten mit Digoxigenin markierte Banden auf einen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

### 2.1.4 Klonierungen

#### 2.1.4.1 Plasmide und *E. coli*-Stämme

Für die Transkription und Translation mitochondrialer Vorstufenproteine *in vitro* wurden Plasmide der pGEM Reihe (Promega) verwendet, in welche die betreffende cDNS unter

Kontrolle des SP6-Promotors kloniert war. Die Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm XL1-Blue transformiert.

Die Expression von Proteinen in *E. coli* erfolgte mit Hilfe der Vektoren pQE70 (Qiagen) und pGEX-4T (Invitrogen), die eine Klonierung der Gene unter Kontrolle des Lac-Promotors ermöglichten. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropylthiogalaktosid (IPTG) in die *E. coli* Kultur induziert. Durch Klonierung der entsprechenden Gene in den Vektor pQE70 wurde Proteinen eine C-terminale Hexahistidinsequenz (*His<sub>6</sub>-Tag*) angehängt. Zur Expression eines Fusionsproteins aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und dem gewünschten Protein wurde der Vektor pGEX-4T verwendet. Dadurch konnte das Protein nach der Expression mit Hilfe einer Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden.

Die Transformation von Expressionsplasmiden erfolgte in den *E. coli* Stamm XL1-Blue, der den Lac-Repressor LacI exprimiert. Dadurch war die Expression des rekombinanten Proteins in Abwesenheit von IPTG weitestgehend unterdrückt.

### 2.1.4.2 Klonierungsstrategien

Sofern nicht anders erwähnt wurden Ligationsansätze für Klonierungen in den *E. coli* Stamm XL1-Blue transformiert.

#### 2.1.4.2.1 Expression von Antigenen/*E. coli* Expressionsklonierungen

##### *Klonierung von pMM59 [NcFzo1(61-751)]*

Für die Expression der N-terminalen Domäne (Aminosäuren 61 bis 751) des Fzo1-Proteins von *N. crassa* mit C-terminalem *His<sub>6</sub>-Tag* in *E. coli* wurde als Matrize die cDNS (Holger Prokisch, München) des Wildtyp-Stammes verwendet und folgende Primer:

5'-Primer: fzoN-*SphI*: AAA GCA TGC TCG ACA ACG ACT CC

3'-Primer: fzo-Cyt-*BamHI*: AAA GGA TCC GCC GGC CTT TTC CTC C

Das entsprechende PCR-Produkt wurde nach Restriktionsverdau mit den Enzymen *SphI* und *BamHI* in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pQE70 (Qiagen) ligiert.

#### 2.1.4.2.2 *N. crassa* Expressionsvektoren

Für die Expression von *N. crassa* Fzo1 mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag unter endogenem Promotor wurde die Klonierung in zwei Schritten vollzogen.

##### *Klonierung von pMM82-4 (Ncfzo-1-Prom)*

Zuerst wurde der endogene Promotor des *fzo-1*-Gens über PCR vom Cosmid G15-D10 (mit Intron)(Holger Prokisch, München) als Matrize mit folgenden Primern amplifiziert:

5'-Primer: Fzoprom80-1: AAA GTC GAC ATC TGA CCC TTC TGA GC

3'-Primer: Fzoprom80-2: AAA AAG CTT GGT CGT GGA GGG ACT TG

Nach Restriktionsverdau mit *SalI* und *HindIII* wurde das PCR-Produkt in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pCB1532 (Sweigard *et al.*, 1997) ligiert.

##### *Klonierung von pMM83-25 (His<sub>6</sub>Fzo1)*

Als zweiter Schritt wurde das PCR-Produkt (mit über den 5'-Primer integriertem His<sub>6</sub>-Tag) ab dem Start ATG des *fzo-1* inklusive Terminator-Sequenz amplifiziert, ebenfalls mit Cosmid G15-D10 als Matrize und folgenden Primern:

5'-Primer: Fzohis80-3: AAA GGA TCC ACC ATG CAC CAT CAC CAT CAC CAT AGC CAG GAT TAC TAC CCG

3'-Primer: Fzoterm80-4: AAA GGA TCC AAT ACG AGC ATG GAG ACG CCG TCG

Nach Restriktionsverdau mit *SacII* und *BamHI* wurde das PCR-Produkt in pMM82-4 ligiert.

#### 2.1.4.2.3 Klonierung von *MDM33* für die *in vitro*-Translation

##### *Klonierung von pMM106 (Mdm33-pGEM4)*

Für die *in vitro*-Synthese des Proteins Mdm33 wurde die kodierende Sequenz, mit genomischer DNS des Wildtyp-Stammes W303 als Matrize, über PCR amplifiziert. Folgende Primer wurden verwendet:

5'-Primer: pYXmdm33fw: AAA CCA TGG TGA GAT ACT ATG GGG CG

3'-Primer: She9pQErev: TTT AAG CTT TCA TAT CAG CCC GGA TAC C

Nach Restriktionsverdau mit den Enzymen *HindIII* und *NcoI* wurde in den Vektor pGEM-4 (Promega) ligiert.

#### 2.1.4.2.4 Hefeexpressionsvektoren

##### *Klonierung von cytRFP (pVT102U-cRFP)*

Für die Expression eines cytosolisch lokalisierten rot fluoreszierenden Proteins wurde die für das RFP codierende Gensequenz aus dem Vektor pRS424-ADH1+PrF0ATP-9-RFP (Mozdy *et al.*, 2000) mit den Enzymen *Bam*HI und *Xho*I herausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pVT102-U (Vernet *et al.*, 1987) ligiert.

##### *Klonierung von pMM104 (GAL-MDM33)*

Zur Überexpression von Mdm33 in *S. cerevisiae* wurde die kodierende Sequenz mit den Enzymen *Hind*III und *Nco*I aus dem Plasmid pMM106 herausgeschnitten und in den Vektor pYX223 (R&D Systems) ligiert. *MDM33* unterliegt hier der Kontrolle des *GAL*-Promotors, so dass die Expression durch Zugabe von Galaktose induziert werden kann.

##### *Klonierung von GFP-Mdm33 unter endogenem Promotor*

Für die Expression von einem Mdm33-Fusionsprotein mit einem N-terminalen GFP unter der Kontrolle des endogenen Promotors, musste das GFP zwischen die Präsequenz und den reifen Teil von Mdm33 kloniert werden. Diese Klonierung wurde in den folgenden drei Schritten vollzogen.

##### *Klonierung von pMM110 (GFP-pRS316)*

Zuerst musste das GFP über PCR aus dem Vektor pUG34 (GenBank/EMBL/DDBJ Nr. AF298784) als Matrize mit folgenden Primern amplifiziert werden:

5'-Primer: pUG34GFPfw: AAA GGA TCC ATG TCT AAA GGT GAA GAA TTA TTC

3'-Primer: pUG34GFPrev: TTT AAG CTT TTT GTA CAA TTC ATC CAT ACC AT

Nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Hind*III wurde das PCR-Produkt in den Vektor pRS316 (Sikorski und Hieter, 1989) ligiert.

##### *Klonierung von pMM111(promMDM33+GFP)*

Als zweiter Schritt wurde der endogene Promotor von *MDM33* zusammen mit der für die Präsequenz kodierenden Sequenz mit genomischer DNS des Wildtyp-Stammes W303 als Matrize und folgenden Primern amplifiziert:

5'-Primer: mdm33GFP1fw: AAA GAG CTC AAT TTC ATC ATG GAG GTG CAT G

3'-Primer: mdm33GFP2rev: TTT GGA TCC AGA ATA TGA ACT ATA ATG AAA TGG



Nach Restriktionsverdau mit *SacI* und *BamHI* wurde in den Vektor pMM110 ligiert.

#### *Klonierung von pMM112 (GFP-Mdm33)*

Zuletzt wurde die für den reifen Teil von Mdm33 kodierende Sequenz zusammen mit der Terminatorsequenz amplifiziert (ebenfalls mit genomischer DNS des Wildtyp-Stammes W303 als Matrize) mit folgenden Primern:

5'-Primer: mdm33GFP3fw: AAA AAG CTT TTT CAT TAT AGT TCA TAT TCT CTA C

3'-Primer: She9pQErev: TTT AAG CTT TCA TAT CAG CCC GGA TAC C

Nach Restriktionsverdau mit *HindIII* und *XhoI* wurde in den Vektor pMM110 ligiert.

#### *Klonierung von pMM113 (GFP-Mdm33 ↑)*

Um eine leichte Überexpression des GFP-Mdm33-Proteins zu ermöglichen, wurde das komplette Insert mit den Enzymen *SacI* und *XhoI* aus pMM112 in das "Multi-Copy-Plasmid" pRS426 (Christianson *et al.*, 1992) umklont.

#### *Klonierung von Mdm33(1-41)-GFP*

Zur Überprüfung, ob der N-Terminus von Mdm33 ein Importsignal darstellt, wurde ein Plasmid (Mdm33(1-41)-GFP) konstruiert, welches die ersten 41 Aminosäurereste von Mdm33 als Fusionsprotein mit C-terminaler GFP-Domäne in Hefe exprimiert. Zu diesem Zweck wurde die für die ersten 41 Aminosäuren kodierende Sequenz mit genomischer DNS des Wildtyp-Stammes W303 als Matrize und folgenden Primern amplifiziert:

5'-Primer: 33L1: GGG AAG CTT ATG TTG AGA TAC TAT GGG GCG

3'-Primer: 33L2: GGG GGA TCC ACC GTT CTG TAG AGA ATA TGA AC

Nach Restriktionsverdau mit *HindIII* und *BamHI* wurde in den Vektor pYES-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) ligiert.

## **2.2 Genetik**

### **2.2.1 Hefegenetik**

#### **2.2.1.1 Kultivierung von *S. cerevisiae***

Die Anzucht von Hefekulturen erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, bei 30°C entweder auf YP-Vollmedien oder, falls eine Selektion auf Auxotrophiemarker erforderlich war, auf SC-

Medien. Für die Isolierung von Mitochondrien wurden die Hefen auf Lactatmedium kultiviert. Als Kohlenstoffquellen dienten entweder 2% (m/v) Glukose, 2% (m/v) Galaktose, 3% (m/v) Glyzerin oder 0,5% (m/v) Lactat.

### 2.2.1.2 Transformation von *S. cerevisiae*

#### *Transformation Lithiumacetat-konditionierter Hefezellen mit rekombinanter DNS*

Die Transformation von Hefezellen mit Lithiumacetat wurde nach Gietz *et al.* (1992) durchgeführt. Eine Kultur (50 ml) in YP- oder SC-Medium mit 2% (m/v) Glukose wurde bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3.000×g; 5 min; RT) geerntet, mit 25 ml Wasser gewaschen und in 1 ml 100 mM LiAc resuspendiert. Nachdem der Ansatz in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt worden war, wurden die Hefen durch erneute Zentrifugation (15.000×g; 30 sec; RT) gesammelt, nochmals in 500 µl 100 mM LiAc resuspendiert, zu 50 µl portioniert und erneut reisoliert. Auf das Zellpellet wurde 250 µl Transformationslösung gegeben [50% (m/v) PEG 3350; 36 µl 1 M LiAc; 25 µl einzelsträngige, denaturierte DNS (2 mg/ml) (unmittelbar vor Zugabe 5 min bei 95°C erhitzt, dann schnell auf 4°C abgekühlt); 1 - 5 µg des gewünschten Plasmids bzw. PCR-Fragmentes in 50 µl Wasser]. Die Hefezellen wurden durch starkes Schütteln resuspendiert und 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock von 20 min bei 42°C wurden die Zellen durch eine kurze Zentrifugation gesammelt, in 200 µl Wasser aufgenommen und auf selektivem Medium ausplattiert.

### 2.2.1.3 Chromosomale Integration

Für die chromosomale Integration der 13-fachen Myc-Markierung an Mdm33 durch homologe Rekombination wurde zuerst ein PCR-Fragment der Kanamycinresistenzkassette mit genspezifischen Sequenzen an beiden Enden amplifiziert. Als Matritze diente das Plasmid pFA6a-13Myc-kanMX6 (Bähler *et al.*, 1998). Folgende Primer wurden verwendet: mdm33pFA6f (CAA TTT CTT TAG TGA GTA TGA CAA TCT TGG TAT CCG GGC TGA TAC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A) und mdm33pFA6r (GGT TAA GGA TAT TGA AAC CAA AAC GTG CTA TTT ACT GTG TAT TTA GAA TTC GAG CTC GTT TAA AC). Nach der Transformation des gereinigten PCR-Produkts wurden die Zellen nach dem Hitzeschock zunächst in 200 µl YPD-Medium 2 - 3 h bei 30°C inkubiert, um die Expression

des Kanamycinresistenzgens zu ermöglichen. Anschließend wurden die Hefen auf YPD-Platten, denen 500 µg/ml Geneticin (G418) zugesetzt waren, ausgestrichen.

#### **2.2.1.4 Kreuzen, Sporulation und Tetradenanalyse von Hefezellen**

Zum Kreuzen zweier Stämme mit unterschiedlichen Paarungstypen wurden diese frisch auf YPD-Platten über Nacht angezogen. Zellen beider Stämme wurden anschließend auf einer YPD-Platte mit Saft über Kreuz überstempelt und nach einer weiteren Über-Nacht-Inkubation auf selektives Medium gestempelt. Das selektive Medium wurde so gewählt, dass nur die diploiden Zellen an der Kreuzungsstelle wachsen konnten. Diploide Zellen von den Kreuzungsstellen wurden anschließend auf selektivem Medium als Einzelkolonien ausgestrichen.

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

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

Um die Atmungsaktivität der Mitochondrien verschiedener Stämme zu untersuchen, wurden Verdünnungsreihen der Kulturen auf glyzerin- bzw. glukosehaltige YP-Platten aufgetropft. Die Stämme wurden hierzu zunächst in dem gewünschten Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Flüssigkulturen angezogen. Zellen entsprechend einer OD-Einheit wurden von jeder Kultur isoliert und in sterilem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden diese Kulturen fünfmal je 1:10 mit Wasser verdünnt, und von jeder Verdünnung wurden 5 µl auf die Platte getropft. Die Ergebnisse konnten nach 2 - 5 Tagen Inkubation bei 15°C, 25°C, 30° und 37°C ausgewertet werden.

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

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

### 2.2.1.7 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte *S. cerevisiae* Stämme

Für die mikroskopischen Untersuchungen und genetischen Manipulationen wurden Stämme verwendet, die isogen zu BY4741, BY4742 und BY4743 sind (Brachmann *et al.*, 1998). Für die Doppelmutanten wurden die haploiden Stämme von EUROSCARF (Frankfurt) verwendet.

Stamm	Beschreibung	Plasmid/Referenz
YBW344	<i>MDM33</i> -myc: genomisch integriertes 13-fach Myc-Epitop am C-Terminus von Mdm33, selektierbar durch Kanamycin-Kasette	Primer: mdm33pFA6f und mdm33pFA6r (Bähler <i>et al.</i> , 1998)
YBW345	WT + erGFP: ss-GFP-HDEL unter MET25 Promotor, URA/CEN Plasmid	pWP1055(Prinz <i>et al.</i> , 2000)
YBW346	<i>Amdm33</i> + erGFP: ss-GFP-HDEL unter MET25 Promotor, URA/CEN Plasmid	pWP1055(Prinz <i>et al.</i> , 2000)
YBW347	<i>Amdm33</i> + cytRFP	pVT102U-cRFP (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003)
YBW348	WT + cytRFP	pVT102U-cRFP (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003)
YBW349	<i>Amdm33</i> + cytRFP + mtGFP	pYX142-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) pVT102U-cRFP (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003)
YBW350	WT + cytRFP + mtGFP	pYX142-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) pVT102U-cRFP (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003)
YBW351	WT + mtGFP + <i>GAL-MDM33</i> : Überexpression Mdm33 unter <i>GAL</i> -Promotor	pYX223- <i>MDM33</i> (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003) und pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW352	WT + mtGFP + pYX223: Leeres Plasmid als Kontrolle	pYX223 und pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW353	<i>Amdm33</i> + mtGFP + <i>GAL-MDM33</i> : Überexpression von Mdm33 unter <i>GAL</i> -Promotor	pYX223- <i>MDM33</i> (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003) und pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW354	<i>Amdm33</i> + mtGFP + pYX223: Leeres Plasmid als Kontrolle	pYX223 und pVT100U-mtGFP
YBW355	<i>Afo1</i> + mtGFP + <i>GAL-MDM33</i> : Überexpression von Mdm33 unter <i>GAL</i> -Promotor	pYX223- <i>MDM33</i> (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003) und pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW356	<i>Afo1</i> + mtGFP + pYX223: Leeres Plasmid als Kontrolle	pYX223 und pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW357	<i>Afis1</i> + mtGFP + <i>GAL-MDM33</i> : Überexpression von Mdm33 unter <i>GAL</i> -Promotor	pYX223- <i>MDM33</i> (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003) und pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW358	<i>Afis1</i> + mtGFP + pYX223: Leeres Plasmid als Kontrolle	pYX223 und pVT100U-mtGFP

		(Westermann und Neupert, 2000)
YBW391	<i>Amdm33/Amgm1</i> -Doppelmutante + mtGFP	pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW363	<i>Amdm33/Azo1</i> -Doppelmutante + mtGFP	pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW365	<i>Amdm33/Afis1</i> -Doppelmutante	pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW392	<i>Afis1</i> + mtGFP	pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW367	WT + mtGFP	pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW368	<i>Amdm33</i> + mtGFP	pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW369	<i>Azo1</i> + mtGFP	pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW370	<i>Amgm1</i> + mtGFP	pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000)
YBW371	WT + Mdm33(1-41)-GFP: Präsequenz von Mdm33 Aminosäurereste 1-41 mit GFP am C-Terminus	pYES-Mdm33(1-41)-GFP (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003)
YBW382	WT + GFP-Mdm33: Endogener Promotor, Präsequenz/GFP/reifes Mdm33 in pRS316	pMM112 (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003)
YBW383	<i>Amdm33</i> + GFP-Mdm33: Endogener Promotor, Präsequenz/GFP/reifes Mdm33 in pRS316	pMM112 (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003)
YBW384	<i>Amdm33</i> + GFP-Mdm33 <sup>↑</sup> : Endogener Promotor, Präsequenz/GFP/reifes Mdm33 in pRS426	pMM113 (Messerschmitt <i>et al.</i> , 2003)
YBW387	WT + mtRFP	pRS424-ADH1+PrFoATP-9-RFP (Mozdy <i>et al.</i> , 2000)

**Tabelle 3: *S. cerevisiae*-Stämme**

## 2.2.2 *Neurospora*-Genetik

### 2.2.2.1 Kultivierung von *N. crassa*

Die Kultivierung von *N. crassa* erfolgte im Wesentlichen wie von Davis und de Serres (1970) beschrieben.

#### 2.2.2.1.1 Gewinnung von Konidiosporen

Die Anzucht von *Neurospora* zur Gewinnung von Konidien erfolgte in 300 ml Erlenmeyerkolben auf Vollmedium mit 2% (m/v) Agar, so dass ein Wachstum des Myzels nach oben ermöglicht wurde. Zunächst wurde mit einigen silikatgetrockneten Hyphen das Medium angeimpft und 3 - 7 Tage bei 30°C im Dunkeln inkubiert. Um die Ausbildung der Konidien anzuregen, wurden die Kulturen anschließend für weitere 3 - 5 Tage bei Raumtemperatur und Tageslicht kultiviert. Das Ernten der Konidien erfolgte durch Abschwemmen mit 50 ml sterilem Wasser. Um abgelöste Hyphen von den Konidien abzutrennen, wurde die Suspension durch sterile Watte filtriert. Die Konzentration der Konidien wurde durch Auszählen mit Hilfe einer Thoma-Kammer unter einem Lichtmikroskop bestimmt.

#### **2.2.2.1.2 Anzucht der Hyphen**

Die Kultivierung von *N. crassa* erfolgte standardmäßig für 16 h bei 25°C in flüssigem Minimal-Medium, das mit  $2 \times 10^9$  Konidien/l Kultur angeimpft wurde. Um ein ausreichendes Wachstum zu garantieren, wurde sterile Luft durch die Kulturen geleitet, und die Kulturen wurden beleuchtet.

#### **2.2.2.1.3 Konservierung der Stämme durch Silikattrocknung**

Die aus einem Anzuchtkolben gewonnenen Konidien wurden mit 10 ml steriler Milch [10% (m/v) Milchpulver in Wasser, autoklaviert] abgeschwemmt und durch sterile Watte filtriert. Anschließend wurden je 1 ml dieser Suspension mit etwa 1 g sterilem Kieselgel vermischt und 2 - 3 Wochen in einem Exsikkator getrocknet. Die Kulturen wurden bei 4°C (für ein Jahr) oder bei -80°C (für mehrere Jahre) gelagert.

#### **2.2.2.2 Transformation von *N. crassa***

##### **2.2.2.2.1 Gewinnung transformationskompetenter Sphäroplasten**

Zur Transformation der *N. crassa* Stämme wurden zunächst Sphäroplasten hergestellt. Dazu wurden  $2 \times 10^9$  Konidien in Minimal-Medium bei 30°C solange inkubiert, bis etwa 90% aller Konidien ausgekeimt waren (4 - 6 h). Das Auskeimen der Konidien konnte unter einem Lichtmikroskop beobachtet werden. Anschließend wurden die Konidien durch Zentrifugation geerntet (480×g; 10 min), mit Wasser gewaschen und in 10 ml 1 M Sorbitol resuspendiert. Zur Herstellung der Sphäroplasten wurde die Zellwand mit Novozym234 (3 mg/ml) 30 - 60 min bei 30°C verdaut. Das Enzym wurde anschließend zweimal mit 1 M Sorbitol und zweimal mit STC-Puffer ausgewaschen und das Pellet in 15 ml STC, 4 ml PTC und 200 µl DMSO resuspendiert. Die Sphäroplastensuspension wurde aliquotiert, langsam bei -20°C eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.2.2 Transformation der Sphäroplasten

Die Transformation der *N. crassa* Stämme wurde nach der Methode von Staben und Vollmer durchgeführt (Vollmer und Yanofsky, 1986; Staben *et al.*, 1989). Dazu wurden 100 µl Sphäroplastensuspension mit einer Mischung aus 5 µl DNS (etwa 1 - 5 µg), 2 µl Spermidin/HCl (50 mM) und 5 µl Heparin (5 mg/ml in STC) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde mit 1 ml PTC-Puffer heftig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur belassen. Dieser Transformationsansatz wurde in Top-Agar aufgenommen und auf FIGS-Agar-Platten mit 200 µg/ml Chlorimuronethyl zur Selektion ausgesossen. Die Platten wurden 3 - 4 Tage bei 30°C inkubiert.

### 2.2.2.3 Verwendete Stämme von *N. crassa*

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und Klonierungen wurde der Wildtypstamm St. Lawrence 74A K93-12A bzw. 5α verwendet. Durch Transformation von pMM83 (pCB1532his/*fzo-1*) in diesen Wildtyp wurde der Stamm MM83-A2 erhalten.

Stamm	Genotyp	Referenz
St. Lawrence 74A K93-12A	Wildtyp	Fungal Genetic Stock Center, Kansas City, KS, USA
St. Lawrence 74A K93-5α	isogener Wildtyp	Fungal Genetic Stock Center, Kansas City, KS, USA
MM83-A2 (His <sub>6</sub> -Fzo1)	endogener Promotor <i>fzo-1</i> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag an <i>fzo-1</i>	diese Arbeit

**Tabelle 4:** *N. crassa*-Stämme

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte durch Anwendung des Bradford-Tests (Bradford, 1976). Verwendet wurde der BioRad-Proteinassay. Durch die Bindung von Coomassie-Brilliant-Blue-G-250 (SERVA) an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe. Dieses Absorptionsmaximum beträgt ohne Protein 465 nm und mit Protein 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist das Maß für die

Proteinkonzentration der Lösung. Eine geeignete Verdünnung der zu bestimmenden Proteinlösung wurde mit 1 ml Farbstofflösung (1:5 Farbstoffkonzentrat mit Wasser) gemischt und 5 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter Proteinkonzentration.

### **2.3.2 Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (TCA)**

Proteine wurden aus wässriger Lösung durch Zugabe von 100% (m/v) TCA (Endkonzentration 10%) gefällt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 30 min bei 30.000×g zentrifugiert und zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Die gefällten Proteine wurden luftgetrocknet und in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

### **2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Um Proteingemische aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) verwendet. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer gelöst und vor dem Auftrag für 5 min auf 95°C erhitzt. Ein Sammelgel [5% Acrylamid; 0,05 % Bisacrylamid; 0,1% SDS; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% TEMED; 0,1% APS] überschichtete ein Trenngel [10 - 20% Acrylamid; 0,1 - 0,2 % Bisacrylamid; 0,1% SDS; 385 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% TEMED; 0,1% APS], die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei 30 mA. Der Laufpuffer enthielt 10 g/l SDS, 144 g/l Glycin und 30 g/l Tris. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine entweder auf Nitrocellulose übertragen oder mit Coomassie-Brilliant-Blue-R-250 angefärbt.

### **2.3.4 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde in Coomassie-Färbelösung [30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% (m/v) Coomassie-Brilliant-Blue R-250] bei Raumtemperatur unter Schütteln für mindestens 1 Stunde gefärbt. In dieser Lösung werden die Proteine gleichzeitig fixiert (denaturiert und ausgefällt) und angefärbt. Anschließend wurde das Gel mit Entfärber [30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure] entfärbt. Das Gel wurde über Nacht zwischen zwei Gel Trocknungsfolien (Promega) getrocknet.



### **2.3.5 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)**

Beim Blotting werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schüll) übertragen (Towbin *et al.*, 1979; Kyshe-Anderson, 1984). Dabei wurden die Membran und das Gel zwischen mit Blotpuffer getränkten Whatman-3MM-Filterpapieren so angeordnet, dass die Membran näher zur Anode als das Gel zu liegen kam. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 1 mA/cm<sup>2</sup>, wobei die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Membran gebunden wurden. Um die Proteinbindungsstellen der Nitrozellulose Membran zu aktivieren, wurde dem Blotpuffer 20% (v/v) Methanol zugesetzt. Anschließend wurden die Proteine auf dem Blot mit Ponceaurot angefärbt. Die Empfindlichkeit dieser Färbemethode liegt bei etwa 50 ng pro Bande. Die Färbung ist reversibel. Der Blot wird 1 - 2 min bei Raumtemperatur in Ponceaurot inkubiert und die überschüssige Farbe danach mit Wasser gewaschen. Die Trichloressigsäure in der Färbelösung fixiert gleichzeitig die Proteine auf dem Blot.

### **2.3.6 Quantifizierung von Proteinbanden durch Autoradiographie und Phosphorimaging**

Bei der Autoradiographie wurden die radioaktiv markierten Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran auf einem Röntgenfilm exponiert. Die auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Amersham) eingelesen und ihre Intensität gemessen (Densitometrie). Alternativ wurden die Nitrozellulose-Membranen nach dem Transfer der Proteine auf Phosphorimaging-Platten exponiert und die Intensität der radioaktiv markierten Proteinbanden durch einen Phosphorimager der Firma Fuji bestimmt.

### **2.3.7 Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine *in vitro***

Zur Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine wurde das „TNT<sup>R</sup>-coupled-reticulocyte-lysate-system“ von Promega verwendet. Hierbei erfolgten Transkription und Translation gekoppelt in einem Schritt. Die Gene befanden sich unter Kontrolle des SP6-Promotors auf einem Plasmid der pGEM-Reihe. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten: 50 µl TNT-Lysat, 4 µl TNT-Reaktionspuffer, 2 µl TNT SP6-Polymerase, 2 µl Aminosäuregemisch ohne Methionin, 4 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin, 2 µl RNasinR Ribonuklease

Inhibitor, 1 - 2 µg DNS Matrize, aufgefüllt wurde mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 100 µl. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei 30°C wurde der Ansatz zentrifugiert (90.000×g; 15 min; 4°C; TLA45-Rotor), der Überstand aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.3.8 Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* und *N. crassa*

#### *Reinigung eines Fzo1-Fragments mit Hexahistidinanhang aus E. coli:*

Für die Erzeugung (2.5.1.1) und Affinitätsreinigung (2.5.1.3) eines spezifischen Antiserums gegen *Neurospora*-Fzo1 wurde ein Fragment des *fzo-1*-Gens in den Vektor pQE70 kloniert (pMM59) und mit einem Anhang von sechs C-terminalen Histidinresten in *E. coli* (M15[pREP4]; Qiagen) exprimiert. Es wurden 100 ml Kultur in LB-Amp/Kan bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 – 1 angezogen; anschließend wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG für 2 h induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (10 min; 3.000×g), in 10 ml Lysepuffer nativ (PBS; 1mM PMSF; 1 mg/ml Lysozym; 0,5% Triton X-100) resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und durch Beschallung im Eiswasserbad (Mikrospitze, Stufe 3, 50% Duty Cycle, 6 Impulse von 10 sec, durch 10 sec Intervalle unterbrochen) aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (30 min; 4°C; 10.000×g), das Sediment in 10 ml Puffer B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris/HCl; 8 M Harnstoff; pH 8 mit NaOH) resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mit 1 ml 50% Ni-NTA-Sepharose für 1 h bei RT inkubiert und auf eine Säule (Biorad) gegeben. Die Ni-NTA-Sepharose wurde zweimal mit 5 ml Puffer C (wie B; pH 6,3) gewaschen. Eluiert wurde viermal mit 0,5 ml Puffer D (wie B; pH 5,9) und viermal mit 0,5 ml Puffer E (wie B; pH 4,5). Je 5 µl der einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert, und die Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt.

#### *Reinigung des Fzo1-Komplexes aus N. crassa:*

Zur Reinigung des Fzo1-Komplexes wurde das Fzo1-Protein mit einem Anhang von sechs N-terminalen Histidinresten versehen. 2 mg Mitochondrien des His<sub>6</sub>-Fzo1 exprimierenden *N. crassa* Stammes wurden in 2 ml Lysepuffer (20 mM Imidazol; 1 % Triton X-100; 20 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF) für 1 h bei 4°C lysiert. Aggregiertes Material und unlösliche Bestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt (45 min; 2°C; 30.000×g). Der Überstand wurde mit 100 µl Ni-NTA-Sepharose versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert, bevor er auf eine Säule (Biorad) gegeben wurde. Die Ni-NTA-Sepharose

wurde mit 20 ml Waschpuffer (20 mM Imidazol; 0,1 % Triton X-100; 20 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF) gewaschen. Das His<sub>6</sub>-Fzo1 wurde viermal mit 0,5 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol; 0,1 % Triton X-100; 20 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF) eluiert. Nach einer TCA-Fällung der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE analysiert.

### **2.3.9 Gelfiltrationschromatographie**

Die Gelfiltration wurde angewandt, um das native Molekulargewicht von Proteinkomplexen abzuschätzen. Dazu wurden isolierte Mitochondrien (0,5 – 2 mg) in einem geeigneten Lysepuffer (150 mM Kaliumacetat; 4 mM Magnesiumacetat; 0,5 mM EDTA; 30 mM Tris, pH 7,4; 1 % Triton X-100; 0,5 mM PMSF) 30 min bei 4°C solubilisiert. Das nicht lysierte und aggregierte Material wurde durch Zentrifugation (90.000×g; 15 min; 4°C) abgetrennt und der Überstand auf eine mit Laufpuffer (wie Lysepuffer, Tritonkonzentration geringer: 0,1 – 0,5 %) äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Superose-6, Amersham) geladen (Flussrate 0,3 ml/min). Die eluierten Proteine wurden in 500 µl-Fractionen gesammelt und durch TCA-Fällung konzentriert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot. Als Größenmarker wurden folgende Proteine verwendet: Thyreoglobulin (669 kD), Apoferritin (443 kD), Alkoholdehydrogenase (150 kD), BSA (66 kD) und Carboanhydrase (29 kD).

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

### **2.4.1 Zellbiologische Methoden bei *S. cerevisiae***

#### **2.4.1.1 Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe**

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

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

Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte nach publizierten Methoden (Herrmann *et al.*, 1994; Zinser und Daum, 1995). Die Zellen wurden auf Laktatmedium bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,8 bis 1,5 kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (3.000×g; 5 min; RT). Nach Waschen mit Wasser wurde das Zellpellet gewogen und in 100 mM Tris, 10 mM DTT (2 ml/g Zellen) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert, abermals zentrifugiert und mit 40 - 100 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen. Zur Herstellung von Sphäroplasten wurden die Zellen in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), 1,2 M Sorbitol, mit Zymolyase (3 mg/g Zellen) resuspendiert und 30 - 60 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Geräten. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (2.500×g; 5 min; 4°C) gesammelt, in Homogenisierungspuffer resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator geöffnet (15 Stöße). Anschließend wurde die Suspension zweimal zentrifugiert (3.000×g; 5 min; 4°C), um die Zellreste abzutrennen. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die darin enthaltenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (12.000×g; 12 min; 4°C) gesammelt und in SEM-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert (12.000×g; 12 min; 4°C) und die Mitochondrien in 0,5 - 1 ml SEM-Puffer aufgenommen. Die Mitochondriensuspension wurde auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.4.1.3 Reinigung von Mitochondrien über einen Saccharosegradienten

Um Mitochondrien von Verunreinigungen zu befreien, wurden sie über einen Saccharosegradienten gereinigt. In einem SW41-Ultrazentrifugen-Röhrchen wurden jeweils 2 ml von einer 60%, 50%, 40%, 30% und 20% ( m/v ) Saccharoselösung (in 20 mM Hepes/KOH, pH 7,4; 100 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF) geschichtet. Auf diesen Gradienten wurde 1 ml Mitochondriensuspension (Konzentration 10 - 20 mg/ml) gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min; 2°C; 220.000×g; SW41-Rotor) wurden die Mitochondrien abgenommen (zwischen der 50% und 40%-Schicht), abzentrifugiert (10 min; 2°C; 12.000×g), mit SEM gewaschen und in 500 µl SEM resuspendiert.

#### **2.4.1.4 Subfraktionierung von Mitochondrien**

Um Mitoplasten zu erzeugen, d. h. Mitochondrien, deren äußere Membran geöffnet ist, wurden Mitochondrien in eiskaltem hypotonischen Puffer resuspendiert (1 mg/ml mitochondriales Protein in 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) und 15 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurden Mitochondrien in eiskaltem isotonischem Puffer resuspendiert (0,6 M Sorbitol; 20 mM Hepes/KOH pH 7,4). Für die Protease-Behandlung von Mitoplasten wurden dem hypotonischen Puffer 100 µg/ml Proteinase K zugegeben. Die Protease-Behandlung wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF und 5 min Inkubation auf Eis beendet. Nach der Schwellung wurden die Mitoplasten durch Zentrifugation (10 min; 12.000×g; 2°C) reisoliert.

#### **2.4.1.5 Isolierung von Mikrosomen und Cytosol aus Hefe**

Um Mikrosomen, die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, zu isolieren, wurden zuerst Sphäroplasten präpariert wie oben beschrieben. Die Sphäroplasten wurden in 60 ml Lysepuffer/10 g Zellen (20 mM Hepes/KOH pH 7,4; 500 mM Saccharose; 1 mM DTT; 3 mM EDTA; 0,5 mM PMSF) resuspendiert und in einem Dounce-Homogenisator mit 15 Stößen geöffnet. Durch einen Zentrifugationsschritt (10.000×g; 10 min; 4°C) wurden schwerere Zellbestandteile abgetrennt. 4 ml des Überstandes, der die Mikrosomen enthielt, wurden auf 8 ml einer 30% (v/v) Percoll-Lösung in einem dünnwandigen Ti50 Zentrifugenröhrchen geschichtet und für 50 min bei 75.000×g (2°C; Ti50-Rotor) zentrifugiert. Von den sichtbaren Banden wurde jeweils die oberste Bande geerntet und die Fraktionen aus verschiedenen Röhrchen miteinander vereinigt. Diese leichte Membranfraktion wurden ein zweites Mal zentrifugiert (1 h; 96.000×g; 4°C; Ti50-Rotor) um das Percoll abzutrennen und in 100 - 200 µl Lysepuffer resuspendiert. Zusätzlich wurde das Cytosol, das bei dem ersten Zentrifugationsschritt von 12.000×g bei der Mitochondrienpräparation (2.4.1.2) anfiel, ebenfalls mit abzentrifugiert, um alle unlöslichen Bestandteile abzutrennen.

#### **2.4.1.6 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Morphologie von Mitochondrien wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Dafür wurden die Mitochondrien mit fluoreszierenden Proteinen oder Farbstoffen sichtbar gemacht. Für die Analyse im Mikroskop wurden die Zellen mit 0,5% (m/v) „Low Melting Point Agarose“ auf dem Objektträger immobilisiert. Fluoreszenz- und

Phasenkontrastaufnahmen wurden mit einem Axioplan Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 100×/1,30 Öl-Objektiv (Carl Zeiss, Jena GmbH) erstellt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde eine 100 W Quecksilber-Lampe verwendet. Für die Analyse von mtGFP wurde der Zeiss-Filtersatz Nr. 09 verwendet (Anregung: 450 bis 490 nm, Emission: >515 nm). Für mtRFP und Rhodamin-B-Hexylester wurde der Zeiss-Filtersatz Nr. 15 verwendet (Anregung: 534 bis 558 nm, Emission: >590 nm)

### **2.4.1.7 Screening einer Hefestammsammlung nach Mutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie (Dimmer *et al.*, 2002)**

Für die Identifizierung von Mutanten mit veränderter mitochondrialer Morphologie wurden die Stämme einer Stammsammlung mit den Disruptionsmutanten sämtlicher nicht-essentieller Hefegene (Giaever *et al.*, 2002) in 0,5 ml flüssiges YPD-Medium angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C im Schüttler wurden die Kulturen mit 3 ml YPD verdünnt und erneut für 3 h inkubiert, um ein logarithmisches Wachstum zu garantieren. Dann wurden die Mitochondrien durch Zugabe von 0,1 µM Rhodamin-B-Hexylester und 15-minütige Inkubation bei RT im Drehrad gefärbt. Die Analyse der Morphologie der Mitochondrien erfolgte im Fluoreszenzmikroskop. Hefestämme, deren Mitochondrien verändert waren, oder deren Mitochondrien sich aufgrund eines fehlenden Membranpotentials nicht anfärben ließen, wurden ein zweites Mal durchmustert. Mutanten, die wiederholt keine Wildtyp-Mitochondrien zeigten, wurden vor einer dritten Durchmusterung mit dem Plasmid pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) transformiert. Die transformierten Mutanten wurden in YPD-Medium angezogen und im Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich ihrer mitochondrialen Morphologie untersucht (Dimmer *et al.*, 2002).

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

### **2.4.1.8 Fixierung von Hefezellen für die Elektronenmikroskopie**

Von einer Übernachtskultur wurden 50 ml YPD (bzw. YPG) auf eine OD von 0,1 - 0,2 angeimpft, um bei 25°C bis auf eine OD von 0,4 bis 0,6 heranzuwachsen. Diese Zellen

wurden bei 3.000×g (RT) sedimentiert und in 10 ml Fixierungsmix (0,1 M Citratpuffer; 4% hydrolysiertes p-Formaldehyd; 0,5% Glutaraldehyd) für eine Stunde inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Citratpuffer (0,1 M, mit Natriumcitrat und Zitronensäure auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt) wurde das Zellsediment in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit Citratpuffer überschichtet. Bei der Ernte und den folgenden Schritten wurde darauf geachtet, dass die Bedingungen des Zellwachstums aufrechterhalten wurden (Temperatur und pH-Wert). Die elektronenmikroskopische Analyse der Zellen erfolgte durch Dr. Frank Vogel (Berlin).

## **2.4.2 Zellbiologische Methoden bei *N. crassa***

### **2.4.2.1 Schnellpräparation von Membranen**

Die Präparation von Membranen aus *N. crassa*-Hyphen erfolgte durch einen Gefrieraufschluss. Die Hyphen einer 30 ml Übernacht-Kultur wurden mit Hilfe einer Nutsche isoliert und in einen Mörser überführt. Nach Übergießen der Hyphen mit flüssigem Stickstoff wurden diese zusammen mit einer Spatelspitze Sand zu einem feinen Pulver verrieben. Dieses Pulver wurde anschließend in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und in 1 ml SEMP-Puffer resuspendiert. Der Sand wurde durch Zentrifugation der Proben (1.000×g; 10 min; 4°C) abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Membranen durch Zentrifugation isoliert (16.000×g; 10 min; 4°C) und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

### **2.4.2.2 Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa***

Zur Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa* wurden Hyphen einer Übernacht-Kultur durch Absaugen in einer Nutsche isoliert, gewogen und in einen Mörser überführt. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Puffern und Geräten. Die Zellen wurden mit Quarzsand und SEMP-Puffer (je 1 ml pro 1 g Hyphen) versetzt und unter Reiben und Drücken mit einem Pistill ihre Zellwände aufgebrochen. Anschließend wurde noch zweimal die gleiche Menge SEMP-Puffer zugegeben und jeweils 1 min gemischt. Durch zwei Zentrifugationen wurde zunächst der Sand abgetrennt (4.000×g; 5 min; 4°C). Die Mitochondrien wurden aus dem Überstand durch Zentrifugation isoliert (12.000×g; 12 min; 4°C), einmal mit SEMP gewaschen, und es wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

### 2.4.3 Import *in vitro*-synthetisierter Vorstufenproteine in Mitochondrien

Der *in vitro*-Import von Vorstufenproteinen wurde wie bei Mayer und Wagner (Wagner *et al.*, 1994; Mayer *et al.*, 1995) beschrieben durchgeführt. Für einen Standard-Importansatz wurden je 100 µg Mitochondrien von *S. cerevisiae* in Importpuffer resuspendiert. Zusätzlich wurde die Importreaktion mit 2 mM NADH und 2 mM ATP versetzt und Kreatinphosphat (15 mg/ml) und Kreatinkinase (150 µg/ml) zur Regeneration von ATP zugegeben. Nach einer Vorinkubationszeit von 5 min bei 25°C wurde das in Retikulozytenlysat synthetisierte Vorstufenprotein zugegeben und noch einmal 25 min bei 25°C inkubiert. Nicht importierte Proteine wurden mittels Trypsin (100 µg/ml) oder Proteinase K (50 µg/ml) abgebaut (15 min; auf Eis). Nach Beendigung des Proteaseverdaus durch Zugabe des 20-fachen molaren Überschusses an Trypsininhibitor (STI) bzw. PMSF (2 mM) wurden die Mitochondrien abzentrifugiert (5.000×g; 10 min; 4°C) und mit SEMP-Puffer gewaschen. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

### 2.4.4 Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranen (Carbonatextraktion)

Durch die Carbonatextraktion kann zwischen integralen Membranproteinen einerseits und löslichen Proteinen und peripheren Membranproteinen andererseits unterschieden werden, da unter den alkalischen Bedingungen die ionischen, nicht aber die hydrophoben Wechselwirkungen von Proteinen mit Membranen gelöst werden (Fujiki *et al.*, 1982). Mitochondrien (100 µg) wurden in 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5 resuspendiert und 30 min bei 4°C im Überkopftaumler inkubiert. Unlösliche Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation (30.000×g; 30 min; 4°C) sedimentiert und in SDS-Probenpuffer gelöst. Die löslichen Proteine wurden mit 20% (m/v) TCA gefällt und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie oder Westernblot analysiert.

## 2.5 Immunologische Methoden

### 2.5.1 Herstellung polyklonaler Antisera in Kaninchen

Die Gewinnung polyklonaler Antikörper erfolgte durch Injektion geeigneter Antigene in Kaninchen. Das Antiserum wurde aus dem Blut, das dem Kaninchen aus der Ohrvene



entnommen wurde, hergestellt. Als Antigene dienten rekombinante Proteine, die in *E. coli* exprimiert wurden.

### 2.5.1.1 Gewinnung der Antiseren

Die Gewinnung der Antiseren erfolgte wie von Söllner *et al.* (1990) beschrieben. 200 µg antigenes Protein in 200 - 300 µl Lösung wurden mit dem gleichen Volumen „Titermax“ der Firma CyrRC (Norcross, USA) heftig gemischt und die entstandene homogene Emulsion subkutan an mehreren Stellen in das Kaninchen injiziert. Weitere Injektionen erfolgten im Abstand von 4 Wochen, wobei Titermax durch „Freundsches Andjuvans Incomplete“ (Behringwerke, Marburg) ersetzt wurde. Vor der ersten Injektion (Präimmunserum), sowie 10 - 12 Tage nach den Injektionen wurde den Kaninchen 10 - 20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, das nach ca. 1 h bei Raumtemperatur vollständig geronnen war. Durch zwei Zentrifugationen (3.000×g; 5 min und 12.000×g; 15 min) wurde das Serum von den geronnenen Bestandteilen getrennt und das Komplementsystem durch 30 minütiges Erhitzen auf 56°C inaktiviert. Die Antiseren wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 2.5.1.2 Kovalente Kopplung von Proteinen an BrCN-aktivierte Sepharose

Harnstoffdenaturiertes Fzo1-Antigen wurde aus *E. coli*-Einschlußkörperchen gereinigt (siehe oben) und an BrCN-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gebunden, um eine spezifische Antigensäule zur Affinitätsreinigung des Immunsersums  $\alpha$ -Fzo1 zu erhalten (Harlow und Lane, 1988). Zur Kopplung des harnstoffdenaturierten Proteins wurden etwa 15 mg des Proteins mit TCA gefällt. Das erhaltene Proteinsediment wurde fünfmal mit 6%-iger TCA-Lösung und zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen und zentrifugiert (28.000×g; jeweils 15 min; 4°C). Anschließend wurde das Sediment in 2 ml 10% (m/v) SDS gelöst und mit 2 ml 200 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,3) verdünnt. Die CNBr-aktivierte Sepharose wurde 15 min in 1 mM HCl gequollen und anschließend einmal mit 1 mM HCl und zweimal mit Äquilibrierungspuffer [2% (m/v) SDS; 100 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 8,3] gewaschen. Die Antigenlösung wurde zu der aktivierten Sepharose gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplung wurde durch eine einstündige Inkubation mit 100 mM Glycin, pH 8,0 beendet. Das nicht kovalent an die Sepharose gebundene Antigen wurde durch Waschen mit den folgenden Puffern abgetrennt: (1) 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0; (2) 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3; (3) 0,5 M NaCl in 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0; (4) 0,5 M NaCl in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>,

pH 8,3. Die beiden letzten Waschschrte wurden wiederholt. Die Sepharosebeads wurden in eine Säule überführt (Säulenvolumen 1 ml) und in TBS/0,02% NaN<sub>3</sub> bei 4°C gelagert.

### **2.5.1.3 Affinitätsreinigung des Antiserums**

Die Affinitätsreinigung des Antiserums wurde nach Harlow und Lane (1988) durchgeführt. Vor Beginn der Antikörperreinigung wurde zunächst die Affinitätssäule mit den folgenden Puffern gewaschen (je 10 Säulenvolumina): (1) 10 mM Tris/HCl, pH 8,8; (2) 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5; (3) 150 mM Natriumchlorid in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5. 4 ml des Antiserums wurden mit 16 ml PBS (1 mM PMSF) verdünnt und dreimal mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule jeweils mit folgenden Puffern gewaschen (20 Säulenvolumina): (1) 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, (2) 500 mM Natriumchlorid in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, (3) 100 mM Zitronensäure/NaOH, pH 4,0. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 10 ml 100 mM Glycin/HCl, pH 2,5 und anschließend 10 ml 100 mM Natriumphosphat, pH 11,5. Fraktionen des Eluats (1 ml) wurden in Reaktionsgefäßen aufgefangen, und mit 100 µl 1 M Tris-Base bzw. 100 µl 1 M Glycin (pH 2,5) neutralisiert. Die antikörperhaltigen Fraktionen wurden durch Bradford-Färbelösung in einer Mikrotiterplatte bestimmt. Hierfür wurden in die Vertiefungen je 200 µl Bradfordlösung und je 50 µl der zu testenden Fraktionen gegeben. Die Fraktionen mit dem stärksten Farbumschlag wurden immunologisch getestet. Die Säule wurde mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen und in TBS und 0,02% (m/v) NaN<sub>3</sub> bei 4°C gelagert.

### **2.5.2 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)**

Die Nitrozellulose-Membran mit den darauf fixierten Proteinen wurde 30 min mit 5% (m/v) Magermilchpulver in TBS abgesättigt. Die Immundekoration erfolgte für 60 min bei RT oder über Nacht bei 4°C mit spezifischen Antiseren, die je nach Titer 1:200 bis 1:30.000 in Milchpulver/TBS verdünnt waren. Anschließend wurde die Membran je 5 min mit TBS, 0,02% (v/v) Tween in TBS, und erneut mit TBS gewaschen. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte durch einstündige Inkubation mit einem Konjugat aus Anti-Kaninchen-Immunglobulinen bzw. Anti-Maus-Immunglobulinen und Meerrettich-Peroxidase (HRP), das 1:10.000 in 5% (m/v) Magermilchpulver/TBS verdünnt war. Anschließend wurde die

Membran dreimal mit TBS gewaschen und mit einem 1:1 Gemisch aus Reagenz 1 und Reagenz 2 benetzt. Durch die ablaufende Chemolumineszenz-Reaktion konnten die Banden mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden.

### 2.5.3 Koimmunfällungen

Zur Koimmunfällung wurden Mitochondrien (100 µg) in 100 µl TNET [10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 10% (v/v) Glycerin] für 15 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde nicht-lysiertes und aggregiertes Material abzentrifugiert (15 min; 17.500×g; 2°C). Der Überstand mit den Antigen-Komplexen wurde mit 1 ml TNET zu Protein A-Sepharose (PAS) gegeben, an die spezifische Immunglobuline (IgG) gekoppelt worden waren. Zur Kopplung der IgGs an PAS wurden 10 - 20 µl PAS dreimal mit TNET gewaschen, mit 20 µl Antiserum in 1 ml TNET für 1 h unter Bewegung bei 4°C inkubiert und wieder dreimal mit TNET gewaschen. Zur Bindung der Antigen-Komplexe an die IgGs wurde 1 h unter Bewegung inkubiert und anschließend dreimal mit TNET und einmal mit 10 mM Tris/HCl pH 7,4 gewaschen. Die Proben wurden SDS-PAGE, Westernblot und gegebenenfalls durch Autoradiographie analysiert.

## 2.6 Medien und Puffer

### 2.6.1 Medien

Die angegebenen Medien wurden für die Zellzucht in Flüssigmedium verwendet. Zur Anzucht auf Platten wurden jeweils noch 2% (m/v) Bacto-Agar hinzugefügt. Bacto-Agar, Zucker und Medien wurden getrennt autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte erst, wenn das Medium auf etwa 50°C abgekühlt war.

#### 2.6.1.1 Medien für *E. coli*

LB-Medium: 1% (m/v) Trypton; 0,5% (m/v) Hefeextrakt;  
1% (m/v) NaCl

LB-Platten: LB-Medium; 2% (m/v) Agar

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

SOC-Medium:	SOB-Medium mit zusätzlich 10 mM MgCl <sub>2</sub> und 20 mM Glukose
Ampicillin:	Endkonzentration 100 µg/ml
Kanamycin:	Endkonzentration 25 µg/ml

### 2.6.1.2 Medien für Hefe

YP-Medium:	1% (m/v) Hefeextrakt; 2% Pepton
YPD-Medium:	YP-Medium mit 2% (m/v) Glukose
YPG-Medium:	YP-Medium mit 3% (m/v) Glyzerin
YPGal-Medium:	YP-Medium mit 2% (m/v) Galaktose
YPD-G418-Platten:	YPD-Medium mit 250 mg/l G418
SC-Medium:	0,17% (m/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 0,5% (m/v) Ammoniumsulfat; 1,5 g/l „Dropout“-Mix; 2% (m/v) Glukose bzw. 3% (m/v) Glyzerin oder 2% (m/v) Galaktose
„Dropout“-Mix:	Mischung aller proteinogenen Aminosäuren (Adenin, Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutamat, Glycin, Histidin, Inositol, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, <i>para</i> -Aminobenzoat, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Uracil, Valin) zu gleichen Gewichtsanteilen; zur Selektion auf einen Auxotrophiemarker wurde die entsprechende Aminosäure nicht zugesetzt
Sporulationsplatten:	1% (m/v) Kaliumacetat; 2% (m/v) Agarose; mit 0,05% (m/v) „Dropout“-Mix
Laktat-Medium:	3 g Hefeextrakt, 1 g Glukose, 1 g K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g NH <sub>4</sub> Cl, 0,5 g CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 0,5 g NaCl, 1,1 g MgSO <sub>4</sub> × 6 H <sub>2</sub> O, 0,3 ml 1% FeCl <sub>3</sub> , 22 ml 90% Milchsäure, H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l, pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen

### 2.6.1.3 Medien für *N. crassa*

Biotinlösung:	5 mg Biotin; ad 100 ml 50% (v/v) Ethanol
Mikrokonidienmedium:	0,5% (m/v) Saccharose; 0,1 × SC-Stammlösung;

	1 mM Iodoacetat; 2% (m/v) Agar
SC-Stammlösung:	1 g KNO <sub>3</sub> ; 0,7 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 g MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O; 0,1 g CaCl <sub>2</sub> ; 0,1 g NaCl; 0,1 ml Biotinlösung, 15 g Saccharose; 0,1 ml Spurenelementlösung; ad 1 l H <sub>2</sub> O; pH 6,5
Sorbose-Platten:	2% Vogel's; 0,003% (m/v) Glukose; 1% (m/v) Sorbose; 2% (m/v) Agar
Spurenelementlösung:	5 g Citrat × 1H <sub>2</sub> O; 5 g ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O; 1 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O; 0,25 g CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O; 0,05 g MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O; 0,05 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> Anhydrit; 0,05 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O; 10 Tropfen Chloroform; ad 100ml H <sub>2</sub> O
STC:	1 M Sorbitol; 50 mM Tris/HCl pH 8; 50 mM CaCl <sub>2</sub>
PTC:	40 % (m/v) PEG 3000; 50 mM Tris/HCl pH 8; 50 mM CaCl <sub>2</sub>
10× FIGS:	20% (m/v) Sorbose; 0,5% (m/v) Fruktose; 0,5% (m/v) Glukose
Heparin Stammlösung:	5 mg/ml in STC
Spermidin Stammlösung:	12 mg/ml
Top-Agar:	0,5% Vogel's, 1 M Sorbitol, 2,8 % Agar; nach Autoklavieren: 50 ml 10× FIGS
Vitamin-Stammlösung:	10 mg Thiamin; 5 mg Riboflavin; 5 mg Pyridoxin; 5 mg Aminobenzoesäure; 5 mg Nicotinamid; 100 mg Colin/HCl; 1 mg Folsäure; 100 mg Inositol; 50 mg Calciumpanthanat; ad 1 l H <sub>2</sub> O
Vogel's Minimal-Medium:	2% Vogel's; 2% (m/v) Glukose
Vogel's Stammlösung (50fach):	300 g tri-Natriumcitrat × 2 H <sub>2</sub> O; 500 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 200 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ; 20 g MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O; 10 g CaCl <sub>2</sub> Anhydrit; 10 ml Spurenelementlösung; 10 ml Biotinlösung; 10 ml Chloroform ad 1,5 l H <sub>2</sub> O
Vollmedium:	2% Vogel's; 1% (m/v) Glyzerin; 1% (m/v) Haushaltszucker; 1% Vitaminlösung; 0,25% (m/v) Hefeextrakt; 0,1% (m/v) Caseinhydrolysat

## 2.6.2 Puffer

Blotpuffer:	20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,05% (m/v) SDS
Ponceaurot Färbelösung:	0,2% (m/v) Ponceaurot; 3% (m/v) TCA
SDS-Probenpuffer:	2% (m/v) SDS; 60 mM Tris/HCl, pH6,8; 10% (v/v) Glycerin; 5% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02% (m/v) Bromphenolblau
Luminol-Reagenz 1:	100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 0,044% (v/v) Luminol; 0,0066% (v/v) <i>p</i> -Cumarinsäure
Luminol-Reagenz 2:	100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 0,05 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
SEM-Puffer:	10 mM MOPS/KOH, pH 7,4; 250 mM Saccharose; 1 mM EDTA
SEMK-Puffer:	SEM; 80 mM KCl
SEMP-Puffer:	SEM; 5 mM PMSF
20× SSC:	300 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 3 M NaCl
TBS-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA
PBS-Puffer:	50 mM Kaliumphosphat pH 7,4; 1 % NaCl
Importpuffer:	50 mM HEPES/KOH pH 7,2; 0,5 M Sorbitol; 80 mM Kaliumchlorid; 10 mM Magnesiumacetat; 2 mM Kaliumphosphat pH 7,4; 1 mM Manganchlorid; 3% (m/v) BSA (fettsäurefrei)
E1:	50 mM Tris/HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 $\mu$ g/ml RNase
E2:	1% (m/v) SDS; 0,2 M NaOH
E3:	3,2 M Kaliumacetat, pH 5,5
E4:	0,15% (v/v) Triton X-100; 0,6 M NaCl; 100 mM Natriumacetat, pH 5
E5:	0,8 M NaCl; 100 mM Natriumacetat, pH 5,0
E6:	1,25 M NaCl; 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

## 2.7 Chemikalien, Enzyme und Geräte

### 2.7.1 Chemikalien und Enzyme

Agfa-Gevaert, München:	Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme
ARK-Sigma, Darmstadt:	Oligonukleotide
Amersham-Pharmacia, Freiburg:	ECL-Immunoblot-Detektionssystem, Kaninchen-Retikulozytenlysat
Biometra, Göttingen:	Reagenzien für Polymerase-Kettenreaktion (PrimeZyme®)
Biorad, München:	Reagenzien zur Proteinbestimmung, Anti-Kaninchen und Anti-Maus IgG-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase
Biozym, Hess. Oldendorf:	SP6-Polymerase
Braun, Melsungen:	Kanülen, Spritzen
CyrRX, Norcross, USA:	TiterMax™
DIFCO, Detroit, USA:	Bacto-Agar, Pepton, Trypton, Hefeextrakt
EUROSCARF, Frankfurt:	Hefestämme
Fluka, Buchs, CH:	Trichloressigsäure
Fuji, Düsseldorf:	Röntgenfilme
Genomed, Bad Oeynhausen:	Jetstar®-Reagenzien und -Säulen zur Plasmidisolierung
Gerbu, Gaiberg:	Acrylamid, Ampicillin, DTT, NADH
GIBCO-BRL, Karlsruhe:	Agarose, T4-Ligase, Restriktionsenzyme
ICN Pharmaceuticals, Eschwege:	[ <sup>35</sup> S]Methionin (1100 bis 1400 Ci/mmol)
Invitrogen, Groningen:	pCRII-TOPO-Vektor
Kodak, München:	Röntgenfilme X-Omat MD
Molecular Probes, Eugene, USA:	Rhodamin B Hexylester
Töpfer, Dietmannsried:	Magermilchpulver
NEB, Frankfurt:	Restriktionsenzyme
Promega, Heidelberg:	RNasin, Kaninchen-Retikulozytenlysat, pGEM-Vektoren (pGEM4), TNT®-Lysat
Qiagen, Homburg:	Gel Extraction Kit®, <i>E. coli</i> XL1-Blue, Ni-NTA
Research Genetics, Huntsville, USA:	Hefestammsammlung
R&D Systems, Abingdon, UK:	pYX-Vektoren
Riedel de Haen, Seelze:	Kaliumacetat
Roche:	NTP, NADH, Proteinase K, DTT, Lysozym, Ethidiumbromid, Klenow-Enzym, dNTP, Oligomycin, Restriktionsenzyme, Tris, Kreatinkinase, Kreatinphosphat
Sarstedt, Bad Homburg:	Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Röhrchen
Schleicher & Schüll, Dassel:	Nitrozellulose-Membranen 0,2 µm, Faltenfilter, Filterpapier, Sterilfilter
Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan:	Zymolyase 20T
Serva, Heidelberg:	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie- Brillant-Blau-R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Ponceau S, Raffinose, Saccharose, SDS, Spermidin, TEMED
Sigma, München:	Aminosäuren, Ammoniumperoxodisulfat, BSA (fettsäurefrei), Glycerin, Lachsspermien-DNS, β-Mercaptoethanol, Mineralöl,

Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE, PMSF,  
Triton X-100, Valinomycin A  
Stratagene, Heidelberg: pBluescript II KS  
Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

### **2.7.2. Geräte**

Abimed, Düsseldorf:	Kolbenhubpipetten
Agfa-Gevaert, München:	Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Gevamatik® 60
Amersham Pharmacia, Freiburg:	Spannungsgeräte für Gelelektrophorese und Immunoblots, Densitometer Ultrascan XL, FPLC-Anlagen, Chromatographiesäulen Superose 6
Appligene, Heidelberg:	Imaging-System The Imager™
Carl Zeiss, Jena GmbH:	Axioplan Fluoreszenzmikroskop
Beckman Instruments, München:	Kühlzentrifuge J2-21 und Ultrazentrifugen Optima TLX und Optima MX-E, L8-50M/E und L8-M, Rotoren, Zentrifugationsröhrchen
Bender und Hobein, München:	Vortex-Mixer
BioRad, München:	Elektroporationsgerät Gene Pulser
Branson, Heusenstamm:	Ultraschallgerät Sonifier B-15
Braun, Melsungen:	Schüttelwasserbäder
Consort, Freiburg:	Spannungsgeräte für die Elektrophorese
Eppendorf, Hamburg:	Photometer, Multipette, Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen (5415D)
Fuji, Tokyo, Japan:	Phospho-Imager BAS-1500
Heraeus Christ, Osterode:	Tischzentrifuge Bactifuge®, Brutschränke, Inkubatoren
Ika, Staufen:	Magnetrührer
Julabo, Seelbach:	Wasserbadthermostat
Memmert, Hannover:	Wärmeschränke
MWG-Biotech AG, Ebersberg:	Primus 25 Personal Thermal Cycler System für PCR
Sartorius, Mainz:	Feinwaagen, Ultrafiltrationsapparatur, Sterilfilter
Schütt, Göttingen:	Autoklav Bioclav®
Shimadzu, Kyoto, Japan:	Photometer UV-120-02 und UV-240
Sigma, München:	Kühlzentrifuge 3K30
Werkstatt des Instituts, München:	Semi-dry-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopfschüttler



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *MDM33* ist ein neues Gen, das für die mitochondriale Morphologie in *Saccharomyces cerevisiae* wichtig ist

##### 3.1.1 Identifizierung neuer *mdm*-Mutanten

Das Genom der Hefe *S. cerevisiae* umfasst etwa 6300 Gene. Von vielen dieser Gene ist die Funktion jedoch noch unbekannt. Um die Funktion sämtlicher Hefegene untersuchen zu können, wurden in einem systematischen Ansatz durch ein internationales Konsortium vieler Hefelabors Stammsammlungen erstellt, die in Mikrotiterplatten geordnet Deletionsmutanten sämtlicher Hefegene enthalten (Winzeler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002). Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde eine Stammsammlung untersucht, die 4794 Deletionsmutanten enthält und damit die nicht-essentiellen Gene der Hefe praktisch vollständig abdeckt. Dabei ist Identität einer jeden Mutante durch ihre Position in den Mikrotiterplatten direkt bekannt.

*MDM*-Gene und ihre Produkte sind wichtig für die mitochondriale Verteilung und Morphologie (engl.: *mitochondrial distribution and morphology*). In einer Gemeinschaftsarbeit der Arbeitsgruppe wurde durch das systematische Screening der Deletionsmutanten-Sammlung nach neuen *MDM*-Genen gesucht (Dimmer *et al.*, 2002). Zur Untersuchung des morphologischen Phänotyps der Mitochondrien wurden die Stämme in Glukose-haltigem Flüssigmedium bis zur logarithmischen Phase angezogen. Die Mitochondrien wurden in den lebenden Zellen mit Rhodamin-B-Hexylester angefärbt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der abhängig vom Membranpotential spezifisch in die Mitochondrien aufgenommen wird. Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde nach Mutanten mit veränderten Mitochondrien gesucht. Das Screening wurde mindestens zwei mal für diejenigen Stämme wiederholt, die eine veränderte mitochondriale Gestalt aufwiesen, oder deren Mitochondrien sich aufgrund eines fehlenden Membranpotentials kaum anfärben ließen. Dabei wurden die Stämme mit Wildtyp-Kontrollen verglichen, wobei der Mikroskopierende nicht die Identität der Proben kannte.

Mutanten, die reproduzierbar ein ungewöhnliches Aussehen hatten, oder die sich durch den Fluoreszenzfarbstoff nicht anfärben ließen, wurden mit einem Plasmid (pVT100U-mtGFP)

transformiert, welches mitochondriales GFP (mtGFP) codiert (Westermann und Neupert, 2000). Alle transformierten Stämme wurden noch mindestens zweimal untersucht.

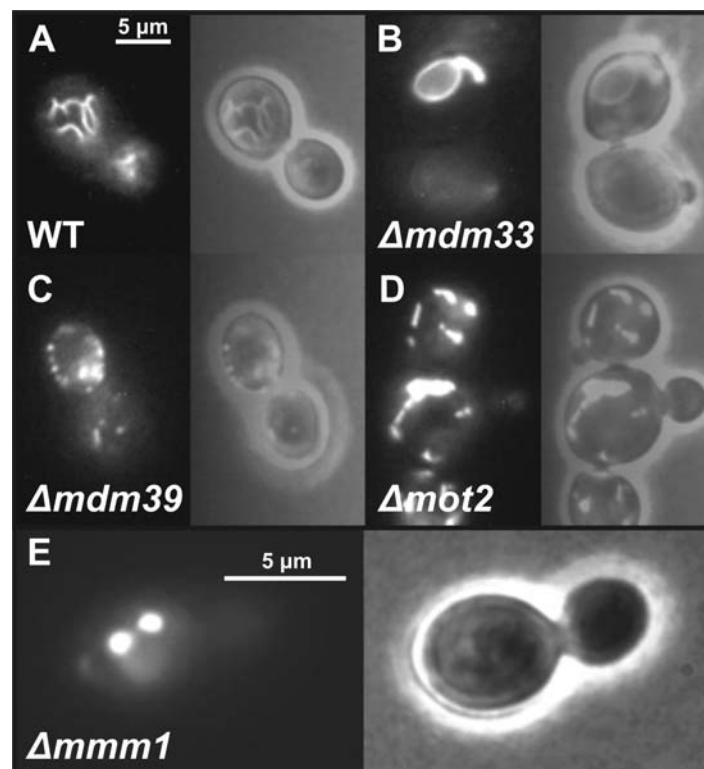
Deletionsmutanten, die eine veränderte Gestalt der Mitochondrien aufwiesen, wurden in drei Klassen unterteilt (Dimmer *et al.*, 2002). Die Gene der Klasse I sind für die Ausprägung von Wildtyp-ähnlichen Mitochondrien essentiell. In dieser Klasse konnten keinerlei Wildtyp-ähnliche Mitochondrien beobachtet werden (Dimmer *et al.*, 2002). Mutanten der Klassen II und III zeigten oft ein fragmentiertes und/oder aggregiertes mitochondriales Aussehen. In beiden Klassen wies jedoch ein veränderlicher Anteil der Zellen Mitochondrien mit Wildtyp-Gestalt auf. Diese Gene haben offenbar einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung des normalen mitochondrialen Aussehens, sind aber nicht essentiell für die Ausprägung normaler schlauchförmiger Mitochondrien (Dimmer *et al.*, 2002). Mutanten der Klasse II sind in der Lage, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen – sie haben also eine intakte Atmungskette. In diese Klasse gehören einige schon länger bekannte mitochondriale Morphologiemutanten, deren Phänotyp nur relativ schwach ausgeprägt ist, wie beispielsweise die Mutante *clu1* (Fields *et al.*, 1998). Mutanten der Klasse III zeigen zusätzlich zu dem mitochondrialen Morphologiedefekt einen Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. In diese Klasse fallen insbesondere Komponenten, die für die Biogenese der Atmungskettenkomplexe notwendig sind. Der Effekt auf die Organellenmorphologie ist wahrscheinlich indirekt (Dimmer *et al.*, 2002).

Zusätzlich zu acht bekannten Genen, die einen wichtigen Einfluss auf die mitochondriale Gestalt haben, befanden sich unter den Klasse I-Mutanten zehn Gene mit bisher unbekannter Funktion und fünf bekannte Gene, die zuvor nicht mit der mitochondrialen Formgebung in Verbindung gebracht worden waren (Dimmer *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Mutanten der Klasse I identifiziert: *mdm33*, *mdm39*, *mmm1* und *mot2*.

Für das *MMM1*-Gen war schon länger bekannt, dass es die mitochondriale Gestalt beeinflusst. *Δmmm1*-Zellen bilden große kugelförmige Mitochondrien aus (Burgess *et al.*, 1994; diese Arbeit, Abb. 5E) und verlieren ihre geordnete innere Struktur (Aiken Hobbs *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass die *mmm1*-Mutante genauso wie die anderen vorher bekannten *mdm*-Mutanten wiedergefunden wurde (Dimmer *et al.*, 2002), bestätigt das Potential des Screening-Ansatzes.

Eine Beteiligung des Proteins Mot2 an der mitochondrialen Formgebung war bisher noch nicht beschrieben worden. Das Gen *MOT2* kodiert für einen allgemeinen negativen Regulator für verschiedene Gene in *S. cerevisiae* (Cade und Errede, 1994; Irie *et al.*, 1994). Unter anderem sind davon paarungsspezifische Gene betroffen. Mitochondrien von  $\Delta mot2$ -Zellen sind oft fragmentiert und aggregiert (Dimmer *et al.*, 2002; diese Arbeit, Abb. 5D). Dieser Phänotyp ist vermutlich auf eine pleiotrope Wirkung des Mot2-Proteins zurückzuführen.

*MDM33* und *MDM39* sind Gene mit bisher unbekannter Funktion.  $\Delta mdm39$ -Zellen weisen fragmentierte Mitochondrien auf (Dimmer *et al.*, 2002; diese Arbeit, Abb. 5C), wohingegen Mitochondrien von  $\Delta mdm33$ -Zellen einen völlig neuartigen Phänotyp zeigen. Sie besitzen zum größten Teil ring- oder kugelförmige Mitochondrien (Dimmer *et al.*, 2002; Messerschmitt *et al.*, 2003; diese Arbeit, Abb. 5B). Aufgrund des ausgefallenen Erscheinungsbildes der Mitochondrien wurde die  $\Delta mdm33$ -Mutante für eine eingehende Charakterisierung ausgewählt und im Rahmen dieser Arbeit untersucht.



**Abb. 5: Mitochondriale Gestalt der neu-identifizierten *mdm*-Mutanten**

MtGFP-exprimierende Stämme wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium kultiviert und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als Referenz diente der isogene Wildtyp (WT). A-E: jeweils links ist die mitochondriale Struktur abgebildet, rechts die Überlagerung mit der dazu passenden Phasenkontrastaufnahme, bzw. bei E nur Phasenkontrast (A-D: Dimmer *et al.*, 2002). Beschreibung der Mutanten im Text.

<i>Systematische/gängige Bezeichnung des Gens</i>	<i>Funktion des Proteins</i>
YLL006w/ <b>MMM1</b>	mitochondriale Morphologie und Vererbung der mtDNS
YER068w/ <b>MOT2</b>	negativer Regulator verschiedener Gene
YDR393w/ <b>MDM33(SHE9)</b>	unbekannte Funktion
YGL020c/ <b>MDM39</b>	unbekannte Funktion

**Tabelle 5: Für die mitochondriale Morphologie und Vererbung wichtige Gene, die bei der Durchmusterung der Hefemutantenbibliothek gefunden wurden**

Die aufgeführten Klasse I-Gene wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefunden und sind essentiell für die Aufrechterhaltung der normalen mitochondrialen Form. Eine vollständige Liste aller Mutanten befindet sich in Dimmer *et al.* (2002).

### 3.1.2 Mdm33 ist ein neues Protein von 54 kD

Beim Screening sind *Δmdm33*-Zellen aufgrund ihrer einzigartigen veränderten Mitochondrienmorphologie besonders aufgefallen. Mdm33 ist ein Protein von 456 Aminosäuren (ca. 54 kD), dessen Funktion zu Beginn der vorliegenden Arbeit unbekannt war. Homologe Gene von *MDM33* wurden in den Genomen von *Candida albicans* (CaShe9) (Andaluz *et al.*, 2001), *Schizosaccharomyces pombe* (SPAC823.13cp; GenBank #CAB90158) und *Neurospora crassa* (NCU06546.1) gefunden. Die Homologen weisen vor allem im mittleren Teil des Proteins eine hohe Sequenzidentität auf (Abb. 6; die Sequenzidentität über die gesamte Länge des Proteins beträgt 38%, 37% bzw. 31%). *In silico*-Analysen zeigten eine ähnliche Domänenstruktur der Homologen. Zwei mögliche Transmembrandomänen wurden durch Hydrophathie-Analysen (Hofmann und Stoffel, 1993) vorausgesagt. Bei Mdm33 und dazu verwandten Proteinen befindet sich ein Transmembransegment im letzten Drittel und eines am C-terminalen Ende (Abb. 6). Eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von coiled-coil-Strukturen wird nach dem Coils-Algorithmus (Lupas *et al.*, 1991) vorhergesagt (Abb. 7).

```

S.c. 1 -----MLRYYGATRNLPVFSINKL
C.a. 1 -----MNLFVALSKKKKYQHKLFPYLRPSTDTTTTETREMLSTC
S.p. 1 -----
N.c. 1 MELGESGIDQLELARQQLSSGCRFLLKLPPIPPPPQVQVARLLAPLNRDQPPNIFATD

S.c. 21 MLRASSTFRP-----FHYSSYSLONGDTPD---KGSTNK---NEIRTEPNN----AVWK
C.a. 41 LIRNCVFIRPRLSVICFKAIRYQSKKSDFFD---YTKINDPKLREIIEGSNF-GTEAILK
S.p. 1 -----
N.c. 61 PDPSPSLSAPSGLGWATDPLSLSLSDSLKHIRYTMSSTTAIRLAARPSSWRGTGALSS

S.c. 64 ENIELQ-----WHLKKNLN---ELYSRFNFHRDQLSFQVNKAKKS-----IQEA
C.a. 97 KQREDQDKKKKMEQERKRLEQEREVDRRREEKRAKEESESNKTDNDNEANQHTDDKLAKV
S.p. 1 -----
N.c. 121 GRPLSQFASLPRRSINPISISGMRQGTLLRLSIHDGRIFFFSTQPPKDTPTENMNNKETGSSNV

S.c. 106 NRKLS-----EOENE-----INDSRL-
C.a. 157 NEKLESNFSKTESGKLRGEDTGTRETIVVETEELKLLKAE--NKIIATSKDSVDESIP
S.p. 1 -----
N.c. 181 IFMPPPPPAQTEAPSSGSAKEDTTDATNKSETETPTAASESETS KSSSESDVSSASTSDSA

S.c. 122 NYNK--DELTSAKIEG-----LPSEREQHRKKWSRKLLEYFDLSLQETLFTATRALN
C.a. 215 NLAKEINETIQKQIAG-----LPSQAKAKNSKLAKNLTKYLD SAHDTILTATRALN
S.p. 1 -----MLQR-----LSQSIKGFARFPKIYNKNGSVQOTILQASORLN
N.c. 241 NSSETTTTTTSETTPENGNNDTAQPELPSRTEAHRARLSARFSTIMDNFQTRLLTATQTLN

S.c. 171 DVTGYSGIQKLLKSSISLMKLEATKKEHKLKFAQYANAIDERAQSOREVNELLORQSAW
C.a. 266 DVTGYSAIKLLKSSIETQEDDLKKAKEKVKQCKIAYGEAILRRSHSOREVNELLTRKHNV
S.p. 40 ELTGYSIEALKNAVVKQETKLRDFRLSAAEARKRYIEAVEKRSSSOREVNELLORSSW
N.c. 301 DLTGYSIEQIKRKNAELEVAHQQAQSRRLRDARHNYKSLTMHRASTQREVTTLLARKDITW

S.c. 231 SSSDLERFTQLYKNDALNARQEQELKNKVKEIESKEEQLNDDLYRAILTRYHEEQIWSDK
C.a. 326 SSNDLERFTELYRNDHENEIHEQEAEEKLDEAESKVDGVQLKLTQSILTRYHEEQIWSDK
S.p. 100 STIDLERFTKLYRDDYSNKEEIKAQEDVDVAERRVEEAQNGLVRSILSRYHEEQVWSDK
N.c. 361 NPLDLERFTSLYRLDHELEAQAQAQELTEAETEESRLSADLNAGILKRYHEEQIWSDR

S.c. 291 IRRSTWGTFFILMGMNIFLFFVVLQLLLEPWKRKRLVG-----SFEDKV-----
C.a. 386 IRRSSTWGTWVLMGLNVLLFVVATFIVEPWKRKRLVS-----AFEDKV-----
S.p. 160 IRQASTWGTWGLMGINVVLFVVVQVLEPWRKRKRLVR-----EAVDHD-----
N.c. 421 IRRQSTWGTWGLMGVNVLLFVVLQVFAEPWRKRKRLMKGIAENEKGVIDEVRHELQVQRQA

S.c. 334 -----KS-----ALNEYAKEQNMKMDKL----LPGKS-----SEVTD
C.a. 429 -----KQ-----VLVGISOENEQILD-----P-----
S.p. 204 -----KE-----RELEINDELKKISEKL----DKKGE-----AVGQA
N.c. 481 LEASGLRETAHLARLMEQEREIQALASTSSSSGDPQGGGRTEGEVEMDIGAEFMAAAA

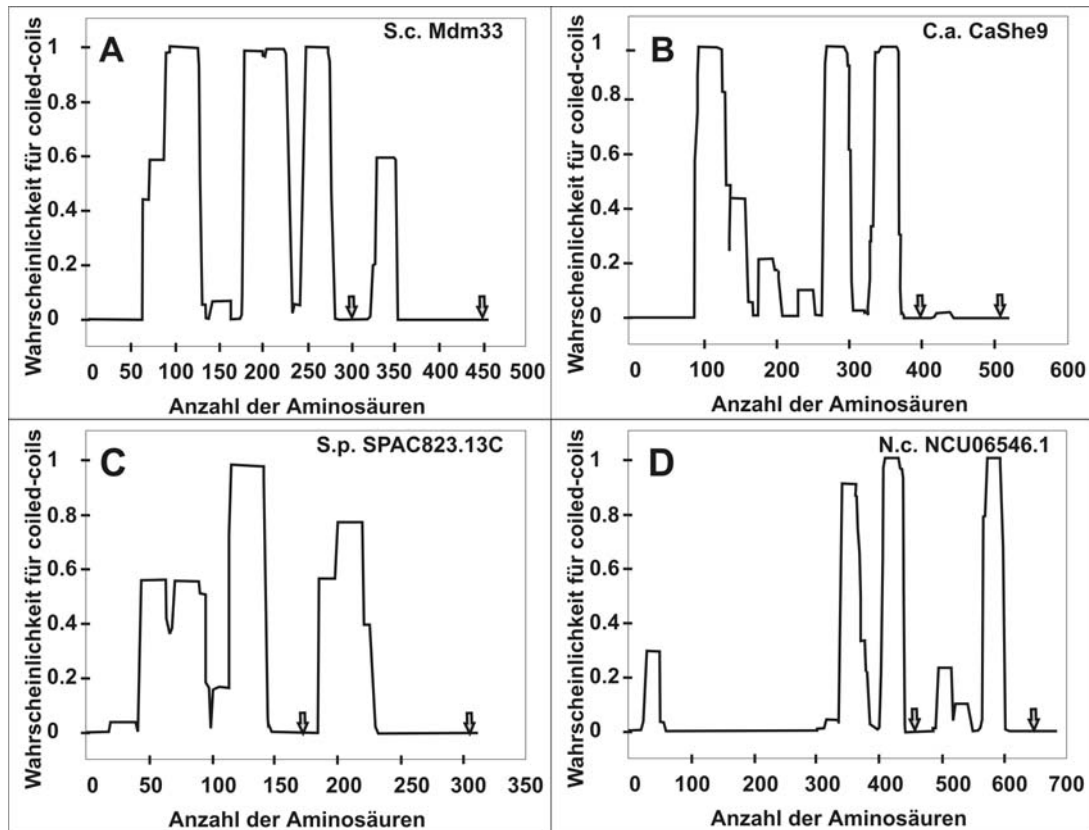
S.c. 362 QGNTENSIVEEHIEQGECKINTAEIDRPEVATAETTTTEMKSFREDIWER-----IKA
C.a. 446 -----IIEKLEPTDGOVPIK-----TSFDFKQFVTNTWHG-----LKA
S.p. 232 LELTSPKIDNKNLPKNSASLIL-----PFINYDTFHSFLDS-----LKY
N.c. 541 EAAEEAATAQQQQQQQQQQQQHHQTPETQEEPQQPPLTWKQTAQKQQQTLSDPQQIKA

S.c. 415 LFVT-LKSIQYRKL DAP-LVFD TLE-FYLYSISLVSM TILVSGLI-----
C.a. 478 ALVRNYEALMSPEITN--LEFDKFE-FELFTMTVAIVAFSMGSLIVSLFK
S.p. 271 FLSRFLSTDYRIQLTYRQLSILATK-FTVGGGVIIYTFIHLFLGLAFKR--
N.c. 601 AVVD-LYSDRRIDLKMRDVSLLALESAAATGAAVVASVAFFVLRSSGSGKA

```

**Abb. 6: Aminosäuresequenzvergleich von Mdm33 mit seinen Homologen**

Für das Alignment der Proteinsequenz von Mdm33 und seiner Homologe wurden die Programme ClustalW und Boxshade 3.21 ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) verwendet. Aminosäuren, die in allen vier Homologen identisch sind, sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. Die Positionen von Transmembransegmenten wurden mit dem Programm TMpred ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org); nach Hoffmann und Stoffel, 1993) berechnet und durch graue Kästen markiert. S.c.: *Saccharomyces cerevisiae* Mdm33; C.a.: *Candida albicans* CaShe9; S.p.: *Schizosaccharomyces pombe* SPAC823.13C; N.c.: *Neurospora crassa* NCU06546.1.



### Abb. 7: Mdm33 und seine Homologe besitzen coiled-coil-Strukturen

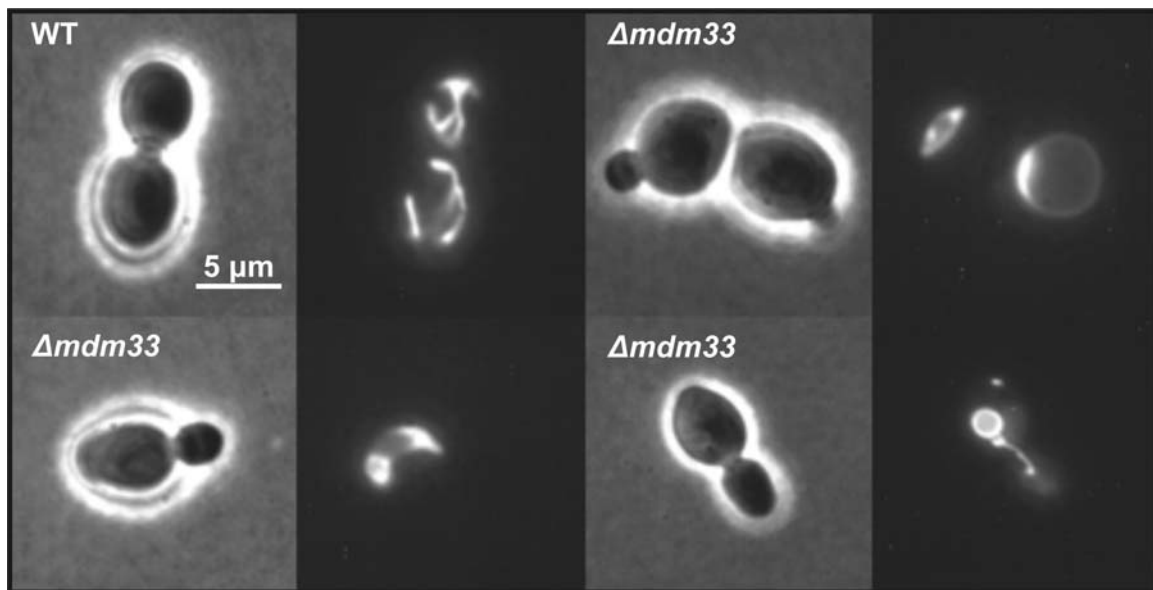
Abgebildet ist die Vorhersage für die Ausbildung von coiled-coil Konformationen nach Lupas et al. (1991) (coils; [www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) für Mdm33 und seine Homologe. Die verwendete Fenstergröße war 21. Die Positionen der vorhergesagten Transmembransegmente sind mit Pfeilen markiert. S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*; C.a.: *Candida albicans*; S.p.: *Schizosaccharomyces pombe*; N.c.: *Neurospora crassa*.

### 3.1.3 Phänotyp von $\Delta mdm33$ -Zellen

Eine Dokumentation des Phänotyps der  $\Delta mdm33$ -Zellen wurde bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen durchgeführt. Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Veränderungen der mitochondrialen Morphologie in  $\Delta mdm33$ -Zellen von der Kohlenstoffquelle und damit der Atmungsaktivität abhängig sind (3.1.3.1). Außerdem wurde untersucht, ob sich das Wachstumsverhalten der  $\Delta mdm33$ -Zellen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und bei unterschiedlichen Temperaturen verändert (3.1.3.2).

### 3.1.3.1 $\Delta mdm33$ -Zellen besitzen veränderte Mitochondrien

Die mitochondriale Morphologie der  $\Delta mdm33$ -Mutante wurde in einem Stamm untersucht, der mtGFP exprimiert. Als Kontrolle diente der isogene Wildtyp. Beide Stämme wurden in Flüssigkultur mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose, Glycerin und Galaktose) bis zur logarithmischen Phase angezogen und dann mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.



**Abb. 8:  $\Delta mdm33$ -Zellen besitzen eine stark veränderte mitochondriale Gestalt**

MtGFP-exprimierende Wildtyp-Zellen (WT) und  $\Delta mdm33$ -Zellen wurden in YPD-Flüssigmedium bis zur logarithmischen Phase angezogen und mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Links die Phasenkontrastaufnahme, rechts jeweils die Fluoreszenzaufnahme (weitere Aufnahmen in Messerschmitt et al., 2003).

Morphologie	Stamm/Medium					
	MDM33			$\Delta mdm33$		
	YPD	YPGal	YPG	YPD	YPGal	YPG
Wildtyp-ähnlich	97%	99%	98%	-	-	-
große Ringe	-	-	-	41%	40%	52%
kleine Ringe	-	-	-	39%	41%	17%
Schläuche	1%	-	-	13%	10%	5%
aggregiert/ fragmentiert	2%	1%	11%	7%	9%	26%
Gesamtzellzahl	394	281	109	433	242	104

**Tabelle 6: Auswertung der mitochondrialen Morphologie in  $\Delta mdm33$ -Zellen**

Zur Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie wurden mtGFP-exprimierende Wildtyp-Zellen (MDM33) und  $\Delta mdm33$ -Zellen in dem entsprechenden Medium bis zur logarithmischen Phase angezogen und die morphologischen Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Unabhängig von der Kohlenstoffquelle zeigte die Mehrheit der *Δmdm33*-Zellen Mitochondrien, die entweder eine große ring- bzw. schüsselförmige Struktur bildeten, oder zwei bis vier kleinere Ringe, die teilweise verknüpft waren (Abb. 8). Dieser Phänotyp ist charakteristisch für *Δmdm33*-Zellen unter allen untersuchten Bedingungen. Ein geringer Anteil der Zellen wies einige schlauchförmige Mitochondrien auf, gelegentlich waren die Mitochondrien fragmentiert und/oder aggregiert. Ein verzweigtes Schlauchsystem wie in Wildtyp-Zellen konnte nicht beobachtet werden. Eine Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie der Deletionsmutante und ihres isogenen Wildtyps ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

Die mitochondrialen Strukturen der Deletionsmutante, die im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten waren, ließen vermuten, dass die veränderten Mitochondrien Hohlkugeln ausbilden können. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden folgende Stämme hergestellt: *Δmdm33* und Wildtyp-Zellen, welche sowohl mitochondriales GFP (pYX142-mtGFP; Westermann und Neupert, 2000) als auch cytosolisches RFP (pVT102U-cytRFP; diese Arbeit, Methodenteil 2.1.4.1) exprimierten. Diese Stämme wurden mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Stefan Jakobs, Göttingen). Das Innere der Ringe und Kugeln enthielt RFP, bestand also aus Cytosol (Messerschmitt *et al.*, 2003). Eine Assoziation mit anderen Zellorganellen konnte nicht beobachtet werden (Messerschmitt *et al.*, 2003).

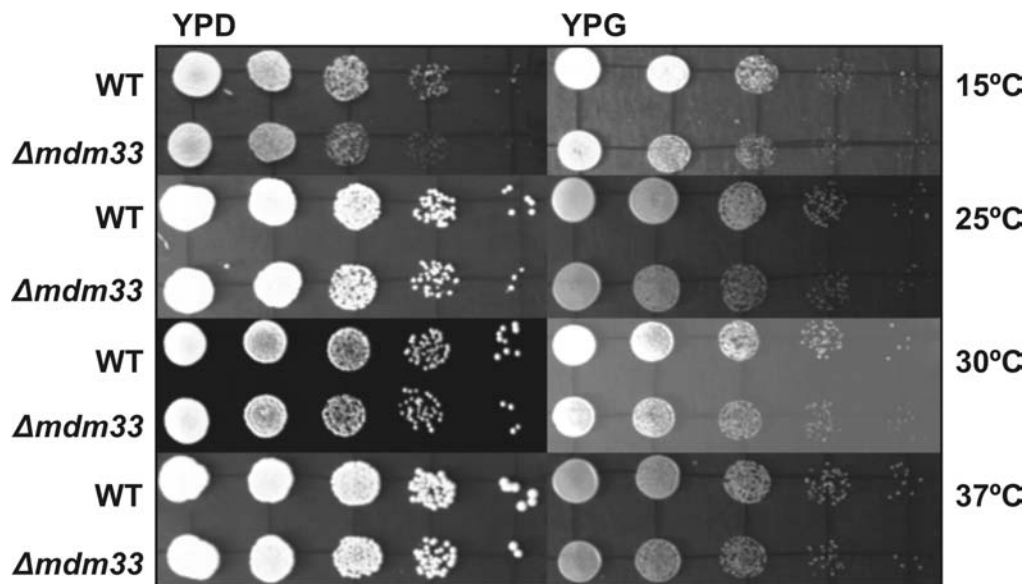
### 3.1.3.2 Wachstumsverhalten von *Δmdm33*-Zellen bei verschiedenen Temperaturen

Um einen möglichen Einfluss der Temperatur auf das Wachstumsverhalten von *Δmdm33*-Zellen zu untersuchen, wurde ihr Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen dokumentiert.

Verdünnungsreihen (ausgehend von einer Flüssigkultur mit einer OD von 1) in 10er Potenzen, wurden auf glukose- oder glyzerinhaltige Medien getropft. Nach einer Inkubationszeit von einem (bei 37°C) bis fünf (bei 15°C) Tagen wurde für die verschiedenen Temperaturen (15°C, 25°C, 30°C und 37°C) das Wachstum dokumentiert.

*Δmdm33*-Zellen zeigten bei allen Temperaturen ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der isogene Wildtyp (Abb. 9). Unterschiedliche Temperaturen haben demnach keinen Einfluss auf das Wachstum von *Δmdm33*-Zellen.





**Abb. 9: Die  $\Delta mdm33$ -Mutante zeigt kein verändertes Wachstumsverhalten**

Wachstumsphänotyp der  $\Delta mdm33$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp (WT). Verdünnungsreihen in 10er Potenzen wurden auf glukose- (YPD) oder glyzerinhaltige (YPG) Agarplatten aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 1-5 Tagen bei verschiedenen Temperaturen (15°C, 25°C, 30°C und 37°C) wurde das Wachstum beobachtet.

**3.1.3.3 In  $\Delta mdm33$ -Zellen sind das Endoplasmatische Retikulum, das Aktincytoskelett und die Vakuolen unverändert**

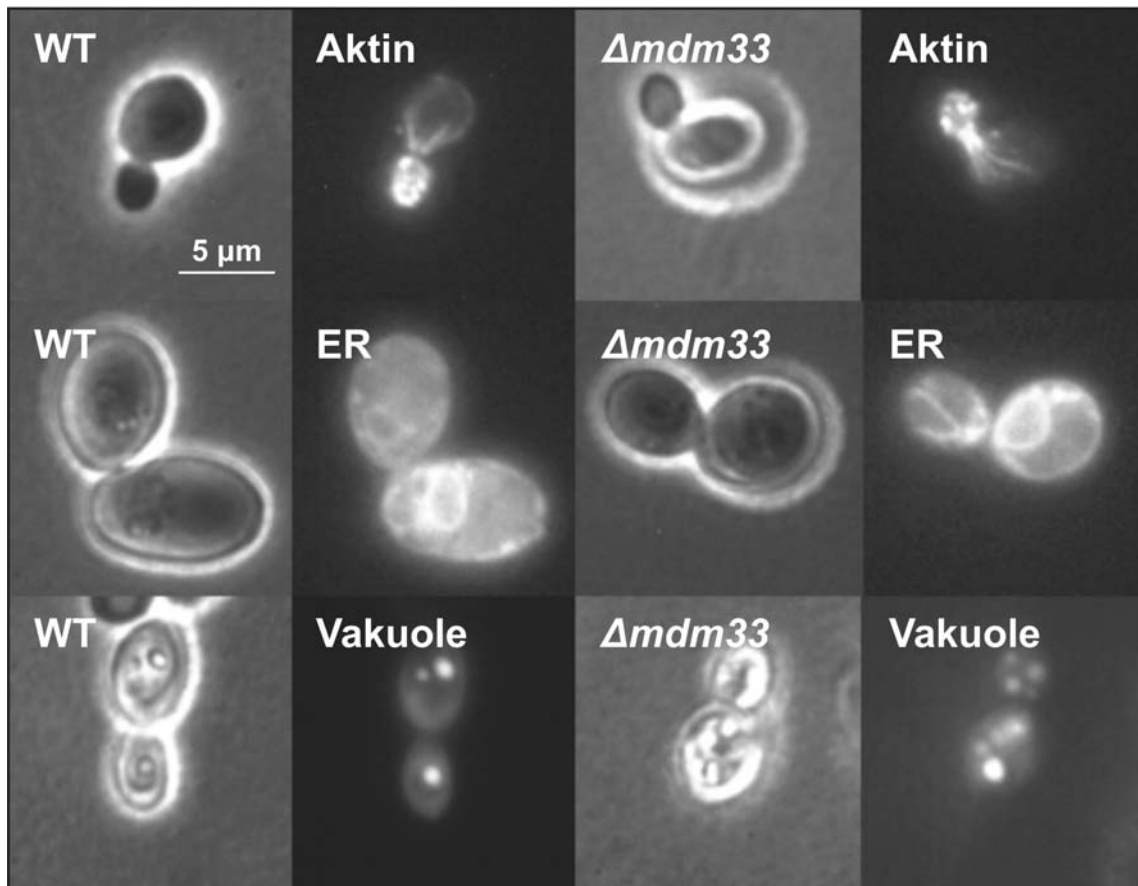
Da ein verändertes Aktincytoskelett Einfluss auf Verteilung und Gestalt von Organellen nehmen kann (Mulholland *et al.*, 1997; Boldogh *et al.*, 2001), wurde untersucht, ob die veränderte mitochondriale Morphologie in  $\Delta mdm33$ -Zellen eventuell auf eine gestörte Struktur des Aktincytoskeletts zurückzuführen ist. Alternativ könnte das Fehlen von Mdm33 in der Zelle Auswirkungen auf die Struktur anderer Organellen zeigen.

Das Aktincytoskelett wurde mit Rhodamin-Phalloidin sichtbar gemacht (Amberg, 1998). Dazu wurden die Zellen in YPD-Flüssigmedium bis zur logarithmischen Phase angezogen, fixiert und gefärbt. Um das Endoplasmatische Retikulum (ER) spezifisch zu färben, wurden Wildtyp und  $\Delta mdm33$ -Zellen mit einem erGFP-exprimierenden Plasmid (pWP1055; Prinz *et al.*, 2000) transformiert. Vakuolen wurden mit einem vakuolenspezifischen Farbstoff (7-Amino-4-Chloromethylcoumarin, Molecular Probes) sichtbar gemacht.

Eine Veränderung der Morphologie konnte für keine dieser Zellstrukturen festgestellt werden. So waren das Aktincytoskelett, das Endoplasmatische Retikulum sowie die Vakuolen von

*Δmdm33*-Zellen im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb. 10; Messerschmitt *et al.*, 2003).

Mdm33 ist somit ein Protein, das spezifisch für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie benötigt wird. Sein Fehlen hat keine allgemeinen Auswirkungen auf andere zelluläre Strukturen und Organellen.



**Abb. 10: Das Fehlen von Mdm33 hat keinen Einfluss auf die Morphologie des Aktincytoskeletts, des Endoplasmatischen Retikulums und der Vakuolen**

**Obere Reihe:** Struktur des Aktincytoskeletts in Wildtyp-Zellen (WT) und *Δmdm33*-Zellen. Die Zellen wurden in YPD-Medium bis zur logarithmischen Phase angezogen, fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt.

**Mittlere Reihe:** Morphologie des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Wildtyp und *Δmdm33*-Zellen exprimieren ein ER-lokalisiertes GFP (Plasmid pWP1055, Prinz *et al.*, 2000). Die Zellen wurden in synthetischem Medium ohne Methionin bis zur logarithmischen Phase angezogen.

**Untere Reihe:** Vakuolengestalt. Wildtyp und *Δmdm33*-Zellen wurden in YPD-Medium bis zur logarithmischen Phase angezogen und mit 7-Amino-4-Chloromethylcoumarin, einem vakuolenspezifischen Farbstoff (Molecular Probes), angefärbt.

Links jeweils die Phasenkontrastaufnahme, rechts die Fluoreszenzaufnahme.

### 3.1.4 Lokalisation und Topologie von Mdm33

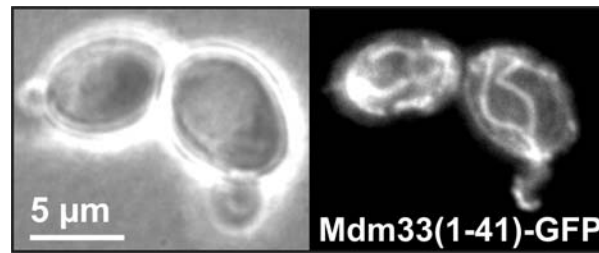
#### 3.1.4.1 Mdm33 ist in Mitochondrien lokalisiert

Der N-Terminus von Mdm33 weist eine hohe Zahl positiv geladener und hydroxylierter Aminosäuren auf, wohingegen negative Ladungen fehlen (Abb. 6). Diese Aminosäurezusammensetzung und ihre Anordnung spricht für die Ausbildung einer positiv geladenen amphiphilen Helix, welche typisch ist für kernkodierte Proteine, die posttranslational in Mitochondrien importiert werden (von Heijne, 1986). Mögliche Prozessierungsstellen für die Matrix-Prozessierungs-Peptidase (MPP) liegen nach den Aminosäureresten 24 und 30. Der N-Terminus besitzt somit typische Eigenschaften einer klassischen mitochondrialen Präsequenz (Hartl *et al.*, 1989). Aufgrund des sehr spezifischen Phänotyps der Mitochondrien, wurde eine mögliche Lokalisierung von Mdm33 in diesem Organell untersucht.

##### 3.1.4.1.1 Der N-Terminus von Mdm33 dient als Importsignal für Mitochondrien *in vivo*

Ob der N-Terminus von Mdm33 tatsächlich ein Importsignal darstellt, sollte *in vivo* gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Plasmid (Mdm33(1-41)-GFP) konstruiert, welches die ersten 41 Aminosäurereste von Mdm33 als Fusionsprotein mit C-terminaler GFP-Domäne in Hefe exprimiert. Die Expression des chimären Proteins unterliegt der Kontrolle eines *GALI*-Promotors und kann durch Zugabe von Galaktose zur Überexpression angeregt werden. Das Wachstum der transformierten Wildtyp-Hefen erfolgte in galaktosehaltigem Medium bis zur logarithmischen Phase. Diese Kulturen wurden im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Durch den Import des Fusionsproteins sind die Mitochondrien anhand des GFP-Signals deutlich zu erkennen (Abb. 11). Somit konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von Mdm33 eine funktionelle Importsequenz darstellt. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis auf eine mitochondriale Lokalisierung von Mdm33.



**Abb. 11: Mdm33(1-41)-GFP ist in Mitochondrien lokalisiert**

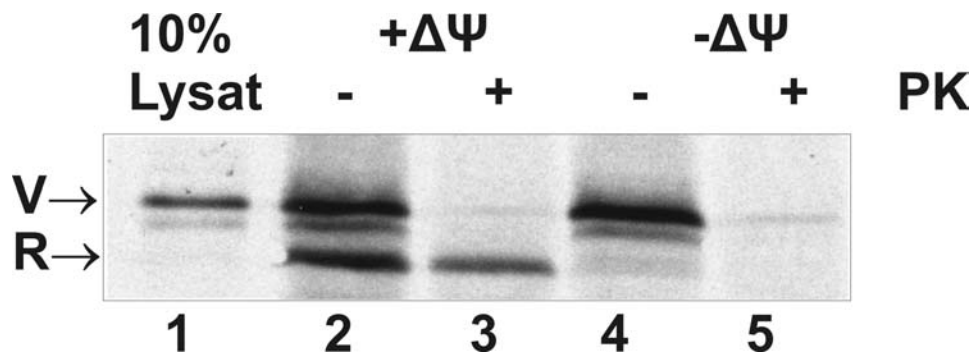
Abgebildet sind Wildtyp-Zellen welche ein chimäres GFP exprimieren. Das chimäre Protein besteht aus den N-terminalen 41 Aminosäureresten von Mdm33 gefolgt von GFP. Die Expression wird von einem Gal-Promotor kontrolliert. Die Aufnahmen entstanden nach dem Wachstum bis zur logarithmischen Phase in YPGal. Links: Phasenkontrast; Rechts: GFP-Fluoreszenz.

**3.1.4.1.2 Mdm33 wird in isolierte Mitochondrien importiert**

Um zu überprüfen, ob auch das authentische Mdm33-Protein in Mitochondrien importiert wird, wurde sein Import *in vitro* getestet.

Mdm33 wurde in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]Methionin mit Retikulozytenlysat synthetisiert. Für den *in vitro*-Import wurde das Protein mit isolierten Wildtyp-Mitochondrien inkubiert. Es wurden vier verschiedene Importansätze durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden die Mitochondrien nach dem Import unbehandelt auf Eis gelagert. Im zweiten Ansatz wurden sie nach dem Import auf Eis mit Proteinase K (PK) behandelt, um nicht-importiertes Material proteolytisch zu verdauen. Im zweiten und dritten Ansatz wurde der Import in Gegenwart von Valinomycin durchgeführt, welches das Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) zerstört. Auch diese Mitochondrien wurden anschließend auf Eis gelagert bzw. mit Proteinase K behandelt. Alle Proben wurden schließlich mit TCA gefällt und mit SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Das radioaktiv markierte Translationsprodukt konnte als Bande von 60 kD nachgewiesen werden (Abb. 12, Spur 1). Das relativ langsame Laufverhalten von Mdm33 in der SDS-PAGE wird möglicherweise durch den hohen Gehalt an basischen Aminosäureresten (isoelektrischer Punkt von 9,36) hervorgerufen. Die Präsequenz von Mdm33 wird in Abhängigkeit vom Membranpotential prozessiert (Abb. 12, vgl. Spuren 2 und 3 gegen 4 und 5). Das prozessierte Protein ist gegen exogen zugegebene Protease geschützt (Abb. 12, Spur 3). Damit verhält sich Mdm33 wie ein typisches mitochondriales Protein, das in die Matrix oder die Innenmembran importiert wird.



**Abb. 12: Mdm33 wird abhängig vom Membranpotential in Mitochondrien importiert**  
 Mdm33 wurde in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin synthetisiert und in isolierte Mitochondrien importiert. Die Menge des geladenen Vorstufenproteins in Spur 1 entspricht 10% des eingesetzten Vorstufenproteins für jede Importreaktion. Gleiche Anteile wurden entweder unbehandelt auf Eis gelagert (Spur 2), mit Proteinase K (PK) behandelt (Spur 3), oder der Import wurde in Gegenwart von Valinomycin durchgeführt, um das Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) zu zerstören, jeweils ohne (Spur 4) oder mit (Spur 5) anschließender Proteinase K-Behandlung. V: Vorstufenprotein, R: reifes Mdm33, PK: Proteinase K.

### 3.1.4.1.3 Epitop-markiertes Mdm33 fraktioniert mit Mitochondrien

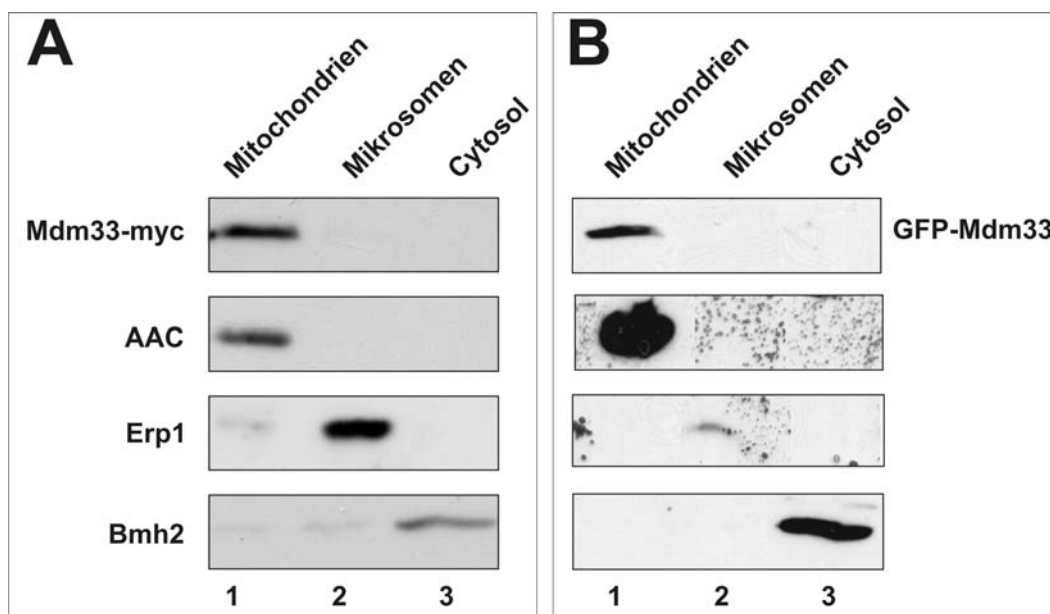
Um eine mitochondriale Lokalisierung von Mdm33 zu bestätigen, sollte untersucht werden, ob Mdm33 bei der Subfraktionierung von Zellen mit mitochondrialen Markern kofraktioniert.

Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Stämme mit Epitop-markierten Versionen von Mdm33 hergestellt. Einerseits wurde über homologe Rekombination ein Stamm erzeugt, der ein genomisches Allel trägt, welches ein Mdm33-Protein mit einem C-terminalen Anhängsel von 13 Kopien des myc-Epitops exprimiert (Mdm33-myc). Andererseits wurde ein Plasmid hergestellt, welches eine GFP-Domäne zwischen der Präsequenz und dem reifen Teil von Mdm33 enthält (GFP-Mdm33). Dieses Plasmid wurde in den  $\Delta m d m 3 3$ -Stamm transformiert. Zellextrakte beider Stämme wurden durch differentielle Zentrifugation in eine mitochondriale, eine mikrosomale und eine cytosolische Fraktion aufgetrennt. Die Mitochondrien wurden zusätzlich über einen Saccharosegradienten gereinigt. Die Fraktionen wurden mit SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

Das Mdm33-myc-Protein wurde ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen (Abb. 13A, Spur 1). Allerdings ist dieses Fusionsprotein offenbar nicht funktionell, da die Mitochondrien in diesem Stamm den Phänotyp der  $\Delta m d m 3 3$ -Mutante aufwiesen (nicht gezeigt). Das GFP-Mdm33-Fusionsprotein ist hingegen funktionell, da es nach Expression in  $\Delta m d m 3 3$ -Zellen den Wildtyp-Phänotyp der Mitochondrien wiederherstellen konnte (nicht

gezeigt). Auch hier zeigte die subzelluläre Fraktionierung eine eindeutige Lokalisierung des GFP-markierten Mdm33 in der mitochondrialen Fraktion (Abb. 13B, Spur 1).

Da die C-terminale Markierung von Mdm33 einen Verlust der Funktion zufolge hatte, scheint dieser Teil des Proteins sehr wichtig für seine Funktion in der Zelle zu sein. Eine Markierung zwischen der Präsequenz und dem reifen Teil hingegen beeinträchtigte die Funktion des Proteins nicht. Durch den Nachweis des Epitop-markierten Mdm33 in der mitochondrialen Fraktion konnte eine mitochondriale Lokalisierung von Mdm33 eindeutig belegt werden.



### Abb. 13: Mdm33 ist in Mitochondrien lokalisiert

**A:** Zellen, die Mdm33 mit einem 13fachen Myc-Epitop am C-terminalen Ende exprimierten, wurden in eine mitochondriale Fraktion (1), Mikrosomenfraktion (2) und in eine cytosolische Fraktion (3) aufgetrennt. Die Analyse der Fraktionierung erfolgte durch SDS-PAGE, Westernblot und Dekoration mit Antiseren gegen Markerproteine. Der Nachweis von Mdm33 erfolgte mit einem Myc-Antiserum, als mitochondrialer Marker diente AAC, für das ER (Endoplasmatisches Retikulum) wurde Erp1-Antiserum eingesetzt und für das Cytosol Bmh2.

**B:** GFP-Mdm33 exprimierende Zellen wurden wie für A beschrieben fraktioniert. Der Nachweis von Mdm33 wurde durch ein Antiserum gegen GFP durchgeführt.

AAC: ADP/ATP-Carrier, lokalisiert in der Innenmembran der Mitochondrien. Erp1: Emp24p/Erv25p related protein, lokalisiert im ER. Bmh2: Brain modulosignalin homolog, lokalisiert im Cytosol.

### 3.1.4.2 Submitochondriale Lokalisierung und Topologie von *in vitro* importiertem Mdm33 in Mitochondrien

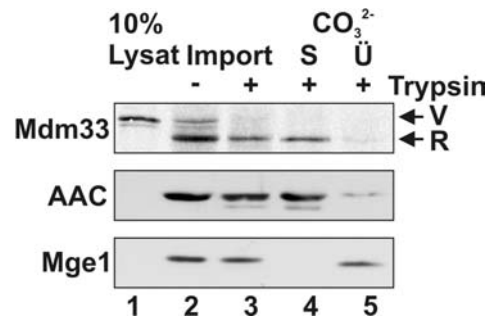
Die oben beschriebenen *in vitro* und *in vivo*-Experimente belegen, dass Mdm33 mitochondrial lokalisiert ist. Die submitochondriale Lokalisierung und die Topologie von Mdm33 sollte nun näher untersucht werden.

#### 3.1.4.2.1 Mdm33 ist ein integrales Membranprotein

Zwei Transmembransegmente wurden durch die Analyse der Aminosäuresequenz von Mdm33 mit dem Computerprogramm TMPred ([www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) vorhergesagt. Mit einer Carbonatextraktion kann zwischen integralen Membranproteinen einerseits und löslichen Proteinen oder peripher assoziierten Membranproteinen andererseits unterschieden werden (Fujiki *et al.*, 1982).

Radioaktiv markiertes Mdm33 wurde *in vitro* in isolierte Mitochondrien importiert, und anschließend wurde eine Carbonatextraktion durchgeführt. Dazu wurden die reisolierten Mitochondrien in 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11,5) resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C im Überkopftaumler inkubiert. Unlösliche Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation sedimentiert und in SDS-Probenpuffer gelöst. Die löslichen Proteine wurden mit TCA gefällt und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte mit SDS-PAGE, Westernblot und Autoradiographie.

Lösliche Proteine, wie z.B. Mge1, befanden sich nach der Extraktion im Überstand, während integrale Membranproteine, wie z.B. AAC, in der unlöslichen Membranfraktion zurückblieben. Mdm33 wurde ausschließlich in der Membranfraktion vorgefunden (Abb. 14). In Übereinstimmung mit dem Hydrophobizitätsprofil konnte damit belegt werden, dass Mdm33 ein integrales Membranprotein ist.



#### Abb. 14: Mdm33 ist ein integrales Membranprotein

Mdm33 wurde wie für Abb. 12 beschrieben in Mitochondrien importiert. Die Menge des Vorstufenproteins in Spur 1 entspricht 10% des eingesetzten Vorstufenproteins für jede Importreaktion. Anteile der Importreaktion wurden entweder unbehandelt auf Eis gelagert (Spur 2) oder mit Trypsin behandelt (Spur 3). Nach dem Abstoppen des Trypsinverdau wurden die trypsinbehandelten Proben mit Carbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) extrahiert und durch Zentrifugation in Überstand (Spur 5) und Sediment (Spur 4) aufgetrennt. Alle Proben wurden anschließend mit TCA gefällt und durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Verwendet wurde als Kontrolle für membrangebundene Proteine ein Antiserum gegen den ADP/ATP-Carrier (AAC), welcher ein integrales Protein der Innenmembran ist. Für den Nachweis von löslichen Proteinen wurde ein Antiserum gegen Mge1 eingesetzt. V: Vorstufenprotein, R: reifes Mdm33; S: Sediment; Ü: Überstand.

#### 3.1.4.2.2 Mdm33 ist in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert

Zur Aufklärung der submitochondrialen Lokalisation und Topologie wurde Mdm33 *in vitro* importiert und die Mitochondrien anschließend subfraktioniert. Proteine des Intermembranraumes sind in intakten Organellen durch die Außenmembran vor einem Abbau durch exogen zugegebene Proteinase K geschützt. Durch osmotisches Schwellen der Mitochondrien kann die Außenmembran geöffnet werden. Dadurch werden die Proteine des Intermembranraumes für den Abbau durch Proteinase K zugänglich. Proteine bzw. Proteinanteile, die in die Matrix ragen, sind auch weiterhin vor einem Abbau geschützt. Dabei erlaubt der Nachweis spezifischer geschützter Fragmente Aussagen über die Topologie von Proteinen der Innenmembran.

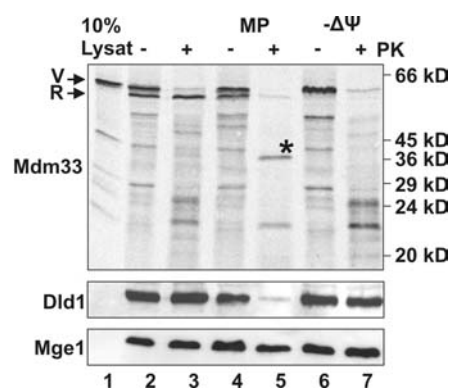
Nach Import von radioaktiv markiertem Mdm33 in Mitochondrien wurde die Außenmembran durch osmotisches Schwellen geöffnet und Proteinase K zugesetzt. Als Kontrollen wurden ein Importansatz ohne Schwellen durchgeführt und ein Ansatz mit Import in Abwesenheit des Membranpotentials. Die Analyse des Experiments erfolgte mit SDS-PAGE, Westernblot und Autoradiographie.



In intakten Mitochondrien war Mdm33 nicht für Proteinase K zugänglich (Abb. 15; Spur 3). Wurde allerdings die Außenmembran durch osmotisches Schwellen geöffnet, entstand durch den PK-Verdau ein charakteristisches Abbauprodukt, welches durch die intakte Innenmembran vor weiterem Abbau geschützt war (Abb. 15, Spur 5). Dieses typische Fragment entsprach der berechneten Fragmentgröße, die den Bereich von der MPP-Prozessierungsstelle bis zur ersten Transmembrandomäne umfasst (34 kD). Der N-Terminus von Mdm33 ragt also in die Matrix. In Abwesenheit des Membranpotentials konnte dieses 34 kD-Fragment nicht nachgewiesen werden (Abb. 15, Spur 7); es handelt sich also nicht um eine Domäne, die aufgrund ihrer Struktur auch ohne Import proteaseresistent ist.

Es konnte somit gezeigt werden, dass Mdm33 ein integrales Protein der Innenmembran ist, dessen N-terminaler Teil in der Matrix lokalisiert ist, und dessen C-terminaler Teil in den Intermembranraum ragt.

Die submitochondriale Lokalisierung von Mdm33 in der Innenmembran wurde auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt (Frank Vogel, Berlin). GFP-markiertes Mdm33 konnte sowohl in den Cristae nachgewiesen werden als auch in der inneren Grenzmembran, wo Innen- und Außenmembran in direkter Nähe vorliegen, (Messerschmitt *et al.*, 2003).



#### Abb. 15: Der N-Terminus von Mdm33 ist in der Matrix lokalisiert

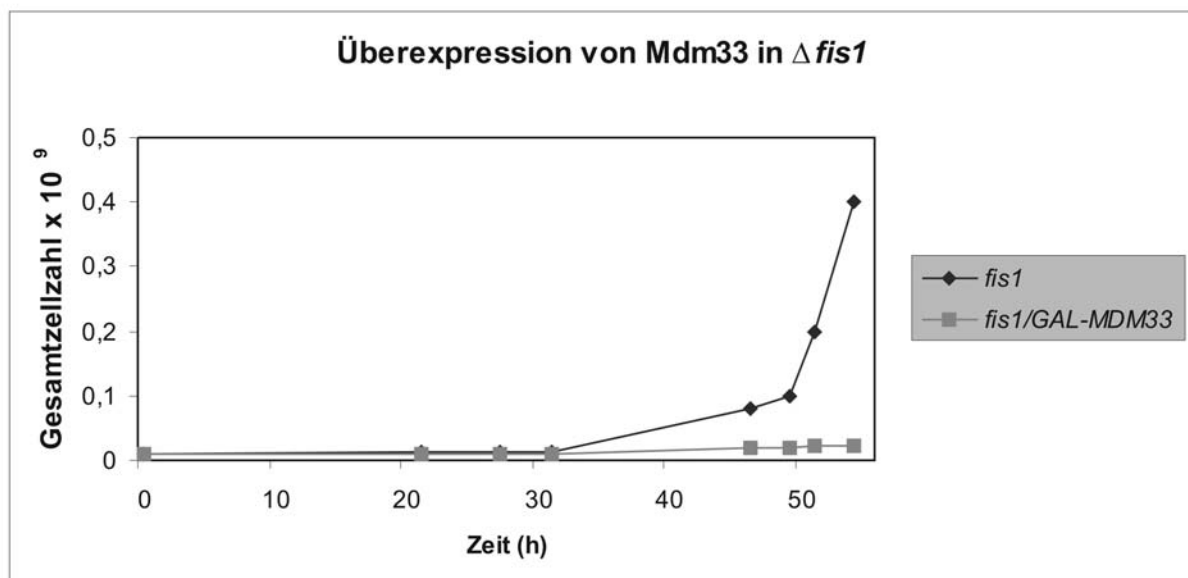
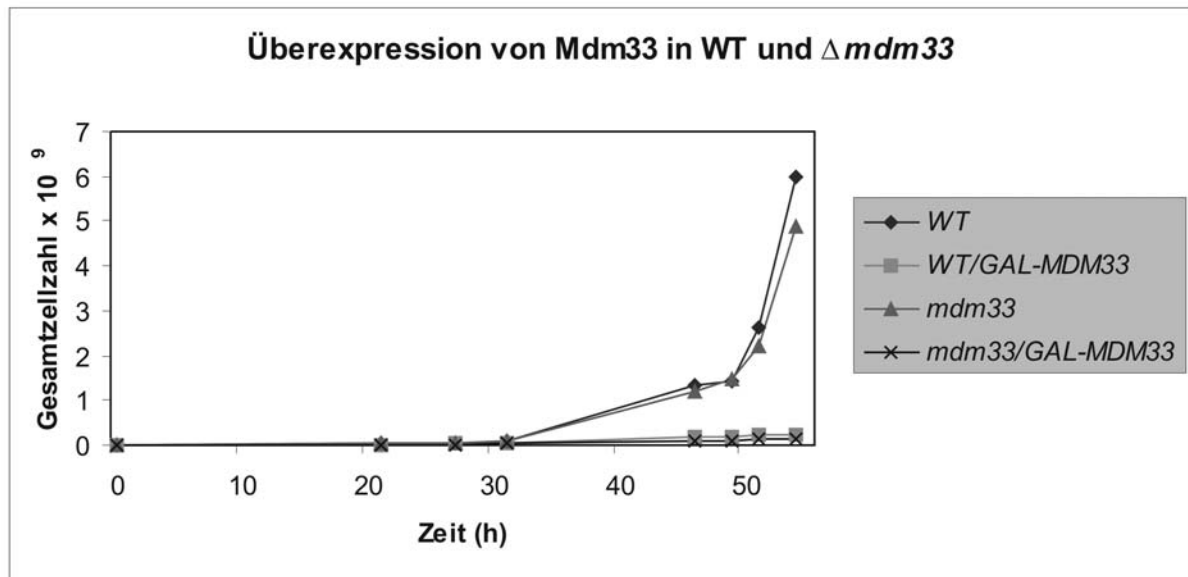
Mdm33 wurde wie oben beschrieben in Mitochondrien importiert (Spur 1: 10% des eingesetzten Lysates). Nach Import von radioaktiv markiertem Mdm33 in Mitochondrien wurde die Außenmembran durch osmotisches Schwellen geöffnet (4 und 5) und Proteinase K zugesetzt (5). Als Kontrollen wurden ein Importansatz ohne Schwellen durchgeführt (2 und 3) und ein Ansatz mit Import in Abwesenheit des Membranpotentials (6 und 7). Die Analyse des Experiments erfolgte mit SDS-PAGE, Westernblot und Autoradiographie. Der Stern markiert ein spezifisches Fragment, welches nach Proteinase K-Behandlung der Mitoplasten entsteht. Die Unversehrtheit der mitochondrialen Membranen wurde durch Dekoration des Westernblots mit Antiseren gegen Dld1 (einem integralen Protein der Innenmembran, dessen Hauptbestandteil im Intermembranraum positioniert ist) und Mge1 (lösliches Matrixprotein) kontrolliert.  $\Delta\Psi$ : Membranpotential; MP: Mitoplasten; PK: Proteinase K; V: Vorstufenprotein; R: reifes Mdm33.

### 3.1.5. Die Überexpression von Mdm33 führt zum Wachstumsarrest

Das *MDM33*-Gen wurde auch unter dem Namen *SHE9* (*sensitive to high expression*) beschrieben, da eine starke Überexpression dieses Gens zum Arrest des Wachstums führt (Espinet *et al.*, 1995). Ob dieser Wachstumsarrest mit einer Veränderung der mitochondrialen Morphologie korreliert, sollte durch Überexpressionsstudien von Mdm33 in verschiedenen Stämmen gezeigt werden. Neben dem Wildtyp und dem  $\Delta$ *mdm33*-Stamm wurde auch der  $\Delta$ *fis1*-Stamm verwendet, dem ein Bestandteil des Teilungsapparates der Außenmembran fehlt.

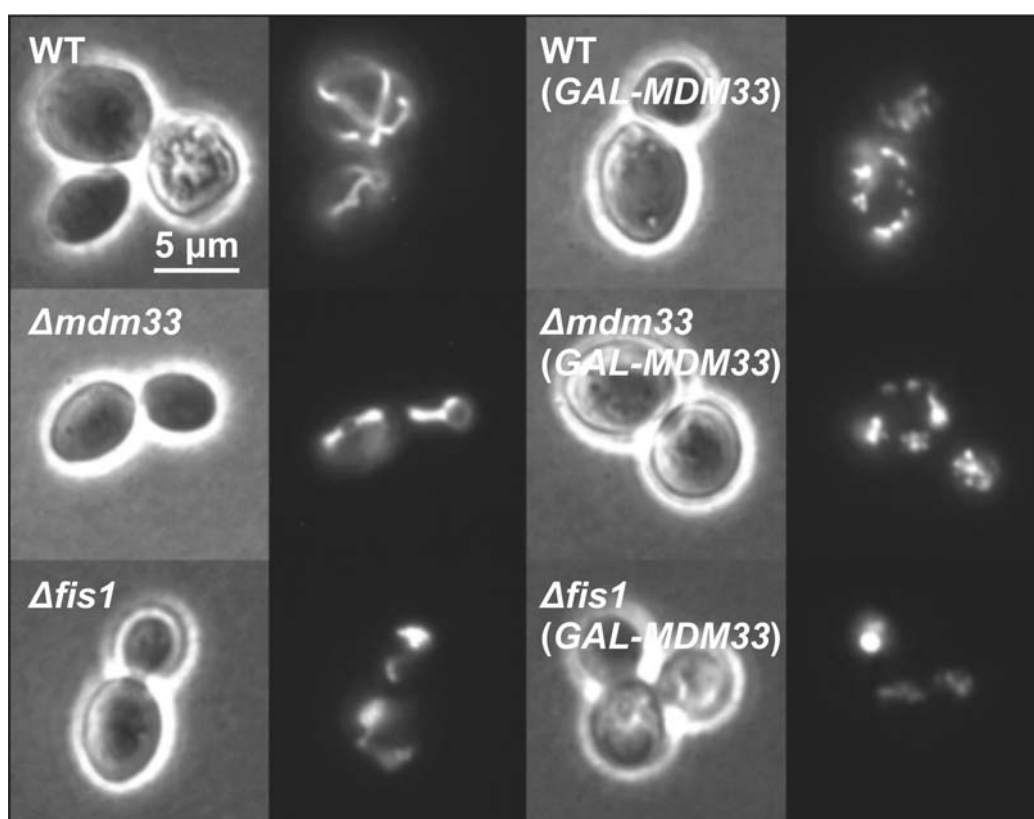
Die kodierende Sequenz von Mdm33 wurde hinter den starken induzierbaren *GALI*-Promotor in ein „multicopy“-Plasmid kloniert (*GAL-MDM33*). Dieses Plasmid wurde in  $\Delta$ *mdm33*-, in Wildtyp- und in  $\Delta$ *fis1*-Zellen transformiert. Der *GALI*-Promotor wird durch eine Änderung der Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium von Glukose auf Galaktose induziert. Als Kontrolle wurden die Stämme verwendet, die mit dem leeren Plasmid (pYX223) transformiert waren. Alle Stämme exprimierten zusätzlich mtGFP. Der mitochondriale Phänotyp wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die Überexpression von Mdm33 führte in allen drei Stämmen zu einer starken Reduzierung des Wachstums, wohingegen die Induktion des Kontrollplasmides keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten hatte. Bei Überexpression von Mdm33 in galaktosehaltigem Medium betrug die Verdopplungszeit 10 Stunden, wohingegen die Kontrollstämme nur 3 Stunden zur Verdopplung benötigten (Abb. 16).



**Abb. 16: Überexpression von Mdm33 verlangsamt das Wachstum**

Wildtyp- (WT),  $\Delta mdm33$ - (*mdm33*) und  $\Delta fis1$ -Zellen (*fis1*), welche entweder mit dem leeren Vektor (pYX223) oder dem Überexpressionplasmid (*GAL-MDM33*) transformiert waren, wurden auf galaktosehaltigem synthetischem Medium ohne Histidin angezogen. Durch das Fehlen von Histidin wurde auf Zellen mit Plasmid selektiert. An den markierten Zeitpunkten wurde die OD<sub>578</sub> gemessen. Das Wachstum ist als Gesamtzahl der Zellen dargestellt.



**Abb. 17: Überexpression von Mdm33 führt zu aggregierten Mitochondrien**

Wildtyp (WT),  $\Delta mdm33$ - und  $\Delta fis1$ -Zellen, transformiert entweder mit dem leeren Plasmid pYX223 oder dem Überexpressionsplasmid *GAL-MDM33*, wurden über Nacht in galaktosehaltigem Medium unter Selektion auf das Plasmid angezogen. Jeweils das linke Bild ist eine Phasenkontrastaufnahme, das rechte Bild die Fluoreszenzaufnahme. Alle Stämme exprimierten mtGFP, um die Mitochondrien sichtbar zu machen.

<i>Morphologie</i>	<i>Wildtyp</i>		<i>Δmdm33</i>		<i>Δfis1</i>	
	Vektor leer	<i>GAL-MDM33</i>	Vektor leer	<i>GAL-MDM33</i>	Vektor leer	<i>GAL-MDM33</i>
<b>Wildtyp</b>	102	17	--	2	--	--
<b>Ringe</b>	--	--	85	11	--	--
<b>Fragmente</b>	1	15	2	25	--	3
<b>Aggregate</b>	1	71	4	59	--	58
<b>Schläuche</b>	--	6	10	5	--	--
<b>Netze</b>	--	--	--	--	101	38
<b>Gesamtzahl</b>	104	109	101	102	103	106

**Tabelle 7: Auswertung der mitochondrialen Morphologie in Mdm33-überexprimierenden Zellen**

Zur Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie wurden mtGFP-exprimierende Wildtyp-Zellen,  $\Delta fis1$ -Zellen und  $\Delta mdm33$ -Zellen mit dem entsprechenden Plasmid (Vektor leer: pYX223, oder Überexpressionsplasmid: *GAL-MDM33*) transformiert, in dem entsprechenden Medium bis zur logarithmischen Phase angezogen und die mitochondriale Morphologie mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Interessanterweise führte die Überexpression von Mdm33 in allen Stämmen zu stark aggregierten und/oder fragmentierten Mitochondrien (Abb. 17). Darüberhinaus zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen eine starke Veränderung der inneren Struktur der Mitochondrien nach Überexpression von Mdm33 (Frank Vogel, Berlin). Die Innenmembran der Mitochondrien zerfällt in zahlreiche kleine Vesikel, und das innere Kompartiment ist teilweise durch Septen der Innenmembran unterteilt (Messerschmitt *et al.*, 2003). Der Wachstumsarrest nach Mdm33-Überexpression korreliert also mit starken Veränderungen der mitochondrialen Morphologie.

### 3.1.6 Epistatische Wechselwirkungen von $\Delta$ mdm33, $\Delta$ fis1 und $\Delta$ fzo1-Mutationen

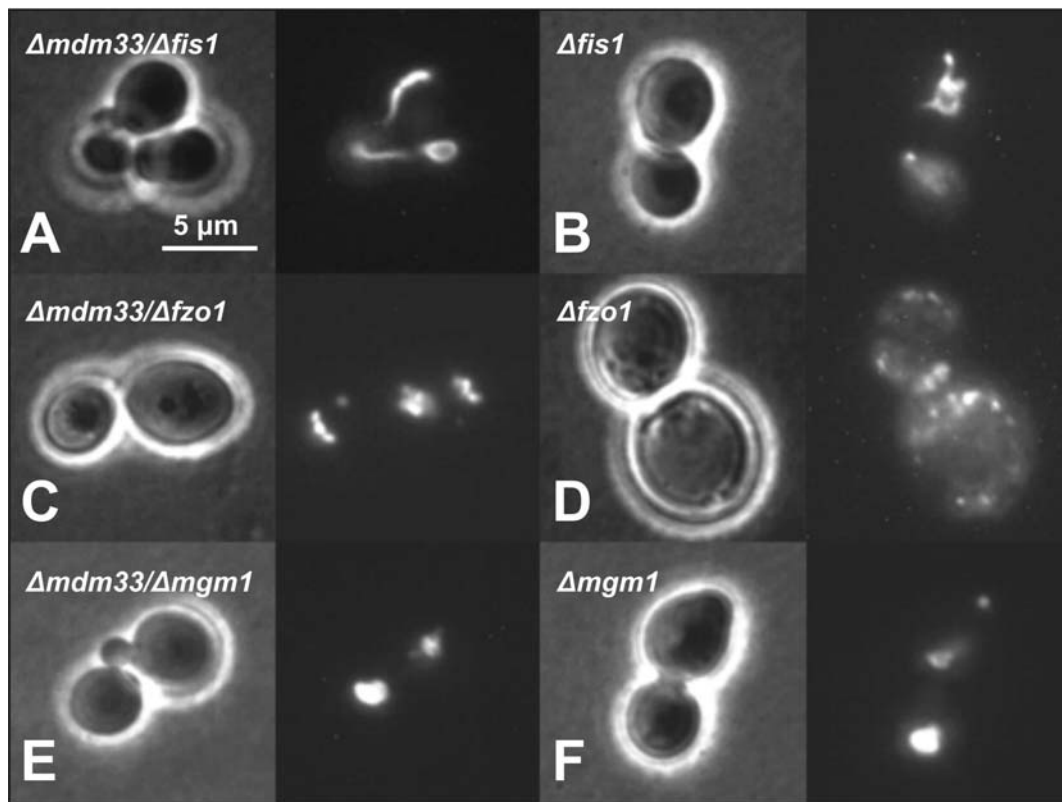
Die Ausbildung und Aufrechterhaltung des tubulären mitochondrialen Netzwerkes ist davon abhängig, dass die Häufigkeiten der Fusions- und Teilungsereignisse aufeinander abgestimmt sind (Nunnari *et al.*, 1997). Wird die mitochondriale Teilung durch Deletion der Gene *DNM1*, *MDV1* oder *FISI* inhibiert, so bilden sich lange tubuläre oder netzartige mitochondriale Strukturen aus (Otsuga *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999; Fekkes *et al.*, 2000; Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Cervený *et al.*, 2001). Deletion der Gene *FZO1* oder *UGO1* blockiert die Fusion der Mitochondrien. Dies führt zu stark fragmentierten Organellen (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Sesaki und Jensen, 2001). Zudem wurde vorgeschlagen, dass Mgm1 an der mitochondrialen Fusion beteiligt ist. In  $\Delta$ mgm1-Zellen ist keine Fusion der Mitochondrien nachweisbar. Vielmehr ist in solchen Zellen Fragmentierung und Aggregation der Mitochondrien zu beobachten (Herlan *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003).

Um zu untersuchen, ob Mdm33 an diesen Prozessen beteiligt ist, wurde die  $\Delta$ mdm33-Mutante mit den  $\Delta$ fis1,  $\Delta$ fzo1 und  $\Delta$ mgm1-Mutanten gekreuzt und der Phänotyp der Doppelmutanten untersucht.

#### 3.1.6.1 Der Phänotyp der $\Delta$ mdm33/ $\Delta$ fis1-Doppelmutante

Die  $\Delta$ mdm33/ $\Delta$ fis1-Doppelmutante war in der Lage, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. Die mitochondriale Gestalt ähnelte stark dem Aussehen des  $\Delta$ mdm33-Elternstammes und unterschied sich deutlich vom  $\Delta$ fis1-Phänotyp. Der größte Anteil der  $\Delta$ mdm33/ $\Delta$ fis1-Zellen wies mitochondriale Ringstrukturen auf, während eine netzartige

Struktur, wie sie bei  $\Delta fis1$ -Zellen zu sehen ist (Mozdy *et al.*, 2000), in keinem Fall beobachtet werden konnte (Tabelle 8, Abb. 18).



**Abb. 18: Phänotyp der Doppelmutanten**

Alle Mutanten exprimierten mtGFP und wurden in YPD-Medium bis zur logarithmischen Phase angezogen. A:  $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Doppelmutante, B:  $\Delta fis1$ -Mutante, C:  $\Delta mdm33/\Delta fzo1$ -Doppelmutante, D:  $\Delta fzo1$ -Mutante, E:  $\Delta mdm33/\Delta mgm1$ -Doppelmutante und F:  $\Delta mgm1$ -Mutante. Links jeweils die Phasenkontrastaufnahme, rechts die Fluoreszenzaufnahme.

<i>Morphologie</i>	<i>Wildtyp</i>	<i>Δfis1</i>	<i>Δmdm33</i>	<i>Δmdm33/Δfis1</i>
<b>Wildtyp</b>	95%	--	--	--
<b>große Ringe</b>	--	--	29%	17%
<b>kleine Ringe</b>	--	1%	41%	44%
<b>Schläuche</b>	--	9%	17%	22%
<b>Fragmente/Aggregate</b>	5%	6%	13%	17%
<b>Netze</b>	--	84%	--	--
<b>Gesamtzellzahl</b>	114	108	115	115

**Tabelle 8: Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie (% der Zellen) in der  $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Doppelmutante**

Zur Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie wurden mtGFP-exprimierende  $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Zellen in YPD-Medium bis zur logarithmischen Phase angezogen und die morphologischen Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Einzelmutanten ( $\Delta mdm33$  und  $\Delta fis1$ ) und der isogene Wildtyp verwendet.

Der durch die Deletion von *MDM33* verursachte Defekt ist also epistatisch zu dem durch die Deletion von *FIS1* verursachten Defekt. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, die in Überexpressionsexperimenten mit *Δfis1*-Zellen gemacht wurden. Überexprimiertes Mdm33 führt zum Arrest des Wachstums und zur Aggregation von Mitochondrien, sowohl in *Δfis1*-Zellen als auch im *FIS1*-Wildtyp-Hintergrund (Abb. 17). Diese genetischen Ergebnisse zeigen, dass Mdm33 agiert, bevor Fis1 benötigt wird.

### 3.1.6.2 Der Phänotyp der *Δmdm33/Δfzo1*-Doppelmutante

Ebenso wie die *Δfzo1*-Einzelmutante (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998) konnte auch die *Δmdm33/Δfzo1*-Doppelmutante nicht auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen (nicht gezeigt). Die mitochondriale Gestalt war von der des *Δfzo1*-Elternteiles nicht unterscheidbar. Fast alle *Δmdm33/Δfzo1*-Zellen zeigten stark fragmentierte Mitochondrien. Es konnten keine typischen *Δmdm33*-Ringstrukturen gefunden werden (Tab. 9, Abb. 18).

Demnach ist der mitochondriale Morphologiedefekt der *Δfzo1*-Mutante epistatisch zu dem der *Δmdm33*-Mutante. *Fzo1* wird also für die Ausbildung der charakteristischen mitochondrialen Struktur der *Δmdm33*-Zellen benötigt. Diese genetischen Daten liefern einen Hinweis darauf, dass die Ring- und Kugelstrukturen in *Δmdm33*-Zellen durch Fusionsereignisse der Organellen mit sich selbst entstehen (Messerschmitt *et al.*, 2003).

<b>Morphologie</b>	<b>Wildtyp</b>	<b><i>Δfzo1</i></b>	<b><i>Δmdm33</i></b>	<b><i>Δmdm33/Δfzo1</i></b>
<b>Wildtyp</b>	98%	--	--	--
<b>große Ringe</b>	--	--	43%	--
<b>kleine Ringe</b>	--	--	43%	<1%
<b>Schläuche</b>	--	--	13%	--
<b>Fragmente</b>	2%	83%	1%	78%
<b>Aggregate</b>	--	17%	--	22%
<b>Gesamtzellzahl</b>	146	103	126	218

**Tabelle 9: Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie (% der Zellen) in der *Δmdm33/Δfzo1*-Doppelmutante**

Zur Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie wurden mtGFP-exprimierende *Δmdm33/Δfzo1*-Zellen in YPD-Medium bis zur logarithmischen Phase angezogen und die morphologischen Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Einzelmutanten (*Δmdm33* und *Δfzo1*) und der isogene Wildtyp verwendet.

### 3.1.6.3 Der Phänotyp der $\Delta m d m 3 3 / \Delta m g m 1$ -Doppelmutante

Die  $\Delta m d m 3 3 / \Delta m g m 1$ -Doppelmutante zeigte ein vergleichbares Erscheinungsbild wie die  $\Delta m g m 1$ -Einzelmutante. Die meisten  $\Delta m d m 3 3 / \Delta m g m 1$ -Zellen besaßen eine mitochondriale Morphologie, die dem  $\Delta m g m 1$ -Elternteil ähnelt. Ihre Mitochondrien bildeten große aggregierte Strukturen aus (Abb. 18). Es wurden keine für  $\Delta m d m 3 3$ -Zellen typischen Ring- oder Kugelstrukturen gefunden.

Demnach ist der mitochondriale Morphologiedefekt von  $\Delta m g m 1$ -Zellen epistatisch zum  $\Delta m d m 3 3$ -Defekt. Ähnlich wie Fzo1 wird Mgm1 also benötigt, um die für  $\Delta m d m 3 3$ -Zellen typischen mitochondrialen Strukturen auszubilden.

### 3.1.7 Mdm33 ist Teil eines höhermolekularen Komplexes mit homooligomeren Interaktionen

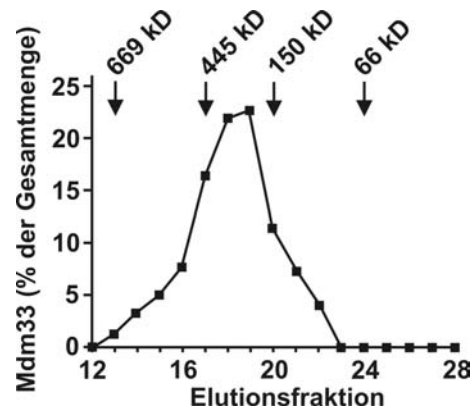
#### 3.1.7.1 Mdm33 ist Teil eines höhermolekularen Komplexes

Die Funktion von Mdm33 bei der mitochondrialen Morphogenese hängt wahrscheinlich davon ab, dass es Protein/Protein-Wechselwirkungen eingeht. Insbesondere können die vorhergesagten coiled-coil-Domänen bei der Bildung von Homo- und/oder Heterooligomeren eine wichtige Rolle spielen. Möglicherweise liegt Mdm33 also in einem größeren Komplex assoziiert mit anderen Proteinen vor.

Um eine Assemblierung in einen höhermolekularen Komplex nachzuweisen, wurde *in vitro*-translatiertes Mdm33 in die Mitochondrien importiert. Nach dem Import wurden die Mitochondrien mit Triton X-100 solubilisiert. Das nicht lysierte und aggregierte Material wurde durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand auf eine Gelfiltrationssäule geladen. Die eluierten Proteine wurden in Fraktionen von 500  $\mu$ l gesammelt und durch TCA-Fällung konzentriert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE, Westernblot und Autoradiographie.

Mdm33 eluierte von der Gelfiltrations-Säule in Fraktionen, die einer molekularen Masse von ca. 300 kD entsprachen (Abb. 19). Dieses Ergebnis spricht für die Ausbildung eines oligomeren Komplexes, der Mdm33 enthält.





### Abb. 19: Mdm33 ist Teil eines höhermolekularen Komplexes

Der Import von *in vitro* synthetisiertem Mdm33 in Wildtyp-Mitochondrien wurde wie in Abb. 12 beschrieben durchgeführt. Nach dem Import wurden die Mitochondrien mit Triton X-100 solubilisiert und auf eine Superose-6-Säule aufgetragen. Nach der Chromatographie wurden die gesammelten Fraktionen durch SDS-PAGE, Westernblot und Autoradiographie aufgearbeitet. Mdm33 wurde durch Densitometrie quantifiziert. Für die Kalibrierung der Säule wurden folgende Markerproteine verwendet: Thyreoglobulin: 669 kD, Apoferritin: 445 kD, Alkoholdehydrogenase: 150 kD, BSA: 66 kD.

#### 3.1.7.2 Importiertes Mdm33 kann spezifisch mit GFP-Mdm33 koimmungefällt werden

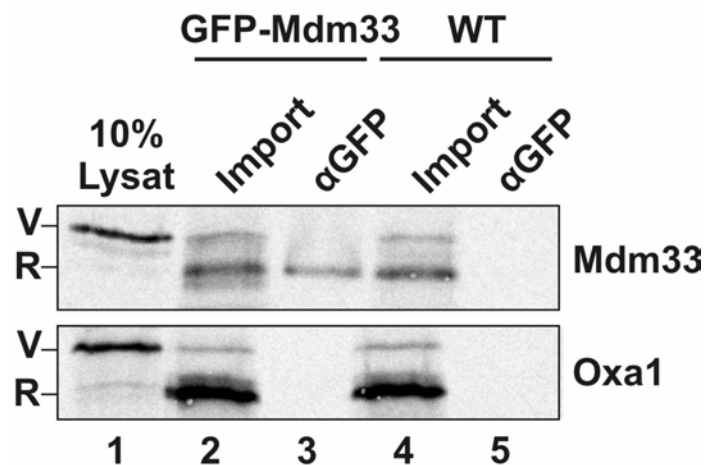
Um gezielt die Wechselwirkungen von Mdm33 mit anderen Proteinen zu untersuchen, wurden Koimmunfällungsexperimente durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob Mdm33 homooligomere Wechselwirkungen eingeht.

In vitro-translatierte Vorstufenproteine wurden entweder in Wildtyp- oder GFP-Mdm33-Mitochondrien importiert. Nach Beendigung der Importreaktion wurden die Mitochondrien mit Detergenz solubilisiert. Für die Koimmunfällung wurden Antikörper gegen die GFP-Domäne verwendet. Es wurde die Interaktion von GFP-Mdm33 mit importiertem Mdm33 und Oxa1 getestet. Oxa1 ist ein Innenmembranprotein, welches nicht an der mitochondrialen Gestaltgebung beteiligt ist und als Negativkontrolle verwendet wurde. Um die Spezifität der Immunpräzipitation zu kontrollieren, wurde ein Ansatz mit Wildtyp Mitochondrien ohne GFP-Mdm33 durchgeführt. Die Auswertung des Experiments erfolgte durch SDS-PAGE, Westernblot und Autoradiographie.

Importiertes Mdm33 konnte spezifisch mit GFP-Mdm33 koimmungefällt werden. Dies deutet auf homotypische Protein-Protein-Interaktionen hin. Mdm33 konnte hingegen nicht aus Mitochondrien koimmungefällt werden, die kein GFP-Mdm33 besaßen. Auch ließ sich keine Interaktion mit Oxa1 nachweisen (Abb. 20).

Zwei weitere Proteine sind auf mögliche Interaktionen mit GFP-Mdm33 untersucht worden. Mdm31 und Mdm32 sind in der Innenmembran lokalisiert und essentiell für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Gestalt (Dimmer *et al.*, 2002). Allerdings war auch hier keine Interaktion mit Mdm33 feststellbar (Kai Stefan Dimmer, persönliche Mitteilung; Messerschmitt *et al.*, 2003).

Andere Mdm-Proteine kommen aufgrund ihrer Lokalisierung, Funktion oder ihres Phänotyps als Interaktionspartner nicht in Frage (Messerschmitt *et al.*, 2003). Es ist daher wahrscheinlich, dass Mdm33 vorwiegend homooligomere Interaktionen ausbildet.



**Abb. 20: Importiertes Mdm33 kann spezifisch mit GFP-Mdm33 koimmungefällt werden**  
*In vitro* translatiertes Mdm33 wurde in Mitochondrien importiert, die entweder GFP-Mdm33 oder nichtmarkiertes Mdm33 besaßen. Die Mitochondrien wurden in Triton X-100 solubilisiert. Mit dem Solubilisat wurden unter Verwendung eines Antiserums gegen GFP die Koimmunfällungen durchgeführt. Als Kontrolle diente importiertes Oxa1. Spur 1: 10% des jeweils für die Importreaktion eingesetzten Lysats. Spur 2: 10% der Importreaktion in GFP-Mdm33 Mitochondrien. Spur 3: Koimmunfällung von GFP-Mdm33 Mitochondrien unter Verwendung des GFP-Antiserums. Spur 4: 10% der Importreaktion in Wildtyp-Mitochondrien. Spur 5: Koimmunfällung von Wildtyp-Mitochondrien unter Verwendung des GFP-Antiserums. V: Vorstufenprotein, R: reife Form der importierten Proteine, WT: Wildtyp.

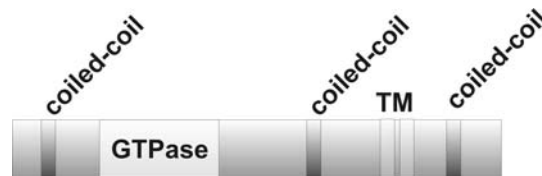
### 3.2 Reinigung und biochemische Charakterisierung von Fzo1 aus *N. crassa*

Eine funktionelle Charakterisierung des Fzo1-Komplexes und seiner möglichen Interaktionspartner erfordert die Aufreinigung von Fzo1 in biochemischen Mengen. Wenn der gereinigte Komplex vorliegt, können z.B. mitgereinigte Partnerproteine identifiziert werden, die Struktur des Komplexes kann elektronenmikroskopisch analysiert werden, und der Komplex kann in Liposomen rekonstituiert werden, um seine Fusionsaktivität zu untersuchen.

Für die Isolierung von Fzo1 in ausreichenden Mengen eignet sich der rote Brotschimmelpilz *N. crassa* besonders gut. Von diesem filamentösen Pilz lassen sich innerhalb eines kurzen Zeitraums große Mengen an Biomasse anziehen. Ein weiterer Vorteil besteht in der einfachen Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa*-Hyphen.

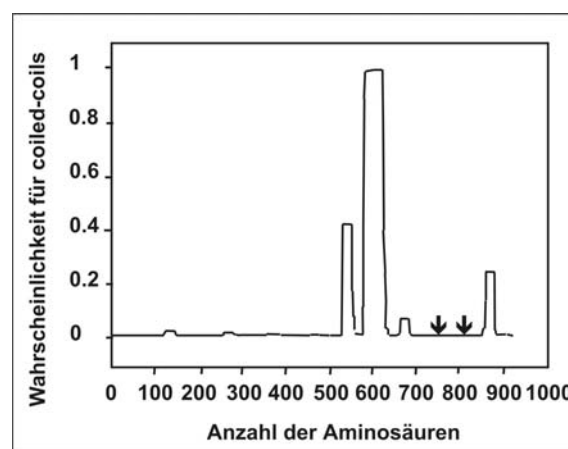
#### 3.2.1 *N. crassa* Fzo1 Proteinsequenz

Das Fzo1-Protein aus *N. crassa* besteht aus 918 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 101,2 kD (Prokisch, persönliche Mitteilung). Wie in *Drosophila* (Hales und Fuller, 1997), Hefe (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998) und humanen Zellen (Santel und Fuller, 2001; Rojo *et al.*, 2002) gezeigt werden konnte, sind die Mitglieder der Fzo-Proteinfamilie in Mitochondrien lokalisiert. Sie sind durch zwei Transmembransegmente in der Außenmembran verankert. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus ragen in das Cytosol, so dass sich nur das kurze Segment zwischen den beiden Transmembranregionen im Intermembranraum befindet (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2001; Rojo *et al.*, 2002). Am C-Terminus, in der Mitte des Proteins sowie am N-Terminus befinden sich jeweils coiled-coil-Regionen. Die GTPase Domäne ist am N-Terminus zwischen zwei coiled-coil-Regionen lokalisiert (Abb. 21). Eine Abweichung dieser Domänenstruktur findet man in den Fzo-Homologen von *N. crassa* und in den humanen Homologen Mfn1 und Mfn2. In diesen Fzo1-Homologen fehlt die erste coiled-coil-Region vor der GTPase-Domäne (Abb. 22).



### Abb. 21: Domänenstruktur von Fzo1

Allgemeine Domänenstruktur der Fzo Homologe von *Drosophila melanogaster* (p-AAC24457 und p-AAF46162), *Saccharomyces cerevisiae* (p-CAA85140), *Schizosaccharomyces pombe* (p-CAA19004) und *C. elegans* (p-AAC71095). Den beiden humanen Homologen von Fzo, Mfn1 (p-AAK06840) und Mfn2 (p-BAA34389) und dem *Neurospora crassa* Fzo1 (NCU00436.1) fehlt die erste coiled-coil-Region vor der GTPase Domäne (siehe Abbildung 2). TM: Transmembrandomänen.



### Abb. 22: *N. crassa* Fzo1 besitzt coiled-coil-Strukturen

Abgebildet ist die Vorhersage für die Ausbildung von coiled-coil-Konformationen nach Lupas et al. (1991) (coils; [www.ch.embnet.org](http://www.ch.embnet.org)) für das *Neurospora crassa* Fzo1 (NCU00436.1). Die verwendete Fenstergröße betrug 21. Die Positionen der vorhergesagten Transmembransegmente wurden mit Pfeilen markiert.

### 3.2.2 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen *N. crassa* Fzo1

Zur Charakterisierung des nativen Fzo1 aus *N. crassa* wurde ein polyklonales Antiserum erzeugt. Zur Herstellung des Antigens wurde die große N-terminale cytosolische Domäne von Fzo1 (pMM59; Aminosäuren 61 bis 751) mit einem Hexahistidinhängsel (*His<sub>6</sub>-Tag*) versehen und in *E. coli* exprimiert. Das Fusionsprotein wurde über den *His<sub>6</sub>-Tag* mit einer NiNTA-Säule gereinigt und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Das Serum wurde im Westernblot getestet und durch Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt. Das affinitätsgereinigte Fzo1-Antiserum erkennt bei einer 1:1000 Verdünnung spezifisch das *N. crassa* Fzo1 und zeigt keine Kreuzreaktionen. Bei dieser Verdünnung können noch 1 ng des Antigens im Westernblot nachgewiesen werden. Das Fzo1 weist ein relativ langsames Laufverhalten in der SDS-PAGE auf (isoelektrischer Punkt bei 5,74).

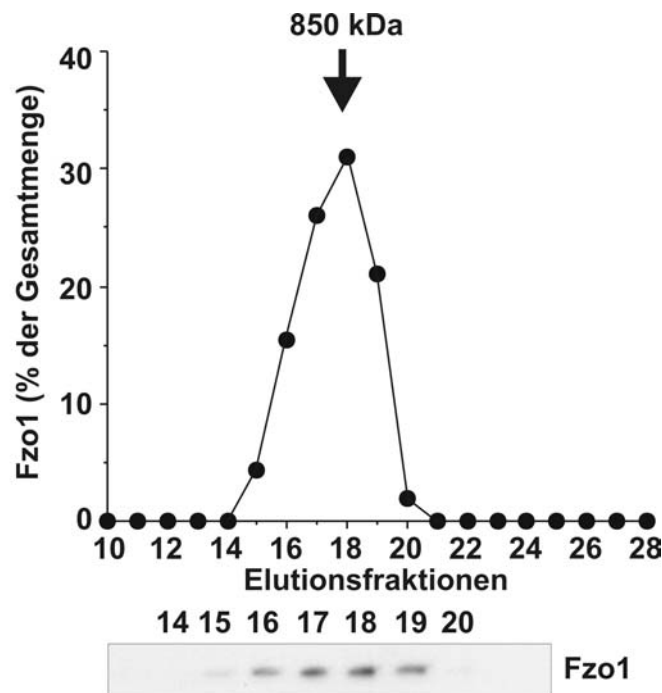
### 3.2.3 Bestimmung des Molekulargewichts des nativen Fzo1-Komplexes in *N. crassa*

In der Hefe *S. cerevisiae* liegt das Fzo1-Protein in einem höhermolekularen Komplex vor. Gelfiltrationsexperimente zeigten, dass dieser Komplex eine molekulare Masse von etwa 800 kD besitzt (Rapaport *et al.*, 1998). Da Fzo1 eine GTPase-Domäne besitzt, die in das Cytosol hineinragt, ist es denkbar, dass der Assemblierungszustand von Fzo1 durch cytosolische Interaktionspartner oder Regulatoren moduliert wird. So wird die Aktivität von vielen GTPasen durch die Bindung von GNRPs (*guanine nucleotide release proteins*) und GAPs (*GTPase activating proteins*) beeinflusst. GNRPs binden an die GDP-gebundene Form einer GTPase und GAPs katalysieren die GTP-Hydrolyse. Durch Zugabe von GDP oder nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogen kann entweder die GDP- oder GTP-gebundene Form der GTPase stabilisiert werden und ebenso der daraus resultierende Einfluss auf die Komplexgröße. Durch Gelfiltrationsexperimente sollte zum einen getestet werden, ob der *N. crassa* Fzo1-Komplex eine mit dem *S. cerevisiae* Fzo1-Komplex vergleichbare Größe aufweist, und zum anderen, ob mitochondriale oder cytosolische Komponenten einen Einfluß auf die Fzo1-Komplexgröße nehmen können.

Für die Bestimmung der Größe des Fzo1-Komplexes in *N. crassa* wurden Gelfiltrationssäulenläufe unter den selben Bedingungen durchgeführt wie von Rapaport *et al.* (1998) für Hefe beschrieben. Isolierte *Neurospora*-Mitochondrien wurden in Puffer mit Triton X-100 als Detergenz solubilisiert. Die Proteinkomplexe wurden anschließend durch Gelfiltrationschromatographie (Superose-6-Säule, Amersham) analysiert. Um einen möglichen Einfluss der GTPase-Domäne zu testen, wurde die Komplexgröße nach Zugabe von GTP, einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogen (GMP-PNP) und ATP ermittelt. Zudem wurden Gelfiltrationsexperimente nach vorheriger Inkubation der Mitochondrien mit cytosolischen Proteinen durchgeführt. Die verschiedenen getesteten Bedingungen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Unter allen getesteten Bedingungen eluierte Fzo1 von der Superose-6-Säule in Fraktionen, die etwa einer molekularen Masse von 850 kD entsprachen (Abb. 23). Die auf diese Weise ermittelten Größen der Fzo1-Komplexe in *N. crassa* und *S. cerevisiae* sind sehr ähnlich. Ein Einfluss durch die Zugabe von Nukleotiden und Cytosol auf die Fzo1-Komplexgröße konnte nicht beobachtet werden. Möglicherweise gehen GTPase-regulierende Faktoren nur transiente

Bindungen mit Fzo1 ein, die mit der Gelfiltrationschromatographie nicht nachgewiesen werden können.



**Abb. 23: *Neurospora* Fzo1 ist Teil eines höhermolekularen Komplexes**

Gelfiltrationschromatographie von *Neurospora* Fzo1. Mitochondrien (1 mg) wurden mit Triton X-100 solubilisiert und nach einem Zentrifugationsschritt der Überstand auf eine Superose-6-Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Fzo1 wurde durch Densitometrie quantifiziert.

Nr.	Triton X-100	Nukleotide	Vorinkubation mit Cytosol	Fraktionen
1	1%	/	/	15 – 18
2	1%	0,5 mM GTP	/	16 – 18
3	1%	/	/	16 – 18
4	0,5%	0,5 mM GMP-PNP	+	15 – 18
5	0,5%	0,5 mM GMP-PNP	/	15 – 18
6	0,5%	/	+	14 – 17
7	0,5%	/	/	15 – 18
8	0,5%	0,5 mM ATP + GTP	+	15 – 17
9	0,5%	0,5 mM ATP + GTP	/	14 – 16
10	0,5%	0,5 mM ATP	/	14 – 17
11	0,5%	0,5 mM ATP	+	14 – 17
12	0,5%	0,5 mM GTP	+	14 – 16
13	0,5%	0,5 mM GTP	/	15

**Tabelle 10: Gelfiltrationsläufe mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen**

Isolierte Mitochondrien wurden mit Triton X-100 solubilisiert und anschließend durch Gelfiltrationschromatographie analysiert. Sowohl dem Solubilisierungs- als auch dem Laufpuffer wurden die angegebenen Nukleotide in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugesetzt. Die Vorinkubation mit Cytosol erfolgte vor der Solubilisierung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Fzo1-Komplex wurde in den Fraktionen durch Westernblot nachgewiesen. ATP: Adenosintri-phosphat, GTP: Guanosintri-phosphat, GMP-PNP: Guanylyl-Imidodiphosphat-Tetralithium-Salz.

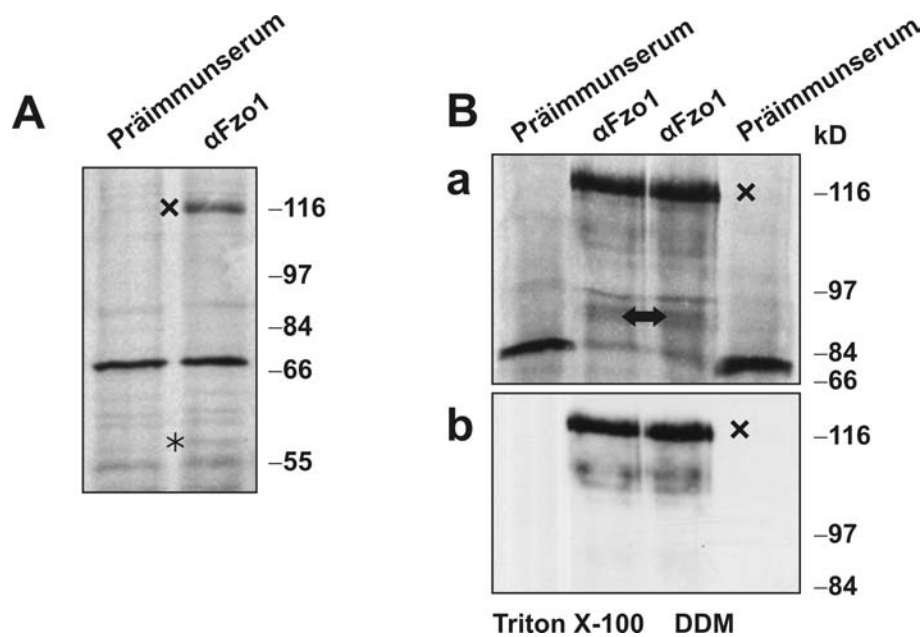
### 3.2.4 Koimmunpräzipitationsexperimente zum Auffinden von Interaktionspartnern

Bei der Fusion von Mitochondrien müssen vier Membranen fusionieren. An diesem sehr komplexen Vorgang sind wahrscheinlich mehrere verschiedene Proteine beteiligt (Westermann, 2002). Auch macht das Vorhandensein einer GTPase-Domäne die Interaktion von Fzo1 mit GTPase-regulierenden Faktoren (GNRPs und GAPs) wahrscheinlich. Zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine Interaktionspartner für das Fzo bekannt. Durch Koimmunfällungsexperimente sollte nach Komponenten gesucht werden, die mit Fzo1 Protein/Protein-Interaktionen eingehen. Die Suche nach Bindungspartnern erfordert eine sensitive Nachweismethode, da Interaktionspartner, die eine regulatorische Funktion auf den Fzo1-Komplex ausüben, in sehr geringen Mengen vorliegen können. Aus diesem Grund wurden radioaktiv markierte Mitochondrien verwendet, da sich [<sup>35</sup>S]-markierte Proteine durch Autoradiographie in sehr kleinen Mengen nachweisen lassen.

Radioaktiv markierte Mitochondrien wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von nicht-markiertem Cytosol vorinkubiert. Anschließend wurde mit dem Fzo1-Antiserum eine Koimmunfällung durchgeführt. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Fällungen auch mit Präimmunserum durchgeführt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Westernblot und Autoradiographie ausgewertet.

Aus den radioaktiv markierten Mitochondrien konnte ein Protein von 60 kD mit Fzo1 koimmungefällt werden (Abb. 24A). Wurde vorher mit Cytosol inkubiert, ließ sich hingegen eine Bande von 90 kD erkennen (Abb. 24B).

Im Cytosol scheinen regulatorische Komponenten vorzuliegen, die einen Einfluss auf das Interaktionsverhalten des Fzo1 nehmen, da sich durch vorherige Inkubation mit Cytosol ein anderer Bindungspartner (90 kD statt 60 kD) nachweisen lässt als ohne Vorinkubation mit Cytosol.



#### Abb. 24: Koimmunpräzipitation von Fzo1 aus radioaktiv markierten Mitochondrien

[<sup>35</sup>S]-markierte Wildtyp-Mitochondrien wurden entweder direkt in 0,1% Triton X-100 solubilisiert (A) oder zuerst für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit unmarkierten Cytosol vorinkubiert (B) bevor sie mit 0,1% Triton X-100 oder Dodecylmaltosid (DDM) im Lysepuffer solubilisiert wurden. Mit dem Solubilisat wurde unter Verwendung des Antiserums gegen Fzo1 die Koimmunfällung durchgeführt. A: Der Stern markiert eine Bande bei etwa 60 kD, die nur mit dem Fzo1-Antiserum, nicht aber mit dem Präimmunserum, koimmungefällt werden kann. B: Der Doppelpfeil markiert eine Doppelbande auf der Höhe von 90 kD (a), welche ebenfalls nur mit dem Fzo1-Antiserum koimmungefällt wurde, unabhängig von der Verwendung unterschiedlicher Detergentien. Das Kreuz markiert in (A) und (B) das Fzo1. Als Kontrolle wurde der Westernblot mit dem Fzo1-Antiserum dekoriert (b), um auszuschliessen, dass es sich um Fzo1-Abbauprodukte handelt. Bei der sehr prominenten Bande um 70 kD handelt es sich um eine unspezifische Bindung des Antiserums, die bei Verwendung des affinitätsgereinigten Serums (B) nahezu wegfällt.

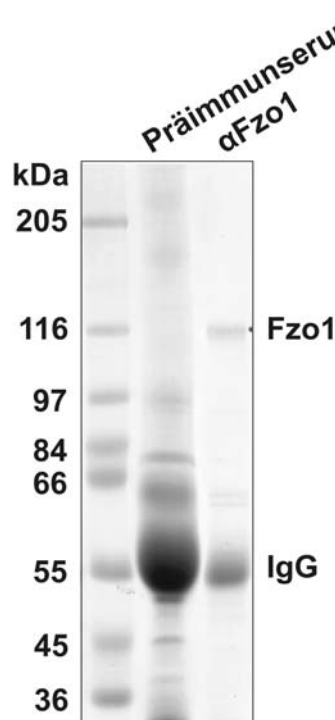
#### 3.2.5 Immunpräzipitationsexperiment zur Feststellung des Fzo1-Anteils am Gesamtproteingehalt der Mitochondrien

Durch eine quantitative Immunfällung sollte der Anteil von Fzo1 am Gesamtproteingehalt der Mitochondrien ermittelt werden.

Für die quantitative Immunfällung wurden 50 µg affinitätsgereinigter Fzo1-Antikörper an Protein-A-Sepharose gekoppelt. 10 mg Wildtyp-Mitochondrien wurden mit Triton X-100 solubilisiert und die Fällung mit dem Fzo1-Antiserum durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Fällung auch mit Präimmunserum durchgeführt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung ausgewertet. Durch Westernblot wurde gezeigt, dass das Fzo1 komplett aus dem Überstand depletiert wurde.



Der ermittelte Fzo1-Anteil betrug 1  $\mu\text{g}$  in 10 mg Mitochondrien (Abb. 25). Der Anteil von Fzo1 am Gesamtproteingehalt der Mitochondrien beträgt also nur ca. 0,01 % und ist damit sehr gering. Im coomassiegefärbten SDS-Gel konnten keine Bindungspartner nachgewiesen werden. Die relativ geringe Menge von Fzo1 in Mitochondrien erschwert eine Aufreinigung des Fzo1 in größeren Mengen. Die Vorteile, die *N. crassa* für das biochemische Arbeiten bietet, lassen dennoch einen Versuch der Aufreinigung und Analyse des Komplexes aussichtsreich erscheinen.



**Abb. 25: Quantitative Immunpräzipitation von Fzo1 aus 10 mg *Neurospora*-Mitochondrien**

50  $\mu\text{g}$  affinitätsgereinigtes Fzo1-Antiserum und Präimmunserum wurden an Protein-A-Sepharose gekoppelt. 10 mg Wildtyp-*Neurospora*-Mitochondrien wurden mit Triton X-100 solubilisiert und mit der gekoppelten Protein-A-Sepharose inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Durch den Vergleich mit den Markerbanden kann auf eine Gesamtmenge von ca. 1  $\mu\text{g}$  Fzo1 geschlossen werden.

### 3.2.2 Reinigung von Fzo1 aus *N. crassa*

Im Fall der Proteintranslokase der Außenmembran, TOM-Komplex, hat sich die Aufreinigung aus *Neurospora*-Mitochondrien über einen Hexahistidin-Anhang und NiNTA-Matrix als ein erfolgreicher Ansatz erwiesen (Künkele *et al.*, 1998). Daher sollte für die Reinigung des Fzo-Komplexes ein ähnlicher Ansatz verfolgt werden.

### 3.2.2.1 Herstellung eines N-terminalen His<sub>6</sub>-Fzo1-Stammes

Zunächst wurde ein Konstrukt erstellt, mit dem in *Neurospora* ein Fzo-Protein mit einem N-terminalen Hexahistidinanhang exprimiert werden kann. Für die Klonierung wurde der *Neurospora* Vektor pCB1532 verwendet (Sweigard *et al.*, 1997), der das Sulfonylurea-Resistenzgen enthält. In zwei Klonierungsschritten wurden der endogene Promotor des *fzo-1*-Gens und die codierende Sequenz mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag in den Vektor eingefügt. Dieses Plasmid (pMM83) wurde in *Neurospora*-Wildtypstämme beider Paarungstypen (a und A) transformiert. Transformanten wurden in flüssigem Minimalmedium mit Chlorimuronethyl (CME) auf den Transformationsmarker selektioniert und durch Southernblot auf eine erfolgreiche Integration des Plasmides überprüft. Die positiven Stämme wurden durch Westernblot mit einem monoklonalen Antiserum gegen den Hexahistidintag auf Expression des integrierten Gens getestet.

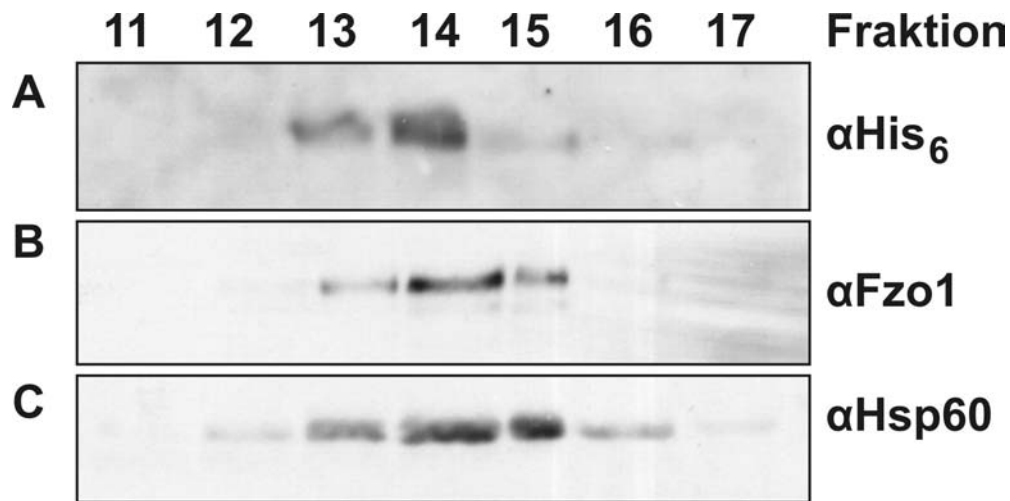
Im Stamm MM83-A2 konnte die Expression des His<sub>6</sub>-markierten *fzo-1*-Gens besonders deutlich nachgewiesen werden. Dieser heterokaryotische Stamm, der sowohl His<sub>6</sub>-markiertes als auch Wildtyp-Fzo1 exprimiert, wurde für weitere Experimente verwendet.

### 3.2.2.2 His<sub>6</sub>-Fzo1 ist Bestandteil eines höhermolekularen Komplexes

Die Fusion einer sechsfachen Histidin-Markierung am N-Terminus könnte eine fehlerhafte Assemblierung des Fzo1-Komplexes zur Folge haben. Um dies zu überprüfen, sollte gezeigt werden, ob der Fzo1-Komplex auch mit der Hexahistidin-Markierung noch seine ursprüngliche Größe besitzt.

Mitochondrien des Stammes MM83-A2, welche neben dem Wildtyp-Fzo1 auch die Histidin-markierte Variante des Fzo1 enthielten, wurden durch Gelfiltrationschromatographie überprüft. Der Nachweis des Fzo1-Komplexes erfolgte durch Dekoration des Westernblots sowohl mit einem Antiserum gegen das Hexahistidinepitop als auch mit einem Fzo1-Antiserum.

Sowohl das Wildtyp-Fzo1 als auch das His<sub>6</sub>-markierte Fzo1 waren in denselben Fraktionen nachzuweisen (Abb. 26). Die Komplexgröße entsprach den erwarteten 850 kD. Die Histidin-Markierung hat demnach keinen störenden Effekt auf die Assemblierung des Komplexes.



**Abb. 26: His<sub>6</sub>-Fzo1 assembliert in einen höhermolekularen Komplex**

Mitochondrien eines Stammes, der His<sub>6</sub>-Fzo1 exprimiert, wurden mit Triton X-100 solubilisiert und nach einem Zentrifugationsschritt auf eine Superose-6-Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Zum Nachweis des His<sub>6</sub>-Fzo1 wurde ein monoklonales His<sub>6</sub>-Antiserum verwendet.

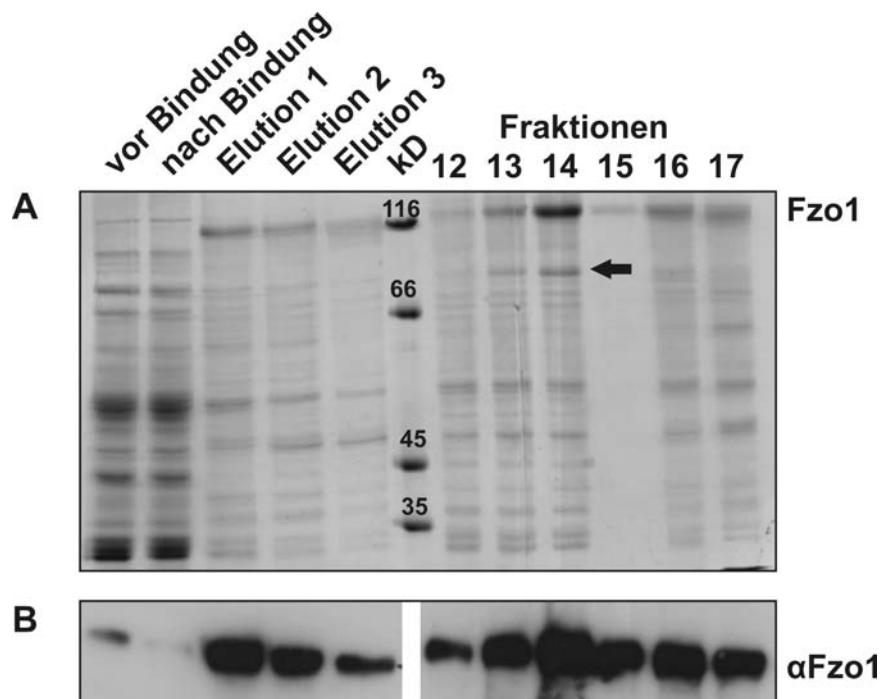
**3.2.2.3 Reinigung von His<sub>6</sub>-Fzo1 durch NiNTA- und Gelfiltrationschromatographie**

Ziel der Reinigungsexperimente war es, möglichst sauberes Fzo1 zu erhalten und Interaktionspartner mit aufzureinigen.

Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien des Stammes MM83-A2 mit Triton X-100 solubilisiert und das Fzo1 durch seinen Histidin-Tag an NiNTA-Sepharose gebunden. Nach der Elution mit imidazolhaltigem Puffer wurden die Elutionsfraktionen durch Gelfiltrationschromatographie weiter aufgetrennt. Die Fraktionen aus der Gelfiltration sowie ein Teil der Elutionsfraktionen aus der NiNTA-Reinigung wurden durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert (Abb. 27A).

Die Elutionsfraktionen nach der NiNTA-Reinigung wiesen bereits eine hohe Anreicherung des Fzo1 auf und waren relativ arm an kontaminierenden Proteinen. Durch die nachfolgende Gelfiltration konnte die Reinheit der Fraktionen noch erhöht werden. Zusätzlich wurde durch die Gelfiltration eine Anreicherung eines Proteins von ca. 90 kD erzielt. Dieses Protein ist möglicherweise mit dem identisch, welches bereits in den Koimmunfällungsexperimenten nachgewiesen werden konnte.

Nach einer weiteren Optimierung des Reinigungsverfahrens und/oder durch den Einsatz größerer Ausgangsmengen an Protein erscheint eine Identifizierung des Bindungspartners durch Massenspektrometrie oder Proteinsequenzierung erfolgsversprechend. Diese Experimente konnten aber im Rahmen der vorgelegten Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.



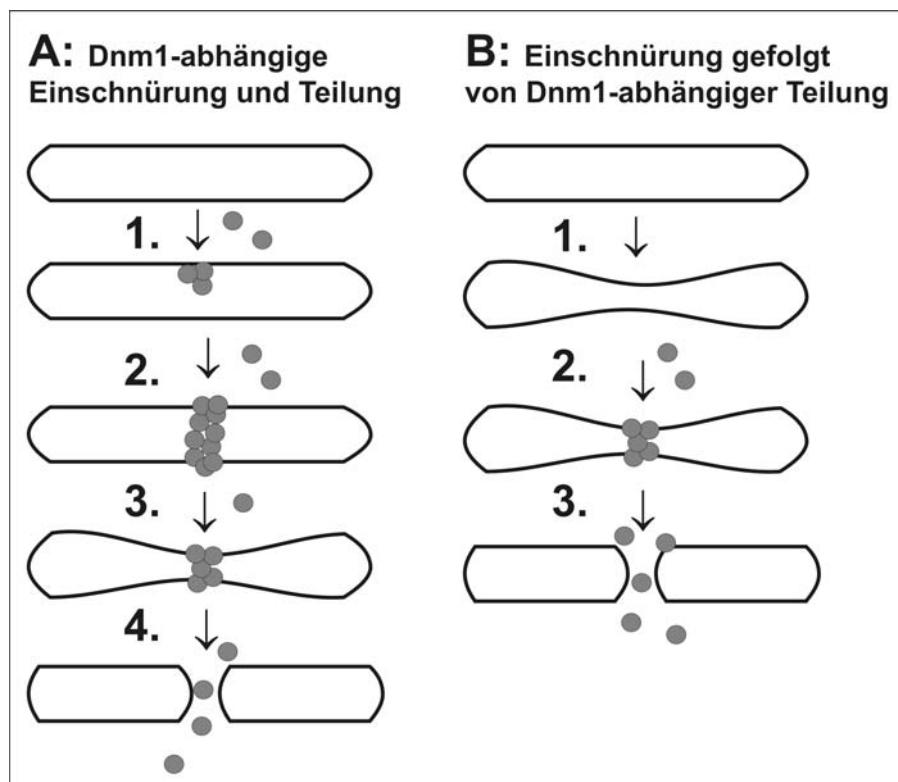
### Abb. 27: Reinigung des His<sub>6</sub>-Fzo1-Komplexes

Nach der Solubilisierung von Mitochondrien eines Stammes, der His<sub>6</sub>-Fzo1 exprimiert, wurde vor der Bindung und nach der Bindung des Solubilisates an die NiNTA-Sepharose eine Probe genommen. Es wurde dreimal mit einem 250 mM Imidazolpuffer eluiert (jeweils 500 µl). Die Eluate wurden nacheinander auf eine Superose-6-Säule aufgetragen. Die Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie wurden mit TCA gefällt und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung ausgewertet (A). Als Kontrolle wurde ein Anteil der Proben nach der SDS-PAGE auf Nitrocellulose übertragen und mit dem Fzo1-Antiserum dekoriert (B). Der Pfeil markiert ein 90 kD-Protein, welches durch Gelfiltration angereichert wurde.

## 4 Diskussion

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente geben Einblick in die molekularen Grundlagen der mitochondrialen Morphogenese. Eine neue Komponente, das Mdm33-Protein, wurde identifiziert und funktionell charakterisiert. Darüber hinaus wurde eine schon länger bekannte Komponente, das Fzo1-Protein, funktionell analysiert.

### 4.1 Teilung der mitochondrialen Außenmembran



#### Abb. 28: Darstellung von zwei möglichen Außenmembranteilungs-Modellen

**A:** Dnm1-abhängige Einschnürung und Teilung des mitochondrialen Tubulus. Cytosolisches Dnm1 (graue Kugeln) sammelt sich an bestimmten Stellen an der Oberfläche der mitochondrialen Außenmembran an und bildet zuerst ein Cluster (1.), bis es zu einem den Tubulus umschließenden Ring wird (2.). Dieser Dnm1-Ring induziert dann eine Einschnürung des mitochondrialen Tubulus (3.), gefolgt von der Teilung (4.). Modell nach Shaw und Nunnari (2002).

**B:** Die Einschnürung des mitochondrialen Tubulus geht der Dnm1-abhängigen Teilung voraus. Der Tubulus wird an einer bestimmten Stelle eingeschnürt. Hier könnte Mdm33 beteiligt sein (1.). Wenn sich zur gleichen Zeit ein Dnm1-Ring an die Einschnürungsstelle anlagert (2.), kann sich der Tubulus teilen (3.). Modell nach Legesse-Miller *et al.* (2003)

Da Mitochondrien von zwei Membranen umgeben sind, muss es Mechanismen geben, welche die Teilung derselben koordiniert ablaufen lassen. Dnm1 spielt im Teilungsprozess der

mitochondrialen Außenmembran eine essentielle Rolle, indem es an Stellen der späteren Teilung zusammen mit Mdv1 und Fis1 einen Ring um das Organell bildet. Es wird angenommen, dass sich dieser Ring nach GTP-Hydrolyse zusammenschnürt und so die Teilung des mitochondrialen Schlauchs bewirkt (Abb. 28A) (Shaw und Nunnari, 2002). Dabei werden die beiden löslichen Proteine Dnm1 und Mdv1 durch das integrale Außenmembranprotein Fis1 an die mitochondriale Oberfläche rekrutiert.

Der Tubulus-Durchmesser der Mitochondrien beträgt etwa 500 nm. Die Stelle, an der Clathrin-umhüllte Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt werden, weist einen Durchmesser von nur etwa 10 nm auf. Anhand dieser Größenunterschiede wird deutlich, dass der aus Dnm1 bestehende Ring im Fall von Mitochondrien vor einer weitaus größeren Aufgabe steht als das Dynamin, welches bei der Endozytose beteiligt ist. Durch fluoreszenzmikroskopische Studien mit Dnm1-GFP-Fusionsproteinen wurden deutliche Hinweise dafür gefunden, dass eine Teilung durch den Dnm1-Ring nur dann stattfindet, wenn sich zuvor die mitochondriale Matrix an dieser Stelle zusammengeschnürt hatte (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Nach diesem Modell würde die Verringerung des Tubulus-Durchmessers am Ort der zukünftigen Teilung es dem Dnm1-Ring ermöglichen, die Trennung der Membranen sehr viel leichter durchzuführen (Abb. 28B).

#### 4.2 Teilung der mitochondrialen Innenmembran

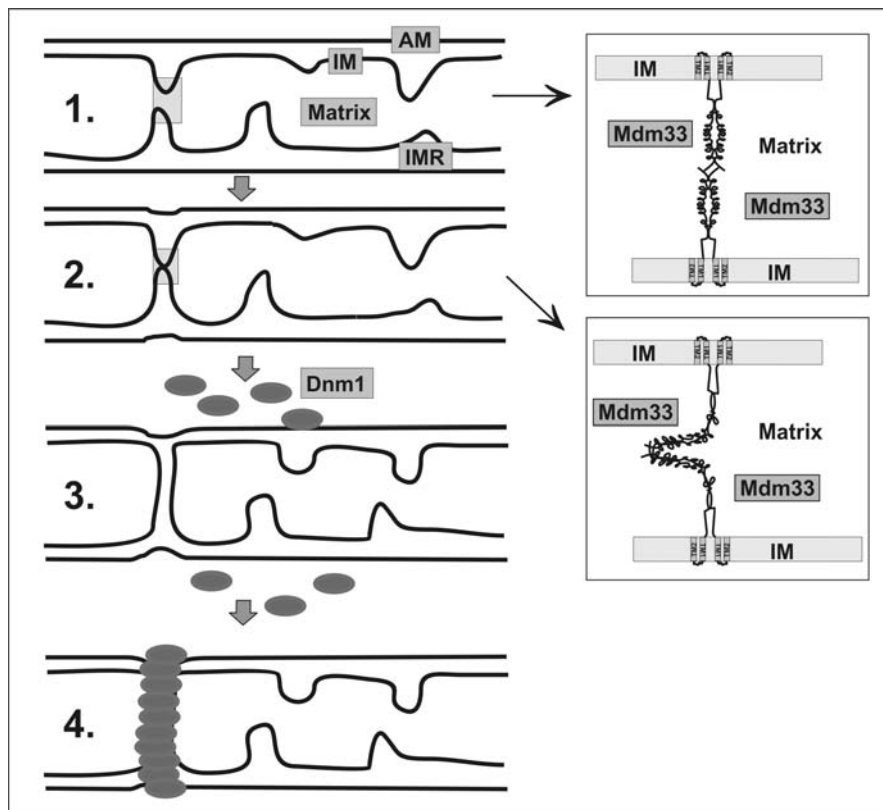
Die zwei mitochondrialen Membranen teilen sich in der Regel gleichzeitig, was dafür spricht, dass die Teilung der Innenmembran mit der Teilung der Außenmembran koordiniert ist. Es wurde aber auch beobachtet, dass eine Teilung der Innenmembran ohne eine Teilung der Außenmembran stattfinden kann. Dies kann man besonders eindrucksvoll in der *drp1*-Mutante von *C. elegans* erkennen (Labrousse *et al.*, 1999). In dieser Mutante wurde beobachtet, dass sich die Matrix blasenartig zusammenzieht, so als würde eine Teilung erfolgen. Die Mitochondrien bleiben aber durch dünne Außenmembranfäden miteinander verbunden, wie bei einer Perlenkette. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine eigene Teilungsmaschinerie für die Innenmembran existiert. Diese Annahme wird auch durch Beobachtungen in mitochondrialen Teilungs-Mutanten in Hefe gestützt. Die Matrix-Teilungsereignisse sind in  $\Delta$ *fis1*-Mitochondrien, deren Außenmembranteilungsmaschinerie defekt ist, ähnlich häufig wie in Wildtyp-Mitochondrien, und auch in  $\Delta$ *dnm1*-Mitochondrien konnte eine Matrixtrennung beobachtet werden (Jakobs *et al.*, 2003).

### 4.3 Mdm33 und seine Rolle bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Mdm33 ein neuer Faktor identifiziert, der für die Teilungsfähigkeit der Mitochondrien wichtig ist. Viele Hinweise sprechen für eine mögliche Rolle von Mdm33 bei der Teilung der Innenmembran. Der erste Punkt ist der außergewöhnliche Phänotyp der *Δmdm33*-Mutante. Ihre ring- und kugelförmigen Mitochondrien wurden bisher in der Art noch nicht beschrieben. Die *Δmdm33*-Mutante hat aber auch einige Gemeinsamkeiten mit bekannten Mutanten der Außenmembranteilung, wie *Δdnm1*, *Δfis1* und *Δmdv1*. So sind die wenigen Mitochondrien in den Mutanten-Zellen miteinander verbunden und konzentrieren sich auf einer Seite der Zelle. Außerdem behalten *Δmdm33*-Zellen ihre mtDNA und sind nicht atmungsdefizient, ähnlich wie die Mutanten der Außenmembranteilungsmaschinerie. Eine weitere wichtige Beobachtung ist die Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur in der *Δmdm33*-Mutante. Elektronenmikroskopische Abbildungen zeigen, dass sich große, extrem lang gestreckte Organellen ausbilden, die nur in Abwesenheit häufiger Teilungsereignisse entstehen können. Diese auseinandergezogenen Organellen bilden typischerweise lange Abschnitte der Außen- und Innenmembran, die einen sehr schmalen Matrixspalt umschließen. Nur in den blasenartigen Aufweitungen an den Enden der Organellen sind noch Cristae zu beobachten (Messerschmitt *et al.*, 2003). In der *Δmdv1*-Mutante ist die Ultrastruktur der Mitochondrien hingegen nicht verändert. Sie zeigen eine unveränderte Cristaestruktur (Cervený *et al.*, 2001). Die langgestreckten mitochondrialen Strukturen der *Δmdm33*-Mutante können, da die Fusion nicht gestört ist, mit sich selbst fusionieren, wenn zwei Enden desselben Organells aufeinandertreffen. Durch diese Selbstfusionsereignisse können sich zuerst ringähnliche Strukturen ausbilden (durch EM-Bilder belegt; Messerschmitt *et al.*, 2003), die durch weitere Fusionsereignisse geschlossene Hohlkugeln bilden (belegt durch konfokale Mikroskopie; Messerschmitt *et al.*, 2003). Die *Δmdm33*-Mutante scheint also einen spezifischen mitochondrialen Teilungsdefekt zu haben, der einige Gemeinsamkeiten – aber auch einige Unterschiede – zu den bekannten Mutanten der mitochondrialen Außenmembranteilungsmaschinerie aufweist.

Die Überexpression von Mdm33 führt zu Septen- und Vesikelausbildung der Innenmembran und schließlich zum gänzlichen Verlust der Cristae (Messerschmitt *et al.*, 2003). Dieser Phänotyp kann am besten dadurch erklärt werden, dass ein Überschuss von Mdm33 eine verstärkte Teilungsaktivität der Innenmembran zur Folge hat, ohne dass gleichzeitig eine Teilung der Außenmembran stattfindet. Die Überexpression von Teilungskomponenten der

Außenmembran zeigt hingegen einen gänzlich anderen mitochondrialen Phänotyp. Wenn hFis1 in HeLa-Zellen überexprimiert wird, fragmentieren die Mitochondrien, die Cristae bleiben allerdings zum Teil erhalten (Yoon *et al.*, 2003). Die fragmentierten Mitochondrien sind hier von beiden Membranen umschlossen. Zudem kann man auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen deutlich erkennen, wie hier die Fragmentierung durch eine Einschnürung von außen erfolgt.



**Abb. 29: Modell der koordinierten Teilung von Innen- und Außenmembran**

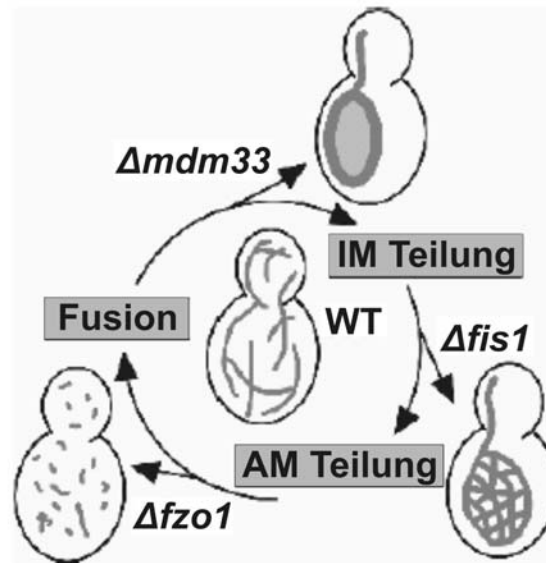
**Links:** Ein möglicher Ablauf der Teilung der mitochondrialen Membranen ist in vier Schritten dargestellt. Zuerst treten Mdm33-Komplexe auf gegenüberliegenden Cristae miteinander in Kontakt (1.). Durch Konformationsänderung der beteiligten Proteine kann dann die Teilung der Innenmembran eingeleitet werden (2.). Dadurch kann möglicherweise eine Kontraktion der Außenmembran an dieser Stelle erfolgen (3.). Dies wäre dann der Auslöser für Dnm1, an dieser Stelle zu assemblieren und die Teilung der mitochondrialen Tubuli einzuleiten (4.).

**Rechts:** Darstellung im Detail, wie durch die Lokalisierung mehrerer coiled-coil-Domänen in der Matrix sich homotypische Interaktionen zwischen Mdm33-Proteinen von gegenüberliegenden Innenmembranen ausbilden können.



Mdm33 ist ein integrales Protein der Innenmembran und exponiert coiled-coil-Domänen in die Matrix. Diese Topologie und die beobachtete homotypische Protein-Protein-Interaktion stimmen mit dem folgenden Modell überein (Abb. 29). Mdm33-Proteinkomplexe von gegenüberliegenden Innenmembranen können miteinander auf der Matrixseite interagieren, möglicherweise durch die Ausbildung von alpha-helicalen Bündeln über die Mdm33-coiled-coils. Die Ausbildung der alpha-helikalen Bündel vermittelt dann die Einschnürung und/oder Teilung der Innenmembran von der Matrixseite aus.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und aus vorangegangenen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen kann ein Modell postuliert werden, nach dem Innenmembranteilung, Außenmembranteilung und mitochondriale Fusion in einem Zyklus nacheinander ablaufen (Abb. 30). Der Zyklus beginnt mit der Teilung der Innenmembran. Diese kann von der Teilung der Außenmembran abgekoppelt werden (s.o.) (Labrousse *et al.*, 1999). Eine unabhängige Teilungsmaschinerie ist für die Teilung der Innenmembran verantwortlich. Mdm33 scheint eine wichtige Rolle bei der Kontrolle dieses Prozesses zu spielen. Durch die Teilung der Innenmembran wird eine erhebliche Einschnürung der Außenmembran verursacht. Erst im nächsten Schritt können Dnm1 und seine Kofaktoren, Fis1 und Mdv1, die Teilung der Außenmembran durchführen. Dass die Teilung der Innenmembran der Initiator des kompletten Teilungszyklus ist, wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die *MDM33*-Deletion epistatisch zur *FIS1*-Deletion ist. Die Ausbildung der ausgedehnten Mitochondrien in den  $\Delta$ *mdm33*-Zellen wird nicht durch die An- oder Abwesenheit von Teilungskomponenten der Außenmembran beeinflusst. Im Gegensatz dazu ist Mdm33 notwendig, damit sich die Netzstrukturen in den *Afis1*-Zellen ausbilden können. Dies weist Mdm33 eine übergeordnete Funktion für die anschließende Außenmembranteilung zu. Der Kreislauf schließt sich durch die mitochondriale Fusion. Mutationen in Komponenten der Außenmembranteilung sind epistatisch zu Mutationen in Fusionskomponenten. So wird die durch die Deletion des *FZO1*-Gens verursachte mitochondriale Fragmentierung und der Verlust der mtDNS durch die Deletion von *DNM1* verhindert (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999; Fekkes *et al.*, 2000; Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Cervený *et al.*, 2001). Die Deletion von *FZO1* ist jedoch epistatisch zur Deletion von *MDM33*. Eine funktionierende mitochondriale Fusionsmaschinerie ist demnach eine Voraussetzung für die Ausbildung des typischen  $\Delta$ *mdm33*-Phänotyps.



**Abb. 30: Hypothetischer Zyklus der epistatischen Beziehungen an der mitochondrialen Dynamik beteiligter Komponenten**

Pfeile, die aus dem Kreis herausführen, zeigen auf den mitochondrialen Phänotyp der jeweiligen Deletionsmutante. Jede Gendeletion ist epistatisch zu der folgenden; d.h. Doppelmutanten, die durch genetisches Kreuzen erzeugt wurden, besitzen den Phänotyp derjenigen Mutante, welche im Zyklus davor steht. AM: Außenmembran, IM: Innenmembran, WT: Wildtyp; (Messerschmitt *et al.*, 2003).

Wenn erst einmal das Gleichgewicht zwischen Teilung und Fusion gestört ist, können ohne Fusion keine größeren mitochondrialen Strukturen mehr entstehen (Sesaki und Jensen, 1999). Eine Deletion von *MDM33* scheint, im Gegensatz zu einer Deletion von *DNMI1*, keinen Einfluss auf die Fragmentierung der Mitochondrien in *Δfzo1*-Zellen zu haben. Hier scheint die Restaktivität der Außenmembranteilungsmaschinerie auszureichen, um die Fragmentierung der Mitochondrien zu bewirken.

Mitochondrien mit abnormaler Morphologie können Ursache für Krankheiten sein. Dies wurde z. B. für Mutationen im *OPA1*-Gen gezeigt, welche die autosomale dominante optische Atrophie Typ I verursachen (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2002). *OPA1* ist das menschliche Homolog des *MGMI*-Gens der Hefe. Es wurde kein Sequenzhomolog von Mdm33 im Menschen gefunden. Ein funktionell analoges Protein könnte aber durchaus existieren. Zumindest wurden schon ähnliche mitochondriale Phänotypen im Zusammenhang mit erkranktem Gewebe aus Tier und Mensch beschrieben. In den Tumor-Zellen von Patienten mit Warthin's Tumor weisen die Mitochondrien schüssel- und ringförmige Strukturen auf (Kataoka *et al.*, 1991). Aber inwieweit ein Zusammenhang zwischen einem

Defekt des möglichen funktionalen Analogons zu Mdm33 und der Tumorauslösung besteht, muss erst noch untersucht werden. Auch in den geschädigten Purkinje-Zellen des cerebralen Kortex von Ratten zeigen die Mitochondrien ringähnliche Strukturen. Ausgelöst wird diese Strukturveränderung des zentralen Nervensystems der Ratten durch langanhaltenden Alkoholkonsum (Tavares und Paula-Barbosa, 1983). Der ringähnliche Phänotyp könnte aber in diesem Falle auch ein sekundärer Effekt anderer Stoffwechselschäden sein. Es bleibt also eine spannende Frage für die Zukunft, ob die abnormalen Mitochondrien in  $\Delta$ *mdm33*-Zellen pathologische Zustände in menschlichen Geweben widerspiegeln.

#### 4.4 Die mitochondriale Fusion

Fzo1 bringt alle Voraussetzungen mit, die es benötigt, um alleine die Fusion der mitochondrialen Außenmembranen zu vermitteln. Zum einen ist es durch seine beiden Transmembrandomänen in der mitochondrialen Außenmembran fest verankert, und sein N- und C-Terminus ragen ins Cytosol. Zum anderen kann es durch seine coiled-coil-Regionen Protein-Protein-Interaktionen eingehen. Außerdem kann die GTPase-Domäne durch GTP-Hydrolyse Energie für eine Konformationsänderung bereitstellen. Der durch Fzo1 vermittelte Fusionsmechanismus könnte folgendermaßen ablaufen: Zuerst treten zwei Fzo1-Komplexe auf gegenüberliegenden Außenmembranen miteinander über die coiled-coil-Regionen in Kontakt. Es könnten sich hier alpha-helicale Bündel ausbilden, ähnlich wie sie bei der SNARE-Protein-vermittelten Membranfusion auftreten (Weber *et al.*, 1998). Durch eine möglicherweise durch GTP-Hydrolyse hervorgerufene Konformationsänderung könnten dann die beiden Außenmembranen in engsten Kontakt gebracht werden und fusionieren. Da Fzo1 durch seine Lokalisierung in den Kontaktstellen in engem Kontakt zur Innenmembran steht, wird durch die Außenmembranfusion auch die Fusion der Innenmembran eingeleitet (Fritz *et al.*, 2001). Um diese Modellvorstellungen zu überprüfen und herauszufinden, wie eine mögliche Regulierung des Fzo1-GTPase-Zyklus funktioniert, ist es wichtig, die fusionsmodulierenden Proteine zu identifizieren, welche aus GTPase aktivierenden Proteinen und GTP-Austauschfaktoren bestehen könnten.

Genetische Screens haben eine Beteiligung von Mgm1 und Ugo1 an der mitochondrialen Fusion enthüllt. Sowohl in  $\Delta$ *mgm1*- als auch in  $\Delta$ *ugo1*-Zellen weisen die Mitochondrien ebenso wie in  $\Delta$ *fzo1*-Zellen einen fragmentierten Phänotyp auf (Guan *et al.*, 1993; Shepard und Yaffe, 1999; Sesaki und Jensen, 2001). Untersuchungen von temperatursensitiven *mgm1*-

Mutanten zeigten, dass die Fragmentierung der Mitochondrien mit einem Verlust der Mgm1-Funktion und dem Verlust der mtDNS verbunden ist. Die mitochondriale Fragmentierung und der Verlust der mtDNS kann durch Mutationen von Teilungskomponenten verhindert werden (Fekkes *et al.*, 2000; Mozdy *et al.*, 2000; Sesaki und Jensen, 2001; Wong *et al.*, 2000).

Des Weiteren wurde eine direkte Interaktion von dem Intermembranraumprotein Mgm1 und dem Außenmembranprotein Ugo1 mit Fzo1 gezeigt (Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Auch *Δugo1*-Mitochondrien sind fragmentiert und verlieren ihre mtDNS (Sesaki und Jensen, 2001). Ugo1 ist jedoch nicht wie Fzo1 in den Kontaktstellen der Außen- und Innenmembran lokalisiert (Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Da dennoch eine physikalische Interaktion beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, dass diese Proteine nur für kurze Zeit miteinander interagieren. Auch die Interaktion von Mgm1 mit Fzo1 ist nur transient. So ist es durchaus möglich, dass diese Proteine an verschiedenen Schritten der mitochondrialen Fusion beteiligt sind.

In einem umfassenden genomweiten Screen nach *S. cerevisiae*-Mutanten, welche Defekte in der Verteilung und der Morphologie der Mitochondrien aufweisen, wurden einige neue Gene gefunden, die in der mitochondrialen Morphogenese involviert sind (Dimmer *et al.*, 2002). Die Durchführung dieses Screens wurde im Ergebnisteil ausführlich beschrieben. Einige dieser neuen *mdm*-Mutanten weisen fragmentierte Mitochondrien auf. Dies deutet auf einen Defekt der mitochondrialen Fusion hin.

Die Fusion von Mitochondrien erfordert eine koordinierte Fusionierung von vier Membranen und muss eng mit der Organellenteilung koordiniert werden. Durch die Komplexität dieser Reaktionen kann davon ausgegangen werden, dass noch verschiedene weitere, bisher noch unbekannte Proteine bei diesem Prozess beteiligt sind. Diese können Komponenten der Fusionsmaschine der Innenmembran, regulatorische Proteine und vielleicht zusätzliche Faktoren in der Außen- und Innenmembran sein. Zur Untersuchung der biochemischen Rolle von bekannten und unbekanntenen Komponenten der mitochondrialen Fusion sind die Entwicklung von *in vitro*-Assays und die Rekonstitution von individuellen Stufen des Fusionsprozesses erforderlich. Für die Rekonstitution in *in vitro*-Fusionsassays ist es notwendig, die zu testenden Fusionskomponenten in einem sehr reinen und funktionsfähigen Zustand zu isolieren. Durch biochemische Reinigung der betreffenden Proteinkomplexe können möglicherweise neue Interaktionspartner der bekannten Proteine gefunden werden.

In dieser Arbeit wurde mit dem filamentösen Pilz *N. crassa* gearbeitet, dessen Vorteil darin besteht, dass sich durch sein schnelles Wachstum große Mengen an Biomasse in einem kurzen Zeitraum gewinnen lassen. Es wurde ein Stamm hergestellt, der His<sub>6</sub>Fzo1 stabil exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass der *N. crassa* Fzo1-Komplex eine Größe von etwa 850 kD hat. Das entspricht recht gut der Größe des *S. cerevisiae* Fzo1-Komplexes. Koimmunfällungsexperimente mit radioaktiv markierten Mitochondrien gaben erste Hinweise auf einen möglichen Interaktionspartner, der von seiner Laufhöhe möglicherweise dem *N. crassa* Mgm1-Homolog zugeordnet werden könnte (ca. 92 kD). Die Ergebnisse zur Reinigung des Komplexes aus dem His<sub>6</sub>Fzo1-Stamm zeigen, dass der Komplex hauptsächlich aus Fzo1-Molekülen besteht. Darüber hinaus wurde in relativ geringen Mengen ein potentieller Interaktionspartner mitaufgereinigt, der von seiner Größe dem zuvor in den Koimmunfällungsexperimenten gefundenen Interaktionspartner entspricht. Die Identifizierung dieses möglichen Interaktionspartners könnte in der Zukunft neue Erkenntnisse in die Funktionsweise und Regulation des Fzo1 Fusionskomplexes bringen.

Es sind noch viele Fragen der mitochondrialen Fusion ungeklärt. Bis jetzt gibt es keinen Hinweis darauf, ob Fzo1 direkt die Fusionsreaktion katalysiert, oder ob Fzo1 eher eine regulatorische Funktion ausübt. Auch die Frage, ob noch andere, und wenn ja welche, Faktoren für die Fusion erforderlich sind, ist noch offen. Da das *Neurospora*-Genom inzwischen bekannt ist (Galagan *et al.*, 2003), eröffnet die Reinigung des Fzo1-Komplexes die Möglichkeit, Interaktionspartner durch Massenspektrometrie zu identifizieren. Dadurch könnte diese Frage beantwortet werden. Durch die Rekonstitution von möglichen Fusionskomponenten in Lipidvesikeln könnte deren Fusionskompetenz getestet werden. Dies ist eine Methode die sehr viel zum Verständnis und zur Aufklärung des Fusionsprozesses von SNARE-Komplexen beigetragen hat (Weber *et al.*, 1998). Untersuchungen der Rolle der mitochondrialen Fusion in höheren Organismen werden uns vielleicht neue Erkenntnisse über die Zellenwicklung, Apoptose und das Altern liefern können. Jedenfalls wird die Erforschung der mitochondrialen Fusion auch in den kommenden Jahren ein interessantes Gebiet der Zellbiologie bleiben.

## 5 Zusammenfassung

Die Kontinuität des mitochondrialen Kompartiments wird durch fortlaufende Membranfusions- und Teilungsereignisse aufrechterhalten. Das Verständnis der Prozesse, die wichtig für die Funktion und die Vererbung der Mitochondrien sind, erfordert die Identifizierung und Charakterisierung der daran beteiligten molekularen Komponenten.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde eine neue Komponente, *MDM33*, identifiziert und charakterisiert. Dabei handelt es sich um ein Gen, welches für ein Protein der mitochondrialen Innenmembran kodiert, und dessen Deletionsmutante einen völlig neuartigen Phänotyp aufweist. Zellen, denen das Mdm33-Protein fehlt, enthalten ringähnliche, miteinander verbundene Mitochondrien, welche große Hohlkugeln ausbilden können. Diese Organellen weisen extrem auseinander gezogene Abschnitte der Außen- und Innenmembran auf, die einen sehr schmalen Matrixspalt umschließen. Die Überexpression von Mdm33 führt zur Einstellung des Wachstums, die Mitochondrien aggregieren, und es entwickelt sich eine stark veränderte Innenmembranstruktur. Es bilden sich verstärkt Septen aus, die den Matrixraum mehrfach unterteilen, oder die Innenmembran verliert die Cristae und fragmentiert. Genetische Hinweise zeigen, dass das Mdm33-Protein vor den Komponenten der Teilungsmaschine der Außenmembran agiert, und dass die mitochondriale Fusion eine Voraussetzung für die Ausbildung der ausgedehnten ringähnlichen Mitochondrien in *Δmdm33*-Zellen ist. Mdm33 assembliert zu einem oligomeren Komplex in der Innenmembran und bildet homotypische Protein-Protein-Interaktionen aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mdm33 bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran involviert ist.

Das Fzo1-Protein ist eine zentrale Komponente der mitochondrialen Fusionsmaschinerie in der Außenmembran. Fzo1 assembliert sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *N. crassa* in einen großen Proteinkomplex. Es sollte untersucht werden, welche Proteine Bestandteile dieses Komplexes sind. Daher wurde ein *N. crassa*-Stamm erzeugt, der stabil Fzo1 mit einem Hexahistidinanhang exprimiert, um den Fzo1-Komplex in größeren Mengen reinigen und mögliche Interaktionspartner identifizieren zu können. Dieser gereinigte Fzo1-Komplex ermöglicht nun auch mechanistische Studien zur Funktionsweise der Fusionsmaschine.

## 6 Literatur

- Aiken Hobbs A.E., Srinivasan M., McCaffery J.M., und Jensen R.E. 2001. Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J. Cell Biol.* 152:401-410.
- Alexander C., Votruba M., Pesch U.E.A., Thiselton D.L., Mayer S., Moore A., Rodriguez M., Kellner U., Leo-Kottler B., Auburger G., Bhattacharya S.S., und Wissinger B. 2000. *Opal*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26:211-215.
- Amberg D.C. 1998. Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol. Biol. Cell.* 9:3259-3262.
- Andaluz E., Coque J.J., Cueva R., und Larriba G. 2001. Sequencing of a 4.3 kbp region of chromosome 2 of *Candida albicans* reveals the presence of homologues of *SHE9* from *Saccharomyces cerevisiae* and of bacterial phosphatidylinositol-phospholipase c. *Yeast.* 18:711-721.
- Bähler J., Wu J.Q., Longtine M.S., Shah N.G., McKenzie A., 3rd, Steever A.B., Wach A., Philippsen P., und Pringle J.R. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 14:943-951.
- Bakeeva L.E., Chentsov Y., und Skulachev V. 1978. Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* 501:349-369.
- Bereiter-Hahn J., und Vöth M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27:198-219.
- Berger K.L., Sogo L.F., und Yaffe M.P. 1997. Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J. Cell Biol.* 136:545-553.
- Bernardi P. 1999. Mitochondria in muscle cell death. *Ital. J. Neurol. Sci.* 6:395-400.
- Bernardi P., Petronilli V., Di Lisa F., und Forte M. 2001. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* 26:112-117.
- Birnboim H.C., und Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bleazard W., McCaffery J.M., King E.J., Bale S., Mozdy A., Tieu Q., Nunnari J., und Shaw J.M. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1:298-304.
- Boldogh I., Vojtov N., Karmon S., und Pon L.A. 1998. Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J. Cell Biol.* 141:1371-1381.
- Boldogh I.R., Yang H.-C., Nowakowski W.D., Karmon S.L., Hays L.G., Yates III J.R., und Pon L.A. 2001. Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3162-3167.
- Brachmann C.B., Davies A., Cost G.J., Caputo E., Li J., Hieter P., und Boeke J.D. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* s288c: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* 14:115-132.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

- Burgess S.M., Delannoy M., and Jensen R.E. 1994. *Mmm1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* 126:1375-1391.
- Cade R.M., and Errede B. 1994. *Mot2* encodes a negative regulator of gene expression that affects basal expression of pheromone-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14:3139-3149.
- Cervený K.L., and Jensen R.E. 2003. The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* 14:4126-4139.
- Cervený K.L., McCaffery J.M., and Jensen R.E. 2001. Division of mitochondria requires a novel Dnm1-interacting protein, Net2p. *Mol. Biol. Cell.* 12:309-321.
- Christianson T.W., Sikorski R.S., Dante M., Shero J.H., and Hieter P. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* 110:119-122.
- David H., Bozner A., Meyer R., and Wassilew G. 1981. Pre- and postnatal development and ageing of the heart. *Exp. Pathol. Suppl.* 7:1-176.
- Davis R.H., and de Serres F.J. 1970. Genetic and microbial research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.* 17A:79-143.
- Delettre C., Lenaers G., Pelloquin L., Belenguer P., and Hamel C.P. 2002. Opa1 (kjer type) dominant optic atrophy: A novel mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* 75:97-107.
- Dimmer K.S., Fritz S., Fuchs F., Messerschmitt M., Weinbach N., Neupert W., and Westermann B. 2002. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 13:847-853.
- Espinete C., de la Torre M.A., Aldea M., and Herrero E. 1995. An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest. *Yeast.* 11:25-32.
- Esser K., Tursun B., Ingenhoven M., Michaelis G., and Pratje E. 2002. A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the maaa complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J. Mol. Biol.* 323:835-843.
- Fekkes P., Shepard K.A., and Yaffe M.P. 2000. Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J. Cell Biol.* 151:333-340.
- Frank S., Gaume B., Bergmann-Leitner E.S., Leitner W.W., Robert E.G., Catez F., Smith C.L., and Youle R.J. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell.* 1:515-525.
- Frey T.G., and Mannella C.A. 2000. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25:319-324.
- Fritz S., Rapaport D., Klanner E., Neupert W., and Westermann B. 2001. Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* 152:683-692.
- Fritz S., Weinbach N., and Westermann B. 2003. Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 14:2303-2313.
- Fuchs F., Prokisch H., Neupert W., and Westermann B. 2002. Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *J. Cell Sci.* 115:1931-1937.
- Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S., and Lazarow P.B. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93:97-102.
- Fuller M.T. 1998. Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:433-444.
- Galagan J.E., Calvo S.E., Borkovich K.A., Selker E.U., Read N.D., Jaffe D., FitzHugh W., Ma L.J., Smirnov S., Purcell S., Rehman B., Elkins T., Engels R., Wang S., Nielsen C.B., Butler J., Endrizzi M., Qui D., Ianakiev P., Bell-Pedersen D., Nelson M.A.,



- Werner-Washburne M., Selitrennikoff C.P., Kinsey J.A., Braun E.L., Zelter A., Schulte U., Kothe G.O., Jedd G., Mewes W., Staben C., Marcotte E., Greenberg D., Roy A., Foley K., Naylor J., Stange-Thomann N., Barrett R., Gnerre S., Kamal M., Kamvysselis M., Mauceli E., Bielke C., Rudd S., Frishman D., Krystofova S., Rasmussen C., Metzberg R., Perkins D.D., Kroken S., Cogoni C., Macino G., Catcheside D., Li W., Pratt R.J., Osmani S.A., DeSouza C.P., Glass L., Orbach M.J., Berglund J.A., Voelker R., Yarden O., Plamann M., Seiler S., Dunlap J., Radford A., Aramayo R., Natvig D.O., Alex L.A., Mannhaupt G., Ebbole D.J., Freitag M., Paulsen I., Sachs M.S., Lander E.S., Nusbaum C., and Birren B. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422:821-822.
- Giaever G., Chu A.M., Ni L., Connelly C., Riles L., Veronneau S., Dow S., Lucau-Danila A., Anderson K., Andre B., Arkin A.P., Astromoff A., El-Bakkoury M., Bangham R., Benito R., Brachat S., Campanaro S., Curtiss M., Davis K., Deutschbauer A., Entian K.D., Flaherty P., Foury F., Garfinkel D.J., Gerstein M., Gotte D., Guldener U., Hegemann J.H., Hempel S., Herman Z., Jaramillo D.F., Kelly D.E., Kelly S.L., Kotter P., LaBonte D., Lamb D.C., Lan N., Liang H., Liao H., Liu L., Luo C., Lussier M., Mao R., Menard P., Ooi S.L., Revuelta J.L., Roberts C.J., Rose M., Ross-Macdonald P., Scherens B., Schimmack G., Shafer B., Shoemaker D.D., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Strathern J.N., Valle G., Voet M., Volckaert G., Wang C.Y., Ward T.R., Wilhelmy J., Winzler E.A., Yang Y., Yen G., Youngman E., Yu K., Bussey H., Boeke J.D., Snyder M., Philippsen P., Davis R.W., and Johnston M. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*. 418:387-391.
- Gietz D., Jean A.S., Woods R.A., and Schiestl R.H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl. Acids Res.* 20:1425.
- Gray M.W., Burger G., and Lang B.F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science*. 283:1476-1481.
- Guan K., Farh L., Marshall T.K., and Deshenes R.J. 1993. Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the *MGM1* gene. *Curr. Genet.* 24:141-148.
- Hales K.G., and Fuller M.T. 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*. 90:121-129.
- Harlow E., and Lane D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Hartl F.-U., Pfanner N., Nicholson D.W., and Neupert W. 1989. Mitochondrial protein import. *Biochim. Biophys. Acta*. 988:1-45.
- Herlan M., Vogel F., Bornhövd C., Neupert W., and Reichert A.S. 2003. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 278:27781-27788.
- Hermann G.J., King E.J., and Shaw J.M. 1997. The yeast gene, *MDM20*, is necessary for mitochondrial inheritance and organization of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 137:141-153.
- Hermann G.J., and Shaw J.M. 1998. Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:265-303.
- Hermann G.J., Thatcher J.W., Mills J.P., Hales K.G., Fuller M.T., Nunnari J., and Shaw J.M. 1998. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* 143:359-373.
- Herrmann J.M., Fölsch H., Neupert W., and Stuart R.A. 1994. Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. *In Cell biology: A laboratory handbook*. Vol. 1. J.E. Celis, editor. Academic Press, San Diego. 538-544.
- Hofmann K., and Stoffel W. 1993. Tmbase - a database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 347:166.

- Hollenbeck P.J. 1996. The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front. Biosci.* 1:d91-d102.
- Hwa J.J., Hiller M.A., Fuller M.T., and Santel A. 2002. Differential expression of the *Drosophila* mitofusin genes *fuzzy onions (fzo)* and *dmfn*. *Mech. Dev.* 116:213-216.
- Irie K., Yamaguchi K., Kawase K., and Matsumoto K. 1994. The yeast *MOT2* gene encodes a putative zinc finger protein that serves as a global negative regulator affecting expression of several categories of genes, including mating-responsive genes. *Mol. Cell. Biol.* 14:3150-3157.
- Jakobs S., Martini N., Schauss A.C., Egner A., Westermann B., and Hell S.W. 2003. Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J. Cell Sci.* 116:2005-2014.
- Jensen R.E., Aiken Hobbs A.E., Cerveny K.L., and Sesaki H. 2000. Yeast mitochondrial dynamics: Fusion, division, segregation, and shape. *Microsc. Res. Tech.* 51:573-583.
- Jones B.A., and Fangman W.L. 1992. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* 6:380-389.
- Kataoka R., Hyo Y., Hoshiya T., Miyahara H., and Matsunaga T. 1991. Ultrastructural study of mitochondria in oncocytes. *Ultrastruct. Pathol.* 15:231-239.
- Khodjakov A., Lizunova E.M., Minin A.A., Koonce M.P., and Gyoeva F.K. 1998. A specific light chain of kinesin associates with mitochondria in cultured cells. *Mol. Biol. Cell.* 9:333-343.
- Künkele K.-P., Heins S., Dembowski M., Nargang F.E., Benz R., Thieffry M., Walz J., Lill R., Nussberger S., and Neupert W. 1998. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell.* 93:1009-1019.
- Kyshe-Anderson J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10:203-207.
- Labrousse A.M., Zappaterra M.D., Rube D.A., and van der Blik A.M. 1999. *C. Elegans* dynamin-related protein drp-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell.* 4:815-826.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature.* 227:680-685.
- Larsen W.J. 1970. Genesis of mitochondria in insect fat body. *J. Cell Biol.* 47:373-383.
- Larsson N.-G., and Luft R. 1999. Revolution in mitochondrial medicine. *FEBS Lett.* 455:199-202.
- Lee S.B., Milgroom M.G., and Taylor J.W. 1988. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet. Newsl.* 35:23-24.
- Legesse-Miller A., Massol R.H., and Kirchhausen T. 2003. Constriction and dnm1-recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell.* 14:1953-1963.
- Lupas A., Van Dyke M., and Stock J. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science.* 252:1162-1164.
- Mayer A., Neupert W., and Lill R. 1995. Mitochondrial protein import: Reversible binding of the presequence at the *trans* side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding. *Cell.* 80:127-137.
- McConnell S.J., Stewart L.C., Talin A., and Yaffe M.P. 1990. Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.* 111:967-976.
- McQuibban G.A., Saurya S., and Freeman M. 2003. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature.* 423:537-541.

- Messerschmitt M., Jakobs S., Vogel F., Fritz S., Dimmer K.S., Neupert W., und Westermann B. 2003. The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 160:553-564.
- Mozdy A., McCaffery J.M., und Shaw J.M. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fusion is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* 151:367-379.
- Mulholland J., Wesp A., Riezman H., und Botstein D. 1997. Yeast actin cytoskeleton mutants accumulate a new class of golgi-derived secretory vesicle. *Mol. Biol. Cell.* 8:1481-1499.
- Nangaku M., Sato-Yoshitake R., Okada Y., Noda Y., Takemura R., Yamazaki H., und Hirokawa N. 1994. Kif1b, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell.* 79:1209-1220.
- Neupert W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66:863-917.
- Nunnari J., Marshall W.F., Straight A., Murray A., Sedat J.W., und Walter P. 1997. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell.* 8:1233-1242.
- Ono T., Isobe K., Nakada K., und Hayashi J.I. 2001. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.* 28:272-275.
- Osteryoung K.W. 2001. Organelle fission in eukaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:639-646.
- Otsuga D., Keegan B.R., Brisch E., Thatcher J.W., Hermann G.J., Bleazard W., und Shaw J.M. 1998. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 143:333-349.
- Palade G. 1953. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* 1:188-211.
- Pereira A.J., Dalby B., Stewart R.J., Doxsey S.J., und Goldstein L.S. 1997. Mitochondrial association of a plus end-directed microtubule motor expressed during mitosis in *drosophila*. *J. Cell Biol.* 136:1081-1090.
- Prinz W.A., Grzyb L., Veenhuis M., Kahana J.A., Silver P.A., und Rapoport T.A. 2000. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 150:461-474.
- Prokisch H., Neupert W., und Westermann B. 2000. Role of Mmm1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell.* 11:2961-2971.
- Rapaport D., Brunner M., Neupert W., und Westermann B. 1998. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273:20150-20155.
- Rojo M., Legros F., Chateau D., und Lombes A. 2002. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* 115:1663-1674.
- Rothman J.E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 372:55-63.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., und Erlich H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-491.
- Saiki R.K., Scharf S.J., Falonna f., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., und Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-1354.
- Sambrook J., Fritsch E.F., und Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Santel A., und Fuller M.T. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114:867-874.

- Scheffler I.E. 2001. A century of mitochondrial research: Achievements and perspectives. *Mitochondrion*. 1:3-31.
- Schnapp B.J. 1997. Rna localization in *Xenopus* oocytes. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 8:529-540.
- Sesaki H., and Jensen R.E. 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* 147:699-706.
- Sesaki H., and Jensen R.E. 2001. *Ugo1* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 152:1123-1134.
- Sesaki H., Southard S.M., Yaffe M.P., and Jensen R.E. 2003. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell.* 14:2342-2356.
- Shaw J.M., and Nunnari J. 2002. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* 12:178-184.
- Shepard K.A., and Yaffe M.P. 1999. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.* 144:711-720.
- Sikorski R.S., and Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 122:19-27.
- Simon V.R., Swayne T.C., and Pon L.A. 1995. Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: Identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J. Cell Biol.* 130:345-354.
- Smirnowa E., Shurland D.L., Ryazantsev S.N., and van der Blik A.M. 1998. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* 143:351-358.
- Smolich J.J. 1995. Ultrastructural and functional features of the developing mammalian heart: A brief overview. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:451-461.
- Sogo L.F., and Yaffe M.P. 1994. Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 130:1361-1373.
- Söllner T., Pfaller R., Griffiths G., Pfanner N., and Neupert W. 1990. A mitochondrial import receptor for the ATP/ADP carrier. *Cell*. 62:107-115.
- Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Staben C., Jensen B., Singer M., Pollock J., Schechtman M., Kinsey J., and Selker E. 1989. Use of bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genet. Newsl.* 36:79-81.
- Sutton R.B., Fasshauer D., Jahn R., and Brunger A.T. 1998. Crystal structure of a snare complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 395:347-353.
- Sweigard J., Chumley F., Carroll A., Farrall L., and Valent B. 1997. A series of vectors for fungal transformation. *Fungal Genet. Newsl.* 44:52-53.
- Tandler B., Erlandson R.A., Smith A.L., and Wynder E.L. 1969. Riboflavin and mouse hepatic cell structure and function. II. Division of mitochondria during recovery from simple deficiency. *J. Cell Biol.* 41:477-493.
- Tandler B., and Hoppel C.L. 1972. Possible division of cardiac mitochondria. *Anat. Rec.* 173:309-323.
- Tavares M.A., and Paula-Barbosa M.M. 1983. Mitochondrial changes in rat purkinje cells after prolonged alcohol consumption. A morphologic assessment. *J. Submicrosc. Cytol.* 15:713-720.
- Tieu Q., and Nunnari J. 2000. Mdv1p is a wd repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 151:353-365.
- Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:267-271.

- Vernet T., Dignard D., and Thomas D.Y. 1987. A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene*. 52:225-233.
- Vollmer S., and Yanofsky C. 1986. Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:4869-4873.
- von Heijne G. 1986. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* 5:1335-1342.
- Wagner I., Arlt H., van Dyck L., Langer T., and Neupert W. 1994. Molecular chaperones cooperate with Pim1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.* 13:5135-45.
- Wallace D.C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 283:1482-1488.
- Warren G. 1985. Membrane traffic and organelle division. *Trends biochem. sci.* 10:439-443.
- Weber T., Zemelman B.V., McNew J.A., Westermann B., Gmachl M., Parlati F., Söllner T.H., and Rothman J.E. 1998. Snarepins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell*. 92:759-772.
- Westermann B. 2003. Mitochondrial membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1641:195-202.
- Westermann B. 2002. Merging mitochondria matters. Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep.* 3:527-531.
- Westermann B., and Neupert W. 2000. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 16:1421-1427.
- Winzler E.A., Shoemaker D.D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., Bangham R., Benito R., Boeke J.D., Bussey H., Chu A.M., Connelly C., Davis K., Dietrich F., Dow S.W., El Bakkoury M., Foury F., Friend S.H., Gentalen E., Giaever G., Hegemann J.H., Jones T., Laub M., Liao H., Liebundguth N., Lockhart D.J., Lucau-Danila A., Lussier M., M'Rabet N., Menard P., Mittmann M., Pai C., Rebischung C., Revuelta J.L., Riles L., Roberts C.J., Ross-MacDonald P., Scherens B., Snyder M., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Veronneau S., Voet M., Volckaert G., Ward T.R., Wysocki R., Yen G.S., Yu K., Zimmermann K., Philippsen P., Johnston M., and Davis R.W. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*. 285:901-906.
- Wong E.D., Wagner J.A., Gorsich S.W., McCaffery J.M., Shaw J.M., and Nunnari J. 2000. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* 151:341-352.
- Wong E.D., Wagner J.A., Scott S.V., Okreglak V., Holewinski T.J., Cassidy-Stone A., and Nunnari J. 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 160:303-311.
- Yaffe M.P. 1997. Mitochondrial morphogenesis: Fusion factor for fly fertility. *Curr. Biol.* 7:R782-R783.
- Yaffe M.P. 1999. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science*. 283:1493-1497.
- Yoon Y., Krueger E.W., Oswald B.J., and McNiven M.A. 2003. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein Dlp1. *Mol. Cell. Biol.* 23:5409-5420.
- Zinser E., and Daum G. 1995. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 11:493-536.

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

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

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

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Marlies Messerschmitt
Geburtsdatum	30.01.1970
Geburtsort	Bad Kissingen

### **Schulbildung und Hochschulstudium**

1976-1980	Besuch der Anton-Kliegl-Grundschule in Bad Kissingen
1980-1984	Besuch des Internatgymnasiums der Schwestern vom hl. Kreuz in Gemünden am Main
1984-1989	Besuch des Gymnasiums in Bad Kissingen
1989	Abitur
1990-1993	Ausbildung zur Schriftsetzerin bei der Saalezeitung Bad Kissingen
1993-1998	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1997-1998	Diplomarbeit im Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie bei Prof. Dr. Ulrich Walter: „Klonierung und Charakterisierung einer neuen humanen EVH1-Domäne“
November 1998	Diplom in Biologie
März 1999	Beginn der vorliegenden Dissertation im Labor von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert in der Arbeitsgruppe von Dr. Benedikt Westermann am Institut für Physiologische Chemie der Ludwigs-Maximilians-Universität München

## **Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Benedikt Westermann bedanken, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand. Das gute Arbeitsklima, der Ideenreichtum und die vielen Anregungen, die er mir gab, waren für das Entstehen dieser Arbeit von großer Bedeutung. Auch seine Freundlichkeit und sein Verständnis werden mir in bester Erinnerung bleiben.

Bedanken möchte ich mich auch für die Unterstützung, die ich von allen wissenschaftlichen Mitarbeitern erhielt. Die angenehme Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft aller Institutsmitglieder hat sehr oft in schwierigen Phasen der Laborarbeit geholfen. Ganz besonders möchte ich mich hier bei meiner Arbeitsgruppe bedanken: Nicole Bauknecht, Jutta Dierolf, Kai-Stefan Dimmer, Tung-Gia Du, Stefan Fritz, Florian Fuchs, Gabi Ludwig und Nadja Weinbach. Die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft meiner Kollegen hat dazu beigetragen, dass die Arbeit letztlich immer Freude bereitete. Danken möchte ich nicht zuletzt allen, die auch zu dieser guten Atmosphäre beitrugen, die Arbeit unterstützten und immer hilfsbereit waren: Frau Lapschansky, die Mitarbeiter der Werkstatt, des Hasenstalls, Frau Döge, Frau Farsen, Frau Hauck. Im besonderen möchte ich hier Frau Reisenauer erwähnen, die durch die ständige Verfügbarkeit von Kaffee dafür sorgte, dass der Treibstoff für die Arbeit nicht ausging.

Ein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Soll für seine Bereitschaft, diese Arbeit an der Fakultät für Biologie zu vertreten.