

**Untersuchung der submitochondrialen
Verteilung von Oxa1 und Mba1
in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Marlen Marina Stäglich

aus Dresden

Göttingen, 2015

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Stefan Jakobs, Forschungsgruppe Struktur und Dynamik von Mitochondrien,
Abt. NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

PD Dr. Wilfried Kramer, Abt. Molekulare Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik,
Georg-August-Universität Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: PD Dr. Wilfried Kramer, Abt. Molekulare Genetik, Institut für
Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen

Korreferent: Prof. Dr. Stefan Jakobs, Forschungsgruppe Struktur und Dynamik
von Mitochondrien, Abt. NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für
biophysikalische Chemie

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

PD Dr. Thomas Teichmann, Abt. Zellbiologie der Pflanze,
Schwann-Schleiden-Forschungszentrum für Molekulare Zellbiologie,
Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Peter Rehling, Institut für Zelluläre Biochemie,
Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. Michael Meinecke, Institut für Zelluläre Biochemie,
Universitätsmedizin Göttingen

Dr. Hans Dieter Schmitt, Projektgruppe Membrantransport in Hefe,
Abt. Neurobiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2015

für Matthi

ZUSAMMENFASSUNG	6
SUMMARY	8
1 EINLEITUNG	10
1.1 Entstehung und Funktion von Mitochondrien	10
1.2 Morphologie und Dynamik von Mitochondrien	11
1.3 Ultrastruktur von Mitochondrien	14
1.4 Proteinbiogenese von Mitochondrien	19
1.4.1 Mitochondriale Import- und Sortierungssignale	19
1.4.2 Transport kernkodierter Proteine in Mitochondrien	20
1.4.3 Sortierung kernkodierter Proteine in die äußere Membran	21
1.4.4 Import kernkodierter Proteine in den Intermembranraum	22
1.4.5 Import kernkodierter Proteine in den Matrixraum	22
1.4.6 Sortierung kernkodierter Proteine in die innere Membran	23
1.4.7 Sortierung mitochondrial kodierter Proteine	25
1.4.7.1 Das Protein Oxa1	26
1.4.7.2 Die Proteine Cox18, Pnt1 und Mss2	29
1.4.7.3 Das Protein Mba1	29
2 MOTIVATION UND ZIELE DIESER ARBEIT	32
3 MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 Verwendete Materialien	33
3.1.1 Chemikalien	33
3.1.2 Enzyme	34
3.1.3 Antikörper und Fluorophore	35
3.1.4 DNS-Oligonukleotide	36
3.1.5 Vektoren und Plasmide	38
3.1.6 Bakterienstamm und Materialien für dessen Kultivierung	40
3.1.7 Hefestämme und Materialien für ihre Kultivierung	40
3.1.7.1 Materialien für die standardmäßige Kultivierung von Hefezellen	44
3.1.7.2 Materialien für die Kultivierung von Hefezellen für SILAC (<i>Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture</i>)	45
3.1.8 Elektronische Datenverarbeitung	46
3.2 Molekularbiologische Methoden	47
3.2.1 Polymerasekettenreaktion zur Vervielfältigung von DNS	47
3.2.2 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNS	48
3.2.3 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen	49
3.2.4 Aufreinigung von DNS aus Lösungen	49
3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNS	49
3.2.6 Restriktion von DNS	49
3.2.7 Dephosphorylierung von DNS	50
3.2.8 Ligation von DNS	50
3.2.9 Aufkonzentrierung von DNS in Lösungen	50
3.2.10 Sequenzierung von DNS	50
3.3 Bakterien-spezifische Methoden	51

3.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	51
3.3.2	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen	51
3.3.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	51
3.3.4	Aufreinigung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> -Zellen	51
3.3.4.1	Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)	52
3.3.4.2	Plasmid-Präparation im großen Maßstab (Midi-Präparation)	52
3.4	Hefe-spezifische Methoden	52
3.4.1	Standardmäßige Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	52
3.4.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen für SILAC	53
3.4.3	Elektrotransformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	54
3.4.4	Gerichtete Integration von DNS in das Hefe-Genom	54
3.4.5	Isolation chromosomaler DNS aus <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	55
3.4.6	Sporulation und Tetradenanalyse	56
3.4.7	Halo-Assay	56
3.4.8	Wachstumstopfpest mit <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	57
3.5	Proteinbiochemische Methoden	57
3.5.1	Präparation von Gesamtzellprotein aus Hefezellen	57
3.5.2	Präparation von Mitochondrien aus Hefezellen	57
3.5.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	58
3.5.4	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	58
3.5.5	Subfraktionierung von Hefe-Mitochondrien	58
3.5.6	Natriumcarbonat-Extraktion von Hefe-Mitochondrien	59
3.5.7	Koimmunopräzipitation	60
3.5.7.1	Koimmunopräzipitation mit SILAC-markierten Oxa1-FLAG-Varianten	60
3.5.7.2	Koimmunopräzipitation mit Mba1-FLAG-Varianten	60
3.5.8	Western-Analyse	61
3.5.8.1	Proteinauftrennung über SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	61
3.5.8.2	Proteinauftrennung über Nativ-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	62
3.5.8.2.1	BN-PAGE zur Analyse von Oxa1-Komplexen	62
3.5.8.2.2	BN-PAGE zur Analyse von Superkomplexen der Atmungskette	63
3.5.8.3	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	64
3.5.8.4	Roti-Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	64
3.5.8.5	Coomassie-Färbung von Nativ- und SDS-Polyacrylamidgelen	64
3.5.8.6	Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen mittels Nass-Blot	65
3.5.8.7	Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen mittels <i>Semi-Dry</i> -Blot	65
3.5.8.8	Ponceau S-Färbung von Nitrozellulosemembranen	65
3.5.8.9	Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen	66
3.5.8.10	Immundetektion membrangebundener Proteine	66
3.6	Fluoreszenzmikroskopie	67
3.6.1	Fluoreszenz-Tags und Fluorophore	67
3.6.2	Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie	67
3.6.3	Epifluoreszenzmikroskopie	67
3.6.4	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	68
3.7	Elektronenmikroskopie	68
3.7.1	Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie	68
3.7.2	Bildaufnahme mit dem Elektronenmikroskop	69
3.7.3	Datenanalyse und Quantifizierung	69
3.8	Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	70
3.8.1	Proteolytische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel	70
3.8.2	Extraktion von Peptiden aus dem SDS-Gel	71
3.8.3	LC-MS/MS-Analyse von Peptiden	71
3.8.4	Prozessierung der massenspektrometrischen Daten	72

3.8.4.1	Analyse der massenspektrometrischen Daten der Koimmunopräzipitationen mit den SILAC-markierten Oxa1-FLAG-Varianten	72
3.8.4.2	Analyse der massenspektrometrischen Daten der Koimmunopräzipitationen mit den verschiedenen Mba1-FLAG-Varianten.....	72
4	ERGEBNISSE	73
4.1	Grundlagen der dynamischen Verteilung von Oxa1 in der inneren mitochondrialen Membran	73
4.1.1	Durchschnittsgrößen von Oxa1-enhaltenden Komplexen.....	73
4.1.1.1	Stabilität von Oxa1-FLAG-Varianten	74
4.1.1.2	BN-PAGE zur Analyse von Oxa1-enhaltenden Komplexen	76
4.1.2	Analyse von Oxa1-Komplexen und Oxa1-Interaktionen	78
4.1.2.1	Erstellung und Überprüfung von <i>OXA1-FLAG</i> -Varianten exprimierenden Hefestämmen für SILAC-basierte LC-MS/MS-Analysen	79
4.1.2.2	Stabilität SILAC-markierter Oxa1-FLAG-Varianten.....	79
4.1.2.3	SILAC-basierte LC-MS/MS-Analyse von Oxa1-Komplexen.....	81
4.2	Submitochondriale Verteilung von an der Membraninsertion beteiligten Proteinen	84
4.2.1	Mikroskopische Techniken zur Analyse der submitochondrialen Proteinverteilung in <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	85
4.2.2	Submitochondriale Verteilung von Mba1 und Pnt1.....	87
4.3	Grundlagen der submitochondrialen Verteilung von Mba1 in der inneren mitochondrialen Membran .	90
4.3.1	Erzeugung von Plasmiden zur Expression von <i>MBA1</i> -Fusionskonstrukten in <i>S. cerevisiae</i>	91
4.3.2	Erzeugung von <i>MBA1</i> -Fusionskonstrukten exprimierenden <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen	91
4.3.3	Submitochondriale Verteilung von Mba1 in Abhängigkeit der verwendeten Kohlenstoffquelle	92
4.3.3.1	Expression und Stabilität von Mba1-GFP und Mba1-FLAG	92
4.3.3.2	Lokalisation und Orientierung von Mba1-FLAG	93
4.3.3.3	Membranständigkeit von Mba1-FLAG	94
4.3.3.4	Submitochondriale Verteilung von Mba1 unter fermentativen sowie unter respiratorischen Wachstumsbedingungen	95
4.3.4	Submitochondriale Verteilung von Mba1 in Abhängigkeit von Mutationen im <i>MBA1</i> -Gen.....	98
4.3.4.1	Auswirkungen von Deletionsmutationen im <i>MBA1</i> -Gen auf die submitochondriale Verteilung von Mba1.....	99
4.3.4.2	Stabilität, mitochondriale Lokalisation, Orientierung und Membranständigkeit der Deletionsmutanten Mba1 ¹⁻²⁷⁵ und Mba1 ¹⁻²⁷³	102
4.3.4.3	Auswirkungen von Substitutionsmutationen im <i>MBA1</i> -Gen auf die submitochondriale Verteilung von Mba1.....	106
4.3.4.4	Stabilität, mitochondriale Lokalisation, Orientierung und Membranständigkeit der Substitutionsmutante Mba1-I272A	109
4.3.5	Auswirkungen von <i>MBA1</i> -Genmutationen auf die Funktion des Mba1-Proteins.....	111
4.3.6	Auswirkungen von <i>MBA1</i> -Genmutationen auf die Biogenese der Superkomplexe der Atmungskette	113
4.3.7	Auswirkungen von <i>MBA1</i> -Genmutationen auf die Interaktion von Mba1 mit anderen mitochondrialen Proteinen	115
4.3.8	Submitochondriale Verteilung von Mba1-Varianten in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur	119
5	DISKUSSION	124
5.1	Charakterisierung von Oxa1 in <i>S. cerevisiae</i>	124
5.1.1	Die Größe der Oxa1-enhaltenden Komplexe steht nicht mit der bevorzugten Lokalisation von Oxa1 in Zusammenhang.....	125
5.1.2	Die Substitutionsmutation <i>oxa1-W128F</i> führt zu einer Beeinträchtigung der Homooligomerisierung von Oxa1	126
5.2	Charakterisierung von Mba1 in <i>S. cerevisiae</i>	128

5.2.1	Mba1 weist eine heterogene und statische Verteilung in der inneren mitochondrialen Membran auf	128
5.2.2	Der C-Terminus von Mba1 ist essentiell für die submitochondriale Lokalisation von Mba1.....	129
5.2.3	Der C-Terminus von Mba1 ist notwendig für die Biogenese der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung	132
5.2.4	Die Rolle des C-Terminus von Mba1 hinsichtlich der Interaktionen von Mba1 mit weiteren mitochondrialen Proteinen	133
5.2.4.1	Die Rolle des C-Terminus von Mba1 bei der Interaktion mit einem Insertionskomplex der inneren Membran	135
5.2.4.2	Die Rolle des C-Terminus von Mba1 bei der Interaktion mit Cox20	136
5.3	Oxa1 und Mba1 im Kontext der Proteininsertion	137
5.4	Ausblick	138
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	139
6.1	Abkürzungen.....	139
6.2	Abkürzungen verschiedener Spezies	143
6.3	Abkürzungen von Gen- und Proteinbenennungen.....	144
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	146
8	ANHANG.....	167
8.1	Vektoren und Plasmide	167
8.1.1	Vektoren für die Erstellung von Expressionsplasmiden	167
8.1.2	Erstellung von Fusionskonstrukten für die Expression in Hefe sowie als Templates für die PCR-Amplifikation	168
8.2	Aminosäuresequenz von Oxa1 aus <i>S. cerevisiae</i>	171
8.3	Aminosäuresequenz von Mba1 aus <i>S. cerevisiae</i>	171
8.4	Aminosäuresequenzvergleich von Mba1-Proteinen aus unterschiedlichen Spezies	172
8.5	Größenstandard für DNS.....	173
8.6	PCR-Produkt für die Deletion von MDM10 im Hefe-Genom zur Erzeugung vergrößerter Mitochondrien	173
8.7	Genetische Verifikation von Gendeletionen im Hefe-Genom sowie von erstellten Expressionsplasmiden	173
8.7.1	Nachweis der Deletion von <i>MBA1</i> , <i>OXA1</i> bzw. <i>PNT1</i> im $\Delta mba1$ -, $\Delta oxa1$ - bzw. $\Delta pnt1$ -Stamm der <i>YKODC</i>	173
8.7.2	Nachweis der <i>MBA1</i> -Deletion im $\Delta mba1$ -Stamm (<i>BY4741</i>).....	174
8.7.3	Nachweis der <i>OXA1</i> -Deletion in den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen	175
8.7.4	Nachweis der für eine <i>OXA1-FLAG</i> -Variante kodierenden Plasmide in den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen.....	175
8.7.5	Nachweis der <i>ARG4</i> -Deletion in den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen	176
8.7.6	Nachweis der <i>LYS2</i> -Deletion in den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen.....	176
8.8	Überprüfung der für SILAC-Analysen erstellten Hefe-stämme mittels Wachstumstest	177

8.9	Streudiagramme der SILAC-basierten Vorwärts- und Rückwärtsanalyse (LC-MS/MS)	178
8.10	Größenstandards für Proteine	179
8.11	Weitere Informationen und Western-Analysen zur Charakterisierung von Fusionsproteinen	179
8.12	Fluoreszenzmikroskopische Analysen	182
8.12.1	Einfluss der Mba1-Fusionsproteine auf die Morphologie und die Funktionalität von Mitochondrien	182
8.12.2	Lokalisation von Mba1 in Abhängigkeit von Deletionsmutationen im <i>MBA1</i> -Gen in vergrößerten Mitochondrien	184
8.12.3	Lokalisation von Mba1 in Abhängigkeit von Substitutionsmutationen im <i>MBA1</i> -Gen in vergrößerten Mitochondrien	186
8.12.4	Lokalisation von Mba1-Varianten in vergrößerten Mitochondrien bei verschiedenen Wachstumstemperaturen	188
8.13	Elektronenmikroskopische Analysen	190
8.14	Auswirkungen von MBA1-Mutationen	192
8.14.1	Analyse des Wachstumsverhaltens von Hefestämmen, die <i>MBA1-GFP</i> -Varianten exprimieren	192
8.14.2	Koimmunopräzipitationen mit Mba1-FLAG-Varianten	193
9	DANKSAGUNG	194
10	LEBENS LAUF	195

Zusammenfassung

Die Mitochondrien eukaryotischer Zellen sind an einer Reihe zellulärer Prozesse beteiligt und übernehmen essentielle Funktionen, wie die der Energiegewinnung aus der oxidativen Phosphorylierung. Sie weisen ein hohes Maß an struktureller Komplexität auf. Das gesamte Organell wird von der äußeren mitochondrialen Membran umgeben und ist durch diese gegenüber dem Zytoplasma abgegrenzt. Die innere mitochondriale Membran kann morphologisch in zwei Bereiche unterteilt werden: Der der äußeren Membran direkt gegenüberliegende Teil wird als „innere Grenzflächenmembran“ bezeichnet, während zahlreiche Einstülpungen die sogenannte „Cristaemembran“ bilden.

Vorhergehende Studien lieferten Hinweise darauf, dass es sich bei der Subkompartimentierung der Innenmembran auch um eine funktionale Gliederung handeln könnte, da für zahlreiche mitochondriale Proteine eine heterogene Verteilung nachgewiesen werden konnte. Darunter befindet sich auch das Protein Oxa1 der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, das sowohl bei der Insertion von kernkodierten als auch von mitochondrial kodierten Proteinen eine zentrale Rolle spielt. In vorausgegangenen Arbeiten wurde belegt, dass Oxa1 bevorzugt in der inneren Grenzflächenmembran vorliegt, wenn die Hefen mit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen. Diese Verteilung ist jedoch dynamisch und verändert sich in Abhängigkeit von den physiologischen Bedürfnissen der Zellen. Wachsen die Hefen mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle, weist Oxa1 eine präferentielle Lokalisation in der Cristaemembran auf. Eine Anreicherung in der Cristaemembran ist auch zu beobachten, wenn die hoch konservierte Aminosäure Tryptophan an Position 128 mit Phenylalanin substituiert wird. Die Substitutionsmutation *oxa1-W128F* führt darüber hinaus zu einer Verringerung der durchschnittlichen Größen der Oxa1-enthaltenden Komplexe. Hieraus ergab sich die Frage, ob die Komplexgröße und die submitochondriale Lokalisation von Oxa1 in direktem Zusammenhang stehen könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Größen der Oxa1-enthaltenden Komplexe in Abhängigkeit zu der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass die durchschnittlichen Größen der Oxa1-enthaltenden Komplexe, die in der inneren Grenzflächenmembran angereichert sind, ungefähr den Größen der Komplexe entsprechen, die bevorzugt in der Cristaemembran vorliegen. Demzufolge gibt es keinen Zusammenhang zwischen der Komplexgröße und der Lokalisation von Oxa1, weshalb der Veränderung der Lokalisation ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen muss. Die Untersuchung der Variante Oxa1-W128F zeigte, dass diese im Vergleich zu Oxa1, wie bereits beschrieben, in kleineren Komplexen vorliegt, bei denen es sich sogar um Dimere sowie Tetramere von Oxa1 handeln könnte, und, dass die Verringerung der Komplexgrößen auf eine beeinträchtigte Homooligomerisierung zurückgeführt werden kann. Zusammen mit der Tatsache, dass neben Oxa1 selbst keine weiteren Interaktionspartner identifiziert werden konnten, legen diese Ergebnisse nahe, dass Oxa1 sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen in größeren homooligomeren Komplexen agieren könnte und, dass seine Dynamik möglicherweise auf transiente Interaktionen mit Substraten zurückzuführen ist.

Es ist bekannt, dass in *S. cerevisiae* neben Oxa1 noch weitere Proteine existieren, die ebenfalls Teil der Proteininsertionsmaschinerie der inneren mitochondrialen Membran sind. Dazu gehören Pnt1 und Mba1, über deren Verteilung in der inneren Membran bisher keine gesicherten Erkenntnisse vorlagen. Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass auch Pnt1 und Mba1 heterogen verteilt sind. So ist sowohl für Pnt1 als auch für Mba1 bei Wachstum mit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle eine Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran zu verzeichnen. Bei Wachstum mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle verschiebt sich die präferentielle Lokalisation von Pnt1 zu einer Anreicherung in der Cristaemembran, wie es bereits für Oxa1 beobachtet wurde. Mba1 hingegen liegt unverändert bevorzugt in der inneren Grenzflächenmembran vor. Somit konnte für die heterogene Verteilung von Pnt1 eine von den physiologischen Bedingungen abhängige Dynamik und für die heterogene Verteilung von Mba1 eine Statik nachgewiesen werden.

Auf Grund des differenzierten Lokalisationsverhaltens von Mba1 im Vergleich zu Oxa1 und Pnt1, wurde eine nähere Charakterisierung der submitochondrialen Verteilung von Mba1 vorgenommen. Bei der Untersuchung der Ursachen der statischen Lokalisation von Mba1 auf molekularer Ebene, wurde festgestellt, dass bereits die Deletion von nur fünf Aminosäuren (*mba1*¹⁻²⁷³) sowie die Substitution einer einzelnen Aminosäure (*mba1-I272A*) im C-Terminus von Mba1 zu einer drastischen Veränderung der heterogenen Mba1-Verteilung führt. Die Untersuchung der Auswirkungen der Genmutationen auf die Funktion von Mba1 zeigte, dass es infolge der Deletionsmutation zu einer verminderten Respirationskompetenz der Zellen kommt, die auf eine Beeinträchtigung der Assemblierung eines Superkomplexes der Atmungskette (2 x KomplexIII / 2 x KomplexIV) zurückgeführt werden kann. Somit liefert die vorliegende Arbeit erstmals Hinweise darauf, dass die dokumentierte heterogene und statische Verteilung von Mba1 in der inneren Membran ausschlaggebend für die korrekte Funktionsweise von Mba1 ist. Möglicherweise wird der Funktionsort von Mba1 durch die Bindung eines bisher nicht eindeutig identifizierten Interaktionspartners bestimmt.

Summary

The mitochondria of eucaryotic cells are involved in several cellular processes and fulfill a multitude of fundamental tasks, such as the production of energy via the process of oxidative phosphorylation. They exhibit a high structural complexity. The outer mitochondrial membrane encloses the entire organelle and therefore delimits it against the cytoplasm. The highly infolded inner mitochondrial membrane is organized into two contiguous but morphologically distinct domains: the “cristae membrane” and the “inner boundary membrane” which faces the outer mitochondrial membrane.

Previous studies provided evidence for a functional compartmentalization of the inner mitochondrial membrane because of the heterogeneous distribution of several mitochondrial proteins. In the course of these studies, the protein Oxa1 of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* was examined, which plays a key role not only in the insertion of nuclear encoded proteins but also of proteins encoded in the mitochondrial genome. A detailed analysis concerning the distribution of Oxa1 revealed its preferential localization in the inner boundary membrane when yeast cells are grown with a fermentable carbon source. However, this heterogeneous distribution changes dynamically depending on the physiological needs of the cell. Thus, in yeast cells grown with a non-fermentable carbon source, Oxa1 is enriched in the cristae membrane. A preferential localization in the cristae membrane can also be observed for Oxa1 when the evolutionary conserved amino acid tryptophan at position 128 is substituted with phenylalanine. Furthermore, the substitution mutation *oxa1-W128F* resulted in a decrease in the size of Oxa1 containing complexes leading to the question whether a correlation exists between the complex sizes and the submitochondrial localization of Oxa1. Therefore, the sizes of the Oxa1 containing complexes were analyzed depending on the available carbon source. In the course of this work, it has been shown that the sizes of Oxa1 containing complexes, which are located in the inner boundary membrane, do not differ from the complexes that are enriched in the cristae membrane. Accordingly, a correlation between the sizes of Oxa1 containing complexes and the submitochondrial localization of Oxa1 could not be demonstrated, and the shift in Oxa1 distribution must therefore be regulated by another mechanism. The analysis of the mutated variant Oxa1-W128F showed a reduction in the complex size in comparison to Oxa1, like it has been described previously. Further, the observed sizes of Oxa1-W128F containing complexes are in accordance to the size of an Oxa1 dimer as well as an Oxa1 tetramer, and the decrease in Oxa1 complex size can be traced back to an impairment in homooligomerization. In conjunction with the fact that no further interaction partner besides Oxa1 itself could be identified, these data suggest that Oxa1 might function as a homooligomeric complex under fermentative as well as respiratory growth conditions, and that the dynamic behaviour of Oxa1 distribution could be attributed to transient interactions with substrates.

For *S. cerevisiae*, it has been well established that in addition to Oxa1, further mitochondrial proteins are part of the protein insertion machinery located in the inner mitochondrial membrane, including Pnt1 and Mba1. To date, no conclusive data concerning the distribution of Pnt1 and Mba1 within the

inner membrane were available. In this thesis, it could be demonstrated that both Pnt1 and Mba1 are heterogeneously distributed with an enrichment in the inner boundary membrane under fermentative growth conditions. In the case of Pnt1, the subjection of the yeast cells to respiratory growth conditions resulted in a change of the preferential localization from the inner boundary membrane to the cristae membrane, like it has been reported for Oxa1. In contrast to Oxa1 and Pnt1, the protein Mba1 remained enriched in the inner boundary membrane. Therefore, the present study could show that the heterogeneous distribution of Pnt1 displays a dynamic which is dependent on the physiological conditions, whereas the heterogeneous distribution of Mba1 is static.

Based on the diverse localization behaviour of Mba1 in comparison to Oxa1 and Pnt1, a more detailed investigation of the submitochondrial localization of Mba1 was performed. The analysis of the causes leading to the static heterogeneous distribution of Mba1 on a molecular level, revealed that already the deletion of five amino acids (*mba1*¹⁻²⁷³) as well as the substitution of a single amino acid (*mba1-I272A*) of the C-terminal part of Mba1 results in a drastic alteration of Mba1 distribution. The study of the consequences of the gene mutations on Mba1 function showed that the deletion mutation causes a decreased respiration competency of the yeast cells which can be attributed to an impairment in the assembly of a super complex of the respiratory chain (2 x complexIII / 2 x complexIV). Therefore, this thesis provides evidence that the static heterogeneous distribution of Mba1 within the inner mitochondrial membrane is crucial for Mba1 function. It is possible that the binding of a currently unknown interaction partner determines the location of Mba1 function.

1 Einleitung

Eukaryotische Zellen weisen ein hohes Maß an Organisation auf. Die intrazelluläre Kompartimentierung durch Organellen, die von Biomembranen umgeben sind, resultiert in der Ausbildung abgegrenzter Reaktionsräume mit jeweils einzigartigen Milieubedingungen für den Ablauf von verschiedensten zellulären Prozessen. Zu diesen Organellen gehören die Mitochondrien, welche im Metabolismus eukaryotischer Zellen eine zentrale Stellung einnehmen und eine Vielfalt verschiedener wichtiger Aufgaben erfüllen (Logan, 2006; McBride *et al.*, 2006; Westermann, 2007).

1.1 Entstehung und Funktion von Mitochondrien

Entsprechend der Endosymbiontentheorie beruht die Entstehung von Mitochondrien auf der phagozytotischen Aufnahme von aeroben α -Proteobakterien durch andere Zellen. Ob es sich bei den Ektosymbionten um primitive Eukaryoten oder anaerobe Archaeobakterien handelte, konnte trotz zahlreicher Studien noch nicht abschließend geklärt werden (Margulis, 1970; Martin & Müller, 1998; Martin *et al.*, 2001; Koonin, 2010; Gray, 2012). Die Theorie der prokaryotischen Herkunft von Mitochondrien wird durch den Besitz von zirkulärer DNS, einer Doppelmembran sowie eines eigenen Replikations- und Proteinbiosyntheseapparats unterstützt. Wie ihre Vorläufer zeichnen sich Mitochondrien durch ein eigenes Genom aus, dessen genetische Information im Laufe der Evolution stark reduziert und in den Zellkern ausgelagert wurde (Whatley, 1981; Dyall *et al.*, 2004; Gray, 2012). Als Konsequenz kodiert das humane mitochondriale Genom nur noch für dreizehn Proteine und das mitochondriale Genom der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* für acht Proteine (Sickmann *et al.*, 2003; Meisinger *et al.*, 2008; Ott & Herrmann, 2010), von denen sieben stark hydrophob sind und Komponenten der oxidativen Phosphorylierung darstellen (Abb. 1.1).

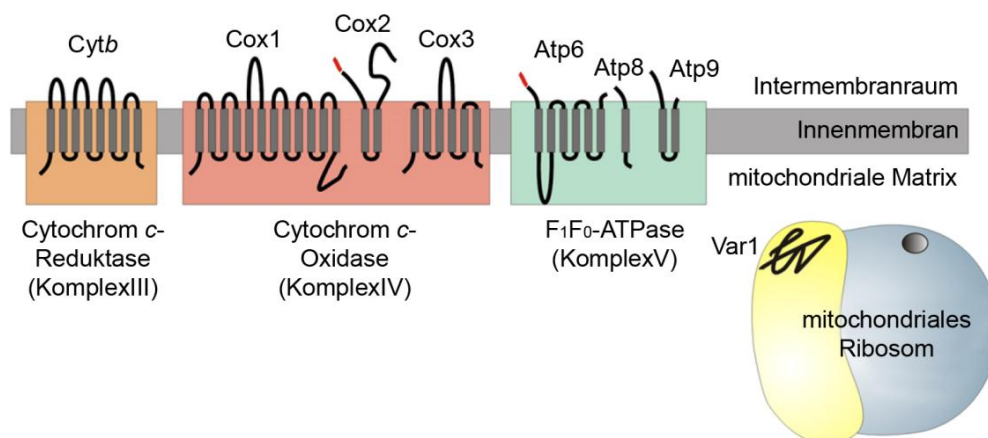


Abb. 1.1: Die mitochondriale DNS von *S. cerevisiae* kodiert für acht Proteine.

Bei den mitochondrial kodierten Genprodukten in *S. cerevisiae* handelt es sich um Proteine der Atmungskettenkomplexe Cytochrom *c*-Reduktase (Cytb), Cytochrom *c*-Oxidase (Cox1, Cox2, Cox3) und F₁F₀-ATPase (Atp6, Atp8, Atp9) sowie des mitochondrialen Ribosoms (Var1) (modifiziert nach (Ott & Herrmann, 2010)).

Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien, die auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet werden, besteht darin im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung das Energieäquivalent Adenosintri-phosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat zu regenerieren. Im Zuge der Glykolyse (Zytosol) sowie der Fettsäureoxidation (Mitochondrium) wird zunächst Acetyl-CoA gebildet, welches in den Mitochondrien während des Krebszyklus (Krebs, 1940) oxidiert wird. Dabei entstehen die Reduktionsäquivalente FADH_2 und NADH/H^+ , deren Elektronen mit Hilfe der Atmungskettenkomplexe der inneren mitochondrialen Membran transportiert werden. Die während des Elektronentransfers frei werdende Energie wird für den zusätzlichen Transport von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum verwendet, was zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten führt. Dieser Protonengradient wird von dem Proteinkomplex F_1F_0 -ATPase zur Synthese von ATP genutzt (Hatefi, 1985; Saraste, 1999; Lenaz & Genova, 2010).

Mitochondrien sind, neben der Energiegewinnung aus der oxidativen Phosphorylierung, an einer Reihe weiterer zellulärer Prozesse beteiligt. Zu diesen gehören beispielsweise der Harnstoffzyklus (Maier *et al.*, 1974), der Fettsäurestoffwechsel (Kennedy & Lehninger, 1949), der Eisenstoffwechsel (Levi & Rovida, 2009; Lill, 2009) sowie die Biosynthese von zellulären Metaboliten wie Aminosäuren (Artom & Swanson, 1951; Birt & Bartley, 1960; Craddock & Simpson, 1961). Weiterhin spielen Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der Zellalterung (Navarro & Boveris, 2007), der Ionenhomöostase sowie dem kontrollierten Zelltod, der Apoptose (Scheffler, 2001a; Scheffler, 2001b; Kroemer, 2003; Green & Kroemer, 2004). Dysfunktionale Mitochondrien werden außerdem mit dem Auftreten zahlreicher Krankheiten, darunter Parkinson, Alzheimer und Diabetes, in Verbindung gebracht (Liesa *et al.*, 2009; Baile & Claypool, 2013; Sokol *et al.*, 2014).

1.2 Morphologie und Dynamik von Mitochondrien

Die Morphologie, die Komplexität und die intrazelluläre Verteilung von Mitochondrien variieren in verschiedenen Organismen (Jakobs *et al.*, 2011). So weisen beispielsweise die Schließzellen von *Nicotiana tabacum* kugelförmige Mitochondrien auf, die vorrangig in der Nähe von Chloroplasten lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die Mitochondrien von *S. cerevisiae* sowie von kultivierten humanen Osteosarkom-Zellen (U2OS) durch eine tubuläre Netzwerkstruktur aus, wobei die der humanen Zellen deutlich komplexer ist (Abb. 1.2).

In den meisten Säugerzellen sowie in *S. cerevisiae* besitzen Mitochondrien typischerweise einen Durchmesser von ungefähr 200 - 400 nm (Hoffmann & Avers, 1973; Egner *et al.*, 2002).

In den Zellen der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bilden die Mitochondrien während der logarithmischen Wachstumsphase ein verzweigtes tubuläres Netzwerk aus, welches vorrangig nahe dem Zellkortex lokalisiert ist (Abb. 1.2, A und Abb. 1.3, A). Die Ausprägung und der Verzweigungsgrad des mitochondrialen Netzwerks sind von der für das Wachstum der *S. cerevisiae*-Zellen verwendeten Kohlenstoffquelle abhängig. Bei Wachstum mit fermentierbaren Kohlenstoffquellen (wie Glukose)

wird das Energieäquivalent ATP vorwiegend über die Glykolyse im Zytosol bezogen. Bei Wachstum mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (wie Laktat) hingegen spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle bei der Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung, was zu einer stärkeren Ausprägung des mitochondrialen Netzwerks führt (Hoffmann & Avers, 1973; Egner *et al.*, 2002).

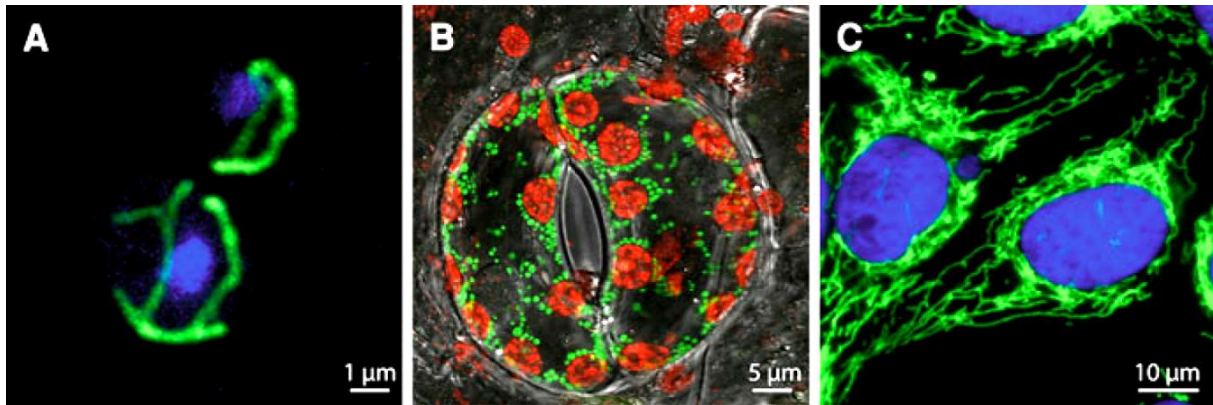


Abb. 1.2: Morphologie mitochondrialer Netzwerke verschiedener Organismen.

Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *S. cerevisiae*-Zellen (A), einer Schließzelle von *N. tabacum* (B) sowie von kultivierten humanen Osteosarkom-Zellen (U2OS) (C). In (A) und (B) wurden die Mitochondrien (grün) mit Hilfe von Matrix-GFP visualisiert und in (C) über eine Immunfluoreszenzmarkierung des Außenmembranproteins Tom20. Die Chloroplasten (rot) in (B) wurden durch ihre starke Autofluoreszenz und die Zellkerne (blau) in (A) und (C) mit Hilfe des Farbstoffs DAPI sichtbar gemacht (Jakobs *et al.*, 2011).

Umfassende Studien bezüglich der Morphologie sowie der Dynamik mitochondrialer Netzwerke zeigten, dass diese über kontinuierlich stattfindende Fusions-, Teilungs- und Transportvorgänge einer fortwährenden Anpassung an die physiologischen Bedingungen der Zelle unterliegen (Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto & Shaw, 2005; Benard & Rossignol, 2008; Lackner, 2014).

Die mitochondriale Fusion trägt zur Erhaltung der Funktionalität der Mitochondrien bei, da sie eine Durchmischung gesunder und geschädigter mitochondrialer Abschnitte ermöglicht (Youle & van der Bliek, 2012). Die Deletion der an der mitochondrialen Fusion beteiligten Gene (wie *FZO1* oder *MGM1*) hat die Fragmentierung der mitochondrialen Tubuli zur Folge (Abb. 1.3, B).

Die mitochondriale Teilung spielt bei der Vererbung der Mitochondrien an die Tochterzellen eine entscheidende Rolle, da Mitochondrien nicht *de novo* synthetisiert werden (Warren & Wickner, 1996). Weiterhin ermöglicht der Teilungsprozess die Entfernung von irreparabel geschädigten Abschnitten aus dem mitochondrialen Netzwerk (Youle & van der Bliek, 2012). Sind die für die mitochondriale Teilung verantwortlichen Gene (wie *DNM1* oder *FIS1*) deletiert, wird ein hyperfusioniertes maschiges Netzwerk mit elongierten Mitochondrien ausgebildet (Abb. 1.3, C).

Um die Mitochondrien intrazellulär zu verteilen oder während der Zellteilung an die Tochterzellen weiterzugeben, werden die Mitochondrien entlang der Filamente des Zytoskeletts transportiert. In den meisten Organismen liegt für diese Transportvorgänge eine Assoziation der Mitochondrien mit Mikrotubuli, in *S. cerevisiae* jedoch mit Aktinfilamenten vor (Yaffe, 1999; Boldogh *et al.*, 2001; Altmann & Westermann, 2005; Boldogh & Pon, 2006).

Neben den Komponenten, welche die mitochondrialen Teilungs- und Fusionsvorgänge koordinieren, gibt es auch eine Vielzahl an Proteinen, die für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie notwendig sind. Dazu gehören Proteine, die für den Import kernkodierter Proteine, für die Assoziation der Mitochondrien mit Aktinfilamenten, für die Nukleoidstruktur oder für die Erhaltung des Ionenhaushalts der Mitochondrien notwendig sind (Burgess *et al.*, 1994; Sogo & Yaffe, 1994; Berger *et al.*, 1997; Boldogh *et al.*, 1998; Dimmer *et al.*, 2002; Meisinger *et al.*, 2004; Dimmer *et al.*, 2005; Kucejova *et al.*, 2005).

Im Zusammenhang mit der Erhaltung der tubulären Struktur der Mitochondrien in *S. cerevisiae* sind insbesondere die Proteine Mmm1 (*Maintenance of Mitochondrial Morphology*, Mmm) (Burgess *et al.*, 1994), Mdm10 (*Mitochondrial Distribution and Morphology*, Mdm) (Sogo & Yaffe, 1994), Mdm12 (Berger *et al.*, 1997) und Mdm34 (Mmm2) (Dimmer *et al.*, 2002; Youngman *et al.*, 2004) zu nennen. Der Verlust dieser Proteine führt unter anderem zur Ausbildung vergrößerter kugelförmiger Mitochondrien an Stelle des filamentösen Netzwerks (Abb. 1.3, D).

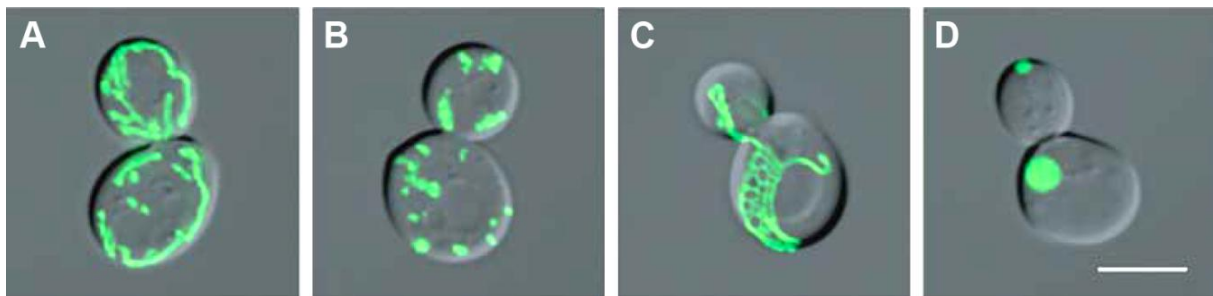


Abb. 1.3: Morphologie mitochondrialer Netzwerke in *S. cerevisiae*.

Gezeigt sind eine Wildtyp-Zelle (A), eine $\Delta fzo1$ -Zelle (Fusionsdefekt) (B), eine $\Delta dm1$ -Zelle (Teilungsdefekt) (C) sowie eine $\Delta mmm1$ -Zelle (Tubulusbildungsdefekt) (D). Die Mitochondrien wurden mit Hilfe von Matrix-GFP visualisiert. Größenstandard = 5 μm (modifiziert nach (Okamoto & Shaw, 2005)).

Früheren Studien zufolge handelt es sich bei den drei Proteinen Mmm1, Mdm10 und Mdm12 ausschließlich um mitochondriale integrale Komponenten des in der äußeren Membran lokalisierten *Mitochore*-Komplexes. Es wurde vorgeschlagen, dass dieser Komplex eine Verbindung zwischen den Aktinfilamenten des Zytoskeletts und den mitochondrialen Nukleoiden herstellen könnte, darüber die gerichtete Bewegung der Mitochondrien entlang des Zytoskeletts ermöglichen würde und so die Weitergabe von Mitochondrien und mitochondrialer DNS bei der Zellteilung bewerkstelligen könnte (Boldogh *et al.*, 1998; Hobbs *et al.*, 2001; Hanekamp *et al.*, 2002; Boldogh *et al.*, 2003; Kondo-Okamoto *et al.*, 2003; Meeusen & Nunnari, 2003; Boldogh & Pon, 2006)

Weiterhin gibt es Belege dafür, dass der *Mitochore*-Komplex, insbesondere Mdm10, an der durch den SAM-Komplex (*Sorting and Assembly Machinery*, SAM) vermittelten Assemblierung von Proteinen mit einer β -Faltblattstruktur (β -*Barrel*) in der mitochondrialen Außenmembran beteiligt ist (Abb. 1.6). Zu diesen β -*Barrel*-Proteinen gehört Tom40 (*Translocase of the Outer Membrane*, Tom), welches eine zentrale Komponente des TOM-Komplexes darstellt, der für den Proteinimport in Mitochondrien notwendig ist (Meisinger *et al.*, 2004; Meisinger *et al.*, 2007; Yamano *et al.*, 2010; Höhr *et al.*, 2015).

Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass Mmm1, Mdm10 und Mdm12 zusammen mit Mdm34 den Kern des ERMES-Komplexes (*ER-Mitochondria Encounter Structure*, ERMES) bilden. Diese Studien beschreiben Mdm10 und Mdm34 als integrale Proteine der äußeren Membran, Mdm12 als zytosolisches Protein und Mmm1 als ein in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) integriertes Protein (Kornmann *et al.*, 2009). Eine weitere Komponente des ERMES-Komplexes stellt die GTPase Gem1 dar. Bei ihr handelt es sich um integrales Protein der Außenmembran, dem auch eine regulatorische Funktion zugesprochen wird (Kornmann *et al.*, 2011; Stroud *et al.*, 2011). Der ERMES-Komplex vermittelt in *S. cerevisiae* einen Kontakt zwischen dem ER und den Mitochondrien (Abb. 1.6) und ermöglicht den Austausch von Phospholipiden zwischen den beiden Organellen. Es wurde berichtet, dass die Deletion der ERMES-Kernkomponenten zu einer Veränderung der Lipidkomposition der mitochondrialen Membranen führt. Insbesondere kommt es zu einer Reduktion der Mengen an Cardiolipin und Phosphatidylethanolamin sowie zu einem erhöhten Gehalt an Phosphatidylserin (Kornmann *et al.*, 2009; Osman *et al.*, 2009; Kopec *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2012; Voss *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2013).

Wie genau die Deletion von *MMM1*, *MDM10*, *MDM12* oder *MDM34* zur Ausbildung der vergrößerten kugelförmigen Mitochondrien führt, konnte bisher nicht abschließend aufgeklärt werden. Es wird vermutet, dass es auf Grund einer beeinträchtigten Assemblierung des TOM-Komplexes zu einer Verringerung des Imports von mitochondrialen Proteinen kommt, welche für die Aufrechterhaltung der tubulären mitochondrialen Morphologie essentiell sind (Meisinger *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2008a; Tan *et al.*, 2013). Außerdem wäre es möglich, dass eine gestörte ER-Mitochondrien-Interaktion den Lipidaustausch zwischen den beiden Organellen behindert. Das könnte in einer Veränderung der Lipidmengen in den mitochondrialen Membranen resultieren und sich schließlich auf die mitochondriale Struktur auswirken (Osman *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013).

1.3 Ultrastruktur von Mitochondrien

Mitochondrien zeichnen sich durch eine einzigartige und äußerst komplexe interne Architektur aus, die exemplarisch in Abbildung 1.4 dargestellt ist. Sie besitzen zwei Phospholipidmembranen, die äußere und die innere mitochondriale Membran, die das Organell in zwei Membransysteme und in zwei wasserhaltige Subkompartimente, den Intermembranraum und die mitochondriale Matrix, unterteilen (Palade, 1952; Sjöstrand, 1953; Frey & Mannella, 2000; Scheffler, 2001b).

Die äußere mitochondriale Membran umschließt das Organell und grenzt es gegenüber dem Zytosol ab. Sie ist durch den schmalen Intermembranraum von der inneren mitochondrialen Membran getrennt. Diese weist zahlreiche, die Membranoberfläche vergrößernde Einstülpungen auf, welche als Cristae bezeichnet werden und in die Matrix hineinragen. Strukturell kann die Cristaemembran somit von der inneren Grenzflächenmembran, die den parallel zur äußeren Membran verlaufenden Teil der inneren mitochondrialen Membran darstellt, unterschieden werden (Perkins *et al.*, 1997; Scheffler, 2001b).

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde der Abstand vom äußeren Rand der äußeren Membran zum inneren Rand der inneren Grenzflächenmembran bestimmt. Er beträgt ungefähr 22 nm, wobei die beiden mitochondrialen Membranen jeweils eine Dicke von etwa 7 nm aufweisen. Nur an den sogenannten „Contact sites“ (Kontaktstellen) beträgt der Abstand ca. 14 nm, was darauf hindeutet, dass die beiden Membranen in diesen Bereichen direkt aneinander liegen (Perkins *et al.*, 1997). Weiterhin wurde festgestellt, dass auch der Durchmesser der Cristae variiert. Die Cristae sind an den Übergängen der inneren Grenzflächenmembran zur Cristaemembran zu schmalen Tubuli verengt, die als „Cristae Junctions“ bekannt sind (Perkins *et al.*, 1997). Diese Strukturen trennen den Inter-membranraum vom Intracristaeraum, welcher von der Cristaemembran umschlossen wird (Herrmann & Riemer, 2010).

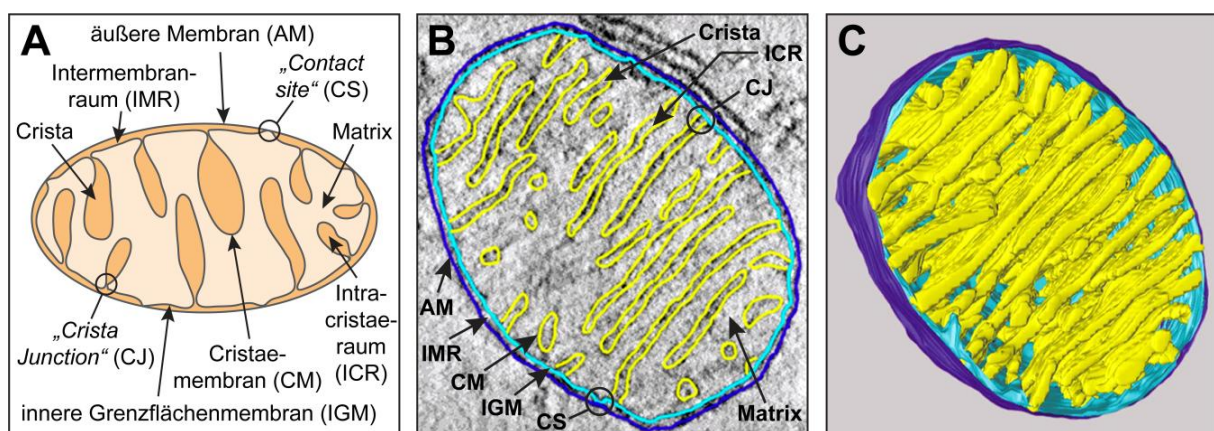


Abb. 1.4: Darstellung der Ultrastruktur und der Subkompartimente eines Mitochondriums.

(A) Schematische Darstellung der internen mitochondrialen Architektur nach dem „Cristae Junction Modell“. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Segments des in (C) abgebildeten 3D-Gesamttomogramms. (C) Elektronentomographische 3D-Rekonstruktion eines Hühner-Cerebellum-Mitochondriums. In (B) und (C) ist die äußere Membran in dunkelblau, die innere Grenzflächenmembran in hellblau und die Cristaemembran der einzelnen Cristae in gelb dargestellt (modifiziert nach (Perkins *et al.*, 1997) sowie (Frey & Mannella, 2000)).

Die mitochondrialen Membransysteme unterscheiden sich nicht nur morphologisch voneinander, sondern auch in der Zusammensetzung ihrer Lipide (Tab. 1.1) (Zinser *et al.*, 1991; Horvath & Daum, 2013) und ihrer Proteinkomponenten (Gilkerson *et al.*, 2003; Vogel *et al.*, 2006; Suppanz, 2008; Wurm, 2008).

Tab. 1.1: Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen in *S. cerevisiae* (Zinser *et al.*, 1991).

	Phosphatidylcholin	Phosphatidylethanolamin	Phosphatidylinositol	Phosphatidylserin	Phosphatidsäure	Cardiolipin
äußere mitochondriale Membran	~ 46 %	~ 33 %	~ 10 %	~ 1 %	~ 4 %	~ 6 %
innere mitochondriale Membran	~ 38 %	~ 24 %	~ 16 %	~ 4 %	~ 2 %	~ 16 %

Die **äußere mitochondriale Membran** weist eine der Plasmamembran ähnliche Protein- und Lipidkomposition auf. Neben den integralen Proteinkomplexen, welche für den Import von kernkodierten Proteinen in die mitochondrialen Subkompartimente notwendig sind (siehe Kapitel 1.4), enthält die mitochondriale Außenmembran noch weitere integrale Membranproteine, die Kanäle bilden. Diese Kanäle ermöglichen einen annähernd ungehinderten Austausch von Makromolekülen und Ionen zwischen dem Zytosol und dem mitochondrialen Intermembranraum, der zwischen der äußeren und der inneren mitochondrialen Membran liegt (Benz *et al.*, 1989; Benz, 1994; Alberts *et al.*, 2002; Colombini, 2012; Colombini & Mannella, 2012).

Auf Grund der Semipermeabilität der äußeren Membran wird angenommen, dass die physikalisch-chemischen Eigenschaften des **Intermembranraums** denen des Zytosols ähnlich sind. Die beiden Reaktionsräume unterscheiden sich jedoch bezüglich ihrer pH-Werte sowie ihrer oxidativen Bedingungen deutlich voneinander (Herrmann & Hell, 2005; Herrmann & Riemer, 2010). Die Studien von Porcelli *et al.* und Hu *et al.* legen nahe, dass der Intermembranraum einen niedrigeren pH-Wert und ein stärker oxidierendes Milieu als das Zytosol aufweist (Porcelli *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2008).

Obwohl der **Intermembranraum** ein mitochondriales Kompartiment von vergleichsweise geringer Größe darstellt, enthält er zahlreiche für die Biogenese und Funktion der Mitochondrien wichtige Faktoren (Herrmann & Riemer, 2010; Vögtle *et al.*, 2012; Petrunaro & Riemer, 2014). Dazu gehören Proteine, die als Chaperone beim Proteinimport fungieren (Mokranjac & Neupert, 2009) oder am Austausch von Metallionen (Ye *et al.*, 2001; Palumaa *et al.*, 2004) oder von Lipiden zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol beteiligt sind (Tamura *et al.*, 2009). Weiterhin spielen die Proteine des Intermembranraums bei der Induktion der Apoptose (Scorrano, 2009), beim Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Godon *et al.*, 1998; Magherini *et al.*, 2007) oder bei der Assemblierung der Atmungskette (Diaz *et al.*, 2011) eine Rolle.

Eine Substruktur des Intermembranraums sind die **Kontaktstellen** (*Contact sites*), an denen die äußere und die innere mitochondriale Membran in Verbindung stehen (Hackenbrock, 1968). Die molekulare Zusammensetzung und die physiologische Funktion dieser Bereiche sind der Schwerpunkt zahlreicher Studien. Sie variieren in ihrer Anzahl, Größe und Anordnung in Abhängigkeit des Organismus, des Zelltyps sowie des metabolischen Zustands der Zelle (Hackenbrock, 1968; Rassow *et al.*, 1989; Bücheler *et al.*, 1991; Perkins *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass mit Hilfe verschiedener Transportkomplexe, die an den Kontaktstellen lokalisiert sind, die Translokation von kernkodierten, mitochondrialen Proteinen über beide mitochondriale Membranen hinweg bewerkstelligt wird (Abb.1.5) (Kellems *et al.*, 1975; Schleyer & Neupert, 1985; Schwaiger *et al.*, 1987; Pon *et al.*, 1989; Rassow *et al.*, 1989; van der Klei *et al.*, 1994; Chacinska *et al.*, 2003; Horvath *et al.*, 2014). Außerdem können die an den Kontaktstellen vorkommenden Proteine mit dem Transport von Metaboliten (Bücheler *et al.*, 1991; Brdiczka *et al.*, 2006), der Verankerung der mitochondrialen DNS am Aktinzytoskelett (Boldogh & Pon, 2006) sowie dem Prozess der mitochondrialen Fusion (Hermann & Shaw, 1998) in Verbindung gebracht werden.

Im Gegensatz zur äußeren Membran ist die **innere mitochondriale Membran** für kleine Moleküle und Ionen, für die keine spezifischen Transportproteine in der inneren Membran eingebettet sind, impermeabel (Alberts *et al.*, 2002). Darüber hinaus unterscheiden sich die äußere und die innere Membran in ihrem Gehalt an verschiedenen Lipiden, wie beispielsweise Cardiolipin (Tab 1.1). Bei Cardiolipin handelt es sich um ein für mitochondriale Membranen charakteristisches Phospholipid (Schlame *et al.*, 2000), welches unter anderem für die strukturelle Organisation der Komplexe der Atmungskette von Bedeutung ist (Pfeiffer *et al.*, 2003; Bazán *et al.*, 2013; Mileykovskaya & Dowhan, 2014). Weiterhin zeichnet sich die Innenmembran durch einen vergleichsweise hohen Proteingehalt aus. Die meisten zellulären Membranen weisen nahezu eine Gleichverteilung von Proteinen und Lipiden auf, während der Massenanteil der Proteine der inneren Membran etwa drei mal so hoch ist wie der der Lipide (Ardail *et al.*, 1990; Simbeni *et al.*, 1991).

Obwohl die **innere Membran** kontinuierlich von der **inneren Grenzflächenmembran** in die **Cristaemembran** übergeht, differenzieren sich diese beiden Substrukturen in ihrer Proteinkomposition. Erste Hinweise auf eine Subkompartimentierung der inneren Membran lieferten Subfraktionierungen mit isolierten Mitochondrien (Werner & Neupert, 1972; Hovius *et al.*, 1990). Die mit Hilfe der biochemischen Experimente gewonnenen Fraktionen, die unter anderem Unterschiede hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung und ihrer enzymatischen Aktivitäten aufwiesen, konnten jedoch keinem der beiden Teile der inneren Membran eindeutig zugeordnet werden. Erst durch den Einsatz mikroskopischer Techniken konnte für zahlreiche Proteine eine heterogene Verteilung in der inneren Membran nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass die Bestandteile der Proteinimport-Maschinerie, darunter Untereinheiten der TIM23-Translokase und der Oxa1-Komplex, eine bevorzugte Lokalisation in der inneren Grenzflächenmembran aufweisen (Abb. 1.5) (Vogel *et al.*, 2006; Wurm & Jakobs, 2006; Suppanz *et al.*, 2009; Stoldt *et al.*, 2012). Gegensätzlich dazu sind die Atmungskettenkomplexe und die F_1F_0 -ATPase in der Cristaemembran angereichert (Abb. 1.5) (Gilkerson *et al.*, 2003; Vogel *et al.*, 2006; Wurm & Jakobs, 2006). Zudem wurde berichtet, dass die Komponenten des für die Cristaemorphologie entscheidenden MICOS-Komplexes (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*, MICOS) an den **Cristae Junctions**, den Verbindungsstellen zwischen der inneren Grenzflächenmembran und der Cristaemembran, lokalisieren (Abb. 1.5) (Harner *et al.*, 2011; Hoppins *et al.*, 2011; von der Malsburg *et al.*, 2011; Alkhaja *et al.*, 2012). Auf Grund ihres geringen Durchmessers wird vermutet, dass die **Cristae Junctions** als Diffusionsbarrieren fungieren und unter anderem den freien Austausch von integralen Membranproteinen zwischen der inneren Grenzflächenmembran und den Cristae einschränken (Mannella *et al.*, 1994; Zick *et al.*, 2009; van der Laan *et al.*, 2012). So deuten zum Beispiel auch die Studien von Wilkens *et al.* darauf hin, dass die Atmungskettenkomplexe, die in unterschiedlichen Cristae vorliegen, sich nicht ohne weiteres mischen und in ihrer Mobilität vorwiegend auf ein Crista begrenzt sind (Wilkens *et al.*, 2013). Demnach liegt für die mitochondriale Innenmembran nicht nur eine morphologische, sondern auch eine funktionale Gliederung vor.

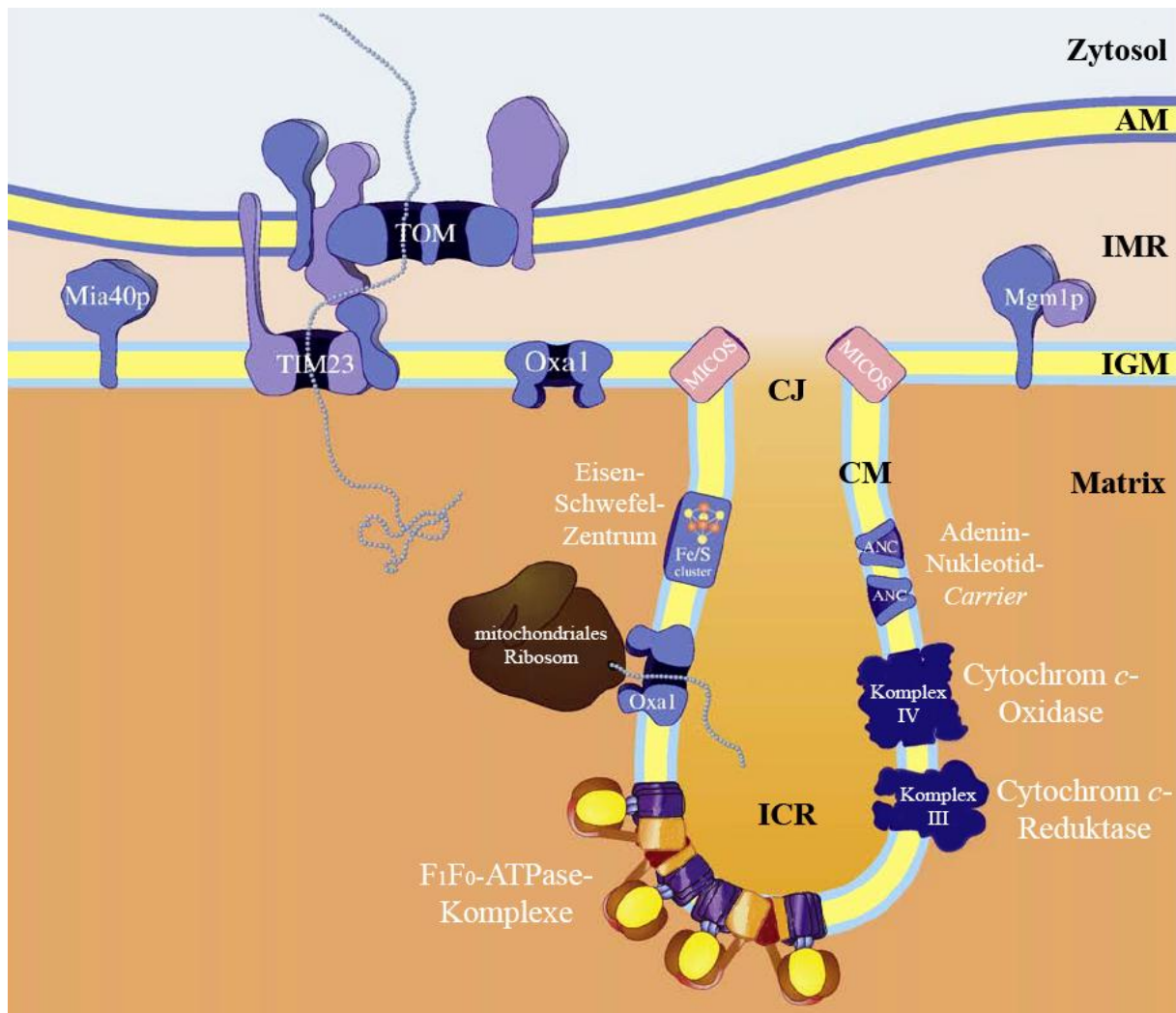


Abb. 1.5: Subkompartimentierung der inneren mitochondrialen Membran in *S. cerevisiae*.

Proteinkomplexe mit einer Beteiligung an der Translokation und/oder Insertion von Membranproteinen, wie beispielsweise der TIM23-Komplex oder der Oxa1-Komplex, lokalisieren bevorzugt in der inneren Grenzflächenmembran. Im Gegensatz dazu sind Proteine, die bei der oxidativen Phosphorylierung eine Rolle spielen, wie zum Beispiel die Cytochrom *c*-Reduktase, die Cytochrom *c*-Oxidase, die F_1F_0 -ATPase oder die Adenin-Nukleotid-Carrier, in der Cristaemembran angereichert. Der MICOS-Komplex lokalisiert an den *Cristae Junctions*. AM (Außenmembran); IMR (Intermembranraum); IGM (innere Grenzflächenmembran); CM (Cristaemembran); CJ (*Crista Junction*) und ICR (Intracristaeraum) (modifiziert nach (Zick *et al.*, 2009)).

Bei den **Cristae** handelt es sich nicht um unregelmäßige und passiv entstehende Aussackungen der inneren mitochondrialen Membran, sondern um hoch geordnete und dynamische Strukturen, die den physiologischen Anforderungen der Zelle angepasst werden können (Frey & Mannella, 2000; Mannella, 2006). Neben dem MICOS-Komplex werden mit der Ausbildung und Aufrechterhaltung der typischen Morphologie der Cristae sowohl eine Reihe weiterer Proteine als auch das Lipid Cardiolipin in Verbindung gebracht. So wurde beispielsweise berichtet, dass die F_1F_0 -ATPase Dimere bildet, die in Reihen entlang der stark gekrümmten Cristaebereiche angeordnet sind, und, dass diese Dimerreihen vermutlich eine entscheidende, strukturgebende Komponente für die starke Krümmung der Cristae darstellen (Davies *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2012). Es wurde gezeigt, dass Defekte der Cardiolipinsynthese in einer beeinträchtigten Organisation der F_1F_0 -ATPase-Dimere resultieren (Acehan *et al.*, 2011), und, dass sich die Deletion der F_1F_0 -ATPase-Untereinheiten e und g sogar nicht

nur auf die Dimerisierung der F_1F_0 -ATPase auswirkt (Arnold *et al.*, 1998), sondern auch zur Ausbildung von zwiebelschalenartigen Cristastrukturen anstelle der typischen, lamellar angeordneten Cristae führt (Paumard *et al.*, 2002; Arselin *et al.*, 2004). Des Weiteren wird dem Fusionsprotein Mgm1 eine Rolle bei der Erhaltung der Cristastruktur in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Abb. 1.5) (Meeusen *et al.*, 2006) und seinem Homolog, dem humanen Fusionsprotein Opa1, eine Beteiligung an der Umstrukturierung der Cristae während der Apoptose (Frezza *et al.*, 2006) zugesprochen.

Im Inneren des Mitochondriums formt die Innenmembran die **mitochondriale Matrix**, den größten Reaktionsraum der Mitochondrien. Die mitochondriale Matrix beherbergt multiple Kopien der mitochondrialen DNS in Form von Nukleoiden und ist mit einem eigenen Replikationsapparat sowie der Transkriptions- und Translationsmaschinerie für mitochondrial kodierte Proteine ausgestattet (Miyakawa *et al.*, 1987; Scheffler, 2001b). Des Weiteren enthält die Matrix den Großteil der mitochondrialen Proteine, darunter eine Vielzahl an Enzymen, die beispielsweise die Stoffwechselreaktionen des Krebszyklus oder der Fettsäureoxidation ausführen (Alberts *et al.*, 2002).

1.4 Proteinbiogenese von Mitochondrien

Die Mitochondrien von *S. cerevisiae* enthalten ungefähr 1000 verschiedene Proteine (Sickmann *et al.*, 2003; Prokisch *et al.*, 2004; Reinders *et al.*, 2006; Zahedi *et al.*, 2006; Premisler *et al.*, 2009). Im Laufe der Evolution wurden ~ 99 % der für das mitochondriale Proteom kodierenden Gene in den Zellkern transferiert. Als Konsequenz wird der Großteil der mitochondrialen Proteine in Form von Vorläuferproteinen, die über spezifische Transportsignale verfügen, an zytosolischen Ribosomen gebildet und während oder nach der Translation in die Mitochondrien transportiert. Die Grundlage für den Import und die Sortierung der kernkodierten Proteine in ein mitochondriales Zielkompartiment sowie die kotranslationale Insertion der im mitochondrialen Genom kodierten Proteine bilden evolutionär konservierte Proteinmaschinerien, die in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben werden (Abb. 1.6) (Herrmann & Neupert, 2003; Dolezal *et al.*, 2006; Kutik *et al.*, 2007; Kutik *et al.*, 2009; Mokranjac & Neupert, 2009; Ott & Herrmann, 2010; Schmidt *et al.*, 2010; Fox, 2012; Dudek *et al.*, 2013; Kulawiak *et al.*, 2013; Neupert, 2015).

1.4.1 Mitochondriale Import- und Sortierungssignale

Es sind eine Reihe von Transportsignalen bekannt, die der Erkennung der kernkodierten Proteine auf der mitochondrialen Oberfläche sowie dem Import und der Sortierung der Vorläuferproteine in ein mitochondriales Subkompartiment dienen (Abb. 1.6) (Neupert, 1997; Chacinska *et al.*, 2009).

Bei den meisten der mitochondrialen Import- und Sortierungssignale handelt es sich um aminoterminalen Präsequenzen, welche aus ca. 10 bis 80 Aminosäuren bestehen und eine amphipatische

α -Helix ausbilden können. Diese Art Signalsequenz wird vor allem für den Import von Vorläuferproteinen in die mitochondriale Matrix benötigt und nachfolgend durch spezifische Peptidasen entfernt. Vorläuferproteine, die für die äußere oder die innere mitochondriale Membran bestimmt sind, weisen dagegen häufig interne Importsignale auf. Darüber hinaus wurden neben diesen typischen Signalsequenzen auch carboxyterminale Transportsignale beschrieben (Hartl *et al.*, 1989; Shore *et al.*, 1995; Neupert, 1997; Fölsch *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Rapaport, 2003; Neupert & Herrmann, 2007; Bolender *et al.*, 2008; Chacinska *et al.*, 2009).

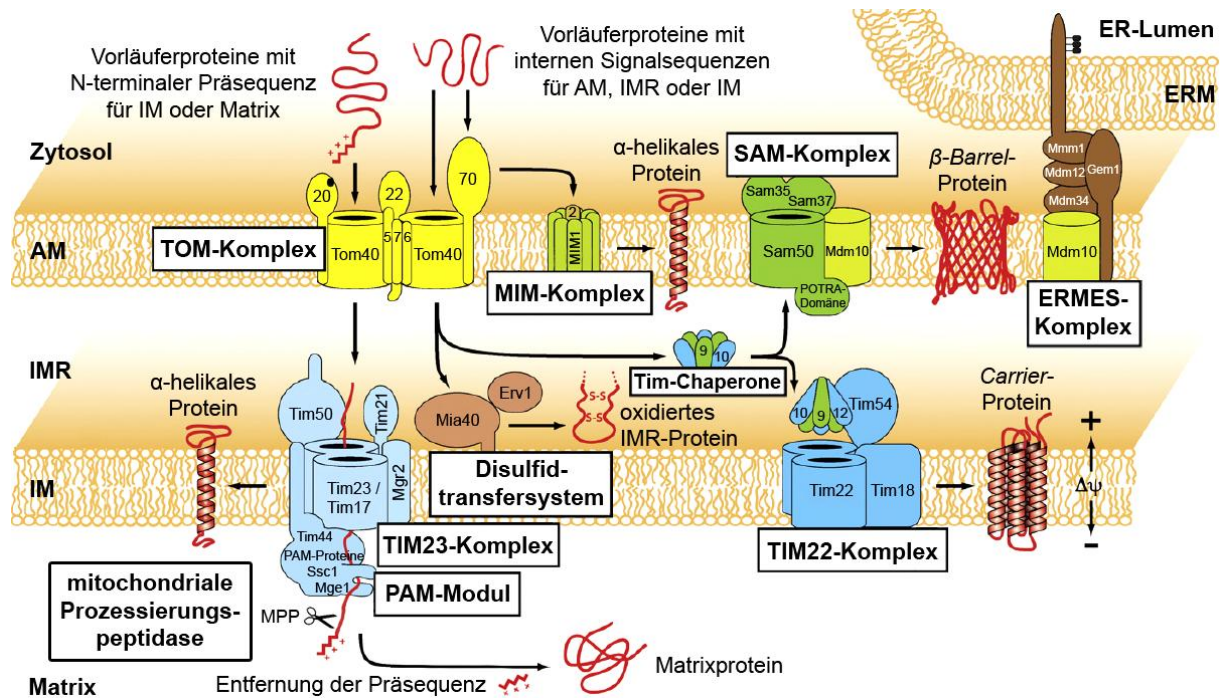


Abb. 1.6: Import kernkodierter Proteine aus dem Zytosol in die Mitochondrien von *S. cerevisiae*.

Alle kernkodierten mitochondrialen Proteine werden als Vorläuferproteine im Zytosol synthetisiert. Für den Import des Großteils der Vorläuferproteine ist der TOM-Komplex zuständig. Anhand ihrer Transportsignale werden die Vorläuferproteine in ein mitochondriales Zielkompartiment sortiert. Die Insertion von Proteinen in die äußere Membran erfolgt über den SAM-Komplex oder den MIM-Komplex und der Proteinimport in den Intermembranraum über das Disulfidtransfersystem. Im Intermembranraum fungieren die kleinen Tim-Proteine als Chaperone. Der TIM22-Komplex und der TIM23-Komplex bewerkstelligen den Einbau von Proteinen in die innere Membran. Außerdem sorgt der TIM23-Komplex in Zusammenarbeit mit dem PAM-Modul für den Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix, wo die Präsequenzen der Vorläuferproteine durch die mitochondriale Prozessierungs-peptidase entfernt werden. Der ERMES-Komplex stellt den Kontakt zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Mitochondrium her. AM (Außenmembran); IMR (Intermembranraum); IM (Innenmembran); ER (Endoplasmatisches Retikulum); ERM (ER-Membran) und MPP (mitochondriale Prozessierungspeptidase) (modifiziert nach (Kulawiak *et al.*, 2013)).

1.4.2 Transport kernkodierter Proteine in Mitochondrien

Die äußere mitochondriale Membran beherbergt den **TOM-Komplex** (*Translocase of the Outer Membrane*, TOM), der den Transport der Mehrheit der kernkodierten mitochondrialen Vorläuferproteine aus dem Zytosol in den Intermembranraum vermittelt (Abb. 1.6) (Neupert, 2015).

Der TOM-Komplex setzt sich aus den sieben verschiedenen Untereinheiten Tom5, Tom6, Tom7, Tom20, Tom22, Tom40 und Tom70 zusammen, die nach ihrem Molekulargewicht benannt wurden

(Neupert, 1997; Künkele *et al.*, 1998). Das β -Barrel-Protein Tom40 ist die Kernkomponente des TOM-Komplexes und bildet womöglich allein die zentrale Importpore des Komplexes (Hill *et al.*, 1998; Künkele *et al.*, 1998; Ahting *et al.*, 2001), während die Rezeptor-Untereinheiten Tom20, Tom22 und Tom70 der Erkennung und Bindung der verschiedenen Klassen von zu importierenden Vorläuferproteinen dienen (Söllner *et al.*, 1989; Hines & Schatz, 1993; Ramage *et al.*, 1993; Moczko *et al.*, 1994; Mayer *et al.*, 1995a; Brix *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2003; Shiota *et al.*, 2011). Zudem ist Tom22, genau wie die kleinen Tom-Proteine Tom5, Tom6 und Tom7, an der Stabilisierung des Gesamtkomplexes beteiligt (Alconada *et al.*, 1995; Hönlinger *et al.*, 1996; Dietmeier *et al.*, 1997; van Wilpe *et al.*, 1999).

Im Anschluss an die Translokation über die äußere Membran werden die Vorläuferproteine ihrer Signalsequenz entsprechend in eines der mitochondrialen Subkompartimente weiter transportiert.

1.4.3 Sortierung kernkodierter Proteine in die äußere Membran

In der äußeren mitochondrialen Membran befinden sich neben dem TOM-Komplex zwei weitere Proteinkomplexe, die für die Insertion mitochondrialer Vorläuferproteine in die Außenmembran zuständig sind: der MIM-Komplex (*Mitochondrial Import complex*, MIM) und der SAM-Komplex (*Sorting and Assembly Machinery*, SAM) (Abb. 1.6) (Neupert, 2015).

Die Insertion von α -helikalen Außenmembranproteinen mit einer oder mehreren Transmembrandomänen erfolgt über den **MIM-Komplex**, welcher aus den beiden Komponenten Mim1 (Tom13) und Mim2 besteht (Abb. 1.6) (Waizenegger *et al.*, 2005; Hulett *et al.*, 2008; Popov-Celeketic *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2008b; Becker *et al.*, 2011; Papic *et al.*, 2011; Dimmer *et al.*, 2012).

Dagegen werden Vorläufer von Außenmembranproteinen, die eine β -Faltblattstruktur aufweisen, nach dem Erreichen des Intermembranraums von den Chaperonen Tim9 und Tim10 gebunden und zum **SAM-Komplex** weitergeleitet, der die β -Barrel-Proteine in die äußere Membran inseriert (Abb. 1.6) (Wiedemann *et al.*, 2003; Wiedemann *et al.*, 2004; Kulawiak *et al.*, 2013). Der SAM-Komplex setzt sich aus den drei Kernkomponenten Sam50 (Tob55, Omp85), Sam35 (Tob38, Tom38) und Sam37 (Mas37, Tom37) sowie dem zusätzlichen Protein Mdm10 zusammen, welches als Komponente des *Mitochore*-Komplexes bzw. des ERMES-Komplexes in die Aufrechterhaltung der tubulären mitochondrialen Morphologie involviert ist (siehe Kapitel 1.2). Das β -Barrel-Protein Sam50 stellt die kanalbildende Untereinheit des SAM-Komplexes dar (Kozjak *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003; Gentle *et al.*, 2004). Während Sam35 eine assistierende Rolle bei der Erkennung und Bindung der Vorläufer der β -Barrel-Proteine einnimmt (Ishikawa *et al.*, 2004; Milenkovic *et al.*, 2004; Waizenegger *et al.*, 2004; Chan & Lithgow, 2008; Kutik *et al.*, 2008), ist Sam37 an der Entlassung der gefalteten β -Barrel-Proteine in die äußere mitochondriale Membran beteiligt (Chan & Lithgow, 2008; Dukanovic *et al.*, 2009). Das Protein Mdm10 wird in Assoziation mit dem SAM-Komplex mit der Biogenese des TOM-Komplexes in Verbindung gebracht (Meisinger *et al.*, 2004; Meisinger *et al.*, 2007; Yamano *et al.*, 2010; Höhr *et al.*, 2015).

1.4.4 Import kernkodierter Proteine in den Intermembranraum

Für kernkodierte Vorläuferproteine, welche für den Intermembranraum bestimmt sind, existieren eine Reihe verschiedener Biogenesemechanismen (Herrmann & Hell, 2005; Kulawiak *et al.*, 2013; Hewitt *et al.*, 2014). So können Proteine beispielsweise durch Proteininsertion in die innere mitochondriale Membran und eine anschließende proteolytische Prozessierung in den Intermembranraum entlassen werden (Glick *et al.*, 1992; Nunnari *et al.*, 1993). Weiterhin können lösliche Vorläufer des Intermembranraums durch Interaktionen mit Komponenten der mitochondrialen Membranen (Lill *et al.*, 1992; Diekert *et al.*, 1999) oder die kovalente Bindung von Kofaktoren im Intermembranraum gehalten werden (Dumont *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1995b). Außerdem können Intermembranraumvorläufer, welche ein aus der Aminosäure Cystein bestehendes Sequenzmotiv aufweisen, mit Hilfe eines Faltungsmechanismus, der über das **Disulfidtransfersystem** vermittelt wird, am Verlassen des Intermembranraums gehindert werden. Das Disulfidtransfersystem umfasst die beiden Proteine Mia40 (Tim40) und Erv1, und fördert die Faltung kleiner Intermembranraumproteine durch die Ausbildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken (Abb. 1.6) (Mesecke *et al.*, 2005; Chatzi & Tokatlidis, 2013; Fischer & Riemer, 2013).

1.4.5 Import kernkodierter Proteine in den Matrixraum

Vorläuferproteine mit einer aminoterminalen Präsequenz, die im Zytosol synthetisiert werden und für die mitochondriale Matrix bestimmt sind, werden in einem membranpotentialabhängigen Prozess über den als Präsequenz-Translokase bezeichneten **TIM23-Komplex** (*Translocase of the Inner Membrane*, TIM) in die Matrix transportiert (Abb. 1.6) (Kulawiak *et al.*, 2013).

Der TIM23-Komplex besteht aus elf verschiedenen Proteinen, die entweder der Rezeptor-Kanal-Einheit oder der Motor-Einheit, dem PAM-Modul (*Presequence translocase-Associated Motor*, PAM), zuzuordnen sind. Die Proteine Tim50, Tim23, Tim17, Tim21, Pam17 und Mgr2 gehören zur Rezeptor-Kanal-Einheit und die Proteine Tim44, Pam18 (Tim14), Pam16 (Tim16), Ssc1 (mtHsp70) und Mge1 sind Teil der Motor-Einheit (Neupert, 2015).

Die Proteine Tim21, Pam17 und Mgr2 stellen womöglich nur akzessorische Komponenten der Rezeptor-Kanal-Einheit dar (Chacinska *et al.*, 2005; van der Laan *et al.*, 2005; Gebert *et al.*, 2012), wohingegen das Protein Tim50 der Erkennung, Bindung und Weitergabe der Vorläuferproteine an Tim23 dient (Geissler *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002; Gevorkyan-Airapetov *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2011). Die Untereinheit Tim23 bildet entweder allein oder gemeinsam mit Tim17 den Kanal für die Proteintranslokation über die innere Membran (Bauer *et al.*, 1996; Milisav *et al.*, 2001; Truscott *et al.*, 2001; Martinez-Caballero *et al.*, 2007). Auf der der Matrix zugewandten Seite der Innenmembran ist die Rezeptor-Kanal-Einheit über das periphere Membranprotein Tim44 mit dem PAM-Modul des TIM23-Komplexes verbunden. Tim44 ist am Ausgang des Kanals lokalisiert und rekrutiert das Chaperon Ssc1 an den TIM23-Komplex, welches an die aus der Translokase kommende

Polypeptidkette bindet (Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994; Krimmer *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003). Die Interaktion von Tim44 und Ssc1 wird über den Nukleotidaustauschfaktor Mge1 (Westermann *et al.*, 1995; Deloche & Georgopoulos, 1996) sowie die zwei Co-Chaperone Pam18 und Pam16 reguliert (D'Silva *et al.*, 2003; Mokranjac *et al.*, 2003; Truscott *et al.*, 2003; Frazier *et al.*, 2004; Kozany *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004). Trotz der zahlreichen Studien bezüglich der Funktionalität des TIM23-Komplexes konnte der Mechanismus, über den die ATP-verbrauchende Motor-Einheit die Substratproteine letztendlich in die Matrix transportiert, noch nicht abschließend aufgeklärt werden (Matouschek *et al.*, 2000; Neupert & Brunner, 2002; De Los Rios *et al.*, 2006; Neupert, 2015). Im Anschluss an die Translokation über die Innenmembran wird die aminoternale Präsequenz durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase vom importierten Protein entfernt (Luciano & Géli, 1996; Ito, 1999; Taylor *et al.*, 2001; Gakh *et al.*, 2002).

1.4.6 Sortierung kernkodierter Proteine in die innere Membran

Für die Insertion von aus dem Zytosol importierten Vorläuferproteinen in die innere mitochondriale Membran sind bisher drei unterschiedliche Mechanismen bekannt: der TIM22-Komplex-abhängige (*Translocase of the Inner Membrane*, TIM) und der TIM23-Komplex-abhängige Sortierungsweg (Abb. 1.6) sowie der Mechanismus der konservativen Sortierung (Abb. 1.7) (Neupert, 2015).

Vorläufer der *Carrier*-Proteinfamilie, wie beispielsweise die ADP/ATP-Translokase, werden mit Hilfe des **TIM22-Komplexes**, der auch als *Carrier*-Translokase bezeichnet wird, in Abhängigkeit des Membranpotentials in die Innenmembran integriert (Sirrenberg *et al.*, 1996; Endres *et al.*, 1999; Rehling *et al.*, 2003). Die Vorläufer der *Carrier*-Proteine verfügen über interne Transportsignale und viele Transmembrandomänen. Nach dem Import aus dem Zytosol werden die hydrophoben Vorläufer durch Chaperone, die kleinen Tim-Proteine Tim9 und Tim10, vor einer Aggregation im hydrophilen Milieu des Intermembranraums geschützt und an den TIM22-Komplex weitergeleitet (Koehler *et al.*, 1998a; Koehler *et al.*, 1998b; Adam *et al.*, 1999; Endres *et al.*, 1999; Curran *et al.*, 2002). Der TIM22-Komplex umfasst die vier integralen Membranproteine Tim18, Tim22, Tim54 und Sdh3 sowie die periphere Membrankomponente Tim12, ein kleines Tim-Protein (Sirrenberg *et al.*, 1996; Kerscher *et al.*, 1997; Sirrenberg *et al.*, 1998; Koehler *et al.*, 1998a; Koehler *et al.*, 2000; Gebert *et al.*, 2011). Während das Protein Tim22 die Pore für die Proteininsertion in die innere Membran formt (Kovermann *et al.*, 2002; Rehling *et al.*, 2003), sind die Untereinheiten Tim18, Tim54 und Sdh3 an der Assemblierung und Stabilisierung des TIM22-Komplexes beteiligt (Koehler *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2007; Gebert *et al.*, 2011). Die Komponente Tim12 vermittelt die Bindung von oligomeren Tim9-Tim10-Komplexen an den TIM22-Komplex (Koehler *et al.*, 1998a; Koehler *et al.*, 1998b; Adam *et al.*, 1999; Endres *et al.*, 1999).

Die Membraninsertion von α -helikalen Innenmembranproteinen mit einer Transmembrandomäne sowie einer aminoternalen Präsequenz erfolgt über den **Stop-Transfer-Mechanismus**, der vom **TIM23-Komplex** ohne Beteiligung des PAM-Moduls ausgeführt wird. Bei diesem Sortierungsweg

werden die Proteine nicht vollständig über die innere Membran transportiert, sondern in der Translokationspore arretiert und durch die laterale Öffnung der Pore in die Innenmembran entlassen (van Loon & Schatz, 1987; Glick *et al.*, 1992; Chacinska *et al.*, 2005; van der Laan *et al.*, 2007). Dieser Mechanismus findet beispielsweise bei der Untereinheit 5a der Cytochrom *c*-Oxidase (Cox5a) oder der D-Laktat-Dehydrogenase (DLD) Anwendung (Glaser *et al.*, 1990; Miller & Cumsky, 1993; Rojo *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 2005).

Eine weitere Möglichkeit für die Integration kernkodierter Proteine in die innere Membran ist der Mechanismus der **konservativen Sortierung** (Abb. 1.7), welcher dem Sortierungsweg der prokaryotischen Vorfahren der Mitochondrien ähnelt (Hartl *et al.*, 1987; Hartl & Neupert, 1990; Herrmann & Neupert, 2003; Neupert & Herrmann, 2007; Kulawiak *et al.*, 2013; Neupert, 2015). Bei der konservativen Sortierung werden Vorläuferproteine, die eine aminoterminalen Präsequenz für den Import in den Matrixraum tragen, zunächst mit Hilfe des TOM- und des TIM23-Komplexes vollständig über beide mitochondriale Membranen transloziert. In der mitochondrialen Matrix wird die Präsequenz proteolytisch durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase entfernt und die Polypeptidkette von dem Chaperon mtHsp70 gebunden, wodurch die Aggregation des importierten Proteins in der Matrix verhindert wird. Im nächsten Schritt wird das Protein in Abhängigkeit des Membranpotentials von der Matrix ausgehend in die innere Membran inseriert, wobei die Proteintopologie, wie in Prokaryoten, der sogenannten „Positive-Inside-Rule“ folgt. Dieser Regel zufolge besitzen die Proteindomänen, die über die Innenmembran in den Intermembranraum transloziert werden, eine negative Nettoladung, während die in der Matrix verbleibenden Proteindomänen eine positive Nettoladung aufweisen (von Heijne, 1989; Dalbey *et al.*, 1995; Rojo *et al.*, 1999).

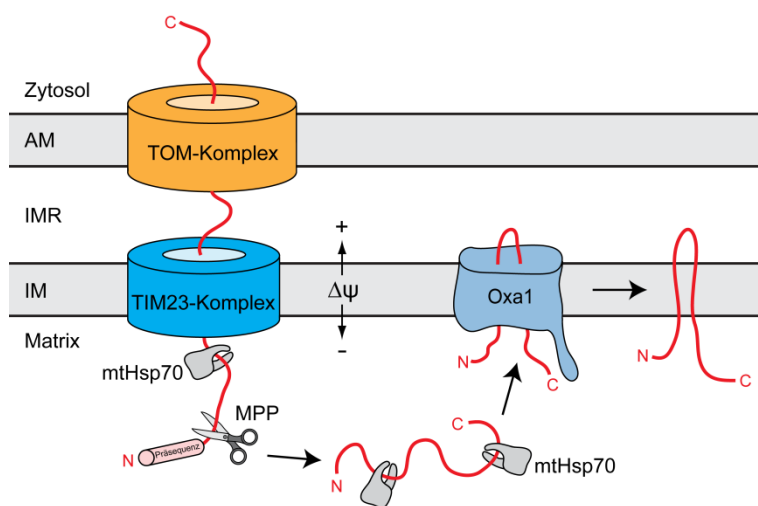


Abb. 1.7: Konservative Sortierung von kernkodierten Innenmembranproteinen in *S. cerevisiae*.

Beim konservativen Sortierungsweg werden die kernkodierten Membranproteine auf Grund ihrer aminoterminalen Präsequenz zunächst vollständig in die mitochondriale Matrix importiert. In einem nächsten Schritt werden die Proteine durch Komponenten wie Oxa1 von der Matrixseite aus in die innere mitochondriale Membran inseriert. AM (Außenmembran); IMR (Intermembranraum); IM (Innenmembran); MPP (mitochondriale Prozessierungspeptidase).

Mit Hilfe des Mechanismus der konservativen Sortierung werden zum Beispiel die Untereinheit 9 der F_1F_0 -ATPase (Su9) von *Neurospora crassa* oder die Proteine Oxa1 (*Oxidase Assembly mutant 1*) und Cox18 (*Cytochrome c Oxidase assembly protein 18*) in die innere mitochondriale Membran integriert (Rojo *et al.*, 1995; Herrmann *et al.*, 1997; Funes *et al.*, 2004). Oxa1 stellt dabei nicht nur ein Substrat

dieses Mechanismus, sondern auch eine zentrale Komponente der Maschinerie der konservativen Sortierung dar, welche den Proteinexport aus der Matrix in die innere Membran bewerkstelligt (Hell *et al.*, 1998; Stuart, 2002; Bohnert *et al.*, 2010). Zudem spielt das Innenmembranprotein Oxa1 eine tragende Rolle bei der Insertion mitochondrial kodierter Proteine (Hell *et al.*, 2001; Bonnefoy *et al.*, 2009; Ott & Herrmann, 2010), die im folgenden Kapitel genauer beschrieben wird.

1.4.7 Sortierung mitochondrial kodierter Proteine

Das mitochondriale Genom der Bäckerhefe *S. cerevisiae* kodiert für eine begrenzte Anzahl an ribosomalen RNS-Molekülen und Transfer-RNS-Molekülen sowie für acht mitochondriale Proteine (Foury *et al.*, 1998). Bei sieben der acht Haupttranslationsprodukte der mitochondrialen DNS von *S. cerevisiae* handelt es sich um Komponenten der Reaktionszentren der Atmungskettenkomplexe sowie der F₁F₀-ATPase: Cytochrom *b* (Cytb) der Cytochrom *c*-Reduktase (KomplexIII), Cox1, Cox2 und Cox3 der Cytochrom *c*-Oxidase (KomplexIV) sowie Atp6, Atp8 und Atp9 der F₁F₀-ATPase (KomplexV). Das achte mitochondrial kodierte Protein ist Var1, ein Bestandteil der kleinen Untereinheit mitochondrialer Ribosomen (Abb. 1.1) (Ott & Herrmann, 2010).

Warum diese wenigen Proteine weiterhin im mitochondrialen Genom kodiert sind und nicht auch im Zuge des evolutionär bedingten, ausgeprägten Gentransfers in den Zellkern ausgelagert wurden, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Eine mögliche Erklärung bietet die Tatsache, dass die mitochondrial kodierten Proteine, mit Ausnahme von Var1, eine starke Hydrophobizität aufweisen, welche in der Aggregation der Proteine im Zytosol resultieren und so einen effizienten Import in die innere mitochondriale Membran unterbinden könnte (Claros *et al.*, 1995). Eine alternative Hypothese besagt, dass die Kopplung der Synthese und der Assemblierung der mitochondrial kodierten Atmungskettenkomponenten einen „Feedback-Kontrollmechanismus“ zur exakten Regulation der Genexpression ermöglicht. Einem solchen regulatorischen Mechanismus unterliegt beispielsweise die Synthese von Cox1, der Untereinheit 1 der Cytochrom *c*-Oxidase (Perez-Martinez *et al.*, 2003; Barrientos *et al.*, 2004; Mick *et al.*, 2007; Pierrel *et al.*, 2007).

Der Einbau mitochondrial kodierter Translationsprodukte in die mitochondriale Innenmembran geschieht kotranslational und die Topologie der Membranproteine folgt auch hier der „Positive-Inside-Rule“ (Ott & Herrmann, 2010). Die für die Insertion von mitochondrial kodierten Proteinen verantwortliche Maschinerie umfasst Komponenten wie Oxa1 (*OXidase Assembly mutant 1*) (Hell *et al.*, 2001), Mba1 (*Multi-copy Bypass of AFG3 mutant 1*) (Preuss *et al.*, 2001), Mdm38 (*Mitochondrial Distribution and Morphology protein 38*) (Frazier *et al.*, 2006), Cox18 (*Cytochrome c OXidase assembly protein 18*) (Souza *et al.*, 2000), Pnt1 (*PeNTamidine resistance factor, mitochondrial*) (He & Fox, 1999; Saracco & Fox, 2002) und Mss2 (*Mitochondrial Splicing System-related protein*) (Broadley *et al.*, 2001) (Abb. 1.8).

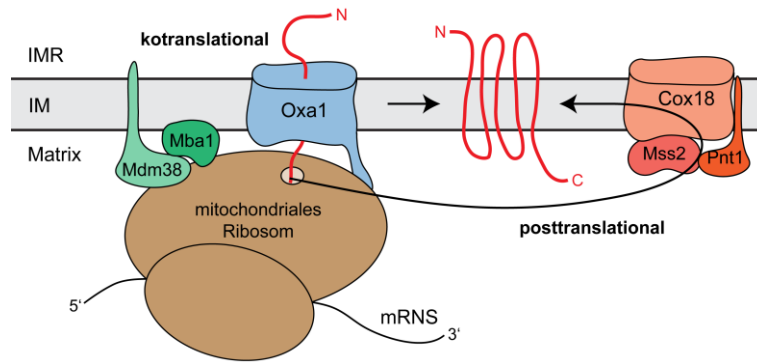


Abb. 1.8: Sortierung von mitochondrial kodierten Innenmembranproteinen in *S. cerevisiae*.

Mitochondrial kodierte Proteine werden mit Hilfe von Proteinen wie Oxa1, Mba1, Mdm38, Cox18, Pnt1 und Mss2 in die Innenmembran inseriert. Während die Komponenten Oxa1, Mba1 und Mdm38 auf Grund ihrer Interaktion mit dem mitochondrialen Ribosom an einem kotranslational ablaufenden Insertionsschritt beteiligt sind, nehmen die Proteine Cox18, Pnt1 und Mss2 möglicherweise eher eine nachgeordnete Stellung bei der Insertion mitochondrial kodierter Proteine ein.

Die Studien von Jia *et al.*, Szyrach *et al.*, Ott *et al.* und Frazier *et al.* haben gezeigt, dass die Innenmembranproteine Oxa1, Mba1 und Mdm38 dazu in der Lage sind an mitochondriale Ribosomen zu binden (Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003; Frazier *et al.*, 2006; Ott *et al.*, 2006). Über die Ausbildung dieser Interaktionen werden die mitochondrialen Ribosomen zur Innenmembran rekrutiert, was einen kotranslationalen Insertionsprozess für die mito-

chondrial kodierten Proteine erlaubt. Im Gegensatz dazu scheinen die Proteine Cox18, Pnt1 und Mss2 eher eine nachgeordnete und kooperative Rolle bei der Insertion mitochondrial kodierter Komponenten zu spielen. Für Cox18 wurde außerdem vorgeschlagen, dass es an der Assemblierung inserierter Membranproteine beteiligt sein könnte (Funes *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2012; Neupert, 2015).

Ein Beispiel für das Zusammenwirken der Komponenten dieses Insertionsapparates ist die Biogenese von Cox2, der mitochondrial kodierten Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase. Cox2 verfügt über zwei Transmembrandomänen und weist eine Topologie auf, bei der beide Termini im Intermembranraum lokalisiert sind. Der N-Terminus von Cox2 wird mit Hilfe von Oxa1 und Mba1 kotranslational in die innere Membran inseriert, während Cox18, Pnt1 und Mss2 an der posttranslationalen Insertion des C-Terminus beteiligt sind (He & Fox, 1997; He & Fox, 1999; Souza *et al.*, 2000; Broadley *et al.*, 2001; Preuss *et al.*, 2001; Saracco & Fox, 2002; Fiumera *et al.*, 2007; Bonnefoy *et al.*, 2009; Ott & Herrmann, 2010).

1.4.7.1 Das Protein Oxa1

Das Protein Oxa1 gehört zu der evolutionär konservierten Oxa1/YidC/Alb3-Proteinfamilie, deren Mitglieder eine zentrale Stellung bei der Insertion von Proteinen in die Membran von Bakterien (YidC), in die innere Membran von Mitochondrien (Oxa1, Cox18) sowie die Thylakoidmembran von Chloroplasten (Alb3) einnehmen (Luirink *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2001; Bonnefoy *et al.*, 2009; Funes *et al.*, 2011; Wang & Dalbey, 2011; Hennon *et al.*, 2015).

Oxa1 ist ein kernkodiertes, integrales Protein der inneren mitochondrialen Membran. In *S. cerevisiae* weist es in der Innenmembran eine heterogene Verteilung auf, welche sich jedoch dynamisch an die physiologischen Bedürfnisse der Zellen anpasst. So liegt Oxa1 unter fermentativen Wachstumsbedingungen, d. h. wenn die Bäckerhefen ihre Energie überwiegend durch Fermentation und somit

näher untersucht. Diese Dipeptidsequenz setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden Tryptophanen (W128 und W129) zusammen und ist auf Grund des hohen Konservierungsgrades in verschiedensten Spezies zu finden (Abb. 1.9, B). Diese zwei Tryptophane scheinen eine wichtige Rolle bei der Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase zu spielen (Lemaire *et al.*, 2004; Mathieu *et al.*, 2010). Außerdem können sie mit der korrekten Orientierung des Oxa1-Proteins in der inneren mitochondrialen Membran (N_{außen}-C_{innen}-Topologie) in Verbindung gebracht werden, da sie für die Translokation des Oxa1-N-Terminus von der Matrix in den Intermembranraum benötigt werden, und scheinen für Interaktionen zwischen den Oxa1-Transmembrandomänen notwendig zu sein (Sato & Mihara, 2009; Mathieu *et al.*, 2010).

Ursprünglich wurde das Protein Oxa1 (*Oxidase Assembly mutant 1*) in den genetischen Studien von Bauer *et al.* und Bonnefoy *et al.* entdeckt, die der Identifizierung von Proteinen mit einer Beteiligung bei der Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase dienten (Bauer *et al.*, 1994; Bonnefoy *et al.*, 1994). In nachfolgenden Studien wurde gezeigt, dass Oxa1 eine maßgebliche Rolle bei der kotranslationalen Insertion der mitochondrial kodierten Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase (Cox2) in die innere mitochondriale Membran spielt (He & Fox, 1997; Hell *et al.*, 1997; Fiumera *et al.*, 2007). Oxa1 kann außerdem mit der Biogenese weiterer Innenmembrankomplexe, wie zum Beispiel der F₁F₀-ATPase, in Verbindung gebracht werden (Altamura *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 2001). Die Abwesenheit von Oxa1 resultiert in einer Beeinträchtigung der Biogenese der Atmungskettenkomplexe, wobei die Cytochrom *c*-Oxidase am stärksten betroffen ist (Hell *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 2001). Hefezellen, in denen *OXA1* deletiert wurde, sind nicht in der Lage auf Medien mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Laktat oder Glycerol zu überleben (Bonnefoy *et al.*, 1994; Preuss *et al.*, 2001). Des Weiteren ist Oxa1 möglicherweise nicht nur an der Membraninsertion, sondern auch an der Assemblierung von mitochondrial kodierten Proteinen beteiligt (Jia *et al.*, 2007). Wie bereits erwähnt, nimmt Oxa1 auch bei der Biogenese von kernkodierten Proteinen, darunter Oxa1 selbst, Cox18, Mdl1 oder Carrier-Proteine, eine zentrale Stellung ein (Hell *et al.*, 1998; Funes *et al.*, 2004; Reif *et al.*, 2005; Bohnert *et al.*, 2010; Hildenbeutel *et al.*, 2012).

Die genauen Mechanismen, wie Oxa1 die Insertion bzw. die Assemblierung von Substratproteinen vermittelt, sind bisher jedoch weitestgehend unverstanden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Oxa1 in homooligomeren Komplexen vorkommt. Die genaue Anzahl der Monomere eines Oxa1-Homooligomers ist jedoch ungeklärt. So wurde für das Oxa1-Protein von *N. crassa* (Nargang *et al.*, 2002) und von *S. cerevisiae* (Reif *et al.*, 2005) berichtet, dass es aus vier Untereinheiten bestehende Homooligomere bildet. Eine *in vitro*-Studie zeigte hingegen, dass *S. cerevisiae*-Oxa1 in Verbindung mit aktiven Ribosomen ein Homodimer formt, welches möglicherweise sogar als Importpore fungieren könnte (Kohler *et al.*, 2009). Es wäre möglich, dass ein Dimer den Grundbaustein größerer Oxa1-enthaltender Komplexe darstellt. So schlägt auch die Studie von Krüger *et al.* vor, dass Oxa1 eine Pore für die Insertion von Proteinen bildet und, dass sich vier Oxa1-Proteine zu einer aktiven Einheit zusammenschließen, die aus zwei funktional gekoppelten Dimeren besteht (Krüger *et al.*, 2012).

1.4.7.2 Die Proteine Cox18, Pnt1 und Mss2

Für *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Oxa1 bei der Insertion von Membranproteinen mit weiteren mitochondrialen Komponenten kooperiert. Zu diesen zählen beispielsweise die Proteine Cox18, Pnt1 und Mss2, die eine wichtige Funktion bei der Biogenese der Cytochrom *c*-Oxidase besitzen (He & Fox, 1999; Souza *et al.*, 2000; Broadley *et al.*, 2001; Saracco & Fox, 2002; Fiumera *et al.*, 2007).

Es wurde nachgewiesen, dass Cox18, Pnt1 und Mss2 sowohl genetisch als auch physikalisch miteinander interagieren und offenbar eine gemeinsame Rolle bei der Insertion des C-Terminus von Cox2 spielen (Saracco & Fox, 2002). Über weitere Substrate dieser Proteine neben Cox2 ist bisher jedoch nichts bekannt und auch ihre Funktionsweise ist noch nicht verstanden.

In den Mitochondrien von Pflanzen, Pilzen und Tieren stellt Cox18 (*Cytochrome c OXidase assembly protein 18*) neben Oxa1 ein weiteres Mitglied der Oxa1/YidC/Alb3-Proteinfamilie dar (Hikkel *et al.*, 1997; Funes *et al.*, 2004). Cox18, welches auch als Oxa2 bezeichnet wird, ist wie Oxa1 ein kernkodiertes und fünf Transmembrandomänen umfassendes Protein (Souza *et al.*, 2000; Funes *et al.*, 2004; Bonnefoy *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu Oxa1 verfügt Cox18 jedoch nicht über eine ribosomale Bindedomäne, weshalb es auch nicht mit der kotranslationalen Insertion von Cox2, sondern mit der posttranslationalen Translokation des Cox2-C-Terminus sowie der postinsertionalen Assemblierung von Cox2 in Verbindung gebracht wird (Souza *et al.*, 2000; Funes *et al.*, 2004; Neupert, 2015).

Bei Pnt1 handelt es sich ebenfalls um ein kernkodiertes, integrales Protein der inneren Membran. Pnt1 zeichnet sich durch zwei in der Matrix lokalisierte Termini sowie eine stark hydrophobe Region im Zentrum des Proteins aus, die es in der Innenmembran verankert (He & Fox, 1999). Ursprünglich wurde Pnt1 (*PeNTamidine resistance factor, mitochondrial*) in der Studie von Ludewig und Staben identifiziert. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von *PNT1* die Resistenz von *S. cerevisiae*-Zellen gegenüber dem Wirkstoff Pentamidin erhöht (Ludewig & Staben, 1994). Erst in der Studie von He und Fox wurde gezeigt, dass es eine Rolle beim Export des Cox2-C-Terminus besitzt. Während die Deletion von *PNT1* in *S. cerevisiae* kaum Auswirkungen auf die Atmungskompetenz der Zellen hat, führt die Deletion von *KLPNT1* in *Klyveromyces lactis*-Zellen zu einem strikten Atmungsdefekt (He & Fox, 1999).

Das kernkodierte Protein Mss2 (*Mitochondrial Splicing System-related protein*) liegt peripher assoziiert mit der der Matrix zugewandten Seite der Innenmembran vor. Es wird angenommen, dass Mss2 für die Erkennung und Weiterleitung des Cox2-C-Terminus an das Translokationssystem benötigt wird (Broadley *et al.*, 2001; Fiumera *et al.*, 2007).

1.4.7.3 Das Protein Mba1

Ein weiteres Protein, welches in *S. cerevisiae* in die Insertion von Innenmembranproteinen involviert ist, ist Mba1 (Rep & Grivell, 1996; Preuss *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006; Pfeffer *et al.*, 2015). Mba1 ist ein kernkodiertes Protein, dessen Vorläuferform im Zytosol synthetisiert und auf Grund der aminoterminalen Präsequenz in die mitochondriale Matrix transportiert wird. Nach der proteolytischen

Prozessierung der 33 Aminosäuren langen Präsequenz wird Mba1 peripher mit der inneren Membran assoziiert, da es nicht über echte Transmembrandomänen, sondern nur über zwei hydrophobe Aminosäureregionen verfügt. Beide Mba1-Termini sind in der Matrix lokalisiert (Rep & Grivell, 1996; Preuss *et al.*, 2001). Funktional konnten für das Mba1-Protein bisher nur die aminoterminalen Präsequenz sowie die zwei hydrophoben Aminosäureregionen identifiziert werden (Abb. 1.10). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Mba1 mit mitochondrialen Translationsprodukten und konservativ sortierten Proteinen sowie mit den mitochondrialen Ribosomen über die Bindung der ribosomalen Untereinheiten Mrpl4 und Mrpl22 interagiert (Preuss *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006; Gruschke *et al.*, 2010). Weiterhin wurde eine Interaktion zwischen Mba1 und Mdm38 nachgewiesen (Bauerschmitt *et al.*, 2010). Diese Daten deuten darauf hin, dass das Mba1-Protein noch weitere funktionale Domänen aufweisen muss, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten.

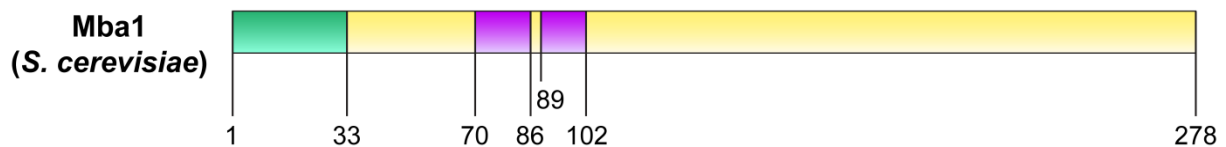


Abb. 1.10: Schematische Darstellung bekannter Aminosäuresequenzen des *S. cerevisiae*-Mba1-Proteins.

Über die Struktur des Mba1-Proteins von *S. cerevisiae* ist bisher nur sehr wenig bekannt. Mba1 verfügt über eine aminoterminalen Präsequenz (grüner Bereich), die für den Import aus dem Zytosol benötigt wird, sowie über zwei hydrophobe Aminosäureregionen (violette Bereiche), über welche es an die innere Membran gebunden wird.

Das Protein Mba1 ist Teil eines Komplexes mit einer Größe von etwa 200 kDa. Auch wenn die genaue Zusammensetzung dieses Komplexes noch nicht bekannt ist, wurde nachgewiesen, dass es sich bei diesem Komplex nicht um den Oxa1-enthaltenden Komplex handelt (Preuss *et al.*, 2001). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass auch Mdm38 im selben Komplex wie Mba1 vorliegt, da es entweder direkt oder indirekt an Mba1 bindet (Bauerschmitt *et al.*, 2010). Mdm38 ist ein kernkodiertes, integrales Innenmembranprotein, das ebenfalls an mitochondriale Ribosomen bindet (Frazier *et al.*, 2006). Für Mdm38 wurde außerdem eine Interaktion mit seinem *S. cerevisiae*-Homolog Ylh47 gezeigt (Bauerschmitt *et al.*, 2010). Die *S. cerevisiae*-Proteine Mdm38 und Ylh47 sind beides Homologe des humanen Letm1-Proteins (Dimmer *et al.*, 2002; Nowikovsky *et al.*, 2004; Schlickum *et al.*, 2004), welches mit dem Wolf-Hirschhorn-Syndrom, einer schwerwiegenden Erberkrankung, in Verbindung gebracht werden kann (Endele *et al.*, 1999).

Mba1 (*Multi-copy Bypass of AFG3 mutant 1*) wurde ursprünglich in der genetischen Studie von Rep *et al.* entdeckt, in der beschrieben wurde, dass die Deletionen der zwei Gene *AFG3/YTA10* und *RCA1/YTA12*, die für Komponenten der mitochondrialen m-AAA-Protease kodieren, durch die Überexpression von *MBA1*, *PIM1* sowie *OXA1* unterdrückt werden können (Rep *et al.*, 1996).

In den Arbeiten von Rep & Grivell sowie von Preuss *et al.* wurde für Mba1 eine Funktion bei der Insertion von mitochondrial kodierten Proteinen, wie zum Beispiel den Untereinheiten 1 und 2 der Cytochrom *c*-Oxidase (Cox1, Cox2), sowie beim Prozess der konservativen Sortierung kernkodierter Proteine nachgewiesen (Rep & Grivell, 1996; Preuss *et al.*, 2001). Die Deletion von *MBA1* führt bei

Wachstum mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen nur zu einem schwachen Wachstumsdefekt (Preuss *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006; Bauerschmitt *et al.*, 2010). Dagegen resultierte die Doppeldeletion von *MBA1* und *OXA1* unter respiratorischen Bedingungen in einer schweren Respirationsdefizienz der Zellen. Es wird angenommen, dass Mba1 und Oxa1 eine Ähnlichkeit bezüglich ihrer Substratspezifität aufweisen, und, dass Mba1 sowohl in Kooperation mit Oxa1 als auch unabhängig von Oxa1 in einem parallelen Insertionsweg fungieren könnte (Preuss *et al.*, 2001). Die Doppeldeletion von *MBA1* und *MDM38* zeigt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen ebenfalls einen schweren Wachstumsphänotyp, was auf ihre gemeinsame Rolle bei der Biogenese der mitochondrial kodierten Proteine zurückgeführt werden kann (Bauerschmitt *et al.*, 2010).

Bisher ist weder die genaue Funktion von Mba1 noch die von Mdm38 in *S. cerevisiae* verstanden. Es wird davon ausgegangen, dass Mba1 im Fall der mitochondrial kodierten Proteine nicht an dem mechanistischen Prozess der Membraninsertion an sich beteiligt ist, sondern, dass es für die Positionierung des mitochondrialen Ribosoms zuständig ist. Es wurde vorgeschlagen, dass Mba1 den Polypeptidkettenausgang des mitochondrialen Ribosoms so zur inneren Membran ausrichtet, dass die naszierenden Polypeptidketten schnell und effizient an die Insertionsmaschinerie der Innenmembran weitergeleitet werden können. Demzufolge spielt Mba1 eine wichtige Rolle bei der Koordination der Proteinsynthese und der kotranslationalen Insertion mitochondrial kodierter Untereinheiten (Ott *et al.*, 2006; Gruschke *et al.*, 2010; Pfeffer *et al.*, 2015).

2 Motivation und Ziele dieser Arbeit

Im Metabolismus eukaryotischer Zellen nehmen die Mitochondrien eine zentrale Stellung ein. Mitochondrien sind essentielle Organellen, die sich durch eine äußere und innere Phospholipidmembran auszeichnen. Die innere mitochondriale Membran lässt sich morphologisch in die zwei Kompartimente „innere Grenzflächenmembran“ und „Cristaemembran“ gliedern. Es gibt Hinweise, dass sich die beiden Substrukturen der inneren Membran in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden. Ob es einen Zusammenhang zwischen der heterogenen Verteilung und der Funktion der Proteine gibt und welche Mechanismen einer solchen Ungleichverteilung der Proteine zu Grunde liegen, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden.

In vorhergehenden Studien wurde für das integrale Membranprotein Oxa1, welches eine zentrale Rolle bei der post- und kotranslationalen Insertion von Proteinen spielt, unter Anwendung mikroskopischer Techniken eine heterogene Verteilung in der Innenmembran nachgewiesen, die sich dynamisch an die physiologischen Bedingungen anpasst. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich auch eine Substitutionsmutation im *OXAI*-Gen auf die Verteilung von Oxa1 auswirkt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese Mutation auch zu einer Veränderung der Größen von Oxa1-enthaltenden Komplexen und damit möglicherweise auch zu einer veränderten Komplexkomposition führt. Es stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der submitochondrialen Lokalisation und den Größen sowie der Zusammensetzung der Komplexe von Oxa1 gibt. Dieser Frage sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Blau-Nativen-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (BN-PAGE) sowie einer massenspektrometrischen Untersuchung (LC-MS/MS) nachgegangen werden.

Aus der Literatur sind neben Oxa1 noch andere Komponenten bekannt, die bei der Insertion von Membranproteinen wichtige Funktionen erfüllen. Zu diesen gehören die Proteine Mba1 und Pnt1. Bislang wurde nicht eindeutig belegt, ob auch Mba1 und Pnt1 eine heterogene Verteilung in der Innenmembran aufweisen, und, ob diese Verteilung statisch oder wie die von Oxa1 dynamisch ist. Deshalb wurden in dieser Arbeit die submitochondrialen Lokalisationen dieser beiden Proteine im Kontext unterschiedlicher physiologischer Bedingungen analysiert. Hierfür wurde auf die konfokalmikroskopische Untersuchung von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen mit vergrößerten Mitochondrien sowie die Elektronenmikroskopie zurückgegriffen. Weiterhin sollte das Mba1-Protein im Rahmen dieser Arbeit gezielt mittels Mutagenese verändert werden, um darüber Aminosäureabschnitte bzw. einzelne Aminosäuren zu identifizieren, die mit der Verteilung sowie der Funktion von Mba1 in Zusammenhang stehen. Zu diesem Zweck wurden sowohl mikroskopische als auch biochemische Techniken, wie BN-PAGE und Koimmunopräzipitation, eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit ist somit die Aufklärung der Verteilung von Proteinen, die an der Insertion mitochondrialer Membranproteine beteiligt sind. Diese Untersuchung könnte zu einem besseren Verständnis über den Insertionsprozess beitragen, da zum Beispiel auch die Stellen in der inneren Membran, an denen Membranproteine inseriert oder assembliert werden, bisher nicht bekannt sind.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Chemikalien

Die für die Herstellung von Puffern und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Applichem (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

Die Komponenten der für die Kultivierung von pro- und eukaryotischen Zellen eingesetzten Wachstumsmedien wurden von Applichem (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) in höchstem Reinheitsgrad geliefert. Für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen für SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture*) (siehe Kapitel 3.4.2) wurden außerdem Lysin und Arginin, welche jeweils mit schweren Kohlenstoff- und Stickstoffatomen markiert sind (siehe Kapitel 3.1.7.2), von der Euriso-Top GmbH (Saarbrücken, Deutschland) in höchster Qualität bezogen.

Sofern es im Text nicht gesondert erwähnt ist, wurden alle Substanzen für Puffer, Lösungen und Medien mit deionisiertem Wasser gelöst, welches aus der Reinstwasseranlage Purelab Classic (ELGA Lab Water, Buckinghamshire, UK) stammte.

Tab. 3.1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
Aceton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung (30 % (w/v) / 0,8 % (w/v))	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Albumin-H2 (aus Rinderserum, fettsäurefrei)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniaklösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
„ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel“	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
„BioRad Protein Assay“	BioRad (München, Deutschland)
clonNAT (Nourseothricin-Sulfat)	Werner BioAgents (Jena, Deutschland)
Coomassie-Brillant-Blau G250	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Coomassie-Brillant-Blau R250	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs)	Promega (Madison, WI, USA)
Digitonin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Chemikalie	Herkunft
Ethidiumbromid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt, Deutschland)
„Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder“	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Geneticin (G418-Sulfat)	Calbiochem Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glyzerin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
„Native Mark™ unstained Protein Standard“	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
„NativePAGE Sample Prep Kit“	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	MPI BPC (Göttingen, Deutschland)
Natronlauge	Merck (Darmstadt, Deutschland)
„Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder“	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Pepstatin A	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ponceau S	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Proteaseinhibitor-Tabletten „Mini Complete“ (EDTA-frei)	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
„QIAprep Spin Miniprep Kit“	Qiagen (Hilden, Deutschland)
„QIAprep Spin Midiprep Kit“	Qiagen (Hilden, Deutschland)
„QIAquick Gel Extraction Kit“	Qiagen (Hilden, Deutschland)
„QIAquick PCR Purification Kit“	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Roti-Blue (kolloidales Coomassie-Brilliant-Blau G250)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Silbernitrat	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Trichloressigsäure (TCA)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Triton X-100	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
„Western Lightning Plus-ECL Enhanced Luminol Reagent Plus“	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
„Western Lightning Plus-ECL Oxidizing Reagent Plus“	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Zitronensäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

3.1.2 Enzyme

Alle in Tabelle 3.2 aufgeführten Enzyme wurden nach Herstellerangaben mit den dafür vorgeschriebenen Reaktionspuffern eingesetzt. So auch sämtliche Restriktionsendonukleasen, welche von New England Biolabs (Schwabach, Deutschland) oder Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen wurden. Nach Bedarf wurde den Restriktionsansätzen BSA zugefügt.

Tab. 3.2: Verwendete Enzyme

Enzym	Herkunft
CIAP (<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>)	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
GoTaq-DNS-Polymerase	Promega (Madison, WI, USA)
Pfu DNS-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Proteinase K	Serva (Heidelberg, Deutschland)
RNase A	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
T4 DNS-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Trypsin	Promega (Madison, WI, USA)
Zymolyase 100T	MP Biomedicals (Solon, OH, USA)

3.1.3 Antikörper und Fluorophore

Tab. 3.3: Für Western-Analysen verwendete primäre und sekundäre Antikörper

primäre Antikörper	aus Spezies	Verdünnung	Herkunft
Anti-Atp1 (F ₁ F ₀ -ATPase Untereinheit α)	Maus	1:1500	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Anti-Atp5	Kaninchen	1:250	P. Rehling (Universität Göttingen, Deutschland)
Anti-Cox4	Kaninchen	1:250	P. Rehling (Universität Göttingen, Deutschland)
Anti-Cytochrom C (in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cyc1)	Maus	1:1000	MitoSciences (Eugene, OR, USA)
Anti-Cyt1	Kaninchen	1:250	P. Rehling (Universität Göttingen, Deutschland)
Anti-FLAG	Maus	1:2000	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Anti-GFP	Maus	1:2000	BD Biosciences Clontech (Heidelberg, Deutschland)
Anti-Mba1	Kaninchen	1:200	P. Rehling (Universität Göttingen, Deutschland)
Anti-Mdm38	Kaninchen	1:200	P. Rehling (Universität Göttingen, Deutschland)
Anti-Mrpl4	Kaninchen	1:500	M. Ott (Universität Stockholm, Schweden)
Anti-Mrpl32	Kaninchen	1:500	T. Langer (Universität Köln, Deutschland)
Anti-Oxa1	Kaninchen	1:500	M. Ott (Universität Stockholm, Schweden)
Anti-Por1	Maus	1:1500	MitoSciences (Eugene, OR, USA)
Anti-Rip1	Kaninchen	1:250	P. Rehling (Universität Göttingen, Deutschland)
Anti-Tim50	Kaninchen	1:1000	K. Hell (Universität München, Deutschland)
Anti-Tom20	Kaninchen	1:1000	D. Rapaport (Universität Tübingen, Deutschland)
Anti-Ylh47	Kaninchen	1:200	P. Rehling (Universität Göttingen, Deutschland)
sekundäre Antikörper	aus Spezies	Verdünnung	Herkunft
Anti-Kaninchen, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (HRP)	Ziege	1:10.000	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Anti-Maus, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (HRP)	Ziege	1:10.000	Dianova (Hamburg, Deutschland)

Tab. 3.4: Für die Elektronenmikroskopie verwendete primäre und sekundäre Antikörper

primäre Antikörper	aus Spezies	Verdünnung	Herkunft
Anti-GFP, polyklonal	Kaninchen	1:150	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-FLAG, monoklonal	Maus	1:300	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Anti-FLAG, polyklonal	Kaninchen	1:150	Abcam (Cambridge, UK)
sekundäre Antikörper	aus Spezies	Verdünnung	Herkunft
Anti-Maus, gekoppelt mit Goldpartikel (10 nm)	Ziege	1:15	Aurion (Wageningen, Niederlande)
Protein A, gekoppelt mit Goldpartikel (10 nm)	<i>S. aureus</i>	1:50	University Medical Center (UMC) (Universität Utrecht, Niederlande)

Tab. 3.5: In der Konfokalmikroskopie eingesetzter Fluorophor

Fluorophor	Beschreibung	Endkonzentration	Herkunft
MitoTracker® Red CM-H ₂ XRos	$\lambda(\text{Ex}): 579 \text{ nm}; \lambda(\text{Em}): 599 \text{ nm}$	500 nmol/l	Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA)

3.1.4 DNS-Oligonukleotide

Für die Erzeugung der verschiedenen Expressionsplasmide und der genomischen Deletionen sowie zu Kontrollzwecken wurden DNS-Oligonukleotide (Primer) der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) mit dem Reinheitsgrad „ENTSALZT“ verwendet und in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Im Fall der *Mba*1-Deletionsvarianten wurden mit Hilfe der DNS-Oligonukleotide an den Enden der verkürzten *MBAI*-Genkonstrukte *Sac*I- und *Xma*I-Schnittstellen eingeführt, welche die spätere Integration der *MBAI*-Konstrukte in die Vektoren pUG36-*C-GFP* (*Vektor1*) und pUG36-*C-FLAG* (*Vektor2*) mittels Ligation (siehe Kapitel 3.2.8) ermöglichten (siehe Kapitel 8.1.2).

Für die Erzeugung von *Mba*1-Substitutionsvarianten wurden die DNS-Oligonukleotide so gewählt, dass sie an bestimmten Stellen im *MBAI*-Gen einen gerichteten Austausch von einer oder zwei Basen gegen andere Basen ermöglichten, so dass das neue Basentriplett für die Aminosäure Alanin kodierte (siehe Kapitel 8.1.2).

Zur Erzeugung und Verifikation von Gendeletionen im Hefe-Genom wurden die Primer „A“ und „D“ des entsprechenden Gens verwendet. Die Sequenzen dieser Primer stammen von der Internetseite des „*Saccharomyces Genome Deletion Project*“ (Tab. 3.13), welche sämtliche Informationen zur „*Yeast Knock-out Deletion Collection*“ (*YKODC*) (Giaever *et al.*, 2002) bereitstellt.

Tab. 3.6: In dieser Arbeit verwendete DNS-Oligonukleotide

Name	Sequenz	Kommentar
für die Erzeugung von Expressionsplasmiden, die <i>MBA1</i>-Konstrukte tragen		
MBA1-Gen_vorwärts	ATATAT GAGCTC TGACTGAACAATACGTTGAT	<i>SacI</i> -Schnittstelle
MBA1-Gen_rückwärts	CGCGCG CCCGGG GCTTGGAGGTAAACGATATATATC	<i>XmaI</i> -Schnittstelle
MBA1 ¹⁻²⁷⁷ _rückwärts	GCGCAAC CCCGGG TGGAGGTAAACGATATATATC	<i>XmaI</i> -Schnittstelle
MBA1 ¹⁻²⁷⁶ _rückwärts	GCGCAAC CCCGGG AGGTAAACGATATATATACACC	<i>XmaI</i> -Schnittstelle
MBA1 ¹⁻²⁷⁵ _rückwärts	GCGCAAC CCCGGG TAAACGATATATATACACCGTT	<i>XmaI</i> -Schnittstelle
MBA1 ¹⁻²⁷⁴ _rückwärts	GCGCAAC CCCGGG ACGATATATATACACCGTTAAC	<i>XmaI</i> -Schnittstelle
MBA1 ¹⁻²⁷³ _rückwärts	GCGCAAC CCCGGG ATATATATACACCGTTAACTTT	<i>XmaI</i> -Schnittstelle
MBA1 ¹⁻²⁷² _rückwärts	GCGCAAC CCCGGG TATATACACCGTTAACTTTCAT	<i>XmaI</i> -Schnittstelle
MBA1-S278A_vorwärts	CGTTTACCTCCAG CCC CCCGGGTAAATTAAC	Serin → Alanin: AGC → GCC
MBA1-S278A_rückwärts	GTTAATTAACCCGGG GGC TGGAGGTAAACG	
MBA1-P277A_vorwärts	GATATATATCGTTTACCT GCA AGCCCCGGGTAAATTAAC	Prolin → Alanin: CCA → GCA
MBA1-P277A_rückwärts	GTTAATTAACCCGGGGCT TGC AGGTAAACGATATATATC	
MBA1-P276A_vorwärts	GATATATATCGTTT AGT CCAAGCCCCGGG	Prolin → Alanin: CCT → GCT
MBA1-P276A_rückwärts	CCCGGGGCTTGG AGC TAAACGATATATATC	
MBA1-L275A_vorwärts	GATATATATCGT GCA CCTCCAAGCCCCGGG	Leucin → Alanin: TTA → GCA
MBA1-L275A_rückwärts	CCCGGGGCTTGGAGG TGC ACGATATATATC	
MBA1-R274A_vorwärts	GGTGATATATAT GCT TACCTCCAAGCCCC	Arginin → Alanin: CGT → GCT
MBA1-R274A_rückwärts	GGGGCTTGGAGGTAA AGC ATATATATACACC	
MBA1-Y273A_vorwärts	GTTAACGGTGATATA GCT CGTTTACCTCCAAGC	Tyrosin → Alanin: TAT → GCT
MBA1-Y273A_rückwärts	GCTTGGAGGTAAACG AGC TATATACACCGTTAAC	
MBA1-I272A_vorwärts	GTTAACGGTGAT GCA TATCGTTTACCTCCAAGC	Isoleucin → Alanin: ATA → GCA
MBA1-I272A_rückwärts	GCTTGGAGGTAAACGATAT TGC ATCACCGTTAAC	
MBA1-D271A_vorwärts	GAAAGTTAACGGT GCT ATATATCGTTTACC	Asparaginsäure → Alanin: GAT → GCT
MBA1-D271A_rückwärts	GGTAAACGATATAT AGC ACCGTTAACTTTC	
MBA1-G270A_vorwärts	GAATGAAAGTTAAC GCT GATATATATCG	Glycin → Alanin: GGT → GCT
MBA1-G270A_rückwärts	CGATATATATC AGC GTTAACTTTCATTC	
MBA1-N269A_vorwärts	GCCATACACAGAATGAAAGTT GCT GGTGATATATATCG	Asparagin → Alanin: AAC → GCT
MBA1-N269A_rückwärts	CGATATATATCAC AGC AACTTTCATTCTGTGTATGGC	
MBA1-V268A_vorwärts	CACAGAATGAAA GCT AACGGTGATATATATCG	Valin → Alanin: GTT → GCT
MBA1-V268A_rückwärts	CGATATATATCACCGTT AGC TTTCATTCTGTG	
zur Kontrolle von Expressionsplasmiden mit <i>GFP</i>- bzw. <i>FLAG</i>-Konstrukten		
M13-Sequ._vorwärts	CAGGAAACAGCTATGACC	zur Überprüfung von <i>GFP</i> -Plasmiden
<i>GFP</i> -out-Sequ._rückwärts	GTTGCATCACCTTCACCCTC	
pUG36-Sequ._vorwärts	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC	zur Überprüfung von <i>FLAG</i> -Plasmiden
pUG36-Sequ._rückwärts	CCCAGTCACGACGTTGTA AACGACGGCC	

Name	Sequenz	Kommentar
für die Deletion von <i>MDM10</i> im Hefe-Genom (zur Erzeugung vergrößerter Mitochondrien)		
<i>MDM10</i> -Knockout_vorwärts	CTGTGGTACCAATTGGATGG	zur Einführung der <i>MDM10</i> -Deletion im Hefe-Genom
<i>MDM10</i> -Knockout_rückwärts	GCTAGTAGAACGCCTGCGAG	
für die Deletion von <i>MBA1</i> im Hefe-Genom und ihre Überprüfung		
MBA1_A	GGAAGAGTCTCAGATATTGGTTTCA	zur genomischen Deletion von <i>MBA1</i> und Überprüfung
MBA1_D	TCTAAAAGATGAAGCAAAGCTCAGT	
MBA1-KO-Sequ._vorwärts	CCCACCTTATTGTCAACGGCA	zur Überprüfung der genomischen Deletion von <i>MBA1</i>
MBA1-KO-Sequ._rückwärts	TTTTAGCGCTGATTACTGTTA	
für die Deletion von <i>ARG4</i> im Hefe-Genom und ihre Überprüfung		
ARG4-KO_vorwärts	TTGAAGAGCTCAAAGCAGGTAAGTATATAACAAG ACTAAGGCAAACATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	zum Austausch von <i>kanMX4</i> gegen <i>natMX</i> im $\Delta arg4$ -Stamm der <i>YKODC</i>
ARG4-KO_rückwärts	AGAAGTACCAGACCTGATGAAATTCTTGCGCATAA CGTCGCCATCTGCTAATCGATGAATTCGAGCTCG	
ARG4_A	TTTTCTTTACTCTTCCAAACCCCTCT	zur genomischen Deletion von <i>ARG4</i> und Überprüfung
ARG4_D	GAGTGCGAATGGGTATAAACTAAGA	
ARG4-KO-Sequ._vorwärts	AAGCCATGATCTTTAGTTACT	zur Überprüfung der genomischen Deletion von <i>ARG4</i>
ARG4-KO-Sequ._rückwärts	ACCTGAACTTAGTCCATCATA	
für die Überprüfung der Deletionen von <i>PNT1</i>, <i>OXA1</i> und <i>LYS2</i> im Hefe-Genom sowie das Vorhandensein der Expressionsplasmide mit <i>OXA1-FLAG</i> und <i>OXA1-W128F-FLAG</i>		
PNT1_A	GATAACCTTTTTCTTACCTTTTCGC	zur Überprüfung der genomischen Deletion von <i>PNT1</i>
PNT1_D	TGCTCACTTAGAGACCTACAAGGTT	
OXA1_A	AGTCTTTTCGTGATAGTCAACATGA	zur Überprüfung der genomischen Deletion von <i>OXA1</i>
OXA1_D	CATGCAATGGTAAATGAAGAATACA	
LYS2-Sequ._vorwärts	TTGCCAGCGAATTCCTTG	zur Überprüfung auf das Allel mit der <i>LYS2</i> -Deletion
LYS2-Gen_rückwärts	TAGCAACACCTAAGTAAATGG	
Genbeginn-OXA1_vorwärts	GCGCGCGAGCTCGCATCGACATTTTCCCGTT	bindet in <i>OXA1</i>
zur Kontrolle auf die Resistenzkassetten <i>kanMX4</i> und <i>natMX</i>		
Kan_B	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	zur Kontrolle auf die <i>kanMX4</i> -Kassette
Kan_C	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	
NAT-3'-out_vorwärts	CGACGGCACCGCCTCGGACGG	zur Kontrolle auf die <i>natMX</i> -Kassette

3.1.5 Vektoren und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden entweder zur direkten Transformation in Hefezellen (siehe Kapitel 3.4.3) oder als PCR-Matrize für die Amplifikation spezifischer Genprodukte (siehe Kapitel 3.2.1) verwendet. Die Karten der in Tabelle 3.7 aufgeführten Vektoren und Plasmide sind im Anhang in Kapitel 8.1 dargestellt.

Tab. 3.7: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten Vektoren und Plasmide

Name (Beschreibung)	Funktion	Marker DH5 α /Hefe	Pro-motor	Herkunft
pAG25 (Vektor)	PCR-Matrize für <i>natMX</i> -Genkassette	<i>AmpR/natMX</i>	<i>TEF</i>	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
pCR2.1-TOPO-MDM10-Knockout	PCR-Matrize für <i>MDM10</i> -Knockout	<i>AmpR</i> und <i>KanR/natMX</i>	<i>TEF</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
pVT100U- <i>mt-GFP</i>	Expression von mitochondrialem Matrix-GFP (Präsequenz Su9 (1-69))	<i>AmpR/URA3</i>	<i>ADHI</i>	B. Westermann (Universität Bayreuth,
Vektor1 (pUG36-C- <i>GFP</i>)	Vektor für die Erzeugung von GFP-Expressionsplasmiden	<i>AmpR/URA3</i>	<i>MET25</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>MBA1-GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-GFP PCR-Matrize für die Klonierung der C-terminalen Deletions- und Punktmutanten mit GFP-Tag	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	J. Schmitz-Salue (MPIBPC, Göttingen)
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁷ - <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1 ¹⁻²⁷⁷ -GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁶ - <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1 ¹⁻²⁷⁶ -GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁵ - <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1 ¹⁻²⁷⁵ -GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁴ - <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1 ¹⁻²⁷⁴ -GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷³ - <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1 ¹⁻²⁷³ -GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷² - <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1 ¹⁻²⁷² -GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -S278A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-S278A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -P277A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-P277A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -P276A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-P276A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -L275A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-L275A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -R274A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-R274A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -Y273A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-Y273A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -I272A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-I272A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -D271A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-D271A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -G270A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-G270A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -N269A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-N269A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1</i> -V268A- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-V268A-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>OXA1-GFP</i>	Expression von mitochondrialem Oxa1-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>oxa1</i> -W128F- <i>GFP</i>	Expression von mitochondrialem Oxa1-W128F-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>PNT1-GFP</i>	Expression von mitochondrialem Pnt1-GFP	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
Vektor2 (pUG36-C- <i>FLAG</i>)	Vektor für die Erzeugung von FLAG-Expressionsplasmiden	<i>AmpR/URA3</i>	<i>MET25</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)

Name (Beschreibung)	Funktion	Marker DH5 α /Hefe	Pro-motor	Herkunft
<i>MBA1-FLAG</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-FLAG PCR-Matrize für die Klonierung der C-terminalen Punktmutanten mit FLAG-Tag	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG</i>	Expression von mitochondrialem Mba1 ¹⁻²⁷⁵ -FLAG	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1¹⁻²⁷³-FLAG</i>	Expression von mitochondrialem Mba1 ¹⁻²⁷³ -FLAG	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>mba1-I272A-FLAG</i>	Expression von mitochondrialem Mba1-I272A-FLAG	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	diese Arbeit
<i>OXA1-FLAG</i>	Expression von mitochondrialem Oxa1-FLAG	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>oxa1-W128F-FLAG</i>	Expression von mitochondrialem Oxa1-W128F-FLAG	<i>AmpR/URA3</i>	<i>nativ</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)

3.1.6 Bakterienstamm und Materialien für dessen Kultivierung

Für die Klonierungen wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α mit folgendem Genotyp eingesetzt: F⁻; 80dlacZ Δ M15; Δ (lacZXA-argF); endA1; recA1; hsdR17; rk⁻-mk⁺; thi-1; supE44; relA1.

Die Kultivierung der *E. coli*-Zellen erfolgte in flüssigem Luria-Bertani-Medium (LB-Medium: 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 1 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) NaCl; 5 mM NaOH). Für die Herstellung von LB-Platten wurde das Medium mit 1,4 % (w/v) Agar versetzt.

Zur Selektion der rekombinanten Organismen wurde ausschließlich Ampicillin (50 μ g/ml; Applichem, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

3.1.7 Hefestämme und Materialien für ihre Kultivierung

In der vorliegenden Arbeit wurden als Ausgangsstämme die *Saccharomyces cerevisiae*-Wildtypstämme BY4741 WT (*MAT α* ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *met15 Δ 0*; *ura3 Δ 0*) und BY4742 WT (*MAT α* ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0*) verwendet (Euroscarf, Frankfurt, Deutschland) (Brachmann *et al.*, 1998).

Des Weiteren wurden als Ausgangsstämme kommerziell erhältliche Deletionsstämme der „Yeast Knock-out Deletion Collection“ (YKODC) (Giaever *et al.*, 2002), bei welchen nicht-essentielle Gene gegen eine *kanMX4*-Kassette im BY4741-Genotyp-Hintergrund ausgetauscht sind, von Biocat (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Im Fall der Deletion von *OXA1* wurde ein diploider Stamm mit BY4743-Genotyp-Hintergrund (*MAT α /MAT α* ; *his3 Δ 1/his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0/leu2 Δ 0*; *met15 Δ 0/MET15*; *LYS2/lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0/ura3 Δ 0*) (Euroscarf, Frankfurt, Deutschland) verwendet, bei dem eines der *OXA1*-Allele gegen eine *kanMX4*-Kassette ausgetauscht ist (Stoldt *et al.*, 2012).

Weiterhin kamen der Wildtyp YPH499 WT (*MAT α* ; *his3- Δ 200*; *leu2- Δ 1*; *trp1- Δ 63*; *lys2-801^{amber}*; *ade2-101^{ochre}*; *ura3-52*) sowie der Deletionsstamm Δ *mba1* (YPH499) (*MAT α* ; *his3- Δ 200*; *leu2- Δ 1*; *trp1- Δ 63*; *lys2-801^{amber}*; *ade2-101^{ochre}*; *ura3-52*; *YBR185C::HIS3MX6*) zum Einsatz.

Tab. 3.8: Übersicht über alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm (Hintergrund)	Genotyp (Kommentar)	Marker	Herkunft
BY4741 WT	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> (Wildtypstamm)	-	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
BY4741 WT + Vektor1	Genotyp wie BY4741 WT (Wildtypstamm mit leerem Vektor1)	<i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
BY4741 WT + Vektor2	Genotyp wie BY4741 WT (Wildtypstamm mit leerem Vektor2)	<i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
BY4741 WT + pVT100U- <i>mt-GFP</i>	Genotyp wie BY4741 WT (Wildtypstamm mit <i>Matrix-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
BY4742 WT	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> (Wildtypstamm)	-	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
YPH499 WT	<i>MATa</i> ; <i>his3-Δ200</i> ; <i>leu2-Δ1</i> ; <i>trp1-Δ63</i> ; <i>lys2-801^{amber}</i> ; <i>ade2-101^{ochre}</i> ; <i>ura3-52</i> (Wildtypstamm)	-	P. Rehling (Universität Göttingen, Deutschland)
RC 898	<i>Mat a</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>can1Δ0</i> ; <i>trp5Δ0</i> ; <i>ade2Δ0</i> (für Halo-Assay)	-	MPIBPC, Göttingen
<i>Δarg4</i> (YKODC)	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YHR018C::kanMX4</i> (genomische Deletion von <i>ARG4</i>)	<i>kanMX4</i>	Biocat (Heidelberg, Deutschland)
<i>Δarg4</i> (YKODC NatR)	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YHR018C::natMX</i> (genomische Deletion von <i>ARG4</i>)	<i>natMX</i>	diese Arbeit
<i>Δoxa1</i> (YKODC)	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YER154W::kanMX4</i> (genomische Deletion von <i>OXA1</i>)	<i>kanMX4</i>	Biocat (Heidelberg, Deutschland)
<i>Δoxa1</i> (YKODC) + Vektor1	Genotyp wie <i>Δoxa1</i> (YKODC) (mit leerem Vektor1)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>Δoxa1</i> (YKODC) + Vektor2	Genotyp wie <i>Δoxa1</i> (YKODC) (mit leerem Vektor2)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>Δoxa1</i> (BY4743 heterozygot)	<i>MATa/MATa</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0/MET15</i> ; <i>LYS2/lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>YER154W/YER154W::kanMX4</i> (diploider Stamm: ein <i>OXA1</i> -Allel ist gegen <i>kanMX4</i> ausgetauscht)	<i>kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt, Deutschland)
<i>Δoxa1</i> (für BN-PAGE) + Vektor 2	basiert auf BY4743; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YER154W::kanMX4</i> (mit leerem Vektor2)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>Δoxa1</i> (für BN-PAGE) + <i>OXA1-FLAG</i>	basiert auf BY4743; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>YER154W::kanMX4</i> ; <i>MET15</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> (mit <i>OXA1-FLAG</i> -Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>Δoxa1</i> (für BN-PAGE) + <i>oxa1-W128F-FLAG</i>	basiert auf BY4743; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>YER154W::kanMX4</i> ; <i>MET15</i> ; <i>LYS2</i> ; <i>ura3Δ0</i> (mit <i>oxa1-W128F-FLAG</i> -Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>Δoxa1</i> (BY4743 heterozygot) + <i>OXA1-W128F-FLAG</i>	<i>MATa/MATa</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0/MET15</i> ; <i>LYS2/lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>YER154W/YER154W::kanMX4</i> (mit <i>oxa1-W128F-FLAG</i> -Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>Δoxa1</i> (für SILAC) + <i>OXA1-FLAG</i>	basiert auf BY4743; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>MET15</i> ; <i>YHR018C::natMX</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>YER154W::kanMX4</i> (mit <i>OXA1-FLAG</i> -Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>natMX</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit

Stamm (Hintergrund)	Genotyp (Kommentar)	Marker	Herkunft
<i>Δoxa1</i> (für SILAC) + <i>oxa1-W128F-FLAG</i>	basiert auf <i>BY4743</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>MET15</i> ; <i>YHR018C::natMX</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>YER154W::kanMX4</i> (mit <i>oxa1-W128F-FLAG</i> -Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>natMX</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>Δoxa1</i> (für Mikroskopie) + <i>OXA1-GFP</i>	basiert auf <i>BY4743</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YER154W::kanMX4</i> (mit <i>OXA1-GFP</i> -Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>Δoxa1</i> (für Mikroskopie) + <i>oxa1-W128F-GFP</i>	basiert auf <i>BY4743</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>YER154W::kanMX4</i> ; <i>ura3Δ0</i> (mit <i>oxa1-W128F-GFP</i> -Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>Δpnt1</i> (YKODC)	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YOR266W::kanMX4</i> (genomische Deletion von <i>PNT1</i>)	<i>kanMX4</i>	Biocat (Heidelberg, Deutschland)
<i>Δpnt1</i> (YKODC) + <i>PNT1-GFP</i>	Genotyp wie <i>Δpnt1</i> (YKODC) (mit <i>PNT1-GFP</i> -Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741)	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>QCR2:mRFP-loxP</i> (<i>Qcr2-mRFP</i> -Epitop-Markierung)	-	S. Stoldt (MPIBPC, Göttingen)
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>MBA1-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>MBA1-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1¹⁻²⁷⁷-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1¹⁻²⁷⁷-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1¹⁻²⁷⁶-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1¹⁻²⁷⁶-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1¹⁻²⁷⁵-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1¹⁻²⁷⁵-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1¹⁻²⁷⁴-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1¹⁻²⁷⁴-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1¹⁻²⁷³-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1¹⁻²⁷³-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1¹⁻²⁷²-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1¹⁻²⁷²-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-S278A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-S278A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-P277A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-P277A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-P276A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-P276A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-L275A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-L275A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-R274A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-R274A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-Y273A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-Y273A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-I272A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-I272A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-D271A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-D271A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-G270A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-G270A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit
<i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) + <i>mba1-N269A-GFP</i>	Genotyp wie <i>QCR2-mRFP</i> (BY4741) (mit <i>mba1-N269A-GFP</i> -Plasmid)	<i>URA3</i>	diese Arbeit

Stamm (Hintergrund)	Genotyp (Kommentar)	Marker	Herkunft
QCR2-mRFP (BY4741) + mba1-V268A-GFP	Genotyp wie QCR2-mRFP (BY4741) (mit mba1-V268A-GFP-Plasmid)	URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (YKODC)	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR185C::kanMX4 (genomische Deletion von MBA1)	kanMX4	Biocat (Heidelberg, Deutschland)
$\Delta mba1$ (YKODC) + Vektor1	Genotyp wie $\Delta mba1$ (YKODC) (mit leerem Vektor1)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (YKODC) + MBA1-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (YKODC) (mit MBA1-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (YKODC) + mba1 ¹⁻²⁷⁷ -GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (YKODC) (mit mba1 ¹⁻²⁷⁷ -GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (YKODC) + mba1 ¹⁻²⁷⁶ -GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (YKODC) (mit mba1 ¹⁻²⁷⁶ -GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (YKODC) + mba1 ¹⁻²⁷⁵ -GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (YKODC) (mit mba1 ¹⁻²⁷⁵ -GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (YKODC) + mba1 ¹⁻²⁷⁴ -GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (YKODC) (mit mba1 ¹⁻²⁷⁴ -GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (YKODC) + mba1 ¹⁻²⁷³ -GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (YKODC) (mit mba1 ¹⁻²⁷³ -GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (YKODC) + mba1 ¹⁻²⁷² -GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (YKODC) (mit mba1 ¹⁻²⁷² -GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741)	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR185C::kanMX4 (genomische Deletion von MBA1)	kanMX4	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + Vektor1	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit leerem Vektor1)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + MBA1-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit MBA1-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1 ¹⁻²⁷⁵ -GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1 ¹⁻²⁷⁵ -GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1 ¹⁻²⁷³ -GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1 ¹⁻²⁷³ -GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1-S278A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1-S278A-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1-P277A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1-P277A-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1-P276A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1-P276A-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1-L275A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1-L275A-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1-R274A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1-R274A-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1-Y273A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1-Y273A-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1-I272A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1-I272A-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + mba1-D271A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit mba1-D271A-GFP-Plasmid)	kanMX4; URA3	diese Arbeit

Stamm (Hintergrund)	Genotyp (Kommentar)	Marker	Herkunft
$\Delta mba1$ (BY4741) + <i>mba1</i> -G270A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit <i>mba1</i> -G270A-GFP-Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + <i>mba1</i> -N269A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit <i>mba1</i> -N269A-GFP-Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + <i>mba1</i> -V268A-GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit <i>mba1</i> -V268A-GFP-Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + pVT100U- <i>mt</i> -GFP	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit <i>Matrix</i> -GFP-Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + Vektor2	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit leerem Vektor2)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + <i>MBA1</i> -FLAG	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit <i>MBA1</i> -FLAG-Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + <i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁵ -FLAG	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit <i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁵ -FLAG-Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + <i>mba1</i> ¹⁻²⁷³ -FLAG	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit <i>mba1</i> ¹⁻²⁷³ -FLAG-Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (BY4741) + <i>mba1</i> -I272A-FLAG	Genotyp wie $\Delta mba1$ (BY4741) (mit <i>mba1</i> -I272A-FLAG-Plasmid)	<i>kanMX4</i> ; <i>URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta mba1$ (YPH499)	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> - Δ 200; <i>leu2</i> - Δ 1; <i>trp1</i> - Δ 63; <i>lys2</i> -801 ^{amber} ; <i>ade2</i> -101 ^{ochre} ; <i>ura3</i> -52; <i>YBR185C</i> :: <i>HIS3MX6</i> (genomische Deletion von <i>MBA1</i>)	<i>HIS3MX6</i>	P. Rehling (Universität Göttingen, Deutschland)

3.1.7.1 Materialien für die standardmäßige Kultivierung von Hefezellen

Alle Nährmedien für die Kultivierung von *S. cerevisiae* enthielten als einzige Kohlenstoffquellen 2 % (w/v) Glukose, Galaktose oder Laktat. Die jeweiligen Komponenten der in Tabelle 3.9 aufgeführten Medien wurden alle zusammen eingewogen, in Wasser gelöst und autoklaviert. Um entsprechende Agarplatten herzustellen wurde der pH-Wert mit einem pH-Meter (Modell PB-11; Sartorius, Göttingen, Deutschland) auf 6 - 6,4 eingestellt und 2 % (w/v) Agar zugegeben.

Zur spezifischen Selektion auf Plasmide, die Selektionsmarkergene wie *URA3* enthielten, wurden Mangelmedien (SC-Medien) mit Aminosäure-Gemischen eingesetzt, bei denen die entsprechende Aminosäure fehlte (Tab. 3.10). Um auf die stabil ins Hefe-Genom integrierte Resistenzkassette *kanMX4* bzw. *natMX* zu selektieren, wurde dem Hefemedium das Antibiotikum Geneticin (G418) bzw. Nourseothricin (clonNAT) in einer finalen Konzentration von 50 µg/ml zugegeben.

Tab. 3.9: Verwendete Wachstumsmedien für die standardmäßige Kultivierung von Hefezellen

Hefemedium	Komponenten
YP-Glukose	10 g/l Hefe-Extrakt; 20 g/l Pepton; 20 g/l Glukose; 20 mg/l Adeninsulfat; 20 mg/l Uracil
YP-Galaktose	10 g/l Hefe-Extrakt; 20 g/l Pepton; 20 g/l Galaktose; 20 mg/l Adeninsulfat; 20 mg/l Uracil
PM-Glukose	1,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, <i>Yeast Nitrogen Base</i>); 5 g/l Trypton (ohne Uracil); 5 g/l Ammoniumsulfat; 20 g/l Glukose; 20 mg/l Adeninsulfat

Hefemedium	Komponenten
PM-Galaktose	1,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, <i>Yeast Nitrogen Base</i>); 5 g/l Trypton (ohne Uracil); 5 g/l Ammoniumsulfat; 20 g/l Galaktose; 20 mg/l Adeninsulfat
PM-Laktat	1,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, <i>Yeast Nitrogen Base</i>); 5 g/l Trypton (ohne Uracil); 5 g/l Ammoniumsulfat; 20 g/l Milchsäure; 20 mg/l Adeninsulfat
SC-Glukose -Ura	1,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, <i>Yeast Nitrogen Base</i>); 5 g/l Ammoniumsulfat; 20 g/l Glukose; 2 g/l Aminosäure-Gemisch (ohne Uracil)
SC-Glukose -Lys	1,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, <i>Yeast Nitrogen Base</i>); 5 g/l Ammoniumsulfat; 20 g/l Glukose; 2 g/l Aminosäure-Gemisch (ohne Lysin)
SC-Glukose -Arg	1,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, <i>Yeast Nitrogen Base</i>); 5 g/l Ammoniumsulfat; 20 g/l Glukose; 2 g/l Aminosäure-Gemisch (ohne Arginin)
SC-Laktat -Ura	1,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, <i>Yeast Nitrogen Base</i>); 5 g/l Ammoniumsulfat; 20 g/l Milchsäure; 2 g/l Aminosäure-Gemisch (ohne Uracil)

Tab. 3.10: Auflistung der 24 Komponenten, die für spezifische Aminosäure-Gemische für die Herstellung von Mangelmedien zur Verfügung stehen

Aminosäure	Menge	Aminosäure	Menge	Aminosäure	Menge
Adenin	0,5 g	Glycin	2,0 g	Phenylalanin	2,0 g
Alanin	2,0 g	Histidin	2,0 g	Prolin	2,0 g
Arginin	2,0 g	Inositol	2,0 g	Serin	2,0 g
Asparagin	2,0 g	Isoleucin	2,0 g	Threonin	2,0 g
Asparaginsäure	2,0 g	Leucin	4,0 g	Tryptophan	2,0 g
Cystein	2,0 g	Lysin	2,0 g	Tyrosin	2,0 g
Glutamin	2,0 g	Methionin	2,0 g	Uracil	2,0 g
Glutaminsäure	2,0 g	para-Aminobenzoesäure	0,2 g	Valin	2,0 g

3.1.7.2 Materialien für die Kultivierung von Hefezellen für SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture*)

Für SILAC wurden den in Tabelle 3.11 aufgeführten Basiskulturmedien verschiedene Aminosäure-Gemische zugesetzt, die Lysin und Arginin enthielten, welche mit unterschiedlich schweren und nicht-radioaktiven Kohlenstoff- und Stickstoffisotopen markiert waren (Tab. 3.12).

Für 50 ml einer Hefekultur für SILAC wurden 48,5 ml Basiskulturmedium, 1,5 ml Aminosäure-Gemisch und 50 µg/ml Ampicillin frisch und steril gemischt.

Tab. 3.11: Verwendete Basiskulturmedien für SILAC

Basishefemedium	Komponenten
Basisglukosemedium	1,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (Stickstoff-Basis); 5 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 g/l Glukose
Basisgalaktosemedium	1,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (Stickstoff-Basis); 5 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 g/l Galaktose
Basislaktatmedium	1,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (Stickstoff-Basis); 5 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 g/l Milchsäure

Tab. 3.12: Zusammensetzung der Aminosäure-Gemische mit unterschiedlichen Isotopen für SILAC

Aminosäure-Gemisch 1 (leichte Isotope)	Menge	Aminosäure-Gemisch 2 (schwere Isotope)	Menge
Adenin (leicht)	66,8 mg / 100 ml	Adenin (leicht)	66,8 mg / 100 ml
Histidin (leicht)	66,8 mg / 100 ml	Histidin (leicht)	66,8 mg / 100 ml
Methionin (leicht)	66,8 mg / 100 ml	Methionin (leicht)	66,8 mg / 100 ml
Tryptophan (leicht)	66,8 mg / 100 ml	Tryptophan (leicht)	66,8 mg / 100 ml
Isoleucin (leicht)	100,0 mg / 100 ml	Isoleucin (leicht)	100,0 mg / 100 ml
Tyrosin (leicht)	100,0 mg / 100 ml	Tyrosin (leicht)	100,0 mg / 100 ml
Phenylalanin (leicht)	166,8 mg / 100 ml	Phenylalanin (leicht)	166,8 mg / 100 ml
Leucin (leicht)	333,2 mg / 100 ml	Leucin (leicht)	333,2 mg / 100 ml
Valin (leicht)	500,0 mg / 100 ml	Valin (leicht)	500,0 mg / 100 ml
Prolin (leicht)	666,8 mg / 100 ml	Prolin (leicht)	666,8 mg / 100 ml
Threonin (leicht)	666,8 mg / 100 ml	Threonin (leicht)	666,8 mg / 100 ml
¹² C ₆ ¹⁴ N ₄ -Arginin (leicht)	75,0 mg / 100 ml	¹³ C ₆ ¹⁵ N ₄ -Arginin (schwer)	77,5 mg / 100 ml
¹² C ₆ ¹⁴ N ₂ -Lysin (leicht)	60,0 mg / 100 ml	¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂ -Lysin (schwer)	75,0 mg / 100 ml

3.1.8 Elektronische Datenverarbeitung

Zur Darstellung und Bearbeitung von mikroskopischen Daten wurden die Programme Leica Confocal Software, LAS AF (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), ImageJ (V1.47f; W. Rasband, National Institutes of Health, USA), Inspector Image Aquisition & Analysis Software (V0.10; Andreas Schönle; Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) und Adobe Photoshop sowie Adobe Illustrator (CS3; Adobe, San Jose, CA, USA) verwendet. Diese Programme kamen teilweise auch bei den Aufarbeitungen sowie den quantitativen Auswertungen von Western Analysen zum Einsatz.

Die Daten der massenspektrometrischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der Suchmaschine Mascot Daemon (Version 2.4.0; Matrix Science, Boston, MA, USA) und der Programme Scaffold Viewer (V4.3.0; Proteome Software, Portland, OR, USA) und MaxQuant (V1.3.0.5; (Cox & Mann, 2008); Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) sowie der Software R (R-Development-Core-Team, 2011) ausgewertet.

Das Programm Microsoft Excel (Microsoft Office 2010; Microsoft, Redmond, WA, USA) wurde für die statistische Datenauswertung eingesetzt.

Für die Plasmid- und Primerkonstruktion sowie die Analyse von DNS-Sequenzierungen wurde das Programm Vector NTI (V11.5; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

DNS-Konzentrationsmessungen wurden am NanoDrop 1000 Spectrophotometer mit der Software NanoDrop 1000 (V3.8.0; PEQLAB Biotechnologie; Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

Die verwendeten Datenbanken und Internet-Tools, mit denen die Daten aus Genbanken für Recherchen und Analysen prozessiert wurden, sind in Tabelle 3.13 aufgelistet.

Tab. 3.13: Datenbanken und Internet-Tools

Name	Beschreibung	Webseite (Betreiber)
<i>Saccharomyces Genome Database (SGD)</i>	Datenbank mit Informationen zu <i>S. cerevisiae</i> -Proteinen und -Genen	http://www.yeastgenome.org/ (Universität Stanford, CA, USA)
<i>Yeast GFP Fusion Localization Database</i>	Datenbank zur Lokalisationsanalyse von <i>S. cerevisiae</i> -Proteinen	http://yeastgfp.yeastgenome.org/ (SGD; Universität Stanford, CA, USA)
<i>Saccharomyces Genome Deletion Project</i>	Datenbank mit Informationen zu <i>S. cerevisiae</i> -Deletionsstämmen	http://yeastdeletion.stanford.edu/ (Universität Stanford, CA, USA)
<i>Universal Protein Resource (UniProt)</i> (Version vom November 2012)	Datenbank mit Informationen zu Proteinen und Proteinsequenzen; wurde zur Analyse von massenspektrometrischen Daten verwendet	http://www.uniprot.org/ (Kooperation des EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute), SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) und PIR (Protein Information Resource))
<i>Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)</i>	Programm zum Nukleotid- oder Proteinsequenzvergleich (Ableitung von funktionellen oder evolutionären Beziehungen von Sequenzen)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (National Library of Medicine (NLM); Bethesda, MD, USA)
<i>SIB ExPASy Bioinformatics Resources Portal</i>	Sammlung von Datenbanken und webbasierten Programmen, zum Beispiel „ClustalW“ zum Vergleich von Aminosäuresequenzen	http://www.expasy.org/ (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB); Lausanne, Schweiz)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion zur Vervielfältigung von DNS

In der vorliegenden Arbeit wurden bestimmte Abschnitte eines DNS-Doppelstrangs spezifisch mit Hilfe der PCR (*Polymerase chain reaction*) amplifiziert (Mullis *et al.*, 1986).

In der PCR eingesetzte DNS-Oligonukleotide (Tab. 3.6) sind zu bestimmten Sequenzabschnitten der DNS-Matrize komplementär und dienen als sogenannte Primer. Sie lagern sich bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 - 70 °C an einen der DNS-Doppelstränge an, nachdem diese durch Aufschmelzen bei 95 °C voneinander getrennt wurden. Eine thermostabile DNS-Polymerase lagert sich wiederum an die 3'-OH-Enden der DNS-Oligonukleotide (Primer) an und synthetisiert von dort ausgehend in 3'-Richtung zur Matrize komplementäre DNS-Sequenzen. Dieser Zyklus, bestehend aus Doppelstrang-Trennung (Denaturierung), Primer-Hybridisierung (Annealing) und DNS-Synthese (Elongation), wird mehrfach wiederholt, so dass am Ende Millionen Kopien des gewünschten DNS-Abschnittes vorliegen.

Anzupassende Parameter sind die von der Sequenz des DNS-Oligonukleotids abhängige Primer-Hybridisierungstemperatur oder die Dauer des Elongationsschrittes, welche sowohl von der Länge des zu amplifizierenden Genabschnittes, als auch der verwendeten DNS-Polymerase abhängig ist. In dieser Arbeit wurden die Taq- und die Pfu-Polymerase verwendet. Sie unterscheiden sich in Geschwindigkeit und Fehlerquote bei der Polymerisation. Die Pfu-Polymerase synthetisiert zwar nur ~ 500 Basenpaare pro Minute, wurde aber wegen ihrer höheren Genauigkeit für die Vervielfältigung

von spezifischen DNS-Abschnitten, die für die Deletion von *MBA1* oder *ARG4* im Hefe-Genom oder die Erstellung der genetisch veränderten Varianten von *MBA1* notwendig waren, eingesetzt. Für analytische Nachweise oder das PCR-Produkt für die Deletion von *MDM10* wurde die schnellere Taq-Polymerase verwendet, welche ~ 1000 Basenpaare pro Minute synthetisiert.

Tabelle 3.14 zeigt beispielhaft jeweils einen Ansatz und ein Amplifikationsprogramm für jede der zwei DNS-Polymerasen. Die Reaktionsansätze wurden einzeln auf Eis pipettiert und direkt in die PCR-Maschine (T-Personal oder T-Gradient, Biometra, Göttingen, Deutschland) hineingesetzt.

Tab. 3.14: Beispiele für Reaktionsansätze und Amplifikationsprogramme

Reaktionsansatz für die Taq-Polymerase	PCR-Programm für Taq-Polymerase	Reaktionsansatz für die Pfu-Polymerase	PCR-Programm für Pfu-Polymerase
0,5 µg Template	95 °C 300 sek 95 °C 120 sek 55 °C 120 sek 72 °C 240 sek 72 °C 600 sek	0,5 µg Template	95 °C 300 sek 95 °C 120 sek 55 °C 120 sek 68 °C 510 sek 68 °C 600 sek
1 µl 10 µM Vorwärtsprimer		1 µl 10 µM Vorwärtsprimer	
1 µl 10 µM Rückwärtsprimer		1 µl 10 µM Rückwärtsprimer	
1 µl 12,5 mM dNTPs		1 µl 12,5 mM dNTPs	
1 µl DMSO (optional)		1 µl DMSO (optional)	
10 µl 5xPolymerasepuffer		5 µl 10xPolymerasepuffer	
0,5 µl Taq-Polymerase		1 µl Pfu-Polymerase	
ad 50 µl mit Wasser	ad 50 µl mit Wasser		

3.2.2 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNS

Die horizontale Agarosegel-Elektrophorese dient der analytischen und präparativen Auftrennung von DNS-Fragmenten. Diese lassen sich aufgrund ihrer negativen Ladung durch das Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Agarosegel voneinander trennen, wobei kleinere DNS-Fragmente sich schneller durch die Poren der Gelmatrix bewegen als größere DNS-Fragmente (Louderback *et al.*, 1970).

Je nach Fragmentgröße wurden ein- bis zweiprozentige Gele verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA; pH 7,2 – 7,5) mittels Erhitzen gelöst und in eine Elektrophoresekammer der Werkstatt des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie (Göttingen, Deutschland) zur Aushärtung überführt. Um die Geltaschen zu beladen, wurden die DNS-Proben mit DNS-Auftragspuffer (6xAuftragspuffer: 10 mM Tris/HCl; 60 % (w/v) Glycerin; 0,03 % (w/v) Bromphenolblau; 0,03 % (w/v) Xylencyanol; 60 mM EDTA; pH 7,6) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 70 - 100 Volt (Power Pack P24, Biometra, Göttingen, Deutschland). Rückschlüsse auf die Länge der erhaltenen DNS-Fragmente ermöglichte der mitgeführte DNS-Größenstandard „Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder“.

Um die aufgetrennten DNS-Moleküle im Gel zu visualisieren, wurde dieses nach der Elektrophorese für 10 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (3 mg/l) gefärbt (LePecq & Paoletti, 1967). Im Anschluss konnten die DNS-Banden unter Verwendung des Illuminators Intas Gel Jet Imager (INTAS UV-Systeme, Göttingen, Deutschland) bei 312 nm detektiert und dokumentiert werden.

3.2.3 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen

Für die Isolierung spezifischer DNS-Fragmente aus präparativen Agarosegelen wurden die gewünschten DNS-Banden mit Hilfe des Illuminators identifiziert, mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mittels des „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ nach Herstellerangaben extrahiert.

3.2.4 Aufreinigung von DNS aus Lösungen

Um unerwünschte Substanzen wie Salze, Proteine und weitere Verunreinigungen zu entfernen, wurden die verwendeten DNS-Proben entweder mit Hilfe des „*QIAquick PCR Purification Kit*“ nach Herstellerangaben oder mittels einer Ethanolpräzipitation aufgereinigt. Für die Präzipitation mit Ethanol wurde die DNS-Probe mit absolutem Ethanol (achtfaches Volumen) versetzt und 30 min bei -80 °C ausgefällt. Nach einer Zentrifugation (10 min, 15700 x g, 4 °C) wurde das Sediment mit Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen und weitere 5 min bei 15700 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde die DNS getrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert.

Eine weitere Alternative zur Entsalzung von Nukleinsäuren bot die Dialyse. Hierzu wurde die DNS-Lösung auf ein Dialyse-Plättchen getropft (MF-Millipore Membrane Filter; Millipore, Billerica, MA, USA) und 30 - 45 min gegen entionisiertes Wasser dialysiert.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) durch die Messung der Extinktion. Dabei entspricht nach dem Lambert-Beer-Gesetz ein Absorptionswert von 1,0 bei 260 nm einer Konzentration von 50 ng/µl. Neben der DNS-Konzentration wurde auch der Reinheitsgrad der DNS über das Verhältnis A_{260}/A_{280} angezeigt, wobei der Quotient einer sauberen Probe bei 1,8 - 2,2 liegen sollte. Eine Verringerung des Wertes weist auf eine Kontamination mit Protein oder Phenol hin (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.6 Restriktion von DNS

Restriktionsendonukleasen spielen bei der Erzeugung von DNS-Fragmenten für anschließende Klonierungen eine wichtige Rolle, da sie eine spezifische Basensequenz der DNS-Doppelhelix erkennen und den Doppelstrang an dieser Stelle schneiden. So entstehen je nach verwendetem Restriktionsenzym bündige Enden (*blunt ends*) oder versetzte komplementäre, einzelsträngige „klebrige“ Enden (*sticky ends*) (Meselson *et al.*, 1972; Nathans & Smith, 1975; Arber, 1978).

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden stets mit den auf die Enzyme abgestimmten Pufferlösungen unter den empfohlenen Reaktionsbedingungen des Herstellers eingesetzt, wobei es teilweise notwendig war, BSA zur Reaktion hinzuzufügen.

Für analytische Zwecke wurden 2 - 4 µg DNS mit 5 - 10 Einheiten eines Restriktionsenzym in einem 20 µl-Reaktionsansatz verdaut. Im Falle eines präparativen Verdaus wurden 15 - 20 µg DNS mit 10 - 20 Einheiten eines Restriktionsenzym in einem 40 µl-Reaktionsansatz eingesetzt. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte meist bei 37 °C für 2 - 4 h oder über Nacht.

3.2.7 Dephosphorylierung von DNS

Um eine unerwünschte Rezirkularisierung eines linearisierten Vektors zu vermeiden, wurden die Vektorfragmente nach der Restriktion mit Hilfe der CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) dephosphoryliert. Hierzu erfolgte nach Herstellerangaben eine 30- bis 60-minütige Inkubation des Enzyms im mitgelieferten Dephosphorylierungspuffer mit der zu dephosphorylierenden DNS bei 37 °C. Im Anschluss wurde das Enzym durch eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C deaktiviert.

3.2.8 Ligation von DNS

Für die Erzeugung der Expressionsplasmide katalysierte die T4-DNS-Ligase eine Verknüpfung der linearisierten und dephosphorylierten Vektor-DNS mit der ebenfalls geschnittenen Insert-DNS.

Für eine typische Ligation sollte die Vektor-DNS zur Insert-DNS in einem molaren Verhältnis von 1:3 vorliegen. Der hierfür verwendete Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl enthielt ca. 100 ng Vektor-DNS, einen dreifachen molaren Überschuss an Insert-DNS, 1 µl 10xLigationspuffer und 1 µl T4-DNS-Ligase (5 Einheiten/µl). Die Ligation erfolgte für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Darauf folgte die Inaktivierung der Ligase bei 65 °C für 10 min und die Aufreinigung des Ligationsansatzes über eine 45-minütige Dialyse mit einem Membranfilter.

3.2.9 Aufkonzentrierung von DNS in Lösungen

Eine Reduktion des Volumens von DNS-enhaltenden Flüssigkeiten wurde mittels Vakuumverdampfung unter Verwendung der Speed Vac SC 100 (Savant, Holbrook, NY, USA) durchgeführt.

3.2.10 Sequenzierung von DNS

Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde ein Reaktionsansatz von 7 µl eingeschickt, der 700 ng DNS und 20 pmol Primer beinhaltete.

3.3 Bakterien-spezifische Methoden

3.3.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Standardmäßig wurden *E. coli*-Kulturen bei 37 °C entweder in flüssigem LB-Medium in einem Schüttelinkubator (150 Upm; Modell Innova 44; New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland) oder auf LB-Agarplatten in einem Brutschrank (Modell Function Line; Heraeus, Hanau, Deutschland) angezogen. Für die Kryokonservierung bestimmter Bakterienklone wurden 500 µl einer Flüssigkultur mit 600 µl sterilem Glycerin (80 % (v/v)) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter DH5α-Zellen (Dower *et al.*, 1988) wurden 500 ml einer *E. coli*-Flüssigkultur in die logarithmische Wachstumsphase ($OD_{600} \sim 0,6$) gebracht, 30 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4 °C in einer Superspeed-Zentrifuge (Modell Sorvall RC 6 Plus; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sedimentiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 500 ml kaltem sterilem Wasser, 250 ml kaltem sterilem Wasser und 10 ml Glycerin (10 % (v/v)) gewaschen. Abschließend wurden die DH5α-Zellen in 1 ml Glycerin (10 % (v/v)) aufgenommen, zu je 40 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation, d.h. das Einbringen der Plasmide in *E. coli*, erfolgte über Elektroporation. Dazu wurden pro Transformation 40 µl der elektrokompetenten DH5α-Zellen auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 5 - 10 µl eines dialysierten Ligationsansatzes bzw. 50 - 100 ng Plasmid-DNS vermischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und für ca. 2 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Elektroschock unter Verwendung des Elektroporators Gene Pulser II (BioRad, München, Deutschland) mit folgenden Einstellungen: 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurde der Transformationsansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsadditiv ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.3.4 Aufreinigung von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidisolationsverfahren basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien, der Entfernung der zellulären RNS sowie der genomischen DNS (Birnboim & Doly, 1979). Für die Plasmidpräparation wurden die Reagenzien des „*QIAprep Spin Miniprep Kits*“ oder „*QIAprep Spin Midiprep Kits*“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

3.3.4.1 Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)

Für eine Mini-Präparation wurde ausgehend von einer Einzelkolonie eine Flüssigkultur in Selektivmedium über Nacht bei 37 °C und 150 Upm angezogen. Von dieser *E. coli*-Kultur wurden 2 ml in einer Tischzentrifuge (Modell Biofuge Fresco Refrigerating Centrifuge; Heraeus, Hanau, Deutschland) abzentrifugiert (5 min, 15700 x g), der Überstand verworfen und die restlichen 2 ml im selben Reaktionsgefäß abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 250 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; pH 8,0) aufgenommen. Danach erfolgte die Lyse durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer (200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS), die nach einer kurzen Inkubation durch das Hinzufügen von 350 µl Neutralisationspuffer (2,8 M Kaliumacetat; pH 5,1) abgestoppt wurde. Diese Lösung wurde kurz gevortext, für 5 min bei -20 °C inkubiert und schließlich für 15 min bei 15700 x g und 4 °C zentrifugiert, was zur Sedimentation der gefällten Proteine, der chromosomalen DNS sowie der Zelltrümmer führte. Der Überstand, in dem sich die Plasmid-DNS befand, wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 800 µl eiskaltem absolutem Ethanol vermischt und für 30 min bei -80 °C zum Fällern der DNS inkubiert. Diese wurde über Zentrifugation (25 min, 15700 x g, 4 °C) sedimentiert, mit 250 µl eiskaltem Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 15700 x g, 4 °C). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das DNS-Pellet im Thermomixer (Modell Comfort; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 37 °C getrocknet, in 50 µl Wasser gelöst und abschließend die Konzentration der Plasmid-DNS (siehe Kapitel 3.2.5) bestimmt.

3.3.4.2 Plasmid-Präparation im großen Maßstab (Midi-Präparation)

Eine Übernachtskultur wurde für 15 min bei 4 °C in einer Superspeed-Zentrifuge (Modell Sorvall RC 6 Plus; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sedimentiert und das Zellsediment mit dem „QIAprep Spin Midiprep Kit“ entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet.

3.4 Hefe-spezifische Methoden

3.4.1 Standardmäßige Kultivierung von *S. cerevisiae*-Zellen

Die Kultivierung von *S. cerevisiae*-Zellen fand typischerweise bei 30 °C statt, aber die Wachstumstemperatur wurde stets den Analysen entsprechend angepasst. Die Anzucht erfolgte entweder auf den für Hefe spezifischen Agarplatten im Brutschrank (Modell Function Line; Heraeus, Hanau, Deutschland) oder in flüssigen Hefemedien bei 150 Upm im Schüttelinkubator (Modell Innova 44; New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland). Für die Herstellung von Dauerkulturen der erzeugten Hefestämme wurden 500 µl einer Flüssigkultur mit 600 µl sterilem Glycerin (80 % (v/v)) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.4.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*-Zellen für SILAC

SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture*) ist eine Methode der Zellkultivierung, die in Verbindung mit einer massenspektrometrischen Analyse (siehe Kapitel 3.8) einen quantitativen Vergleich der Proteome zweier Proben ermöglicht (de Godoy *et al.*, 2006; Ong & Mann, 2006). Dazu werden zwei zu vergleichende Zellkulturen parallel kultiviert, wobei die erste Kultur in einem Medium mit normalen „leichten“ Aminosäuren und die zweite Kultur in einem Medium mit „schweren“ Aminosäuren inkubiert wird. Bei diesen handelt es sich typischerweise um schwere, aber nicht-radioaktive Varianten der beiden Aminosäuren Arginin und Lysin, die sich sehr gut für die Massenspektrometrie eignen, da die in der Probenvorbereitung eingesetzte Protease Trypsin stets hinter diesen Aminosäuren schneidet (siehe Kapitel 3.8.1). Somit wird sichergestellt, dass nur Peptide entstehen, die mindestens einmal mit „leichten“ bzw. „schweren“ Isotopen markiert sind. Durch den Einbau der schweren Aminosäuren in die Proteine kommt es im Vergleich zu den normalen Aminosäuren zu einer bekannten Gewichtsveränderung der Peptide, die nach Mischen der beiden zu vergleichenden Proteinproben mit Hilfe eines Massenspektrometers detektiert (siehe Kapitel 3.8.3) und mit entsprechender Software quantifiziert werden kann (siehe Kapitel 3.8.4.1).

In dieser Arbeit wurden für die SILAC-basierten Analysen ausschließlich Hefestämme verwendet, die in ihrem Genom eine Deletion von *ARG4* sowie *LYS2* trugen, so dass die Aminosäuren Arginin und Lysin stets aus dem Medium aufgenommen werden mussten. Im Fall der schweren Aminosäurevarianten wurde so bereits nach 5 - 6 Zellteilungszyklen eine fast vollständige Markierung aller neu synthetisierten Proteine mit schweren Isotopen gewährleistet.

Die im Rahmen dieser Arbeit zu vergleichenden Hefestämme trugen neben einer genomischen Deletion von *OXA1*, *ARG4* und *LYS2* ein Plasmid, das entweder für *OXA1-FLAG* oder *oxa1-WI28F-FLAG* kodierte, und wurden parallel in den für SILAC spezifischen Flüssigmedien (siehe Kapitel 3.1.7.2) bei 30 °C in einem Schüttelinkubator kultiviert. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Analysen durchgeführt. So wurde für die Vorwärtsanalyse (VA) der Δ *oxa1*-Stamm (*für SILAC*) mit *OXA1-FLAG*-Plasmid in Medium inkubiert, das leicht markiertes Arginin sowie Lysin beinhaltete, und der Δ *oxa1*-Stamm (*für SILAC*) mit *oxa1-WI28F-FLAG*-Plasmid in Medium, das Arginin und Lysin enthielt, die mit schweren Kohlenstoff- und Stickstoffisotopen markiert waren. In der Rückwärtsanalyse (RA) erfolgte die Kultivierung dann umgekehrt. Nachdem die Hefestämme eine OD₆₀₀ von ~ 2 erreicht hatten, wurden ihre Mitochondrien präpariert (siehe Kapitel 3.5.2) und für Koimmunopräzipitationen (siehe Kapitel 3.5.7.1) eingesetzt. In der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse (siehe Kapitel 3.8) konnten die Peptide der *OXA1-FLAG* exprimierenden Hefezellen schließlich quantitativ mit denen der *oxa1-WI28F-FLAG* exprimierenden Hefen verglichen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl jede SILAC-basierte Vorwärtsanalyse als auch jede SILAC-basierte Rückwärtsanalyse dreimal durchgeführt.

3.4.3 Elektrotransformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Für die Transformation mittels Elektroporation wurden die *S. cerevisiae*-Zellen in 50 ml flüssigem Glukosemedium bei 30 °C geschüttelt bis sie die logarithmische Wachstumsphase (OD₆₀₀ 0,8 - 1,2) erreicht hatten. Dieser Zeitpunkt wurde mit der Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers (Modell BioPhotometer; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ermittelt.

Für die stabile Integration von DNS-Fragmenten in das Hefe-Genom (siehe Kapitel 3.4.4) mussten die Zellen mit Lithiumacetatlösung (100 mM Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5) vorbehandelt werden (Becker & Guarente, 1991), was bei der Transformation mit Plasmiden (Tab. 3.7) entfällt. Für die Lithiumacetat-Behandlung wurden die Hefezellen für 3 min bei 1600 x g und RT sedimentiert (Modell Heraeus Megafuge 16; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und in 8,5 ml Lithiumacetatlösung aufgenommen, woraufhin eine 45-minütige Inkubation bei 30 °C unter Schütteln folgte. Anschließend wurden sie mit 210 µl 1 M DTT versetzt und für weitere 15 min bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nachdem die Zellen dreimal mit eiskaltem sterilem Wasser und einmal mit einer eiskalten sterilen 1 M Sorbitollösung gewaschen wurden, wurden sie in 200 µl 1 M Sorbitol resuspendiert. Pro Transformation wurden 40 µl der elektrokompetenten *S. cerevisiae*-Zellen vorsichtig mit 2 µl Plasmid-DNS oder 5 µl PCR-Produkt vermischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte unter Verwendung des Elektroporators Gene Pulser II (BioRad, München, Deutschland) mit folgenden Einstellungen: 1,5 kV, 25 µF, 200 Ω. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde der Transformationsansatz mit 1 ml 1 M Sorbitol versetzt.

Zur spezifischen Selektion auf erfolgreich mit Plasmid-DNS transformierte Hefezellen wurde der gesamte Transformationsansatz sofort nach der Elektroporation auf den dem Markergen (zum Beispiel *URA3*) entsprechenden Selektionsagarplatten (siehe Kapitel 3.1.7.1) ausplattiert.

Für die Ausbildung einer Antibiotika-Resistenz, die bei einer stabilen DNS-Integration in das Hefe-Genom (siehe Kapitel 3.4.4) notwendig war, wurden dem Transformationsansatz noch 3 ml YP-Glukosemedium hinzugefügt und die transformierten Zellen für 4 h bei 30 °C im Inkubator geschüttelt. Danach wurde der gesamte Ansatz auf Agarplatten mit dem der Resistenzkassette entsprechenden Antibiotikum (z. B. G418 bei der *kanMX4*-Kassette) ausplattiert und bei 30 °C im Brutschrank für 4 Tage inkubiert, bis sich Einzelkolonien für weitere Analysen ausgebildet hatten.

3.4.4 Gerichtete Integration von DNS in das Hefe-Genom

Um Gene im Genom von *S. cerevisiae* spezifisch zu deletieren (Hegemann *et al.*, 2006) wurde eine zu integrierende DNS-Sequenz mittels PCR (siehe Kapitel 3.2.1) entweder auf isolierter genomischer Hefe-DNS (siehe Kapitel 3.4.5) oder auf einem Plasmid (Tab. 3.7) amplifiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das PCR-Produkt an seinem 5'- und 3'-Ende jeweils eine Sequenz enthielt, die 200 - 400 Basenpaare lang war und zu je einer der beiden das Zielgen flankierenden Regionen

homolog war, da für die stabile Integration von DNS-Sequenzen in das Hefe-Genom die natürlich vorkommende homologe Rekombination (Szostak *et al.*, 1983; Rothstein, 1984) genutzt wurde. Um den Erfolg der Integration in das Zielgenom zu überprüfen, wurde eine Resistenzkassette (*kanMX4* oder *natMX*) zur Transformantenselektion in das PCR-Produkt eingefügt.

Das Plasmid pCR2.1-TOPO-*MDM10*-Knockout (Tab. 3.7) diente als PCR-Matrize für die Deletion von *MDM10*. Das dafür amplifizierte PCR-Produkt enthielt die *natMX*-Resistenzkassette und zu den beiden Bereichen, die das *MDM10*-Gen flankieren, homologe Sequenzen, wodurch eine vollständige Entfernung von *MDM10* aus dem Zielgenom sichergestellt wurde.

Zur Deletion von *MBA1* im Wildtypstamm *BY4741 WT* wurde als PCR-Matrize die isolierte genomische DNS des *Amba1*-Stammes der *YKODC* verwendet, welcher an Stelle des *MBA1*-Gens die *kanMX4*-Resistenzkassette trägt. Da das hergestellte PCR-Produkt zu den *MBA1*-Gen-flankierenden Regionen homologe Bereiche enthielt, wurde das *MBA1*-Gen vollständig mit der *kanMX4*-Resistenzkassette im *BY4741 WT*-Stamm ersetzt.

Für SILAC-basierte Analysen wurde auf den Δ *oxa1*-Stämmen (*für SILAC*), die sowohl ein Plasmid mit *OXA1-FLAG* oder *oxa1-W128F-FLAG* als auch eine genomische Deletion für *OXA1* und *LYS2* trugen, zusätzlich die Deletion von *ARG4* eingeführt. Da für den vorhandenen *OXA1*-Knockout bereits die *kanMX4*-Kassette verwendet wurde, wurde für die *ARG4*-Deletion die *natMX*-Kassette eingesetzt. Dafür wurde zunächst im Δ *arg4*-Stamm der *YKODC* die *kanMX4*- durch die *natMX*-Kassette ersetzt. Auf der genomischen DNS des neuen Stammes Δ *arg4* (*YKODC NatR*) wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, das die *natMX*-Kassette sowie homologe *ARG4*-flankierende Bereiche für die vollständige *ARG4*-Deletion auf den Ausgangsstämmen enthielt.

Die jeweils erzeugten PCR-Produkte wurden mittels Elektrottransformation (siehe Kapitel 3.4.3) in die Ausgangsstämme (Tab. 3.8) eingebracht und die Selektion positiver Transformanten erfolgte entweder mit Geneticin (G418) oder mit Nourseothricin (clonNAT).

3.4.5 Isolation chromosomaler DNS aus *S. cerevisiae*-Zellen

Die genomische DNS aus *S. cerevisiae*-Zellen wurde benötigt, um zum Beispiel bei der stabilen Integration von DNS-Fragmenten in das Hefe-Genom (siehe Kapitel 3.4.4) als PCR-Matrize zu fungieren oder um die genomischen Deletionen bestimmter Gene mittels PCR (siehe Kapitel 3.2.1) zu überprüfen. Dazu wurden die Hefezellen in 50 ml flüssigem Glukosemedium kultiviert, durch Zentrifugation sedimentiert (3 min, 1600 x g, RT) und mit 1,8 ml Wasser gewaschen. Danach wurden sie in 200 μ l gDNS-Präparationspuffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS; 2 % (v/v) Triton X-100; pH 8,0) resuspendiert, eine Spatelspitze in Salzsäure gewaschener Glasperlen sowie 200 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch 15-minütiges Vortexen. Nach der Zugabe von 200 μ l TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) folgte eine Zentrifugation (5 min, 16000 x g, RT), durch welche die Phasentrennung beschleunigt wurde. Die obere wässrige Phase

enthielt die Nukleinsäuren und wurde deshalb in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in welchem sie mit 1 ml absolutem Ethanol zur Fällung versetzt wurde. Nach mehrmaligem Invertieren wurde 2 min bei 16000 x g und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um das DNS-Sediment von noch vorhandener RNS zu befreien, wurde es in 400 µl TE-Puffer aufgenommen, 3 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Fällung der genomischen DNS erfolgte mit 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml absolutem Ethanol. Die DNS wurde für 5 min bei 16000 x g und RT pelletiert, getrocknet, in 30 µl Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.4.6 Sporulation und Tetradenanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Sporulation und Tetradenanalyse eingesetzt, um einen $\Delta oxal$ -Stamm zu erzeugen, der sowohl ein für *oxal-W128F-FLAG* kodierendes Plasmid als auch eine genomische *LYS2*-Deletion trägt. Als Ausgangsstamm diente ein heterozygoter Hefeklon mit *BY4743*-Genotyp-Hintergrund (*LYS2/lys2Δ0*), der das *oxal-W128F-FLAG*-Plasmid enthielt.

Der diploide Hefeklon wurde in flüssigem Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert und durch Zentrifugation (3 min, 1600 x g, RT) sedimentiert. Die Zellen wurden in 100 µl YP-Galaktosemedium resuspendiert, auf eine Sporulationsplatte getropft und für 2 - 6 Tage bei 30 °C inkubiert. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde analysiert, ob sich bereits Ascus mit jeweils vier Sporen gebildet hatten. Um die Sporen zu vereinzeln, musste zunächst die Ascus-Wand entfernt werden. Dazu wurde etwas vom Zellrasen abgenommen und in 20 µl Zymolyaselösung (0,5 mg/ml in 1 M Sorbitol) aufgenommen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 30 °C wurden 500 µl Wasser zugegeben und die Ansätze auf Eis versetzt. Am Rand einer YP-Glukose-Platte wurden 20 µl einer solchen Suspension strichförmig verteilt und unter Verwendung eines Mikromanipulators (Singer Instruments, Somerset, UK) wurden die Tetraden getrennt und die Sporen vereinzelt. Nach einer zwei- bis viertägigen Inkubation bei 30 °C folgte die Phänotypenanalyse der gewachsenen Kolonien. Dazu wurden sie auf Selektivmedium-agarplatten (siehe Kapitel 3.1.7.1) umgestempelt und für weitere 2 - 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Mögliche positive Klone wurden mittels PCR (siehe Kapitel 3.2.1) überprüft und ihr Paarungstyp mit dem Halo-Assay (siehe Kapitel 3.4.7) bestimmt.

3.4.7 Halo-Assay

Zur Bestimmung des Paarungstyps wurden 200 ml YP-Glukosemedium mit 2 g Agar aufgekocht und auf ca. 35 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml einer *RC 898*-Kultur (*Mat a; leu2Δ0; can1Δ0; trp5Δ0; ade2Δ0*) wurde das Gemisch in Petrischalen gegossen. Je 10 µl einer zu untersuchenden Hefekultur wurden auf diese Platten getropft und bei 30 °C inkubiert. Da die *RC 898*-Zellen mit dem Paarungstyp **a** mit dem Wachstum aufhören, wenn der zu analysierende Stamm den Paarungstyp **α** besitzt, konnte anhand eines auftretenden Hemmhofs („Halo“) um die aufgetropfte Kolonie bestimmt werden, um welchen Paarungstyp es sich handelt.

3.4.8 Wachstumstropftest mit *S. cerevisiae*-Zellen

Um das Wachstumsverhalten von *S. cerevisiae*-Zellen zu analysieren, wurde ein Tropftest durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Hefezellen zunächst in Glukosemedium kultiviert bis sie eine optische Zelldichte von $\sim 1,2$ erreicht hatten. Daraufhin wurden sie in Laktatmedium so überimpft, dass ihre OD_{600} ungefähr 0,7 entsprach. Sie wurden für weitere 4 - 6 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde ihre optische Dichte erneut ermittelt und für alle Stämme auf ca. 0,7 eingestellt. Von diesen Zellsuspensionen ausgehend wurde nun sukzessiv 1:10 in Laktatmedium verdünnt und aus jeder dieser Verdünnungsstufen wurden 3 - 5 μ l auf Agarplatten gestempelt oder aufgetropft. Da im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der verschiedenen Mba1-Varianten auf das Wachstumsverhalten der Hefen in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle und der Temperatur analysiert werden sollte, wurden Selektivmediumagarplatten mit Glukose und Laktat (siehe Kapitel 3.1.7.1) verwendet und die Hefen bei 25 °C, 30 °C und 37 °C für 4 Tage inkubiert.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Präparation von Gesamtzellprotein aus Hefezellen

Um Gesamtzelllysate von *S. cerevisiae*-Zellen herzustellen, wurden die Zellen einer Flüssigkultur (200 ml) in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation (3 min, 1600 x g, RT) sedimentiert. Sie wurden mit eiskaltem HKET-Puffer (20 mM HEPES; 150 mM Kaliumacetat; 1 % (v/v) Triton X-100; 18 mM PMSF; 2,5 mM EDTA; 140 μ g/ml Pepstatin A ; *Mini Complete* (1 Tablette/10 ml Puffer); pH 7,2) gewaschen und durch Vortexen zusammen mit einer Spatelspitze Glaskügelchen zweimal für 3 min bei 4 °C aufgeschlossen. Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (10 min, 16000 x g, 4 °C) vom Proteinlysate getrennt, das mit Protein-Auftragspuffer (50 mM Tris/HCl; 100 mM DTT; 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) Glycerin; pH 6,8) versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht wurde.

3.5.2 Präparation von Mitochondrien aus Hefezellen

Für zahlreiche konventionelle biochemische Untersuchungen sowie SILAC-basierte Analysen war die Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*-Zellen notwendig.

Dazu wurden die Zellen bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1,5 - 2$) in flüssigem Galaktose- oder Laktatmedium bei 30 °C kultiviert und durch Zentrifugation in einer Super-speed-Zentrifuge (Modell Sorvall RC-6 Plus, Rotor SLA-1500; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 3 min bei 1600 x g und RT pelletiert. Anschließend wurde das Zellsediment mit sterilem Wasser gewaschen und nach Verwerfen des Wassers das Nassgewicht der geernteten Zellen bestimmt. Danach wurden die Zellen in einem Puffer (2 ml/g Nassgewicht) aus 100 mM Tris und

10 mM DTT bestehend resuspendiert, für zehn Minuten bei 30 °C unter ständigem Schütteln inkubiert und mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Um die Hefezellwände zu entfernen, wurden die Zellen in Spheroplastierungspuffer (6,7 ml/g Nassgewicht) (10 mM Tris/HCl; 1,2 M Sorbitol; 20 mM KH₂PO₄; Zymolyase 100T (0,6 mg/g Nassgewicht); pH 7,4) aufgenommen und für 90 min bei 30 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die spheroplastierten Zellen gekühlt abzentrifugiert (5 min, 1600 x g, 4 °C; Rotor SLA-1500), in Homogenisierungspuffer (13,4 ml/g Nassgewicht) (10 mM Tris/HCl; 0,6 M Sorbitol; 0,2 % (w/v) fettsäurefreies Albumin-H2; 10 mM EDTA; 2 mM PMSF; *Mini Complete* (1 Tablette/60 ml Puffer); 140 µg/ml Pepstatin A; pH 7,4) resuspendiert und mit einem Glas-Teflon-Homogenisator (Sartorius, Göttingen, Deutschland) vorsichtig auf Eis aufgeschlossen. Durch mehrfaches Zentrifugieren für 5 min bei 1600 x g und 4 °C (Rotor SLA-1500) wurde das Homogenisat von unerwünschten Zellfragmenten befreit.

Durch einen Zentrifugationsschritt für 12 min bei 17000 x g und 4 °C (Rotor SA600) wurden die Mitochondrien aus dem Homogenisat gewonnen. Sie wurden in SEH-Puffer (0,6 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 10 mM HEPES) gewaschen und durch eine finale Zentrifugation (12 min, 17000 x g, 4 °C; Rotor SA600) sedimentiert. Abschließend wurden die Mitochondrien in 1 ml SEH-Puffer aufgenommen, portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.5.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration in zellulären Lysaten oder von isolierten Mitochondrien wurde mit dem „*BioRad Protein Assay*“ (BioRad, München, Deutschland), welcher auf dem Bradford-Verfahren basiert (Bradford, 1976), entsprechend den Herstellerangaben bestimmt.

3.5.4 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Die Fällung von Proteinen erfolgte für 30 min auf Eis in einer 15 %igen (w/v) Trichloressigsäure-Lösung (TCA-Lösung). Das Präzipitat wurde in einer Tischzentrifuge für 1 h bei 15700 x g und 4 °C sedimentiert, zweimal mit eiskaltem Aceton (-20 °C) gewaschen und in einem Thermoschüttler bei 37 °C getrocknet. Die Proteine wurden in 30 µl/100 µg Protein-Auftragspuffer (siehe Kapitel 3.5.1) aufgenommen und für mindestens 1 h bei 42 °C in einem Thermoschüttler unter starkem Schütteln gelöst. Im Falle eines Farbumschlages des Indikators Bromphenolblau von blau nach gelb, der auf einer Verringerung des pH-Wertes beruht, wurden 0,5 µl Trislösung (1 M Tris/HCl; pH 9,0) hinzugefügt.

3.5.5 Subfraktionierung von Hefe-Mitochondrien

Die Subfraktionierung von isolierten Hefe-Mitochondrien erfolgte nach Diekert *et al.* (Diekert *et al.*, 2001) und diente in Verbindung mit einer Western-Analyse zur Bestimmung der Lokalisation und Orientierung der verschiedenen Mba1-Varianten im Mitochondrium.

Für eine Subfraktionierung wurden 300 µg der aufgereinigten Mitochondrien sedimentiert (10 min, 15700 x g, 4 °C) und in 130 µl eiskaltem SEM-Puffer (250 mM Saccharose; 10 mM MOPS/KOH; 1 mM EDTA; pH 7,2) aufgenommen. Je 20 µl dieser Probe wurden auf fünf Reaktionsgefäße verteilt, welche anschließend mit unterschiedlichen Reagenzien auf Eis inkubiert wurden.

Fraktion 1 diente als unbehandelte Kontrollprobe und wurde deshalb nur mit weiteren 80 µl SEM-Puffer versetzt. Um zugängliche Proteine der äußeren Mitochondrienmembran zu degradieren, wurde Fraktion 2 mit 80 µl SEM-Puffer sowie 25 µl Proteinase K-Lösung (0,33 mg/ml SEM-Puffer) behandelt. Um ein osmotisch bedingtes Anschwellen der Mitochondrien auszulösen, das in der Ruptur der äußeren Membran resultiert, wurden 180 µl eines hypotonen Puffers (20 mM HEPES; pH 7,4) zu den Fraktionen 3 und 4 gegeben. Fraktion 4 wurde zusätzlich mit 50 µl Proteinase K-Lösung (0,33 mg/ml SEM-Puffer) inkubiert, so dass nur Proteine der mitochondrialen Matrix und der inneren Mitochondrienmembran, die vollständig in die Matrix ragen, intakt bleiben konnten. Fraktion 5 diente als Kontrolle für den proteolytischen Abbau durch Proteinase K. Dazu wurde Fraktion 5 mit 80 µl SEM-Puffer, 25 µl Proteinase K-Lösung (0,33 mg/ml SEM-Puffer) und 6 µl Detergenslösung (20 % (v/v) Triton X-100) versetzt. Durch die Behandlung der Mitochondrien mit Detergens wurde sowohl die innere als auch die äußere Membran permeabilisiert, so dass alle mitochondrialen Proteine für den Abbau durch Proteinase K zugänglich waren.

Die fünf beschriebenen Reaktionsansätze wurden auf Eis hergestellt und jeweils für 25 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 30 µl Proteaseinhibitorlösung (*Mini Complete* (1 Tablette/1,5 ml SEM-Puffer)) versetzt, für 20 min bei 15700 x g und 4 °C sedimentiert und in 100 µl der Proteaseinhibitorlösung resuspendiert. Die Proteine der verschiedenen Fraktionen wurden mit einer TCA-Fällung (siehe Kapitel 3.5.4) präzipitiert und das Ergebnis der Subfraktionierung mittels Western-Analyse (siehe Kapitel 3.5.8) visualisiert.

3.5.6 Natriumcarbonat-Extraktion von Hefe-Mitochondrien

Da Mba1 keine Transmembrandomänen besitzt, die es fest in der inneren Mitochondrienmembran verankern, sondern nur eine aus hydrophoben Aminosäuren bestehende Region, über welche es peripher an die Membran assoziiert (Rep & Grivell, 1996), führte die übliche Behandlung mit 100 mM Na₂CO₃ nach Diekert *et al.* (Diekert *et al.*, 2001) zu einer partiellen Herauslösung von Mba1 aus der inneren Membran. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit für eine bessere Vergleichbarkeit der Membranständigkeiten der verschiedenen Mba1-Varianten eine Natriumcarbonat-Konzentrationsreihe in Verbindung mit einer Western-Analyse verwendet.

Dazu wurden 300 µg der isolierten Mitochondrien für 10 min bei 15700 x g und 4 °C sedimentiert, in 1,2 ml hypotonem Puffer (20 mM HEPES; pH 7,4) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde diese Probe gleichmäßig auf sechs Reaktionsgefäße verteilt. Jeder dieser sechs Ansätze wurde mit 200 µl eines Extraktionspuffers mit einer anderen Na₂CO₃-Konzentration versetzt (1 mM PMSF; *Mini Complete* (1 Tablette/10 ml Wasser); Ansatz 1: 0 mM Na₂CO₃; Ansatz 2:

14,5 mM Na₂CO₃; Ansatz 3: 30 mM Na₂CO₃; Ansatz 4: 60 mM Na₂CO₃; Ansatz 5: 100 mM Na₂CO₃; Ansatz 6: 200 mM Na₂CO₃). Die Reaktionsansätze wurden gevortext und für 2 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein 10-minütiger Sedimentationsschritt in einer Tisch-Ultrazentrifuge (Modell Beckman Optima TLX; Rotor TLA-100.3; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) bei 35000 x g und 4 °C. Die Sedimente wurden getrocknet und in Protein-Auftragspuffer gelöst. Die sich im Überstand befindenden Proteine wurden mittels TCA-Fällung (siehe Kapitel 3.5.4) präzipitiert. Alle Proben wurden bei 70 °C für 10 min unter Schütteln inkubiert bevor sie mittels Western-Analyse (siehe Kapitel 3.5.8) weiterführend untersucht wurden.

3.5.7 Koimmunopräzipitation

Die Koimmunopräzipitation dient der Untersuchung potentieller Interaktionen zwischen Proteinen. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers wird ein bestimmtes Zielprotein aus einem Proteinlysate präzipitiert. Weitere, gemeinsam mit dem Zielprotein gefällte Proteine werden über eine Western-Analyse oder eine massenspektrometrische Analyse identifiziert.

3.5.7.1 Koimmunopräzipitation mit SILAC-markierten Oxa1-FLAG-Varianten

Für SILAC-basierte Koimmunopräzipitationen der Zielproteine Oxa1-FLAG und Oxa1-W128F-FLAG wurden in dieser Arbeit 500 µg der entsprechenden SILAC-markierten Mitochondrien in 800 µl IP-Puffer (20 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin; 1 % (w/v) Digitonin; 5 mM EDTA; 2 mM PMSF; *Mini Complete* (1 Tablette/10 ml Wasser); pH 7,4) aufgenommen und 30 min bei 4 °C solubilisiert. Um unlösliche Zellfragmente zu entfernen, wurden die Lysate abzentrifugiert (15 min, 16000 x g, 4 °C). Die Überstände wurden jeweils mit 50 µl „ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel“ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt und für 1 h bei 4 °C auf einem Probenrotator inkubiert. Anschließend wurde die Anti-FLAG-Agarose von ungebundenen Proteinen durch Zentrifugation (1 min, 1000 x g, 4 °C) und von unspezifisch gebundenen Proteinen durch eine dreimalige Behandlung mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin; 0,3 % (w/v) Digitonin; 5 mM EDTA; 1 mM PMSF; *Mini Complete* (1 Tablette/10 ml Wasser); pH 7,4) befreit. Um die gebundenen Proteine von der Anti-FLAG-Agarose zu eluieren, wurden die Ansätze mit Protein-Auftragspuffer versetzt und für 10 min bei 70 °C schüttelnd inkubiert. Für die folgende massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.8) wurden die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgradientengel (4 → 12 % (w/v)) geladen.

3.5.7.2 Koimmunopräzipitation mit Mba1-FLAG-Varianten

Für die Identifikation möglicher Interaktionspartner der verschiedenen Mba1-FLAG-Varianten wurde ein abweichendes Koimmunopräzipitationsprotokoll verwendet. Hierfür wurde 1 mg isolierter Mitochondrien in 1 ml eiskaltem IP-Puffer (50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂;

10 % (v/v) Glycerin; 1 % (w/v) Digitonin; 2 mM PMSF; *Mini Complete* (1 Tablette/20 ml Wasser); pH 7,4) aufgenommen und 30 min bei 4 °C solubilisiert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation von den Zellfragmenten befreit (15 min, 16000 x g, 4 °C), mit 40 µl „*ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel*“ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt und für 1,5 h bei 4 °C auf einem Probenrotator inkubiert. Ungebundene Proteine wurden durch Zentrifugation (1 min, 1000 x g, 4 °C) und unspezifisch gebundene Proteine durch zehnmaliges Waschen mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 % (v/v) Glycerin; 1 mM PMSF; 1 % (w/v) Digitonin; *Mini Complete* (1 Tablette/20 ml Wasser); pH 7,4) entfernt. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde die Anti-FLAG-Agarose mit 40 µl 100 mM Glycin versetzt und 8 min bei RT schüttelnd inkubiert. Abschließend wurden den Eluaten Protein-Auftragspuffer und 2 µl Trislösung (1 M Tris/HCl; pH 9,0) hinzugefügt. Die Proben wurden nicht bei 95 °C gekocht, sondern direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.5.8.1) geladen.

3.5.8 Western-Analyse

Bei einer Western-Analyse werden die Proteine eines komplexen Gemischs zunächst mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt, auf eine Trägermembran transferiert und abschließend spezifisch über eine immunologische Nachweisreaktion detektiert.

3.5.8.1 Proteinauftrennung über SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die eindimensionale diskontinuierliche SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Dabei werden die Disulfidbrücken der Proteine durch Reduktion mit Dithiothreitol gespalten und die Eigenladungen durch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat maskiert, so dass alle Proteine negative Ladungen besitzen, die ihrer Größe entsprechen. Als Trennmedium wurde ein Gel auf Polyacrylamidbasis (Tab. 3.15) verwendet, das aus einem Sammel- und Trenngel bestand und sich zwischen zwei Glasplatten befand, die senkrecht in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt waren. Minigele (8,6 cm x 6,7 cm) wurden in der „*Mini-PROTEAN Tetra Cell*“ von BioRad (München, Deutschland) und größere Gele (13 cm x 14,5 cm) in der Elektrophoresekammer der Werkstatt des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie (Göttingen, Deutschland) mit dem Laemmli-Elektrophorese-puffer (25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3) verwendet.

Die Proteinproben, die im Rahmen einer Proteinstabilitätsanalyse, einer Subfraktionierung, einer Natriumcarbonat-Extraktion oder einer Koimmunopräzipitation gewonnen wurden, wurden in Protein-Auftragspuffer aufgenommen und meist für 5 - 10 min bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden sie vertikal über das SDS-Polyacrylamidgel bei einer Stromstärke von 15 - 25 mA nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, wobei der „*Page Ruler[™] Plus Prestained Protein Ladder*“ als Größenstandard mitgeführt wurde.

Tab. 3.15: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Sammel- und Trenngele

Komponente	Sammelgel 5 % (v/v)	Trenngel 12,5 % (v/v)
Wasser	5,6 ml	6,3 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl; pH 8,8)	-	5,0 ml
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl; pH 6,8)	2,5 ml	-
Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung (30 % (w/v) / 0,8 % (w/v))	1,7 ml	8,3 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	200 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	200 µl
TEMED	12,5 µl	25 µl

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine in den Gelen entweder mit einer Silberfärbung visualisiert (siehe Kapitel 3.5.8.3) oder unter Anwendung des Nass-Blot-Verfahrens (siehe Kapitel 3.5.8.6) bzw. des Semi-Dry-Blot-Verfahrens (siehe Kapitel 3.5.8.7) auf eine Trägermembran übertragen. Danach wurde die Transfereffizienz mit Hilfe einer Roti-Blue-Färbung (siehe Kapitel 3.5.8.4) oder Coomassie-Färbung (siehe Kapitel 3.5.8.5) analysiert.

3.5.8.2 Proteinauftrennung über Nativ-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Blau-Native-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (BN-PAGE) zur Auftrennung von nicht denaturierten Proteingemischen verwendet, um Proteine mit ihrer nativen Proteinfaltung sowie natürlich vorkommende Proteinkomplexe zu analysieren.

3.5.8.2.1 BN-PAGE zur Analyse von Oxa1-Komplexen

Die Untersuchung von intakten Oxa1-Komplexen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Stoldt (Arbeitsgruppe „Struktur und Dynamik von Mitochondrien“, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland). Um mitochondriale Membranproteine vorsichtig aus der Membran herauszulösen und dabei die vorkommenden Proteinkomplexe weitestgehend zu erhalten, erfolgte die Probenvorbereitung unter Verwendung des milden, nicht-ionischen Detergens Digitonin (Wittig *et al.*, 2006). Dazu wurden jeweils 400 µg isolierte Mitochondrien sedimentiert (10 min, 15700 x g, 4 °C), in 40 µl Solubilisierungspuffer (50 mM NaCl; 2 mM 6-Aminohexansäure; 50 mM Imidazol/HCl; 1 mM EDTA; 2,6 % (w/v) Digitonin; pH 7,0) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Um das Proteinlysate von Zelltrümmern zu befreien, wurde es 20 min bei 15700 x g und 4 °C zentrifugiert. Die solubilisierten Membranproteine befanden sich im Überstand, der mit 20 µl 4xProbenpuffer und 13 µl 5 % (w/v) G-250-Probenadditiv des „NativePAGE Sample Prep Kits“ (Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) versetzt wurde. Die hergestellten Proben wurden nicht gekocht, sondern direkt auf ein „NativePAGE Bis-Tris-Gel“ (4 → 16 % (w/v)) von Novex aufgetragen. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde der Größenstandard „Native Mark™ unstained Protein Standard“ von Novex mitgeführt. Die Gel-Elektrophorese erfolgte mit den von Novex gelieferten

Puffern in der Elektrophoresekammer „BlueVertical 102“ von Serva (Heidelberg, Deutschland) bei einer konstanten Spannung von 150 V und 4 °C.

3.5.8.2.2 BN-PAGE zur Analyse von Superkomplexen der Atmungskette

Die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Mba1-Varianten auf die Biogenese der Superkomplexe der Atmungskette erfolgte mit Hilfe einer BN-PAGE, die von Dr. Markus Deckers und Mirjam Wissel (Arbeitsgruppe „Mitochondrial Dynamics“, Institut für Zellbiochemie, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland) durchgeführt wurde. Dazu wurden 500 µg der isolierten Mitochondrien für 10 min bei 15700 x g und 4 °C sedimentiert, in 450 µl Solubilisierungspuffer (20 mM Tris/HCl; 0,1 mM EDTA; 50 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin; 1 mM PMSF; 1 % (w/v) Digitonin; pH 7,4) aufgenommen und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Proteinlysate für 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit BN-Probenauftragspuffer (10 mM BisTris; 50 mM 6-Aminohexansäure; 0,5 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau G250; pH 7,0) versetzt und direkt auf ein BN-Polyacrylamidgel mit einem Konzentrationsgradienten (4 → 10 % (w/v)) (Tab. 3.16) aufgetragen. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 400 V, 30 mA und 4 °C. Zunächst wurde für die Auftrennung der Proben der Anodenpuffer (50 mM BisTris; pH 7,0) und der Kathodenpuffer (50 mM Trizin; 15 mM BisTris; pH 7,0) mit 0,02 % (w/v) Coomassie-Farbstoff verwendet. Nachdem die blaue Lauffront der Proben ungefähr die Hälfte des Gels erreicht hatte, wurde der Kathodenpuffer mit Coomassie-Farbstoff durch einen Kathodenpuffer ohne Coomassie-Farbstoff (50 mM Trizin; 15 mM BisTris; pH 7,0) ersetzt, was einen effizienteren Proteintransfer beim *Semi-Dry-Blot* (siehe Kapitel 3.5.8.7) gewährleistete.

Tab. 3.16: Zusammensetzung des BN-Polyacrylamidgradientengels

Komponente	10 % (v/v)	4 % (v/v)
Wasser	0,535 ml	9,5795 ml
3 x Gelpuffer (150 mM BisTris; 200 mM 6-Aminohexansäure; pH 7,0)	3 ml	5,5 ml
Acrylamidlösung (49,5 % T; 3 % C)*	1,82 ml	1,338 ml
50 % (v/v) Glycerin	3,6 ml	-
10 % (w/v) APS	40 µl	73,3 µl
TEMED	5 µl	9,2 µl

(*) Es wurden 480 g/l Acrylamid und 15 g Bisacrylamid eingewogen. 49,5 % T entspricht dabei der Gesamtkonzentration von Acrylamid- und Bisacrylamid-Monomeren und 3 % C der Konzentration der Quervernetzungs-substanz Bisacrylamid im Vergleich zur Monomer-Gesamtmenge.

Im Anschluss an die BN-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine in den Nativgelen mittels Nass-Blot-Verfahren (siehe Kapitel 3.5.8.6) bzw. *Semi-Dry-Blot*-Verfahren (siehe Kapitel 3.5.8.7) auf eine Trägermembran übertragen und danach die Transfereffizienz mittels Coomassie-Färbung (siehe Kapitel 3.5.8.5) überprüft.

3.5.8.3 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um sehr geringe Proteinmengen (0,1 - 1 ng Protein/Bande) in einem SDS-Polyacrylamidgel, zum Beispiel nach Auftrennung der Eluate der Koimmunopräzipitationen (siehe Kapitel 3.5.7), nachzuweisen, wurden Silberfärbungen durchgeführt (Wray *et al.*, 1981). Um die Proteine im Gel zu fixieren und störende Substanzen auszuwaschen, wurden die Proteingele für 30 min in einer Fixierlösung (9 % (v/v) Essigsäure; 45,5 % (v/v) Methanol) und zweimal für 15 min in einer Methanollösung (30 % (v/v)) inkubiert. Danach wurden 50 ml Färbelösung pro Proteingel frisch aus 1 ml Lösung A (0,2 g/ml AgNO₃), 11 ml Lösung B (84 mM NaOH; 1,5 % (v/v) Ammoniaklösung) und 38 ml Wasser hergestellt. Die Gele wurden darin 25 min unter Schwenken inkubiert, wobei sich die Silberionen an die negativ geladenen Seitenketten von Aminosäuren anlagerten. Das überschüssige Silber wurde in den fünf folgenden fünfminütigen Waschschritten mit Wasser aus den Gelen gewaschen. Abschließend folgte der Entwicklungsschritt, bei dem die Silberionen durch alkalisches Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert wurden, welches die Stellen, an denen Proteine vorhanden waren, dunkel färbte. Dazu wurden pro Proteingel ~ 50 ml Entwicklerlösung (0,007 % (w/v) Zitronensäure; 0,05 % (v/v) Formaldehyd) verwendet. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von Fixierlösung abgestoppt und die Proteinbanden im Gel mit dem Scanner (Modell Canon CanoScan LiDE 100; Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) dokumentiert.

3.5.8.4 Roti-Blue-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um die Effizienz des Transfers von aufgetrennten Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran (siehe Kapitel 3.5.8.6 und 3.5.8.7) zu überprüfen, wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer Roti-Blue-Färbung im SDS-Polyacrylamidgel visualisiert. Dazu wurden die Gele in einer Roti-Blue-Färbelösung (20 % (v/v) 5xRoti-Blue-Lösung; 20 % (v/v) Methanol) unter ständigem Schwenken über Nacht inkubiert. Der kolloidale Roti-Blue-Farbstoff bindet mit sehr hoher Affinität an Proteine und nur sehr wenig an die Gelmatrix, weshalb eine aufwändige Entfärbungsprozedur des Gelhintergrundes entfällt. Stattdessen wurden die Gele kurz mit VE-Wasser gespült und mit einem Scanner (Modell Canon CanoScan LiDE 100) dokumentiert.

3.5.8.5 Coomassie-Färbung von Nativ- und SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Analyse der Transfereffizienz von aufgetrennten Proteinen aus einem Nativ-Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran (siehe Kapitel 3.5.8.6 und 3.5.8.7), wurde stets eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Diese kam unter anderem auch bei der Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse (siehe Kapitel 3.8.1) von Koimmunopräzipitationen (siehe Kapitel 3.5.7) zum Einsatz. Die Visualisierung der im SDS- oder Nativ-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau R250, der sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert. Die Gele wurden für 20 - 30 min in einer Coomassie-Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R250; 25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure) unter ständigem Schwenken

inkubiert. Da der Coomassie-Brillant-Blau-Farbstoff auch die Gelmatrix anfärbt, musste der überschüssige Farbstoff mit Hilfe einer Entfärbelösung (50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) entfernt werden. Die SDS- oder Nativ-Polyacrylamidgele wurden mit einem Scanner (Modell Canon CanoScan LiDE 100) dokumentiert.

3.5.8.6 Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen mittels Nass-Blot

Für den spezifischen Nachweis bestimmter Proteinsignale wurden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung (siehe Kapitel 3.5.8.1 und 3.5.8.2) auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose (Protran® Nitrozellulosemembran; Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) (Towbin *et al.*, 1979) oder Polyvinylidendifluorid (PVDF) (Hybond™-P PVDF-Membran; GE Healthcare, München, Deutschland) übertragen. Anschließend wurden sie durch eine Immundetektion (siehe Kapitel 3.5.8.10) visualisiert (Renart *et al.*, 1979; Burnette, 1981).

Der Transfer der Proteine auf die proteinbindenden Membranen erfolgte durch ein senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegtes elektrisches Feld in einem mit Transferpuffer (150 mM Glycin; 20 mM Tris/HCl; 20 % (v/v) Methanol) befülltem Nass-Blot-System. Für kleine Gele wurde entweder die „Mini Trans-Blot Cell“ von BioRad (München, Deutschland) oder die „BlueBlot Wet 100“-Kammer von Serva (Heidelberg, Deutschland) und für größere Gele die Tankblotapparatur der Werkstatt des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie (Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Dazu wurden das Proteingel und die Membran von mehreren Filterpapieren und Schwämmen eingerahmt, die vorher ausreichend mit Transferpuffer equilibriert wurden. Der Blot erfolgte für 12 - 20 h bei 4 °C und einer konstanten Stromstärke von 80 - 110 mA pro Membran.

3.5.8.7 Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen mittels *Semi-Dry-Blot*

Eine weitere Methode, um Proteine aus Polyacrylamidgelen auf proteinbindende Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen zu übertragen, ist das *Semi-Dry-Blot*-Verfahren. Dazu wurde eine Halbtrockenzelle (*Semi-Dry-Blot*-System) (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet, die mit zwei Graphitelektroden ausgestattet war. Das Proteingel und die Membran wurden auch hier von mehreren Filterpapieren eingerahmt und zwischen die Elektroden gelegt. Dabei war es wichtig, dass alle Komponenten vorher ausreichend in Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris/HCl; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3) equilibriert und luftblasenfrei übereinander gelegt wurden. Der Blot erfolgte dann für 3 h bei 0,5 mA/cm² und einer Spannung von 20 V.

3.5.8.8 Ponceau S-Färbung von Nitrozellulosemembranen

Um die Effizienz des Proteintransfers auf eine Nitrozellulosemembran zu überprüfen, wurde stets eine Ponceau S-Färbung (Salinovich & Montelaro, 1986) durchgeführt. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der membrangebundenen Proteine bindet. Nach dem Transfer wurde die Membran für 10 min in einer Ponceau S-Färbelösung (2,5 g/l Ponceau S;

40 % (v/v) Methanol; 15 % (v/v) Essigsäure) bei RT unter Schwenken inkubiert und mit VE-Wasser gespült bis die Proteinbanden sichtbar wurden und mit dem Scanner (Modell Canon CanoScan LiDE 100) digitalisiert werden konnten. Danach wurde die Membran für die Detektion der membran-gebundenen Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper weiterverwendet (siehe Kapitel 3.5.8.10).

3.5.8.9 Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen

Die Proteintransfereffizienz auf eine PVDF-Membran wurde mit Hilfe einer 30-minütigen Färbung in Coomassie-Lösung (0,1 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R250; 25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure) überprüft. Nachdem die Proteinbanden mit dem Scanner (Modell Canon CanoScan LiDE 100) dokumentiert wurden, wurde die Membran mit Methanol entfärbt und wie in 3.5.8.10 beschrieben, weiterbehandelt.

3.5.8.10 Immundetektion membrangebundener Proteine

Die spezifische Detektion der membrangebundenen Proteine erfolgte mit Hilfe von gegen die Zielproteine gerichteten Antikörpern. Um die Spezifität der Immunreaktionen zu erhöhen, wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation der Blotmembran bei RT in einer Blocklösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T (20 mM Tris/HCl; 62 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 7,5)) abgesättigt. Danach wurde die Membran entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1 - 2 h bei RT in einer Primärantikörperlösung inkubiert. Die Primärantikörper (Tab. 3.3) wurden in Blocklösung verdünnt, mehrfach verwendet und bei -20 °C gelagert. Zur Entfernung von ungebundenem Primärantikörper wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend folgte eine einstündige Behandlung mit einer entsprechenden sekundären Antikörperlösung bei RT, wobei ausschließlich mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte Antikörper verwendet wurden (Tab. 3.3). Die darauf folgenden Waschschriffe erfolgten wie für den primären Antikörper beschrieben. Die gesuchten Proteinbanden wurden mit Hilfe einer auf Chemilumineszenz beruhenden Nachweisreaktion detektiert (Mattson & Bellehumeur, 1996). Dazu wurden pro Membran je 750 µl der Entwicklerlösungen „*Western Lightning Plus-ECL Enhanced Luminol Reagent Plus*“ und „*Western Lightning Plus-ECL Oxidizing Reagent Plus*“ von Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) eingesetzt. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP katalysiert die Oxidation des in der Detektionslösung enthaltenen Luminols, wobei es zu einer Lichtemission (Chemilumineszenz) kommt, die mit Hilfe des PCO Imaging Sensicam Systems (PCO AG, Kelheim, Deutschland) dokumentiert werden konnte.

3.6 Fluoreszenzmikroskopie

3.6.1 Fluoreszenz-Tags und Fluorophore

In der vorliegenden Arbeit wurden fluoreszierende Proteine zur Visualisierung der Lokalisation eines fusionierten Proteins *in vivo* eingesetzt. Beim ersten verwendeten Chromophor handelt es sich um GFP (S65T) (grün fluoreszierendes Protein) (Shimomura *et al.*, 1962), welches Licht der Wellenlänge 489 nm absorbiert und Licht der Wellenlänge 509 nm emittiert. Das zweite Chromophor ist mRFP (monomeres rot fluoreszierendes Protein) (Campbell *et al.*, 2002), das durch Licht der Wellenlänge 584 nm angeregt werden kann und Licht der Wellenlänge 607 nm emittiert.

Für die Visualisierung mitochondrialer Netzwerke und die Analyse des Membranpotentials, wurde der fluoreszierende Farbstoff MitoTracker Red CM-H₂XRos (Molecular Probes; Carlsbad, CA, USA) (Tab. 3.5) in einer Konzentration von 500 nmol/l in PBS-Sorbitol (1 % (w/v) Sorbitol in PBS (137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄; pH 7,4)) eingesetzt. In lebenden und respiratorisch aktiven Zellen absorbiert dieser Farbstoff Licht der Wellenlänge 579 nm und emittiert Licht der Wellenlänge 599 nm. Seine zuerst reduzierte und nicht fluoreszierende Form wird in lebenden Zellen oxidiert und anschließend an die Mitochondrien abgesondert, in denen er in Abhängigkeit des Membranpotentials akkumuliert.

3.6.2 Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl *S. cerevisiae*-Zellen, die mit Fluoreszenz-Tags fusionierte Proteine synthetisierten, als auch *S. cerevisiae*-Zellen, deren Mitochondrien mit einem Fluorophor angefärbt worden waren, lebend lichtmikroskopisch untersucht. Dazu wurden sie in 20 µl PBS aufgenommen, auf den Objektträger gebracht und unter einem Deckglas befestigt.

3.6.3 Epifluoreszenzmikroskopie

Zur Dokumentation fluoreszierender Proben kam unter anderem das Epifluoreszenzmikroskop Leica DM6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) zum Einsatz. Alle mikroskopischen Aufnahmen von lebenden Hefezellen wurden mit dem Öl-Immersionsobjektiv (PL APO, 100x/1.40-0.70 oil) durchgeführt. Für die Durchlichtmikroskopie diente eine Halogenlampe und für die Fluoreszenzmikroskopie eine Metallhalogenidlampe (Leica EL6000; 120 W) als Lichtquelle. Um das Fluoreszenzlicht optimal zu selektieren, wurden im Strahlengang platzierte Filter, die an die Anregungs- und Emissionsspektren unterschiedlicher fluoreszierender Moleküle angepasst sind, verwendet. GFP wurde mit dem GFP-Filterwürfel (Anregung 470/40 nm, Emission 525/50 nm) und mRFP mit dem N3-Filterwürfel (Anregung 546/12 nm, Emission 600/40 nm) detektiert. Eine an das System gekoppelte CCD-Kamera (Leica DFC 350 FX) diente zur Bildaufnahme.

3.6.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Aufnahme der Lokalisationsstudien von GFP- bzw. mRFP-markierten Proteinen in lebenden *S. cerevisiae*-Zellen das konfokale Laser-Raster-Mikroskop Leica TCS-SP1 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) verwendet (Tab. 3.17).

Tab. 3.17: Ausstattung des Leica TCS-SP1

System / Scanner	Leica TCS-SP1
Laser	Argon-Krypton-Laser (476 nm; 488 nm; 568 nm; 647 nm)
Anregungsfilter	akusto-optisch einstell- barer Filter (AOTF)
Detektionsfilter	RSP500 DD488/568 DD458/514 TD488/568/647
Objektive	10x (0,3 NA Luft) 63x (1,2 NA Wasser) 100x (1,4 NA Öl)
Detektoren	PMT

Tab. 3.18: Verwendete Mikroskopeinstellungen

System / Scanner	verwendete Einstellung
Anregung	GFP: 488 nm mRFP: 568 nm
Detektion	GFP: 510 - 560 nm mRFP: 600 - 700 nm
Detektionsfilter	GFP: RSP500 mRFP: TD488/568/647
Objektiv	100x (1,4 NA Öl)
Pinhole	1,0 Airy Unit
Raster- geschwindigkeit	400 Hz
Voxelgröße	50 nm x 50 nm x 150 nm (nach Nyquist-Theorem)

Für die Dokumentation wurden typischerweise die in Tabelle 3.18 angegebenen Mikroskopeinstellungen bei einer Temperatur von ungefähr 22 °C verwendet. Um eine Signalüberlappung bei der Aufnahme von Proben, die gleichzeitig mit GFP- und mRFP-Fluorophoren markiert waren, zu vermeiden, wurde die Fluoreszenz von GFP bzw. mRFP stets im „*sequential Scan*“-Modus nacheinander angeregt und detektiert. Dieser Aufnahmemodus gewährleistete eine sichere Trennung der Emissionsspektren der beiden Fluorophore bei der Detektion. Es wurde außerdem stets darauf geachtet, dass die Photomultiplier (PMTs) im dynamischen Bereich betrieben wurden. Zur Optimierung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurde jeder optische Schnitt viermal aufgenommen und gemittelt.

3.7 Elektronenmikroskopie

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Dirk Wenzel aus der Arbeitsgruppe „Elektronenmikroskopie“ des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie (Göttingen, Deutschland).

3.7.1 Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

Die Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie erfolgte nach Tokuyasu (Tokuyasu, 1973). Dazu wurden die zu untersuchenden Hefezellen zunächst in flüssigem Galaktose- oder Laktatmedium bei 25 °C oder 30 °C kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation

(3 min, 1600 x g, RT) sedimentiert. Die Zellen wurden für 30 min bei RT in einer ersten Formaldehydlösung (2 % (v/v) Formaldehyd in Wachstumsmedium) vorfixiert, pelletiert und über Nacht in einer zweiten Formaldehydlösung (2 % (v/v) Formaldehyd in PBS) auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweite Nachfixierung in einer Formaldehyd-Glutaraldehyd-Lösung (4 % (v/v) Formaldehyd und 0,1 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS) für 2 h auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit einer Glycinlösung (0,02 % (w/v) Glycin in PBS) gewaschen, in 10 % (w/v) Gelatine eingebettet, abgekühlt und in kleine Blöcke geschnitten. Die Gelatineblöcke wurden über Nacht in einer Saccharose-Formaldehyd-Lösung (2,1 M Saccharose; 0,4 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert, mit einer Saccharose-Glycin-Lösung (2,3 M Saccharose; 0,02 % (w/v) Glycin) gewaschen, auf Metallstiften befestigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Herstellung der Ultradünnschnitte (80 nm) wurde ein mit einem Diamantmesser ausgestattetes Ultrakryomikrotom (Ultracut; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) verwendet.

Für die Immunmarkierung wurden die Ultradünnschnitte 20 min mit einer Primärantikörperlösung (Tab. 3.4) und danach 20 min mit einer Lösung mit sekundären Antikörpern, welche mit Goldpartikeln (10 nm) gekoppelt waren (Tab. 3.4), behandelt. Es folgten fünf dreiminütige Waschschrte mit TBS-BSA (20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,5 % (w/v) BSA; pH 7,5), fünf dreiminütige Waschschrte mit TBS (20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5) und fünf dreiminütige Waschschrte mit TBS-T (20 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 7,5). Abschließend wurden die Schnitte für 10 min auf Eis mit 0,4 % (w/v) Uranylacetat in Methylzellulose kontrastiert (Liou *et al.*, 1996) und schließlich in Methylzellulose eingebettet.

3.7.2 Bildaufnahme mit dem Elektronenmikroskop

Die Untersuchung der immunmarkierten Ultradünnschnitte erfolgte mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop CM120 von Philips (Amsterdam, Niederlande) und die Detektion mit einer gekoppelten CCD-Kamera (TVIPS, Gauting, Deutschland).

3.7.3 Datenanalyse und Quantifizierung

Zur Quantifikation der submitochondrialen Proteinverteilungen wurden in jedem Fall zwischen 50 und 170 individuelle Goldpartikel aus 50 bis 100 verschiedenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgewertet. Mit Hilfe des Programms Image J wurde jeweils die kürzeste Distanz von der Mitte einer Goldkugel zur inneren Grenzflächenmembran (IGM) des Mitochondriums ermittelt. Das jeweils zu analysierende Protein war mit GFP oder FLAG fusioniert und konnte nur indirekt über einen Komplex visualisiert werden, der aus Primärantikörper, Sekundärantikörper bzw. Protein A sowie Goldpartikel mit einem Durchmesser von ca. 10 nm bestand. Deshalb wurden Goldpartikel, bei denen der gemessene Abstand von der Mitte des Goldpartikels zur IGM mehr als 20 nm betrug, der Cristaemembran (CM) des Mitochondriums oder dem Zytoplasma der Hefezelle zugeordnet. Die

Goldpartikel mit einem Abstand von ≤ 20 nm wurden mit einer Lokalisation in der IGM gewertet. Da nicht bekannt war in welcher Richtung des Goldpartikels sich das Fusionsprotein befand, wurden auch Goldpartikel mit einem Abstand von ≤ 20 nm in diese Wertung mit einbezogen, die außerhalb des Mitochondriums lagen (Suppanz *et al.*, 2009; Stoldt *et al.*, 2012).

Außerdem war es erforderlich das Membranlängenverhältnis der IGM zur CM in die Auswertung mit einzubeziehen, da es sich bei Wachstum mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Galaktose von dem bei Wachstum mit der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Laktat unterscheidet. So beträgt das Membranlängenverhältnis IGM : CM unter fermentativen Wachstumsbedingungen ungefähr 1 : 1 (Vogel *et al.*, 2006; Suppanz *et al.*, 2009; Stoldt *et al.*, 2012) und unter respiratorischen Wachstumsbedingungen etwa 1 : 1,5, weshalb die ermittelten Prozentwerte für die Anreicherung innerhalb der IGM zur Korrektur mit dem Faktor 1,5 multipliziert wurden (Vogel *et al.*, 2006; Stoldt *et al.*, 2012). Die Membranlängen wurden in repräsentativen Aufnahmen ebenfalls mit Hilfe von Image J bestimmt.

3.8 Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Sämtliche massenspektrometrische Untersuchungen der vorgelegten Arbeit wurden von Dr. Miroslav Nikolov und Monika Raabe aus der Arbeitsgruppe „Bioanalytische Massenspektrometrie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Henning Urlaub am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

3.8.1 Proteolytische Spaltung von Proteinen im SDS-Gel

Für die Analyse der einzelnen Peptide eines komplexen Proteingemisches mit Hilfe der Massenspektrometrie war es zunächst notwendig, den Grad der Komplexität der zu untersuchenden Probe hinsichtlich der enthaltenen Proteine zu reduzieren. Dazu wurden die Proteine zuerst über eine SDS-PAGE und weiterhin durch das Ausschneiden von kleinen Stücken aus dem Gel separiert.

Die Eluate der Koimmunopräzipitationen mit SILAC-markiertem Oxa1-FLAG und Oxa1-W128F-FLAG (siehe Kapitel 3.5.7.1) wurden so miteinander gemischt, dass die beiden Zielproteine in gleicher Menge zueinander vorlagen. Dieses Gemisch wurde mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgradientengels (4 → 12 % (w/v)) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) aufgetrennt.

Im Gegensatz dazu wurden die Eluate der Koimmunopräzipitationen mit den Mba1-FLAG-Varianten (siehe Kapitel 3.5.7.2) für die massenspektrometrischen Analysen einzeln, d. h. ohne mischen, auf das SDS-Polyacrylamidgradientengel (4 → 12 % (w/v)) aufgetragen und aufgetrennt.

Zur Fixierung der Proteine im Gel wurde eine Coomassie-Färbung (siehe Kapitel 3.5.8.5) durchgeführt und jede Gelspur in 23 gleich große Gelstücke geschnitten. Jedes dieser Gelstücke wiederum wurde in kleine Würfel mit einer Größe von 1 mm x 1 mm geschnitten. Der im-Gel-Verdau der Proteine mit Trypsin erfolgte nach Shevchenko *et al.* (Shevchenko *et al.*, 2006). Dafür wurden alle

aufgeführten Inkubationsschritte in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt, alle verwendeten Lösungen in LiChrosolv-Wasser mit LC-MS-Qualität (Merck, Darmstadt, Deutschland) angesetzt und nach jedem Inkubationsschritt die Lösungen entfernt. Zuerst wurden die Gelwürfel mit 150 µl Wasser für 5 min bei RT gewaschen, in 150 µl Acetonitril für 15 min bei RT dehydriert, getrocknet, in 100 µl Reduzierungspuffer (100 mM NH_4HCO_3 ; 10 mM DTT; pH 8,0) rehydriert und für mindestens 30 min bei 56 °C inkubiert. Danach wurden die Gelwürfel erneut in 150 µl Acetonitril dehydriert und, um reduzierte Cysteinreste zu alkylieren, in 100 µl Iodacetamidpuffer (55 mM $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$; 100 mM NH_4HCO_3 ; pH 8,0) für 20 min bei RT im Dunkeln eingelegt. Die Gelwürfel wurden mit 150 µl Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (100 mM; pH 8,0) für 15 min bei RT gewaschen, mit 150 µl Acetonitril versetzt, für 20 min bei RT inkubiert, nochmals in 150 µl Acetonitril für 15 min bei RT dehydriert, getrocknet und in 15 - 20 µl Verdau-puffer (50 mM NH_4HCO_3 ; 5 mM CaCl_2 ; 12,5 ng/µl Trypsin; pH 8,0) für 30 - 45 min auf Eis rehydriert. Damit die Gelwürfel während des Verdaus über Nacht bei 37 °C nicht austrockneten, wurden sie mit Verdau-puffer ohne Trypsin überschichtet.

3.8.2 Extraktion von Peptiden aus dem SDS-Gel

Die durch den im-Gel-Verdau erzeugten Peptide (siehe Kapitel 3.8.1) wurden nach Shevchenko *et al.* (Shevchenko *et al.*, 2006) aus den Gelstücken extrahiert. Auch hierfür wurden alle Inkubationsschritte in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt und die Lösungen wurden typischerweise nach jedem Inkubationsschritt wieder entfernt. Zunächst wurde der Verdauansatz mit 10 - 15 µl Wasser versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Gelwürfel mit 100 µl Acetonitril für 15 min bei 37 °C behandelt und nach einer kurzen Zentrifugation der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Die dehydrierten Gelwürfel wurden mit 65 µl 5 % (v/v) Ameisensäure versetzt, gevortext und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 15 min bei 37 °C mit 65 µl Acetonitril und nach einer kurzen Zentrifugation wurde auch dieser Überstand abgenommen und aufbewahrt. Um eine vollständige Extraktion zu gewährleisten, konnte ein dritter Extraktionsschritt mit Acetonitril angewandt werden. Zum Schluss wurden die Überstände aller durchgeführten Extraktionsschritte vereinigt, in einer SpeedVac (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) aufkonzentriert und in 20 µl einer Acetonitril-Ameisensäurelösung (5 % (v/v) Acetonitril; 1 % (v/v) Ameisensäure) mit Hilfe von intensivem Vortexen und einer dreiminütigen Ultraschallbehandlung resuspendiert.

3.8.3 LC-MS/MS-Analyse von Peptiden

Sämtliche LC-MS/MS-Analysen (Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie) wurden mit dem Massenspektrometer des Typs LTQ-Orbitrap XL der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) durchgeführt, das über eine Nanoelektronenspray-

Ionenquelle mit einem Nanoflow-RP-HPLC-System (Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie) (Agilent 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verbunden war.

Um die aus dem komplexen Ausgangsproteingemisch gewonnen Peptide weiterführend vor der eigentlichen massenspektrometrischen Analyse über Nanoflow-RP-HPLC aufzutrennen, wurden je 5 µl-Aliquots der Peptid-angereicherten Proben (siehe Kapitel 3.8.2) auf eine analytische C18-Säule geladen und bei einer Flussrate von 250 nl/min eluiert. Nach der flüssigchromatographischen Trennung wurden die eluierten Peptide über eine Nanoelektronenspray-Ionisation mit einer Spannung von 1,5 kV zur Detektion in das Massenspektrometer eingebracht.

3.8.4 Prozessierung der massenspektrometrischen Daten

3.8.4.1 Analyse der massenspektrometrischen Daten der Koimmunopräzipitationen mit den SILAC-markierten Oxa1-FLAG-Varianten

Die umfangreiche Bearbeitung und Darstellung der massenspektrometrischen Analyse der SILAC-basierten Koimmunopräzipitationen mit Oxa1-FLAG-Varianten (siehe Kapitel 3.5.7.1) wurde stets von Dr. Nikolov (Arbeitsgruppe „Bioanalytische Massenspektrometrie“, Prof. Dr. Henning Urlaub, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) nach Nikolov *et al.* (Nikolov *et al.*, 2011) durchgeführt. Zur Prozessierung der massenspektrometrischen Rohdaten wurde das Programm MaxQuant unter Zuhilfenahme der UniProt-Proteindatenbank für *S. cerevisiae* eingesetzt. Die verwendeten schweren Kohlenstoff- und Stickstoffisotope, mit denen Lysin und Arginin markiert waren, wurden bei der Datenbanksuche berücksichtigt. Die von MaxQuant ausgewerteten Daten wurden, wie in Nikolov *et al.* (Nikolov *et al.*, 2011) beschrieben, in die Software R importiert. Zum Abschluss wurden die normalisierten Werte der Intensitätsverhältnisse (S/L) von schwer markiertem (S) zu leicht markiertem Peptid (L) der Vorwärtsanalyse (VA) und der Rückwärtsanalyse (RA) in einem Streudiagramm mit logarithmischen Skalen gegeneinander aufgetragen.

3.8.4.2 Analyse der massenspektrometrischen Daten der Koimmunopräzipitationen mit den verschiedenen Mba1-FLAG-Varianten

Um die Peptide der massenspektrometrischen Analyse der Koimmunopräzipitationen mit den verschiedenen Mba1-FLAG-Varianten (siehe Kapitel 3.5.7.2) zu identifizieren, wurden die generierten massenspektrometrischen Rohdaten unter Verwendung der Suchmaschine Mascot Daemon gegen die theoretischen Daten der UniProt-Proteindatenbank für *S. cerevisiae* abgeglichen. Diese Ergebnisse wurden in das Programm Scaffold Viewer integriert und analysiert. Ausgewählte Daten wurden in Excel exportiert, quantifiziert und in Form von Datentabellen dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Grundlagen der dynamischen Verteilung von Oxa1 in der inneren mitochondrialen Membran

Die Mehrheit aller mitochondrialen Proteine ist im Zellkern kodiert und wird an zytosolischen Ribosomen synthetisiert. Anschließend werden diese Proteine mit Hilfe spezifischer Translokasen in das Mitochondrium importiert und in eines der Subkompartimente, wie die stark proteinhaltige innere Membran, sortiert. Zu den Proteinen, deren Bestimmungsort die Innenmembran ist, gehören neben kernkodierten Proteinen auch die mitochondrial kodierten Kernkomponenten der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung, welche an den mitochondrialen Ribosomen gebildet werden. Ein Bestandteil der Innenmembran, der sowohl bei der Insertion von konservativ sortierten als auch von mitochondrial synthetisierten Proteinen in die innere Membran eine zentrale Stellung einnimmt, ist Oxa1 (Ott & Herrmann, 2010; Kulawiak *et al.*, 2013; Neupert, 2015).

Das Protein Oxa1 zeichnet sich durch fünf konservierte hydrophobe Transmembransegmente aus, über die es fest in der mitochondrialen Innenmembran verankert wird (Abb. 1.9) (Herrmann *et al.*, 1997; Kermorgant *et al.*, 1997). Die Verteilung von Oxa1 in der inneren Membran wurde erstmalig in den Studien von Stoldt *et al.* umfassend charakterisiert (Stoldt, 2010; Stoldt *et al.*, 2012). Es wurde gezeigt, dass die submitochondriale Lokalisation von Oxa1 in *Saccharomyces cerevisiae* von den physiologischen Bedürfnissen der Zellen abhängig ist. So weist Oxa1 unter fermentativen Wachstumsbedingungen eine Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran auf, die sich unter respiratorischen Bedingungen zur Cristaemembran hin verschiebt. Zudem wurde beobachtet, dass auch die Substitution der in der ersten Transmembrandomäne gelegenen, konservierten Aminosäure Tryptophan128 mit Phenylalanin in einer deutlichen Anreicherung von Oxa1 in der Cristaemembran resultiert.

Es stellte sich die Frage, ob der Veränderung der Oxa1-Lokalisation, welche über die Einführung der Substitutionsmutation *oxa1-W128F* induziert wurde, derselbe Mechanismus zu Grunde liegt, der für die dynamische Verschiebung der Oxa1-Verteilung in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle verantwortlich ist. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die Grundlagen der submitochondriale Verteilung von Oxa1 unter Anwendung von proteinbiochemischen Analysen untersucht.

4.1.1 Durchschnittsgrößen von Oxa1-enthaltenden Komplexen

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Oxa1 eine zentrale Rolle bei der Biogenese mitochondrialer Membranproteine spielt, wobei die molekulare Funktion von Oxa1 bei diesem Prozess weitestgehend unverstanden ist (Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001; Bohnert *et al.*, 2010; Hildenbeutel *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass Oxa1 *in vivo* in homooligomeren Komplexen vorkommt und möglicherweise eine Art Importpore formt (Reif *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2009; Krüger *et al.*, 2012).

In den Studien von Nargang *et al.* und Reif *et al.* wurde für Oxa1 von *N. crassa* und *S. cerevisiae* berichtet, dass Oxa1 in Form von Homotetrameren vorliegt, während die Daten von Kohler *et al.* auf ein Homodimer, das eine Pore formt, hindeuten (Nargang *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2009). Eine neuere Studie schlägt vor, dass Oxa1 als Protein-translozierender Kanal fungiert, wobei jeweils vier Oxa1-Proteine miteinander kooperieren und eine homotetramere Einheit bilden, die sich aus zwei funktional gekoppelten Oxa1-Dimeren zusammensetzt (Krüger *et al.*, 2012).

Analysen bezüglich der durchschnittlichen Größe von Oxa1-Komplexen der dieser Arbeit vorausgegangenen Doktorarbeit (Stoldt, 2010) haben gezeigt, dass die Mutation *oxa1-W128F* zu einer Verkleinerung der Oxa1-enthaltenden Komplexe führt. Wie auch für Oxa1-W128F, wurde für Oxa1 bei Wachstum mit der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Laktat eine Verschiebung der Lokalisation von der inneren Grenzflächenmembran zur Cristaemembran beobachtet. Es ergibt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der präferierten Lokalisation von Oxa1 und der Größe von Oxa1-enthaltenden Komplexen gibt und sich demzufolge die Größen der Oxa1-enthaltenden Komplexe unter fermentativen Bedingungen von denen unter respiratorischen Bedingungen unterscheiden. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung wurde die Methode der Blau-Nativen-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (BN-PAGE) angewandt, da sie den Nachweis von natürlich vorkommenden Proteinkomplexen ermöglicht (Wittig *et al.*, 2006).

4.1.1.1 Stabilität von Oxa1-FLAG-Varianten

In der vorliegenden Arbeit wurde die durchschnittliche Größe von Oxa1- bzw. Oxa1-W128F-enthaltenden Komplexen mit Hilfe der BN-PAGE analysiert. Hierfür kamen die Stämme zum Einsatz, die in der vorausgegangenen Doktorarbeit (Stoldt, 2010) verwendet wurden. Bei diesen Stämmen ist die genomische Kopie von *OXA1* deletiert und die Fusionsgene *OXA1-FLAG* und *oxa1-W128F-FLAG* werden unter der Kontrolle des *nativen OXA1-Promotors* von einem Plasmid exprimiert. In dieser Arbeit wird auf diese Stämme mit folgender Bezeichnung Bezug genommen: „*Δoxa1* (für BN-PAGE) mit *OXA1-FLAG*-Plasmid bzw. mit *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid“ (siehe Tab. 3.8).

Auf Grund der Verwendung von Fusionskonstrukten wurde zunächst überprüft, ob diese korrekt exprimiert werden und ob sie stabil sind. Sind Fusionsproteine instabil, werden sie proteolytisch verdaut und entstandene Abbauprodukte können zu verfälschten Ergebnissen der BN-PAGE führen. Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien aus dem Wildtyp *BY4741 WT* mit *Vektor2*, der als Kontrollstamm diente, sowie aus den *Δoxa1*-Stämmen (für BN-PAGE) mit *OXA1-FLAG*- bzw. mit *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid isoliert, die in Galaktose- oder Laktatmedium bei 30 °C kultiviert wurden. Die mitochondrialen Lysate wurden mittels Western-Analyse untersucht. Dazu wurden die Proteine über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mittels Nassblot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und unter Anwendung einer Immundetektion visualisiert.

Das Molekulargewicht der maturierten Form von Oxa1 beträgt ungefähr 40 kDa (Tab. 8.4) und das der Oxa1-FLAG-Varianten etwa 41 kDa (Tab. 8.3). Laut den Angaben des mitgeführten Größenstandards

für Proteine „Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) (Abb. 8.18) und durch den Einsatz eines FLAG-Antikörpers können Oxa1-FLAG und Oxa1-W128F-FLAG bei etwa 40 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4.1, A). Bei den weiteren sichtbaren Proteinbanden (Abb. 4.1, A: Markierung mit dem Sternsymbol) handelt es sich höchstwahrscheinlich nicht um Abbauprodukte der Oxa1-FLAG-Varianten, sondern um vom FLAG-Antikörper unspezifisch markierte Proteine, da diese Proteinsignale auch in der Gelspur des Wildtypstamms, der gar kein FLAG-Fusionskonstrukt exprimierte, zu verzeichnen sind.

Weiterhin fällt auf, dass Oxa1-W128F-FLAG unter Verwendung des FLAG-Antikörpers ein schwächeres Proteinsignal als Oxa1-FLAG aufweist. Durch einen zusätzlichen Nachweis mit Hilfe eines Oxa1-Antikörpers kann jedoch gezeigt werden, dass die Mengen des Wildtyp-Oxa1 und der Oxa1-FLAG-Varianten vergleichbar sind (Abb. 4.1, A). Die mit dem Kreissymbol (Abb. 4.1, A) gekennzeichneten Proteinsignale sind möglicherweise Abbauprodukten der Oxa1-FLAG-Varianten oder Proteinen zuzuordnen, die vom Oxa1-Antikörper unspezifisch erkannt wurden.

Abschließend wurde die Membran mit Antikörpern gegen die Ladekontrollen Tim50, Tom20 und Cyc1 dekoriert. Diese Proteine sind bei den erwarteten Molekulargewichten nachweisbar (Tab. 8.4) und zeigen, dass vergleichbare Mengen an Mitochondrien eingesetzt wurden (Abb. 4.1, A).

Da für die Analyse von Oxa1-enhaltenden Komplexen mittels BN-PAGE die Mitochondrien mit dem Detergens Digitonin (2,6 % (w/v)) solubilisiert werden sollten, wurde die Stabilität von Oxa1-FLAG und Oxa1-W128F-FLAG auch unter dem Einfluss von Detergentien überprüft. Hierfür wurden die isolierten Mitochondrien für 30 min mit 0,5 % (w/v) SDS bei RT bzw. mit 2,6 % (w/v) Digitonin bei 4 °C inkubiert. SDS fungierte als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Solubilisierung. Anschließend wurden die Lysate bei RT bzw. bei 4 °C zentrifugiert und die Proteine der Überstands- und Sedimentfraktionen mittels Western-Analyse untersucht.

Der Oxa1-Antikörper markiert Oxa1-FLAG und Oxa1-W128F-FLAG wie erwartet bei ca. 40 kDa und Wildtyp-Oxa1 bei einem etwas geringeren Molekulargewicht (Abb. 4.1, B). Neben den Oxa1-Signalen sind noch weitere Proteinbanden zu erkennen (Abb. 4.1, B: Markierung mit dem Kreissymbol), bei denen es sich möglicherweise um Oxa1-Abbauprodukte handelt. In den Gelspuren der Oxa1-FLAG-Proben sind die Signalintensitäten dieser Banden im Verhältnis zu denen der Oxa1-FLAG-Varianten vergleichbar und im Vergleich zu den sichtbaren Signalen in der Gelspur des Wildtyps nicht erhöht. Deshalb wird angenommen, dass die Detergentien keinen erkennbaren Einfluss auf die Stabilität der Fusionsproteine Oxa1-FLAG oder Oxa1-W128F-FLAG ausüben.

Tim50, Tom20 und Cyc1 sind mit Hilfe der entsprechenden Antikörper bei den erwarteten Molekulargewichten nachweisbar. Die Signale der Kontrollproteine zeigen zum einen, dass sich die Mengen der aufgetragenen Mitochondrien nur geringfügig unterscheiden, und zum anderen, dass die Mitochondrien mittels SDS vollständig solubilisiert werden, während bei der Behandlung mit Digitonin ein geringer Proteinanteil in der Sedimentfraktion zurückbleibt (Abb. 4.1, B).

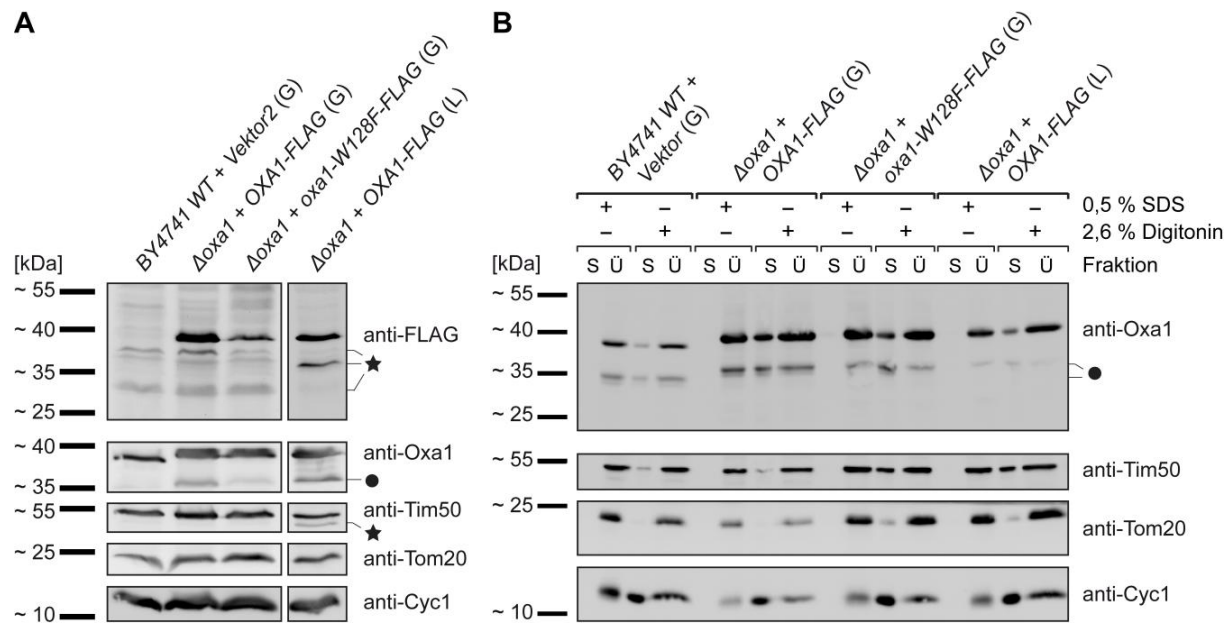


Abb. 4.1: Überprüfung der Stabilität der Oxa1-FLAG-Varianten.

Die Kultivierung des Wildtyps *BY4741 WT* mit *Vektor2* und der Δ *oxa1*-Stämme (für *BN-PAGE*) mit *OXA1-FLAG*- bzw. *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid erfolgte in Medium mit Galaktose (G) oder Laktat (L) bei 30 °C (A, B). (A) Die Lysate isolierter Mitochondrien wurden mittels Western-Analyse untersucht, wobei die Membran zunächst mit FLAG-Antikörper und danach mit Antikörpern gegen Oxa1, Tim50, Tom20 und Cyc1 dekoriert wurde. (B) Isolierte Mitochondrien wurden mit 0,5 % (w/v) SDS bzw. mit 2,6 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Mit Hilfe der Western-Analyse wurden die Proteine des Sediments (S) bzw. des Überstands (Ü) untersucht. Die Membran wurde erst mit Oxa1-Antikörper und danach mit Tim50-, Tom20- und Cyc1-Antikörpern dekoriert. (A) Unspezifische Proteinsignale (★). (A, B) Oxa1-Abbauprodukte oder unspezifische Proteinbanden (●).

Oxa1-FLAG bzw. Oxa1-W128F-FLAG weisen unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle oder dem eingesetzten Detergens im Vergleich zum Wildtyp-Oxa1 keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Proteinstabilität auf. Die Δ *oxa1*-Stämme (für *BN-PAGE*) mit *OXA1-FLAG*- bzw. mit *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid konnten für die *BN-PAGE* eingesetzt werden.

4.1.1.2 BN-PAGE zur Analyse von Oxa1-enhaltenden Komplexen

Um die durchschnittlichen Größen von Oxa1-Komplexen zu untersuchen, wurden die Δ *oxa1*-Stämme (für *BN-PAGE*) mit *OXA1-FLAG*- bzw. mit *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid in Galaktose- bzw. in Laktatmedium bei 30 °C angezogen. Des Weiteren kamen der Wildtypstamm *BY4741 WT* und der Δ *oxa1*-Stamm (für *BN-PAGE*), die beide *Vektor2* enthielten, zum Einsatz. Sie fungierten als Kontrollen und wurden ebenfalls in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Isolierte Mitochondrien wurden mit 2,6 % (w/v) Digitonin solubilisiert und über ein 4 → 16 % iges (w/v) BN-Polyacrylamidgel (Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Nass-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen und die Oxa1-FLAG-Varianten über eine Markierung mit FLAG-Antikörper visualisiert.

In den Gelspuren der Oxa1-FLAG-Proben wurden spezifisch Oxa1-enhaltende Komplexe markiert, da in der des Wildtyps *BY4741 WT* mit *Vektor2* und der des Δ *oxa1*-Stamms (für *BN-PAGE*) mit *Vektor2*, wie erwartet, kein signifikantes Proteinsignal sichtbar ist (Abb. 4.2, A).

Die Größen der Oxa1-FLAG-enthaltenden Komplexe variieren sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen über einen relativ großen Bereich. Laut den Angaben des mitgeführten Größenstandards für native Proteinkomplexe „Native Mark™ unstained Protein Standard“ (Novex, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Abb. 8.18) erstreckt sich dieser Größenbereich schätzungsweise von 150 kDa bis 600 kDa. Bei Wachstum mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Galaktose sind zwei starke Proteinsignale bei ca. 300 kDa und 400 kDa sowie ein schwächeres Signal bei etwa 500 kDa sichtbar. Im Vergleich dazu sind bei Wachstum mit der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Laktat drei relativ gleich starke Signale bei ungefähr 200 kDa, 300 kDa und 450 kDa sowie ein schwächeres Signal bei etwa 150 kDa zu erkennen. Im Gegensatz dazu betragen die durchschnittlichen Größen der Oxa1-W128F-FLAG-enthaltenden Komplexe zwischen 80 kDa und 450 kDa, wobei die zwei höchsten Signalintensitäten bei etwa 80 kDa und 160 kDa zu verzeichnen sind, die in ihren apparenten Größen im Bereich von Oxa1-Dimeren bzw. Oxa1-Tetrameren liegen (Abb. 4.2, A und B).

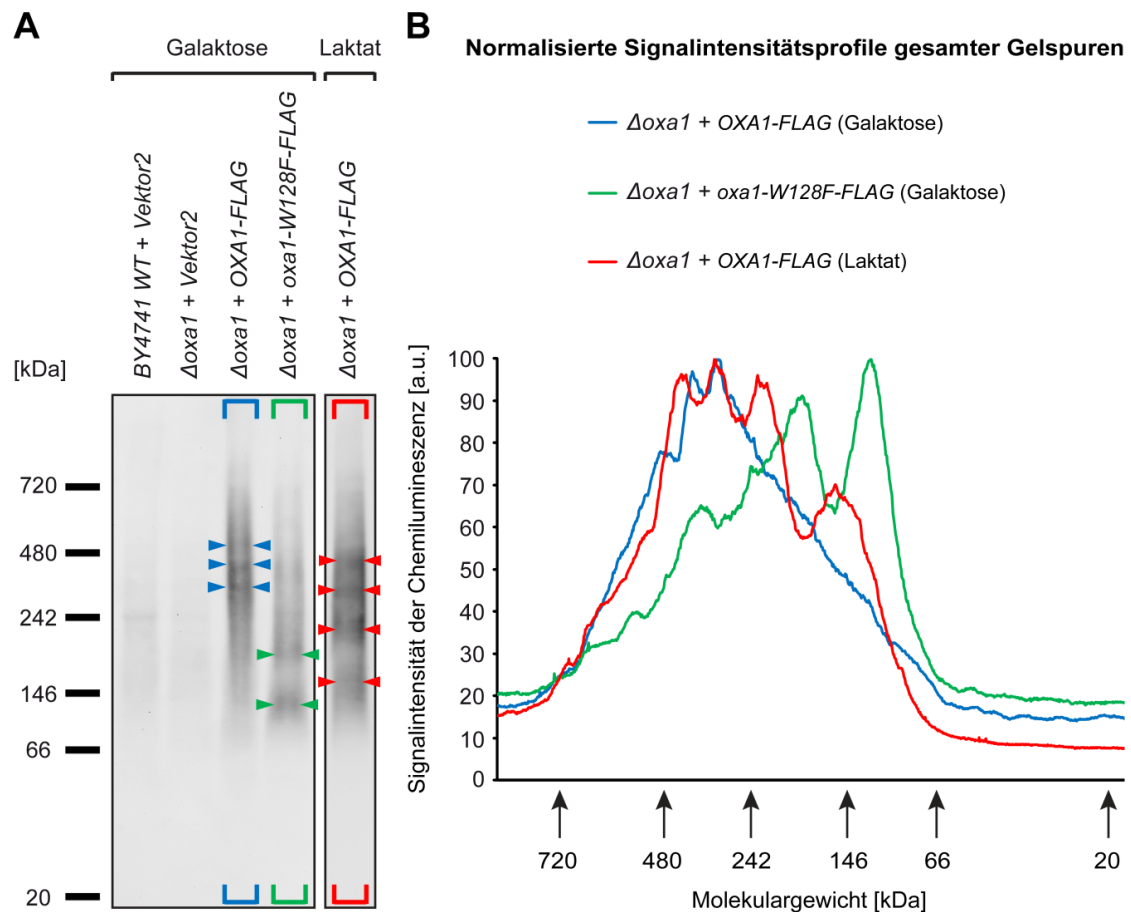


Abb. 4.2: Analyse der durchschnittlichen Größe von Oxa1-enthaltenden Proteinkomplexen.

(A) Der Wildtyp *BY4741 WT* mit *Vektor2* und die Δ *oxa1*-Stämme (für *BN-PAGE*) mit *Vektor2*, mit *OXA1-FLAG*- bzw. *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid wurden in Galaktose- oder Laktatmedium bei 30 °C kultiviert. Isolierte Mitochondrien wurden mit 2,6 % (w/v) Digitonin solubilisiert, die Lysate über *BN-PAGE* aufgetrennt und mittels Western-Analyse unter Verwendung des FLAG-Antiköpers untersucht. Die höchsten Signalintensitäten, die in einer Gelspur sichtbar sind, wurden mit Pfeilen markiert und entsprechen den Peaks des in (B) abgebildeten Graphen, der die normalisierten Intensitätsprofile der Chemilumineszenzsignale gesamter Gelspuren aus (A) darstellt: Δ *oxa1*-Stamm (für *BN-PAGE*) mit *OXA1-FLAG*-Plasmid (Galaktose) (blaue Kurve), mit *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid (Galaktose) (grüne Kurve) und mit *OXA1-FLAG*-Plasmid (Laktat) (rote Kurve).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ausschließlich die Mutation *oxa1-W128F* zu einer deutlichen Verringerung der durchschnittlichen Komplexgrößen führt. Auch wenn die Oxa1-enthaltenden Komplexe bei Wachstum mit Galaktose tendenziell geringfügig größer sind als bei Wachstum mit Laktat ist kein deutlicher Unterschied in den Komplexgrößen erkennbar. Sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen liegt der Großteil von Oxa1 in größeren Komplexen als die Variante Oxa1-W128F vor. Demnach scheint die Lokalisationsveränderung von Oxa1, die aus der Verwendung der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Laktat resultiert, einem anderen Regulationsmechanismus als die Verlagerung der Oxa1-Verteilung, die durch die Einführung der Mutation *oxa1-W128F* induziert wird, zu unterliegen.

4.1.2 Analyse von Oxa1-Komplexen und Oxa1-Interaktionen

Die mit Hilfe der BN-PAGE ermittelten Größen der Oxa1-enthaltenden Komplexe erstrecken sich sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen über einen Größenbereich von ungefähr 150 kDa bis 600 kDa. Es wäre möglich, dass die Komplexe mit einer Größe von ca. 150 kDa Tetramere von Oxa1 repräsentieren (Nargang *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2005) und dass in den höhermolekularen Komplexen Oxa1-Oligomere sowie weitere Proteine enthalten sind. Bei diesen Proteinen könnte es sich beispielsweise um Substrate von Oxa1 oder um Komponenten handeln, welche bei der Biogenese von Membranproteinen mit Oxa1 interagieren.

Bisher wurden für Oxa1 nur sehr wenige stabile Interaktionen, wie die mit anderen Oxa1-Proteinen (Reif *et al.*, 2005), dem mitochondrialen Ribosom (Szyrach *et al.*, 2003) oder dem Substrat Atp9 (Jia *et al.*, 2007), beschrieben. Um die Zusammensetzung der Oxa1-enthaltenden Komplexe zu untersuchen und mögliche transiente Bindungspartner zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit eine Koimmunopräzipitation in Verbindung mit einer massenspektrometrischen Analyse durchgeführt, die auf der Verwendung SILAC-markierter Mitochondrien basierte. Die Zellkultivierungstechnik SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture*) erlaubt einen quantitativen Vergleich der Proteome von zwei zu analysierenden Stämmen und ermöglicht so die Identifizierung von subtilen Unterschieden zwischen den Proteomen (de Godoy *et al.*, 2006; Ong & Mann, 2006). Unter Einsatz von Lysin- und Argininvarianten, die entweder mit leichten oder schweren Kohlenstoff- und Stickstoffisotopen markiert sind, wird eine bekannte Gewichtsveränderung in den Peptidpaaren zweier Proben erzeugt, die mit Hilfe von LC-MS/MS (Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie) detektiert und mit entsprechender Software quantifiziert werden kann.

Die Ergebnisse des vorhergehenden Kapitels zeigen, dass die Mutation *oxa1-W128F* zu einer Reduktion der Größen der Oxa1-enthaltenden Komplexe und deshalb womöglich auch zu einer Veränderung der Komplexkomposition durch gestörte Interaktionen führt. Durch den Vergleich der Proteome von *OXA1-FLAG* und *oxa1-W128F-FLAG* exprimierenden Zellen mittels SILAC-basierter LC-MS/MS-Analysen sollten die Oxa1-Varianten zum einen hinsichtlich ihrer Fähigkeit Homooligomere zu bilden, und zum anderen bezüglich weiterer potentieller Interaktionspartner, neben Oxa1, untersucht werden.

4.1.2.1 Erstellung und Überprüfung von *OXA1-FLAG*-Varianten exprimierenden Hefestämmen für SILAC-basierte LC-MS/MS-Analysen

Um sicherzustellen, dass die zu analysierenden Stämme die leichten bzw. schweren Varianten von Lysin und Arginin aus dem Medium (Tab. 3.11 und Tab. 3.12) aufnehmen und in neu synthetisierte Proteine einbauen, wurden zunächst die Gene *LYS2* und *ARG4* der Stämme deletiert.

Der für die BN-PAGE verwendete *OXA1-FLAG*-Stamm trug bereits eine Deletion im Gen *LYS2*. Um einen *oxa1-WI28F-FLAG* exprimierenden Stamm mit einer *LYS2*-Deletion zu erzeugen, wurde ein heterozygoter Klon (*BY4743*) als Ausgangsstamm eingesetzt. Bei diesem Stamm ist eines der *OXA1*-Allele sowie eines der *LYS2*-Allele deletiert und er enthält ein *oxa1-WI28F-FLAG*-Plasmid. Mit Hilfe einer Tetradenanalyse wurden haploide Sporen isoliert, welche die Deletionen von *OXA1* und *LYS2* sowie das *oxa1-WI28F-FLAG*-Plasmid trugen.

Im nächsten Schritt wurde die genomische Kopie von *ARG4* deletiert. Dazu wurde die *natMX*-Resistenzkassette gezielt an der Stelle des *ARG4*-Gens im Genom der *LYS2*- und *OXA1*-deletierten Stämme mit *OXA1-FLAG*- oder *oxa1-WI28F-FLAG*-Plasmid integriert.

Nachfolgend wurden die erstellten Stämme hinsichtlich der genomischen Deletion von *OXA1*, *LYS2* und *ARG4* überprüft. Zu diesem Zweck kamen zum einen eine PCR in Verbindung mit einer Agarosegel-Elektrophorese und zum anderen ein Wachstumstest auf Selektivmediumagarplatten zum Einsatz (siehe Kapitel 8.7 und 8.8). In den für SILAC erzeugten Stämmen wurde nachgewiesen, dass die genomische Kopie von *OXA1*, *LYS2* sowie *ARG4* erfolgreich deletiert ist und dass sie ein Expressionsplasmid enthalten, das für eine *OXA1-FLAG*-Variante kodiert. In dieser Arbeit wird auf diese Stämme mit folgender Bezeichnung Bezug genommen: „*Δoxa1* (für SILAC) mit *OXA1-FLAG*-Plasmid bzw. mit *oxa1-WI28F-FLAG*-Plasmid“ (siehe Tab. 3.8).

Im Anschluss wurde die Effizienz des Einbaus der schweren Lysin- und Argininvariante in neu synthetisierte Proteine überprüft. Dazu wurden die für SILAC erzeugten Stämme zunächst in Galaktosemedium, das leichtes $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$ -L-Lysin und $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_4$ -L-Arginin enthielt, angezogen und nach einem Tag in Galaktosemedium mit schwerem $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -L-Lysin und $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -L-Arginin umgeimpft. Nach weiteren 6 Tagen wurden von diesen Kulturen Zellysate hergestellt, welche über eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel wurden mittels Rotiblu-Färbung visualisiert. Eine prominente Proteinbande wurde aus dem Gel geschnitten und die daraus eluierten tryptischen Peptide mittels LC-MS/MS analysiert. Es wurde festgestellt, dass nach 6 Tagen Kultivierungsdauer eine fast 100 % ige Inkorporation der schweren Varianten von Lysin und Arginin an Stelle der leichten Varianten in neu synthetisierte Proteine stattgefunden hat (Daten nicht gezeigt).

4.1.2.2 Stabilität SILAC-markierter *Oxa1-FLAG*-Varianten

Da die *OXA1-FLAG* und *oxa1-WI28F-FLAG* exprimierenden Hefezellen für den quantitativen Vergleich ihrer Proteome in Medien mit leichten bzw. schweren Aminosäurevarianten kultiviert werden sollten, wurde als Nächstes überprüft, ob die SILAC-markierten *Oxa1-FLAG*-Varianten stabil

sind und ob sie sich wie Wildtyp-Oxa1 verhalten. Hierfür wurden die für SILAC hergestellten Stämme (siehe Kapitel 4.1.2.1) und der Wildtyp *BY4741 WT* mit *Vektor2* in Galaktosemedium mit leichten sowie schweren Aminosäuren bei 30 °C kultiviert (Tab. 3.11 und Tab. 3.12). Die Untersuchung der Lysate isolierter Mitochondrien erfolgte mittels Western-Analyse.

Die Oxa1-FLAG-Varianten weisen unabhängig vom verwendeten SILAC-Kultivierungsmedium ein Molekulargewicht von ca. 41 kDa auf (Tab. 8.3) und wurden mittels Oxa1-Antikörper bei ~ 40 kDa detektiert (Abb. 4.3, A). Die mit dem Kreissymbol gekennzeichneten Banden repräsentieren entweder Oxa1-Abbauprodukte oder vom Oxa1-Antikörper unspezifisch markierte Proteine (Abb. 4.3, A).

Um die Beladung des SDS-Polyacrylamidgels zu überprüfen, wurde die Membran mit Antikörpern gegen Tim50, Tom20 und Cyc1 dekoriert. Die Kontrollen sind bei den erwarteten Molekulargewichten (Tab. 8.4) zu erkennen und zeigen, dass etwa gleiche Proteinmengen geladen wurden. Beim Vergleich der Oxa1-Banden fällt jedoch auf, dass die Signalstärke von Oxa1-FLAG ungefähr der des Wildtyp-Oxa1 entspricht, aber dass die von Oxa1-W128F-FLAG leicht verringert ist, was möglicherweise auf einen höheren Umsatz von Oxa1-W128F-FLAG zurückgeführt werden kann (Abb. 4.3, A). Für die SILAC-basierte LC-MS/MS-Analyse war es ausschlaggebend, dass die Zielproteine Oxa1-FLAG und Oxa1-W128F-FLAG nach dem Mischen der Proben in gleicher Menge zueinander vorlagen. Deshalb wurde im Anschluss an die Koimmunopräzipitationen stets eine SDS-PAGE durchgeführt, die der Bestimmung der in den Eluaten enthaltenen Mengen an Oxa1-FLAG bzw. Oxa1-W128F-FLAG für eine gleichmäßige Mischung diene.

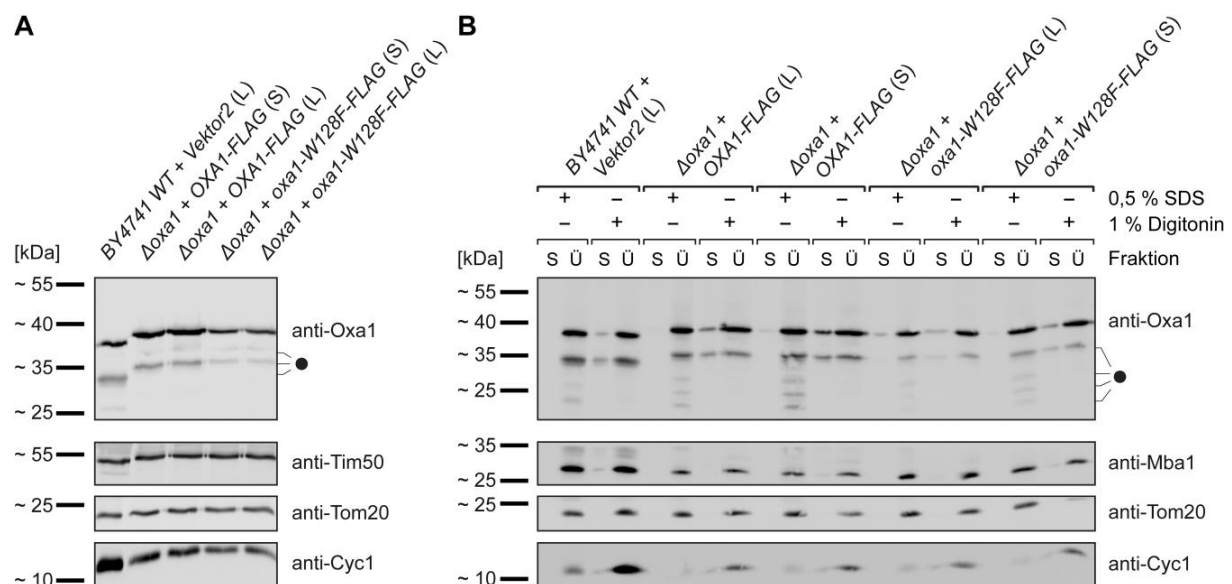


Abb. 4.3: Überprüfung der Stabilität der mit SILAC markierten Oxa1-FLAG-Varianten.

Der Wildtyp *BY4741 WT* mit *Vektor2* und die Δ oxa1-Stämme (für SILAC) mit *OXA1-FLAG*- bzw. *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid wurden in Galaktosemedium mit leichten (L) oder schweren (S) Aminosäuren bei 30 °C kultiviert (A, B). (A) Die Lysate isolierter Mitochondrien wurden mittels Western-Analyse untersucht und die Membran zuerst mit Oxa1-Antikörper und danach mit Antikörpern gegen Tim50, Tom20 und Cyc1 dekoriert. (B) Isolierte Mitochondrien wurden mit 0,5 % (w/v) SDS bzw. mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Mit Hilfe der Western-Analyse wurden die Proteine des Sediments (S) bzw. des Überstands (Ü) untersucht. Die Membran wurde erst mit Oxa1-Antikörper und danach mit Antikörpern gegen die Proteine Mba1, Tom20 und Cyc1 behandelt. (A, B) Oxa1-Abbauprodukte oder unspezifische Proteinbanden (●).

Weiterführend wurde die Stabilität von SILAC-markiertem Oxa1-FLAG und Oxa1-W128F-FLAG unter dem Einfluss von Detergentien analysiert, da die Mitochondrien für die Koimmunopräzipitationen mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert wurden. Zu diesem Zweck wurden die Mitochondrien, wie in Kapitel 4.1.1.1 aufgeführt, mit 0,5 % (w/v) SDS bei RT bzw. mit 1 % (w/v) Digitonin bei 4 °C behandelt. Die Sediments- und Überstandsfraktionen wurden mittels Western-Analyse unter Verwendung des Oxa1-Antikörpers sowie weiterer Kontrollantikörper untersucht.

Sowohl die Oxa1-FLAG-Varianten als auch die Kontrollproteine Mba1, Tom20 und Cyc1 konnten bei den erwarteten Molekulargewichten (Tab. 8.4) nachgewiesen werden. Die verwendeten Detergentien üben keinen erkennbaren Einfluss auf die Stabilität von Oxa1-FLAG und Oxa1-W128F-FLAG aus. Die Kontrollantikörper zeigen zum einen, dass die Solubilisierung mit SDS wie erwartet effizienter war und zum anderen, dass im Fall der Oxa1-FLAG-Proben etwas weniger und im Fall der Wildtyp-Proben etwas mehr Proteine als bei den Oxa1-W128F-FLAG-Proben auf das SDS-Polyacrylamidgel geladen wurden (Abb. 4.3, B).

Die im Kultivierungsmedium verwendeten leichten bzw. schweren Aminosäurevarianten von Lysin und Arginin sowie die Detergentien hatten keine Auswirkung auf die Stabilität von Oxa1-FLAG sowie Oxa1-W128F-FLAG. Deshalb wurden die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten SILAC-Stämme (siehe Kapitel 4.1.2.1) für die SILAC-basierten LC-MS/MS-Analysen eingesetzt.

4.1.2.3 SILAC-basierte LC-MS/MS-Analyse von Oxa1-Komplexen

Zur Untersuchung der Oxa1-enthaltenden Komplexe auf mögliche weitere Komponenten wurden zwei voneinander unabhängige SILAC-basierte LC-MS/MS-Analysen, die Vorwärts- und die Rückwärtsanalyse, in Zusammenarbeit mit Dr. Nikolov und Frau Raabe (Arbeitsgruppe „Bioanalytische Massenspektrometrie“, Prof. Dr. Urlaub, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Sowohl für die Vorwärts- als auch die Rückwärtsanalyse wurden Mitochondrien aus in Galaktosemedium bei 30 °C gewachsenen Hefestämmen isoliert. Im Zuge der Vorwärtsanalyse wurde der Δ oxa1-Stamm (für SILAC) mit OXA1-FLAG-Plasmid in Medium mit leichten Aminosäuren und der Δ oxa1-Stamm (für SILAC) mit oxa1-W128F-FLAG-Plasmid in Medium mit schweren Aminosäuren angezogen. Für die Rückwärtsanalyse erfolgte die Kultivierung dann umgekehrt. Die isolierten Mitochondrien wurden mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert und für eine Koimmunopräzipitation eingesetzt, die auf der Verwendung von FLAG-Antikörper gekoppelter Agarose beruhte. Die eluierten Proteine wurden für die Vorwärts- bzw die Rückwärtsanalyse so gemischt, dass die Zielproteine Oxa1-FLAG und Oxa1-W128F-FLAG in gleicher Menge zueinander vorlagen. Die Auftrennung der Gemische erfolgte mittels SDS-PAGE. Nachdem das SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie angefärbt wurde, wurde jede Gelspur in 23 Stücke gleicher Größe geschnitten. Die separierten Proteine wurden im Gel mittels Trypsin verdaut und die tryptischen Peptide mit LC-MS/MS untersucht. Die Rohdaten der zwei LC-MS/MS-Analysen wurden mit dem Programm

MaxQuant unter Zuhilfenahme der UniProt-Proteindatenbank für *S. cerevisiae* prozessiert und nach Nikolov *et al.* in die Software R importiert (Abb. 4.4, A) (Nikolov *et al.*, 2011). Abschließend wurden die normalisierten Werte der Intensitätsverhältnisse von schwer markiertem Peptid (S) zu leicht markiertem Peptid (L) der Vorwärts- und der Rückwärtsanalyse in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen. Alle Proteine mit einem Intensitätsverhältniswert (S/L) der Vorwärts- bzw. der Rückwärtsanalyse, der kleiner als der festgelegte Schwellenwert ± 1 ist, werden dem Hintergrund zugeordnet. Diese Proteine sind weder in der Oxa1-FLAG- noch in der Oxa1-W128F-FLAG-Probe angereichert (Abb. 4.4, B).

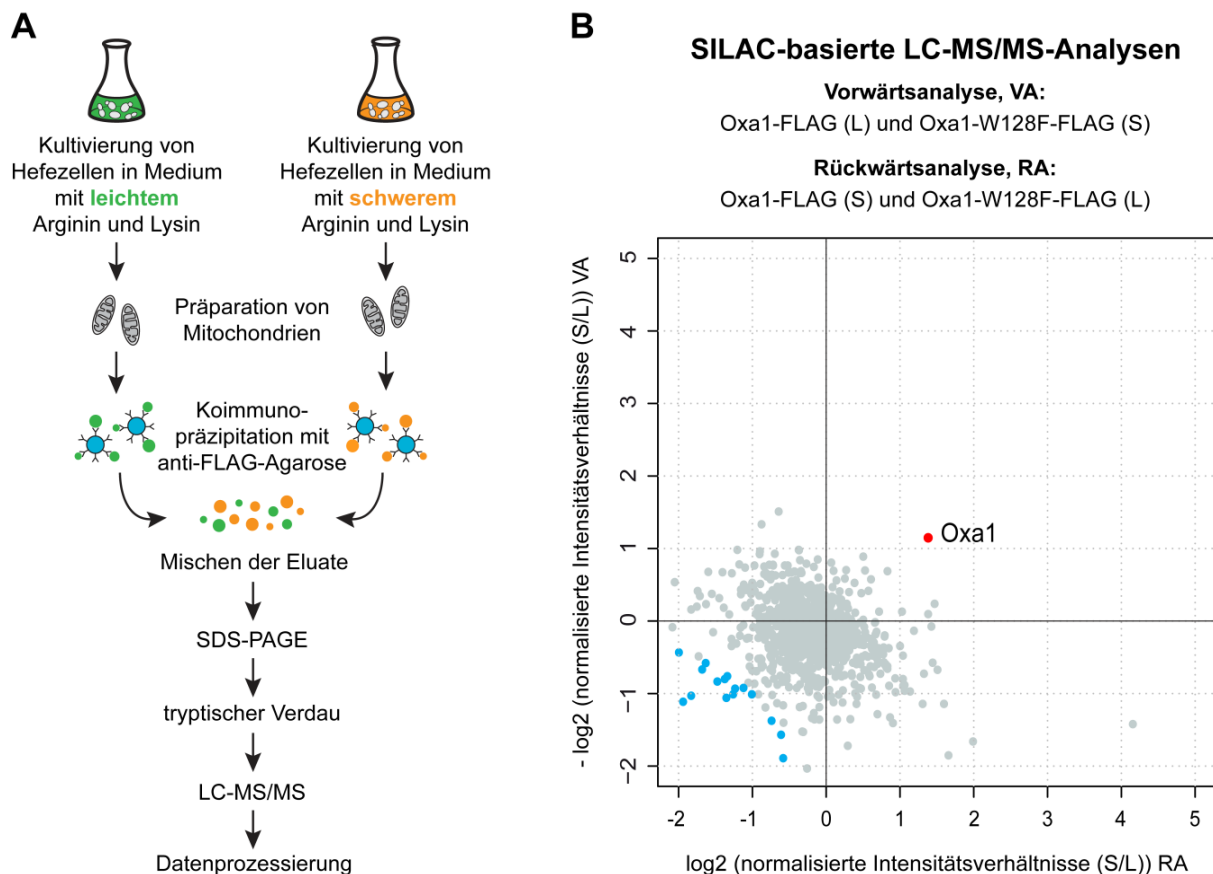


Abb. 4.4: Einfluss der Substitutionsmutation *oxa1-W128F* auf Oxa1-Komplexe und Oxa1-Interaktionen.

(A) Darstellung der SILAC-basierten LC-MS/MS-Analysen von Oxa1-Komplexen und Oxa1-Interaktionen, für welche die $\Delta oxa1$ -Stämme (für SILAC) mit OXA1-FLAG- bzw. *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid verwendet wurden. (B) Das Streudiagramm zeigt die Korrelation der normalisierten Werte der Intensitätsverhältnisse (S/L) von schwer markiertem (S) zu leicht markiertem Peptid (L) der Vorwärts- (VA) und Rückwärtsanalyse (RA). Roter Punkt: mit Oxa1-FLAG angereichertes Oxa1-Protein (wahrer Treffer). Blaue Punkte: mit Oxa1-W128F-FLAG angereicherte Proteine (unspezifische Treffer). Graue Punkte: falsch-positive Treffer oder Hintergrundproteine. Vorwärtsanalyse, VA: Oxa1-FLAG (L), Oxa1-W128F-FLAG (S); Rückwärtsanalyse, RA: Oxa1-FLAG (S), Oxa1-W128F-FLAG (L). Die normalisierten Werte der Intensitätsverhältnisse (S/L) der VA wurden für die grafische Darstellung invertiert, so dass sie den numerischen Werten der RA entsprechen.

Das Streudiagramm ist in vier Quadranten aufgeteilt, wobei der Quadrant oben links sowie der unten rechts neben Hintergrundproteinen auch falsch-positive Proteintreffer zeigt (Abb. 4.4, B). Diese Proteine weisen zwar einen Intensitätsverhältniswert (S/L) größer ± 1 auf, jedoch keine spezifische Anreicherung mit einem der beiden Oxa1-Zielproteine. Sie liegen sowohl in der Vorwärts- als auch

der Rückwärtsanalyse stets in der leichten oder der schweren Probe vor (siehe Streudiagramme der Vorwärts- bzw. Rückwärtsanalyse in Abb. 8.16 und Abb. 8.17).

Im unteren linken Quadranten sind die Proteintreffer dargestellt, für die sowohl in der Vorwärts- als auch in der Rückwärtsanalyse eine Anreicherung in der Oxa1-W128F-FLAG-Probe zu verzeichnen ist (Abb. 4.4, B; blaue Punkte). Da jedoch ausschließlich nicht-mitochondriale Proteine, wie zum Beispiel das Kernporenprotein Nup145, identifiziert wurden, wird angenommen, dass es sich bei diesen Proteinen um Verunreinigungen und demzufolge nicht um echte Interaktionspartner von Oxa1-W128F-FLAG handelt.

Im oberen rechten Quadranten ist der einzige echte Proteintreffer dieser Untersuchung abgebildet (Abb. 4.4, B; roter Punkt). Es handelt sich dabei um Oxa1 selbst, welches sowohl in der Vorwärts- als auch in der Rückwärtsanalyse in der Oxa1-FLAG-Probe angereichert ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Oxa1-FLAG-Proteine effizienter aneinander binden, d. h. oligomerisieren, als Oxa1-W128F-FLAG-Proteine. Dieses Resultat konnte in drei voneinander unabhängigen Versuchen, die jeweils aus einer Vorwärts- sowie einer Rückwärtsanalyse bestanden, reproduziert werden.

Mit Hilfe der SILAC-basierten LC-MS/MS-Analysen konnten neben Oxa1 selbst keine weiteren Interaktionspartner identifiziert werden, was zum Beispiel auf die Tatsache zurückgeführt werden kann, dass Oxa1 nur sehr transiente und nicht-stabile Proteinbindungen eingeht und womöglich hauptsächlich als Homooligomer fungiert. Des Weiteren unterstützen diese Daten das Ergebnis der BN-PAGE (Abb. 4.2). Die kleineren Oxa1-W128F-Komplexe stehen möglicherweise mit einer Beeinträchtigung der Oligomerisierung von Oxa1-W128F-Proteinen in Zusammenhang.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Oxa1 eine heterogene submitochondriale Verteilung aufweist, die nicht nur von den Wachstumsbedingungen abhängig ist, sondern auch gezielt durch Einführung der Mutation *oxa1-W128F* verschoben werden kann (Stoldt, 2010; Stoldt *et al.*, 2012).

Die Annahme, dass die dynamische, von der Kohlenstoffquelle abhängige, Verlagerung der Oxa1-Verteilung mit einer Veränderung der Oxa1-Komplexgrößen in Verbindung steht, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Sowohl die Größen der Oxa1-Komplexe, die durch Wachstum mit Galaktose präferiert in der inneren Grenzflächenmembran lokalisieren, als auch die Größen der Oxa1-Komplexe, die durch Wachstum mit Laktat in der Cristaemembran angereichert sind, liegen zwischen 150 kDa und 600 kDa, während sich die Größen der Oxa1-W128F-enthaltenden Komplexe in einem Bereich von 80 kDa bis 450 kDa erstrecken. Zusammen mit den aus der Literatur bekannten Daten bezüglich der Oxa1-Komplexgrößen (Nargang *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2009; Krüger *et al.*, 2012) deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei den beobachteten Komplexen mit einer Größe von etwa 80 kDa um Oxa1-Dimere und bei denen mit einer Größe von ca. 160 kDa um Oxa1-Tetramere handeln könnte. Demzufolge bildet Oxa1-W128F wahrscheinlich vorwiegend Dimere oder Tetramere aus, während Oxa1 sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen mindestens als Tetramer vorzuliegen scheint.

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob Oxa1 neben anderen Oxa1-Proteinen auch mit weiteren Proteinen interagiert. Mit Hilfe der SILAC-basierten Interaktionsstudie konnten jedoch, neben Oxa1 selbst, keine weiteren Bindungspartner von Oxa1 identifiziert werden. Daraus lässt sich schließen, dass Oxa1 keine stabilen Komplexe mit weiteren Proteinen bildet. Möglicherweise agiert Oxa1 hauptsächlich in Form von größeren Homooligomeren. Diese Annahme wird sowohl durch die Daten der BN-PAGE als auch durch das Ergebnis der SILAC-basierten Interaktionsstudie unterstützt. Es wurde beobachtet, dass Oxa1-W128F-Proteine im Vergleich zu Oxa1 Proteinen nur mit einer verminderten Effizienz aneinander binden. Es wäre denkbar, dass es infolge der Mutation *oxa1-W128F* zu einer Strukturveränderung des Oxa1-Proteins kommt, welche die Bildung von größeren Oxa1-W128F-Oligomeren stört und so zu den beobachteten verringerten Größen von Oxa1-W128F-enthaltenden Komplexen führt, die mit den Größen von Oxa1-Dimeren und Oxa1-Tetrameren übereinstimmen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass es neben Oxa1 noch weitere Innenmembranproteine gibt, die eine ähnliche Rolle bei der Biogenese der Mitochondrien einnehmen (He & Fox, 1999; Souza *et al.*, 2000; Broadley *et al.*, 2001; Preuss *et al.*, 2001; Frazier *et al.*, 2006). Da für Oxa1 ein dynamisches Lokalisationsverhalten nachgewiesen wurde, welches komplexen Regulationsmechanismen zu unterliegen scheint (Stoldt, 2010; Stoldt *et al.*, 2012; diese Arbeit), stellt sich die Frage, ob auch andere an der Proteininsertion beteiligte Komponenten eine dynamisch regulierte Verteilung in der inneren mitochondrialen Membran, wie Oxa1, aufweisen.

4.2 Submitochondriale Verteilung von an der Membraninsertion beteiligten Proteinen

In *S. cerevisiae* stellen die Proteine Mba1 und Pnt1, neben Oxa1, möglicherweise weitere Wege für die Insertion von Proteinen in die innere mitochondriale Membran bereit. Beide Proteine werden mit der Sortierung von mitochondrial kodierten Atmungskettenkomponenten in Verbindung gebracht, wobei sie jedoch in unterschiedlichen Komplexen agieren (Bonney *et al.*, 2009; Ott & Herrmann, 2010). Es wird vermutet, dass Mba1 und Mdm38 einen gemeinsamen Komplex bilden, der an der Proteininsertion beteiligt ist, und dass Pnt1 in einem Insertionskomplex mit Cox18 und Mss2 vorliegt (Saracco & Fox, 2002; Bauerschmitt *et al.*, 2010).

Wie für Oxa1, wurde für Mba1 (Schmitz-Salue, 2007) und Pnt1 (unveröffentlichte Daten, S. Stoldt) bei Wachstum mit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle eine heterogene Proteinverteilung mit einer bevorzugten Lokalisation in der inneren Grenzflächenmembran beobachtet.

Daher wurde in dieser Arbeit die Fragestellung bearbeitet, ob auch die Proteinverteilung von Mba1 und Pnt1 einer dynamischen Regulation in Abhängigkeit von der verwendeten Kohlenstoffquelle unterliegt. Dazu wurde neben der konfokalmikroskopischen Analyse von genetisch vergrößerten Mitochondrien *in vivo* auch die Elektronenmikroskopie in fixierten *S. cerevisiae*-Zellen angewandt.

4.2.1 Mikroskopische Techniken zur Analyse der submitochondrialen Proteinverteilung in *S. cerevisiae*-Zellen

Durch den Einsatz lichtmikroskopischer Techniken ist es möglich, mit einem relativ geringen Zeitaufwand die Lokalisation vieler Fusionsproteine innerhalb von Zellen, auch unter verschiedenen physiologischen Bedingungen, zu analysieren. Die Auflösung konventioneller Lichtmikroskope ist nach dem Abbe'schen Gesetz durch Beugung begrenzt (Abbe, 1873) und ist neben der Wellenlänge des Lichts auch vom Brechungsindex des Immersionsmediums sowie vom Öffnungswinkel des Objektivs abhängig. Demnach können mit Hilfe der konfokalen Lichtmikroskopie zwei Strukturen nur als voneinander getrennt wahrgenommen werden, wenn sie in lateraler Richtung einen Abstand von mindestens 200 nm zueinander aufweisen. Da der Durchmesser mitochondrialer Tubuli jedoch nur 200 nm bis 400 nm beträgt (Hoffmann & Avers, 1973; Egner *et al.*, 2002), ist es unter normalen Umständen nicht möglich mitochondriale Substrukturen oder submitochondriale Proteinverteilungen mittels konventioneller Konfokalmikroskopie zu untersuchen. Infolge dessen wurden in dieser Arbeit im Rahmen der konfokalmikroskopischen Lokalisationsanalysen von Fusionsproteinen *S. cerevisiae*-Zellen eingesetzt, die auf Grund der Deletion von *MDM10* (*Mitochondrial Distribution and Morphology protein 10*) Mitochondrien mit einer modifizierten Struktur aufweisen (Sogo & Yaffe, 1994; Wurm & Jakobs, 2006; Suppanz *et al.*, 2009; Stoldt *et al.*, 2012).

MDM10-deletierte Zellen zeichnen sich an Stelle des tubulären mitochondrialen Netzwerks durch Mitochondrien mit einer kugelförmigen Morphologie und einem vergrößerten Durchmesser von etwa 0,5 bis 2,5 μm aus (Abb. 4.5). Diese genetisch veränderten Mitochondrien besitzen weiterhin eine äußere und innere Mitochondrienmembran sowie eine ausgeprägte Cristastruktur (Sogo & Yaffe, 1994). Der Einsatz von Mitochondrien, die einen Durchmesser dieser Größenordnung aufweisen, erlaubt es konfokalmikroskopisch zu differenzieren, ob ein Fusionsprotein in der inneren Grenzflächenmembran oder der Cristaemembran angereichert ist. Ist ein Fusionsprotein in der inneren Grenzflächenmembran angereichert, erscheinen die vergrößerten Mitochondrien hohlkugelförmig. Bei einer gleichmäßigen Proteinverteilung in der inneren Membran oder einer Anreicherung in der Cristaemembran sind sie als gefüllte Kugeln zu erkennen (Abb. 4.5).

Genetisch vergrößerte Mitochondrien sind trotz der morphologischen Veränderung atmungskompetent, besitzen einen funktionierenden Proteinimport und sind weiterhin in der Lage ein Membranpotential aufzubauen (Sogo & Yaffe, 1994; Boldogh *et al.*, 1998; Meisinger *et al.*, 2004).

Weitere Studien haben gezeigt, dass nach einer gewissen Zeit ein Verlust der mitochondrialen DNS (Boldogh *et al.*, 1998; Dimer *et al.*, 2005) oder eine Komplementierung des Phänotyps der *MDM10*-Deletion auftreten kann. Deshalb wurde die Deletion von *MDM10* stets unmittelbar vor der Verwendung der zu analysierenden *S. cerevisiae*-Zellen durchgeführt.

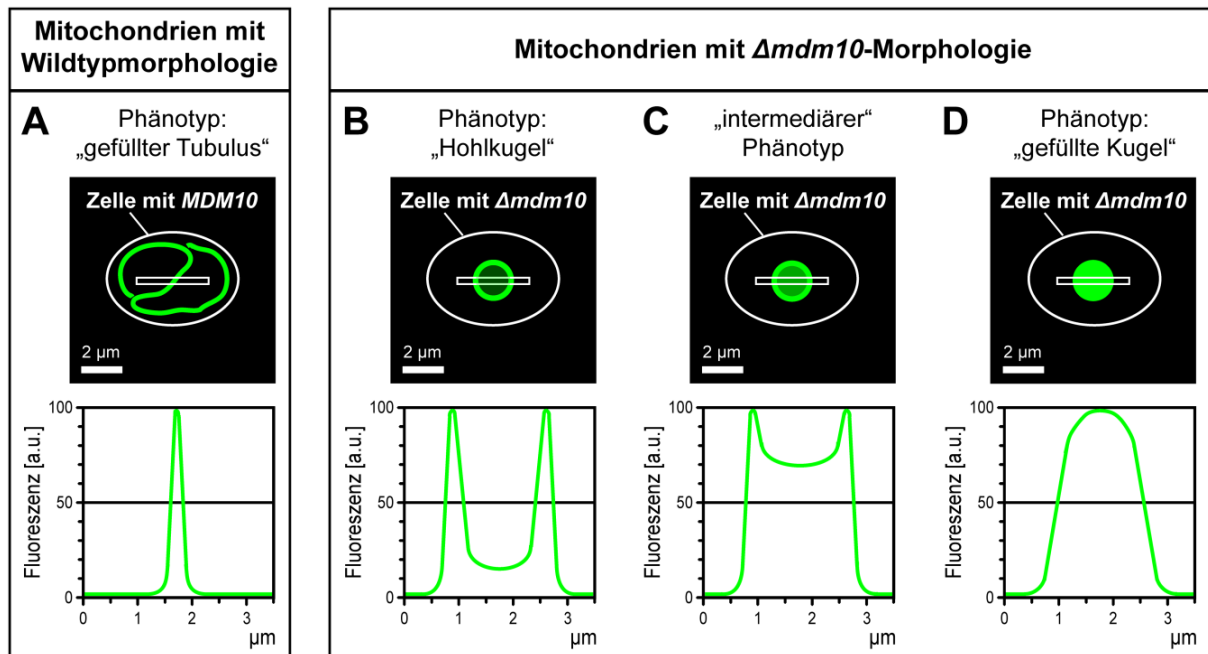


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der möglichen Phänotypen genetisch vergrößerter Mitochondrien.

Es sind jeweils im realistischen Maßstab ein schemenhaftes Fluoreszenzbild mit einer Hefezelle, die ein mitochondriales *GFP*-Fusionsgen exprimiert, sowie ein Intensitätsprofil des Fluoreszenzsignals abgebildet. Der weiße Kasten markiert den Bereich im Mitochondrium, der für die Intensitätsprofilierung verwendet wurde. Die Zelle mit *MDM10* weist ein tubuläres Mitochondrienetzwerk auf (A) und die Zellen mit *MDM10*-Deletion kugelförmige Mitochondrien mit einem vergrößerten Durchmesser (B, C, D). (A) „gefüllter Tubulus“: Die submitochondriale Lokalisation des Fusionsproteins ist nicht zu erkennen. (B) „Hohlkugel“: Das Fusionsprotein lokalisiert bevorzugt in der inneren Grenzflächenmembran und ist deshalb am Rand des Mitochondriums zu finden. (C) „intermediärer“ Phänotyp: Das Fusionsprotein ist vermutlich gerade noch in der inneren Grenzflächenmembran angereichert, weshalb das GFP-Signal am Rand des Mitochondriums etwas stärker als im Inneren ist. (D) „gefüllte Kugel“: Das Fusionsprotein ist entweder homogen in der inneren Membran verteilt oder liegt präferentiell in der Cristaemembran vor, weshalb es im Inneren des Mitochondriums lokalisiert.

In früheren Studien wurde außerdem das Risiko beschrieben, dass es bei der Verwendung von *MDM10*-deletierten Zellen zu einem Verlust der Cristastruktur im Inneren der vergrößerten Mitochondrien kommen kann, was in der Misslokalisierung eines Proteins am Rand resultieren würde (Wurm, 2008; Stoldt, 2010). Um fehlerhafte Cristastrukturen zu identifizieren, wurde *Qcr2* (*Cor2*) als „Cristae-Marker“ eingesetzt, da es als Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Reduktase (KomplexIII) in der Cristaemembran angereichert ist (Gilkerson *et al.*, 2003). In den zu verwendenden Zellen wurde das genomische *QCR2*-Gen mit dem Gen *mRFP*, das für das monomere rot fluoreszierende Protein kodiert, fusioniert. Demnach weisen genetisch vergrößerte Mitochondrien mit einer intakten Cristastruktur eine Anreicherung von *Qcr2*-mRFP in ihrem Inneren auf und sind als gefüllte Kugeln zu erkennen (Wurm & Jakobs, 2006; Suppanz *et al.*, 2009; Stoldt *et al.*, 2012).

Um die mit Hilfe von genetisch vergrößerten Mitochondrien gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Proteinlokalisierung von Fusionsproteinen zu überprüfen und zu quantifizieren, wurde die Elektronenmikroskopie eingesetzt. Sie ermöglichte die Analyse von Proteinverteilungen in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie in fixierten *S. cerevisiae*-Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Dr. Wenzel (Arbeitsgruppe „Elektronenmikroskopie“, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Hefen in Galaktose- oder Laktatmedium bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und einer Kryofixierung unterzogen (Tokuyasu, 1973). Die auf der Oberfläche der Ultradünnschnitte vorhandenen Antigene wurden mittels Immunmarkierung nachgewiesen. Dafür wurden primäre GFP- oder FLAG-Antikörper in Verbindung mit Goldpartikeln eingesetzt, die entweder mit Protein A oder sekundären Antikörpern gekoppelt waren. Für die Quantifikation submitochondrialer Proteinverteilungen wurden zwischen 50 und 170 individuelle Goldpartikel in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgewertet. Dazu wurde jeweils die kürzeste Distanz von der Mitte eines Goldpartikels zur inneren Grenzflächenmembran (IGM) des Mitochondriums ermittelt. Goldpartikel, die einen Abstand von ≤ 20 nm zur IGM aufwiesen, wurden mit einer Lokalisation in der IGM gewertet. War der gemessene Abstand zur IGM größer als 20 nm, wurde die Lokalisation der Goldkugel der Cristaemembran (CM) oder dem Zytoplasma der Zelle zugeordnet (Suppanz *et al.*, 2009; Stoldt *et al.*, 2012).

Des Weiteren wurde das Membranlängenverhältnis der IGM zur CM, das von der verwendeten Kohlenstoffquelle abhängt, in die Auswertung mit einbezogen. Bei Wachstum mit Galaktose beträgt es ungefähr 1 : 1 und bei Wachstum mit Laktat etwa 1 : 1,5, weshalb die ermittelten Prozentwerte für die Anreicherung in der IGM zur Korrektur mit dem Faktor 1,5 multipliziert wurden (Vogel *et al.*, 2006; Suppanz *et al.*, 2009; Stoldt *et al.*, 2012).

4.2.2 Submitochondriale Verteilung von Mba1 und Pnt1

Die Verteilung von Mba1 und Pnt1 unter fermentativen Wachstumsbedingungen wurde als Erstes mit Hilfe der Konfokalmikroskopie unter Verwendung vergrößerter Mitochondrien analysiert. Dazu kamen die Stämme der „Yeast Knock-out Deletion Collection“ (YKODC) (Giaever *et al.*, 2002) zum Einsatz, bei denen die genomische Kopie des *MBA1*-Gens bzw. des *PNT1*-Gens deletiert ist. Die in die YKODC-Stämme eingebrachten Expressionsplasmide kodierten für die Fusionsgene *MBA1-GFP* bzw. *PNT1-GFP*, die unter der Kontrolle ihres *nativen Promotors* standen (Tab. 3.7). Um vergrößerte Mitochondrien zu erzeugen, wurde *MDM10* im $\Delta mba1$ -Stamm (YKODC) mit *MBA1-GFP*-Plasmid sowie im $\Delta pnt1$ -Stamm (YKODC) mit *PNT1-GFP*-Plasmid deletiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf Agarplatten mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose bei 30 °C kultiviert. Nach vier Tagen wurden hochgewachsene Kolonien direkt von der Glukoseplatte genommen und konfokalmikroskopisch *in vivo* analysiert.

Sowohl für Mba1-GFP (Abb. 4.6, A) als auch für Pnt1-GFP (Abb. 4.6, B) ist eine Anreicherung am Rand der genetisch vergrößerten Mitochondrien zu beobachten, welche deshalb hohlkugelförmig erscheinen. Diese Daten bestätigen die Beobachtung der vorausgegangenen Studien (Schmitz-Salue, 2007; unveröffentlichte Daten, S. Stoldt) und deuten darauf hin, dass Mba1 und Pnt1 unter fermentativen Wachstumsbedingungen präferentiell in der inneren Grenzflächenmembran lokalisieren.

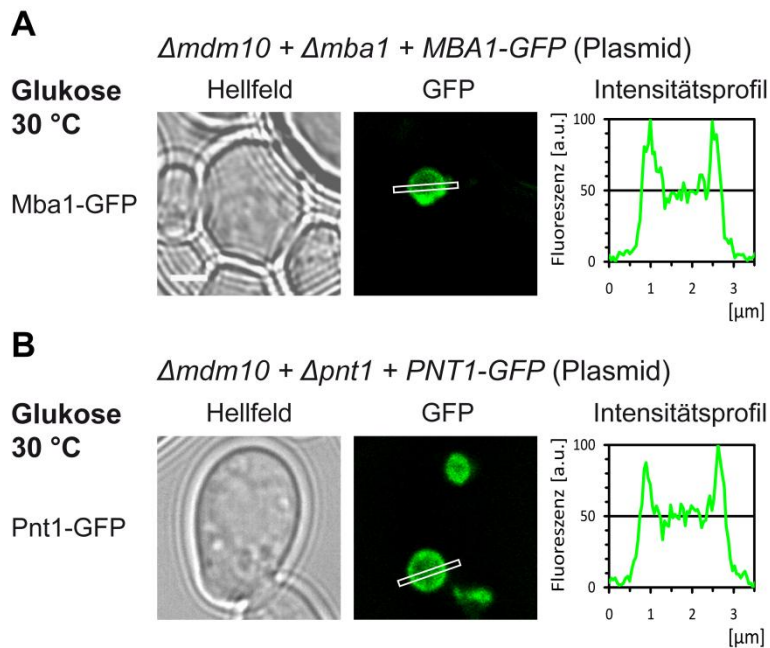


Abb. 4.6: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP und Pnt1-GFP in vergrößerten Mitochondrien unter fermentativen Bedingungen.

Die Hefestämme $\Delta mba1$ (YKODC) mit *MBA1-GFP*-Plasmid (A) und $\Delta pnt1$ (YKODC) mit *PNT1-GFP*-Plasmid (B) wurden auf Glukoseplatten bei 30 °C kultiviert. Unter fermentativen Bedingungen lokalisieren Mba1-GFP (A) und Pnt1-GFP (B) am Rand der vergrößerten Mitochondrien. Von links nach rechts sind jeweils das Hellfeldbild, das GFP-Fluoreszenzbild sowie ein Intensitätsprofil des Fluoreszenzsignals dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 μm .

Zur Klärung der Fragestellung, ob neben Oxal auch Mba1 und Pnt1 eine dynamische Verteilung in Abhängigkeit von der verwendeten Kohlenstoffquelle aufweisen, wurde eine elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse in Mitochondrien mit tubulärer Morphologie durchgeführt. Hierfür wurden der $\Delta mba1$ -Stamm (YKODC) mit *MBA1-GFP*-Plasmid und der $\Delta pnt1$ -Stamm (YKODC) mit *PNT1-GFP*-Plasmid zum einen in Medium mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Galaktose und zum anderen in Medium mit der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Laktat bei 30 °C kultiviert. Die Detektion der GFP-Fusionsproteine erfolgte über eine Immunmarkierung, bei der Antikörpergekoppelte Goldpartikel eingesetzt wurden.

Unter fermentativen Wachstumsbedingungen ergibt sich für Mba1-GFP nach einer Auswertung von 87 Goldpartikeln eine Verteilung von 55 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 45 % in der Cristaemembran (Abb. 4.7, A). Für Pnt1-GFP wurde bei 159 ausgewerteten Goldpartikeln eine Verteilung von 77 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 23 % in der Cristaemembran gefunden (Abb. 4.7, B). Demzufolge liegt für Mba1 sowie Pnt1 unter fermentativen Bedingungen eine Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran vor, was die konfokalmikroskopischen Daten der vergrößerten Mitochondrien (Abb. 4.6) bestätigt.

Unter respiratorischen Wachstumsbedingungen wurden für Mba1-GFP insgesamt 263 Goldpartikel ausgewertet, von denen 44,5 % der inneren Grenzflächenmembran und 55,5 % der Cristaemembran zuzuordnen sind. Für Pnt1-GFP wurden insgesamt 115 Goldpartikel ausgewertet, von denen 33 % in der inneren Grenzflächenmembran und 67 % in der Cristaemembran zu finden sind. Unter Einbeziehung des unter respiratorischen Wachstumsbedingungen auftretenden Membranlängenverhältnisses IGM : CM von 1 : 1,5 ergibt sich für Mba1-GFP ein Verteilungsverhältnis von 54,5 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 45,5 % in der Cristaemembran (Abb. 4.7, C) und für Pnt1-GFP von 42,5 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 57,5 % in der Cristaemembran (Abb. 4.7, D).

Folglich ist für Mba1 unter respiratorischen Bedingungen ebenfalls eine leichte Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran zu verzeichnen. Die bevorzugte Lokalisation von Pnt1 verschiebt sich jedoch deutlich von der inneren Grenzflächenmembran zur Cristaemembran hin.

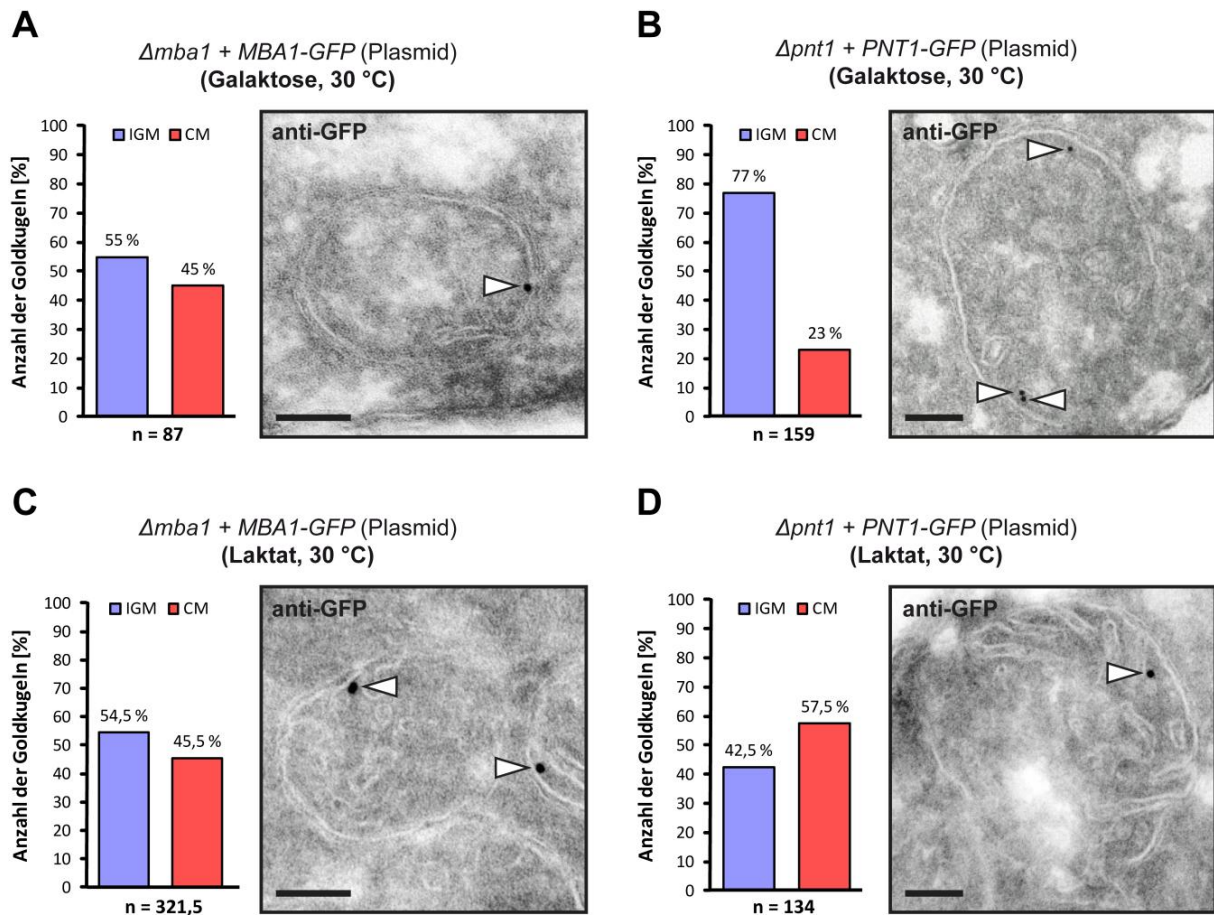


Abb. 4.7: Elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP und Pnt1-GFP in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie unter dem Einfluss der verwendeten Kohlenstoffquelle.

Der $\Delta mba1$ -Stamm (YKODC) mit *MBA1-GFP*-Plasmid (A, C) und der $\Delta pnt1$ -Stamm (YKODC) mit *PNT1-GFP*-Plasmid (B, D) wurden entweder in Medium mit Galaktose (A, B) oder Laktat (C, D) bei 30 °C kultiviert. Unter fermentativen Bedingungen sind Mba1-GFP und Pnt1-GFP in der IGM angereichert (A, B). Unter respiratorischen Bedingungen lokalisiert Mba1-GFP bevorzugt in der IGM (C) und Pnt1-GFP in der CM (D). Gezeigt sind jeweils eine statistische Auswertung der Proteinverteilung (links) sowie eine repräsentative Aufnahme (rechts). Zum Nachweis wurden die Fusionsproteine immunologisch mit Goldpartikeln markiert (Pfeile). IGM (innere Grenzflächenmembran) und CM (Cristaemembran). Größenstandard = 100 nm.

Zusammenfassend konnte durch die elektronenmikroskopischen Lokalisationsstudien gezeigt werden, dass für Pnt1 eine dynamische Verlagerung der Proteinverteilung innerhalb der inneren Membran in Abhängigkeit von der verwendeten Kohlenstoffquelle stattfindet, wie es bereits für Oxa1 beschrieben wurde (Stoldt *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu steht die Lokalisation von Mba1, die sich von den Wachstumsbedingungen unabhängig zeigte (Abb. 4.7 und Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie ermittelte Proteinverteilungen von Mba1, Pnt1 und Oxa1 unter fermentativen und respiratorischen Wachstumsbedingungen.

Fusionsprotein	Proteinverteilung unter fermentativen Bedingungen		Proteinverteilung unter respiratorischen Bedingungen		Lokalisationsverschiebung
	IGM	CM	IGM	CM	
Mba1-GFP	55 %	45 %	54,5 %	45,5 %	nein (diese Studie)
Pnt1-GFP	77 %	23 %	42,5 %	57,5 %	ja (diese Studie)
Oxa1-FLAG	79 %	21 %	39 %	61 %	ja (Stoldt <i>et al.</i> , 2012)

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Funktionen von Oxa1, Pnt1 und Mba1 bei der mitochondrialen Biogenese wenigstens teilweise überlappen. So wurde beispielsweise für alle drei Proteine eine Beteiligung bei der Biogenese von Cox2, der Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase (KomplexIV), beschrieben (He & Fox, 1997; He & Fox, 1999; Preuss *et al.*, 2001; Fiumera *et al.*, 2007; Bonnefoy *et al.*, 2009; Ott & Herrmann, 2010). Da Mba1 jedoch ein anderes Lokalisationsverhalten als Pnt1 und Oxa1 zeigte, wäre es anzunehmen, dass sich die drei Proteine hinsichtlich weiterer Substrate sowie der Insertions- bzw. Assemblierungsorte dieser Substrate innerhalb der inneren Membran voneinander unterscheiden. Eine nähere Charakterisierung der Mba1-Verteilung sowie der zu Grunde liegenden Mechanismen könnte demnach sowohl Hinweise auf Stellen in der inneren Membran liefern, an denen die Insertion bzw. Assemblierung von Substraten des Mba1-enthaltenden Komplexes stattfindet, als auch Aufschluss über die Aufenthaltsorte verschiedener Komplexstadien oder sogar von Superkomplexen der oxidativen Phosphorylierung geben.

4.3 Grundlagen der submitochondrialen Verteilung von Mba1 in der inneren mitochondrialen Membran

Als Bestandteil der Proteinmaschinerie, die für eine effiziente Insertion neu synthetisierter Proteine in die innere Membran benötigt wird, interagiert Mba1 sowohl mit mitochondrialen Ribosomen als auch mit mitochondrialen Translationsprodukten (Preuss *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006; Bauerschmitt *et al.*, 2010; Gruschke *et al.*, 2010). Über Domänen, die für die Lokalisation oder die Ausübung der Funktionen von Mba1 eine Rolle spielen, ist bisher nur sehr wenig bekannt (Abb. 1.10).

Um mögliche funktionale Domänen zu identifizieren, wurde das Mba1-Protein im Rahmen dieser Arbeit gezielt durch Mutagenese verändert. Dafür wurden im Mba1-C-Terminus sowohl unterschiedlich lange Aminosäuresequenzen deletiert, als auch einzelne Aminosäuren mit Alanin substituiert. Mit Hilfe mikroskopischer und proteinbiochemischer Techniken wurden in *S. cerevisiae*-Zellen die Auswirkungen der Deletions- und Substitutionsmutationen im *MBA1*-Gen auf die submitochondriale Verteilung sowie die Funktion des Mba1-Proteins untersucht.

4.3.1 Erzeugung von Plasmiden zur Expression von *MBA1*-Fusionskonstrukten in *S. cerevisiae*

Um die submitochondriale Lokalisation sowie die Funktionalität verschiedener Mba1-Varianten zu analysieren, wurden Plasmide zur Expression von *MBA1*-Fusionskonstrukten in *S. cerevisiae* erstellt (Abb. 8.2). Für die Erzeugung dieser Expressionsplasmide wurden die auf dem Ursprungsvektor pUG36 (Niedenthal *et al.*, 1996; Fu & Xiao, 2003) basierenden Ausgangsvektoren pUG36-*C-GFP* (*Vektor1*) und pUG36-*C-FLAG* (*Vektor2*) verwendet (Abb. 8.1).

Die von pUG36 abgeleiteten Vektoren erlaubten die Herstellung und Charakterisierung von *GFP*- sowie *FLAG*-Fusionskonstrukten (siehe Kapitel 8.1.1 und 8.1.2). Das Protein GFP (S65T) (Shimomura *et al.*, 1962) wurde vorrangig für die konfokalmikroskopische Untersuchung von Mba1-Fusionsproteinen eingesetzt. Obwohl GFP ein relativ großes Molekulargewicht von 26,8 kDa aufweist, wird die Lokalisation, Integration sowie Funktionalität des Fusionsproteins in den meisten Fällen nicht beeinträchtigt (Jakobs, 2006). Um dennoch mögliche durch das Anhängen von GFP verursachte Störungen auszuschließen, wurde zusätzlich für elektronenmikroskopische Analysen das nur aus acht Aminosäuren bestehende *FLAG*-Peptid (Hopp *et al.*, 1988) verwendet.

Das Mba1-Vorläuferprotein besitzt eine aminoternale Präsequenz mit einer Länge von 33 Aminosäuren, die für den Import von Mba1 in das Mitochondrium benötigt und nachfolgend proteolytisch vom Mba1-Protein entfernt wird (Rep & Grivell, 1996). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit ausnahmslos Mba1-Varianten analysiert, die am C-Terminus mit GFP bzw. *FLAG* fusioniert waren.

4.3.2 Erzeugung von *MBA1*-Fusionskonstrukten exprimierenden *S. cerevisiae*-Stämmen

In dieser Arbeit wurden vorrangig *S. cerevisiae*-Zellen eingesetzt, bei denen die genomische Kopie des *MBA1*-Gens deletiert war, und die *MBA1*-Fusionskonstrukte von einem Plasmid exprimierten (Tab. 3.8). Somit wurde sowohl eine *MBA1*-Überexpression als auch eine Wechselwirkung von endogenem Mba1 mit Mba1-Fusionsproteinen vermieden. Mittels Elektroporation wurden die Expressionsplasmide in die Deletionsstämme $\Delta mba1$ (*BY4741*) und $\Delta mba1$ (*YKODC*) sowie in den *QCR2-mRFP*-Stamm (*BY4741*) transformiert.

Der Deletionsstamm $\Delta mba1$ (*YKODC*) wurde ausschließlich für Voranalysen verwendet, da er von Biocat (Heidelberg, Deutschland) erworben wurde und die Möglichkeit bestand, dass er Genmutationen mit unbekanntem Konsequenzen in *S. cerevisiae* besaß. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Stamm $\Delta mba1$ (*BY4741*) erzeugt, der von dem Wildtypstamm *BY4741 WT* abgeleitet ist. Er diente sowohl der Überprüfung des zuvor in Kapitel 4.2.2 beobachteten Lokalisationsverhaltens von Mba1 in Abhängigkeit verschiedener Kohlenstoffquellen, als auch den mikroskopischen sowie den proteinbiochemischen Analysen der verschiedenen mutierten Mba1-Varianten.

Der *QCR2-mRFP*-Stamm (*BY4741*) wurde für die Überprüfung der beobachteten Lokalisationen eingesetzt, da er die Identifikation fehlerhafter Cristastrukturen ermöglichte.

4.3.3 Submitochondriale Verteilung von Mba1 in Abhängigkeit der verwendeten Kohlenstoffquelle

Da für die submitochondrialen Lokalisationsanalysen von Mba1 entweder ein GFP- oder FLAG-Fusionsprotein verwendet wurde, musste zuerst mit Hilfe proteinbiochemischer Techniken untersucht werden, ob sich die Mba1-Fusionsproteine wie das wildtypische Äquivalent verhalten.

Für die biochemischen Kontrollanalysen wurden Mitochondrien aus Hefestämmen verwendet, die in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert wurden. Hierfür kamen der Wildtyp *BY4741 WT* mit *Vektor2* und die $\Delta mba1$ -Stämme (*BY4741*) zum Einsatz, die *MBA1-GFP* bzw. *MBA1-FLAG* unter der Kontrolle des *nativen MBA1-Promotors* von einem Plasmid exprimierten.

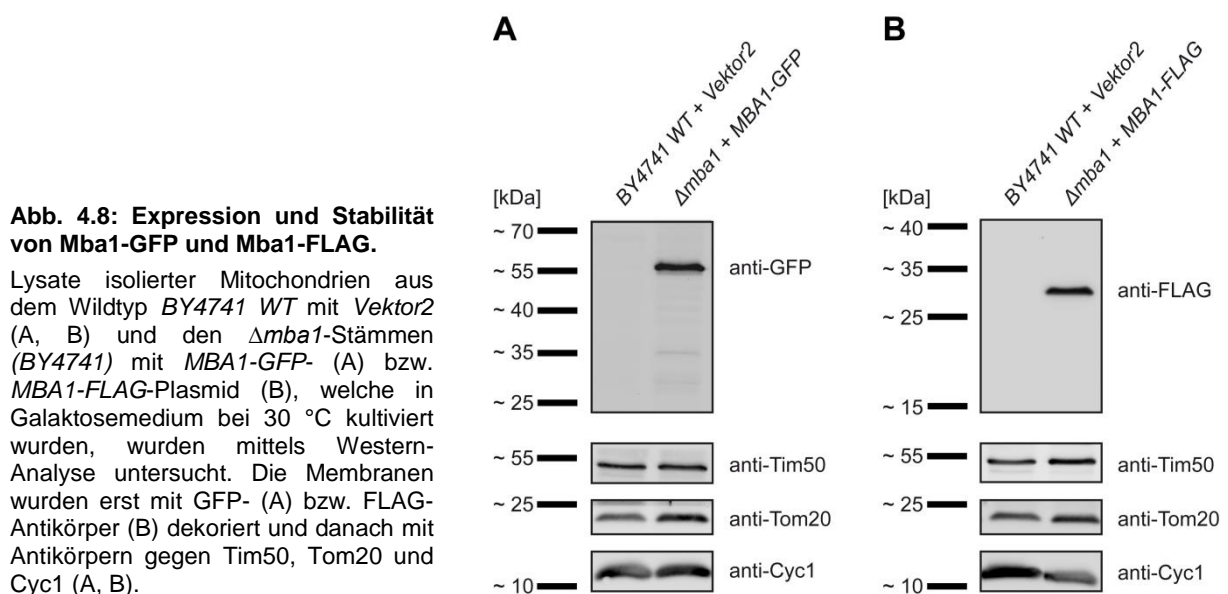
4.3.3.1 Expression und Stabilität von Mba1-GFP und Mba1-FLAG

Als Erstes wurde analysiert, ob die Fusionskonstrukte *MBA1-GFP* und *MBA1-FLAG* korrekt in den $\Delta mba1$ -Hefen (*BY4741*) exprimiert werden und ob die Mba1-Fusionsproteine stabil sind. Hierzu wurde eine Western-Analyse mitochondrialer Lysate durchgeführt.

Das Molekulargewicht der maturierten Form von Mba1 beträgt ungefähr 28 kDa (Tab. 8.4), weshalb Mba1-GFP bei einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa (Tab. 8.2) und Mba1-FLAG bei ca. 29 kDa (Tab. 8.3) zu erwarten ist. Der Nachweis der Mba1-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper, die entweder gegen GFP oder das FLAG-Peptid gerichtet waren.

Die apparenten Molekulargewichte von Mba1-GFP (Abb. 4.8, A) und Mba1-FLAG (Abb. 4.8, B) stimmen mit der Erwartung überein. Da kein signifikanter Abbau sichtbar ist, kann darauf geschlossen werden, dass die Mba1-Fusionsproteine stabil sind.

Die Membranen wurden außerdem mit Tim50-, Tom20- und Cyc1-Antikörpern dekoriert. Die Kontrollproteine sind bei den erwarteten Molekulargewichten nachweisbar (Abb. 4.8, A und B) und weisen auf eine gleichmäßige Beladung der SDS-Polyacrylamidgele hin.



4.3.3.2 Lokalisation und Orientierung von Mba1-FLAG

Es wäre möglich, dass das Anhängen von Markierungsproteinen an den C-Terminus die Translokation des Mba1-Präproteins über die mitochondrialen Membranen hinweg beeinträchtigt, was in der Fehllokalisation von Mba1 resultieren könnte. Deshalb wurde mit Hilfe einer Subfraktionierung die mitochondriale Lokalisation und Orientierung von Mba1-FLAG untersucht. Die isolierten Mitochondrien wurden entweder unbehandelt belassen (Spur 1), mit Proteinase K behandelt (Spur 2), osmotisch geschwollen (Spur 3), osmotisch geschwollen und zusätzlich mit Proteinase K versetzt (Spur 4) oder gleichzeitig mit Proteinase K sowie Triton X-100 zur Permeabilisierung der beiden mitochondrialen Membranen inkubiert (Spur 5). Im Anschluss wurden die erhaltenen Proteinproben mittels Western-Analyse untersucht.

Die Detektion von Mba1-FLAG bei ca. 29 kDa erfolgte unter Einsatz des FLAG-Antikörpers und zusätzlich mit Hilfe des Mba1-Antikörpers (Abb. 4.9). Die Subfraktionierung zeigt, dass Mba1-FLAG in den Fraktionen 2 und 4 vor der Degradation durch Proteinase K geschützt ist (Spuren 2 und 4). Daraus folgt, dass Mba1-FLAG in der Innenmembran lokalisiert und sowohl mit dem N-Terminus als auch C-Terminus der mitochondrialen Matrix zugewandt vorliegt, wie es für das native Mba1-Protein

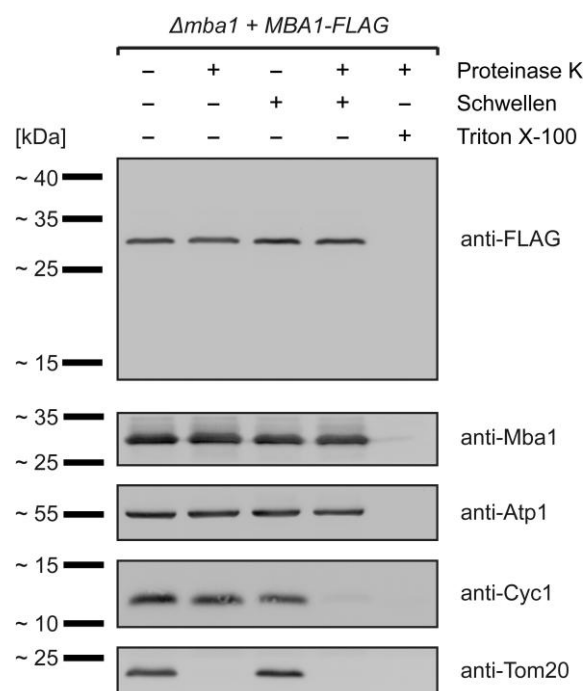


Abb. 4.9: Mitochondriale Lokalisation und Orientierung von Mba1-FLAG.

Die isolierten Mitochondrien aus dem *Δmba1*-Stamm (BY4741) mit *MBA1-FLAG*-Plasmid, der in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert wurde, wurden einer Subfraktionierung unterzogen. Die Membran wurde erst mit FLAG-Antikörper und danach mit Antikörpern gegen Mba1, Atp1, Cyc1 und Tom20 dekoriert.

bereits in der Literatur beschrieben wurde (Preuss *et al.*, 2001).

Zur Kontrolle wurde die Membran mit Antikörpern gegen Atp1, Cyc1 und Tom20 dekoriert, die bei den erwarteten Molekulargewichten (Tab. 8.4) nachweisbar sind (Abb. 4.9). Atp1 ist ein Innenmembranprotein, das in den Fraktionen 2 und 4 vor Proteolyse geschützt ist (Spuren 2 und 4). Das Intermembranraumprotein Cyc1 ist in Fraktion 2 durch die Außenmembran vor Abbau geschützt (Spur 2), aber auf Grund ihrer Disruption durch osmotisches Schwellen in Fraktion 4 für Proteinase K zugänglich (Spur 4). Tom20 ist als Außenmembranprotein stets für die Proteinase erreichbar, weshalb es in den Fraktionen 2 und 4 im Vergleich zu Atp1 nicht detektiert werden kann (Spuren 2 und 4). Auf Grund der Permeabilisation beider mitochondrialer Membranen unterlagen in Fraktion 5 alle Proteine einem voll-ständigen Abbau durch Proteinase K (Spur 5).

4.3.3.3 Membranständigkeit von Mba1-FLAG

Abschließend wurde untersucht, ob die C-terminale Markierung die Insertion von Mba1-Fusionsproteinen in die innere Mitochondrienmembran beeinträchtigt. Da Mba1 nicht über Transmembrandomänen verfügt, die es fest in der Innenmembran verankern könnten, wird angenommen, dass es peripher an die Membran über eine aus hydrophoben Aminosäuren bestehende Region assoziiert (Rep & Grivell, 1996). Die übliche Behandlung mit 100 mM Natriumcarbonat (Na_2CO_3) führt zu einer partiellen Herauslösung von Mba1 aus der Membran. Deshalb wurde für die Charakterisierung der Membranständigkeit von Mba1-FLAG im Vergleich zu Wildtyp-Mba1 eine Natriumcarbonat-Konzentrationsreihe mit den finalen Konzentrationen von 0 mM, 7 mM, 15 mM, 30 mM, 50 mM und 100 mM Na_2CO_3 eingesetzt. Isolierte Mitochondrien wurden nach hypotoner Schwellung mit den verschiedenen Natriumcarbonat-Extraktionspuffern behandelt. Nach Ultrazentrifugation wurden die Proteine des Sediments und Überstands mittels Western-Analyse untersucht.

Wildtyp-Mba1 wurde mit Hilfe des Mba1-Antikörpers bei ca. 28 kDa (Abb. 4.10, A) und Mba1-FLAG mittels FLAG-Antikörper bei ca. 29 kDa (Abb. 4.10, B) detektiert. Die Membran zur Analyse von Wildtyp-Mba1 wurde außerdem mit dem FLAG-Antikörper dekoriert, der wie erwartet kein Protein markierte, und die Membran zur Analyse von Mba1-FLAG mit dem Mba1-Antikörper, der ein dem FLAG-Antikörper entsprechendes Proteinbandenmuster erzeugte.

Die Natriumcarbonat-Extraktionen zeigen, dass bei einer Konzentration von 30 mM Na_2CO_3 für Wildtyp-Mba1 und Mba1-FLAG eine leichte Herauslösung aus der Membran zu verzeichnen ist, die mit Erhöhung der Na_2CO_3 -Konzentration zunimmt. Bei einer Konzentration von 100 mM Na_2CO_3 ist jedoch für Mba1-FLAG im Vergleich zum Wildtyp-Mba1 eine Verdopplung des Anteils an löslichen Mba1-Proteinen zu beobachten.

Es folgte eine Dekoration mit Antikörpern gegen Tim50, Mrpl4, Mrpl32 und Cyc1, deren Signale bei den erwarteten Molekulargewichten (Tab. 8.4) nachweisbar sind (Abb. 4.10). Da Tim50 über eine Transmembrandomäne in der inneren Membran verankert ist, diente es als Kontrolle für die Sedimentfraktion (Geissler *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002). Das Intermembranraumprotein Cyc1 repräsentierte die lösliche Überstandsfraktion, da es nur sehr schwach mit der Innenmembran assoziiert (Gonzales & Neupert, 1990). Die Ribosomenproteine Mrpl4 und Mrpl32 wurden als Kontrollen eingesetzt, da sie wie Mba1 peripher an die Innenmembran gebunden sind und mit 100 mM Na_2CO_3 partiell aus der Membran herausgelöst werden können (Liu & Spremulli, 2000). Bei Betrachtung der Kontrollen bei 100 mM Na_2CO_3 fällt auf, dass bei der Mba1-FLAG-Analyse auch die löslichen Anteile von Tim50 und Mrpl32 leicht erhöht sind. Da möglicherweise die experimentellen Bedingungen für diese Analyse etwas rigoroser waren, wird angenommen, dass Mba1-FLAG eine dem Wildtyp-Mba1 ähnliche Membranständigkeit aufweist.

Somit lässt sich aus diesen Daten schließen, dass die Mba1-Fusionsproteine strukturell intakt sind und in der inneren Mitochondrienmembran korrekt inseriert und lokalisiert vorliegen.

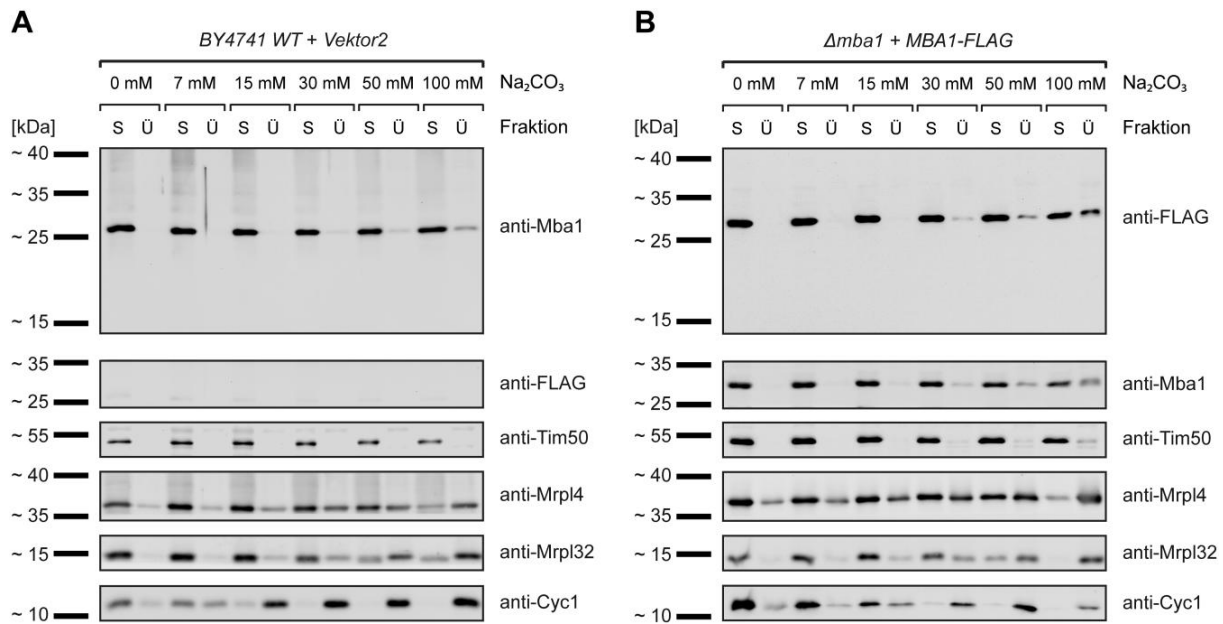


Abb. 4.10: Membranständigkeit von Wildtyp-Mba1 und Mba1-FLAG im Mitochondrium.

Die isolierten Mitochondrien aus dem Wildtyp *BY4741 WT* mit *Vektor2* (A) und dem $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*) mit *MBA1-FLAG*-Plasmid (B), die in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert wurden, wurden mit Extraktionspuffern mit unterschiedlichen Na_2CO_3 -Konzentrationen behandelt. Nach Ultrazentrifugation wurden die im Sediment (S) und im Überstand (Ü) befindlichen Proteine der jeweiligen Behandlung mittels Western-Analyse untersucht. Die Membranen wurden erst mit Mba1- (A) bzw. FLAG-Antikörper (B) dekoriert und danach mit Antikörpern gegen FLAG (A), Mba1 (B), Tim50 (A, B), Mrpl4 (A, B), Mrpl32 (A, B) und Cyc1 (A, B).

4.3.3.4 Submitochondriale Verteilung von Mba1 unter fermentativen sowie unter respiratorischen Wachstumsbedingungen

Die proteinbiochemischen Kontrollanalysen haben gezeigt, dass sich die Mba1-Fusionsproteine dem wildtypischen Mba1-Protein entsprechend verhalten. Deshalb wurden die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten $\Delta mba1$ -Stämme (*BY4741*) mit *MBA1-GFP*- bzw. mit *MBA1-FLAG*-Plasmid im Folgenden für die Überprüfung des in Kapitel 4.2.2 dokumentierten Lokalisationsverhaltens von Mba1 in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle eingesetzt. Zuvor wurden die Stämme jedoch mit Hilfe von *in vivo*-Epifluoreszenzmikroskopie auf mögliche Auswirkungen der Expression von *MBA1*-Fusionskonstrukten auf die mitochondriale Morphologie untersucht.

Zu diesem Zweck wurden der *Matrix-GFP* exprimierende Wildtypstamm *BY4741 WT*, der *Matrix-GFP* exprimierende $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*) sowie der *MBA1-GFP* exprimierende $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*) in Galaktose- bzw. Laktatmedium bei 30 °C kultiviert. Für eine zusätzliche Visualisierung der Mitochondrienetzwerke wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red CM-H₂XRos von Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA) eingesetzt. Dieser Farbstoff ermöglichte außerdem die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Mitochondrien, da er nur in aktiven Mitochondrien mit vorhandenem Membranpotential akkumuliert.

Sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen ist für den *MBA1-GFP*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied bezüglich der mitochondrialen Morphologie oder des Membranpotentials erkennbar (Abb. 8.22), was auf funktionsfähige Mitochondrien schließen lässt.

Da in der Literatur für den $\Delta mba1$ -Stamm bei Wachstum mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle lediglich ein vermindertes Wachstum beschrieben wurde (Ott *et al.*, 2006), war es zu erwarten, dass auch die Mitochondrien des $\Delta mba1$ -Stamms (*BY4741*) mit *Matrix-GFP*-Plasmid ein intaktes Netzwerk sowie ein Membranpotential aufweisen (Abb. 8.22). Für die Expression von *MBA1-FLAG* sind diesbezüglich ebenfalls keine Auswirkungen feststellbar (Abb. 8.24).

Anschließend wurde die submitochondriale Lokalisation von Mba1-GFP sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen mit Hilfe der Konfokalmikroskopie und dem Einsatz genetisch vergrößerter Mitochondrien *in vivo* untersucht. Zu diesem Zweck wurde der $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*) mit *MBA1-GFP*-Plasmid sowie der *QCR2-mRFP*-Stamm (*BY4741*) mit *MBA1-GFP*-Plasmid zunächst auf Glukoseplatten bei 30 °C kultiviert.

Bei Wachstum mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose ist für Mba1-GFP eine bevorzugte Lokalisation am Rand der vergrößerten Mitochondrien zu beobachten (Abb. 4.11, A und B). Die Anreicherung von Qcr2-mRFP im Inneren der vergrößerten Mitochondrien deutet auf eine intakte Cristastruktur der analysierten Mitochondrien hin (Abb. 4.11, B).

Für die Analyse der submitochondrialen Mba1-GFP-Lokalisation unter respiratorischen Wachstumsbedingungen wurden einzelne auf der Glukoseplatte hochgewachsene Hefekolonien ausgewählt, in laktathaltiges Flüssigmedium überführt und zu den Zeitpunkten 0 h und 4 h analysiert. Auch in Zellen, die für 4 h mit Laktat kultiviert wurden und zu diesem Zeitpunkt ungefähr einen vollständigen Teilungszyklus abgeschlossen hatten, ist Mba1-GFP am Rand und Qcr2-mRFP weiterhin im Inneren der vergrößerten Mitochondrien angereichert (Abb. 4.11, A und B).

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die submitochondriale Verteilung von Mba1-GFP von der verwendeten Kohlenstoffquelle unabhängig ist, was die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.2 bestätigt.

Da die bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Mba1-Verteilung nur auf der Analyse von Mba1-GFP-Fusionsproteinen basieren und eine mögliche durch GFP verursachte Fehllokalisierung ausgeschlossen werden sollte, wurde die Verteilung von Mba1-FLAG mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht. Dazu wurde der $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*) mit *MBA1-FLAG*-Plasmid in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Das Fusionsprotein Mba1-FLAG wurde unter Verwendung von Antikörper-gekoppelten Goldpartikeln mittels Immunmarkierung detektiert.

Nach der Auswertung von 70 Goldpartikeln ergibt sich für Mba1-FLAG eine Verteilung von 53 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 47 % in der Cristaemembran (Abb. 4.12). Diesen Daten zufolge ist auch für FLAG-markiertes Mba1 eine präferentielle Lokalisation in der inneren Grenzflächenmembran zu verzeichnen.

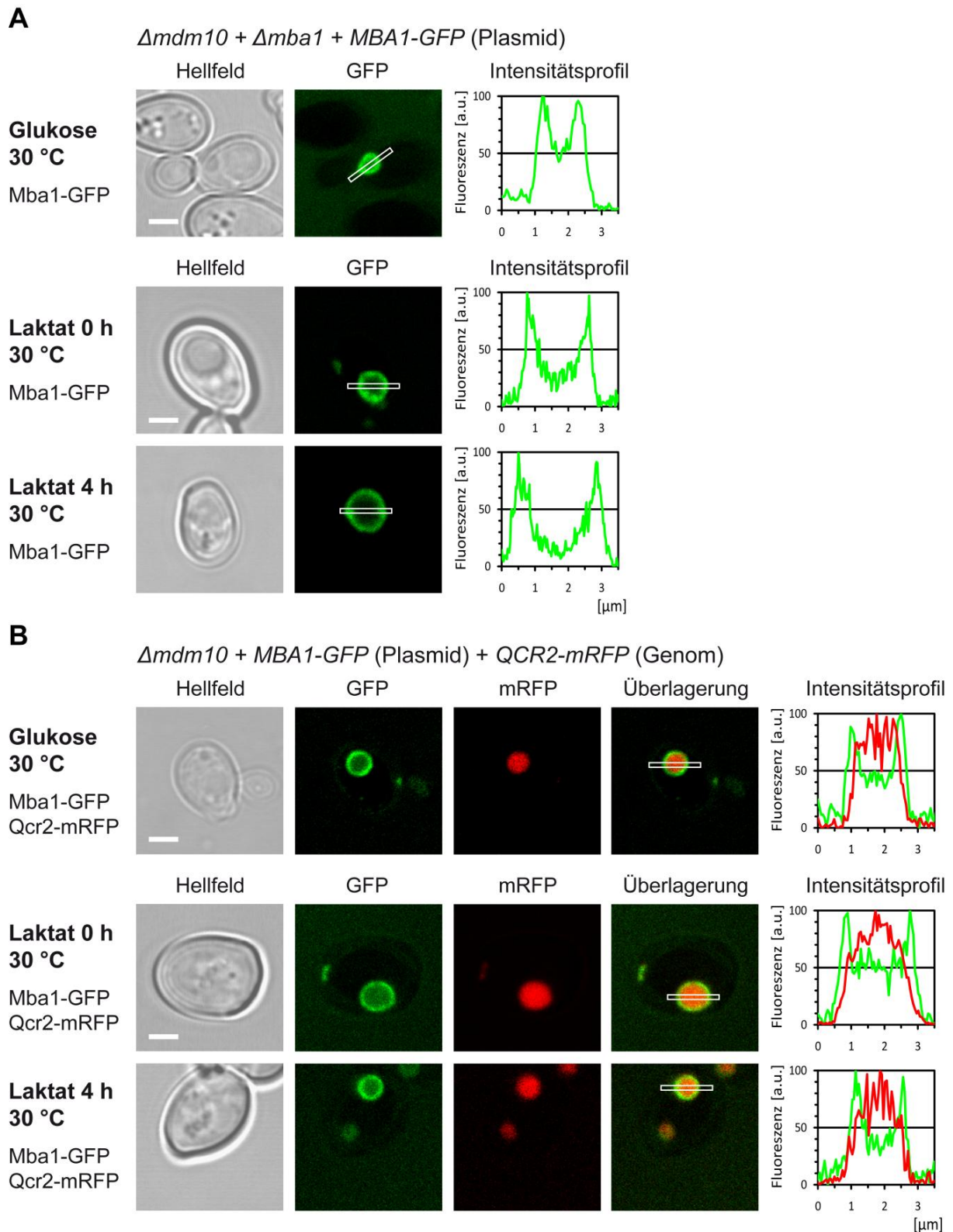


Abb. 4.11: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP in vergrößerten Mitochondrien unter dem Einfluss der verwendeten Kohlenstoffquelle.

Δmba1-Hefen (BY4741) (A) bzw. *QCR2-mRFP*-Hefen (BY4741) (B) mit *MBA1-GFP*-Plasmid wurden entweder auf Glukoseplatten oder in Laktatmedium bei 30 °C kultiviert. Sowohl unter fermentativen als auch unter respiratorischen Bedingungen lokalisiert Mba1-GFP am Rand (A, B) und Qcr2-mRFP im Inneren (B) der vergrößerten Mitochondrien. Von links nach rechts sind jeweils das Hellfeldbild (A, B), das Fluoreszenzbild für GFP (A, B) und mRFP (B), eine Überlagerung (B) und ein Intensitätsprofil der Fluoreszenzsignale (A, B) dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 μm.

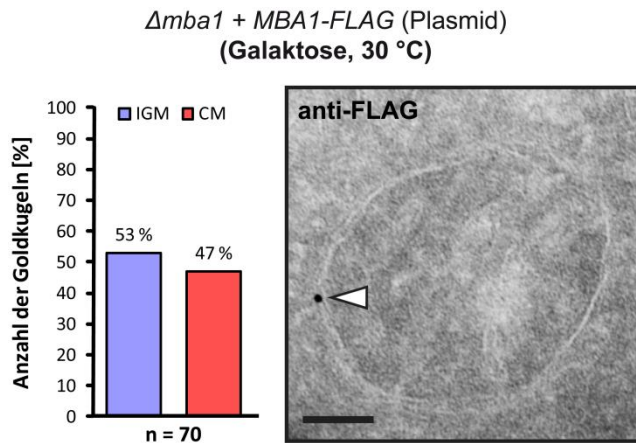


Abb. 4.12: Elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-FLAG in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie unter fermentativen Bedingungen.

Der *Δmba1*-Stamm (BY4741) mit *MBA1-FLAG*-Plasmid wurde in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Mba1-FLAG ist in der IGM angereichert. Gezeigt ist eine statistische Auswertung der Mba1-FLAG-Verteilung (links) sowie eine repräsentative Aufnahme (rechts). Zum Nachweis wurde Mba1-FLAG immunologisch mit Goldpartikeln markiert (Pfeil). IGM (innere Grenzflächenmembran) und CM (Cristaemembran). Größenstandard = 100 nm.

Eine ähnliche Verteilung wie die von Mba1-FLAG kann auch für Mba1-GFP unter Einsatz des *Δmba1*-Stamms (BY4741) mit *MBA1-GFP*-Plasmid beobachtet werden. Für Mba1-GFP können bei Wachstum mit Galaktose bei 30 °C nach Auswertung von 114 Goldpartikeln 60 % der inneren Grenzflächenmembran und 40 % der Cristaemembran zugeordnet werden (Abb. 8.30).

Insgesamt belegen die mittels Konfokal- und Elektronenmikroskopie gewonnenen Daten bezüglich der Lokalisation von Mba1, dass der größere Anteil an Mba1-Proteinen sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Wachstumsbedingungen in der inneren Grenzflächenmembran vorliegt. Dieses Ergebnis wurde in mehreren Hefestämmen unterschiedlicher Genotypen und unter Verwendung von GFP- sowie FLAG-Fusionsproteinen reproduziert (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.3.3.4).

Über mögliche Mechanismen oder Faktoren, die das beobachtete Lokalisationsverhalten von Mba1 bestimmen, welches sich nicht dynamisch an die physiologischen Bedingungen in der Zelle anpasst, ist bisher nichts bekannt. Durch die Einführung von Mutationen im *MBA1*-Gen sollte eine Verlagerung der Mba1-Verteilung induziert werden und anhand weiterführender Analysen der lokalisationsveränderten Mba1-Varianten sollte die Funktionsweise von Mba1 näher untersucht werden.

4.3.4 Submitochondriale Verteilung von Mba1 in Abhängigkeit von Mutationen im *MBA1*-Gen

In der Literatur wurden für das Mba1-Protein bisher nur die aminoternale Präsequenz, die für den Import von Mba1 in das Mitochondrium zuständig ist, und die zwei hydrophoben Bereiche beschrieben, über die Mba1 vermutlich peripher an der mitochondrialen Innenmembran angeheftet ist (Rep & Grivell, 1996). Über weitere funktionale Domänen des Mba1-Proteins, über welche es beispielsweise mit anderen mitochondrialen Komponenten interagiert, ist nichts bekannt. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe verschiedener mutierter Mba1-Varianten hergestellt und hinsichtlich ihrer Lokalisation in der inneren mitochondrialen Membran untersucht. Die Analyse der mutierten Mba1-Proteinvarianten erlaubte die Identifizierung von Aminosäureabschnitten im Mba1-Protein, die für die Lokalisation sowie die Funktion von Mba1 essentiell sind.

4.3.4.1 Auswirkungen von Deletionsmutationen im *MBA1*-Gen auf die sub-mitochondriale Verteilung von Mba1

Der C-terminale Bereich des Mba1-Proteins ist im Vergleich zum N-Terminus deutlich länger (Abb. 4.13), weshalb weitere funktionale Mba1-Domänen höchstwahrscheinlich im C-Terminus zu finden sind. Deshalb wurden zunächst Mba1-Varianten erstellt, bei denen am Ende des C-Terminus Aminosäureabschnitte mit einer Länge von 55, 42, 26, 13 sowie 7 Aminosäuren deletiert wurden. Der $\Delta mba1$ -Stamm der *YKODC* wurde mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Nach Erzeugung genetisch vergrößerter Mitochondrien wurden die Stämme auf Glukose bei 30 °C angezüchtet und konfokalmikroskopisch *in vivo* untersucht. Im Vergleich zu Mba1 weist jede der Mba1-Mutanten mit mehr als fünf deletierten C-terminalen Aminosäuren eine veränderte submitochondriale Lokalisation im Inneren der vergrößerten Mitochondrien auf (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden im nächsten Schritt sechs Mba1-Varianten erzeugt, bei denen in Richtung des N-Terminus, vom C-terminalen Ende ausgehend, jeweils eine weitere Aminosäure entfernt wurde (Abb. 4.13). Für eine Voranalyse der submitochondrialen Verteilung dieser Mba1-Mutanten wurde der $\Delta mba1$ -Stamm (*YKODC*) mit den für diese Varianten kodierenden Plasmiden transformiert und unter Einsatz genetisch vergrößerter Mitochondrien mittels Konfokalmikroskopie *in vivo* untersucht.

Dabei wurde festgestellt, dass die drei aufeinanderfolgenden Mutanten Mba1¹⁻²⁷⁵, Mba1¹⁻²⁷⁴ und Mba1¹⁻²⁷³ unterschiedliche submitochondriale Lokalisationen aufweisen (Abb. 8.25 und Abb. 4.13). Mba1¹⁻²⁷⁵-GFP zeigt eine klare Lokalisation am Rand der vergrößerten Mitochondrien, während Mba1¹⁻²⁷³-GFP deutlich in ihrem Inneren angereichert ist. Für Mba1¹⁻²⁷⁴-GFP konnte keine eindeutige Präferenz festgestellt werden. Überwiegend war eine intermediäre Lokalisation zu verzeichnen, aber in seltenen Fällen konnte auch eine randständige Lokalisation oder eine Anreicherung im Inneren der vergrößerten Mitochondrien beobachtet werden.

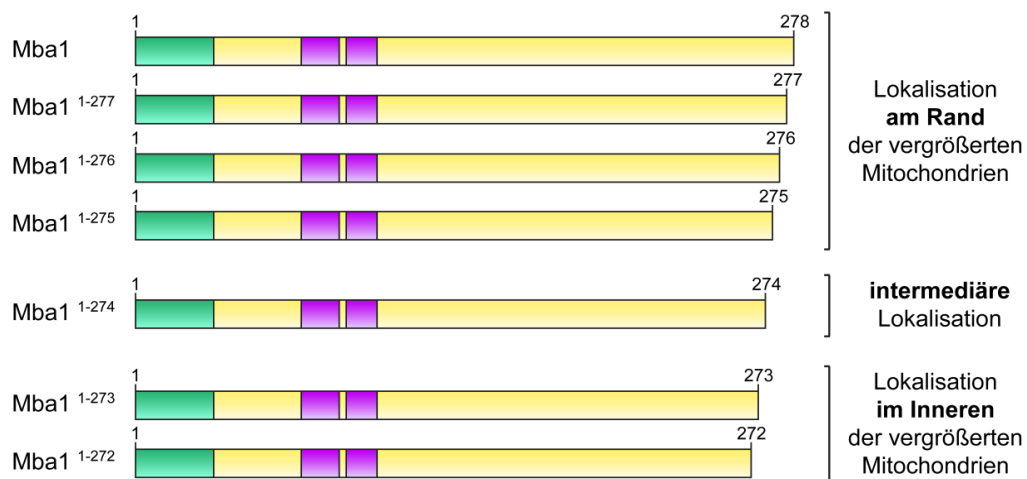


Abb. 4.13: Schematische Darstellung der erzeugten Mba1-Varianten mit C-terminalen Deletionen.

Abgebildet sind die verschiedenen Mba1-Varianten mit C-terminalen Deletionen, ihre Aminosäureanzahl sowie ihre bevorzugten Lokalisationen in genetisch vergrößerten Mitochondrien im $\Delta mba1$ -Stamm der *YKODC* (Voranalyse). Mba1, Mba1¹⁻²⁷⁷, Mba1¹⁻²⁷⁶ und Mba1¹⁻²⁷⁵ lokalisieren am Rand, Mba1¹⁻²⁷⁴ intermediär und Mba1¹⁻²⁷³ sowie Mba1¹⁻²⁷² im Inneren der vergrößerten Mitochondrien. Grüne Bereiche: aminoterminaler Präsequenz. Violette Bereiche: hydrophobe Aminosäureregionen.

Da Mba1¹⁻²⁷⁵ und Mba1¹⁻²⁷³ während der Voranalyse eine eindeutige submitochondriale Lokalisation zugeordnet werden konnte, wurden diese Varianten für weitere Untersuchungen ausgewählt. Zuvor wurde jedoch mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie *in vivo* untersucht, ob die Expression der Genvarianten *mba1*¹⁻²⁷⁵ und *mba1*¹⁻²⁷³ einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie oder das Membranpotential ausübt. Hierfür wurden die *GFP*- bzw. *FLAG*-Fusionskonstrukt exprimierenden Δ *mba1*-Stämme (*BY4741*) in Galaktosemedium bei 30 °C angezogen.

Mit Hilfe des MitoTracker Red CM-H₂XRos konnte nachgewiesen werden, dass auch unter dem Einfluss der Expression von *mba1*¹⁻²⁷⁵-*GFP* bzw. *mba1*¹⁻²⁷³-*GFP* (Abb. 8.23) sowie *mba1*¹⁻²⁷⁵-*FLAG* bzw. *mba1*¹⁻²⁷³-*FLAG* (Abb. 8.24) ein Membranpotential vorhanden ist und es sich demzufolge um respiratorisch aktive Mitochondrien handelt. Außerdem kann ein ausgeprägtes mitochondriales Netzwerk beobachtet werden. Bei der Expression von *mba1*¹⁻²⁷³-*GFP* fällt nur auf, dass neben dem Netzwerk auch punktförmige Stellen mit einem stärkeren GFP-Fluoreszenzsignal sichtbar sind (Abb. 8.23, mitte), deren Ursprung und Bedeutung ungeklärt sind.

Im Anschluss wurde die Verteilung von Mba1¹⁻²⁷⁵-*GFP* und die von Mba1¹⁻²⁷³-*GFP* sowohl im Δ *mba1*-Stamm (*BY4741*) als auch im *QCR2-mRFP*-Stamm (*BY4741*) in vergrößerten Mitochondrien unter fermentativen Bedingungen mittels *in vivo*-Konfokalmikroskopie analysiert.

Bei Wachstum mit Glukose lokalisiert Mba1¹⁻²⁷⁵-*GFP* bevorzugt am Rand der vergrößerten Mitochondrien (Abb. 4.14, A und B, oben), während Mba1¹⁻²⁷³-*GFP* (Abb. 4.14, A und B, unten) und *Qcr2-mRFP* (Abb. 4.14, B) im Inneren angereichert sind. Die im Δ *mba1*-Stamm der *YKODC* gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der submitochondrialen Lokalisationen von Mba1¹⁻²⁷⁵-*GFP* und Mba1¹⁻²⁷³-*GFP* wurden in vollem Umfang bestätigt. Auch für die anderen Mba1-Varianten mit C-terminalen Deletionen konnten die in der Voranalyse beobachteten Proteinverteilungen ebenfalls mit Hilfe des *QCR2-mRFP*-Stamms (*BY4741*) gezeigt werden (Abb. 8.26).

Die konfokalmikroskopischen Daten deuten darauf hin, dass die mutierte Variante Mba1¹⁻²⁷³ im Gegensatz zu Mba1 (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.3.3.4) präferentiell in der Cristaemembran angereichert ist. Deshalb wurden als Nächstes die submitochondrialen Lokalisationen von Mba1¹⁻²⁷³-*GFP* und Mba1¹⁻²⁷³-*FLAG* in Δ *mba1*-Hefen (*BY4741*) bei Wachstum mit Galaktose und bei 30 °C mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht. Die Fusionsproteine wurden durch eine immunologische Markierung mit Goldpartikeln nachgewiesen.

Bei der Beurteilung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen fällt auf, dass neben Mitochondrien mit Wildtypmorphologie (Abb. 4.15, A und B) auch Mitochondrien mit Strukturen mit einer veränderten Elektronendichte zu beobachten sind (Abb. 4.15, C und D). Dabei handelt es sich vermutlich um Proteinaggregationen, die durch die Expression von *mba1*¹⁻²⁷³ verursacht werden.

Für die statistische Auswertung der submitochondrialen Verteilung der Mba1¹⁻²⁷³-Fusionsproteine wurden ausschließlich elektronenmikroskopische Aufnahmen verwendet, auf denen Mitochondrien mit Wildtypmorphologie abgebildet sind (Abb. 4.15, A und B).

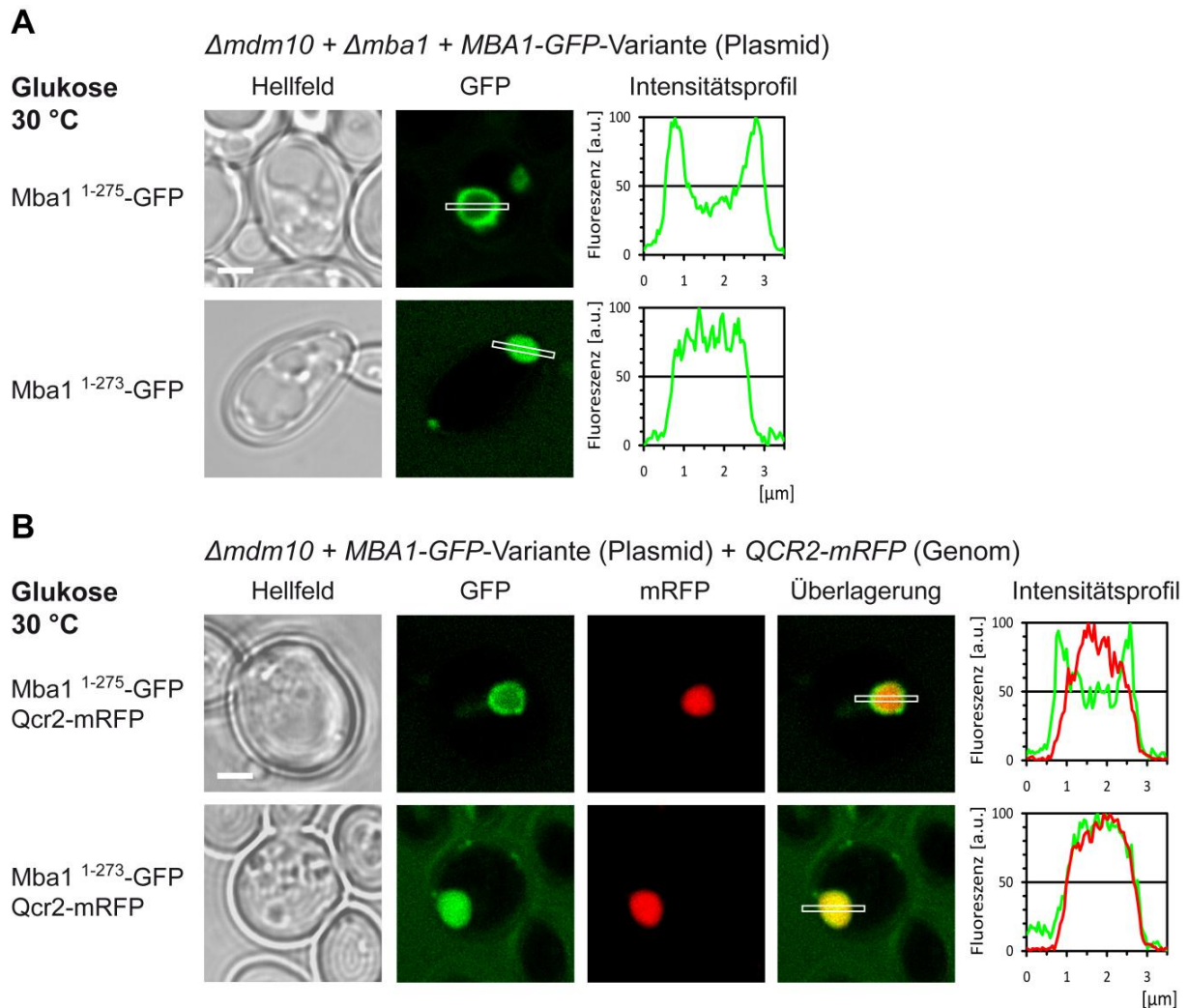


Abb. 4.14: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1¹⁻²⁷⁵-GFP und Mba1¹⁻²⁷³-GFP in vergrößerten Mitochondrien unter fermentativen Wachstumsbedingungen.

Δmba1-Hefen (BY4741) (A) bzw. *QCR2-mRFP*-Hefen (BY4741) (B), welche jeweils eine *MBA1-GFP*-Variante vom Plasmid exprimierten, wurden auf Glukoseplatten bei 30 °C kultiviert. Mba1¹⁻²⁷⁵-GFP lokalisiert am Rand (oben in A, B) und Mba1¹⁻²⁷³-GFP (unten in A, B) im Inneren der vergrößerten Mitochondrien. Von links nach rechts sind jeweils das Hellfeldbild (A, B), das Fluoreszenzbild für GFP (A, B) und mRFP (B), eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale (B) und ein Intensitätsprofil der Fluoreszenzsignale (A, B) dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 μm.

Nach einer Auswertung von 84 Goldpartikeln ergibt sich für Mba1¹⁻²⁷³-GFP eine Verteilung von 36 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 64 % in der Cristaemembran (Abb. 4.15, A). Für Mba1¹⁻²⁷³-FLAG wurden 59 Goldpartikel ausgewertet, von denen 22 % der inneren Grenzflächenmembran und 78 % der Cristaemembran zuzuordnen sind (Abb. 4.15, B). Somit liegt sowohl für Mba1¹⁻²⁷³-GFP als auch Mba1¹⁻²⁷³-FLAG bei Wachstum mit Galaktose bei 30 °C eine deutliche Anreicherung in der Cristaemembran vor.

Des Weiteren wurde die Häufigkeit der Mitochondrien, die Proteinaggregationsstrukturen enthalten, im Vergleich zu den Mitochondrien mit Wildtypmorphologie bestimmt. Betrachtet man die Ergebnisse dieser statistischen Auswertung, so ist festzuhalten, dass der prozentuale Anteil an Mitochondrien mit Aggregaten bei der Expression von *mba1*¹⁻²⁷³-FLAG (Abb. 4.15, D) deutlich geringer ist als bei der von *mba1*¹⁻²⁷³-GFP (Abb. 4.15, C). Es wäre denkbar, dass sich die Fusionierung mit GFP oder dem

FLAG-Peptid auf die Stabilität oder Struktur von Mba1¹⁻²⁷³ auswirkt, wobei GFP anscheinend einen stärkeren Effekt als das FLAG-Peptid hat. Um zu überprüfen, ob es sich bei der in diesem Kapitel dokumentierten Verteilung von Mba1¹⁻²⁷³ um eine, auf der C-terminalen Markierung beruhende, verfälschte Anreicherung in der Cristaemembran handelt, die zum Beispiel durch eine Reduzierung der Proteinestabilität oder der Membranständigkeit verursacht wurde, wurden die Mba1¹⁻²⁷³-Fusionsproteine im Folgenden proteinbiochemisch untersucht.

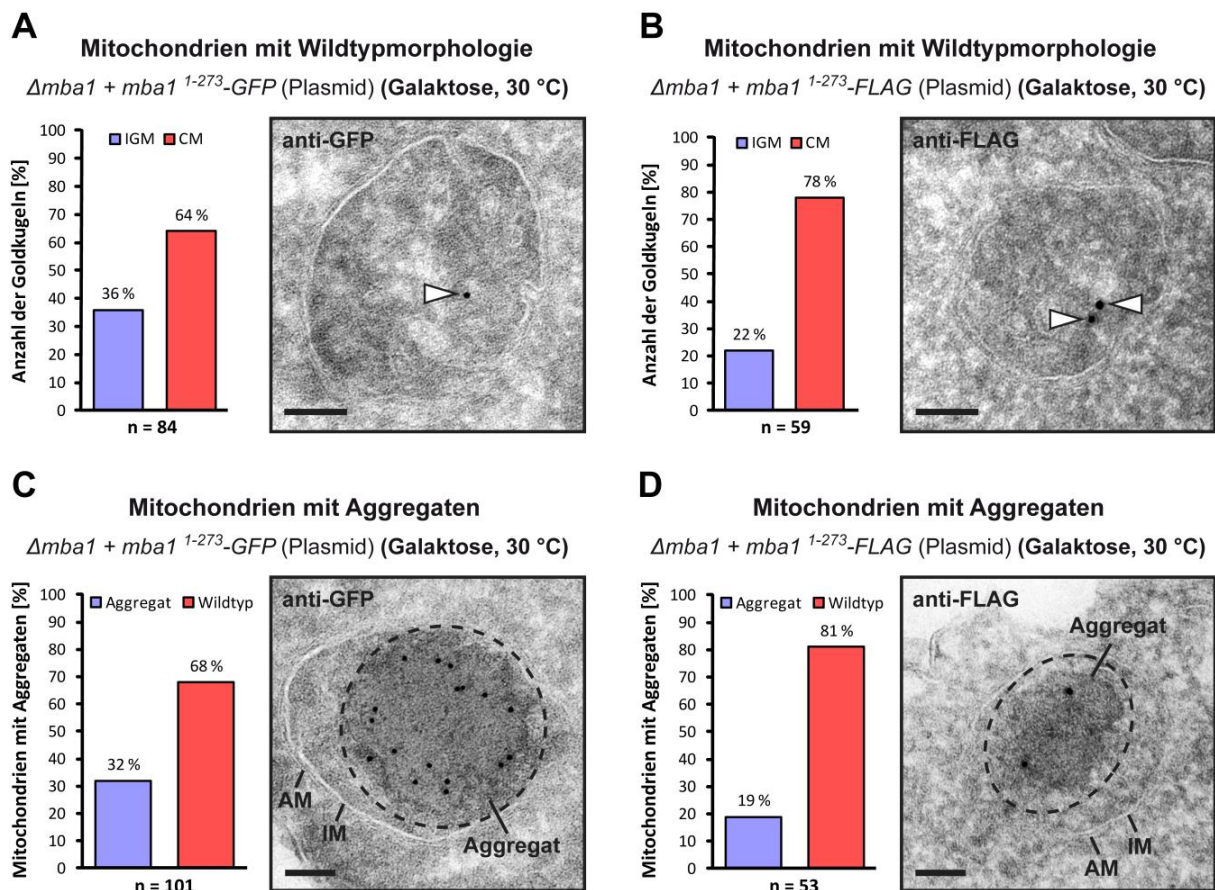


Abb. 4.15: Elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1¹⁻²⁷³-GFP und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie unter fermentativen Wachstumsbedingungen.

Der $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) mit $mba1^{1-273}\text{-GFP}$ (A, C) bzw. mit $mba1^{1-273}\text{-FLAG}$ -Plasmid (B, D) wurde in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. In Mitochondrien mit Wildtypmorphologie sind Mba1¹⁻²⁷³-GFP (A) und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG (B) in der CM angereichert. Es ist eine statistische Auswertung der Fusionsproteinverteilung (links in A, B) sowie eine repräsentative Aufnahme (rechts in A, B) dargestellt. Zum Nachweis wurden die Fusionsproteine immunologisch mit Goldpartikeln markiert (Pfeile). Außerdem sind Mitochondrien mit Aggregaten abgebildet (gestrichelte Rahmung in C, D) sowie eine statistische Auswertung ihrer Häufigkeit (links in C, D) und eine repräsentative Aufnahme (rechts in C, D). IGM (innere Grenzflächenmembran); CM (Cristaemembran); IM (Innenmembran) und AM (Außenmembran). Größenstandard = 100 nm.

4.3.4.2 Stabilität, mitochondriale Lokalisation, Orientierung und Membranständigkeit der Deletionsmutanten Mba1¹⁻²⁷⁵ und Mba1¹⁻²⁷³

Im Anschluss an die Lokalisationsanalysen wurde mit Hilfe proteinbiochemischer Kontrollen überprüft, ob die Fusionsproteine von Mba1¹⁻²⁷⁵ und Mba1¹⁻²⁷³ strukturell intakt sind und ob sie korrekt in der inneren Mitochondrienmembran inseriert und lokalisiert sind. Hierfür wurden Mitochondrien aus

in Galaktosemedium bei 30 °C gewachsenen $\Delta mba1$ -Stämmen (*BY4741*) isoliert, die entweder das *mba1*¹⁻²⁷⁵-FLAG-Plasmid oder das *mba1*¹⁻²⁷³-FLAG-Plasmid enthielten.

Für die Überprüfung der Stabilität von Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG sowie Mba1¹⁻²⁷³-FLAG wurden mitochondriale Lysate mit Hilfe der Western-Analyse untersucht. Unter Verwendung des FLAG-Antikörpers sowie des Mba1-Antikörpers konnte sowohl Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG als auch Mba1¹⁻²⁷³-FLAG bei einem erwarteten Molekulargewicht von ungefähr 28,5 kDa (Tab. 8.3) nachgewiesen werden (Abb. 4.16). Die Deletionsvarianten Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG sind stabil, da sie im Vergleich zu Mba1-FLAG keinen signifikanten Abbau aufweisen.

Diese Beobachtung wurde ebenfalls für Mba1¹⁻²⁷⁵-GFP und Mba1¹⁻²⁷³-GFP gemacht, deren Fusionsgene im $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*) unter der Kontrolle des *nativen MBA1-Promotors* vom Plasmid exprimiert wurden. Die Proteinsignale sind wie erwartet bei einem Molekulargewicht von ungefähr 54 kDa (Tab. 8.2) sichtbar (Abb. 8.19).

Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der SDS-Polyacrylamidgele wurden die Membranen mit Kontrollantikörpern gegen Tim50, Tom20 und Cyc1 behandelt, die bei den erwarteten Molekulargewichten (Tab. 8.4) detektiert werden können (Abb. 4.16 und Abb. 8.19).

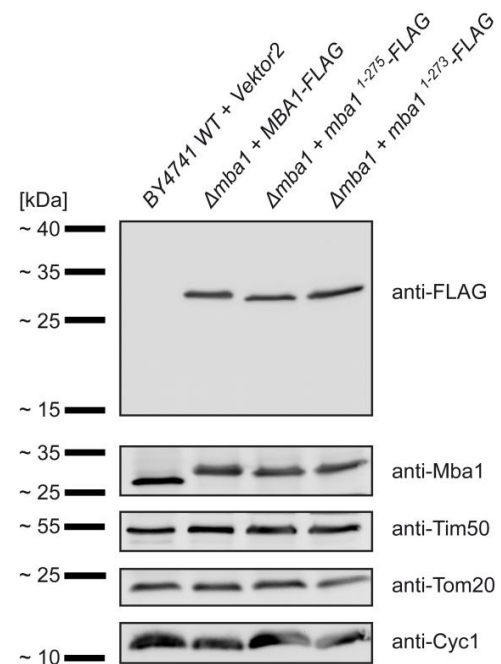


Abb. 4.16: Expression und Stabilität von Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG.

Der Wildtyp *BY4741 WT* mit *Vektor2* und die $\Delta mba1$ -Stämme (*BY4741*) mit *MBA1-FLAG*-, *mba1*¹⁻²⁷⁵-FLAG- bzw. *mba1*¹⁻²⁷³-FLAG-Plasmid wurden in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Die Lysate isolierter Mitochondrien wurden mittels Western-Analyse untersucht. Die Membran wurde erst mit FLAG-Antikörper dekoriert und danach mit Antikörpern gegen die Proteine Mba1, Tim50, Tom20 und Cyc1.

Als nächstes wurde die mitochondriale Lokalisation und Orientierung von Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG mittels Subfraktionierung untersucht und ihre Membranständigkeit mit Hilfe von Natriumcarbonat-Konzentrationsreihen analysiert. Zu diesem Zweck wurden die isolierten Mitochondrien den Schilderungen aus den Kapiteln 4.3.3.2 und 4.3.3.3 entsprechend behandelt und die erhaltenen Proteinproben unter Anwendung einer Western-Analyse untersucht.

Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG wurden bei einem Molekulargewicht von ca. 28,5 kDa detektiert, wofür zunächst der FLAG-Antikörper und für einen zusätzlichen Nachweis der Mba1-Antikörper eingesetzt wurde (Abb. 4.17).

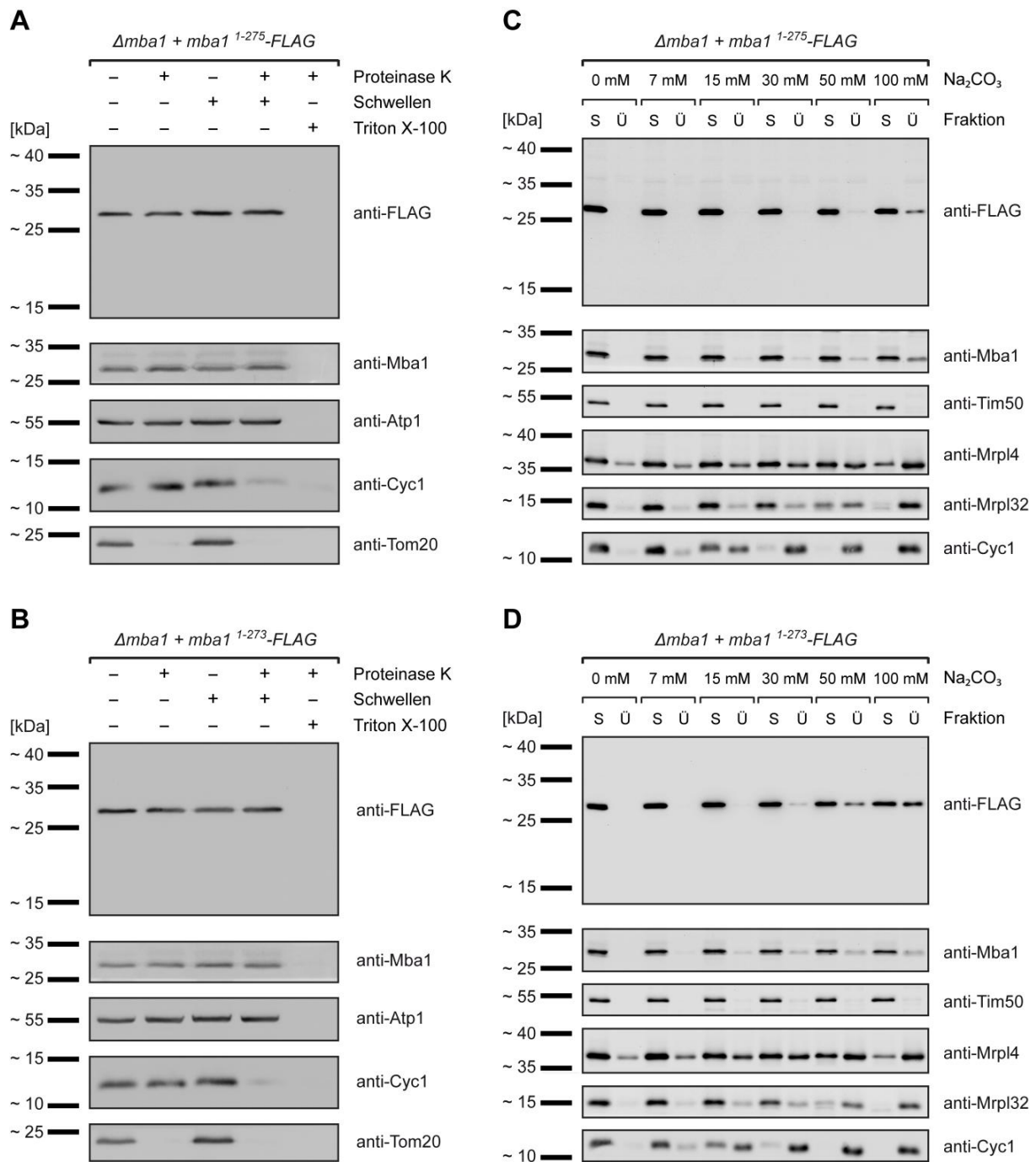


Abb. 4.17: Mitochondriale Lokalisation, Orientierung und Membranständigkeit von Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG.

Die isolierten Mitochondrien aus den $\Delta mba1$ -Stämmen (BY4741) mit $mba1^{1-275}\text{-FLAG}$ - (A, B) bzw. $mba1^{1-273}\text{-FLAG}$ -Plasmid (C, D), die in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert wurden, wurden einer Subfraktionierung (A, C) bzw. einer Natriumcarbonat-Konzentrationsreihe (B, D) unterzogen. (A, C) Für die Analyse der mitochondrialen Lokalisation und Orientierung der Mba1-FLAG-Varianten wurden die Membranen erst mit FLAG-Antikörper dekoriert und danach mit Antikörpern gegen die Proteine Mba1, Atp1, Cyc1 und Tom20. (B, D) Für die Analyse der Membranständigkeit der Mba1-FLAG-Varianten wurden die Membranen zunächst mit FLAG-Antikörper und danach mit Antikörpern gegen die Kontrollproteine Mba1, Tim50, Mrpl4, Mrpl32 und Cyc1 behandelt.

Die Subfraktionierungen zeigen, dass auch Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG (Abb. 4.17, A) und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG (Abb. 4.17, B), genau wie Mba1-FLAG (Abb. 4.9), in der inneren Membran auf der der Matrix zugewandten Seite lokalisieren, da sie in Fraktionen 2 und 4 vor dem Abbau durch Proteinase K geschützt sind (Spuren 2 und 4). Die Signale der Kontrollproteine Atp1, Cyc1 und Tom20, die mit

Hilfe des entsprechenden Antikörpers markiert wurden, sind in den erwarteten Fraktionen auf der dem jeweiligen Zielprotein entsprechenden Höhe zu verzeichnen (Abb. 4.17, A und B).

Die Natriumcarbonat-Extraktionen zeigen, dass für Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG (Abb. 4.17, C) und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG (Abb. 4.17, D) bei 30 mM Na₂CO₃ eine leichte Herauslösung aus der Mitochondrienmembran stattfindet, die mit zunehmender Na₂CO₃-Konzentration ansteigt. Bei 100 mM Na₂CO₃ ist der Anteil an löslichem Mba1¹⁻²⁷³-FLAG ungefähr doppelt so hoch wie der von Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG. Die Behandlung mit Kontrollantikörpern gegen Tim50, Mrpl4, Mrpl32 und Cyc1, die bei den erwarteten Molekulargewichten nachweisbar sind, legt nahe, dass die experimentellen Bedingungen beider Analysen vergleichbar waren (Abb. 4.18, C und D). Im Vergleich zu den in Kapitel 4.3.3.3 charakterisierten Membranständigkeiten fällt auf, dass Wildtyp-Mba1 (Abb. 4.10, A), Mba1-FLAG (Abb. 4.10, B) und Mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG (Abb. 4.17, C) ein ähnliches Verhalten zeigen. Im Gegensatz dazu weist Mba1¹⁻²⁷³-FLAG (Abb. 4.17, D) eine leicht reduzierte Assoziation an die innere Membran auf. Da jedoch bei 100 mM Na₂CO₃ auch mehr als 50 % der Mba1¹⁻²⁷³-FLAG-Fusionsproteine in der Sedimentfraktion nachgewiesen werden können, ist anzunehmen, dass die Membranständigkeit von Mba1¹⁻²⁷³-FLAG in *S. cerevisiae in vivo* nicht beeinträchtigt ist.

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Fusionsproteine von Mba1¹⁻²⁷⁵ und Mba1¹⁻²⁷³ stabil sind, korrekt in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert sind und im Vergleich zu Wildtyp-Mba1 keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Membranständigkeit aufweisen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit Hilfe der Konfokalmikroskopie gezeigt werden konnte, dass die Deletionsvariante Mba1¹⁻²⁷⁵ unter fermentativen Wachstumsbedingungen bevorzugt am Rand vergrößerter Mitochondrien vorliegt, wie es bereits für Mba1 dokumentiert wurde (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.3.3.4). Im Gegensatz dazu lokalisiert die Deletionsvariante Mba1¹⁻²⁷³ im Inneren der vergrößerten Mitochondrien, was auf eine Anreicherung in der Cristaemembran hindeutet. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine elektronenmikroskopische Analyse durchgeführt. Die Deletion der letzten fünf Aminosäuren des Mba1-Proteins führt zu einer eindeutigen Verlagerung der Mba1-Verteilung, da die Mehrheit der Mba1¹⁻²⁷³-Proteine in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie in der Cristaemembran zu finden ist. Da mit Hilfe der Elektronenmikroskopie neben Mitochondrien mit Wildtypmorphologie auch Mitochondrien mit Proteinaggregationsstrukturen beobachtet wurden, wurde geklärt, ob sich die C-terminale Markierung auf die Eigenschaften der Mba1¹⁻²⁷³-Fusionsproteine auswirkt und so zu einer Fehllokalisation führt. Unter Einsatz proteinbiochemischer Kontrollanalysen wurde jedoch nachgewiesen, dass sich die Mba1¹⁻²⁷³-Fusionsproteine weitestgehend wie Wildtyp-Mba1 verhalten und die dokumentierte Mba1¹⁻²⁷³-Verteilung demnach nicht mit einer Instabilität oder einer gravierend verminderten Membranständigkeit von Mba1¹⁻²⁷³ in Verbindung steht. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass es sich bei den fünf Aminosäuren, die in Mba1¹⁻²⁷³ deletiert sind, um einen für die Lokalisation von Mba1 kritischen Bereich im C-Terminus handelt.

4.3.4.3 Auswirkungen von Substitutionsmutationen im *MBA1*-Gen auf die submitochondriale Verteilung von *Mba1*

Um die Bedeutung einzelner C-terminaler Aminosäuren hinsichtlich der Verteilung und Funktion von *Mba1* zu untersuchen, wurde als Nächstes ein Alanin-scan durchgeführt. Mit Hilfe einer zielgerichteten Mutagenese wurden die letzten elf Aminosäuren im *Mba1*-C-Terminus jeweils einzeln gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht (Abb. 4.18). Da die Seitenkette von Alanin lediglich aus einer Methylgruppe besteht, resultiert die Substitution funktionell essentieller Aminosäuren mit längeren Seitenketten meist in einem Verlust der Funktion, jedoch nicht in einer Beeinträchtigung der Sekundärstruktur des mutierten Proteins (Cunningham & Wells, 1989).



Abb. 4.18: Schematische Darstellung der erzeugten *Mba1*-Varianten mit C-terminalen Substitutionen.

Dargestellt sind die verschiedenen *Mba1*-Varianten mit C-terminalen Substitutionen, die Position der jeweiligen Aminosäure, die mit Alanin substituiert wurde (fett hervorgehoben) sowie die bevorzugten Proteinlokalisationen in genetisch vergrößerten Mitochondrien im $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*). *Mba1*, *Mba1*-S278A, *Mba1*-P277A, *Mba1*-P276A, *Mba1*-L275A, *Mba1*-G270A, *Mba1*-N269A sowie *Mba1*-V268A lokalisieren am Rand und *Mba1*-R274A, *Mba1*-Y273A, *Mba1*-I272A sowie *Mba1*-D271A im Inneren der vergrößerten Mitochondrien. Grüne Bereiche: N-terminale Präsenz. Violette Bereiche: hydrophobe Aminosäureregionen.

Für die Analyse der submitochondrialen Lokalisation der *Mba1*-Substitutionsvarianten kam sowohl der $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*) als auch der *QCR2-mRFP*-Stamm (*BY4741*) zum Einsatz, welche die *MBA1-GFP*-Varianten unter der Kontrolle des *nativen MBA1-Promotors* vom Plasmid exprimierten. Im Anschluss an die Deletion von *MDM10* wurden die Stämme auf Glukoseplatten bei 30 °C herangezogen und konfokalmikroskopisch *in vivo* untersucht.

Es stellte sich heraus, dass insbesondere die Substitutionsmutanten *Mba1*-R274A, *Mba1*-Y273A, *Mba1*-I272A und *Mba1*-D271A eine eindeutige Anreicherung im Inneren der vergrößerten Mitochondrien aufweisen (Abb. 4.19, Abb. 8.27 und Abb. 8.28). Auch für *Qcr2-mRFP* ist eine Lokalisation im Inneren der vergrößerten Mitochondrien zu verzeichnen (Abb. 4.19, B und Abb. 8.28).

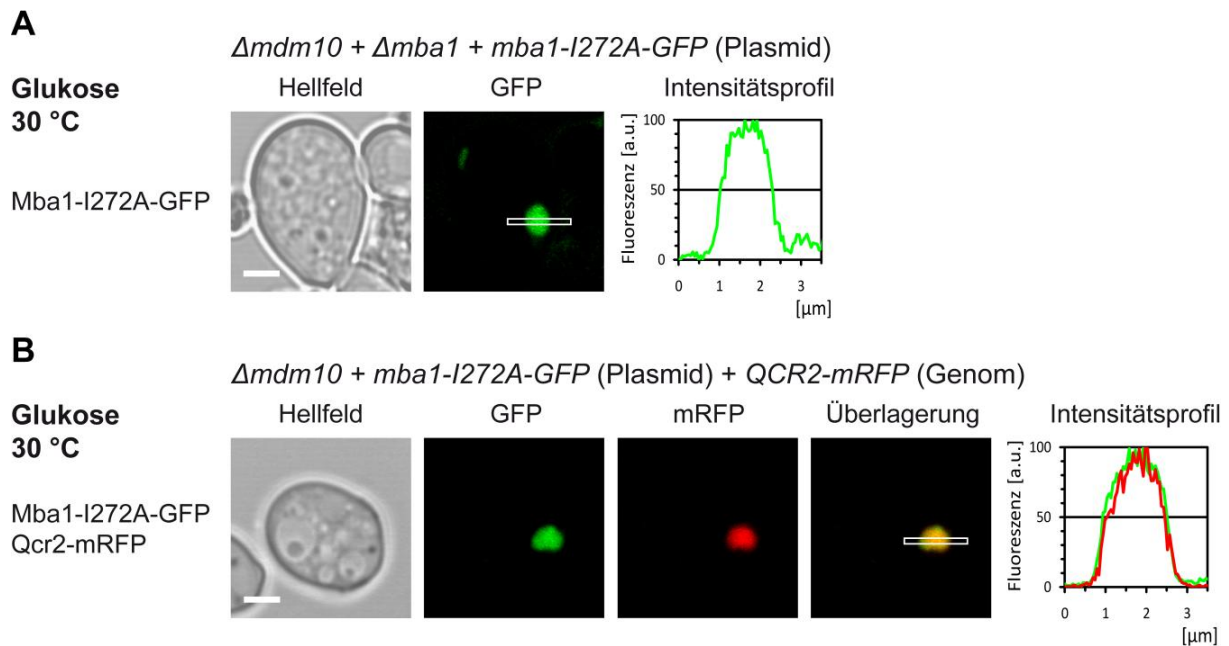


Abb. 4.19: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-I272A-GFP in vergrößerten Mitochondrien unter fermentativen Wachstumsbedingungen.

$\Delta mba1$ -Hefen (BY4741) (A) bzw. $QCR2-mRFP$ -Hefen (BY4741) (B) mit $mba1-I272A-GFP$ -Plasmid wurden auf Glukoseplatten bei 30 °C kultiviert. Mba1-I272A-GFP (A, B) und Qcr2-mRFP (B) sind im Inneren vergrößerter Mitochondrien angereichert. Von links nach rechts sind jeweils das Hellfeldbild (A, B), das Fluoreszenzbild für GFP (A, B) und mRFP (B), eine Überlagerung (B) sowie ein Intensitätsprofil der Fluoreszenzsignale (A, B) dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 μm .

Von den vier Mba1-Substitutionsvarianten, die eine veränderte Lokalisation aufweisen, wurde die Variante Mba1-I272A (Abb. 4.19) für weitere Untersuchungen ausgewählt. Da sowohl Isoleucin als auch Alanin zur Gruppe der Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten gehört, handelt es sich bei dieser Substitution um die kleinste strukturelle Veränderung im Mba1-Protein.

Um für weitergehende Analysen sicherzustellen, dass sich die $mba1-I272A-GFP$ -Expression nicht auf die Morphologie oder das Membranpotential der Mitochondrien ausübt, wurde der $mba1-I272A-GFP$ exprimierende $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurde der Stamm in Galaktosemedium bei 30 °C angezogen und *in vivo* unter Verwendung von MitoTracker Red CM-H₂XRos mikroskopiert.

Bei Wachstum mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Galaktose wurde keine Beeinflussung der Mitochondrienmorphologie oder des Membranpotentials durch die $mba1-I272A-GFP$ -Expression festgestellt (Abb. 8.23, unten). Bei der Expression von $mba1-I272A-FLAG$ in $\Delta mba1$ -Hefen (BY4741) sind diesbezüglich auch keine Auswirkungen zu verzeichnen (Abb. 8.24).

Die konfokalmikroskopischen Daten legen nahe, dass neben der Deletionsvariante Mba1¹⁻²⁷³ (siehe Kapitel 4.3.4.1) womöglich auch die Substitutionsvariante Mba1-I272A eine Anreicherung in der Cristaemembran aufweist. Um diese Vermutung zu überprüfen, kam die Elektronenmikroskopie zum Einsatz. Hierfür wurden die $\Delta mba1$ -Stämme (BY4741) mit $mba1-I272A-GFP$ - bzw. mit $mba1-I272A-FLAG$ -Plasmid in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Für die Detektion wurden die Fusionsproteine immunologisch mit Goldpartikeln markiert.

Auch bei dieser elektronenmikroskopischen Analyse sind, wie bei der von Mba1¹⁻²⁷³, sowohl Mitochondrien mit Wildtypmorphologie (Abb. 4.20, A und B) als auch Mitochondrien mit Proteinaggregationsstrukturen zu verzeichnen (Abb. 4.20, C und D). Für die statistische Auswertung der Verteilung der Mba1-I272A-Fusionsproteine kamen ebenfalls nur elektronenmikroskopische Aufnahmen zum Einsatz, die Mitochondrien mit Wildtypmorphologie zeigten.

Nach einer Auswertung von 106 Goldpartikeln können im Fall von Mba1-I272A-GFP 42,5 % der inneren Grenzflächenmembran und 57,5 % der Cristaemembran zugeordnet werden (Abb. 4.20, A). Für Mba1-I272A-FLAG wurden 171 Goldpartikel ausgewertet. 26 % der Goldpartikel sind in der inneren Grenzflächenmembran und 74 % in der Cristaemembran zu finden (Abb. 4.20, B). Sowohl für Mba1-I272A-GFP als auch für Mba1-I272A-FLAG ist bei Wachstum mit Galaktose bei 30 °C eine Anreicherung in der Cristaemembran zu beobachten.

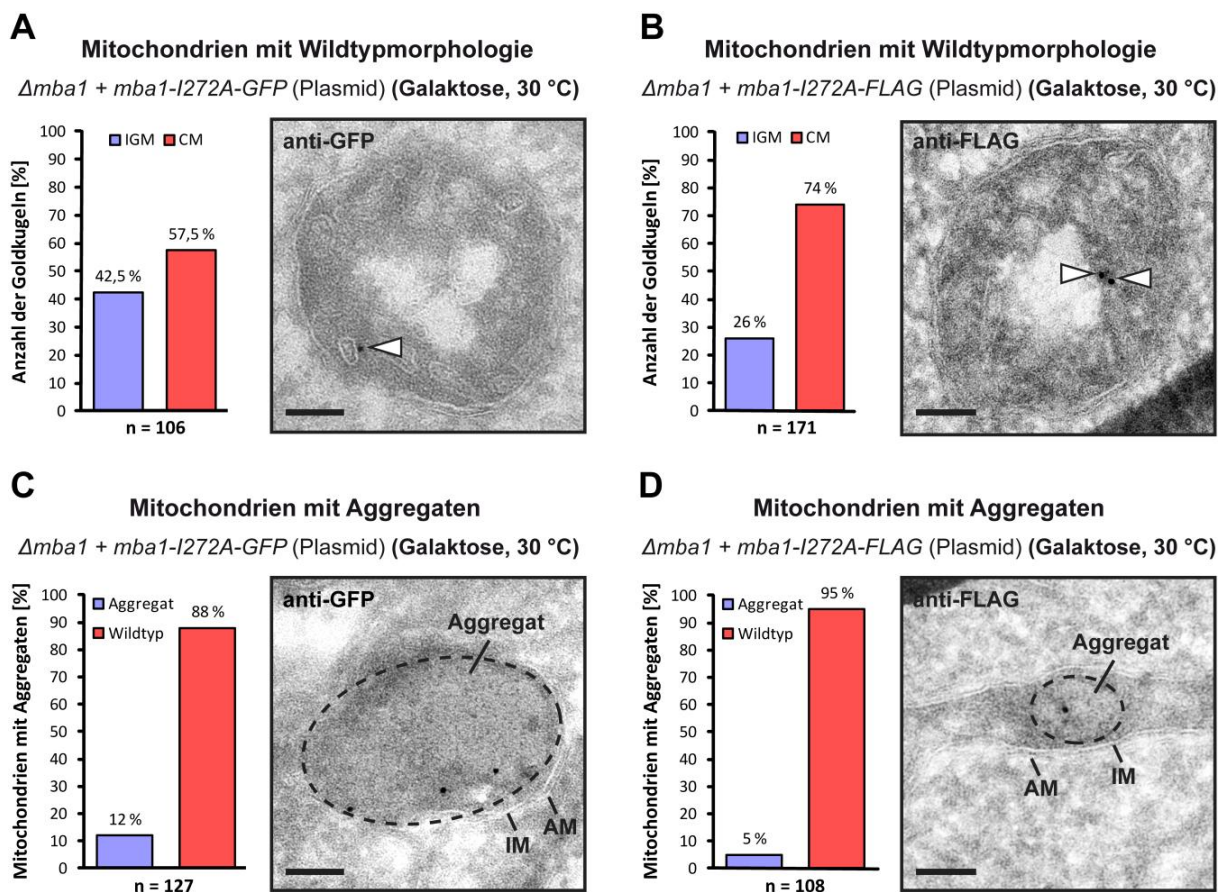


Abb. 4.20: Elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-I272A-GFP und Mba1-I272A-FLAG in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie unter fermentativen Wachstumsbedingungen.

Der $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) mit $mba1-I272A-GFP$ - (A, C) bzw. mit $mba1-I272A-FLAG$ -Plasmid (B, D) wurde in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. In Mitochondrien mit Wildtypmorphologie sind Mba1-I272A-GFP (A) und Mba1-I272A-FLAG (B) in der CM angereichert. Es ist eine statistische Auswertung der Verteilung der Fusionsproteine (links in A, B) sowie eine repräsentative Aufnahme (rechts in A, B) dargestellt. Zum Nachweis wurden die Fusionsproteine immunologisch mit Goldpartikeln markiert (Pfeile). Außerdem sind Mitochondrien mit Aggregaten abgebildet (gestrichelte Rahmung in C, D) sowie eine statistische Auswertung ihrer Häufigkeit (links in C, D) und eine repräsentative Aufnahme (rechts in C, D). IGM (innere Grenzflächenmembran); CM (Cristaemembran); IM (Innenmembran) und AM (Außenmembran). Größenstandard = 100 nm.

Bei Betrachtung der statistischen Auswertung der Mitochondrien mit Proteinaggregationsstrukturen fällt auf, dass der prozentuale Anteil an Mitochondrien mit Aggregaten im Fall von Mba1-I272A-GFP (Abb. 4.20, C) gegenüber dem von Mba1-I272A-FLAG (Abb. 4.20, D) leicht erhöht ist. Weiterhin wurde festgestellt, dass Mba1-I272A-GFP (Abb. 4.20, C) und Mba1-I272A-FLAG (Abb. 4.20, D) im Vergleich zu Mba1¹⁻²⁷³-GFP (Abb. 4.15, C) und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG (Abb. 4.15, D) deutlich geringere Prozentwerte aufweisen. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Substitutionsvariante Mba1-I272A im Vergleich zur Deletionsvariante Mba1¹⁻²⁷³ zwar ebenfalls zu einer Verlagerung der Mba1-Lokalisation führt, jedoch möglicherweise einen geringeren Einfluss auf die Struktur oder Funktion von Mba1 ausübt.

4.3.4.4 Stabilität, mitochondriale Lokalisation, Orientierung und Membranständigkeit der Substitutionsmutante Mba1-I272A

Um zu überprüfen, ob sich die C-terminale Fusionierung mit Markierungsproteinen auf die submitochondriale Verteilung von Mba1-I272A auswirkt, wurde Mba1-I272A-FLAG biochemisch analysiert. Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien aus dem $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) mit *mba1-I272A-FLAG*-Plasmid isoliert, der in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert wurde.

Mit Hilfe der Western Analyse wurden lysierte Mitochondrien bezüglich der Stabilität von Mba1-I272A-FLAG untersucht. Mba1-I272A-FLAG, das unter Verwendung des FLAG- sowie des Mba1-Antikörpers bei einem Molekulargewicht von ungefähr 29 kDa (Tab. 8.3) markiert wurde (Abb. 4.21), weist keinen erkennbaren Abbau auf, was darauf hindeutet, dass es stabil ist.

Als Ladekontrollen dienten die Proteine Tim50, Tom20 und Cyc1, die wie erwartet mittels des entsprechenden Kontrollantikörpers detektiert wurden (Abb. 4.21).

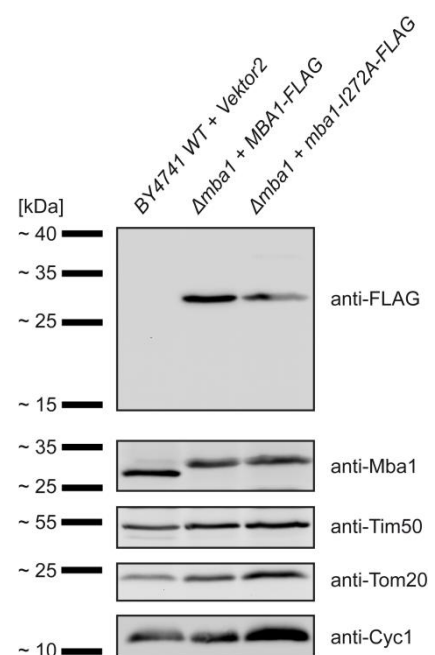


Abb. 4.21: Expression und Stabilität von Mba1-I272A-FLAG.

Der Wildtyp BY4741 WT mit *Vektor2* und die $\Delta mba1$ -Stämme (BY4741) mit *MBA1-FLAG*- bzw. *mba1-I272A-FLAG*-Plasmid wurden in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Die Lysate der daraus isolierten Mitochondrien wurden mittels Western-Analyse untersucht. Die Membran wurde erst mit FLAG-Antikörper dekoriert und danach mit Antikörpern gegen Mba1, Tim50, Tom20 und Cyc1.

Für die Bestimmung der mitochondrialen Lokalisation und Orientierung von Mba1-I272A-FLAG wurde eine Subfraktionierung und für die Charakterisierung der Membranständigkeit eine Natriumcarbonat-Konzentrationsreihe durchgeführt. Die isolierten Mitochondrien wurden nach der in Kapitel 4.3.3.2 und 4.3.3.3 beschriebenen Vorgehensweise behandelt, die Proben mittels Western-Analyse untersucht und Mba1-I272A-FLAG sowohl unter Einsatz des FLAG- als auch des Mba1-Antikörpers bei einem Molekulargewicht von ca. 29 kDa nachgewiesen (Abb. 4.22).

Die Subfraktionierung zeigt, dass Mba1-I272A-FLAG, genau wie die anderen Mba1-Varianten (Abb. 4.9 und Abb. 4.17, A und B), in der Innenmembran lokalisiert und beide Termini in die mitochondriale Matrix exponiert sind (Abb. 4.22, A). Die Kontrollen Atp1, Cyc1 und Tom20 wurden mit Hilfe des jeweiligen Antikörpers in den erwarteten Fraktionen detektiert (Abb. 4.22, A).

Anhand der Natriumcarbonat-Konzentrationsreihe ist zu erkennen, dass der Anteil der Mba1-I272A-FLAG-Proteine in der löslichen Überstandsfraction bei höheren Na_2CO_3 -Konzentrationen merklich ansteigt, während sich die Kontrollproteine Tim50, Mrpl4, Mrpl32 und Cyc1 der Erwartung entsprechend verhalten (Abb. 4.22, B). Obwohl der lösliche Mba1-I272A-FLAG-Anteil bei 100 mM Na_2CO_3 im Vergleich zu den anderen Mba1-Varianten (Abb. 4.10 und Abb. 4.17, C und D) deutlich erhöht ist, weist es bei 30 mM und 50 mM Na_2CO_3 eine vergleichbare Membranständigkeit auf. Deshalb wird angenommen, dass Mba1-I272A in *S. cerevisiae* *in vivo*, genau wie Wildtyp-Mba1, membranassoziiert vorliegt.

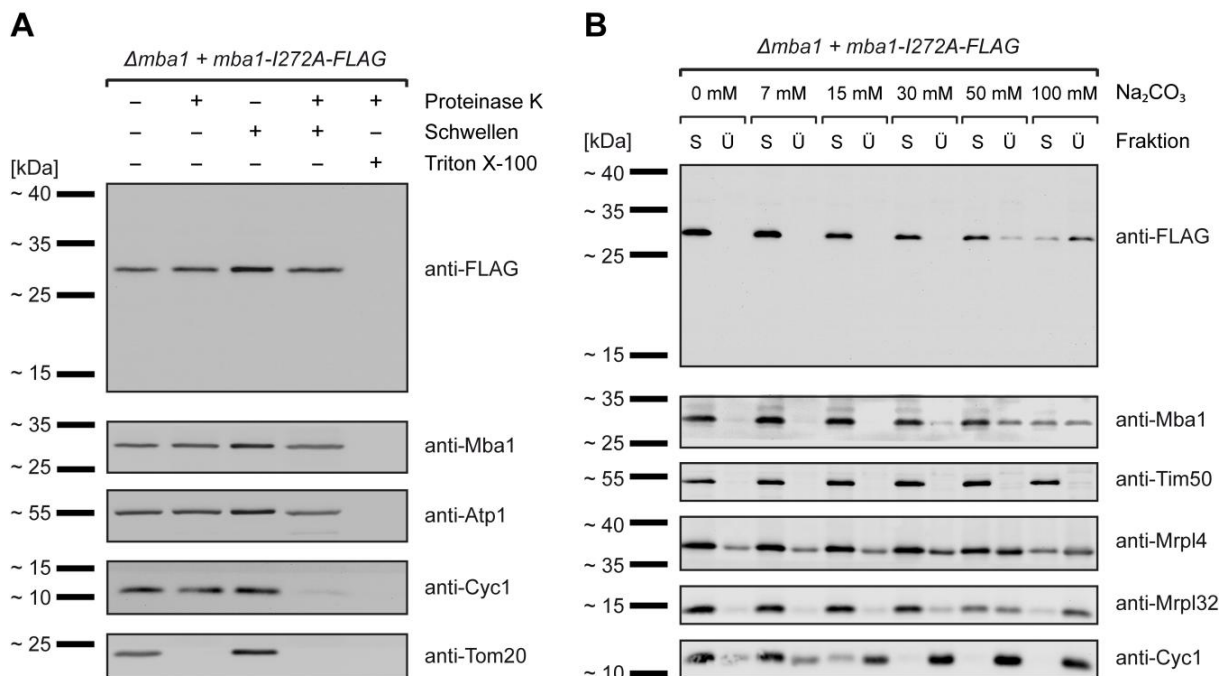


Abb. 4.22: Mitochondriale Lokalisation, Orientierung und Membranständigkeit von Mba1-I272A-FLAG.

Die isolierten Mitochondrien des $\Delta mba1$ -Stamms (BY4741) mit *mba1-I272A-FLAG*-Plasmid, der in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert wurde, wurden einer Subfraktionierung (A) bzw. einer Natriumcarbonat-Konzentrationsreihe (B) unterzogen. (A) Für die Analyse der Lokalisation und Orientierung von Mba1-I272A-FLAG wurde die Membran erst mit FLAG-Antikörper dekoriert und danach mit Antikörpern gegen Mba1, Atp1, Cyc1 und Tom20. (B) Für die Analyse der Membranständigkeit von Mba1-I272A-FLAG wurde die Membran zuerst mit FLAG-Antikörper und danach mit Antikörpern gegen Mba1, Tim50, Mrpl4, Mrpl32 und Cyc1 behandelt.

Die biochemischen Kontrollen zeigen, dass die Substitutionsvariante Mba1-I272A stabil ist und die korrekte Lokalisation sowie Insertion im Mitochondrium aufweist.

Es lässt sich zusammenfassend festhalten, dass sich die bevorzugte Lokalisation des Mba1-Proteins durch die Einführung bestimmter Deletionsmutationen sowie Substitutionsmutationen im *MBA1*-Gen von der inneren Grenzflächenmembran zur Cristaemembran hin verschiebt. Die Analyse einer Reihe von Deletions- und Substitutionsmutanten von Mba1 führte zur Identifikation eines Aminosäuresequenzabschnitts im Mba1-C-Terminus, der für die Verteilung von Mba1 ausschlaggebend zu sein scheint. Die epifluoreszenzmikroskopischen Analysen bezüglich des Membranpotentials haben gezeigt, dass auch die Zellen, die eine lokalisationsveränderte Mba1-Mutante exprimieren, respiratorisch aktiv und lebensfähig sind. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden Strukturen innerhalb der Mitochondrien beobachtet, bei denen es sich womöglich um Proteinaggregationen handelt und die offensichtlich mit der Lokalisationsveränderung von Mba1 in Zusammenhang stehen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich bestimmte *MBA1*-Mutationen nicht nur auf die Lokalisation, sondern auch auf die Funktion des Mba1-Proteins auswirken könnte.

4.3.5 Auswirkungen von *MBA1*-Genmutationen auf die Funktion des Mba1-Proteins

Um die Funktion der verschiedenen Mba1-Varianten zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten der *MBA1*-Varianten exprimierenden Stämme unter fermentativen bzw. respiratorischen Bedingungen bei verschiedenen Temperaturen analysiert und mit dem des Wildtypstamms *BY4741 WT* sowie des Deletionsstamms $\Delta mba1$ (*BY4741*) verglichen.

Die Hefekulturen wurden, von einer OD_{600} von $\sim 0,7$ ausgehend, sukzessiv 1:10 verdünnt, durch Stempeln oder Tropfen auf Glukose- bzw. Laktatplatten gebracht und für 4 Tage bei 25 °C, 30 °C bzw. 37 °C kultiviert. Anschließend wurde das Wachstumsverhalten der $\Delta mba1$ -Stämme (*BY4741*) dokumentiert, die entweder einen Kontrollvektor oder ein Expressionsplasmid trugen, das für eine *MBA1-GFP*-Variante (Abb. 8.33) oder eine *MBA1-FLAG*-Variante (Abb. 4.23) kodierte. Unter respiratorischen Bedingungen fungierte der Wildtypstamm *BY4741 WT* als Positivkontrolle und der $\Delta oxa1$ -Stamm (*YKODC*) als Negativkontrolle, da dieser bei Wachstum mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle nicht lebensfähig ist (Bonney *et al.*, 1994; Preuss *et al.*, 2001). Beide Stämme enthielten den dem Fusionskonstrukt entsprechenden Kontrollvektor.

Bei Wachstum mit Glukose und den verschiedenen Temperaturen ist im Allgemeinen kein Unterschied oder nur ein geringer Unterschied zwischen den untersuchten Stämmen zu erkennen. So ist bei 25 °C für den *mba1*¹⁻²⁷³-*FLAG*-Stamm ein geringfügig langsames und bei 30 °C für den Wildtyp ein etwas besseres Wachstum im Vergleich zu den anderen Stämmen zu verzeichnen. Bei 37 °C wachsen die Stämme, die eine mutierte *MBA1-FLAG*-Variante exprimieren, sowie der $\Delta oxa1$ -Stamm (*YKODC*) ein wenig schlechter als der Wildtyp (Abb. 4.23, links).

Auf Laktatplatten ist bei allen Temperaturen für den Δoxa1 -Stamm (*YKODC*) wie erwartet gar kein und für den Δmba1 -Stamm (*BY4741*) ein deutlich vermindertes Wachstum (Ott *et al.*, 2006) zu sehen. Zwischen dem Wildtyp und den Stämmen, die *MBA1-FLAG*, *mba1*¹⁻²⁷⁵-*FLAG* bzw. *mba1-I272A-FLAG* exprimieren, lässt sich bei 25 °C und 30 °C kein Unterschied und bei 37 °C nur ein minimaler beobachten. Im Vergleich zu diesen Stämmen weist der *mba1*¹⁻²⁷³-*FLAG*-Stamm bei allen Temperaturen ein merklich langsames Wachstum auf, das jedoch etwas besser als das des Deletionsstamms Δmba1 (*BY4741*) ist. Außerdem ist für alle Stämme ein etwas geringeres Wachstum bei 37 °C auf Laktat als bei 25 °C oder 30 °C auf Laktat zu beobachten (Abb. 4.23, rechts).

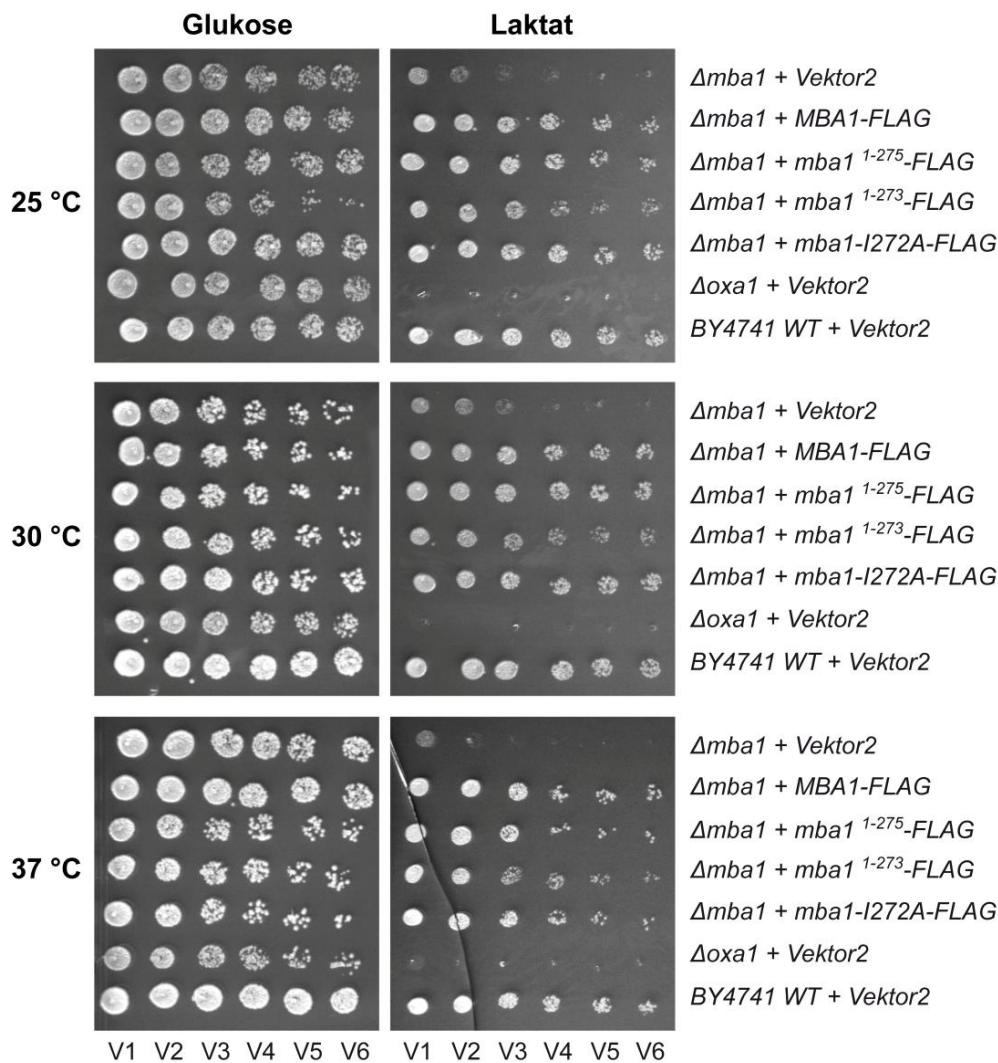


Abb. 4.23: Wachstumstest von *MBA1-FLAG*-Varianten exprimierenden Hefezellen.

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten der Δmba1 -Stämme (*BY4741*) mit *Vektor2*, mit *MBA1-FLAG*-Plasmid, mit *mba1*¹⁻²⁷⁵-*FLAG*-Plasmid, mit *mba1*¹⁻²⁷³-*FLAG*-Plasmid bzw. mit *mba1-I272A-FLAG*-Plasmid sowie des Δoxa1 -Stamms (*YKODC*) mit *Vektor2* und des Wildtypstamms *BY4741* WT mit *Vektor2*. Die Flüssigkulturen wurden ausgehend von einer OD_{600} von $\sim 0,7$ seriell 1:10 verdünnt (V1 - V6). Die verdünnten Kulturen wurden auf Glukose- bzw. Laktatplatten getropft und bei 25 °C, 30 °C und 37 °C kultiviert.

Die Analyse des Wachstumsverhaltens der Stämme, die eine *MBA1-GFP*-Variante exprimieren, führte prinzipiell zu denselben Ergebnissen (Abb. 8.33). Es fällt jedoch auf, dass der *mba1*¹⁻²⁷³-*GFP*-Stamm auf Laktat bei 25 °C, im Gegensatz zu 30 °C und 37 °C, besser und deshalb nur noch minimal lang-

samer als der Wildtyp und die anderen *MBA1-GFP*-Stämme wächst. Auch der *mba1-I272A-GFP*-Stamm zeigt auf Laktat bei 25 °C ein etwas besseres Wachstum als bei 30 °C und 37 °C. Da für den *mba1-I272A-FLAG*-Stamm auf Laktat unabhängig von der Temperatur keine Unterschiede im Wachstum zum Wildtyp oder dem *MBA1-FLAG*- und *mba1¹⁻²⁷⁵-FLAG*-Stamm festgestellt werden konnten (Abb. 4.23, rechts), ergibt sich die Frage, ob die Markierung mit GFP die Funktionalität von Mba1-I272A stärker beeinträchtigt als die mit dem FLAG-Peptid. Es wäre denkbar, dass auch die lokalizationsveränderte Variante Mba1-I272A zu einem Respirationsdefizit führt, das im Vergleich zu Mba1¹⁻²⁷³ nur geringeren und subtileren Ausmaßes ist und mit Hilfe des Wachstumstests nicht detektiert werden kann. Außerdem deuten diese Daten darauf hin, dass eine höhere Wachstumstemperatur zu einer stärkeren Ausprägung und eine niedrigere Temperatur zu einer Verminderung einer bestehenden Respirationsdefizienz führt.

Somit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Fusionsproteine von Mba1 sowie Mba1¹⁻²⁷⁵ eindeutig und die von Mba1-I272A zumindest zum Großteil in der Lage sind die Funktion des genomisch deletierten *MBA1* zu komplementieren, was im Gegensatz zu den Mba1¹⁻²⁷³-Fusionsproteinen steht. Die mutierte Variante Mba1¹⁻²⁷³ weist eine verminderte Funktionsfähigkeit auf, da sie unter respiratorischen Wachstumsbedingungen eine deutlich reduzierte Atmungskompetenz der Zellen, wenn auch nicht mit dem gleichen Ausmaß wie die genomische *MBA1*-Deletion, zur Folge hat. Auf Grund der aus der Literatur bekannten Funktionen von Mba1 (Preuss *et al.*, 2001) stellte sich die Frage, ob Mba1¹⁻²⁷³ in Folge einer Störung der Biogenese der oxidativen Phosphorylierung zu der beobachteten Respirationsdefizienz führt.

4.3.6 Auswirkungen von *MBA1*-Genmutationen auf die Biogenese der Superkomplexe der Atmungskette

Die im vorhergehenden Kapitel beobachtete Minderung der Respirationskompetenz von *mba1¹⁻²⁷³* exprimierenden Zellen deutet auf eine Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung hin, welche beispielsweise auf Probleme bei der Assemblierung der Superkomplexe der notwendigen Proteine zurückgeführt werden kann.

Zur Überprüfung der Superkomplexbildung der Atmungskette wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Deckers und Frau Wissel (Arbeitsgruppe „Mitochondrial Dynamics“, Institut für Zellbiochemie, Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland) eine BN-PAGE in Verbindung mit einer Western-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden Mitochondrien aus Stämmen gewonnen, die in Galaktosemedium bei 30 °C herangezogen wurden. Es kamen der Wildtypstamm *YPH499 WT*, der Δ *mba1*-Stamm (*YPH499*) sowie die Δ *mba1*-Stämme (*BY4741*) mit *MBA1-GFP*-, *mba1¹⁻²⁷⁵-GFP*- bzw. *mba1¹⁻²⁷³-GFP*-Plasmid zum Einsatz. Mit Hilfe von Digitonin (1 % (w/v)) wurden Mitochondrienlysate hergestellt, die über ein 4 → 10 % iges (w/v) BN-Polyacrylamidgel separiert wurden. Zur Visualisierung der Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung wurden die im Gel enthaltenen

Proteine mittels *Semi-Dry-Blot*-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen, die mit spezifischen Antikörpern gegen Komponenten der Atmungskettenkomplexe behandelt wurde. Für die Detektion der Cytochrom *c*-Reduktase (KomplexIII) wurden Antikörper gegen Cyt1 und Rip1, für die der Cytochrom *c*-Oxidase (KomplexIV) ein Cox4-Antikörper und die der F₁F₀-ATPase (KomplexV) ein Atp5-Antikörper eingesetzt.

Auch mit Hilfe der BN-PAGE konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine Mba1-GFP und Mba1¹⁻²⁷⁵-GFP funktional sind, da die Biogenese der Superkomplexe der Atmungskette nicht beeinträchtigt war. Die Analyse der Mitochondrien dieser Stämme zeigt das typische in der Literatur beschriebene Proteinbandenmuster von Monomeren, Dimeren sowie Superkomplexen der Atmungskettenkomplexe III, IV und V (Schägger, 2002), welches ebenfalls bei der Analyse der Mitochondrien des Wildtyps *YPH499 WT* zu sehen ist. Im Fall der Mitochondrien des *mba1*¹⁻²⁷³-GFP-Stamms ist eine deutliche Störung der Biogenese der oxidativen Phosphorylierung zu verzeichnen. Anscheinend ist die Bildung des Superkomplexes, der aus KomplexIII- und KomplexIV-Dimeren besteht, aber nicht die von Komplex V betroffen. Dasselbe Proteinbandenmuster kann auch für die Mitochondrien des Δ *mba1*-Stamms (*YPH499*) beobachtet werden (Abb. 4.24).

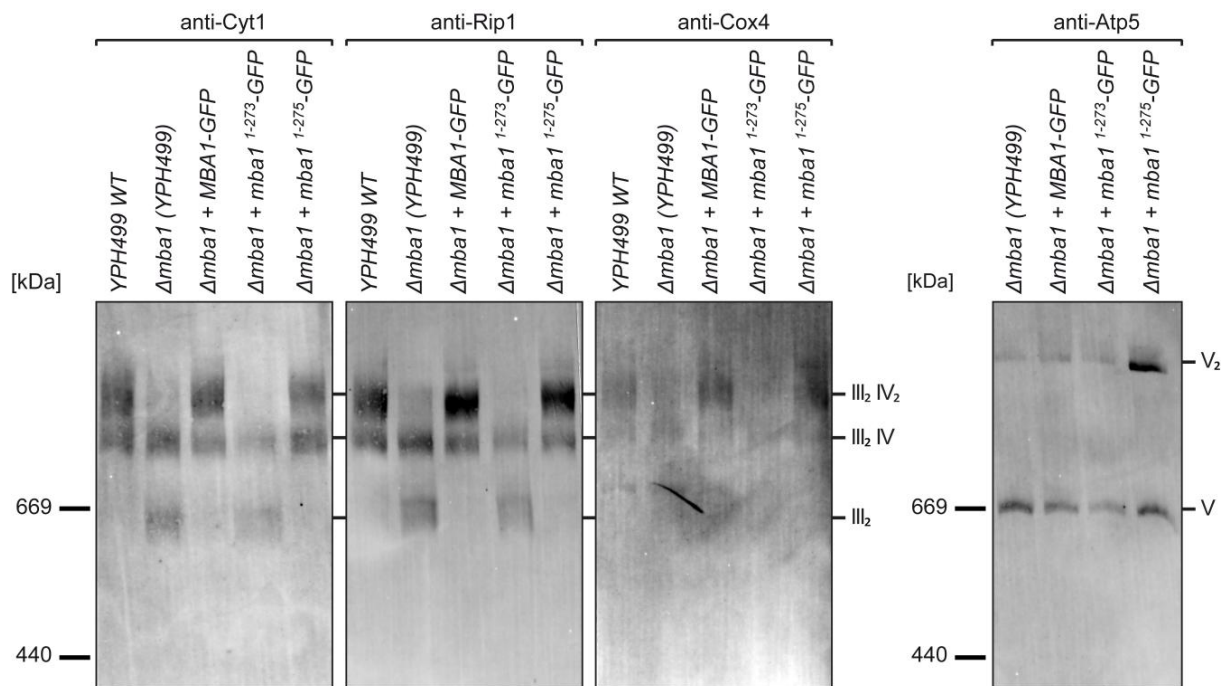


Abb. 4.24: Einfluss der verschiedenen Mba1-Varianten auf die Biogenese der Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung.

Der Wildtyp *YPH499 WT*, der Δ *mba1*-Stamm (*YPH499*) und die Δ *mba1*-Stämme (*BY4741*) mit *MBA1-GFP*-Plasmid, mit *mba1*¹⁻²⁷³-GFP-Plasmid bzw. mit *mba1*¹⁻²⁷⁵-GFP-Plasmid wurden in Galaktoosemedium bei 30 °C kultiviert. Isolierte Mitochondrien wurden mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert, die Lysate über eine BN-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Analyse untersucht. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine Cyt1, Rip1, Cox4 sowie Atp5 dekoriert. Gezeigt sind verschiedene Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung: KomplexIII-Dimer (III₂), Superkomplex aus KomplexIII-Dimer und KomplexIV-Monomer (III₂ IV) sowie aus KomplexIII-Dimer und KomplexIV-Dimer (III₂ IV₂), KomplexV-Monomer (V) und KomplexV-Dimer (V₂).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die dokumentierte Respirationsdefizienz von *mba1*¹⁻²⁷³ exprimierenden Zellen (siehe Kapitel 4.3.5) auf Probleme bei der Assemblierung der Dimere von KomplexIII und der Dimere von KomplexIV zu einem Superkomplex der Atmungskette zurückgeführt werden kann. Da Mba1 bekanntlich an der Biogenese mitochondrial kodierter Proteine wie Cox2 beteiligt ist (Preuss *et al.*, 2001), wäre es anzunehmen, dass die in diesem Kapitel beobachtete Beeinträchtigung der Superkomplexbildung mit einer Störung der Insertion bzw. Assemblierung der mitochondrial kodierten Untereinheiten in Zusammenhang stehen könnte.

4.3.7 Auswirkungen von *MBA1*-Genmutationen auf die Interaktion von Mba1 mit anderen mitochondrialen Proteinen

Die Ergebnisse des vorhergehenden Kapitels legen dar, dass *mba1*¹⁻²⁷³ exprimierende Zellen eine Beeinträchtigung in der Assemblierung eines Superkomplexes der Atmungskette aufweisen, die womöglich auf Probleme bei der Insertion oder bei der Assemblierung der entsprechenden Untereinheiten zurückgeführt werden kann. Es wäre denkbar, dass der verkürzte Mba1¹⁻²⁷³-C-Terminus zum Verlust oder zur Schwächung der Bindung von Mba1¹⁻²⁷³ an einen Interaktionspartner führt, bei dem es sich beispielsweise um das mitochondriale Ribosom, eine andere an der Insertion von Membranproteinen beteiligte Komponente oder einen Assemblierungsfaktor handeln könnte.

Um potentielle Interaktionspartner von Mba1 sowie der Mutante Mba1¹⁻²⁷³ zu identifizieren, wurde eine Koimmunopräzipitation entweder in Verbindung mit einer Western-Analyse oder einer LC-MS/MS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Mitochondrien aus in Galaktosemedium bei 30 °C kultivierten Stämmen gewonnen. Der Kontrollstamm *BY4741 WT* trug den *Vektor2* und die Δ *mba1*-Stämme (*BY4741*) ein *MBA1-FLAG*- bzw. ein *mba1*¹⁻²⁷³-*FLAG*-Plasmid.

Da die Mitochondrien für die Koimmunopräzipitation mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert werden sollten, wurde zunächst die Auswirkung von Detergentien auf die Stabilität von Mba1-FLAG und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG, wie in den Kapiteln 4.1.1.1 und 4.1.2.2 beschrieben, analysiert. Wildtyp-Mba1 und die Mba1-FLAG-Varianten konnten bei 28 kDa bzw. bei 29 kDa mittels FLAG- und Mba1-Antikörper visualisiert werden (Abb. 8.20). Als Kontrollen für die Gelbeladung kamen Antikörper gegen Tim50, Tom20 und Cyc1 zum Einsatz, welche die Kontrollproteine bei den erwarteten Molekulargewichten markieren (Abb. 8.20). Die Mba1-FLAG-Varianten wurden mit SDS vollständig und mit Digitonin zum großen Teil aus der Membran herausgelöst. Dabei ist kein Abbau zu verzeichnen, weshalb anzunehmen ist, dass die Mba1-FLAG-Varianten auch unter dem Einfluss von Detergentien stabil sind und für Koimmunopräzipitation eingesetzt werden konnten.

Für die Fällung der Zielproteine Mba1-FLAG und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG sowie potentiell assoziierter Proteine aus den Lysaten, die mit 1 % (w/v) Digitonin hergestellt wurden, wurde Anti-FLAG-Agarose verwendet. Da das Lysat der Wildtyp-Mitochondrien kein FLAG-Fusionsprotein enthielt, diente die Wildtyp-Probe als Kontrolle. Nach der 1,5-stündigen Inkubation mit Anti-FLAG-Agarose wurden die Proben gründlich gewaschen, die gebundenen Proteine mit 100 mM Glycin eluiert und über ein SDS-

Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die im Gel enthaltenen Proteine wurden entweder mittels Nass-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und über eine Immunmarkierung nachgewiesen oder direkt im Gel mit Trypsin verdaut, um tryptische Peptide zu erhalten, die mit Hilfe von LC-MS/MS analysiert wurden.

Als Erstes wurden die über Koimmunopräzipitation gefällten Proteine mittels Western-Analyse untersucht. Um die Reinheit und den Erfolg der Koimmunopräzipitationen zu überprüfen, wurden neben den Eluaten auch die Lysate auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine mit Hilfe einer Silberfärbung im Gel visualisiert. Diese Färbung zeigt zum einen, dass im Vergleich zu den Lysaten nur noch sehr wenige Proteine in den Eluaten vorhanden sind und zum anderen, dass im Wildtyp-Eluat nochmals weniger Proteine als in den Eluaten der Mba1-FLAG-Varianten sichtbar sind (Abb. 8.21). Das lässt auf erfolgreiche Koimmunopräzipitationen und relativ reine Proben schließen, welche daraufhin mittels Western-Analyse untersucht wurden (Abb. 4.25).

Die Zielproteine Mba1-FLAG und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG wurden auf der Nitrozellulosemembran bei etwa

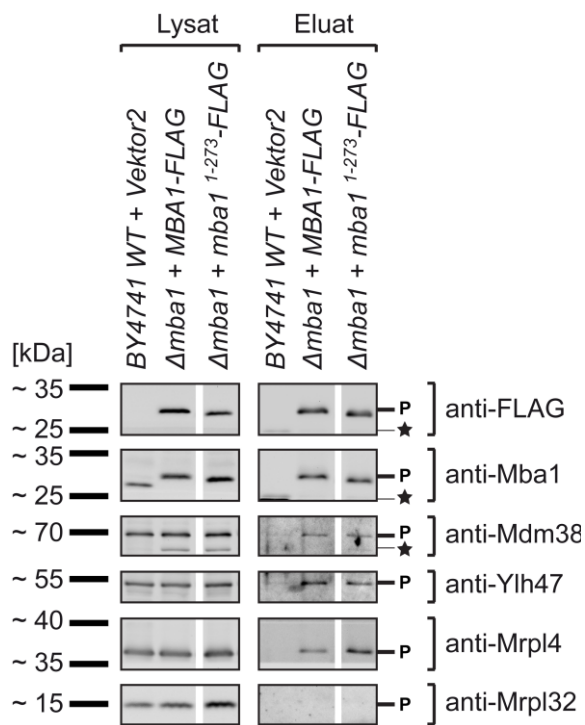


Abb. 4.25: Analyse der Koimmunopräzipitationen mit Mba1-FLAG-Varianten.

Aus den in Galaktosemedium bei 30 °C kultivierten Stämmen *BY4741 WT* mit *Vektor2* und *Δmba1* (*BY4741*) mit *MBA1-FLAG*- bzw. *mba1¹⁻²⁷³-FLAG*-Plasmid wurden Mitochondrien isoliert. Nach Solubilisierung mit 1 % (w/v) Digitonin wurden die Proteine mit Anti-FLAG-Agarose gefällt und mittels Western-Analyse untersucht. Die Membran wurde mit FLAG- bzw. Mba1-Antikörper dekoriert und danach mit Antikörpern gegen Mdm38, Ylh47, Mrpl4 und Mrpl32. Spezifische Proteinbanden (P). Nicht-identifizierte Proteinsignale (★). Von den Lysaten wurden 50 % und den Eluaten 100 % aufgetragen.

29 kDa mit Hilfe des FLAG- bzw. des Mba1-Antikörpers nachgewiesen (Abb. 4.25). Die Mba1-Antikörper-Färbung zeigt, dass die Mba1-FLAG-Varianten spezifisch präzipitiert wurden, da Wildtyp-Mba1 nur im Wildtyp-Lysat, aber nicht im Wildtyp-Eluat zu sehen ist. Anschließend wurde die Membran mit Antikörpern gegen mögliche Interaktionspartner von Mba1 dekoriert (Abb. 4.25). Mdm38 sowie Mrpl4 wurden wegen der in der Literatur beschriebenen Interaktionen mit Mba1 ausgewählt und Ylh47 wegen der bekannten Interaktion mit Mdm38 (Bauerschmitt *et al.*, 2010; Gruschke *et al.*, 2010). Mrpl 32 wurde als weitere Komponente des mitochondrialen Ribosoms untersucht (Graack & Wittmann-Liebold, 1998).

Um die in den Lysaten und Eluaten vorhandenen Mengen der Kandidatenproteine zu bestimmen, wurden die Signale dieser Proteine (Abb. 4.25) quantitativ ausgewertet (Tab. 4.2). Diese Quantifizierung wurde nur für die Mba1-FLAG-Probe sowie die Mba1¹⁻²⁷³-FLAG-Probe durchgeführt, da der Signalintensitätswert eines Proteins innerhalb einer Probe stets auf den Wert

der Mba1-FLAG-Variante normalisiert wurde und im Wildtyp-Eluat gar kein Mba1-Signal vorhanden ist. Das Wildtyp-Eluat zeigt die Spezifität der jeweiligen Proteinfällung an. So deuten die sehr schwachen Proteinbanden von Mdm38 und Ylh47 im Wildtyp-Eluat auf eine geringfügig unspezifische Bindung dieser Proteine an die Anti-FLAG-Agarose hin (Markierung mit dem Sternsymbol in Abb. 4.25). Für die Quantifizierungen (Tab. 4.2) wurden diese Verunreinigungen vernachlässigt, da die Proteinbanden im Wildtyp-Eluat deutlich schwächer sind als die in den Eluaten der Mba1-FLAG-Varianten (Abb. 4.25).

Mrpl32 kann in den Lysaten, jedoch nicht in den Eluaten detektiert werden, was darauf hindeutet, dass es nicht mit den Mba1-FLAG-Varianten präzipitiert werden konnte. Beim Vergleich der Signalintensitäten von Mdm38 und Ylh47 ist weder in den Lysaten noch in den Eluaten ein merklicher Unterschied zwischen den beiden Mba1-FLAG-Varianten zu erkennen. Für Mrpl4 ist eine Anreicherung in der Mba1¹⁻²⁷³-FLAG-Probe zu verzeichnen, da der Intensitätswert im Eluat von Mba1¹⁻²⁷³-FLAG im Vergleich zu dem von Mba1-FLAG erhöht ist (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Quantifizierung der mittels Western-Analyse erhaltenen Signale von Kandidatenproteinen der Koimmunopräzipitationen mit Mba1-FLAG-Varianten.

Kategorie	Protein	Signalintensität [%]			
		Lysat		Eluat	
		$\Delta mba1 +$ MBA1-FLAG	$\Delta mba1 +$ <i>mba1</i> ¹⁻²⁷³ -FLAG	$\Delta mba1 +$ MBA1-FLAG	$\Delta mba1 +$ <i>mba1</i> ¹⁻²⁷³ -FLAG
Zielprotein	Mba1	100	100	100	100
Beteiligung an der Proteininsertion	Mdm38	77	92	16	21
	Ylh47	49	57	43	41
mitochondriales Ribosom	Mrpl4	100	110	30	67
	Mrpl32	83	140	0	0

Als nächstes wurden die Eluate der Koimmunopräzipitationen in Zusammenarbeit mit Frau Raabe (Arbeitsgruppe „Bioanalytische Massenspektrometrie“, Prof. Dr. Urlaub, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) mittels LC-MS/MS untersucht. Nach dem Abgleich der Rohdaten dieser Analyse mit der UniProt-Proteindatenbank für *S. cerevisiae* wurden sie unter Verwendung des Programms Scaffold Viewer manuell analysiert. Eine Selektion an Daten (Tab. 8.5), die anhand der Funktion eines Kandidatenproteins und der zugehörigen Anzahl der detektierten Peptide getroffen wurde, wurde in Excel exportiert und für die Mba1-FLAG-Probe sowie die Mba1¹⁻²⁷³-FLAG-Probe quantifiziert (Tab. 4.3). Auch zu diesem Zweck wurde eine Normalisierung der Signalintensitätswerte (Anzahl der Peptide) der ausgewählten Kandidatenproteine gegen den des entsprechenden Mba1-Zielproteins durchgeführt, bei der die im Wildtyp-Eluat detektierten Peptidsignale auf Grund ihrer vergleichsweise niedrigen Intensitätswerte als geringfügige Verunreinigungen vernachlässigt wurden (Tab. 8.5).

Beim Vergleich der Signalintensitätswerte von Cox20 und Yta12 der beiden Mba1-FLAG-Eluate ist ein leichter Unterschied zu erkennen. Da der Signalintensitätswert von Cox20 geringfügig im Mba1-FLAG-Eluat und der von Yta12 geringfügig im Mba1¹⁻²⁷³-FLAG-Eluat erhöht ist, deutet es darauf hin, dass Cox20 etwas effizienter mit Mba1-FLAG und Yta12 etwas effizienter mit Mba1¹⁻²⁷³-FLAG präzipitiert werden konnte. Im Fall von Ssc1, Hsp60 und Pim1 ist eine deutliche Anreicherung im Mba1¹⁻²⁷³-FLAG-Eluat zu verzeichnen, da ihre Signalintensitätswerte im Vergleich zum Mba1-FLAG-Eluat merklich gesteigert sind (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Quantifizierung der mittels LC-MS/MS-Analyse erhaltenen Signale von Kandidatenproteinen der Koimmunopräzipitationen mit Mba1-FLAG-Varianten.

Kategorie	Protein	Signalintensität [%]	
		$\Delta mba1 +$ MBA1-FLAG	$\Delta mba1 +$ mba1 ¹⁻²⁷³ -FLAG
Zielprotein	Mba1-Variante	100	100
Protein mit Chaperonfunktion	Ssc1	27	98
	Hsp60	42	107
Cox2-Chaperon	Cox20	12	5
Komponente einer Protease	Pim1	0	21
	Yta12	10	19

Als Gesamteindruck kann festgehalten werden, dass es sich bei dem in Mba1¹⁻²⁷³ mutierten Bereich scheinbar nicht um die Region handelt, die für die Bindung von Mdm38 notwendig ist, da diesbezüglich mit Hilfe der Koimmunopräzipitation kein Unterschied zwischen den Mba1-Varianten zu erkennen ist. Des Weiteren scheint die Variante Mba1¹⁻²⁷³ weiterhin die Fähigkeit zur Bindung des mitochondrialen Ribosoms zu besitzen, da für Mrpl4 sogar eine Anreicherung in der Mba1¹⁻²⁷³-Probe zu verzeichnen ist. Die erhöhten Peptidsignale der Chaperone Ssc1 (Craig *et al.*, 1989) und Hsp60 (Cheng *et al.*, 1989) in der Mba1¹⁻²⁷³-Probe und die verminderte Präzipitation von Mba1¹⁻²⁷³ mit Cox20, einem an der proteolytischen Prozessierung und Assemblierung von Cox2 beteiligten Protein (Hell *et al.*, 2000), deuten gemeinsam darauf hin, dass die Substrate des Mba1-enthaltenden Komplexes womöglich nicht korrekt in die innere Membran inseriert oder assembliert werden. Dies könnte möglicherweise auf die veränderte submitochondriale Lokalisation von Mba1¹⁻²⁷³ zurückgeführt werden. Die Anreicherung der an der Proteolyse beteiligten Komponenten Pim1 (Suzuki *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994) und Yta12 (Arlt *et al.*, 1996) in der Mba1¹⁻²⁷³-Probe deutet an, dass die Substratproteine womöglich im Anschluss an ihre Translation auf Grund einer Beeinträchtigung des Insertions- oder Assemblierungsprozesses proteolytisch verdaut werden. Eine fehlgeschlagene Insertion oder Assemblierung von Substraten des Mba1-enthaltenden Komplexes in *mba1*¹⁻²⁷³ exprimierenden Zellen könnte auch der Grund für die in Kapitel 4.3.6 beobachtete Beeinträchtigung der Biogenese der Atmungskettenkomplexe sein, die sich schließlich auf die Atmungskompetenz der *mba1*¹⁻²⁷³ exprimierenden Zellen auswirkt (siehe Kapitel 4.3.5).

In Kapitel 4.3.5 entstand die Vermutung, dass die Senkung der Wachstumstemperatur womöglich zu einer Verminderung des Respirationsdefekts führt. Wenn es einen Zusammenhang zwischen der Lokalisationsveränderung und der reduzierten Funktionalität von Mba1¹⁻²⁷³ gibt, wäre es anzunehmen, dass der Lokalisationsphänotyp durch eine niedrigere Temperatur revertiert werden kann.

4.3.8 Submitochondriale Verteilung von Mba1-Varianten in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur

Es ist vorstellbar, dass es sich bei der mittels Mutagenese entdeckten Aminosäuresequenz im Mba1-C-Terminus um ein Bindungsmotiv handelt, das die Bindung von Mba1 an ein anderes mitochondriales Protein ermöglicht. Diese Interaktion könnte für die Lokalisation und somit die Bestimmung des Funktionsortes von Mba1 in der inneren Membran verantwortlich sein. Die Wachstumstemperatur könnte die Struktur oder Faltung dieses Bindungsmotivs oder sogar die vermutete Interaktion selbst beeinflussen, die zum beobachteten Lokalisationsphänotyp von Mba1¹⁻²⁷³ führt.

Im Rahmen der Analysen bezüglich der mutierten Oxa1-Variante Oxa1-W128F wurde ein temperatursensitiver Lokalisationsphänotyp dokumentiert. So führt die Verwendung einer niedrigeren Wachstumstemperatur als 30 °C zu einer teilweisen Revertierung des durch Mutagenese induzierten Lokalisationsphänotyps (Abb. 8.31). Deshalb wurde an dieser Stelle analysiert, wie sich eine niedrigere bzw. eine höhere Wachstumstemperatur auf die Verteilung einer lokalisationsveränderten Mba1-Variante auswirkt. Für diese Untersuchung wurden der $\Delta mba1$ -Stamm (*YKODC*) sowie der *QCR2-mRFP*-Stamm (*BY4741*) mit *mba1*¹⁻²⁷³-GFP-Plasmid eingesetzt, die nach der Deletion von *MDM10* auf Glukose bei 25 °C, 30 °C sowie 37 °C kultiviert wurden.

Die konfokalmikroskopische Analyse zeigt, dass Mba1¹⁻²⁷³-GFP bei 30 °C und 37 °C im Inneren und bei 25 °C eher am Rand der vergrößerten Mitochondrien lokalisiert (Abb. 8.29, A und B). Die Qcr2-mRFP-Anreicherung im Inneren der vergrößerten Mitochondrien legt nahe, dass die untersuchten Zellen bei allen Wachstumstemperaturen eine normale Cristastruktur aufweisen (Abb. 8.29, B).

Auf Grund dieser Beobachtung wurde als nächstes die Verteilung von Mba1-GFP, Mba1¹⁻²⁷⁵-GFP, Mba1¹⁻²⁷³-GFP und Mba1-I272A-GFP im $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*) sowie im *QCR2-mRFP*-Stamm (*BY4741*) bei Wachstum mit Glukose bei 25 °C konfokalmikroskopisch analysiert.

Alle Mba1-GFP-Varianten zeigen eine randständige Lokalisation (Abb. 4.26, A und B), während Qcr2-mRFP im Inneren der vergrößerten Mitochondrien angereichert ist (Abb. 4.26, B). Diese Daten deuten an, dass die Senkung der Temperatur sich nicht auf die Verteilung von Mba1 und Mba1¹⁻²⁷⁵, aber auf die von Mba1¹⁻²⁷³ und Mba1-I272A auswirkt und in diesen Fällen in einer Lokalisationsverschiebung von der Cristaemembran zur inneren Grenzflächenmembran resultiert.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde als nächstes die Verteilung von Mba1-GFP bzw. Mba1-FLAG sowie die von Mba1¹⁻²⁷³-GFP und Mba1-I272A-GFP im $\Delta mba1$ -Stamm (*BY4741*), der mit Galaktose bei 25 °C kultiviert wurde, elektronenmikroskopisch analysiert. Die Fusionsproteine wurden immunologisch mit Goldpartikeln markiert.

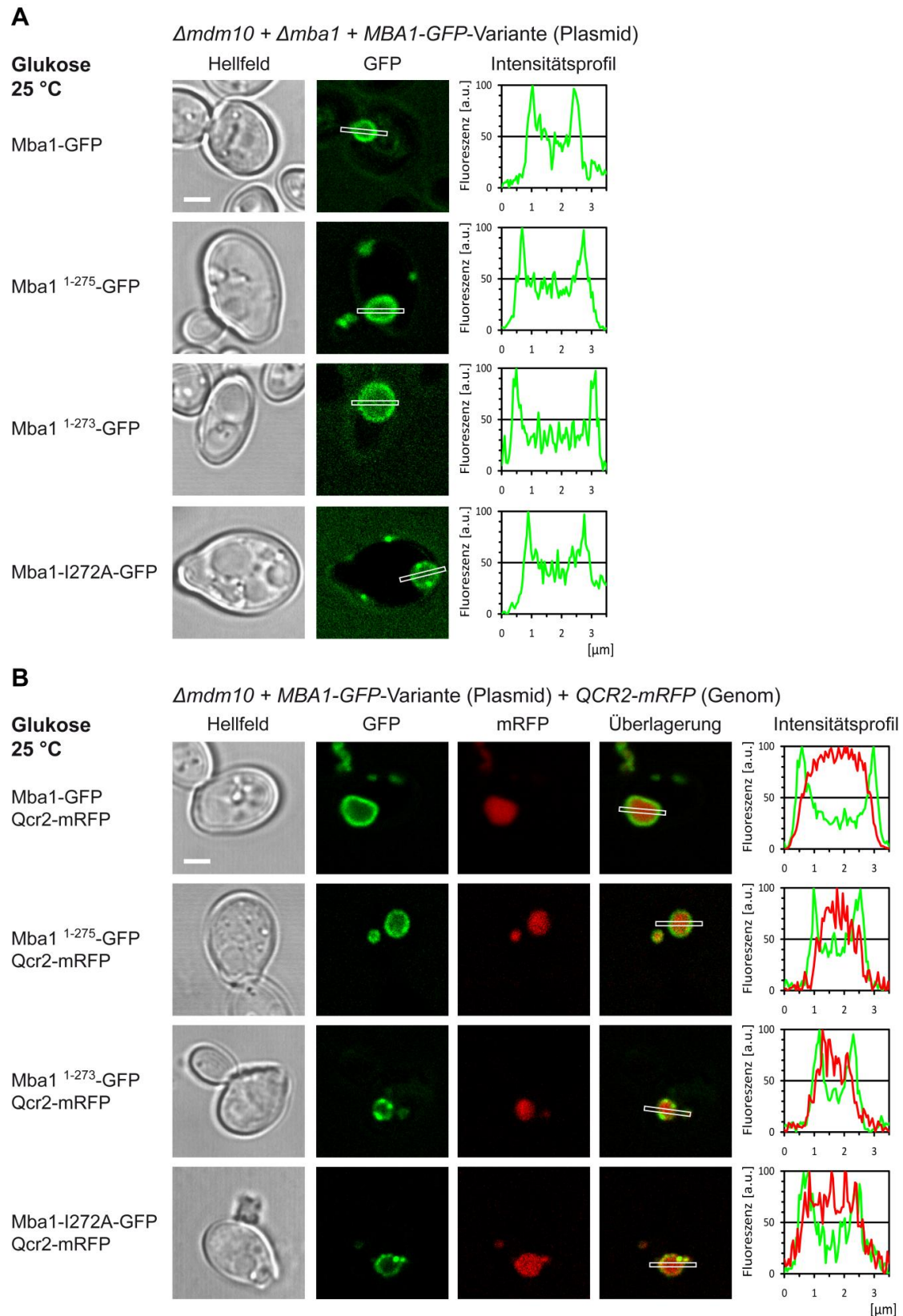


Abb. 4.26: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse verschiedener Mba1-GFP-Varianten in vergrößerten Mitochondrien bei einer Wachstumstemperatur von 25 °C.

$\Delta mba1$ -Hefen (BY4741) (A) bzw. $QCR2\text{-mRFP}$ -Hefen (BY4741) (B), die jeweils eine $MBA1\text{-GFP}$ -Variante vom Plasmid exprimierten, wurden auf Glukoseplatten bei 25 °C kultiviert. Die $Mba1\text{-GFP}$ -Fusionsproteine lokalisieren am Rand (A, B) und $Qcr2\text{-mRFP}$ stets im Inneren der vergrößerten Mitochondrien (B). Von links nach rechts sind das Hellfeldbild (A, B), das Fluoreszenzbild für GFP (A, B) und mRFP (B), eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale (B) und ein Intensitätsprofil der Fluoreszenzsignale (A, B) dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 µm.

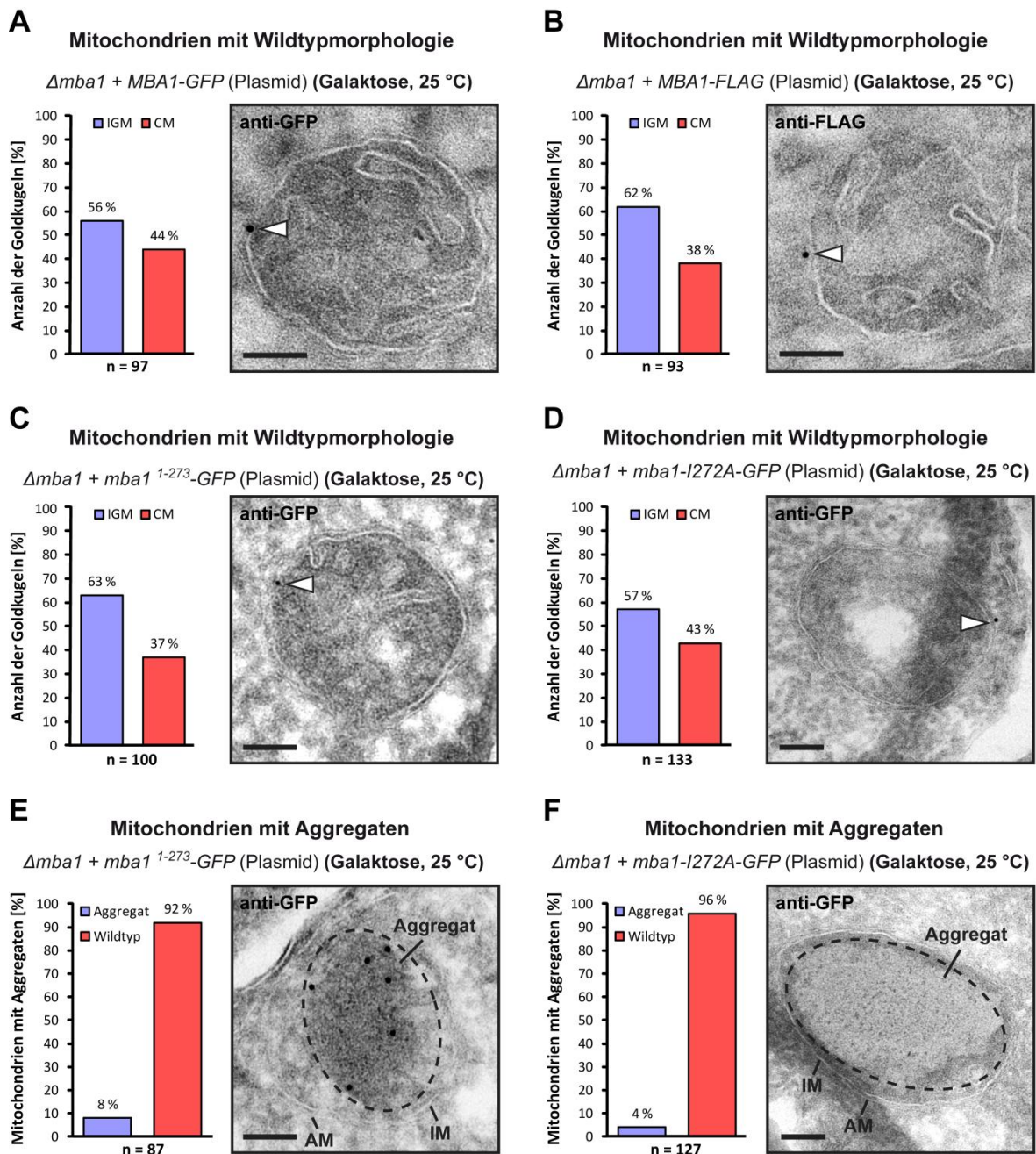


Abb. 4.27: Elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP, Mba1-FLAG, Mba1¹⁻²⁷³-GFP und Mba1-I272A-GFP in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie bei 25 °C.

Der $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) mit *MBA1-GFP*- (A), mit *MBA1-FLAG*- (B), mit *mba1¹⁻²⁷³-GFP*- (C, E) bzw. mit *mba1-I272A-GFP*-Plasmid (D, F) wurde in Galaktosemedium bei 25 °C kultiviert. In Mitochondrien mit Wildtypmorphologie sind Mba1-GFP (A), Mba1-FLAG (B), Mba1¹⁻²⁷³-GFP (C) und Mba1-I272A-GFP (D) in der IGM angereichert. Es ist eine statistische Auswertung der Verteilung der Fusionsproteine (links in A, B, C, D) sowie eine repräsentative Aufnahme (rechts in A, B, C, D) dargestellt. Zum Nachweis wurden die Fusionsproteine immunologisch mit Goldpartikeln markiert (Pfeile). Außerdem sind Mitochondrien mit Aggregaten abgebildet (gestrichelte Rahmung in E, F) sowie eine statistische Auswertung ihrer Häufigkeit (links in E, F) und eine repräsentative Aufnahme (rechts in E, F). IGM (innere Grenzflächenmembran); CM (Cristaemembran); IM (Innenmembran) und AM (Außenmembran). Größenstandard = 100 nm.

Bei Wachstum mit Galaktose bei 25 °C sind für Mba1-GFP von 97 ausgewerteten Goldpartikeln 56 % in der inneren Grenzflächenmembran und 44 % in der Cristaemembran zu finden (Abb. 4.27, A). Im Fall von Mba1-FLAG befinden sich von 93 Goldpartikeln 62 % in der inneren Grenzflächenmembran und 38 % in der Cristaemembran (Abb. 4.27, B). Sowohl für Mba1-GFP als auch für Mba1-FLAG

kann bei Wachstum mit Galaktose bei 30 °C (Abb. 8.30 und Abb. 4.12) sowie bei 25 °C (Abb. 4.27, A und B) eine präferentielle Lokalisation in der inneren Grenzflächenmembran beobachtet werden. Demnach ist die Verteilung von Mba1 unabhängig von der Temperatur.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Analyse der Verteilung von Mba1¹⁻²⁷³-GFP und Mba1-I272A-GFP bei Wachstum mit Galaktose bei 25 °C zeigen Mitochondrien mit Wildtypmorphologie (Abb. 4.27, C und D) sowie Mitochondrien mit Proteinaggregationsstrukturen (Abb. 4.27, E und F), wie es für das Wachstum mit Galaktose bei 30 °C dokumentiert wurde (siehe Kapitel 4.3.4.1 und 4.3.4.3). Auch für diese statistischen Auswertungen der Proteinverteilungen wurden nur elektronenmikroskopische Aufnahmen mit Mitochondrien mit Wildtypmorphologie herangezogen.

Für Mba1¹⁻²⁷³-GFP wurden 100 Goldpartikel ausgewertet, von denen sich 63 % in der inneren Grenzflächenmembran und 37 % in der Cristaemembran befinden (Abb. 4.27, C). Nach der Analyse von 133 Goldpartikeln ergibt sich für Mba1-I272A-GFP eine Verteilung von 57 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 43 % in der Cristaemembran (Abb. 4.27, D). Beide Mba1-Mutanten sind bei Wachstum mit Galaktose bei 25 °C in der inneren Grenzflächenmembran angereichert, was im Gegensatz zur Verteilung bei Wachstum mit Galaktose bei 30 °C steht (Abb. 4.15, A und Abb. 4.20, A). Demzufolge findet bei Senkung der Temperatur eine deutliche Lokalisationsveränderung statt, die der von Mba1 entspricht (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.3.3.4).

Bei der Beurteilung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, auf denen Mitochondrien mit Proteinaggregationsstrukturen abgebildet sind, ist zu erkennen, dass bei Wachstum mit Galaktose bei 25 °C deutlich weniger Mitochondrien Aggregate aufweisen. Im Fall von Mba1¹⁻²⁷³-GFP bei 30 °C ergibt die statistische Auswertung, dass 32 % der Mitochondrien Aggregate enthalten (Abb. 4.15, C), während es bei 25 °C nur noch 8 % sind (Abb. 4.27, E). Für Mba1-I272A-GFP wurde bei 30 °C beobachtet, dass der Anteil 12 % beträgt (Abb. 4.20, C), der bei 25 °C auf 4 % sinkt (Abb. 4.27, F). Bei der elektronenmikroskopischen Lokalisationsanalyse von Mba1¹⁻²⁷³-FLAG, bei der sich nach Auswertung von 89 Goldpartikeln eine Verteilung von 66 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 34 % in der Cristaemembran ergibt, sind sogar ausschließlich Mitochondrien mit Wildtypmorphologie zu verzeichnen (Abb. 8.32).

Insgesamt lässt sich aus diesen Daten schließen, dass die Mutationen *mba1*¹⁻²⁷³ und *mba1-I272A* zu einem temperatursensitiven Phänotyp führen. Mba1 lokalisiert unabhängig von der Temperatur präferentiell in der inneren Grenzflächenmembran, während für die mutierten Varianten Mba1¹⁻²⁷³ und Mba1-I272A bei einer niedrigeren Temperatur eine deutliche Verschiebung der bevorzugten Lokalisation von der Cristaemembran zur inneren Grenzflächenmembran stattfindet. Zusammen mit der Beobachtung, dass die Expression von *mba1*¹⁻²⁷³ und *mba1-I272A* deutlich weniger bzw. gar keine Proteinaggregationen mehr verursacht, führen die Daten zu der Annahme, dass eine niedrige Wachstumstemperatur sich dahingehend auf die Struktur oder die Bindungseigenschaften von Mba1¹⁻²⁷³ und Mba1-I272A auswirkt, dass es zu einer Abmilderung der Folgen der Mutationen kommt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass, neben Oxa1, die ebenfalls in die Proteininsertion involvierte Komponente Mba1 eine heterogene Verteilung mit einer Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran aufweist. Die Lokalisation von Mba1 in der Innenmembran erwies sich von der verwendeten Kohlenstoffquelle unabhängig, während die Deletion von nur fünf Aminosäuren (*mba1*¹⁻²⁷³) bzw. die Substitution einer einzelnen Aminosäure (*mba1-I272A*) im C-Terminus von Mba1 zu einer drastischen Lokalisationsverschiebung führte. Es zeigte sich, dass die Mutation *mba1*¹⁻²⁷³ zu einer verminderten Respirationskompetenz der Zellen führt und die Assemblierung von KomplexIII-Dimeren und von KomplexIV-Dimeren zu einem Superkomplex der oxidativen Phosphorylierung beeinträchtigt ist. Des Weiteren wurde belegt, dass die mutierten Varianten Mba1¹⁻²⁷³ und Mba1-I272A einen temperatursensitiven Lokalisationsphänotyp aufweisen.

Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Daten lässt sich zwar nicht endgültig erklären, was genau mit den mutierten Mba1-Proteinen passiert, aber sie weisen darauf hin, dass es infolge der Mutagenese des Mba1-C-Terminus zu einer Störung einer Interaktion von Mba1 mit einem bisher nicht eindeutig identifizierten Interaktionspartner kommen könnte. Solch eine Interaktion könnte die spezifische Lokalisation von Mba1 und somit auch die Stelle in der inneren mitochondrialen Membran bestimmen, an welcher Mba1 seine Funktion ausübt.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung von *Oxa1* in *S. cerevisiae*

Das mitochondriale Proteom setzt sich aus kernkodierten sowie mitochondrial kodierten Proteinen zusammen. Die Mehrheit der Innenmembranproteine ist im Zellkern kodiert und wird über den TOM- und den TIM-Komplex in die Matrix importiert und von dort aus posttranslational in die innere Membran inseriert. Bei den Proteinen, die im mitochondrialen Genom der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* kodiert sind, handelt es sich fast ausschließlich um hydrophobe Proteine der Komplexe der Atmungskette, die über einen kotranslationalen Mechanismus in die Innenmembran inseriert werden. Eine Komponente, die sowohl bei der posttranslationalen Insertion kernkodierter Proteine als auch der kotranslationalen Insertion mitochondrial kodierter Proteine eine zentrale Stellung einnimmt, ist Oxa1 (Herrmann & Neupert, 2003; Ott & Herrmann, 2010; Neupert, 2015).

Oxa1 ist ein integrales Protein der inneren Membran, das sich durch fünf Transmembrandomänen auszeichnet. Es wird angenommen, dass Oxa1 in der Innenmembran in homooligomeren Komplexen vorliegt, deren genaue Größe bisher jedoch nicht abschließend geklärt werden konnte. So wurde in zwei Studien von einem homotetrameren Oxa1-Komplex berichtet (Nargang *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2005), während eine andere Studie auf die Möglichkeit eines Poren-bildenden Homodimers hindeutete (Kohler *et al.*, 2009). In einer neueren Studie wurde vorgeschlagen, dass Oxa1-Proteine homotetramere aktive Einheiten bilden, wobei sich eine Einheit aus zwei funktional gekoppelten Dimeren zusammensetzt (Krüger *et al.*, 2012). Diese Studien geben Grund zu der Annahme, dass ein Oxa1-Dimer den Grundbaustein größerer Oxa1-enthaltender Komplexe darstellen könnte.

Im Zusammenhang mit Oxa1-Komplexgrößen wurde in der dieser Arbeit vorausgegangenen Doktorarbeit festgestellt, dass die Substitution der in der ersten Transmembrandomäne gelegenen, evolutionär konservierten Aminosäure Tryptophan128 mit Phenylalanin zu einer Reduktion der durchschnittlichen Größen von Oxa1-enthaltenden Komplexen führt. Darüber hinaus resultiert die Substitutionsmutation *oxa1-W128F* in einer Verschiebung der submitochondrialen Oxa1-Lokalisation von einer Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran hin zu einer präferentiellen Lokalisation in der Cristaemembran (Stoldt, 2010). Eine solche Lokalisationsverschiebung ist auch in Abhängigkeit der physiologischen Bedürfnisse der Hefezellen zu beobachten. Wachsen die Hefen mit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle, liegt Oxa1 bevorzugt in der inneren Grenzflächenmembran vor. Diese Verteilung verschiebt sich jedoch dynamisch zu einer Anreicherung in der Cristaemembran, wenn die Hefezellen mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen (Stoldt *et al.*, 2012).

Um einen tieferen Einblick in die Regulation von Oxa1 zu gewinnen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Größe von Oxa1-enthaltenden Komplexen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Annahme, dass ein direkter Zusammenhang

zwischen der submitochondrialen Lokalisation von Oxa1 und der Größe von Oxa1-enthaltenden Komplexen besteht, nicht bestätigt werden. Die Kenntnisse bezüglich der Substitutionsmutante Oxa1-W128F gaben außerdem Anlass zu der Annahme, dass diese sich womöglich auch auf Interaktionen von Oxa1 auswirken könnte, weshalb im Rahmen dieser Arbeit eine vergleichende Interaktionsstudie mit Oxa1 und der Variante Oxa1-W128F durchgeführt wurde. Diese Untersuchung führte zwar nicht zur Identifikation neuer Bindungspartner von Oxa1, aber zu der Erkenntnis, dass die Mutation *oxa1-W128F* in einer Beeinträchtigung der Homooligomerisierung von Oxa1 resultiert.

5.1.1 Die Größe der Oxa1-enthaltenden Komplexe steht nicht mit der bevorzugten Lokalisation von Oxa1 in Zusammenhang

Zu Beginn dieser Arbeit gab es Hinweise darauf, dass Oxa1 in der inneren Grenzflächenmembran in größeren oligomeren Komplexen vorliegen könnte, während kleinere Oxa1-enthaltende Komplexe in der Cristaemembran lokalisiert sind (Stoldt, 2010). Es wäre vorstellbar, dass *Cristae Junctions*, die den Übergang von der inneren Grenzflächenmembran zur Cristaemembran bilden (Perkins *et al.*, 1997), auf Grund ihres geringen Durchmessers als Diffusionsbarrieren fungieren könnten und somit den freien Austausch von Membranproteinen zwischen den Subkompartimenten der inneren Membran einschränken (Mannella *et al.*, 1994; Zick *et al.*, 2009; van der Laan *et al.*, 2012). Diese Rolle der *Cristae Junctions* wird zum Beispiel durch die Tatsache unterstützt, dass Atmungskettenkomplexe unterschiedlicher Cristae in ihrer Mobilität vorwiegend auf ein Crista begrenzt sind (Wilkens *et al.*, 2013). Dieser Theorie entsprechend wäre es denkbar, dass nur kleinere Oxa1-enthaltende Komplexe durch das Passieren der *Cristae Junctions* in die Cristaemembran gelangen können, während die größeren Oxa1-Komplexe in der inneren Grenzflächenmembran zurückbleiben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Größe von Oxa1-enthaltenden Komplexen in Abhängigkeit von der verwendeten Kohlenstoffquelle mit Hilfe der Blau-Nativen-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (BN-PAGE) analysiert. Es stellte sich heraus, dass die durchschnittlichen Größen der Oxa1-enthaltenden Komplexe, die durch Wachstum mit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle bevorzugt in der inneren Grenzflächenmembran lokalisieren, ungefähr den Größen der Komplexe entsprechen, die durch Wachstum mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle in der Cristaemembran angereichert sind. Sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen erstreckt sich der Größenbereich der Oxa1-enthaltenden Komplexe von ungefähr 150 kDa bis etwa 600 kDa. Ausschließlich im Fall der Substitutionsmutante Oxa1-W128F konnte eine Verringerung der Komplexgrößen beobachtet werden, die nun zwischen ca. 80 kDa und 450 kDa liegen.

Diesen Daten zufolge konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Größe von Oxa1-enthaltenden Komplexen und der Verschiebung der bevorzugten Lokalisation von Oxa1 in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle festgestellt werden. Diese Ergebnisse schließen jedoch eine mögliche Rolle der *Cristae Junctions* bei der Aufrechterhaltung der heterogenen Proteinverteilung in der inneren Membran nicht aus. Sie könnten, wie bereits beschrieben, als eine Art

„Molekularsieb“ oder nicht im Sinne einer strengen Diffusionsbarriere fungieren (Zick *et al.*, 2009) und eher eine Art „Sortierungsapparat“ darstellen. Es wäre durchaus vorstellbar, dass die höhermolekularen Oxa1-enthaltenden Komplexe mit einer Größe von ca. 600 kDa nicht nur Oxa1-Oligomere, sondern auch andere mitochondriale Proteine enthalten, und, dass die Verteilung von Oxa1 über die Ausbildung transienter Interaktionen reguliert wird. Die Studie von Stoldt *et al.* lieferte Hinweise darauf, dass Oxa1 unter fermentativen Bedingungen vorwiegend für die posttranslationale Insertion kernkodierter Proteine zuständig sein könnte (Stoldt *et al.*, 2012). Es könnte demnach sein, dass Oxa1 unter fermentativen Bedingungen transient mit Substratproteinen oder mit dem TIM23-Komplex interagiert, welcher für die Translokation der kernkodierten, konservativ sortierten Proteine verantwortlich ist. Da der TIM23-Komplex vermutlich hauptsächlich an den Kontaktstellen der inneren zur äußeren Membran lokalisiert ist (Vogel *et al.*, 2006; Horvath *et al.*, 2014), würde das eine Anreicherung von Oxa1 in der inneren Grenzflächenmembran erklären. Als Anpassung auf respiratorische Wachstumsbedingungen könnte es sein, dass die transienten Interaktionspartner vom Oxa1-enthaltenden Komplex dissoziieren, sodass das Oxa1-Oligomer die *Cristae Junctions* in Richtung Cristaemembran passieren kann, wobei dieser Prozess entweder passiv als „Molekularsieb“ oder aktiv als „Sortierungsapparat“ durch die *Cristae Junctions* reguliert sein könnte. In der Cristaemembran scheint Oxa1 überwiegend an der Insertion mitochondrial kodierter Proteine beteiligt zu sein (Stoldt *et al.*, 2012) und könnte sich beispielsweise in räumlicher Nähe zu anderen Komponenten der Insertionsmaschinerie wie Cox18 oder zu Assemblierungsintermediaten von Atmungskettenkomplexen aufhalten.

5.1.2 Die Substitutionsmutation *oxa1-W128F* führt zu einer Beeinträchtigung der Homooligomerisierung von Oxa1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Substitutionsvariante Oxa1-W128F im Vergleich zu Oxa1 eine Verringerung der durchschnittlichen Größen der Oxa1-enthaltenden Komplexe festgestellt, wie es bereits in der dieser Arbeit vorausgegangenen Studie beobachtet wurde (Stoldt, 2010). Da Oxa1 sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen in höhermolekularen Komplexen mit weiteren mitochondrialen Proteinen vorliegen könnte, entstand die Vermutung, dass die Substitutionsmutation *oxa1-W128F* möglicherweise nicht nur in der Reduktion der Größen der Oxa1-enthaltenden Komplexe, sondern auch in einer Beeinträchtigung von Oxa1-Interaktionen und somit auch in einer Veränderung der Komplexkomposition resultieren könnte. Der Verlust einer Bindung von Oxa1-W128F an einen Interaktionspartner von Oxa1 könnte die Verlagerung der bevorzugten submitochondrialen Lokalisation erklären.

Da für Oxa1 bisher nur sehr wenige stabile Interaktionen, wie zum Beispiel die Bindung weiterer Oxa1-Proteine, mitochondrialer Ribosomen oder des Substrats Atp9 (Szyrach *et al.*, 2003; Reif *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2007), nachgewiesen werden konnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Versuch unternommen die Zusammensetzung der Oxa1-enthaltenden Komplexe mit Hilfe einer Koimmunopräzipitation, die auf der Verwendung SILAC-markierter Mitochondrien basierte, in Verbindung mit

LC-MS/MS zu untersuchen. Bei SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture*) handelt es sich um eine Zellkultivierungstechnik, welche durch die Verwendung von leichten sowie schweren Varianten der Aminosäuren Lysin und Arginin einen quantitativen Vergleich zweier Proteome erlaubt und so eine Identifizierung von subtilen Unterschieden zwischen diesen beiden Proteomen ermöglicht (de Godoy *et al.*, 2006; Ong & Mann, 2006).

Die SILAC-basierte Interaktionsstudie mit Oxa1 und der Variante Oxa1-W128F führte jedoch nicht zur Identifizierung weiterer Oxa1-Interaktionspartner neben Oxa1 selbst. Dennoch stellte sich heraus, dass Oxa1-W128F-Proteine mit einer geringeren Effizienz aneinander binden als Oxa1-Proteine, was auf eine durch die Substitutionsmutation *oxa1-W128F* verursachte Beeinträchtigung der Homooligomerisierung von Oxa1 hindeutet.

Da in der Literatur berichtet wurde, dass die Aminosäure Tryptophan an Position 128 Teil einer hoch konservierten Dipeptidsequenz ist, welche für die Ausbildung von Interaktionen zwischen den Oxa1-Transmembrandomänen notwendig ist (Mathieu *et al.*, 2010), wäre es möglich, dass es auf Grund der Substitution von Tryptophan128 mit Phenylalanin zu einer Strukturveränderung des Oxa1-Proteins kommt, welche die Bildung von größeren Oxa1-Oligomeren stört. Trotz dieser Erkenntnis wäre es möglich, dass sich die Substitutionsmutation *oxa1-W128F* auch auf transiente Interaktionen von Oxa1 mit weiteren mitochondrialen Proteinen auswirken könnte. Demzufolge könnte die Verschiebung der bevorzugten Oxa1-Lokalisation in Abhängigkeit der Substitutionsmutation *oxa1-W128F* entsprechend der im vorhergehenden Kapitel präsentierten Theorie mit einem Verlust lokalisationsbestimmender transienter Interaktionen von Oxa1-W128F mit weiteren mitochondrialen Komponenten in Zusammenhang stehen.

Die Tatsache, dass neben Oxa1 selbst keine weiteren Interaktionspartner identifiziert werden konnten und, dass die Substitutionsmutation *oxa1-W128F* zu einer beeinträchtigten Homooligomerisierung führt, deuten darauf hin, dass Oxa1 keine stabilen Komplexe mit weiteren Proteinen bildet und womöglich hauptsächlich in Form von größeren Homooligomeren agiert. Zusammen mit den unter Anwendung der BN-PAGE ermittelten Größen sowie den aus der Literatur bekannten Daten bezüglich möglicher Größen von Oxa1-Homooligomeren (Nargang *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2005; Kohler *et al.*, 2009; Krüger *et al.*, 2012) deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei den beobachteten Komplexen mit einer Größe von etwa 80 kDa um Oxa1-Dimere und bei denen mit einer Größe von ca. 160 kDa um Oxa1-Tetramere handeln könnte. Demzufolge liegt Oxa1-W128F wahrscheinlich vorwiegend in Form von Dimeren sowie Tetrameren vor, während Oxa1 sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Bedingungen mindestens als Tetramer vorzuliegen scheint. Diese Erkenntnisse würden die Annahme unterstützen, dass ein Oxa1-Dimer den Grundbaustein für größere Oxa1-enthaltende Komplexe darstellen könnte und, dass Oxa1 homotetramere Einheiten ausbilden könnte.

5.2 Charakterisierung von *Mba1* in *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* besitzt neben Oxa1 auch das Protein Mba1 eine wichtige Rolle im Insertionsprozess mitochondrialer Membranproteine. Es wurde vorgeschlagen, dass es sowohl an der Insertion kernkodierter als auch mitochondrial kodierter Proteine beteiligt ist (Preuss *et al.*, 2001). Mba1 ist ein peripheres Protein der inneren Membran, mit welcher es auf der zur Matrix zugewandten Seite assoziiert (Rep & Grivell, 1996; Preuss *et al.*, 2001). Außerdem interagiert Mba1 mit naszierenden Polypeptidketten sowie mit mitochondrialen Ribosomen (Preuss *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006; Gruschke *et al.*, 2010). Auf Grund dieser Bindungen wird angenommen, dass Mba1 als eine Art Rezeptor fungiert, der die mitochondrialen Ribosomen zur Innenmembran rekrutiert und diese aktiv so gegenüber der integralen Insertionsmaschinerie der inneren Membran positioniert, dass eine effiziente kotranslationale Insertion der mitochondrial kodierten Proteine gewährleistet ist (Ott *et al.*, 2006; Gruschke *et al.*, 2010; Pfeffer *et al.*, 2015).

Bisher gibt es nur wenige Hinweise darauf, ob in der inneren mitochondrialen Membran bestimmte Bereiche existieren, an denen die Insertion mitochondrialer Membranproteine bevorzugt stattfindet. Um einen tieferen Einblick in den Insertionsprozess von Membranproteinen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine detaillierte Untersuchung der submitochondrialen Lokalisation von Mba1 in *S. cerevisiae* vorgenommen. So konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine heterogene Verteilung von Mba1 in der inneren mitochondrialen Membran nachgewiesen werden, die sich nicht in Abhängigkeit der physiologischen Bedingungen verändert. Des Weiteren wurde die submitochondriale Lokalisation zahlreicher mutierter Mba1-Varianten untersucht. Mit Hilfe der Mba1-Mutanten konnte in der vorliegenden Arbeit ein Aminosäureabschnitt im C-Terminus von Mba1 identifiziert werden, welcher essentiell für die submitochondriale Lokalisation sowie die Funktion von Mba1 ist.

5.2.1 Mba1 weist eine heterogene und statische Verteilung in der inneren mitochondrialen Membran auf

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit gab es keine gesicherten Erkenntnisse bezüglich der submitochondrialen Lokalisation von Mba1 in der inneren mitochondrialen Membran. Die mikroskopische Untersuchung der Verteilung von Mba1 in der inneren Membran stellte eine Herausforderung dar, da Mitochondrien nur einen Durchmesser von ~ 200 - 400 nm aufweisen (Hoffmann & Avers, 1973; Egner *et al.*, 2002) und die Auflösung eines konventionellen Lichtmikroskops nach dem Abbe'schen Gesetz durch Beugung auf etwa 250 nm limitiert ist (Abbe, 1873).

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen auf die konfokalmikroskopische Untersuchung von *S. cerevisiae*-Zellen mit einer Deletion von *MDM10* (*Mitochondrial Distribution and Morphology protein 10*) zurückgegriffen. Mdm10 spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der tubulären mitochondrialen Morphologie, weshalb die Deletion von *MDM10* in einer veränderten, kugelförmigen Mitochondrienmorphologie mit einem vergrößerten Durchmesser von etwa 0,5 bis 2,5 µm resultiert.

Diese Vergrößerung des mitochondrialen Durchmessers erlaubte es mit Hilfe der Konfokalmikroskopie zwischen einer Anreicherung eines Proteins in der inneren Grenzflächenmembran und einer präferentiellen Lokalisation eines Proteins in der Cristaemembran zu unterscheiden. Es wurde nachgewiesen, dass die genetisch vergrößerten Mitochondrien trotz der veränderten Morphologie weiterhin über eine Doppelmembran, eine Cristastruktur sowie einen funktionierenden Proteinimport verfügen. Des Weiteren weisen sie ein Membranpotential über die innere mitochondriale Membran auf und sind atemungskompetent (Sogo & Yaffe, 1994; Boldogh *et al.*, 1998; Meisinger *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen *MDM10* stets unmittelbar vor der Verwendung der zu analysierenden *S. cerevisiae*-Zellen deletiert, da weitere Studien belegt haben, dass es im Laufe der Zeit zu einem Verlust der mitochondrialen DNS (Boldogh *et al.*, 1998; Dimmer *et al.*, 2005) oder zu einer Komplementierung des Phänotyps der *MDM10*-Deletion kommen kann.

Zum anderen wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der Elektronenmikroskopie eingesetzt, die sowohl der Überprüfung der Erkenntnisse, die mit Hilfe der genetisch vergrößerten Mitochondrien gewonnen wurden, als auch der Quantifizierung von Proteinverteilungen in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie diente.

In dieser Arbeit stellte sich heraus, dass der größere Anteil an Mba1-Proteinen sowohl unter fermentativen als auch respiratorischen Wachstumsbedingungen in der inneren Grenzflächenmembran vorliegt. So konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie unabhängig von der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle für Mba1 ein Verteilungsverhältnis von ca. 55 % in der inneren Grenzflächenmembran zu ca. 45 % in der Cristaemembran nachgewiesen werden. Obwohl der prozentuale Unterschied des Verteilungsverhältnisses von Mba1 lediglich 10 % beträgt, kann geschlossen werden, dass die beobachtete Proteinverteilung von Mba1 spezifisch ist, da dieses Lokalisationsverhalten von Mba1 in mehreren Hefestämmen unterschiedlicher Genotypen und unter Verwendung von GFP-Fusionsproteinen sowie FLAG-Fusionsproteinen reproduziert werden konnte. Demzufolge wurde im Rahmen dieser Arbeit eine heterogene Verteilung von Mba1 in der inneren mitochondrialen Membran nachgewiesen, die von den physiologischen Bedürfnissen der Hefezellen unabhängig ist. Dieses statische Lokalisationsverhalten von Mba1 steht im Gegensatz zu der dynamischen Verteilung der Proteine Oxa1 (Stoldt *et al.*, 2012) und Pnt1, dessen submitochondriale Lokalisation auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. So weisen sowohl Oxa1 als auch Pnt1 unter fermentativen Wachstumsbedingungen eine Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran auf, welche sich unter respiratorischen Bedingungen zu einer Anreicherung in der Cristaemembran verschiebt.

5.2.2 Der C-Terminus von Mba1 ist essentiell für die submitochondriale Lokalisation von Mba1

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen keine weitreichenden Kenntnisse bezüglich funktionaler Domänen von Mba1 vor. Aus der Literatur war bisher nur bekannt, dass Mba1 über eine aminoterminal Präsequenz mit einer Länge von 33 Aminosäuren verfügt, über die Mba1 aus dem Zytosol in

das Mitochondrium importiert wird, und, dass das Mba1-Protein sich durch zwei hydrophobe Aminosäureregionen auszeichnet, mit deren Hilfe es vermutlich peripher an die innere mitochondriale Membran bindet (Rep & Grivell, 1996). Weitere Studien belegten jedoch, dass Mba1 sowohl mit Translationsprodukten als auch mit mitochondrialen Ribosomen interagiert (Preuss *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006; Gruschke *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurde eine Interaktion von Mba1 und Mdm38 nachgewiesen (Bauerschmitt *et al.*, 2010). Diese Studien geben Grund zu der Annahme, dass das Mba1-Protein noch weitere funktionale Domänen aufweist. Es ist davon auszugehen, dass solche Domänen höchstwahrscheinlich im C-terminalen Bereich von Mba1 lokalisiert sind, da der Mba1-N-Terminus auf Grund der nahe gelegenen hydrophoben Aminosäureregionen deutlich kürzer ist (Abb. 5.1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen von Deletionen und Substitutionen im C-Terminus von Mba1 auf die submitochondriale Lokalisation von Mba1 untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst alle in dieser Arbeit hergestellten Deletions- und Substitutionsmutanten mit Hilfe der Konfokalmikroskopie unter Verwendung genetisch vergrößerter Mitochondrien hinsichtlich ihrer bevorzugten Lokalisation untersucht. Für die elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse wurden jedoch nur die zwei Varianten Mba1¹⁻²⁷³ und Mba1-I272A ausgewählt, da es sich bei Mba1¹⁻²⁷³ um die Variante mit der kürzesten Deletion und bei Mba1-I272A um die Variante mit der geringfügigsten strukturellen Veränderung des Mba1-Proteins handelt.

Die Lokalisationsanalyse zahlreicher Deletionsmutanten von Mba1 führte zu der Erkenntnis, dass bereits die Deletion der letzten fünf Aminosäuren des C-Terminus von Mba1 in einer Veränderung der Mba1-Verteilung resultiert. So weist die mutierte Variante Mba1¹⁻²⁷³ unter fermentativen Wachstumsbedingungen eine deutliche Anreicherung in der Cristaemembran auf, während für Mba1 eine präferentielle Lokalisation in der inneren Grenzflächenmembran dokumentiert wurde. Interessanterweise konnte dieser Aminosäureabschnitt im Mba1-C-Terminus zusätzlich durch die Lokalisationsanalyse einer Vielzahl von Mba1-Substitutionsvarianten identifiziert werden. So weisen auch die mutierten Varianten Mba1-D271A, Mba1-I272A, Mba1-Y273A und Mba1-R274A eine zu Mba1 gegensätzliche Lokalisation auf, wie es zuvor für die Variante Mba1¹⁻²⁷³ gezeigt wurde.

Diesen Daten zufolge ist der identifizierte C-terminale Bereich, im Speziellen die mit Hilfe der Substitutionsmutationen entdeckte Aminosäuresequenz „Asp-Ile-Tyr-Arg“, essentiell für die korrekte submitochondriale Lokalisation von Mba1 in *S. cerevisiae* (Abb. 5.1). Es ist anzunehmen, dass es sich bei dem entdeckten C-terminalen Aminosäureabschnitt um eine funktionale Domäne des Mba1-Proteins handelt. In der Literatur wurden für das Mba1-Protein von *S. cerevisiae* zahlreiche funktionale Homologe in verschiedenen Spezies beschrieben, die von weiteren Pilzen über Pflanzen bis hin zu Säugern, wie beispielsweise humanes Mrpl45, reichen (Smits *et al.*, 2007). Um zu untersuchen, ob der in dieser Arbeit identifizierte C-terminale Bereich von Mba1 und vor allem die Sequenz „Asp-Ile-Tyr-Arg“ in verschiedenen Spezies konserviert ist, wurde ein Aminosäuresequenzvergleich unter Zuhilfenahme des webbasierten Programms „ClustalW“ des *SIB ExPASy Bioinformatics Resources Portal* erstellt. Während der Aminosäuresequenzvergleich des C-terminalen Bereichs von

Mba1 aus *S. cerevisiae* mit humanem Mrpl45 keine Übereinstimmung bezüglich der in dieser Arbeit identifizierten Sequenz „Asp-Ile-Tyr-Arg“ ergab (Daten nicht gezeigt), waren beim Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Pilzarten weitreichende Übereinstimmungen bezüglich der Sequenz „Asp-Ile-Tyr-Arg“ zu verzeichnen (Abb. 5.1). Dieser Erkenntnis zufolge könnte es sich bei der identifizierten Aminosäuresequenz „Asp-Ile-Tyr-Arg“ im C-Terminus von Mba1 zumindest um eine in näher verwandten Pilzen konservierte funktionale Domäne des Mba1-Proteins handeln.

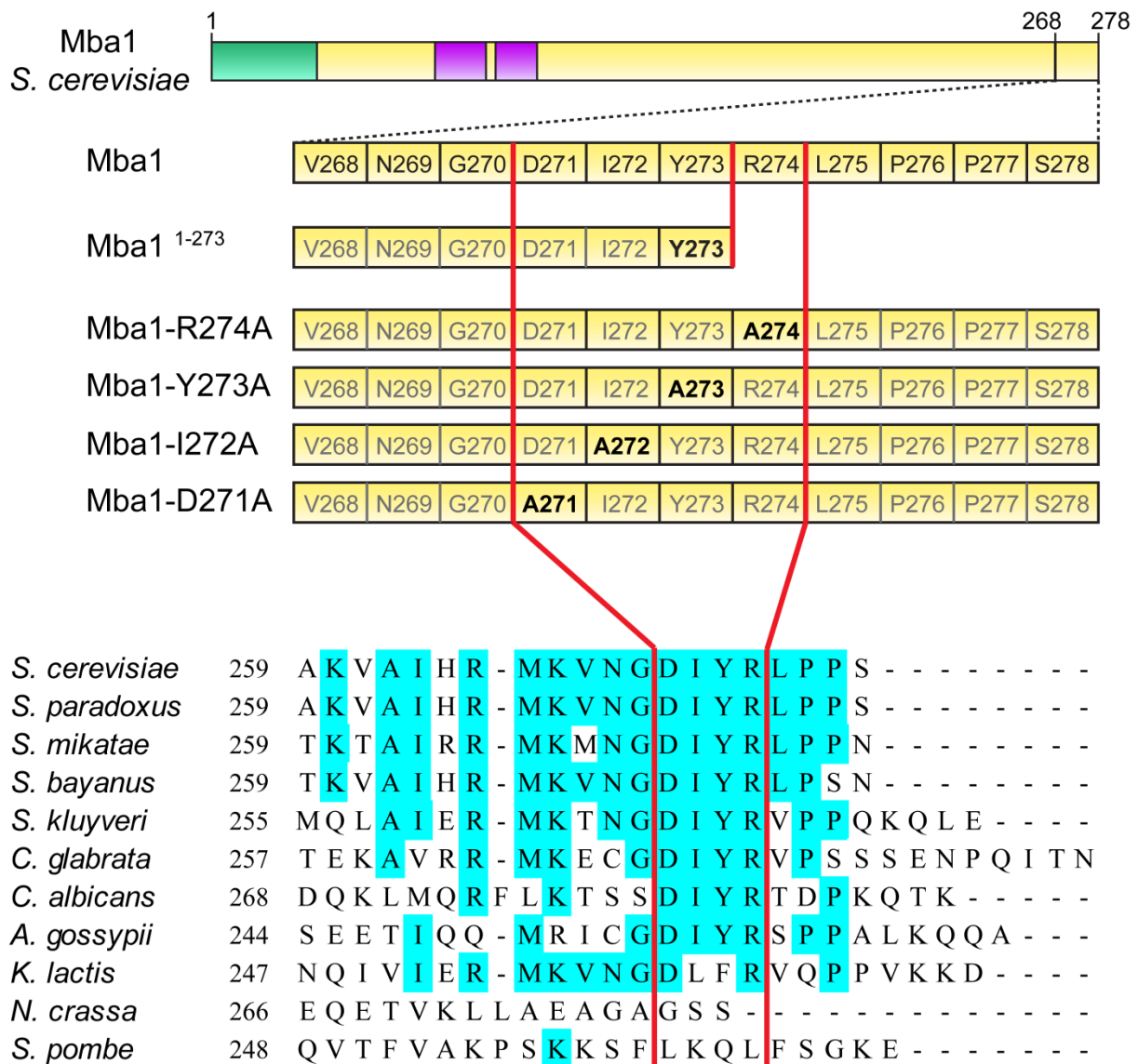


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der lokalisationsveränderten Mba1-Varianten im Kontext eines Aminosäuresequenzvergleichs des C-terminalen Bereichs von Mba1-Proteinen verschiedener Spezies.

Im oberen Teil der Abbildung sind die verschiedenen Mba1-Varianten dargestellt, für welche im Rahmen dieser Arbeit eine zu Mba1 gegensätzliche Lokalisation festgestellt wurde. Die Position der letzten Aminosäure der Deletionsmutation und die Positionen der jeweiligen Aminosäuren, die mit Alanin substituiert wurden, sind fett hervorgehoben. Der grüne Bereich markiert die aminoterminalen Präsequenz und die violetten Bereiche die zwei hydrophoben Aminosäureregionen. Im unteren Teil der Abbildung ist ein Aminosäuresequenzvergleich des C-terminalen Bereichs von Mba1-Proteinen aus *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. kluyveri*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *A. gossypii*, *K. lactis*, *N. crassa* und *S. pombe* dargestellt. Weitreichend übereinstimmende Aminosäuren wurden blau hinterlegt. Dieser Sequenzvergleich wurde mit dem webbasierten Programm „ClustalW“ des SIB ExpASY Bioinformatics Resources Portal erstellt (Tab. 3.13).

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit festgestellt, dass die Deletionsmutante Mba1¹⁻²⁷³ und die Substitutionsmutante Mba1-I272A einen temperatursensitiven Lokalisationsphänotyp aufweisen. So wurde für Mba1 auch bei einer niedrigeren Wachstumstemperatur eine präferentielle Lokalisation in der inneren Grenzflächenmembran beobachtet, während im Fall der mutierten Varianten Mba1¹⁻²⁷³ und Mba1-I272A eine deutliche Lokalisationsverschiebung zu verzeichnen ist. So liegen Mba1¹⁻²⁷³ und Mba1-I272A bei einer niedrigeren Temperatur nicht mehr präferentiell in der Cristaemembran vor, sondern weisen eine Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran auf, welche der submitochondrialen Lokalisation von Mba1 entspricht.

Des Weiteren wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie Strukturen innerhalb der Mitochondrien beobachtet, bei denen es sich womöglich um Proteinaggregationen handelt, die durch die Expression von *mba1*¹⁻²⁷³ und *mba1-I272A* verursacht werden. Die statistische Auswertung der Häufigkeit der Mitochondrien mit Proteinaggregationsstrukturen ergab, dass der prozentuale Anteil an Mitochondrien mit Aggregaten bei der Expression von *mba1*¹⁻²⁷³ merklich höher ist, als der bei der Expression von *mba1-I272A*. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückgeführt werden, dass sich die Deletion von fünf Aminosäuren im Mba1-C-Terminus stärker auf die Struktur des Mba1-Proteins auswirkt als die Substitution einer einzelnen Aminosäure. Dieser Effekt konnte auch beim Vergleich der GFP- und FLAG-Fusionsproteine beobachtet werden. So waren die prozentualen Anteile an Mitochondrien mit Aggregaten im Fall der GFP-Fusionsproteine merklich höher, als bei den FLAG-Fusionsproteinen. Auch hier wäre es denkbar, dass sich die Fusionierung mit GFP stärker auf die Struktur der Mba1-Varianten auswirkt als die Fusionierung mit dem FLAG-Peptid. Abschließend stellte sich bei der elektronenmikroskopischen Analyse der mutierten Varianten Mba1¹⁻²⁷³ und Mba1-I272A bei einer niedrigeren Wachstumstemperatur heraus, dass die Expression von *mba1*¹⁻²⁷³ und *mba1-I272A* deutlich weniger bzw. gar keine Proteinaggregationen mehr verursacht.

Diese Daten deuten zum einen darauf hin, dass sich die Mutationen *mba1*¹⁻²⁷³ und *mba1-I272A* nicht nur auf die Lokalisation, sondern auch auf die Funktion von Mba1 auswirken, und zum anderen, dass eine niedrigere Wachstumstemperatur zu einer Abmilderung der Folgen der Mutationen führt.

5.2.3 Der C-Terminus von Mba1 ist notwendig für die Biogenese der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde in der Literatur eine Interaktion von Mba1 mit naszierenden Polypeptidketten kernkodierter sowie mitochondrial kodierter Proteine beschrieben, weshalb dem Protein Mba1 eine Rolle bei der posttranslationalen sowie kotranslationalen Insertion mitochondrialer Membranproteine zugesprochen wurde (Preuss *et al.*, 2001). Die Abwesenheit von *MBA1* zeigt nur geringfügige Auswirkungen auf die Respirationskompetenz von Hefezellen, wenn diese mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen sowie geringe Insertionsdefekte (Preuss *et al.*, 2001). Hingegen führt beispielsweise die Deletion von *OXA1* zu einer deutlichen Reduktion der Atmungs-

kompetenz der Zellen sowie zu einer starken Beeinträchtigung der Biogenese der Atmungskettenkomplexe (Bonney *et al.*, 1994; Hell *et al.*, 1997; Hell *et al.*, 2001; Preuss *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich von Mba1 für die Funktion von Mba1 essentiell ist, da *mba1*¹⁻²⁷³ exprimierende Hefezellen eine deutlich verminderte Respirationskompetenz aufweisen, wenn diese mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen. Die Auswirkung der Deletionsmutation *mba1*¹⁻²⁷³ ist jedoch nicht so stark wie der genomischen *MBA1*-Deletion. Demzufolge weist die Deletionsmutante Mba1¹⁻²⁷³ eine verminderte Funktionsfähigkeit auf.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass der C-Terminus von Mba1 für die Biogenese der Atmungskette notwendig ist. So weisen *mba1*¹⁻²⁷³ exprimierende Zellen eine beeinträchtigte Assemblierung eines Superkomplexes der Atmungskette (2 x KomplexIII / 2 x KomplexIV) auf. Diese Beeinträchtigung kann auf Grund der aus der Literatur bekannten Rolle von Mba1 bei der Biogenese mitochondrial kodierter Proteine (Preuss *et al.*, 2001; Bauerschmitt *et al.*, 2010; Pfeffer *et al.*, 2015) möglicherweise auf Probleme bei der Insertion oder Assemblierung der entsprechenden Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe zurückgeführt werden. Eine mögliche Auswirkung auf die Translation der mitochondrial kodierten Proteine ist eher auszuschließen, da mit Hilfe der Elektronenmikroskopie neben Mitochondrien mit Wildtypmorphologie auch Mitochondrien beobachtet wurden, welche Strukturen mit einer veränderten Elektronendichte beinhalten. Bei diesen Strukturen könnte es sich um Proteinaggregationen handeln, die aus der fehlgeschlagenen Insertion oder Assemblierung mitochondrial kodierter Proteine resultiert.

5.2.4 Die Rolle des C-Terminus von Mba1 hinsichtlich der Interaktionen von Mba1 mit weiteren mitochondrialen Proteinen

In dem Bemühen die genaue Funktion des C-Terminus von Mba1 aufzuklären, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Koimmunopräzipitationen mit Mba1 und der Deletionsvariante Mba1¹⁻²⁷³ zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner des Mba1-C-Terminus durchgeführt.

In der Literatur wurde für Mba1 eine Interaktion mit mitochondrialen Ribosomen über die Proteine Mrpl4 und Mrpl22 nachgewiesen, bei denen es sich um zwei Komponenten der großen Ribosomenuntereinheit handelt (Preuss *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006; Gruschke *et al.*, 2010). Da beispielsweise auch Oxa1 in der Lage ist an mitochondriale Ribosomen zu binden und der C-terminale Bereich von Oxa1 als Ribosomenbindedomäne identifiziert wurde (Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003), wäre es vorstellbar gewesen, dass auch der C-terminale Bereich von Mba1 zur Bindung der mitochondrialen Ribosomen notwendig ist. Da Mrpl4 jedoch spezifisch sowohl mit Mba1 als auch mit der mutierten Variante Mba1¹⁻²⁷³ präzipitiert werden konnte, scheint es sich bei dem C-terminalen Bereich von Mba1 nicht um die Ribosomenbindedomäne des Mba1-Proteins zu handeln.

Des Weiteren wurde in der Literatur von einer direkten oder indirekten Bindung von Mba1 an Mdm38 berichtet (Bauerschmitt *et al.*, 2010), weshalb in der vorliegenden Arbeit überprüft wurde, ob der

C-terminale Bereich von Mba1 zur Bindung von Mdm38 benötigt wird. Es konnte jedoch auch Mdm38 sowohl mit Mba1 als auch der Variante Mba1¹⁻²⁷³ präzipitiert werden, weshalb der C-terminale Bereich von Mba1 offensichtlich nicht an der Bindung von Mdm38 beteiligt ist.

Als weitere Möglichkeit wurde die Bindung von Ylh47, einem Homolog von Mdm38 in *S. cerevisiae*, in Betracht gezogen. Da Ylh47 und Mdm38 nachweislich miteinander interagieren, erschien es wahrscheinlich, dass auch Mba1 entweder direkt oder indirekt an Ylh47 binden könnte (Bauerschmitt *et al.*, 2010). Die Vermutung einer Interaktion zwischen Mba1 und Ylh47 konnte zwar bestätigt werden, aber auch hierfür wird der C-terminale Bereich von Mba1 nicht benötigt, da Ylh47 mit Mba1 sowie der mutierten Variante Mba1¹⁻²⁷³ präzipitiert werden konnte.

Die massenspektrometrische Analyse der Koimmunpräzipitationen zeigte, dass die Chaperone Ssc1 und Hsp60 sowie die an der Proteolyse beteiligten Komponenten Pim1 und Yta12 etwas stärker mit der Deletionsmutante Mba1¹⁻²⁷³ präzipitiert werden konnten, während für das Chaperon Cox20 eine stärkere Präzipitation mit Mba1 zu verzeichnen war. Aus der Literatur ist bekannt, dass Ssc1 eine Komponente der Motor-Einheit des TIM23-Komplexes darstellt und an importierte kernkodierte Proteine bindet während diese über den TIM23-Komplex transloziert werden (Rassow *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994; Krimmer *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003). Es konnte jedoch für Ssc1 auch gezeigt werden, dass es direkt im Anschluss an die Translation an die mitochondrial kodierten Untereinheiten der F₁F₀-ATPase bindet und eine Rolle bei ihrer Assemblierung übernimmt (Herrmann *et al.*, 1994). In der mitochondrialen Matrix kooperiert Ssc1 mit dem Chaperon Hsp60, welches ebenfalls in die Bindung mitochondrial kodierter Proteine involviert sein könnte (Voos & Rottgers, 2002). Demnach deutet die verstärkte Präzipitation der Chaperone Hsp60 und Ssc1 mit Mba1¹⁻²⁷³ darauf hin, dass die Substrate des Mba1-enthaltenden Komplexes entweder nicht korrekt in die innere Membran inseriert oder nachfolgend assembliert werden konnten, weshalb sie von den Chaperonen gebunden wurden. Womöglich werden die neusynthetisierten Proteine durch diese Bindung für den Abbau markiert, da in der Literatur eine Kooperation von molekularen Chaperonen mit der Protease Pim1 beschrieben wurde. So ist Pim1 beispielsweise für die Proteolyse von falsch-gefalteten, ungefalteten, beschädigten sowie nicht-nativen Proteinen zuständig (Suzuki *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). Eine ähnliche Rolle übernimmt auch die m-AAA-Protease, die in dieser Arbeit über die Komponente Yta12 identifiziert wurde. Die m-AAA-Protease ist neben der Proteolyse falsch-gefalteter Proteine auch am Abbau unassemblierter Proteine beteiligt (Tzagoloff *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1996). Mit der Assemblierung von Proteinen kann auch Cox20 in Verbindung gebracht werden, da es nachweislich eine Rolle bei der proteolytischen Prozessierung und Assemblierung von Cox2 spielt (Hell *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass Cox20 verstärkt mit Mba1 präzipitiert wurde und die m-AAA-Protease-Komponente Yta12 eine verstärkte Präzipitation mit Mba1¹⁻²⁷³ zeigte, weist darauf hin, dass die Deletionsmutante Mba1¹⁻²⁷³ auf Grund der veränderten submitochondrialen Lokalisation die Substrate nicht an die Stelle in der inneren Membran bringt, an der sie für gewöhnlich inseriert und nachfolgend assembliert werden, weshalb sie letztendlich proteolytisch verdaut werden. Es wäre möglich, dass die

Proteinaggregationsstrukturen, die mit Hilfe der Elektronenmikroskopie beobachtet wurden, diesen proteolytischen Abbau widerspiegeln.

Da die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auf eine fehlgeschlagene Insertion oder Assemblierung der mitochondrial kodierten Proteine hindeuten, wird im Folgenden die Rolle des C-Terminus von Mba1 bei der Interaktion mit einem Insertionskomplex der inneren Membran sowie mit Cox20, einem an der proteolytischen Prozessierung und Assemblierung von Cox2 beteiligten Protein, diskutiert.

5.2.4.1 Die Rolle des C-Terminus von Mba1 bei der Interaktion mit einem Insertionskomplex der inneren Membran

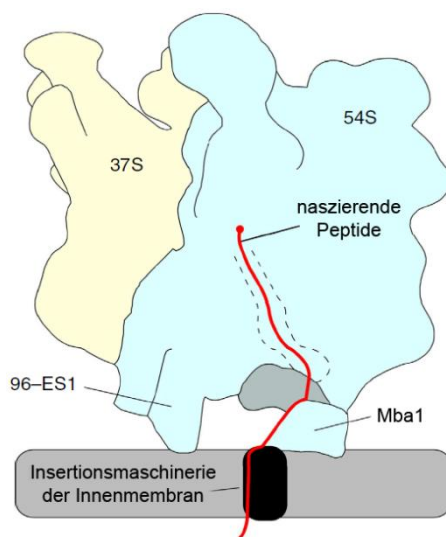


Abb. 5.2: Hypothetisches Modell für die kotranslationale Insertion von Membranproteinen in Hefemitochondrien.

Das Innenmembranprotein Mba1 richtet den Peptidkettenausgang des mitochondrialen Ribosoms (gestrichelte Linie) zur Insertionsmaschinerie der inneren Membran (schwarze Box) aus und unterstützt auf diese Weise den Transfer der stark hydrophoben naszierenden Polypeptide (rote Linie) zur Innenmembran, um so ihre schnelle und zuverlässige Insertion zu gewährleisten (modifiziert nach (Pfeffer *et al.*, 2015)).

Mba1 bindet gleichzeitig peripher an die innere Membran, an naszierende Polypeptidketten sowie an mitochondriale Ribosomen (Preuss *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2006; Gruschke *et al.*, 2010). Deshalb wird angenommen, dass Mba1 nicht in den mechanistischen Prozess der Membraninsertion involviert ist, sondern als eine Art Rezeptor für die Positionierung des Polypeptidkettenausgangs des mitochondrialen Ribosoms zur inneren Membran notwendig ist. Die korrekte Ausrichtung des Ribosoms ist wichtig für die schnelle und effiziente Weiterleitung der naszierenden Polypeptidketten an die Insertionsmaschinerie der Innenmembran. Infolge dessen übernimmt Mba1 eine zentrale Rolle bei der Koordination der Translation und der kotranslationalen Insertion von mitochondrial kodierten Proteinen (Abb. 5.2) (Ott *et al.*, 2006; Gruschke *et al.*, 2010; Pfeffer *et al.*, 2015).

Es wäre möglich, dass es sich beim C-Terminus von Mba1 um eine Bindestelle für einen integralen Insertionskomplex der inneren Membran handelt. Auf Grund des verkürzten C-Terminus der mutierten Variante Mba1¹⁻²⁷³

könnte es zu einer Beeinträchtigung der Ausrichtung des Polypeptidausgangs des mitochondrialen Ribosoms kommen, weshalb die naszierenden Polypeptidketten nicht korrekt an den Insertionskomplex weitergeleitet und möglicherweise sogar direkt in die Matrix sezerniert werden, wo sie verstärkt von Chaperonen gebunden werden bis sie schließlich durch Proteasen abgebaut werden. Diese Theorie würde zwar die verstärkte Präzipitation von Hsp60, Ssc1, Pim1 und Yta12 mit Mba1¹⁻²⁷³ sowie die mittels Elektronenmikroskopie beobachteten Aggregationsstrukturen, jedoch nicht die beobachtete Lokalisationsverschiebung erklären. Deshalb wäre es wahrscheinlicher, dass sich

die Mutation *mba1*¹⁻²⁷³ direkt auf die Bindung von Mba1 mit einem Insertionskomplex der inneren Membran auswirkt und sich die bevorzugte submitochondriale Lokalisation der Variante Mba1¹⁻²⁷³ auf Grund des Verlustes dieser Interaktion verschiebt. Demnach würde der Insertionskomplex den Ort in der mitochondrialen Membran bestimmen, an welchem die mitochondrial kodierten Proteine inseriert werden sollen. Da für Mba1 eine statische heterogene Verteilung und für Oxa1 eine dynamische heterogene Verteilung nachgewiesen wurde, ist es unwahrscheinlich, dass es sich beim mit Mba1 kooperierenden Insertionskomplex um Oxa1 handeln könnte.

5.2.4.2 Die Rolle des C-Terminus von Mba1 bei der Interaktion mit Cox20

Es wäre möglich, dass es sich beim C-Terminus von Mba1 um eine Bindestelle für Cox20 handelt, da Cox20 nur mit einer verminderten Effizienz mit der Deletionsmutante Mba1¹⁻²⁷³ präzipitiert werden konnte. Dennoch kann zu diesem Zeitpunkt keine konkrete Aussage bezüglich der Interaktion des C-Terminus von Mba1 mit Cox20 getroffen werden, da die Koimmunopräzipitation bisher nur einmal durchgeführt wurde und dieses Ergebnis in nachfolgenden Studien reproduziert werden muss.

Cox20 ist ein integrales Protein der inneren Membran und stellt ein Chaperon für neusynthetisiertes Cox2 dar (Abb. 5.3). Nachdem der N-Terminus mit Hilfe der Proteine Oxa1 und Mba1 über die innere Membran transloziert wurde, bindet Cox20 an die Vorstufe des Cox2-Proteins (pCox2). Diese Bindung ist Voraussetzung für die proteolytische Prozessierung von pCox2. Die Interaktion von Cox20 mit Cox2 bleibt so lange erhalten bis Cox2 erfolgreich assembliert wurde (Hell *et al.*, 2000; Preuss *et al.*, 2001). Interessanterweise interagiert Cox20 im Anschluss an die Prozessierung von Cox2 indirekt über Cox2 mit dem Protein Cox18, welches in den Export des C-Terminus von Cox2 involviert ist. Weiterhin scheint Cox20 eine Rolle bei der Stabilisierung von unassemblierten Cox2 gegenüber dem Abbau durch die i-AAA-Protease zu spielen (Elliott *et al.*, 2012).

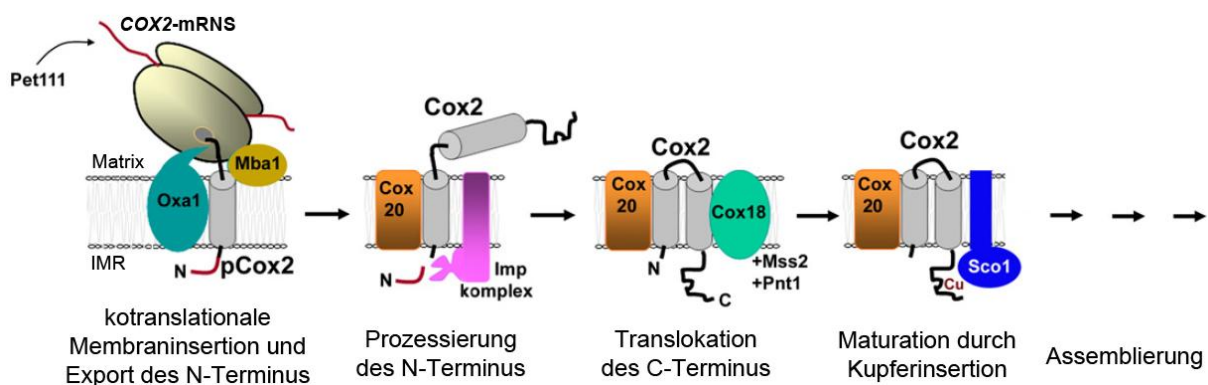


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der Biogenese von Cox2.

Dargestellt sind die verschiedenen Stufen der Biogenese von Cox2 sowie die in die Synthese, Topogenese, Maturation und Assemblierung involvierten Proteine. IMR (Intermembranraum) und mRNS (messenger-Ribonukleinsäure) (modifiziert nach (Soto *et al.*, 2012)).

Da Cox20 erst im Anschluss an die durch Oxa1 und Mba1 vermittelte Translokation des Cox2-N-Terminus bindet und nachgewiesen wurde, dass es in einer späteren Stufe der Biogenese von Cox2 als Oxa1 und Mba1 fungiert (Hell *et al.*, 2000; Preuss *et al.*, 2001), ist es fraglich, ob der C-Terminus von Mba1 wirklich mit Cox20 interagieren kann. Wird davon ausgegangen, dass eine Interaktion von Cox20 mit dem C-Terminus von Mba1 vorliegt, so könnte geschlussfolgert werden, dass die beobachtete Lokalisationsverschiebung der Deletionsmutante Mba1¹⁻²⁷³ direkt auf den Verlust der Bindung an Cox20 zurückgeführt werden kann. Möglicherweise liegt immer noch eine Interaktion zwischen Mba1¹⁻²⁷³ und einem Translokationskomplex der inneren Membran vor, so dass sich der gesamte Insertionsapparat für Cox2 auf Grund der Deletionsmutation *mba1*¹⁻²⁷³ von der inneren Grenzflächenmembran zur Cristaemembran verschieben könnte. Demzufolge würde es zu einer Insertion von Cox2 in der Cristaemembran und dadurch womöglich an der falschen Stelle in der inneren Membran kommen, weshalb Cox2 nicht assembliert und nachfolgend abgebaut wird. Diese Theorie würde dafür sprechen, dass neben kernkodierten Proteinen auch mitochondrial kodierte Proteine unter fermentativen Wachstumsbedingungen in der inneren Grenzflächenmembran inseriert und assembliert werden könnten. Die räumliche Nähe der Insertion von mitochondrial kodierten Untereinheiten zur Importstelle von kernkodierten Untereinheiten könnte von Vorteil für die Biogenese der Cytochrom *c*-Oxidase sein, da so eine schnelle und effiziente Assemblierung der Untereinheiten zu einem Komplex der Atmungskette gewährleistet werden könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte deutlich belegt werden, dass der C-terminale Bereich von Mba1, womöglich im Besonderen die Aminosäuresequenz „Asp-Ile-Tyr-Arg“, für die korrekte submitochondriale Lokalisation sowie die Funktion von Mba1 in *S. cerevisiae* notwendig ist. Auf Grund der Erkenntnisse aus den Koimmunopräzipitationsversuchen wird angenommen, dass es sich beim C-Terminus von Mba1 um eine Bindedomäne für einen bisher nicht eindeutig identifizierten Interaktionspartner von Mba1 handeln könnte und, dass diese Interaktion ausschlaggebend für die submitochondriale Lokalisation von Mba1 ist, und somit auch die Stelle in der inneren mitochondrialen Membran bestimmt, an der Mba1 seine Funktion ausübt.

5.3 Oxa1 und Mba1 im Kontext der Proteininsertion

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde in Unterstützung zur Hypothese der funktionalen Kompartimentierung der inneren mitochondrialen Membran eine heterogene Verteilung von Oxa1 in *S. cerevisiae* nachgewiesen. Oxa1 weist stets eine Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran oder der Cristaemembran auf, die sich in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle und somit auch in Abhängigkeit von der mitochondrialen Aktivität verändert. Außerdem wurde vorgeschlagen, dass die posttranslationale Insertion kernkodierter Proteine vorwiegend in der inneren Grenzflächenmembran durch Oxa1 vermittelt wird, während die

kotranslationale Insertion mitochondrial kodierter Proteine durch Oxa1 überwiegend in der Cristae-membran stattfindet (Stoldt *et al.*, 2012). Stellt man die aus der Literatur bekannten Daten bezüglich der Rolle von Mba1 bei der Biogenese der mitochondrial kodierten Untereinheiten Cox1, Cox2 und Cox3 (Preuss *et al.*, 2001) mit der in dieser Arbeit dokumentierten statischen Verteilung von Mba1 in Zusammenhang, wäre es denkbar, dass die Insertion dieser Proteine durch einen mit Mba1 kooperierenden Translokationskomplex vorwiegend in der inneren Grenzflächenmembran stattfinden könnte. Diese Erkenntnisse unterstützen die Annahme, dass Oxa1 und Mba1 in voneinander unabhängigen und parallelen Insertionswegen agieren. Es wäre deshalb vorstellbar, dass trotz einer gewissen Überlappung der Substratspezifität der Oxa1-enthaltende und der Mba1-enthaltende Insertionskomplex für die Insertion unterschiedlicher Substrate verantwortlich sein könnten. Außerdem wäre es möglich, dass dieselben Substrate in Abhängigkeit der Translokase an unterschiedlichen Stellen in der mitochondrialen Innenmembran inseriert und im Anschluss assembliert werden.

5.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Untersuchung der submitochondrialen Lokalisation von Komponenten der Proteininsertionsmaschinerie zur Aufklärung von Insertions- oder Assemblierungsstellen in der inneren Membran beitragen kann. Ein naheliegender nächster Schritt wäre die Untersuchung der Verteilung von Mdm38 auf Grund der nachgewiesenen Interaktion von Mdm38 mit Mba1 (Bauerschmitt *et al.*, 2010). Es ist anzunehmen, dass auch Mdm38 ein statisches Lokalisationsverhalten aufweist, wie es in dieser Arbeit für Mba1 dokumentiert wurde. Die Erkenntnisse dieser Arbeit bezüglich der dynamischen heterogenen Verteilung von Pnt1 legen auf Grund der bekannten Interaktion von Pnt1 mit Cox18 sowie Mss2 nahe (Saracco & Fox, 2002), dass auch die submitochondriale Lokalisation von Cox18 und Mss2 dynamisch reguliert sein könnte. Da sowohl für Pnt1 als auch für Oxa1 eine heterogene und dynamische Verteilung in der inneren Membran beobachtet werden konnte, ist es vorstellbar, dass Oxa1 mit den Proteinen Pnt1, Cox18 und Mss2 bei der Insertion weiterer mitochondrialer Membranproteine neben Cox2 kooperiert.

6 Abkürzungsverzeichnis

6.1 Abkürzungen

Die in dieser Arbeit verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen für Aminosäuren entsprechen den Vorgaben der *IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) und des *Nomenclature Committee of IUBMB* (NC-IUBMB) (Liébecq, 1997).

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AgNO ₃	Silbernitrat
AM	Außenmembran
<i>AmpR</i>	Ampicillin-Resistenzkassette
AOTF	akusto-optisch einstellbarer Filter (<i>Acousto-optic tunable filter</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
-Arg	minus Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	verhältnismäßige Einheiten (<i>Arbitrary Units</i>)
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)-methan
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BN-PAGE	Blau-Native-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c-	zenti-
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
C ₂ H ₄ INO	Iodacetamid
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CJ	<i>Crista Junction</i>
CM	Cristaemembran
CS	Kontaktstelle (<i>Contact site</i>)

C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DD	doppeldichroitisch (<i>Double dichroic</i>)
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	verbesserte Chemilumineszenz (<i>Enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung
g	Gramm
G418	Geneticin
gDNS	genomische Desoxyribonukleinsäure
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
ICR	Intracristeraum
IGM	innere Grenzflächenmembran
IM	Innenmembran
IMR	Intermembranraum
k-	kilo-
<i>kanMX4</i>	Resistenzkassette gegen Geneticin (G418)
<i>KanR</i>	Kanamycin-Resistenzkassette
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (<i>Liquid chromatography tandem-mass spectrometry</i>)
loxP	<i>Locus of crossing-over of P1 phage</i>
-Lys	minus Lysin
m	Meter
m-	milli-
M	molar (mol/l)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
n-	nano-
NA	numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Nanoflow-RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>Nanoflow-reversed phase-high performance liquid chromatography</i>)
NaOH	Natriumhydroxid
<i>natMX</i>	Resistenzkassette gegen Nourseothricin
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen (<i>Open reading frame</i>)
p-	pico-
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration

PM-Medium	Pepton-Minimalmedium (<i>Peptone Minimal Medium</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	Photomultiplier (<i>Photomultiplier tube</i>)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RA	Rückwärtsanalyse
RBD	ribosomale Bindedomäne (<i>Ribosomal binding domain</i>)
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive oxygen species</i>)
RSP	Kurzpass-Spiegelung (<i>Reflection short pass</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Sediment
SC-Medium	synthetisches Vollmedium (<i>Synthetic Complete Medium</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sek	Sekunde(n)
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TCA	Trichloressigsäure (<i>Trichloroacetic acid</i>)
TD	dreifach dichroitisch (<i>Triple dichroic</i>)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü	Überstand
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
-Ura	minus Uracil
V	Volt

VA	Vorwärtsanalyse
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
v/v	Volumen pro Volumen (l/l)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (g/l)
YKODC	<i>Yeast Knock-out Deletion Collection</i>
YNB	Hefe-Stickstoff-Basis (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
YP-Medium	Hefeextrakt-Pepton-Medium (<i>Yeast Peptone Medium</i>)
z. B.	zum Beispiel
μ	mikro-
%	Prozent

6.2 Abkürzungen verschiedener Spezies

<i>A. gossypii</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>S. bayanus</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. kluyveri</i>	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>S. mikatae</i>	<i>Saccharomyces mikatae</i>
<i>S. paradoxus</i>	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

6.3 Abkürzungen von Gen- und Proteinbenennungen

AFG	<i>ATPase Family Gene</i>
ARG	<i>ARGinine requiring</i>
ATP	<i>ATP synthase</i>
COR	<i>CORe protein of QH2 cytochrome c reductase</i>
COX	<i>Cytochrome c OXidase</i>
Cyc1	<i>Cytochrome c, isoform 1</i>
Cyt1	<i>Cytochrome c1</i>
Cytb	<i>Cytochrome b</i>
DLD	<i>D-Laktat-Dehydrogenase (D-Lactate-Dehydrogenase)</i>
DNM	<i>DyNaMin-related</i>
DSS	<i>Deletion of SUV3 Supressor</i>
ERMES	<i>ER-mitochondria encounter structure</i>
ERV	<i>Essential for Respiration and Viability</i>
FIS	<i>mitochondrial FISsion</i>
FZO	<i>FuZzy Onions homolog</i>
GEM	<i>GTPase EF-hand protein of Mitochondria</i>
GFP	<i>grün fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein)</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
LYS	<i>LYSine requiring</i>
MBA	<i>Multi-copy Bypass of AFG3</i>
MDL	<i>MultiDrug resistance-Like</i>
MDM	<i>Mitochondrial Distribution and Morphology</i>
MGE	<i>Mitochondrial GrpE</i>
MGM	<i>Mitochondrial Genome Maintenance</i>
MGR	<i>Mitochondrial Genome Required</i>
MIA	<i>Mitochondrial intermembrane space Import and Assembly</i>
MICOS	<i>mitochondrial contact site and cristae organizing system</i>

MIM	<i>Mitochondrial IMport complex</i>
MMM	<i>Maintenance of Mitochondrial Morphology</i>
MPP	mitochondriale Prozessierungspeptidase (<i>Mitochondrial Processing Peptidase</i>)
mRFP	monomeres rot fluoreszierendes Protein (<i>Monomeric Red Fluorescent Protein</i>)
MRPL	<i>Mitochondrial Ribosomal Protein, Large subunit</i>
MSS	<i>Mitochondrial Splicing System</i>
NUP	<i>NUclear Pore</i>
OPA	<i>OPtic Atrophy</i>
OXA	<i>OXidase Assembly</i>
PAM	<i>Presequence translocase-Associated Motor</i>
PIM	<i>Proteolysis In Mitochondria</i>
PNT	<i>PeNTamidine resistance</i>
QCR	<i>biQuinol-cytochrome C oxidoReductase</i>
RIP	<i>Rieske Iron-sulfur Protein</i>
SAM	<i>Sorting and Assembly Machinery</i>
SDH	<i>Succinate DeHydrogenase</i>
SSC	<i>Stress-Seventy subfamily C</i>
Su9	Untereinheit 9 der F ₁ F ₀ -ATPase von <i>Neurospora crassa</i>
TIM	<i>Translocase of the Inner Membrane</i>
TOM	<i>Translocase of the Outer Membrane</i>
URA	<i>URAcil requiring</i>
YLH	<i>Yeast LETM1 Homolog</i>
YTA	<i>Yeast Tat-binding Analog</i>

7 Literaturverzeichnis

- Abbe E. 1873.** Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. f. Mikroskop. Anat.* **9**(1873): 413-420.
- Acehan D, Malhotra A, Xu Y, Ren M, Stokes DL, Schlame M. 2011.** Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophys J* **100**(9): 2184-2192.
- Adam A, Endres M, Sirrenberg C, Lottspeich F, Neupert W, Brunner M. 1999.** Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *EMBO J* **18**(2): 313-319.
- Ahting U, Thieffry M, Engelhardt H, Hegerl R, Neupert W, Nussberger S. 2001.** Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol* **153**(6): 1151-1160.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002.** Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science. The Mitochondrion.
- Alconada A, Kübrich M, Moczko M, Hönlinger A, Pfanner N. 1995.** The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol Cell Biol* **15**(11): 6196-6205.
- Alkhaja AK, Jans DC, Nikolov M, Vukotic M, Lytovchenko O, Ludewig F, Schliebs W, Riedel D, Urlaub H, Jakobs S, Deckers M. 2012.** MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Mol Biol Cell* **23**(2): 247-257.
- Altamura N, Capitanio N, Bonnefoy N, Papa S, Dujardin G. 1996.** The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett* **382**(1-2): 111-115.
- Altmann K, Westermann B. 2005.** Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**(11): 5410-5417.
- Arber W. 1978.** Restriction endonucleases. *Angew Chem Int Ed Engl* **17**(2): 73-79.
- Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P. 1990.** Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem* **265**(31): 18797-18802.
- Arlt H, Tauer R, Feldmann H, Neupert W, Langer T. 1996.** The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell* **85**(6): 875-885.
- Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schägger H. 1998.** Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* **17**(24): 7170-7178.
- Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brethes D, Velours J. 2004.** The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem* **279**(39): 40392-40399.
- Artom C, Swanson MA. 1951.** Incorporation of labeled phosphate into the lipides of liver slices. *J Biol Chem* **193**(2): 473-480.
- Baile MG, Claypool SM. 2013.** The power of yeast to model diseases of the powerhouse of the cell. *Front Biosci (Landmark Ed)* **18**: 241-278.
- Barrientos A, Zambrano A, Tzagoloff A. 2004.** Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **23**(17): 3472-3482.
- Bauer M, Behrens M, Esser K, Michaelis G, Pratje E. 1994.** PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol Gen Genet* **245**(3): 272-278.

- Bauer MF, Sirrenberg C, Neupert W, Brunner M. 1996.** Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* **87**(1): 33-41.
- Bauerschmitt H, Mick DU, Deckers M, Vollmer C, Funes S, Kehrein K, Ott M, Rehling P, Herrmann JM. 2010.** Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation. *Mol Biol Cell* **21**(12): 1937-1944.
- Bazán S, Mileykovskaya E, Mallampalli VK, Heacock P, Sparagna GC, Dowhan W. 2013.** Cardiolipin-dependent reconstitution of respiratory supercomplexes from purified *Saccharomyces cerevisiae* complexes III and IV. *J Biol Chem* **288**(1): 401-411.
- Becker DM, Guarente L. 1991.** High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol* **194**: 182-187.
- Becker T, Pfannschmidt S, Guiard B, Stojanovski D, Milenkovic D, Kutik S, Pfanner N, Meisinger C, Wiedemann N. 2008b.** Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *J Biol Chem* **283**(1): 120-127.
- Becker T, Vögtle FN, Stojanovski D, Meisinger C. 2008a.** Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1777**(7-8): 557-563.
- Becker T, Wenz LS, Krüger V, Lehmann W, Müller JM, Goroncy L, Zufall N, Lithgow T, Guiard B, Chacinska A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N. 2011.** The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispinning outer membrane proteins. *J Cell Biol* **194**(3): 387-395.
- Benard G, Rossignol R. 2008.** Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* **10**(8): 1313-1342.
- Benz R. 1994.** Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* **1197**(2): 167-196.
- Benz R, Schmid A, Dihanich M. 1989.** Pores from mitochondrial outer membranes of yeast and a porin-deficient yeast mutant: a comparison. *J Bioenerg Biomembr* **21**(4): 439-450.
- Berger KH, Sogo LF, Yaffe MP. 1997.** Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol* **136**(3): 545-553.
- Birnboim HC, Doly J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.
- Birt LM, Bartley W. 1960.** The pyridine nucleotide metabolism of mitochondria incubated with and without added substrates and metabolic inhibitors. *Biochem J* **76**(3): 427-438.
- Bohnert M, Rehling P, Guiard B, Herrmann JM, Pfanner N, van der Laan M. 2010.** Cooperation of stop-transfer and conservative sorting mechanisms in mitochondrial protein transport. *Curr Biol* **20**(13): 1227-1232.
- Boldogh I, Vojtov N, Karmon S, Pon LA. 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**(6): 1371-1381.
- Boldogh IR, Nowakowski DW, Yang HC, Chung H, Karmon S, Royes P, Pon LA. 2003.** A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell* **14**(11): 4618-4627.
- Boldogh IR, Pon LA. 2006.** Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* **1763**(5-6): 450-462.
- Boldogh IR, Yang HC, Nowakowski WD, Karmon SL, Hays LG, Yates JR, 3rd, Pon LA. 2001.** Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3162-3167.
- Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C, Pfanner N. 2008.** Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* **9**(1): 42-49.

- Bonnefoy N, Chalvet F, Hamel P, Slonimski PP, Dujardin G. 1994.** OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J Mol Biol* **239**(2): 201-212.
- Bonnefoy N, Fiumera HL, Dujardin G, Fox TD. 2009.** Roles of Oxal-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochim Biophys Acta* **1793**(1): 60-70.
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. 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**(2): 115-132.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brdiczka DG, Zorov DB, Sheu SS. 2006.** Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1762**(2): 148-163.
- Brix J, Rüdiger S, Bukau B, Schneider-Mergener J, Pfanner N. 1999.** Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. *J Biol Chem* **274**(23): 16522-16530.
- Broadley SA, Demlow CM, Fox TD. 2001.** Peripheral mitochondrial inner membrane protein, Mss2p, required for export of the mitochondrially coded Cox2p C tail in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**(22): 7663-7672.
- Bücheler K, Adams V, Brdiczka D. 1991.** Localization of the ATP/ADP translocator in the inner membrane and regulation of contact sites between mitochondrial envelope membranes by ADP. A study on freeze-fractured isolated liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1056**(3): 233-242.
- Burgess SM, Delannoy M, Jensen RE. 1994.** MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol* **126**(6): 1375-1391.
- Burnette WN. 1981.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**(2): 195-203.
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. 2002.** A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 7877-7882.
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. 2009.** Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**(4): 628-644.
- Chacinska A, Lind M, Frazier AE, Dudek J, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Truscott KN, Guiard B, Pfanner N, Rehling P. 2005.** Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell* **120**(6): 817-829.
- Chacinska A, Rehling P, Guiard B, Frazier AE, Schulze-Specking A, Pfanner N, Voos W, Meisinger C. 2003.** Mitochondrial translocation contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex. *EMBO J* **22**(20): 5370-5381.
- Chan NC, Lithgow T. 2008.** The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis. *Mol Biol Cell* **19**(1): 126-136.
- Chatzi A, Tokatlidis K. 2013.** The mitochondrial intermembrane space: a hub for oxidative folding linked to protein biogenesis. *Antioxid Redox Signal* **19**(1): 54-62.

- Cheng MY, Hartl FU, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Neupert W, Hallberg EM, Hallberg RL, Horwich AL. 1989.** Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* **337**(6208): 620-625.
- Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL, Jacq C. 1995.** Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem* **228**(3): 762-771.
- Colombini M. 2012.** VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1818**(6): 1457-1465.
- Colombini M, Mannella CA. 2012.** VDAC, the early days. *Biochim Biophys Acta* **1818**(6): 1438-1443.
- Cox J, Mann M. 2008.** MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**(12): 1367-1372.
- Craddock VM, Simpson MV. 1961.** Amino acid-activating enzymes in rat-liver mitochondria. *Biochem J* **80**: 348-352.
- Craig EA, Kramer J, Shilling J, Werner-Washburne M, Holmes S, Kosic-Smithers J, Nicolet CM. 1989.** SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol Cell Biol* **9**(7): 3000-3008.
- Cunningham BC, Wells JA. 1989.** High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **244**(4908): 1081-1085.
- Curran SP, Leuenberger D, Oppliger W, Koehler CM. 2002.** The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J* **21**(5): 942-953.
- D'Silva PD, Schilke B, Walter W, Andrew A, Craig EA. 2003.** J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13839-13844.
- Dalbey RE, Kuhn A, von Heijne G. 1995.** Directionality in protein translocation across membranes: the N-tail phenomenon. *Trends Cell Biol* **5**(10): 380-383.
- Davies KM, Anselmi C, Wittig I, Faraldo-Gomez JD, Kühlbrandt W. 2012.** Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(34): 13602-13607.
- Davies KM, Strauss M, Daum B, Kief JH, Osiewacz HD, Rycovska A, Zickermann V, Kühlbrandt W. 2011.** Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(34): 14121-14126.
- de Godoy LM, Olsen JV, de Souza GA, Li G, Mortensen P, Mann M. 2006.** Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system. *Genome Biol* **7**(6): R50.
- De Los Rios P, Ben-Zvi A, Slutsky O, Azem A, Goloubinoff P. 2006.** Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(16): 6166-6171.
- Deloche O, Georgopoulos C. 1996.** Purification and biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae*'s Mge1p, the mitochondrial cochaperone of Ssc1p. *J Biol Chem* **271**(39): 23960-23966.
- Diaz F, Kotarsky H, Fellman V, Moraes CT. 2011.** Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med* **16**(4): 197-204.
- Diekert K, de Kroon AI, Kispal G, Lill R. 2001.** Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* **65**: 37-51.

- Diekert K, Kispal G, Guiard B, Lill R. 1999.** An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21): 11752-11757.
- Dietmeier K, Hönlinger A, Bömer U, Dekker PJ, Eckerskorn C, Lottspeich F, Kübrich M, Pfanner N. 1997.** Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* **388**(6638): 195-200.
- Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, Messerschmitt M, Weinbach N, Neupert W, Westermann B. 2002.** Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13**(3): 847-853.
- Dimmer KS, Jakobs S, Vogel F, Altmann K, Westermann B. 2005.** Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J Cell Biol* **168**(1): 103-115.
- Dimmer KS, Papić D, Schumann B, Sperl D, Krumpe K, Walther DM, Rapaport D. 2012.** A crucial role for Mim2 in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *J Cell Sci* **125**(Pt 14): 3464-3473.
- Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T. 2006.** Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**(5785): 314-318.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. 1988.** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**(13): 6127-6145.
- Dudek J, Rehling P, van der Laan M. 2013.** Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta* **1833**(2): 274-285.
- Dukanovic J, Dimmer KS, Bonnefoy N, Krumpe K, Rapaport D. 2009.** Genetic and functional interactions between the mitochondrial outer membrane proteins Tom6 and Sam37. *Mol Cell Biol* **29**(22): 5975-5988.
- Dumont ME, Cardillo TS, Hayes MK, Sherman F. 1991.** Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**(11): 5487-5496.
- Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. 2004.** Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**(5668): 253-257.
- Egner A, Jakobs S, Hell SW. 2002.** Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3370-3375.
- Elliott LE, Saracco SA, Fox TD. 2012.** Multiple roles of the Cox20 chaperone in assembly of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase. *Genetics* **190**(2): 559-567.
- Endele S, Fuhry M, Pak SJ, Zabel BU, Winterpacht A. 1999.** LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics* **60**(2): 218-225.
- Endres M, Neupert W, Brunner M. 1999.** Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J* **18**(12): 3214-3221.
- Fischer M, Riemer J. 2013.** The mitochondrial disulfide relay system: roles in oxidative protein folding and beyond. *Int J Cell Biol* **2013**: 742923.
- Fiumera HL, Broadley SA, Fox TD. 2007.** Translocation of mitochondrially synthesized Cox2 domains from the matrix to the intermembrane space. *Mol Cell Biol* **27**(13): 4664-4673.
- Fölsch H, Gaume B, Brunner M, Neupert W, Stuart RA. 1998.** C- to N-terminal translocation of preproteins into mitochondria. *EMBO J* **17**(22): 6508-6515.
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. 1998.** The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **440**(3): 325-331.
- Fox TD. 2012.** Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics* **192**(4): 1203-1234.

- Frazier AE, Dudek J, Guiard B, Voos W, Li Y, Lind M, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Bilanchone V, Cumsy MG, Truscott KN, Pfanner N, Rehling P. 2004.** Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol* **11**(3): 226-233.
- Frazier AE, Taylor RD, Mick DU, Warscheid B, Stoepel N, Meyer HE, Ryan MT, Guiard B, Rehling P. 2006.** Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol* **172**(4): 553-564.
- Frey TG, Mannella CA. 2000.** The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**(7): 319-324.
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. 2006.** OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**(1): 177-189.
- Froschauer E, Nowikovsky K, Schweyen RJ. 2005.** Electroneutral K⁺/H⁺ exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yol027/Letm1 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1711**(1): 41-48.
- Fu Y, Xiao W. 2003.** Functional domains required for the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease complex formation and nuclear localization. *DNA Repair (Amst)* **2**(12): 1435-1447.
- Funes S, Kauff F, van der Sluis EO, Ott M, Herrmann JM. 2011.** Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *Biol Chem* **392**(1-2): 13-19.
- Funes S, Nargang FE, Neupert W, Herrmann JM. 2004.** The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol Biol Cell* **15**(4): 1853-1861.
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G. 2002.** Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1592**(1): 63-77.
- Gebert M, Schrempp SG, Mehnert CS, Heisswolf AK, Oeljeklaus S, Ieva R, Bohnert M, von der Malsburg K, Wiese S, Kleinschroth T, Hunte C, Meyer HE, Haferkamp I, Guiard B, Warscheid B, Pfanner N, van der Laan M. 2012.** Mgr2 promotes coupling of the mitochondrial presequence translocase to partner complexes. *J Cell Biol* **197**(5): 595-604.
- Gebert N, Gebert M, Oeljeklaus S, von der Malsburg K, Stroud DA, Kulawiak B, Wirth C, Zahedi RP, Dolezal P, Wiese S, Simon O, Schulze-Specking A, Truscott KN, Sickmann A, Rehling P, Guiard B, Hunte C, Warscheid B, van der Laan M, Pfanner N, Wiedemann N. 2011.** Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell* **44**(5): 811-818.
- Geissler A, Chacinska A, Truscott KN, Wiedemann N, Brandner K, Sickmann A, Meyer HE, Meisinger C, Pfanner N, Rehling P. 2002.** The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell* **111**(4): 507-518.
- Gentle I, Gabriel K, Beech P, Waller R, Lithgow T. 2004.** The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* **164**(1): 19-24.
- Gevorkyan-Airapetov L, Zohary K, Popov-Celeketic D, Mapa K, Hell K, Neupert W, Azem A, Mokranjac D. 2009.** Interaction of Tim23 with Tim50 Is essential for protein translocation by the mitochondrial TIM23 complex. *J Biol Chem* **284**(8): 4865-4872.

- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Guldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kotter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**(6896): 387-391.
- Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. 2003. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* **546**(2-3): 355-358.
- Glaser SM, Miller BR, Cumsy MG. 1990. Removal of a hydrophobic domain within the mature portion of a mitochondrial inner membrane protein causes its mislocalization to the matrix. *Mol Cell Biol* **10**(5): 1873-1881.
- Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Müller S, Hallberg RL, Schatz G. 1992. Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* **69**(5): 809-822.
- Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB, Labarre J. 1998. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**(35): 22480-22489.
- Gonzales DH, Neupert W. 1990. Biogenesis of mitochondrial c-type cytochromes. *J Bioenerg Biomembr* **22**(6): 753-768.
- Graack HR, Grohmann L, Kitakawa M, Goldschmidt-Reisin S. 1995. Gene MRP-L4, encoding mitochondrial ribosomal protein YmL4, is indispensable for proper non-respiratory cell functions in yeast. *Gene* **152**(1): 107-112.
- Graack HR, Wittmann-Liebold B. 1998. Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *Biochem J* **329** (Pt 3): 433-448.
- Gray MW. 2012. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(9): a011403.
- Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**(5684): 626-629.
- Gruschke S, Gröne K, Heublein M, Hölz S, Israel L, Imhof A, Herrmann JM, Ott M. 2010. Proteins at the polypeptide tunnel exit of the yeast mitochondrial ribosome. *J Biol Chem* **285**(25): 19022-19028.
- Hackenbrock CR. 1968. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**(2): 598-605.
- Hanekamp T, Thorsness MK, Rebbapragada I, Fisher EM, Seebart C, Darland MR, Coxbill JA, Updike DL, Thorsness PE. 2002. Maintenance of mitochondrial morphology is linked to maintenance of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**(3): 1147-1156.
- Harner M, Körner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, Griffith J, Mann M, Reggiori F, Neupert W. 2011. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J* **30**(21): 4356-4370.
- Hartl FU, Neupert W. 1990. Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* **247**(4945): 930-938.
- Hartl FU, Ostermann J, Guiard B, Neupert W. 1987. Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell* **51**(6): 1027-1037.
-

- Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W. 1989.** Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* **988**(1): 1-45.
- Hatefi Y. 1985.** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* **54**: 1015-1069.
- He S, Fox TD. 1997.** Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol Biol Cell* **8**(8): 1449-1460.
- He S, Fox TD. 1999.** Mutations affecting a yeast mitochondrial inner membrane protein, pnt1p, block export of a mitochondrially synthesized fusion protein from the matrix. *Mol Cell Biol* **19**(10): 6598-6607.
- Hegemann JH, Guldener U, Kohler GJ. 2006.** Gene disruption in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* **313**: 129-144.
- Hell K, Herrmann J, Pratje E, Neupert W, Stuart RA. 1997.** Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett* **418**(3): 367-370.
- Hell K, Herrmann JM, Pratje E, Neupert W, Stuart RA. 1998.** Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2250-2255.
- Hell K, Neupert W, Stuart RA. 2001.** Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J* **20**(6): 1281-1288.
- Hell K, Tzagoloff A, Neupert W, Stuart RA. 2000.** Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J Biol Chem* **275**(7): 4571-4578.
- Hennon SW, Soman R, Zhu L, Dalbey RE. 2015.** YidC/Alb3/Oxa1 Family of Insertases. *J Biol Chem* **290**(24): 14866-14874.
- Hermann GJ, Shaw JM. 1998.** Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 265-303.
- Herrmann JM, Hell K. 2005.** Chopped, trapped or tacked - protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **30**(4): 205-211.
- Herrmann JM, Neupert W. 2003.** Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* **55**(4-5): 219-225.
- Herrmann JM, Neupert W, Stuart RA. 1997.** Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J* **16**(9): 2217-2226.
- Herrmann JM, Riemer J. 2010.** The intermembrane space of mitochondria. *Antioxid Redox Signal* **13**(9): 1341-1358.
- Herrmann JM, Stuart RA, Craig EA, Neupert W. 1994.** Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. *J Cell Biol* **127**(4): 893-902.
- Hewitt VL, Gabriel K, Traven A. 2014.** The ins and outs of the intermembrane space: diverse mechanisms and evolutionary rewiring of mitochondrial protein import routes. *Biochim Biophys Acta* **1840**(4): 1246-1253.
- Hikkel I, Gbelska Y, van der Aart QJ, Lubecu G, Subik J. 1997.** Cloning and characterization of K1COX18, a gene required for activity of cytochrome oxidase in *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* **32**(4): 267-272.
- Hildenbeutel M, Theis M, Geier M, Haferkamp I, Neuhaus HE, Herrmann JM, Ott M. 2012.** The membrane insertase Oxa1 is required for efficient import of carrier proteins into mitochondria. *J Mol Biol* **423**(4): 590-599.

- Hill K, Model K, Ryan MT, Dietmeier K, Martin F, Wagner R, Pfanner N. 1998.** Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* **395**(6701): 516-521.
- Hines V, Schatz G. 1993.** Precursor binding to yeast mitochondria. A general role for the outer membrane protein Mas70p. *J Biol Chem* **268**(1): 449-454.
- Hobbs AE, Srinivasan M, McCaffery JM, Jensen RE. 2001.** Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol* **152**(2): 401-410.
- Hoffmann HP, Avers CJ. 1973.** Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science* **181**(4101): 749-751.
- Höhr AI, Straub SP, Warscheid B, Becker T, Wiedemann N. 2015.** Assembly of beta-barrel proteins in the mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta* **1853**(1): 74-88.
- Hönlinger A, Bömer U, Alconada A, Eckerskorn C, Lottspeich F, Dietmeier K, Pfanner N. 1996.** Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J* **15**(9): 2125-2137.
- Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Pat Cerretti D, Urdal DL, Conlon PJ. 1988.** A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nat Biotech* **6**(10): 1204-1210.
- Hoppins S, Collins SR, Cassidy-Stone A, Hummel E, Devay RM, Lackner LL, Westermann B, Schuldiner M, Weissman JS, Nunnari J. 2011.** A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol* **195**(2): 323-340.
- Horvath SE, Daum G. 2013.** Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* **52**(4): 590-614.
- Horvath SE, Rampelt H, Oeljeklaus S, Warscheid B, van der Laan M, Pfanner N. 2014.** Role of membrane contact sites in protein import into mitochondria. *Protein Sci*.
- Hovius R, Lambrechts H, Nicolay K, de Kruijff B. 1990.** Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim Biophys Acta* **1021**(2): 217-226.
- Hu J, Dong L, Outten CE. 2008.** The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem* **283**(43): 29126-29134.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. 2003.** Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**(6959): 686-691.
- Hulett JM, Lueder F, Chan NC, Perry AJ, Wolyneec P, Likic VA, Gooley PR, Lithgow T. 2008.** The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex. *J Mol Biol* **376**(3): 694-704.
- Hwang DK, Claypool SM, Leuenberger D, Tienson HL, Koehler CM. 2007.** Tim54p connects inner membrane assembly and proteolytic pathways in the mitochondrion. *J Cell Biol* **178**(7): 1161-1175.
- Ishikawa D, Yamamoto H, Tamura Y, Moritoh K, Endo T. 2004.** Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate beta-barrel protein assembly. *J Cell Biol* **166**(5): 621-627.
- Ito A. 1999.** Mitochondrial processing peptidase: multiple-site recognition of precursor proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **265**(3): 611-616.
- Jakobs S. 2006.** High resolution imaging of live mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1763**(5-6): 561-575.
- Jakobs S, Stoldt S, Neumann D. 2011.** Light microscopic analysis of mitochondrial heterogeneity in cell populations and within single cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **124**: 1-19.
-

- Jia L, Dienhart M, Schramp M, McCauley M, Hell K, Stuart RA. 2003.** Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J* **22**(24): 6438-6447.
- Jia L, Dienhart MK, Stuart RA. 2007.** Oxa1 directly interacts with Atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F1Fo-ATP synthase complex. *Mol Biol Cell* **18**(5): 1897-1908.
- Kellems RE, Allison VF, Butow RA. 1975.** Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *J Cell Biol* **65**(1): 1-14.
- Kennedy EP, Lehninger AL. 1949.** Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **179**(2): 957-972.
- Kermorgant M, Bonnefoy N, Dujardin G. 1997.** Oxa1p, which is required for cytochrome c oxidase and ATP synthase complex formation, is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Curr Genet* **31**(4): 302-307.
- Kerscher O, Holder J, Srinivasan M, Leung RS, Jensen RE. 1997.** The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* **139**(7): 1663-1675.
- Kitakawa M, Isono K. 1991.** The mitochondrial ribosomes. *Biochimie* **73**(6): 813-825.
- Koehler CM, Jarosch E, Tokatlidis K, Schmid K, Schweyen RJ, Schatz G. 1998a.** Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* **279**(5349): 369-373.
- Koehler CM, Merchant S, Oppliger W, Schmid K, Jarosch E, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Tokatlidis K. 1998b.** Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J* **17**(22): 6477-6486.
- Koehler CM, Murphy MP, Bally NA, Leuenberger D, Oppliger W, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Or E. 2000.** Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol* **20**(4): 1187-1193.
- Kohler R, Boehringer D, Greber B, Bingel-Erlenmeyer R, Collinson I, Schaffitzel C, Ban N. 2009.** YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Mol Cell* **34**(3): 344-353.
- Kondo-Okamoto N, Shaw JM, Okamoto K. 2003.** Mmm1p spans both the outer and inner mitochondrial membranes and contains distinct domains for targeting and foci formation. *J Biol Chem* **278**(49): 48997-49005.
- Koonin EV. 2010.** The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biol* **11**(5): 209.
- Kopec KO, Alva V, Lupas AN. 2010.** Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria. *Bioinformatics* **26**(16): 1927-1931.
- Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, Walter P. 2009.** An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* **325**(5939): 477-481.
- Kornmann B, Osman C, Walter P. 2011.** The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(34): 14151-14156.
- Kovermann P, Truscott KN, Guiard B, Rehling P, Sepuri NB, Müller H, Jensen RE, Wagner R, Pfanner N. 2002.** Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell* **9**(2): 363-373.
- Kozany C, Mokranjac D, Sichting M, Neupert W, Hell K. 2004.** The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase. *Nat Struct Mol Biol* **11**(3): 234-241.
-

- Kozjak V, Wiedemann N, Milenkovic D, Lohaus C, Meyer HE, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N. 2003.** An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **278**(49): 48520-48523.
- Krebs HA. 1940.** The citric acid cycle and the Szent-Gyorgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochem J* **34**(5): 775-779.
- Krimmer T, Rassow J, Kunau WH, Voos W, Pfanner N. 2000.** Mitochondrial protein import motor: the ATPase domain of matrix Hsp70 is crucial for binding to Tim44, while the peptide binding domain and the carboxy-terminal segment play a stimulatory role. *Mol Cell Biol* **20**(16): 5879-5887.
- Kroemer G. 2003.** Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **304**(3): 433-435.
- Krüger V, Deckers M, Hildenbeutel M, van der Laan M, Hellmers M, Dreker C, Preuss M, Herrmann JM, Rehling P, Wagner R, Meinecke M. 2012.** The mitochondrial oxidase assembly protein1 (Oxa1) insertase forms a membrane pore in lipid bilayers. *J Biol Chem* **287**(40): 33314-33326.
- Kucejova B, Kucej M, Petrezselyova S, Abelovska L, Tomaska L. 2005.** A screen for nigericin-resistant yeast mutants revealed genes controlling mitochondrial volume and mitochondrial cation homeostasis. *Genetics* **171**(2): 517-526.
- Kulawiak B, Hopker J, Gebert M, Guiard B, Wiedemann N, Gebert N. 2013.** The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* **1827**(5): 612-626.
- Künkele KP, Heins S, Dembowski M, Nargang FE, Benz R, Thieffry M, Walz J, Lill R, Nussberger S, Neupert W. 1998.** The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* **93**(6): 1009-1019.
- Kutik S, Guiard B, Meyer HE, Wiedemann N, Pfanner N. 2007.** Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import. *J Cell Biol* **179**(4): 585-591.
- Kutik S, Stojanovski D, Becker L, Becker T, Meinecke M, Krüger V, Prinz C, Meisinger C, Guiard B, Wagner R, Pfanner N, Wiedemann N. 2008.** Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell* **132**(6): 1011-1024.
- Kutik S, Stroud DA, Wiedemann N, Pfanner N. 2009.** Evolution of mitochondrial protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1790**(6): 409-415.
- Lackner LL. 2014.** Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biol* **12**: 35.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lee CM, Sedman J, Neupert W, Stuart RA. 1999.** The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J Biol Chem* **274**(30): 20937-20942.
- Lemaire C, Guibet-Grandmougin F, Angles D, Dujardin G, Bonnefoy N. 2004.** A yeast mitochondrial membrane methyltransferase-like protein can compensate for oxal mutations. *J Biol Chem* **279**(46): 47464-47472.
- Lenaz G, Genova ML. 2010.** Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal* **12**(8): 961-1008.
- LePecq JB, Paoletti C. 1967.** A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J Mol Biol* **27**(1): 87-106.
- Levi S, Rovida E. 2009.** The role of iron in mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* **1790**(7): 629-636.

- Li Y, Dudek J, Guiard B, Pfanner N, Rehling P, Voos W. 2004.** The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18. *J Biol Chem* **279**(36): 38047-38054.
- Liébecq C. 1997.** IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) and Nomenclature Committee of IUBMB (NC-IUBMB). *Arch Biochem Biophys* **344**(1): 242-252.
- Liesa M, Palacin M, Zorzano A. 2009.** Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* **89**(3): 799-845.
- Lill R. 2009.** Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**(7257): 831-838.
- Lill R, Stuart RA, Drygas ME, Nargang FE, Neupert W. 1992.** Import of cytochrome c heme lyase into mitochondria: a novel pathway into the intermembrane space. *EMBO J* **11**(2): 449-456.
- Liou W, Geuze HJ, Slot JW. 1996.** Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol* **106**(1): 41-58.
- Liu M, Spremulli L. 2000.** Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J Biol Chem* **275**(38): 29400-29406.
- Liu Q, D'Silva P, Walter W, Marszalek J, Craig EA. 2003.** Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science* **300**(5616): 139-141.
- Logan DC. 2006.** The mitochondrial compartment. *J Exp Bot* **57**(6): 1225-1243.
- Louderback AL, Natland MC, Shanbrom E. 1970.** Method of electrophoresis. US Patent 3497437. Baxter Laboratories Inc., United States.
- Luciano P, Géli V. 1996.** The mitochondrial processing peptidase: function and specificity. *Experientia* **52**(12): 1077-1082.
- Ludwig G, Staben C. 1994.** Characterization of the PNT1 pentamidine resistance gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **38**(12): 2850-2856.
- Luirink J, Samuelsson T, de Gier JW. 2001.** YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett* **501**(1): 1-5.
- Magherini F, Tani C, Gamberi T, Caselli A, Bianchi L, Bini L, Modesti A. 2007.** Protein expression profiles in *Saccharomyces cerevisiae* during apoptosis induced by H₂O₂. *Proteomics* **7**(9): 1434-1445.
- Maier KP, Helbig C, Hoppe-Seyler G, Fröhlich J, Schollmeyer P, Gerok W, Talke H. 1974.** Extractability and intracellular localisation of urea cycle enzymes from rat liver. *Z Klin Chem Klin Biochem* **12**(12): 524-529.
- Mannella CA. 2006.** Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* **1763**(5-6): 542-548.
- Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J. 1994.** The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech* **27**(4): 278-283.
- Margulis L. 1970.** Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven, United States.
- Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, Henze K. 2001.** An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol Chem* **382**(11): 1521-1539.
- Martin W, Müller M. 1998.** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**(6671): 37-41.
- Martinez-Caballero S, Grigoriev SM, Herrmann JM, Campo ML, Kinnally KW. 2007.** Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23. *J Biol Chem* **282**(6): 3584-3593.

- Mathieu L, Bourens M, Marsy S, Hlavacek O, Panozzo C, Dujardin G. 2010.** A mutational analysis reveals new functional interactions between domains of the Oxa1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **75**(2): 474-488.
- Matouschek A, Pfanner N, Voos W. 2000.** Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep* **1**(5): 404-410.
- Mattson DL, Bellehumeur TG. 1996.** Comparison of three chemiluminescent horseradish peroxidase substrates for immunoblotting. *Anal Biochem* **240**(2): 306-308.
- Mayer A, Nargang FE, Neupert W, Lill R. 1995a.** MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *EMBO J* **14**(17): 4204-4211.
- Mayer A, Neupert W, Lill R. 1995b.** Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* **270**(21): 12390-12397.
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. 2006.** Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* **16**(14): R551-560.
- Meeusen S, DeVay R, Block J, Cassidy-Stone A, Wayson S, McCaffery JM, Nunnari J. 2006.** Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* **127**(2): 383-395.
- Meeusen S, Nunnari J. 2003.** Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J Cell Biol* **163**(3): 503-510.
- Meier S, Neupert W, Herrmann JM. 2005.** Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *J Cell Biol* **170**(6): 881-888.
- Meisinger C, Pfannschmidt S, Rissler M, Milenkovic D, Becker T, Stojanovski D, Youngman MJ, Jensen RE, Chacinska A, Guiard B, Pfanner N, Wiedemann N. 2007.** The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major beta-barrel assembly pathway of mitochondria. *EMBO J* **26**(9): 2229-2239.
- Meisinger C, Rissler M, Chacinska A, Szklarz LK, Milenkovic D, Kozjak V, Schönfisch B, Lohaus C, Meyer HE, Yaffe MP, Guiard B, Wiedemann N, Pfanner N. 2004.** The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell* **7**(1): 61-71.
- Meisinger C, Sickmann A, Pfanner N. 2008.** The mitochondrial proteome: from inventory to function. *Cell* **134**(1): 22-24.
- Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM. 2005.** A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**(7): 1059-1069.
- Meselson M, Yuan R, Heywood J. 1972.** Restriction and modification of DNA. *Annu Rev Biochem* **41**: 447-466.
- Meyer W, Bomer U, Pratje E. 1997.** Mitochondrial inner membrane bound Pet1402 protein is rapidly imported into mitochondria and affects the integrity of the cytochrome oxidase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complexes. *Biol Chem* **378**(11): 1373-1379.
- Mick DU, Wagner K, van der Laan M, Frazier AE, Perschil I, Pawlas M, Meyer HE, Warscheid B, Rehling P. 2007.** Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J* **26**(20): 4347-4358.
- Milenkovic D, Kozjak V, Wiedemann N, Lohaus C, Meyer HE, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C. 2004.** Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J Biol Chem* **279**(21): 22781-22785.
- Mileykovskaya E, Dowhan W. 2014.** Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chem Phys Lipids* **179**: 42-48.

- Milisav I, Moro F, Neupert W, Brunner M. 2001.** Modular structure of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *J Biol Chem* **276**(28): 25856-25861.
- Miller BR, Cumsy MG. 1993.** Intramitochondrial sorting of the precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit Va. *J Cell Biol* **121**(5): 1021-1029.
- Miyakawa I, Sando N, Kawano S, Nakamura S, Kuroiwa T. 1987.** Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **88 (Pt 4)**: 431-439.
- Moczko M, Ehmam B, Gärtner F, Hönliger A, Schäfer E, Pfanner N. 1994.** Deletion of the receptor MOM19 strongly impairs import of cleavable preproteins into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J Biol Chem* **269**(12): 9045-9051.
- Mokranjac D, Neupert W. 2009.** Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta* **1793**(1): 33-41.
- Mokranjac D, Sichting M, Neupert W, Hell K. 2003.** Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J* **22**(19): 4945-4956.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Nargang FE, Preuss M, Neupert W, Herrmann JM. 2002.** The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **277**(15): 12846-12853.
- Nathans D, Smith HO. 1975.** Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem* **44**: 273-293.
- Navarro A, Boveris A. 2007.** The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(2): C670-686.
- Neupert W. 1997.** Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **66**: 863-917.
- Neupert W. 2015.** A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *J Mol Biol*.
- Neupert W, Brunner M. 2002.** The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(8): 555-565.
- Neupert W, Herrmann JM. 2007.** Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**: 723-749.
- Nguyen TT, Lewandowska A, Choi JY, Markgraf DF, Junker M, Bilgin M, Ejsing CS, Voelker DR, Rapoport TA, Shaw JM. 2012.** Gem1 and ERMES do not directly affect phosphatidylserine transport from ER to mitochondria or mitochondrial inheritance. *Traffic* **13**(6): 880-890.
- Niedenthal RK, Riles L, Johnston M, Hegemann JH. 1996.** Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12**(8): 773-786.
- Nikolov M, Stutzer A, Mosch K, Krasauskas A, Soeroes S, Stark H, Urlaub H, Fischle W. 2011.** Chromatin affinity purification and quantitative mass spectrometry defining the interactome of histone modification patterns. *Mol Cell Proteomics* **10**(11): M110 005371.
- Nowikovsky K, Froschauer EM, Zsurka G, Samaj J, Reipert S, Kolisek M, Wiesenberger G, Schweyen RJ. 2004.** The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem* **279**(29): 30307-30315.
- Nunnari J, Fox TD, Walter P. 1993.** A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* **262**(5142): 1997-2004.

- Nunnari J, Marshall WF, Straight A, Murray A, Sedat JW, 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**(7): 1233-1242.
- Okamoto K, Shaw JM. 2005.** Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* **39**: 503-536.
- Ong SE, Mann M. 2006.** A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc* **1**(6): 2650-2660.
- Osman C, Haag M, Potting C, Rodenfels J, Dip PV, Wieland FT, Brügger B, Westermann B, Langer T. 2009.** The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *J Cell Biol* **184**(4): 583-596.
- Osman C, Voelker DR, Langer T. 2011.** Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol* **192**(1): 7-16.
- Ott M, Herrmann JM. 2010.** Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochim Biophys Acta* **1803**(6): 767-775.
- Ott M, Prestele M, Bauerschmitt H, Funes S, Bonnefoy N, Herrmann JM. 2006.** Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J* **25**(8): 1603-1610.
- Palade GE. 1952.** The fine structure of mitochondria. *Anat Rec* **114**(3): 427-451.
- Palumaa P, Kangur L, Voronova A, Sillard R. 2004.** Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase. *Biochem J* **382**(Pt 1): 307-314.
- Papic D, Krumpe K, Dukanovic J, Dimmer KS, Rapaport D. 2011.** Multispan mitochondrial outer membrane protein Ugo1 follows a unique Mim1-dependent import pathway. *J Cell Biol* **194**(3): 397-405.
- Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W. 2003.** Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **426**(6968): 862-866.
- Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J. 2002.** The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* **21**(3): 221-230.
- Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD. 2003.** Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J* **22**(21): 5951-5961.
- Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. 1997.** Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* **119**(3): 260-272.
- Petrungaro C, Riemer J. 2014.** Mechanisms and physiological impact of the dual localization of mitochondrial intermembrane space proteins. *Biochem Soc Trans* **42**(4): 952-958.
- Pfeffer S, Woellhaf MW, Herrmann JM, Forster F. 2015.** Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nat Commun* **6**: 6019.
- Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schägger H. 2003.** Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* **278**(52): 52873-52880.
- Pierrel F, Bestwick ML, Cobine PA, Khalimonchuk O, Cricco JA, Winge DR. 2007.** Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J* **26**(20): 4335-4346.
- Pon L, Moll T, Vestweber D, Marshallsay B, Schatz G. 1989.** Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1): 2603-2616.

- Popov-Celeketic J, Waizenegger T, Rapaport D. 2008.** Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* **376**(3): 671-680.
- Porcelli AM, Ghelli A, Zanna C, Pinton P, Rizzuto R, Rugolo M. 2005.** pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochem Biophys Res Commun* **326**(4): 799-804.
- Premisler T, Zahedi RP, Lewandrowski U, Sickmann A. 2009.** Recent advances in yeast organelle and membrane proteomics. *Proteomics* **9**(20): 4731-4743.
- Preuss M. 2004.** Biogenese der Innenmembran von Mitochondrien: Funktion von Mba1 und Oxal bei der Insertion von Proteinen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Preuss M, Leonhard K, Hell K, Stuart RA, Neupert W, Herrmann JM. 2001.** Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **153**(5): 1085-1096.
- Prokisch H, Scharfe C, Camp DG, 2nd, Xiao W, David L, Andreoli C, Monroe ME, Moore RJ, Gritsenko MA, Kozany C, Hixson KK, Mottaz HM, Zischka H, Ueffing M, Herman ZS, Davis RW, Meitinger T, Oefner PJ, Smith RD, Steinmetz LM. 2004.** Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol* **2**(6): e160.
- R-Development-Core-Team. 2011.** R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN: 3-900051-07-0. .
- Ramage L, Junne T, Hahne K, Lithgow T, Schatz G. 1993.** Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J* **12**(11): 4115-4123.
- Rapaport D. 2003.** Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep* **4**(10): 948-952.
- Rassow J, Guiard B, Wienhues U, Herzog V, Hartl FU, Neupert W. 1989.** Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites. *J Cell Biol* **109**(4 Pt 1): 1421-1428.
- Rassow J, Maarse AC, Krainer E, Kübrich M, Müller H, Meijer M, Craig EA, Pfanner N. 1994.** Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J Cell Biol* **127**(6 Pt 1): 1547-1556.
- Rehling P, Model K, Brandner K, Kovermann P, Sickmann A, Meyer HE, Kühlbrandt W, Wagner R, Truscott KN, Pfanner N. 2003.** Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* **299**(5613): 1747-1751.
- Reif S, Randelj O, Domanska G, Dian EA, Krimmer T, Motz C, Rassow J. 2005.** Conserved mechanism of Oxal1 insertion into the mitochondrial inner membrane. *J Mol Biol* **354**(3): 520-528.
- Reinders J, Zahedi RP, Pfanner N, Meisinger C, Sickmann A. 2006.** Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* **5**(7): 1543-1554.
- Renart J, Reiser J, Stark GR. 1979.** Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(7): 3116-3120.
- Rep M, Grivell LA. 1996.** MBA1 encodes a mitochondrial membrane-associated protein required for biogenesis of the respiratory chain. *FEBS Lett* **388**(2-3): 185-188.
- Rep M, Nooy J, Guelin E, Grivell LA. 1996.** Three genes for mitochondrial proteins suppress null-mutations in both Afg3 and Rca1 when over-expressed. *Curr Genet* **30**(3): 206-211.
- Rajo EE, Guiard B, Neupert W, Stuart RA. 1998.** Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements. *J Biol Chem* **273**(14): 8040-8047.

- Rojo EE, Guiard B, Neupert W, Stuart RA. 1999.** N-terminal tail export from the mitochondrial matrix. Adherence to the prokaryotic "positive-inside" rule of membrane protein topology. *J Biol Chem* **274**(28): 19617-19622.
- Rojo EE, Stuart RA, Neupert W. 1995.** Conservative sorting of F₀-ATPase subunit 9: export from matrix requires delta pH across inner membrane and matrix ATP. *EMBO J* **14**(14): 3445-3451.
- Rothstein R. 1984.** Double-strand-break repair, gene conversion, and postdivision segregation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **49**: 629-637.
- Roucou X, Prescott M, Devenish RJ, Nagley P. 2000.** A cytochrome c-GFP fusion is not released from mitochondria into the cytoplasm upon expression of Bax in yeast cells. *FEBS Lett* **471**(2-3): 235-239.
- Salinovich O, Montelaro RC. 1986.** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **156**(2): 341-347.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor laboratory Press*(2nd edition).
- Saracco SA, Fox TD. 2002.** Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane. *Mol Biol Cell* **13**(4): 1122-1131.
- Saraste M. 1999.** Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**(5407): 1488-1493.
- Sato T, Mihara K. 2009.** Topogenesis of mammalian Oxa1, a component of the mitochondrial inner membrane protein export machinery. *J Biol Chem* **284**(22): 14819-14827.
- Schägger H. 2002.** Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1555**(1-3): 154-159.
- Scheffler IE. 2001a.** A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **1**(1): 3-31.
- Scheffler IE. 2001b.** Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev* **49**(1-2): 3-26.
- Schlame M, Rua D, Greenberg ML. 2000.** The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* **39**(3): 257-288.
- Schleyer M, Neupert W. 1985.** Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* **43**(1): 339-350.
- Schlickum S, Moghekar A, Simpson JC, Steglich C, O'Brien RJ, Winterpacht A, Endele SU. 2004.** LETM1, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics* **83**(2): 254-261.
- Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. 2010.** Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 655-667.
- Schmitz-Salue JS. 2007.** Untersuchung der innermitochondrialen Lokalisation von sechs Proteinen mittels konfokaler Lichtmikroskopie. Praktikumsarbeit. Hogeschool Drenthe/Emmen.
- Schneider HC, Berthold J, Bauer MF, Dietmeier K, Guiard B, Brunner M, Neupert W. 1994.** Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* **371**(6500): 768-774.
- Schulz C, Lytovchenko O, Melin J, Chacinska A, Guiard B, Neumann P, Ficner R, Jahn O, Schmidt B, Rehling P. 2011.** Tim50's presequence receptor domain is essential for signal driven transport across the TIM23 complex. *J Cell Biol* **195**(4): 643-656.
- Schwaiger M, Herzog V, Neupert W. 1987.** Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins. *J Cell Biol* **105**(1): 235-246.
- Scorrano L. 2009.** Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* **41**(10): 1875-1883.

- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. 2006.** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**(6): 2856-2860.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962.** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239.
- Shiota T, Mabuchi H, Tanaka-Yamano S, Yamano K, Endo T. 2011.** In vivo protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(37): 15179-15183.
- Shore GC, McBride HM, Millar DG, Steenaart NA, Nguyen M. 1995.** Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Eur J Biochem* **227**(1-2): 9-18.
- Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C. 2003.** The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13207-13212.
- Simbeni R, Pon L, Zinser E, Paltauf F, Daum G. 1991.** Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *J Biol Chem* **266**(16): 10047-10049.
- Sirrenberg C, Bauer MF, Guiard B, Neupert W, Brunner M. 1996.** Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* **384**(6609): 582-585.
- Sirrenberg C, Endres M, Fölsch H, Stuart RA, Neupert W, Brunner M. 1998.** Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* **391**(6670): 912-915.
- Sjöstrand FS. 1953.** Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* **171**(4340): 30-32.
- Smits P, Smeitink JA, van den Heuvel LP, Huynen MA, Ettema TJ. 2007.** Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome. *Nucleic Acids Res* **35**(14): 4686-4703.
- Sogo LF, Yaffe MP. 1994.** Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* **126**(6): 1361-1373.
- Sokol AM, Sztolsztener ME, Wasilewski M, Heinz E, Chacinska A. 2014.** Mitochondrial protein translocases for survival and wellbeing. *FEBS Lett* **588**(15): 2484-2495.
- Söllner T, Griffiths G, Pfaller R, Pfanner N, Neupert W. 1989.** MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* **59**(6): 1061-1070.
- Soto IC, Fontanesi F, Liu J, Barrientos A. 2012.** Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta* **1817**(6): 883-897.
- Souza RL, Green-Willms NS, Fox TD, Tzagoloff A, Nobrega FG. 2000.** Cloning and characterization of COX18, a *Saccharomyces cerevisiae* PET gene required for the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **275**(20): 14898-14902.
- Stoldt S. 2010.** Dynamische sub-mitochondriale Lokalisation von Oxa1. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.
- Stoldt S, Wenzel D, Hildenbeutel M, Wurm CA, Herrmann JM, Jakobs S. 2012.** The inner-mitochondrial distribution of Oxa1 depends on the growth conditions and on the availability of substrates. *Mol Biol Cell* **23**(12): 2292-2301.
- Stroud DA, Oeljeklaus S, Wiese S, Bohnert M, Lewandrowski U, Sickmann A, Guiard B, van der Laan M, Warscheid B, Wiedemann N. 2011.** Composition and topology of the endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure. *J Mol Biol* **413**(4): 743-750.
- Stuart R. 2002.** Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex. *Biochim Biophys Acta* **1592**(1): 79-87.

- Suppanz I. 2008.** Lichtmikroskopische Untersuchung submitochondrialer Proteinverteilungen in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
- Suppanz IE, Wurm CA, Wenzel D, Jakobs S. 2009.** The m-AAA protease processes cytochrome c peroxidase preferentially at the inner boundary membrane of mitochondria. *Mol Biol Cell* **20**(2): 572-580.
- Suzuki CK, Suda K, Wang N, Schatz G. 1994.** Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* **264**(5156): 273-276.
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. 1983.** The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**(1): 25-35.
- Szyrach G, Ott M, Bonnefoy N, Neupert W, Herrmann JM. 2003.** Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J* **22**(24): 6448-6457.
- Takeda M, Chen WJ, Saltzgaber J, Douglas MG. 1986.** Nuclear genes encoding the yeast mitochondrial ATPase complex. Analysis of ATP1 coding the F1-ATPase alpha-subunit and its assembly. *J Biol Chem* **261**(32): 15126-15133.
- Tamura Y, Endo T, Iijima M, Sesaki H. 2009.** Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria. *J Cell Biol* **185**(6): 1029-1045.
- Tan T, Özbalci C, Brügger B, Rapaport D, Dimmer KS. 2013.** Mcp1 and Mcp2, two novel proteins involved in mitochondrial lipid homeostasis. *J Cell Sci* **126**(Pt 16): 3563-3574.
- Taylor AB, Smith BS, Kitada S, Kojima K, Miyaura H, Otwinowski Z, Ito A, Deisenhofer J. 2001.** Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure* **9**(7): 615-625.
- Tokuyasu KT. 1973.** A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* **57**(2): 551-565.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.
- Truscott KN, Kovermann P, Geissler A, Merlin A, Meijer M, Driessen AJ, Rassow J, Pfanner N, Wagner R. 2001.** A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol* **8**(12): 1074-1082.
- Truscott KN, Voos W, Frazier AE, Lind M, Li Y, Geissler A, Dudek J, Muller H, Sickmann A, Meyer HE, Meisinger C, Guiard B, Rehling P, Pfanner N. 2003.** A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol* **163**(4): 707-713.
- Tzagoloff A, Yue J, Jang J, Paul MF. 1994.** A new member of a family of ATPases is essential for assembly of mitochondrial respiratory chain and ATP synthetase complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**(42): 26144-26151.
- van der Klei IJ, Veenhuis M, Neupert W. 1994.** A morphological view on mitochondrial protein targeting. *Microsc Res Tech* **27**(4): 284-293.
- van der Laan M, Bohnert M, Wiedemann N, Pfanner N. 2012.** Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends Cell Biol* **22**(4): 185-192.
- van der Laan M, Chacinska A, Lind M, Perschil I, Sickmann A, Meyer HE, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N, Rehling P. 2005.** Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor. *Mol Cell Biol* **25**(17): 7449-7458.
- van der Laan M, Meinecke M, Dudek J, Hutu DP, Lind M, Perschil I, Guiard B, Wagner R, Pfanner N, Rehling P. 2007.** Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins. *Nat Cell Biol* **9**(10): 1152-1159.

- Van Dyck L, Pearce DA, Sherman F. 1994.** PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**(1): 238-242.
- van Loon AP, Schatz G. 1987.** Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the 'sorting' domain of the cytochrome c1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. *EMBO J* **6**(8): 2441-2448.
- van Wilpe S, Ryan MT, Hill K, Maarse AC, Meisinger C, Brix J, Dekker PJ, Moczko M, Wagner R, Meijer M, Guiard B, Hönlinger A, Pfanner N. 1999.** Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* **401**(6752): 485-489.
- Vogel F, Bornhovd C, Neupert W, Reichert AS. 2006.** Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* **175**(2): 237-247.
- Vögtle FN, Burkhart JM, Rao S, Gerbeth C, Hinrichs J, Martinou JC, Chacinska A, Sickmann A, Zahedi RP, Meisinger C. 2012.** Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol Cell Proteomics* **11**(12): 1840-1852.
- von der Malsburg K, Müller JM, Bohnert M, Oeljeklaus S, Kwiatkowska P, Becker T, Loniewska-Lwowska A, Wiese S, Rao S, Milenkovic D, Hutu DP, Zerbes RM, Schulze-Specking A, Meyer HE, Martinou JC, Rospert S, Rehling P, Meisinger C, Veenhuis M, Warscheid B, van der Klei IJ, Pfanner N, Chacinska A, van der Laan M. 2011.** Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev Cell* **21**(4): 694-707.
- von Heijne G. 1989.** Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**(6241): 456-458.
- Voos W, Rottgers K. 2002.** Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1592**(1): 51-62.
- Voss C, Lahiri S, Young BP, Loewen CJ, Prinz WA. 2012.** ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* **125**(Pt 20): 4791-4799.
- Wagner I, Arlt H, van Dyck L, Langer T, Neupert W. 1994.** Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J* **13**(21): 5135-5145.
- Waizenegger T, Habib SJ, Lech M, Mokranjac D, Paschen SA, Hell K, Neupert W, Rapaport D. 2004.** Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep* **5**(7): 704-709.
- Waizenegger T, Schmitt S, Zivkovic J, Neupert W, Rapaport D. 2005.** Mim1, a protein required for the assembly of the TOM complex of mitochondria. *EMBO Rep* **6**(1): 57-62.
- Wang P, Dalbey RE. 2011.** Inserting membrane proteins: the YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1808**(3): 866-875.
- Warren G, Wickner W. 1996.** Organelle inheritance. *Cell* **84**(3): 395-400.
- Werner S, Neupert W. 1972.** Functional and biogenetical heterogeneity of the inner membrane of rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* **25**(2): 379-396.
- Westermann B. 2007.** Focus on mitochondria: introducing a new series in Trends in Cell Biology. *Trends Cell Biol* **17**(9): 417-418.
- Westermann B, Neupert W. 2000.** Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**(15): 1421-1427.
- Westermann B, Prip-Buus C, Neupert W, Schwarz E. 1995.** The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *EMBO J* **14**(14): 3452-3460.

- Whatley FR. 1981.** The establishment of mitochondria: Paracoccus and Rhodospseudomonas. *Ann N Y Acad Sci* **361**: 330-340.
- Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schönfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C. 2003.** Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* **424**(6948): 565-571.
- Wiedemann N, Truscott KN, Pfannschmidt S, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N. 2004.** Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *J Biol Chem* **279**(18): 18188-18194.
- Wilkens V, Kohl W, Busch K. 2013.** Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution. *J Cell Sci* **126**(Pt 1): 103-116.
- Wittig I, Braun HP, Schagger H. 2006.** Blue native PAGE. *Nat Protoc* **1**(1): 418-428.
- Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R. 1981.** Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **118**(1): 197-203.
- Wurm CA. 2008.** Lichtmikroskopische Untersuchung submitochondrialer Proteinverteilungen. Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Wurm CA, Jakobs S. 2006.** Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett* **580**(24): 5628-5634.
- Yaffe MP. 1999.** The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* **283**(5407): 1493-1497.
- Yamamoto H, Esaki M, Kanamori T, Tamura Y, Nishikawa S, Endo T. 2002.** Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell* **111**(4): 519-528.
- Yamano K, Tanaka-Yamano S, Endo T. 2010.** Mdm10 as a dynamic constituent of the TOB/SAM complex directs coordinated assembly of Tom40. *EMBO Rep* **11**(3): 187-193.
- Ye B, Maret W, Vallee BL. 2001.** Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2317-2322.
- Yen MR, Harley KT, Tseng YH, Saier MH, Jr. 2001.** Phylogenetic and structural analyses of the oxal family of protein translocases. *FEMS Microbiol Lett* **204**(2): 223-231.
- Youle RJ, van der Blik AM. 2012.** Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **337**(6098): 1062-1065.
- Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU. 2003.** Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* **112**(1): 41-50.
- Youngman MJ, Hobbs AE, Burgess SM, Srinivasan M, Jensen RE. 2004.** Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J Cell Biol* **164**(5): 677-688.
- Zahedi RP, Sickmann A, Boehm AM, Winkler C, Zufall N, Schönfisch B, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C. 2006.** Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell* **17**(3): 1436-1450.
- Zick M, Rabl R, Reichert AS. 2009.** Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1793**(1): 5-19.
- Zinser E, Sperka-Gottlieb CD, Fasch EV, Kohlwein SD, Paltauf F, Daum G. 1991.** Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**(6): 2026-2034.

8 Anhang

8.1 Vektoren und Plasmide

8.1.1 Vektoren für die Erstellung von Expressionsplasmiden

Für die Herstellung der Plasmide zur Expression von carboxyterminalen Fusionskonstrukten in *Saccharomyces cerevisiae* wurden in dieser Arbeit die beiden modifizierten Vektoren pUG36-C-GFP und pUG36-C-FLAG verwendet (Abb. 8.1), welche auf dem Ausgangsvektor pUG36 basieren (Niedenthal *et al.*, 1996; Fu & Xiao, 2003).

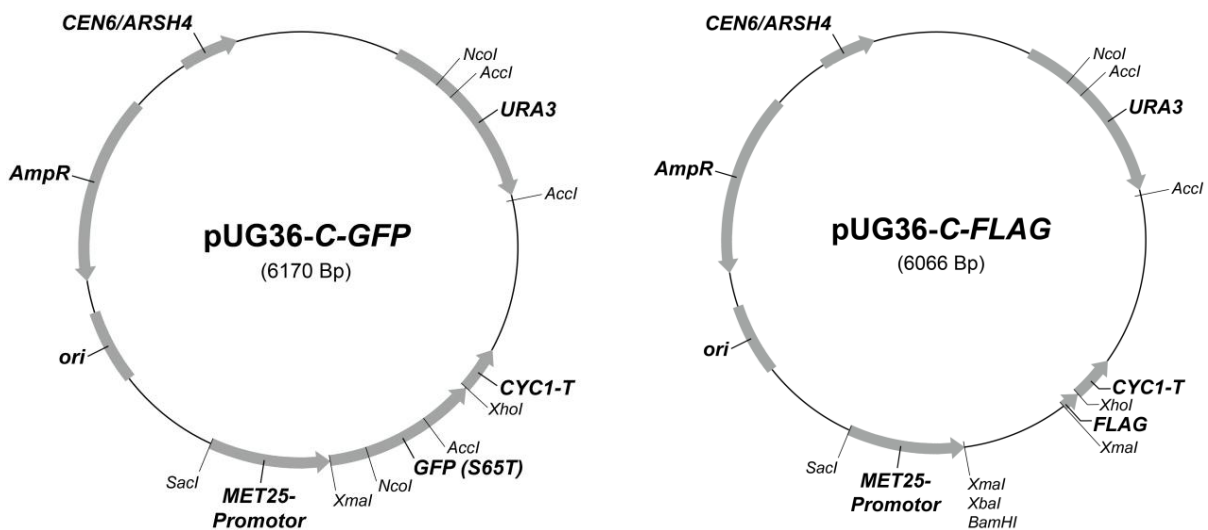


Abb. 8.1: Vektorkarten der Ausgangsvektoren pUG36-C-GFP und pUG36-C-FLAG.

Dargestellt sind die beiden Ausgangsvektoren, die für die Erzeugung der Expressionsplasmide in *S. cerevisiae* verwendet wurden. Folgende Merkmale sind abgebildet: ausgewählte Restriktionsschnittstellen, Hefe-Zentromerregion und Replikationsursprung (*CEN6/ARSH4*), Hefe-Selektionsmarker (*URA3*), Hefe-Transkriptionsterminator (*CYC1-T*), Hefe-Promotor (*MET25*), Bakterien-Replikationsstartpunkt (*ori*), Bakterien-Resistenzkassette (*AmpR*) und die Gene *GFP (S65T)* (links) und *FLAG* (rechts) für die C-terminale Markierung.

Der Vektor pUG36-C-GFP trägt ein Gen, das für die Variante **GFP (S65T)** des grün fluoreszierenden Proteins kodiert (Shimomura *et al.*, 1962). Die zugehörige Gensequenz stammt aus der „Yeast GFP Clone Collection“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Huh *et al.*, 2003).

Der Vektor pUG36-C-FLAG enthält das Gen, welches für das **FLAG**-Oktapeptid kodiert (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK) (Hopp *et al.*, 1988).

Der pUG36-Vektor ist ein sogenanntes „low copy“-Plasmid, von dem nur 1 – 4 Kopien pro Zelle vorliegen. Er verfügt über die *CEN6/ARSH4*-Kassette, die sowohl für die Weitergabe des Plasmids während der Zellteilung (*CEN6*, *S. cerevisiae*-Zentromerregion) als auch für die autonome Replikation des Plasmids (*ARSH4*, Replikationsursprung) benötigt wird.

Weitere Merkmale dieser Vektoren sind der Transkriptionsterminator *CYC1-T* sowie der integrierte *MET25-Promotor*, der die Regulierung der Expressionsstärke eines Gens ermöglicht. Ein Gen wird

schwach exprimiert solange der Promotor nicht induziert wird, oder stark, wenn der Promotor aktiviert wird, indem die zu analysierenden Hefezellen in einem Methionin-freien Wachstumsmedium kultiviert werden. In dieser Arbeit wurde der **MET25-Promotor** gegen den **nativen Promotor** des zu exprimierenden Gens ausgetauscht. Dabei handelte es sich stets um die 300 Basenpaare, die unmittelbar vor dem Startcodon des entsprechenden Gens liegen.

Des Weiteren verfügen die Vektoren über das **URA3**-Markergen, welches für das Enzym Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase kodiert. Es wird für die *de novo*-Synthese von Pyrimidin-Ribonukleotiden benötigt und kann deshalb zur Transformantenselektion von *S. cerevisiae*-Zellen mit einer genomischen **URA3**-Deletion auf Uracil-freien Medien verwendet werden.

Die Vektoren besitzen außerdem einen für die Amplifizierung des Plasmids in Bakterien benötigten Replikationsstartpunkt (**ori**, Origin of Replication) und eine Ampicillin-Resistenzkassette (**AmpR**) für die Selektion von *Escherichia coli*-Zellen. **AmpR** kodiert für das Enzym β -Laktamase, welches die Hydrolyse des β -Laktam-Rings katalysiert und so β -Laktam-Antibiotika wie Ampicillin inaktiviert.

8.1.2 Erstellung von Fusionskonstrukten für die Expression in Hefe sowie als Templates für die PCR-Amplifikation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden pUG36-C-GFP- und pUG36-C-FLAG-Expressionsplasmide verwendet, welche für die mitochondrialen Gene *OXA1* oder *oxa1-W128F* kodierten. Sie wurden eingesetzt, um Oxa1-Komplexe sowie die dynamische Proteinverteilung von Oxa1 innerhalb der inneren Mitochondrienmembran (Stoldt *et al.*, 2012) zu untersuchen.

Für die submitochondriale Lokalisationsanalyse von Pnt1 und Mba1 in Abhängigkeit von der im Wachstumsmedium verwendeten Kohlenstoffquelle wurde ein für *PNT1-GFP* bzw. ein für *MBA1-GFP* kodierendes Expressionsplasmid eingesetzt.

Neben unverändertem Mba1 wurden in der vorliegenden Arbeit auch Deletions- und Substitutionsmutanten von Mba1 erstellt und lichtmikroskopisch sowie biochemisch analysiert. Für die Erzeugung der Mba1-Mutanten, bei denen Aminosäuren im C-Terminus deletiert waren, wurde das für *MBA1-GFP* kodierende Expressionsplasmid als PCR-Matrize (siehe Kapitel 3.2.1) verwendet. Über spezifische DNS-Oligonukleotide (Tab. 3.6) wurden an den Enden der PCR-Produkte *SacI*- und *XmaI*-Schnittstellen eingeführt. Diese Schnittstellen ermöglichten die über Ligation (siehe Kapitel 3.2.8) vermittelte Integration der verkürzten *MBA1*-Genvarianten in die Ausgangsvektoren pUG36-C-GFP (*Vektor1*) und pUG36-C-FLAG (*Vektor2*), die vorher ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XmaI* geschnitten wurden. Um die Mba1-Mutanten zu erzeugen, bei denen einzelne Aminosäuren im C-Terminus mit Alanin substituiert wurden, wurde jeweils das gesamte für *MBA1-GFP* bzw. *MBA1-FLAG* kodierende pUG36-Plasmid mittels PCR amplifiziert. Über die dabei eingesetzten DNS-Oligonukleotide wurde ein gerichteter Austausch von einer oder zwei Basen an einer bestimmten Stelle im *MBA1*-Gen gegen andere Basen herbeigeführt, so dass das Basentriplett nun für die Aminosäure Alanin anstelle der ursprünglichen Aminosäure kodierte.

Um ein annähernd natürliches Expressionsniveau für die Charakterisierung der verschiedenen *OXA1*-, *PNT1*- bzw. *MBA1*-Fusionskonstrukte zu erreichen, wurde der *MET25*-Promotor in den beiden Ausgangsvektoren pUG36-*C-GFP* (Vektor1) und pUG36-*C-FLAG* (Vektor2) durch den dem jeweiligen Gen entsprechenden *nativen Promotor* ersetzt.

Die zugehörigen Plasmidkarten sind in Abbildung 8.2 dargestellt und die jeweiligen Größen der inserierten Gene in Tabelle 8.1.

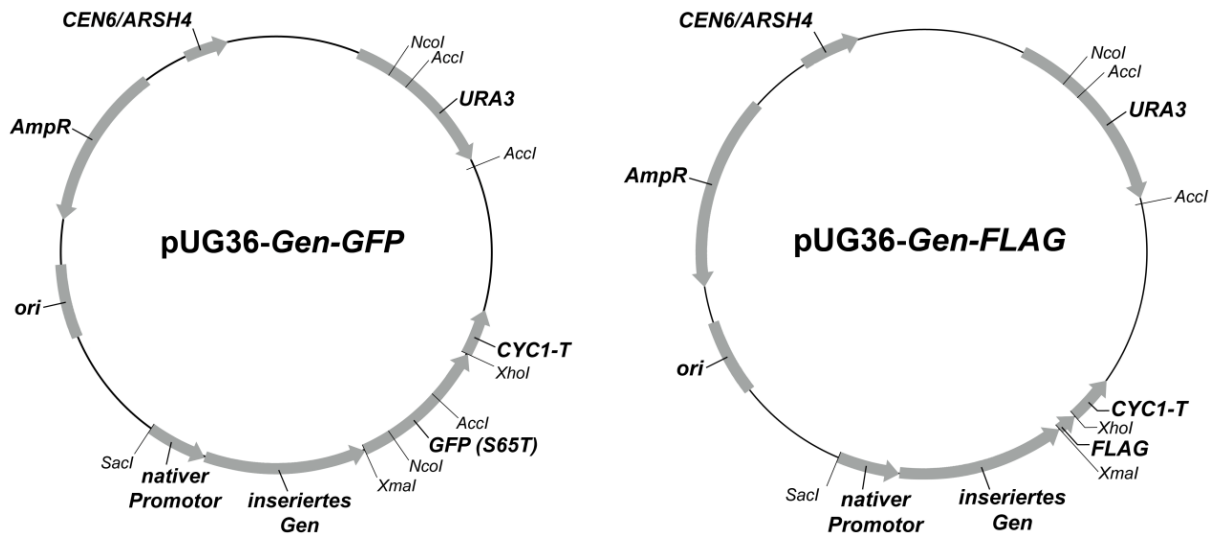


Abb. 8.2: Plasmidkarten der eingesetzten *GFP*- und *FLAG*-Expressionsplasmide.

Darstellung der Plasmidkarten für die *S. cerevisiae*-Expression von *GFP*- (links) und *FLAG*-Fusionskonstrukten (rechts). Weiterhin sind ausgewählte Restriktionsschnittstellen, die Hefe-Zentromerregion und der Replikationsursprung (*CEN6/ARSH4*), das Hefe-Selektionsmarker (*URA3*), der Hefe-Transkriptionsterminator (*CYC1-T*), der Hefe-Promotor (*nativer Promotor*), das zu untersuchende Gen (*inseriertes Gen*), der Bakterien-Replikationsstartpunkt (*ori*) und die Bakterien-Resistenzkassette (*AmpR*) abgebildet.

Tab. 8.1: Größen der in die *GFP*- und *FLAG*-Expressionsplasmide inserierten Gene

inseriertes Gen	Gengröße	inseriertes Gen	Gengröße	inseriertes Gen	Gengröße
<i>OXA1</i>	1206 Bp	<i>mba1</i> ¹⁻²⁷³	819 Bp	<i>mba1-I272A</i>	834 Bp
<i>oxa1-W128F</i>	1206 Bp	<i>mba1</i> ¹⁻²⁷²	816 Bp	<i>mba1-D271A</i>	834 Bp
<i>PNT1</i>	1269 Bp	<i>mba1-S278A</i>	834 Bp	<i>mba1-G270A</i>	834 Bp
<i>MBA1</i>	834 Bp	<i>mba1-P277A</i>	834 Bp	<i>mba1-N269A</i>	834 Bp
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁷	831 Bp	<i>mba1-P276A</i>	834 Bp	<i>mba1-V268A</i>	834 Bp
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁶	828 Bp	<i>mba1-L275A</i>	834 Bp	<i>mba1-M266A</i>	834 Bp
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁵	825 Bp	<i>mba1-R274A</i>	834 Bp		
<i>mba1</i> ¹⁻²⁷⁴	822 Bp	<i>mba1-Y273A</i>	834 Bp		

Der Vektor pAG25 (Euroscarf, Frankfurt, Deutschland) sowie die Plasmide pVT100U-*mt-GFP* und pCR2.1-TOPO-*MDM10*-Knockout kamen ebenfalls zum Einsatz. Die Vektorkarte bzw. die beiden Plasmidkarten sind in Abbildung 8.3 dargestellt.

Der Vektor pAG25 diente als PCR-Matrize für die Amplifikation der *natMX*-Genkassette, welche für die *ARG4*-Deletion in den für SILAC-Analysen angewandten Hefestämmen benötigt wurde.

Das Plasmid pVT100U-*mt-GFP* wurde für die Expression von mitochondrialem *Matrix-GFP* verwendet, welches die Darstellung des mitochondrialen Netzwerks und der Mitochondrienmorphologie während lichtmikroskopischer Analysen ermöglichte.

Das Plasmid pCR2.1-TOPO-*MDM10*-Knockout diente als Matrize für die Herstellung des PCR-Produktes für die genomische Deletion von *MDM10* (siehe Kapitel 3.4.4 und 8.6), welche in Hefen für die Erzeugung von Mitochondrien mit einem vergrößerten Durchmesser eingesetzt wurde.

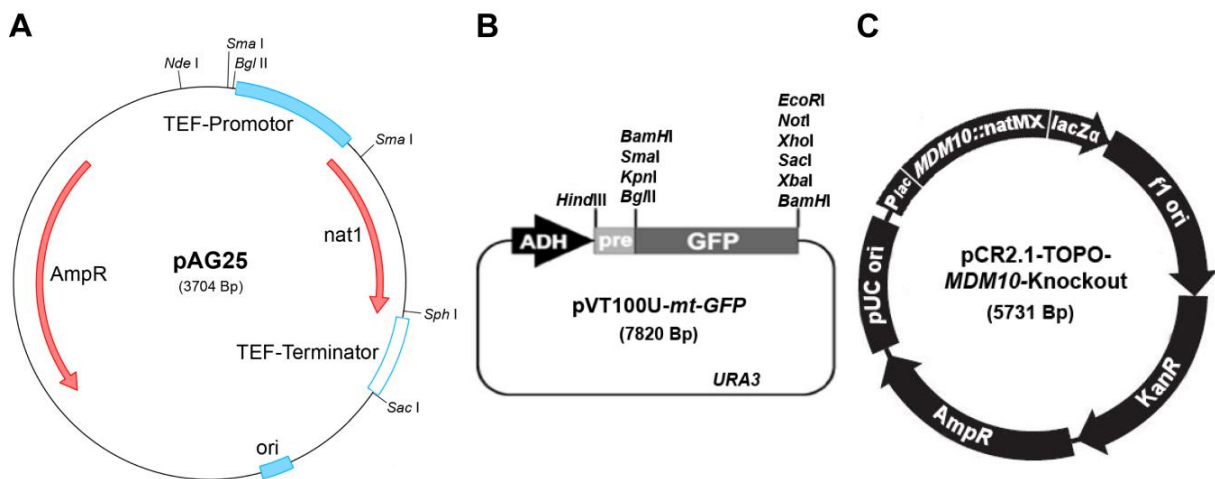


Abb. 8.3: Vektorkarte des pAG25-Vektors sowie Plasmidkarten von pVT100U-*mt-GFP* und pCR2.1-TOPO-*MDM10*-Knockout.

(A) Vektorkarte von pAG25 basierend auf Informationen von Euroscarf (Frankfurt, Deutschland). Gezeigt sind ausgewählte Restriktionsschnittstellen, der *TEF*-Promotor sowie der *TEF*-Terminator, die Resistenzkassette *nat1* (*natMX*), die Bakterienresistenzkassette *AmpR* und der Bakterien-Replikationsstartpunkt *ori*. (B) Plasmidkarte von pVT100U-*mt-GFP* modifiziert nach (Westermann & Neupert, 2000). Es sind ausgewählte Restriktionsschnittstellen, das Hefe-Selektionsmarker *URA3*, der konstitutiv aktive Promotor *ADH* sowie die Sequenz, die für die Expression von mitochondrialem *Matrix-GFP* benötigt wurde, dargestellt. (C) Plasmidkarte von pCR2.1-TOPO-*MDM10*-Knockout basierend auf Produktinformationen über den pCR2.1-TOPO TA-Klonierungsvektor der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Neben der Sequenz, welche für die Amplifikation des PCR-Produktes für die genomische *MDM10*-Deletion notwendig war (*MDM10::natMX*), sind die Bakterien-Resistenzkassetten *AmpR* und *KanR*, der Bakterien-Replikationsstartpunkt *pUC ori*, der Startpunkt für die einzelsträngige DNS-Replikation in *E. coli* (*f1 ori*) sowie die *Plac*- und *lacZα*-Fragmente für die Blau-Weiß-Selektion zur Identifikation von transgenen Klonen abgebildet.

8.2 Aminosäuresequenz von Oxa1 aus *S. cerevisiae*

```

1      MFKLTSRLVTSRFAASSRLATARTIVLPRPHPSWISFQAKRFNSTGPNAN
51     DVSEIQTQLPSIDELTSSAPSLASSTSDLIANTTQTVGELSSHIGYLNSI
101    GLAQTWYWPSDI IQHVLEAVHVYSGLPWWGTIAATTILIRCLMFPLYVKS
151    SDTVARNSHIKPELDALNNKLMSTTDLQQGQLVAMQRKKLLSSHGIKNRW
201    LAAPMLQIPIALGFFNALRHMANYPVDGFANQGVAVFTDLTQADPYLGLQ
251    VITAAVFISFTRLGGETGAQQFSSPMKRLFTILPIISIPATMNLSSAVVL
301    YFAFNGAFSVLQTMILRNKWVRSKLIKITEVAKPRTPIAGASPTENMGIFQ
351    SLKHNIQKARDQAERRQLMQDNEKKLQESFKEKRQNSKIKIVHKS NF INNK*

```

Abb. 8.4: Aminosäuresequenz von Oxa1 aus *S. cerevisiae*.

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von Oxa1 (YER154W) aus *S. cerevisiae*. Die aminoternale Präsequenz ist in **Grün** dargestellt, die Transmembrandomänen sind mit **Gelb** hinterlegt, die Tryptophane W128 und W129 mit **Rot** gekennzeichnet, der Bereich der ribosomalen Bindedomäne (RBD) ist in **Blau** dargestellt und das Sternsymbol (*) repräsentiert das Stop-Codon.

8.3 Aminosäuresequenz von Mba1 aus *S. cerevisiae*

```

1      MSVLRSTCLFFPPRSLIISFNKRRLFSTSRLLLNKESETTKKKDKSKQQD
51     FNPRHLGVAAEIFIPSAKYNLPNVFAHPLIVANALIRRLYTFGLNSVQVA
101    LFRFQSGIKPSFLLWKNKAIETYINVNTSFAHKNLSDIKGLVSLWVQEAL
151    EARSRQLPGNATLDWQLIKFNAVPKLVSVQPIMIPGMPLEHLQLVYKFDT
201    KQRLIKVNQQTKKTE TLDRDVVDYIAFLCDAT TNDMI LMGSLFESKPNDK
251    LPKSYEDDAKVAIHRMKVNGDIYRLPPS*

```

Abb. 8.5: Aminosäuresequenz von Mba1 aus *S. cerevisiae*.

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von Mba1 (YBR185C) aus *S. cerevisiae*. Die aminoternale Präsequenz ist in **Grün** dargestellt, die hydrophoben Bereiche, über welche Mba1 höchstwahrscheinlich in die innere Membran integriert wird, sind mit **Violett** hinterlegt und das Sternsymbol (*) repräsentiert das Stop-Codon.

8.4 Aminosäuresequenzvergleich von Mba1-Proteinen aus unterschiedlichen Spezies

<i>S. cerevisiae</i>	-MSVLRSTCL	FFPPRSLLIS	FNKRRLFSTS	RLILNK--ES	ETTKKKDKSK	QQDFNPRHLG	VAAEIFIPSA
<i>S. paradoxus</i>	-MSVLRSTCF	LSPAKLLIS	FNKQRLFSTS	RLILNN--ES	ETTKKKDKNK	QQDFNPRHLG	VAADIFIPTA
<i>S. mikatae</i>	-MNVLRSTYL	FSPARSLIS	CSRKQLFSTS	RLVLNK--ES	ETAKKKDKNK	QQDFNPRHLS	VTAEIFIPSA
<i>S. bayanus</i>	-MNLKPTYF	ISPAKSLIS	INRQLFTTS	RLILNK--ES	EPTEKKDKSK	QQDFNPRHLG	VASEIFIPSA
<i>K. lactis</i>	-----MFQ	LRGIRTVGLL	GKRGRFFSTS	RRLDLS--DG	-----VVKK	PAPFNPRHMG	VANQVYIAPS
<i>S. kluyveri</i>	MSIVRSSTRL	LTPSRKHLGC	IR-----LIS	TSRINF--QE	SVQDKKPSKK	PADFNPRHLG	VSTEVYIPTS
<i>C. glabrata</i>	MIVGYRGVVV	RRVGVSRLAN	VYNTRLFSSG	VKLLDE--AE	Q---KQDTKK	IQDFNPRHLG	VASELYVPAS
<i>C. albicans</i>	MFSVKRSVIG	ISKQSSLPKS	FISSQISIRS	NSSSSTPDND	NVKRKKAGMD	ISKVPLPYIG	VMSDFYVPPK
<i>A. gossypii</i>	-----	-----MMVIM	GFSSGIGMQA	SRRLS--SS	AIVRGSSTKQ	QSGFNKRYLG	VTDKIYVPTM
<i>N. crassa</i>	---MAVGRAL	FSTSENRAAA	NRRTQAARL	HTGNVVRQTG	KQPAPSLERA	KLDPKAPTFF	VLPETFYIIP
<i>S. pombe</i>	-----MN	VLRTQKYWVN	QFAINFACRN	TYVNPMLFRY	FHCAVPRAIS	QRALKPMDIP	FLQCYIEPID
<i>S. cerevisiae</i>	YKNLNPVFAH	PLIVANALIR	RLYTFGLNSV	QVALFRFQSG	IKPSFLLWKN	KAIETYINVN	TSFAHKN---
<i>S. paradoxus</i>	YKNLNPVFAH	PLIVANALIR	RLYTFGLNSV	QVALFRFQSG	IKPSFLLWKN	KAIETYINVN	TSFAHKN---
<i>S. mikatae</i>	YKNLNPVFSH	PFIVANALIR	RLYTFGLNSV	QIALFRFQSG	IKPSFLLWKN	KAIETYINVN	TSFAHKN---
<i>S. bayanus</i>	YKNLNPVFTH	PFVAVANALVR	RLYTFGLNSV	QVALFRFQSG	IKPSFLLWKN	KAIETYINVN	TSFARKN---
<i>K. lactis</i>	KKNMNPPTS	PVAYFNVLVR	KIYTLGMNTI	QVALFRYQSG	LKPNFLLWKN	KAIETYVQVN	EAFAKRE---
<i>S. kluyveri</i>	FSNLNPVFAH	PVLFFGSLIR	RVYTLGLNTV	QVALFRYQSG	IKPNFLLWKN	KAIETYVQVN	KAFANKN---
<i>C. glabrata</i>	LSRLPSVITS	PKLWFDNVIR	RIYMLGLNTV	QIGIFRFQTG	IKPAFLLWKN	KAIETYVQVN	ANFASKS---
<i>C. albicans</i>	LTTCP-----	ITSWPKLITR	RIMLFALNTY	NIVKFKREIG	VPLEFNAWKD	KGIENYVRAN	KVFAQACSEF
<i>A. gossypii</i>	YRNLPVSFRS	PLVVANSLIR	RIYMLGLNTV	HVALFRVQSG	YKPKFLLWKN	KAIETYVEVN	RAFARRD---
<i>N. crassa</i>	LSRFPKQFKP	LMSYLWGIIR	VKSLDLARIK	QYRFSSMPGW	RQKPLLSLKK	APLIAQTKAL	HRQMNIAIAS
<i>S. pombe</i>	NTSFFLHPFK	KIRFWWRYLF	YGWVN-LKKN	QFLIKRTFPD	RDFSIAEIIQ	NALKLHSGVN	KALANHD---
<i>S. cerevisiae</i>	-----L	SDIKGLVSLW	VQEALERSR	QLPGNATLDW	QLIKFNAVPK	LVSVPIMIP	G-MPLEHLQL
<i>S. paradoxus</i>	-----L	SDIKGLVSLW	VQEALERSR	QLPGNATLDW	QLIKFNAVPK	LVSVPIMIP	G-MPLEHLQL
<i>S. mikatae</i>	-----L	LDIKGMVSLW	VQEALERSR	QLPGNATLDW	QLIKFNAVPK	LVSVPIMIP	G-MPLEHLQL
<i>S. bayanus</i>	-----L	SEIKGSVSLW	VQEALERSR	QLPSNATLDW	QLIKFNAVPK	LVSVPIMIP	G-MPLEHLQL
<i>K. lactis</i>	-----L	DTIKPQVSIW	VDEALTARAK	QIPSNITLDW	ELIKFNEVPK	LVSTQAMMIP	G-RPVELIQL
<i>S. kluyveri</i>	-----L	NPVKPKISLW	VDEALSARVQ	QLPKNFQLDW	QLVKFNQIPK	LVSVPAMMIP	G-RPLEHIQL
<i>C. glabrata</i>	-----V	EKLKPEVSVW	VEEALNARSK	QIPDNVKLDW	QLLKFNVDVPK	LISIQPMIIP	G-RPLEHIQL
<i>C. albicans</i>	QLKAKASLLR	RKLDHSCGKH	LIESLSARS	SFPEDSKLNW	ELKSIQNNPK	VVLFNIIPDA	D-GIACFVQF
<i>A. gossypii</i>	-----L	EAAQPLVSIW	VQEALERSR	QLPKRVEMEW	DLVKFNGVPK	LVAVQPIMLP	G-QPLEMLQL
<i>N. crassa</i>	G-----DA	EMLEKIVDSY	LYVPLAVNIE	QRPKGRCTCTW	ELVRYNKEPR	IVSHKIFPLQ	GTKDKLLWQV
<i>S. pombe</i>	-----L	QLEELCTLR	TAQILKQOAL	NQPK---CIN	KLEKHISKPK	LLNLSRAQAD	LKGEFFVQA
<i>S. cerevisiae</i>	VYKFDTKQRL	IKVNQ-QTKK	TETLDRDVVD	YIAFLCDATT	NDMILMGSLF	ESKPNDKLPK	SYEDDAKVAI
<i>S. paradoxus</i>	VYKFDTKQRL	IKVNQ-QTKK	SEILDRDVVD	YIAFLCDATT	NDVILMGSLF	ESKPNDKLPK	SYEDDAKVAI
<i>S. mikatae</i>	VYKFDTKQRL	IKVNQ-QTKK	SEILDRDVVD	YIAFLCDATT	NDMVLMGSLF	ESKPNDKLPK	NYEDDTKTAI
<i>S. bayanus</i>	IYKLDTRQRL	IKVNQ-QTKK	SETLDRDVVD	YVAFLCDATT	NDMILMGSVF	ENKPNKLPK	SYEDDTKVAI
<i>K. lactis</i>	IYKFDTKQRL	IKFDK-KKSK	TDKLDRDVID	YIAFLCDAST	NDILLTGSVF	ESAPDAKLPK	DSETSNQIVI
<i>S. kluyveri</i>	IYKFNTKQQL	IKLNR-QTNK	TDKLDLDRVVD	YVAFLCDATT	DDLILIGSIF	ESKPGAKLPK	NYEDNMQLAI
<i>C. glabrata</i>	LYRFNTKQRL	VKLNK-TNNK	VEKLDLDRVVD	YVAFLCDATT	NDLILMGSVF	ESKPDAKLPK	NYDDNTEKAV
<i>C. albicans</i>	ILKLNKTKKI	SIVKD-Q-KV	VKEQESSVED	YLVYSMNPIS	KELLLVGLKF	ESDHIRGLPK	EMDVFQDKLM
<i>A. gossypii</i>	VYRFDTRQRL	IKVER-GSSE	AEKLDLDRVVD	HVAFLCDAST	DEMMLVGTVF	EAAPDAKLP-	TTEASSEETI
<i>N. crassa</i>	TVSIASRQRV	VEHERGRVVP	GSEKELDIVE	NVIGTMISN	ETWATQNAWK	IISTVQPMTP	EKWEREQETV
<i>S. pombe</i>	VVRLHTLQSL	RTDKG----S	PKIEKPDIEI	VVIQQRSWTS	PIRWQLWGSV	ESTPVNTVRK	TLPDQGVTFV
<i>S. cerevisiae</i>	HR-MKVNGDI	YRLPPS----	----				Protein aus <i>S. cerevisiae</i> : 278 Aminosäuren
<i>S. paradoxus</i>	HR-MKVNGDI	YRLPPS----	----				Protein aus <i>S. paradoxus</i> : 278 Aminosäuren
<i>S. mikatae</i>	RR-MKMNGDI	YRLPPN----	----				Protein aus <i>S. mikatae</i> : 278 Aminosäuren
<i>S. bayanus</i>	HR-MKVNGDI	YRLPSN----	----				Protein aus <i>S. bayanus</i> : 278 Aminosäuren
<i>K. lactis</i>	ER-MKVNGDL	FRVQPPVKKD	----				Protein aus <i>K. lactis</i> : 270 Aminosäuren
<i>S. kluyveri</i>	ER-MKTNGDI	YRVPPQKQLE	----				Protein aus <i>S. kluyveri</i> : 278 Aminosäuren
<i>C. glabrata</i>	RR-MKECGDI	YRVPSSENPF	QITN				Protein aus <i>C. glabrata</i> : 284 Aminosäuren
<i>C. albicans</i>	QRFLKTSDDI	YRTDPKQTK-	----				Protein aus <i>C. albicans</i> : 291 Aminosäuren
<i>A. gossypii</i>	QQ-MRITCGDI	YRSPPALKQQ	A----				Protein aus <i>A. gossypii</i> : 268 Aminosäuren
<i>N. crassa</i>	KLLAEAGAGS	S-----	----				Protein aus <i>N. crassa</i> : 281 Aminosäuren
<i>S. pombe</i>	AKPSKKSFLK	QLFSGKE---	----				Protein aus <i>S. pombe</i> : 269 Aminosäuren

Abb. 8.6: Aminosäuresequenzvergleich von Mba1-Proteinen aus unterschiedlichen Spezies.

Gezeigt ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mba1-Proteinen aus *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *K. lactis*, *S. kluyveri*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *A. gossypii*, *N. crassa* und *S. pombe*. Identische, d. h. hoch konservierte Aminosäuren sind mit Gelb hinterlegt. Dieser Sequenzvergleich wurde mit dem webbasierten Programm „ClustalW“ des SIB ExPASy Bioinformatics Resources Portal erstellt (Tab. 3.13).

8.5 Größenstandard für DNS

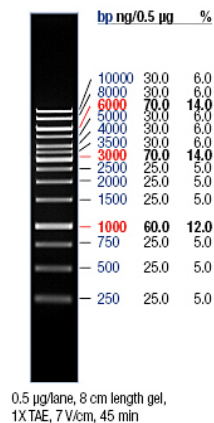


Abb. 8.7: Verwendeter DNS-Größenstandard.

Für die Ermittlung der Längen von DNS-Fragmenten wurde der Größenstandard „Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder“ (250 Bp - 10000 Bp) von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) auf Agarosegelen mitgeführt.

8.6 PCR-Produkt für die Deletion von MDM10 im Hefe-Genom zur Erzeugung vergrößerter Mitochondrien

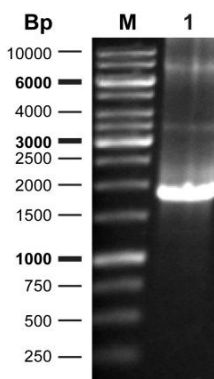


Abb. 8.8: *MDM10*-Knockout-Konstrukt für die Erzeugung von Mitochondrien mit einem vergrößerten Durchmesser.

Um vergrößerte Mitochondrien zu erzeugen, wurde *MDM10* vollständig aus dem Zielgenom entfernt. Dazu wurde ein Produkt mittels PCR amplifiziert, das die *natMX*-Resistenzkassette und homologe *MDM10*-flankierende Bereiche enthielt. Als PCR-Matrize wurde das Plasmid pCR2.1-TOPO-*MDM10*-Knockout verwendet. Unter Anwendung der Primer *MDM10*-Knockout_vorwärts und *MDM10*-Knock-out_rückwärts wurde ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 1800 Bp erzeugt (siehe schwarzer Pfeil auf dem links gezeigten Agarosegel).

8.7 Genetische Verifikation von Gendeletionen im Hefe-Genom sowie von erstellten Expressionsplasmiden

8.7.1 Nachweis der Deletion von *MBA1*, *OXA1* bzw. *PNT1* im $\Delta mba1$ -, $\Delta oxa1$ - bzw. $\Delta pnt1$ -Stamm der *YKODC*

Die Deletionen von *MBA1*, *OXA1* und *PNT1* in den Genomen der *YKODC*-Stämme wurden mittels PCR und Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Als PCR-Matrize diente jeweils die chromosomale DNS des entsprechenden Stamms. Für die Analyse der *MBA1*-Deletion wurden die Primerpaare *MBA1_A* und *MBA1_D*, *MBA1_A* und *Kan_B* sowie *Kan_C* und *MBA1_D* verwendet. Die Überprüfung der *OXA1*-Deletion erfolgte mit den Primerpaaren *OXA1_A* und *OXA1_D*, *OXA1_A* und *Kan_B* sowie *Kan_C* und *OXA1_D*. Die Primerpaare *PNT1_A* und *PNT1_D*, *PNT1_A* und *Kan_B* sowie *Kan_C* und *PNT1_D* dienten der Überprüfung der *PNT1*-Deletion. Alle durchgeführten Deletionen konnten erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 8.9).

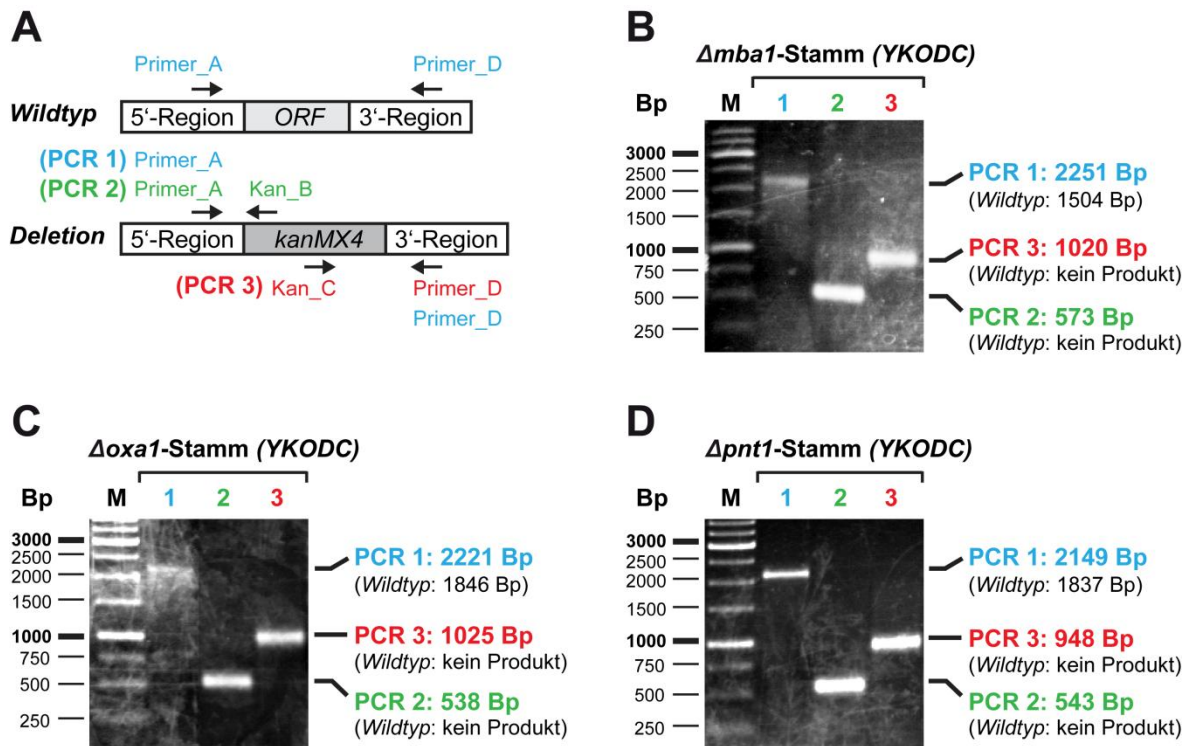


Abb. 8.9: Überprüfung der YKODC-Stämme auf Deletion von *MBA1*, *OXA1* und *PNT1*.

(A) Schematische Darstellung der Primer-Bindestellen. (B, C, D) Agarosegele zur Analyse der PCR-Ergebnisse mit der genomischen DNS der Stämme $\Delta mba1$ (YKODC) (B), $\Delta oxa1$ (YKODC) (C) und $\Delta pnt1$ (YKODC) (D). Als Primerpaare wurden jeweils Primer_A und Primer_D (Spur 1), Primer_A und Kan_B (Spur 2) sowie Kan_C und Primer_D (Spur 3) eingesetzt. Die erwarteten Produktgrößen für die erfolgreiche Deletion und den Fall, dass das Zielgen nicht deletiert ist, sind jeweils in den Abbildungen vermerkt (siehe Angaben in Klammern).

8.7.2 Nachweis der *MBA1*-Deletion im $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741)

Die genetische Verifikation der genomischen *MBA1*-Deletion erfolgte mittels PCR auf der chromosomalen DNS des $\Delta mba1$ -Stamms (BY4741) und anschließender Agarosegel-Elektrophorese. *MBA1* wurde erfolgreich gegen die *kanMX4*-Resistenzkassette ausgetauscht (Abb. 8.10).

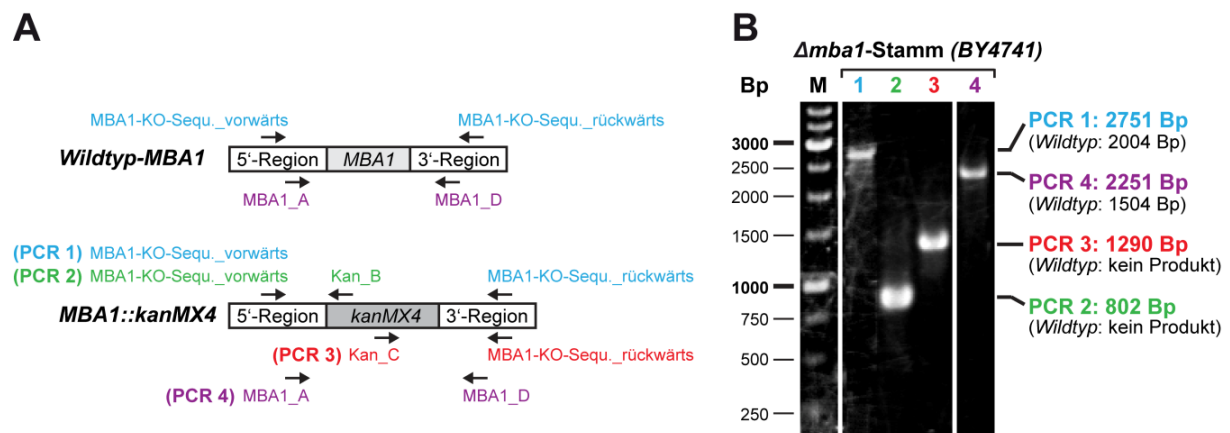


Abb. 8.10: Überprüfung des $\Delta mba1$ -Stamms (BY4741) auf *MBA1*-Deletion.

(A) Schematische Darstellung der Primer-Bindestellen. (B) Agarosegel zur Analyse der PCR-Ergebnisse. Als Primerpaare wurden MBA1-KO-Sequ._vorwärts und MBA1-KO-Sequ._rückwärts (Spur 1), MBA1-KO-Sequ._vorwärts und Kan_B (Spur 2), Kan_C und MBA1-KO-Sequ._rückwärts (Spur 3) sowie MBA1_A und MBA1_D (Spur 4) eingesetzt. Die erwarteten Produktgrößen für die erfolgreiche *MBA1*-Deletion und den Fall, dass *MBA1* nicht deletiert ist, sind jeweils in der Abbildung vermerkt (siehe Angaben in Klammern).

8.7.3 Nachweis der *OXA1*-Deletion in den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen

Die *OXA1*-Deletion wurde in den Genomen der für SILAC-Analysen verwendeten Hefestämme mittels PCR und anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Als PCR-Matrize diente die chromosomale DNS des $\Delta oxa1$ -Stamms (für SILAC), der ein *OXA1-FLAG*- bzw. *oxa1-W128F-FLAG*-Plasmid enthält. Die *OXA1*-Deletion konnte erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 8.11).

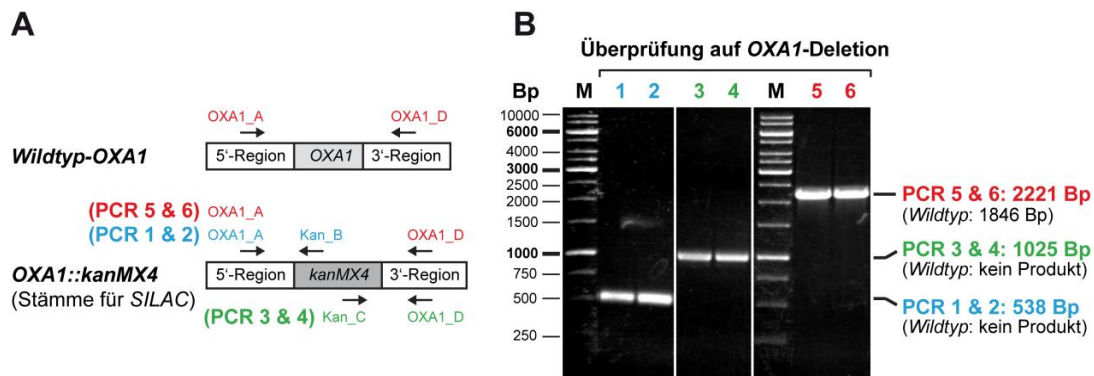


Abb. 8.11: Überprüfung der für SILAC-Analysen erstellten Stämme auf *OXA1*-Deletion.

(A) Schematische Darstellung der Primer-Bindestellen. (B) Agarosegel zur Analyse der PCR-Ergebnisse für den *OXA1-FLAG*- (Spuren 1, 3, 5) bzw. den *oxa1-W128F-FLAG*-Stamm (für SILAC) (Spuren 2, 4, 6). Als Primerpaare wurden *OXA1_A* und *Kan_B* (Spuren 1, 2), *Kan_C* und *OXA1_D* (Spuren 3, 4) sowie *OXA1_A* und *OXA1_D* (Spuren 5, 6) eingesetzt. Die erwarteten Produktgrößen für die erfolgreiche *OXA1*-Deletion und den Fall, dass *OXA1* nicht deletiert ist, sind jeweils in der Abbildung vermerkt (siehe Angaben in Klammern).

8.7.4 Nachweis der für eine *OXA1-FLAG*-Variante kodierenden Plasmide in den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen

Der Nachweis der Expressionsplasmide, die für eine *OXA1-FLAG*-Variante kodieren, erfolgte mittels PCR auf der chromosomalen DNS der für SILAC erstellten Stämme und Agarosegel-Elektrophorese. Die für *OXA1-FLAG* bzw. *oxa1-W128F-FLAG* kodierenden Expressionsplasmide wurden in den für SILAC-Analysen verwendeten Stämmen nachgewiesen (Abb. 8.12).

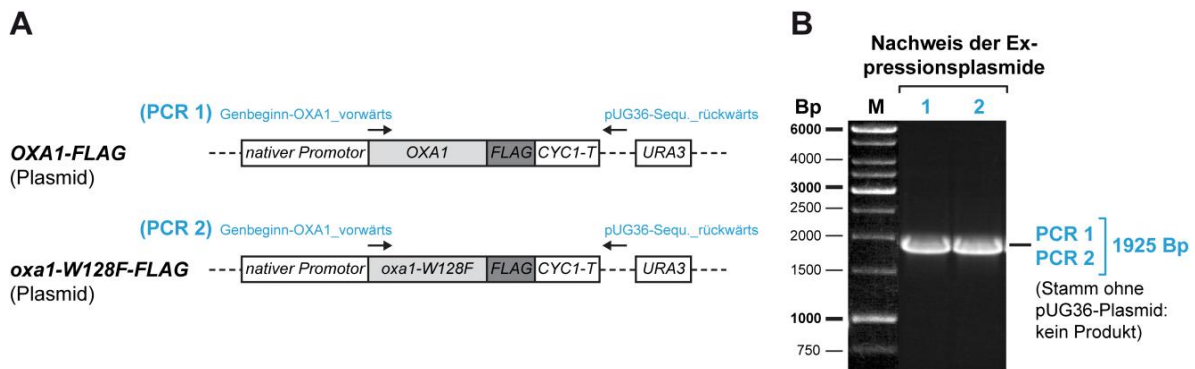


Abb. 8.12: Überprüfung der für SILAC-Analysen erstellten Stämme auf Expressionsplasmide.

(A) Schematische Darstellung der Primer-Bindestellen auf den Expressionsplasmiden. (B) Agarosegel zur Analyse der PCR-Ergebnisse für den *OXA1-FLAG*-Stamm (Spur 1) sowie den *oxa1-W128F-FLAG*-Stamm (für SILAC) (Spur 2). Als Primerpaar wurde *Genbeginn-OXA1_vorwärts* und *pUG36-Sequ._rückwärts* (Spuren 1, 2) eingesetzt. Die erwartete Produktgröße beträgt 1925 Bp.

8.7.5 Nachweis der ARG4-Deletion in den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen

Der Nachweis der ARG4-Deletion in den Genomen der für SILAC-Analysen erzeugten Stämme erfolgte mittels PCR und Agarosegel-Elektrophorese. Als PCR-Matrize diente die chromosomale DNS des Δ oxa1-Stamms (für SILAC) mit OXA1-FLAG- bzw. oxa1-W128F-Plasmid, die des Wildtyps BY4741 WT, die des Δ arg4-Stamms (YKODC) sowie die des Δ arg4-Stamms (YKODC NatR). Die Δ arg4-Stämme dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle für den Nachweis der Resistenzkassetten natMX bzw. kanMX4. In den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen wurde nachgewiesen, dass ARG4 erfolgreich gegen die natMX-Kassette ausgetauscht wurde (Abb. 8.13).

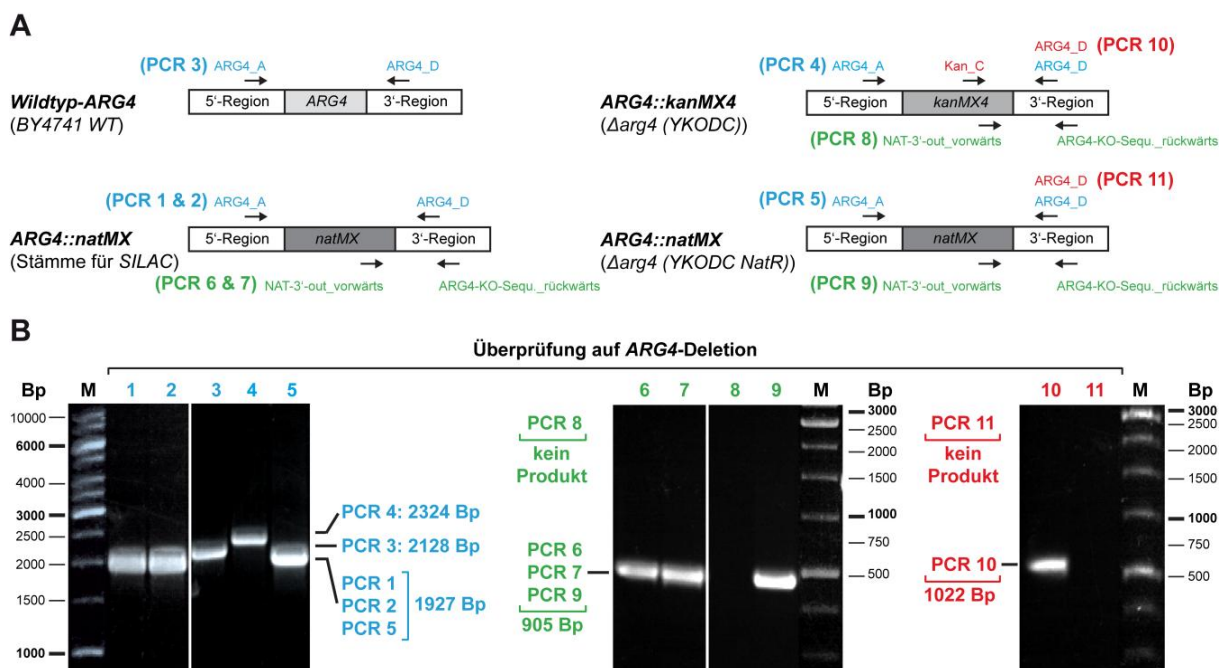


Abb. 8.13: Überprüfung der für SILAC-Analysen erstellten Stämme auf ARG4-Deletion.

(A) Schematische Darstellung der Primer-Bindestellen. (B) Agarosegele zur Analyse der PCR-Ergebnisse: OXA1-FLAG- (Spuren 1, 6) bzw. oxa1-W128F-FLAG-Stamm (für SILAC) (Spuren 2, 7), Wildtypstamm BY4741 WT (Spur 3), Δ arg4-Stamm (YKODC) (Spuren 4, 8, 10) und Δ arg4-Stamm (YKODC NatR) (Spuren 5, 9, 11). Als Primerpaare wurden ARG4_A und ARG4_D (Spuren 1 - 5), NAT-3'-out_vorwärts und ARG4-KO-Sequ._rückwärts (Spuren 6 - 9) sowie Kan_C und ARG4_D (Spuren 10, 11) eingesetzt. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte für den Nachweis der ARG4-Deletion (Spuren 1 - 5) und die Überprüfung der Resistenzkassetten natMX (Spuren 6 - 9) und kanMX4 (Spuren 10, 11) sind in den Abbildungen vermerkt.

8.7.6 Nachweis der LYS2-Deletion in den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen

Die genetische Verifikation der Deletion von LYS2 in den Genomen der für SILAC-Analysen erzeugten Hefestämme erfolgte mittels PCR und anschließender Agarosegel-Elektrophorese. Als PCR-Matrize diente die chromosomale DNS des Δ oxa1-Stamms (für SILAC) mit OXA1-FLAG- bzw. mit oxa1-W128F-Plasmid sowie die der Wildtypstämme BY4741 WT und BY4742 WT, die als Positiv- bzw. Negativkontrolle für LYS2 mitgeführt wurden. Die LYS2-Deletion konnte in den für SILAC-Analysen erstellten Stämmen nachgewiesen werden (Abb. 8.14).

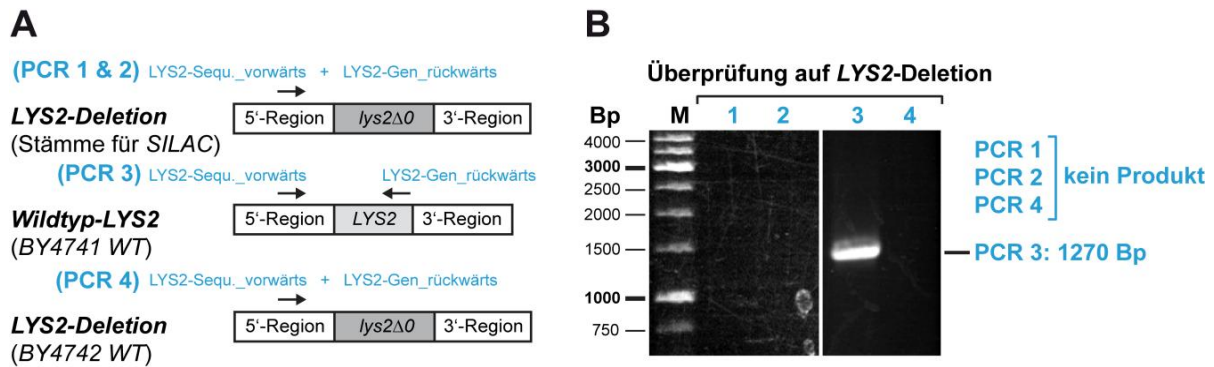


Abb. 8.14: Überprüfung der für SILAC-Analysen erstellten Stämme auf LYS2-Deletion.

(A) Schematische Darstellung der Primer-Bindestellen. (B) Agarosegel zur Analyse der PCR-Ergebnisse. Als Primerpaar wurde LYS2-Sequ_vorwärts und LYS2-Gen_rückwärts (Spuren 1, 2, 3, 4) eingesetzt. Für den OXA1-FLAG- (Spur 1) bzw. den *oxa1-W128F-FLAG*-Stamm (für SILAC) (Spur 2) sowie den als Negativkontrolle verwendeten Wildtyp BY4742 WT (Spur 4) wurde kein PCR-Produkt erwartet. Als Positivkontrolle kam der Wildtyp BY4741 WT (Spur 3) zum Einsatz. Die erwartete Produktgröße beträgt 1270 Bp.

8.8 Überprüfung der für SILAC-Analysen erstellten Hefestämme mittels Wachstumstest

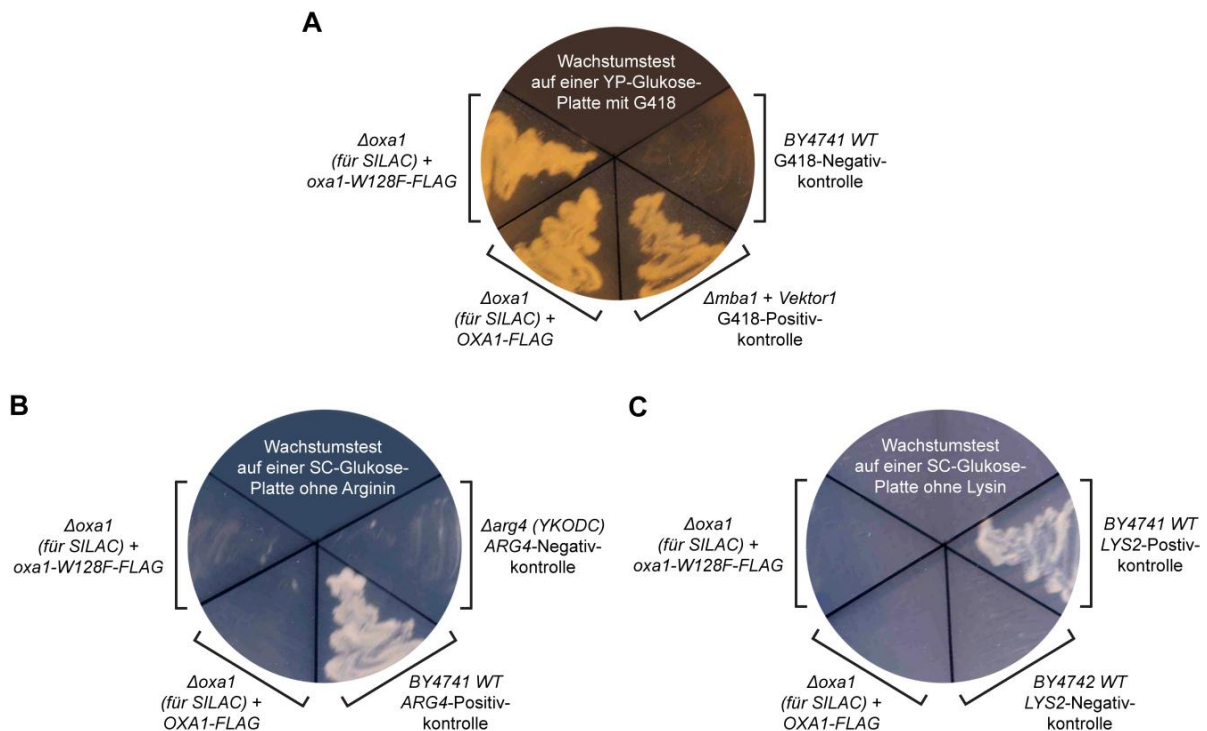


Abb. 8.15: Überprüfung der für SILAC-Analysen erstellten Stämme auf die Deletion von OXA1, ARG4 und LYS2 mit Hilfe eines Wachstumstests auf Selektivmediumagarplatten.

Die für SILAC verwendeten $\Delta oxa1$ -Stämme (für SILAC), die OXA1-FLAG oder *oxa1-W128F-FLAG* von einem Plasmid exprimierten, wurden auf Selektivmediumagarplatten ausgestrichen, um die genomische Deletion von OXA1, ARG4 und LYS2 zu überprüfen. (A) Der Wachstumstest auf einer G418-enthaltenden YP-Glukose-Platte zeigt, dass die für SILAC-Analysen erstellten Stämme eine *kanMX4*-Kassette besitzen. Das deutet daraufhin, dass die genomische OXA1-Kopie mit der *kanMX4*-Kassette ersetzt wurde. Als Positivkontrolle diente der den Vektor1 tragende $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) und als Negativkontrolle der Wildtyp BY4741 WT. (B) Der Wachstumstest auf einer SC-Glukose-Platte ohne Arginin zeigt, dass die für SILAC-Analysen erstellten Stämme die genomische ARG4-Deletion tragen, wobei der Wildtyp BY4741 WT als Positiv- und der $\Delta arg4$ -Stamm der YKODC als Negativkontrolle diente. (C) Der Wachstumstest auf einer SC-Glukose-Platte ohne Lysin zeigt, dass die für SILAC-Analysen erstellten Stämme die genomische LYS2-Deletion tragen, wobei der Wildtyp BY4741 WT als Positiv- und der Wildtyp BY4742 WT als Negativkontrolle fungierte.

8.9 Streudiagramme der SILAC-basierten Vorwärts- und Rückwärtsanalyse (LC-MS/MS)

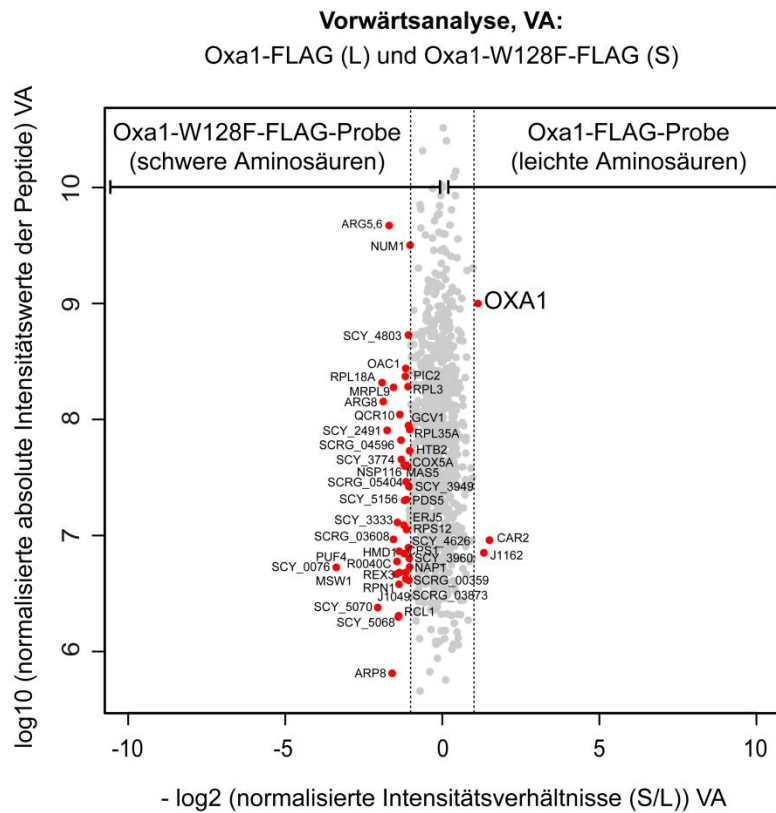


Abb. 8.16: SILAC-basierte Vorwärtsanalyse (LC-MS/MS) zur Untersuchung von Oxa1-enthaltenden Komplexen.

Die Rohdaten der Vorwärtsanalyse (VA) (Oxa1-FLAG (L), Oxa1-W128F-FLAG (S)) wurden mit dem Programm MaxQuant sowie UniProt prozessiert und in die Software R importiert. Im Diagramm sind die normalisierten Werte der Intensitätsverhältnisse (S/L) von schwer markiertem Peptid (S) zu leicht markiertem Peptid (L) (x-Achse, log₂-Skala) gegen die zugehörigen normalisierten, absoluten Intensitätswerte der Peptide (y-Achse, log₁₀-Skala) aufgetragen. Die normalisierten Werte der Intensitätsverhältnisse (S/L) wurden für die grafische Darstellung invertiert. Unter den als Treffern identifizierten Proteinen (rote Punkte; S/L > 1) befindet sich Oxa1. Weitere identifizierte Proteine (graue Punkte; S/L < 1) sind dem Hintergrund zuzuordnen.

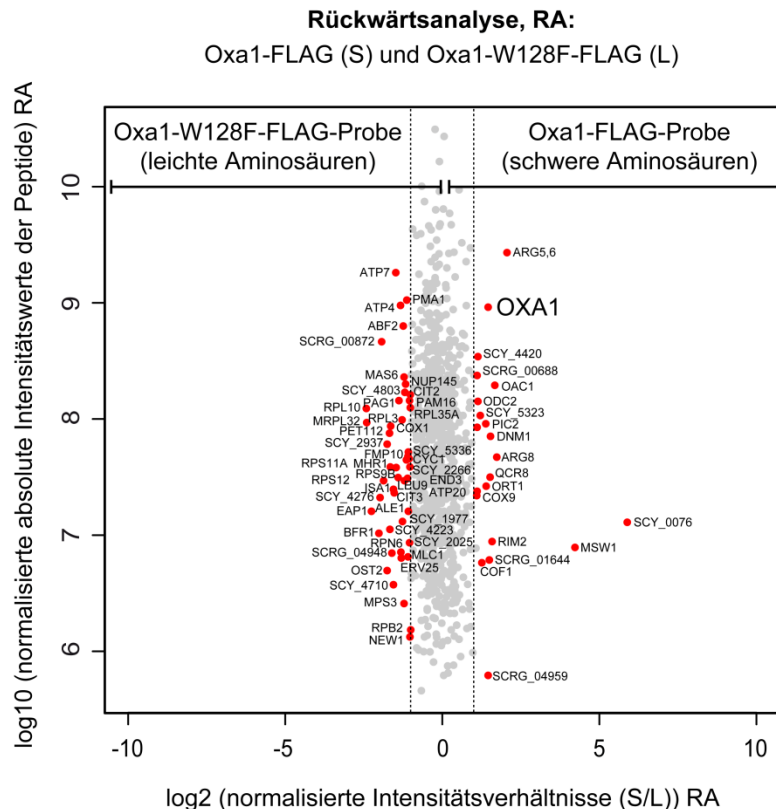


Abb. 8.17: SILAC-basierte Rückwärtsanalyse (LC-MS/MS) zur Untersuchung von Oxa1-enthaltenden Komplexen.

Die Rohdaten der Rückwärtsanalyse (RA) (Oxa1-FLAG (S), Oxa1-W128F-FLAG (L)) wurden mit dem Programm MaxQuant sowie UniProt prozessiert und in die Software R importiert. Im Diagramm sind die normalisierten Werte der Intensitätsverhältnisse (S/L) von schwer markiertem Peptid (S) zu leicht markiertem Peptid (L) (x-Achse, log₂-Skala) gegen die zugehörigen normalisierten, absoluten Intensitätswerte der Peptide (y-Achse, log₁₀-Skala) aufgetragen. Unter den als Treffern identifizierten Proteinen (rote Punkte; S/L > 1) befindet sich Oxa1. Weitere identifizierte Proteine (graue Punkte; S/L < 1) sind dem Hintergrund zuzuordnen.

8.10 Größenstandards für Proteine

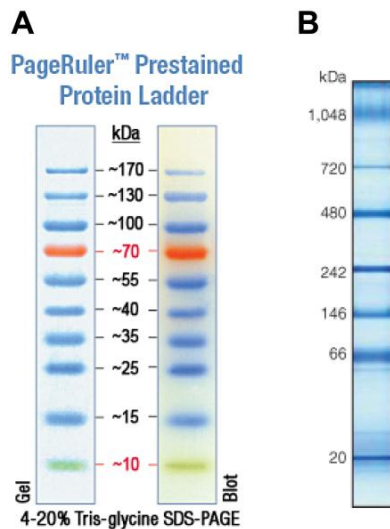


Abb. 8.18: Verwendete Größenstandards für Proteine.

(A) Für die Ermittlung der Molekulargewichte von Proteinen, die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, wurde der Größenstandard „Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder“ (10 kDa - 170 kDa) von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) mitgeführt. (B) Für die Größenerkennung nativer Proteinkomplexe, die mit Hilfe der „NativePAGE 4–16% Bis-Tris Gel“ aufgetrennt wurden, diente der „Native Mark™ unstained Protein Standard“ (20 kDa - 1048 kDa) von Novex (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) als Größenstandard.

8.11 Weitere Informationen und Western-Analysen zur Charakterisierung von Fusionsproteinen

Tab. 8.2: Molekulargewichte der GFP-Fusionsproteine

Protein	Molekulargewicht ¹	Molekulargewicht mit GFP ²	Protein	Molekulargewicht ¹	Molekulargewicht mit GFP ²
Oxa1	40,1 kDa	66,8 kDa	Mba1-P277A	27,9 kDa	54,7 kDa
Oxa1-W128F	40,1 kDa	66,8 kDa	Mba1-P276A	27,9 kDa	54,7 kDa
Pnt1	48,9 kDa	75,7 kDa	Mba1-L275A	27,9 kDa	54,7 kDa
Mba1	27,9 kDa	54,7 kDa	Mba1-R274A	27,8 kDa	54,6 kDa
Mba1 ¹⁻²⁷⁷	27,8 kDa	54,6 kDa	Mba1-Y273A	27,8 kDa	54,6 kDa
Mba1 ¹⁻²⁷⁶	27,7 kDa	54,5 kDa	Mba1-I272A	27,9 kDa	54,7 kDa
Mba1 ¹⁻²⁷⁵	27,6 kDa	54,4 kDa	Mba1-D271A	27,9 kDa	54,7 kDa
Mba1 ¹⁻²⁷⁴	27,5 kDa	54,3 kDa	Mba1-G270A	27,9 kDa	54,7 kDa
Mba1 ¹⁻²⁷³	27,36 kDa	54,16 kDa	Mba1-N269A	27,9 kDa	54,7 kDa
Mba1 ¹⁻²⁷²	27,2 kDa	54,0 kDa	Mba1-V268A	27,9 kDa	54,7 kDa
Mba1-S278A	27,9 kDa	54,7 kDa	Mba1-M266A	27,85 kDa	54,65 kDa

(¹) nach Aminosäuresequenz berechnetes Molekulargewicht des maturierten Proteins ohne Präsequenz (falls bekannt); (²) Molekulargewicht von GFP = 26,8 kDa

Tab. 8.3: Molekulargewichte der FLAG-Fusionsproteine

Protein	Molekulargewicht ¹	Molekulargewicht mit FLAG ²	Protein	Molekulargewicht ¹	Molekulargewicht mit FLAG ²
Oxa1	40,1 kDa	41,1 kDa	Mba1 ¹⁻²⁷⁵	27,6 kDa	28,6 kDa
Oxa1-W128F	40,1 kDa	41,1 kDa	Mba1 ¹⁻²⁷³	27,36 kDa	28,36 kDa
Mba1	27,9 kDa	28,9 kDa	Mba1-I272A	27,9 kDa	28,9 kDa

(¹) nach Aminosäuresequenz berechnetes Molekulargewicht des maturierten Proteins ohne Präsequenz (falls bekannt); (²) Molekulargewicht von FLAG = ~ 1 kDa

Tab. 8.4: Molekulargewichte der unmarkierten Proteine

Protein	Aminosäuren	Molekulargewicht ¹	Molekulargewicht ²	Referenz
Atp1	545	58,6 kDa	~ 58 kDa	(Takeda <i>et al.</i> , 1986)
Cyc1	109	12,2 kDa	~ 13 kDa	(Gonzales & Neupert, 1990; Roucou <i>et al.</i> , 2000)
Mba1	278	31,8 kDa	~ 28 kDa	(Rep & Grivell, 1996; Preuss, 2004)
Mdm38	573	65,0 kDa	~ 65 kDa	(Nowikovsky <i>et al.</i> , 2004; Froschauer <i>et al.</i> , 2005)
Mrpl4	319	37,0 kDa	~ 35 kDa	(Graack <i>et al.</i> , 1995)
Mrpl32	183	21,4 kDa	~ 15 kDa	(Kitakawa & Isono, 1991; Graack & Wittmann-Liebold, 1998)
Oxa1	402	44,8 kDa	~ 40 kDa	(Herrmann <i>et al.</i> , 1997; Kermorgant <i>et al.</i> , 1997)
Tim50	476	55,1 kDa	~ 50 kDa	(Geissler <i>et al.</i> , 2002; Yamamoto <i>et al.</i> , 2002)
Tom20	183	20,3 kDa	~ 20 kDa	(Söllner <i>et al.</i> , 1989; Ramage <i>et al.</i> , 1993)
Ylh47	454	52,2 kDa	~ 47 kDa	(Nowikovsky <i>et al.</i> , 2004; Frazier <i>et al.</i> , 2006)

(¹) nach Aminosäuresequenz berechnetes Molekulargewicht des maturierten Proteins inklusive Präsequenz (falls bekannt); (²) Abschätzung des Molekulargewichts des maturierten Proteins ohne Präsequenz (falls bekannt) durch die Migration im SDS-Polyacrylamidgel

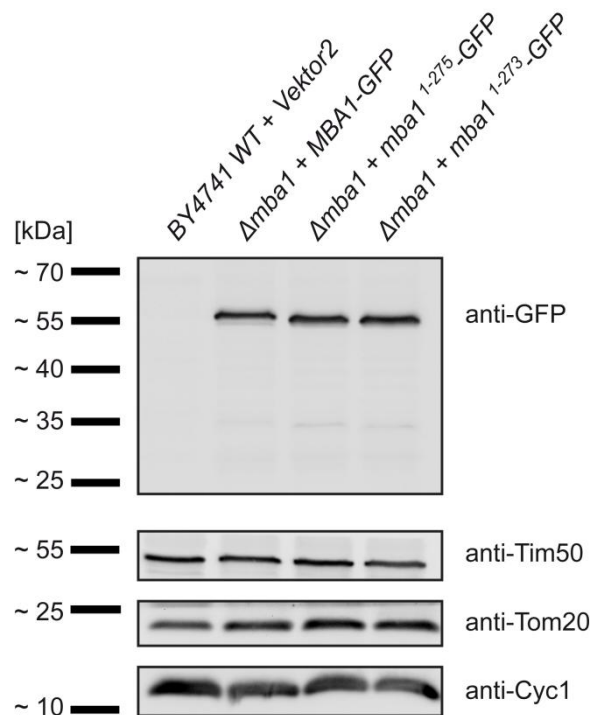


Abb. 8.19: Expression und Stabilität von Mba1¹⁻²⁷⁵-GFP und Mba1¹⁻²⁷³-GFP.

Der Wildtyp *BY4741 WT* mit *Vektor2* und die $\Delta mba1$ -Stämme (*BY4741*) mit *MBA1-GFP*-, mit *mba1*¹⁻²⁷⁵-*GFP*- bzw. mit *mba1*¹⁻²⁷³-*GFP*-Plasmid wurden in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Die Lysate der daraus isolierten Mitochondrien wurden mittels Western-Analyse untersucht. Die GFP-Fusionsproteine zeigen keinen signifikanten Abbau. Die Membran wurde erst mit GFP-Antikörper dekoriert und danach mit Antikörpern gegen Tim50, Tom20 und Cyc1. Anhand der Kontrollantikörper ist zu erkennen, dass vergleichbare Mengen an Mitochondrien auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen wurden und dass diese intakt sind.

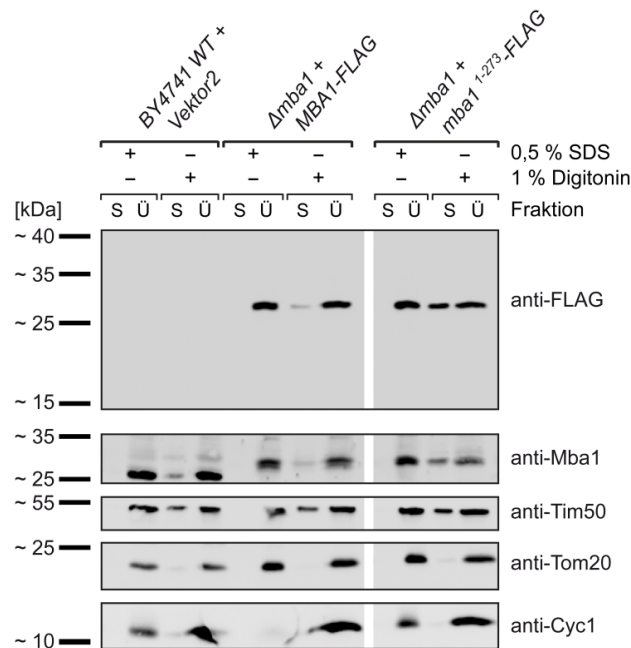


Abb. 8.20: Stabilität von Mba1-FLAG und Mba1¹⁻²⁷³-FLAG unter dem Einfluss von SDS und Digitonin.

Der Wildtyp *BY4741 WT* mit *Vektor2* und die $\Delta mba1$ -Stämme (*BY4741*) mit *MBA1-FLAG*- bzw. *mba1¹⁻²⁷³-FLAG*-Plasmid wurden in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Daraus isolierte Mitochondrien wurden mit SDS (0,5 % (w/v)) bzw. mit Digitonin (1 % (w/v)) solubilisiert. Nach Zentrifugation wurden die Proteine des Sediments (S) und des Überstands (Ü) mittels Western-Analyse untersucht. Die Membran wurde erst mit FLAG-Antikörper und danach mit Antikörpern gegen Mba1, Tim50, Tom20 und Cyc1 dekoriert.

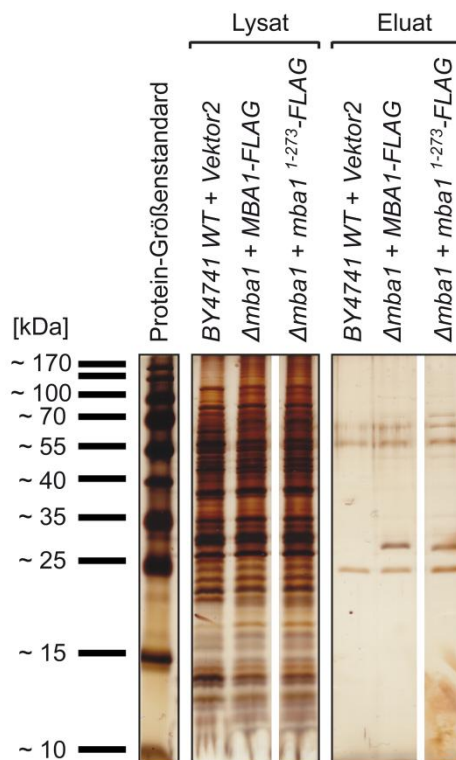


Abb. 8.21: Analyse der Reinheit Koimmunopräzipitationen mit Mba1-FLAG-Varianten.

Aus den in Galaktosemedium bei 30 °C kultivierten Stämmen *BY4741 WT* mit *Vektor2* und $\Delta mba1$ (*BY4741*) mit *MBA1-FLAG*- bzw. *mba1¹⁻²⁷³-FLAG*-Plasmid wurden Mitochondrien isoliert. Nach Solubilisierung mit 1 % (w/v) Digitonin wurden die Proteine mit Anti-FLAG-Agarose gefällt und mittels SDS-PAGE separiert. Anschließend wurde eine Silberfärbung des SDS-Polyacrylamidgels zur Analyse der Reinheit der Koimmunopräzipitationsproben durchgeführt. Von den Lysaten wurden 50 % und den Eluat 100 % aufgetragen.

8.12 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

8.12.1 Einfluss der Mba1-Fusionsproteine auf die Morphologie und die Funktionalität von Mitochondrien

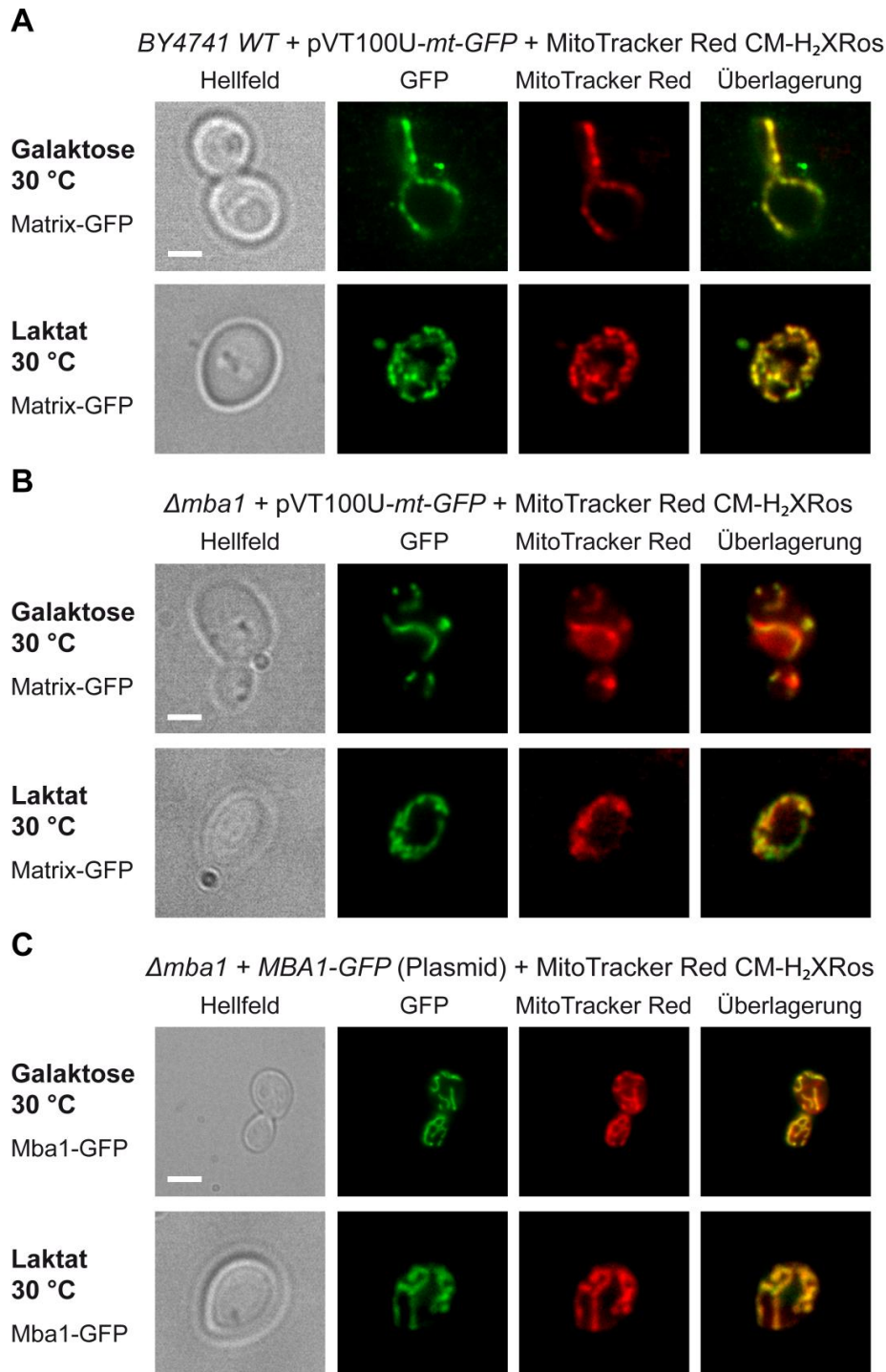


Abb. 8.22: Epifluoreszenzmikroskopische Analyse der mitochondrialen Morphologie unter dem Einfluss der Expression von *MBA1-GFP*.

Die Stämme *BY4741 WT* mit *pVT100U-mt-GFP* (A), Δ *mba1* (*BY4741*) mit *pVT100U-mt-GFP* (B) und Δ *mba1* (*BY4741*) mit *MBA1-GFP*-Plasmid (C) wurden in Galaktose- oder Laktatmedium bei 30 °C kultiviert. Die Expression von *MBA1-GFP* hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie oder das Membranpotential. Von links nach rechts sind das Hellfeldbild, das Fluoreszenzbild für GFP und MitoTracker Red CM-H₂XRos sowie eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale dargestellt. Größenstandard = 10 μ m.

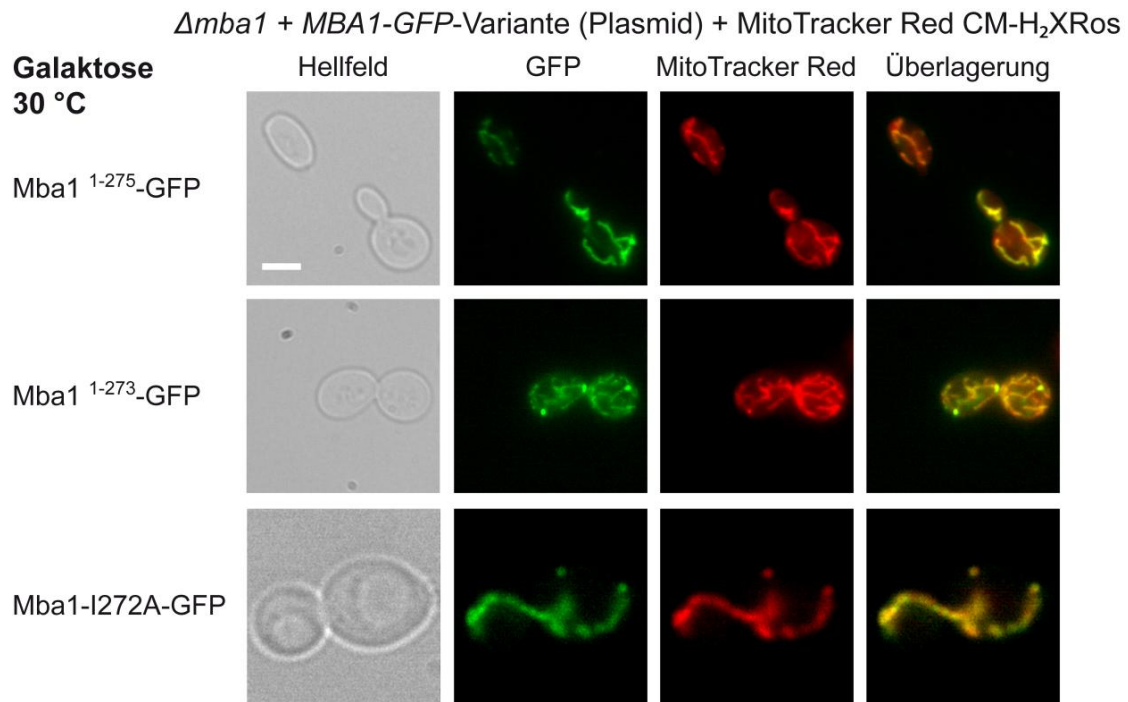


Abb. 8.23: Epifluoreszenzmikroskopische Analyse der mitochondrialen Morphologie unter dem Einfluss der Expression von *mba1*¹⁻²⁷⁵-GFP, *mba1*¹⁻²⁷³-GFP und *mba1*-I272A-GFP.

Der $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) mit *mba1*¹⁻²⁷⁵-GFP-Plasmid, mit *mba1*¹⁻²⁷³-GFP-Plasmid bzw. mit *mba1*-I272A-GFP-Plasmid wurde in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Die Expression der MBA1-GFP-Fusionskonstrukte hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie oder das Membranpotential. Von links nach rechts sind das Hellfeldbild, das Fluoreszenzbild für GFP und MitoTracker Red CM-H₂XRos sowie eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale dargestellt. Größenstandard = 10 μ m.

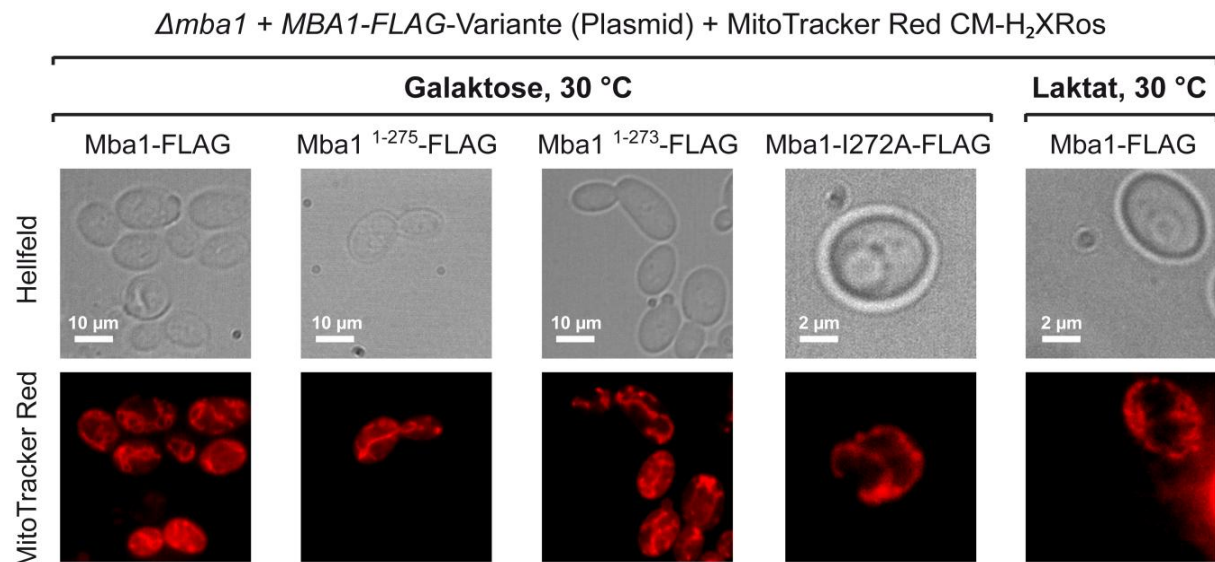


Abb. 8.24: Epifluoreszenzmikroskopische Analyse der mitochondrialen Morphologie unter dem Einfluss der Expression von MBA1-FLAG-Varianten.

$\Delta mba1$ -Hefen (BY4741), die MBA1-FLAG, *mba1*¹⁻²⁷⁵-FLAG, *mba1*¹⁻²⁷³-FLAG oder *mba1*-I272A-FLAG vom Plasmid exprimierten, wurden in Galaktose- oder Laktatmedium bei 30 °C kultiviert. Die Expression der MBA1-FLAG-Fusionskonstrukte hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie oder das Membranpotential. Von links nach rechts sind jeweils das Hellfeldbild, das Fluoreszenzbild für GFP und MitoTracker Red CM-H₂XRos und eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale dargestellt.

8.12.2 Lokalisation von Mba1 in Abhängigkeit von Deletionsmutationen im *MBA1*-Gen in vergrößerten Mitochondrien

Für die Voranalyse der submitochondrialen Lokalisation von Mba1-GFP-Varianten, bei denen Aminosäuren im C-Terminus deletiert waren, wurden $\Delta mba1$ -Hefezellen der *YKODC* verwendet. Die Hefestämme exprimierten *MBA1*¹⁻²⁷⁷-GFP, *MBA1*¹⁻²⁷⁶-GFP, *MBA1*¹⁻²⁷⁵-GFP, *MBA1*¹⁻²⁷⁴-GFP, *MBA1*¹⁻²⁷³-GFP oder *MBA1*¹⁻²⁷²-GFP unter der Kontrolle des nativen *MBA1*-Promotors von einem Plasmid. Über die Deletion von *MDM10* wurden Zellen mit vergrößerten Mitochondrien erzeugt, die auf Agarplatten mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose bei 30 °C kultiviert wurden. Die konfokalmikroskopische *in vivo*-Untersuchung zeigt, dass Mba1¹⁻²⁷⁷-GFP, Mba1¹⁻²⁷⁶-GFP und Mba1¹⁻²⁷⁵-GFP am Rand der genetisch vergrößerten Mitochondrien lokalisieren und Mba1¹⁻²⁷⁴-GFP intermediär. Mba1¹⁻²⁷³-GFP und Mba1¹⁻²⁷²-GFP sind im Inneren der vergrößerten Mitochondrien angereichert (Abb. 8.25).

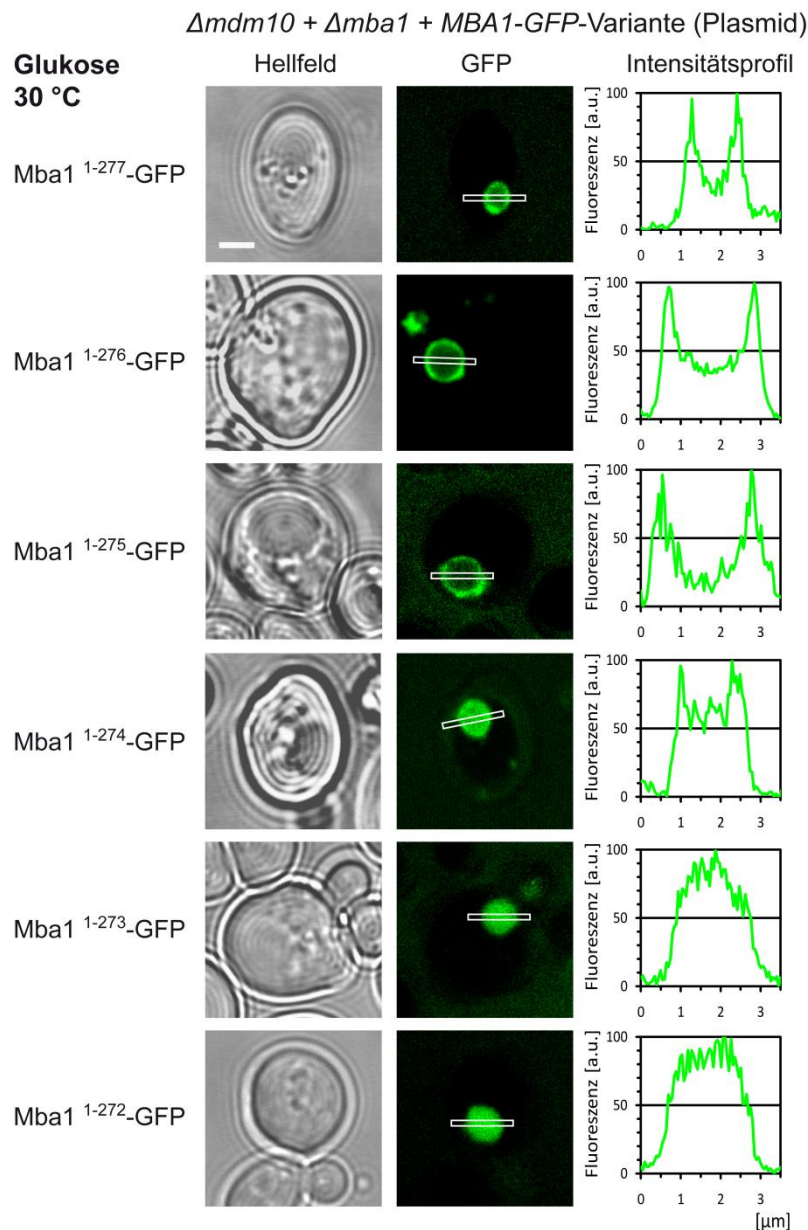


Abb. 8.25: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP-Varianten mit C-terminalen Deletionen in vergrößerten Mitochondrien unter fermentativen Bedingungen.

$\Delta mba1$ -Hefen (*YKODC*), die *mba1*¹⁻²⁷⁷-GFP, *mba1*¹⁻²⁷⁶-GFP, *mba1*¹⁻²⁷⁵-GFP, *mba1*¹⁻²⁷⁴-GFP, *mba1*¹⁻²⁷³-GFP oder *mba1*¹⁻²⁷²-GFP vom Plasmid exprimierten, wurden auf Glukoseplatten bei 30 °C kultiviert. Mba1¹⁻²⁷⁷-GFP, Mba1¹⁻²⁷⁶-GFP und Mba1¹⁻²⁷⁵-GFP lokalisieren am Rand und Mba1¹⁻²⁷⁴-GFP intermediär in vergrößerten Mitochondrien. Mba1¹⁻²⁷³-GFP und Mba1¹⁻²⁷²-GFP sind im Inneren der vergrößerten Mitochondrien angereichert. Von links nach rechts sind jeweils das Hellfeldbild und GFP-Fluoreszenzbild sowie ein Intensitätsprofil des Fluoreszenzsignals dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 μm.

Um die in Abbildung 8.25 beobachteten submitochondrialen Lokalisationen der Mba1-Deletionsvarianten zu überprüfen und gleichzeitig einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die analysierten Hefezellen eine intakte Cristastruktur aufweisen, wurden doppelmarkierte Stämme (*BY4741*) eingesetzt. Diese exprimierten *QCR2-mRFP* direkt vom Genom und die *MBA1-GFP*-Varianten unter der Kontrolle des *nativen MBA1-Promotors* vom Plasmid. *MDM10*-deletierte Zellen mit vergrößerten Mitochondrien wurden auf Agarplatten mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose bei 30 °C kultiviert. Die konfokalmikroskopische Untersuchung zeigt, dass Qcr2-mRFP stets im Inneren der vergrößerten Mitochondrien angereichert ist, was auf eine intakte Cristastruktur der untersuchten Hefezellen hindeutet. Die zuvor beobachteten Proteinverteilungen der Mba1-Deletionsvarianten konnten bestätigt werden (Abb. 4.14, B und Abb. 8.26).

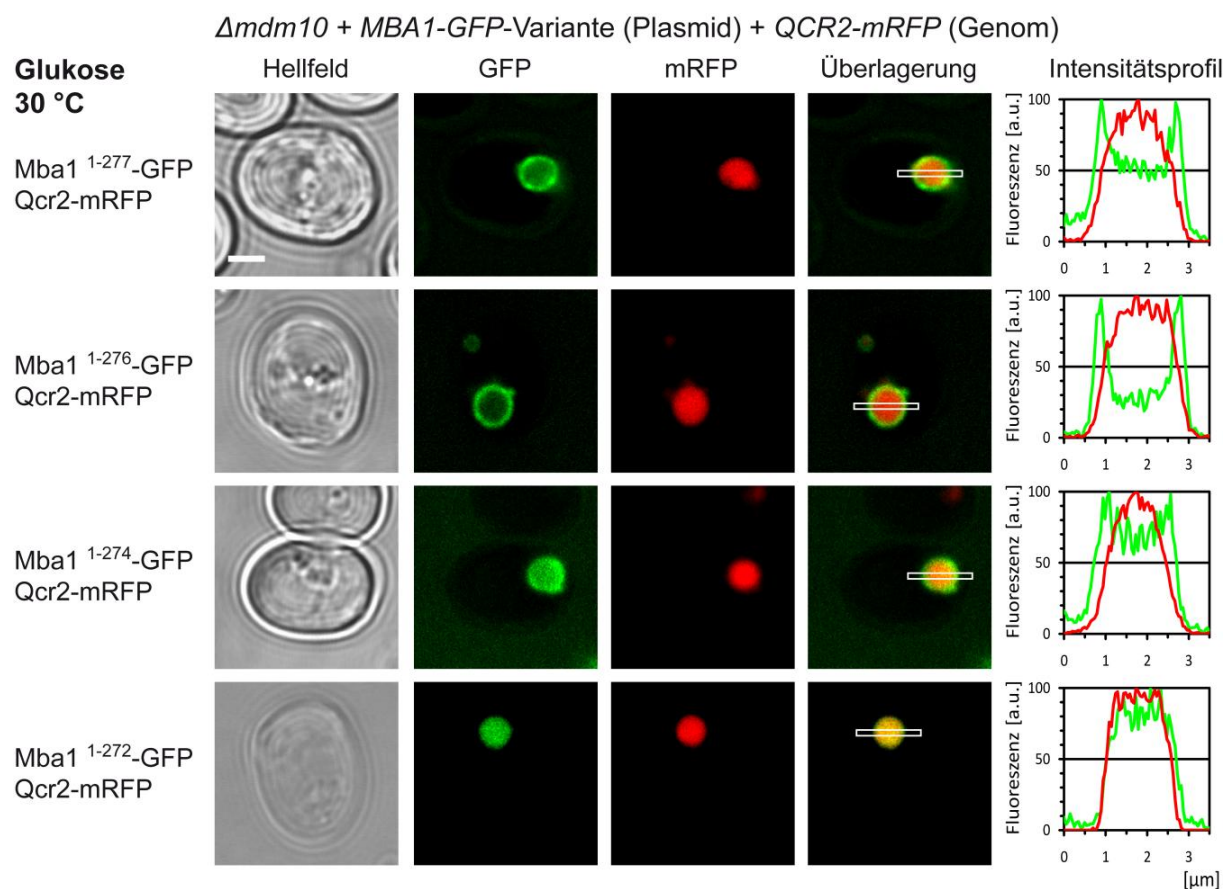


Abb. 8.26: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP-Varianten mit C-terminalen Deletionen in vergrößerten Mitochondrien unter fermentativen Wachstumsbedingungen.

QCR2-mRFP-Hefen (*BY4741*), die *mba1*¹⁻²⁷⁷-GFP, *mba1*¹⁻²⁷⁶-GFP, *mba1*¹⁻²⁷⁴-GFP oder *mba1*¹⁻²⁷²-GFP vom Plasmid exprimierten, wurden auf Glukoseplatten bei 30 °C kultiviert. Mba1¹⁻²⁷⁷-GFP und Mba1¹⁻²⁷⁶-GFP lokalisieren am Rand, Mba1¹⁻²⁷⁴-GFP intermediär und Mba1¹⁻²⁷²-GFP sowie Qcr2-mRFP im Inneren der vergrößerten Mitochondrien. Von links nach rechts sind das Hellfeldbild, das Fluoreszenzbild für GFP und mRFP, eine Überlagerung sowie ein Intensitätsprofil der Fluoreszenzsignale dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 μm.

8.12.3 Lokalisation von Mba1 in Abhängigkeit von Substitutionsmutationen im *MBA1*-Gen in vergrößerten Mitochondrien

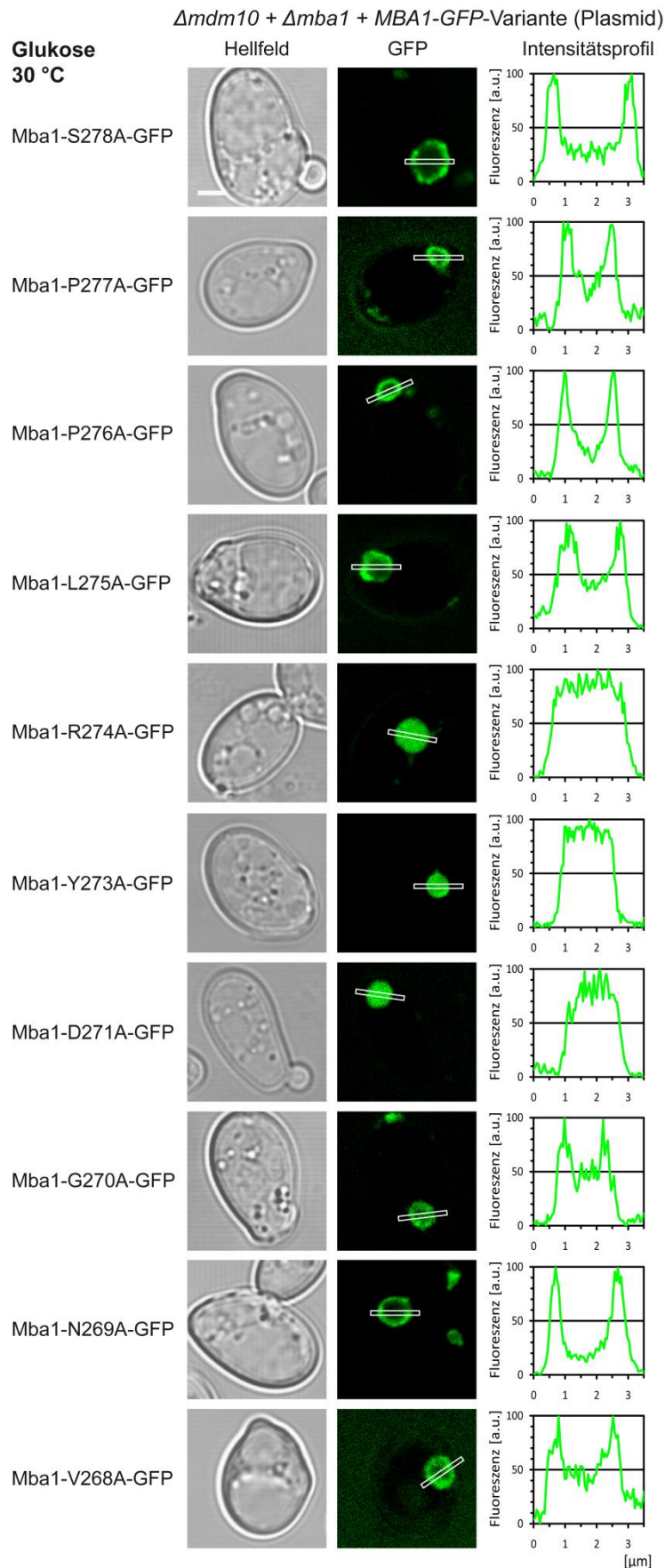


Abb. 8.27: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP-Varianten mit C-terminalen Substitutionen in vergrößerten Mitochondrien unter fermentativen Wachstumsbedingungen.

Δmba1-Hefen (BY4741), die *mba1-S278A-GFP*, *mba1-P277A-GFP*, *mba1-P276A-GFP*, *mba1-L275A-GFP*, *mba1-R274A-GFP*, *mba1-Y273A-GFP*, *mba1-D271A-GFP*, *mba1-G270A-GFP*, *mba1-N269A-GFP* oder *mba1-V268A-GFP* vom Plasmid exprimierten, wurden auf Glukoseplatten bei 30 °C kultiviert. Mba1-S278A-GFP, Mba1-P277A-GFP, Mba1-P276A-GFP, Mba1-L275A-GFP sowie Mba1-G270A-GFP, Mba1-N269A-GFP und Mba1-V268A-GFP lokalisieren am Rand vergrößerter Mitochondrien. Mba1-R274A-GFP, Mba1-Y273A-GFP und Mba1-D271A-GFP sind im Inneren der vergrößerten Mitochondrien angereichert. Von links nach rechts sind jeweils das Hellfeldbild und GFP-Fluoreszenzbild sowie ein Intensitätsprofil des Fluoreszenzsignals dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 μm.

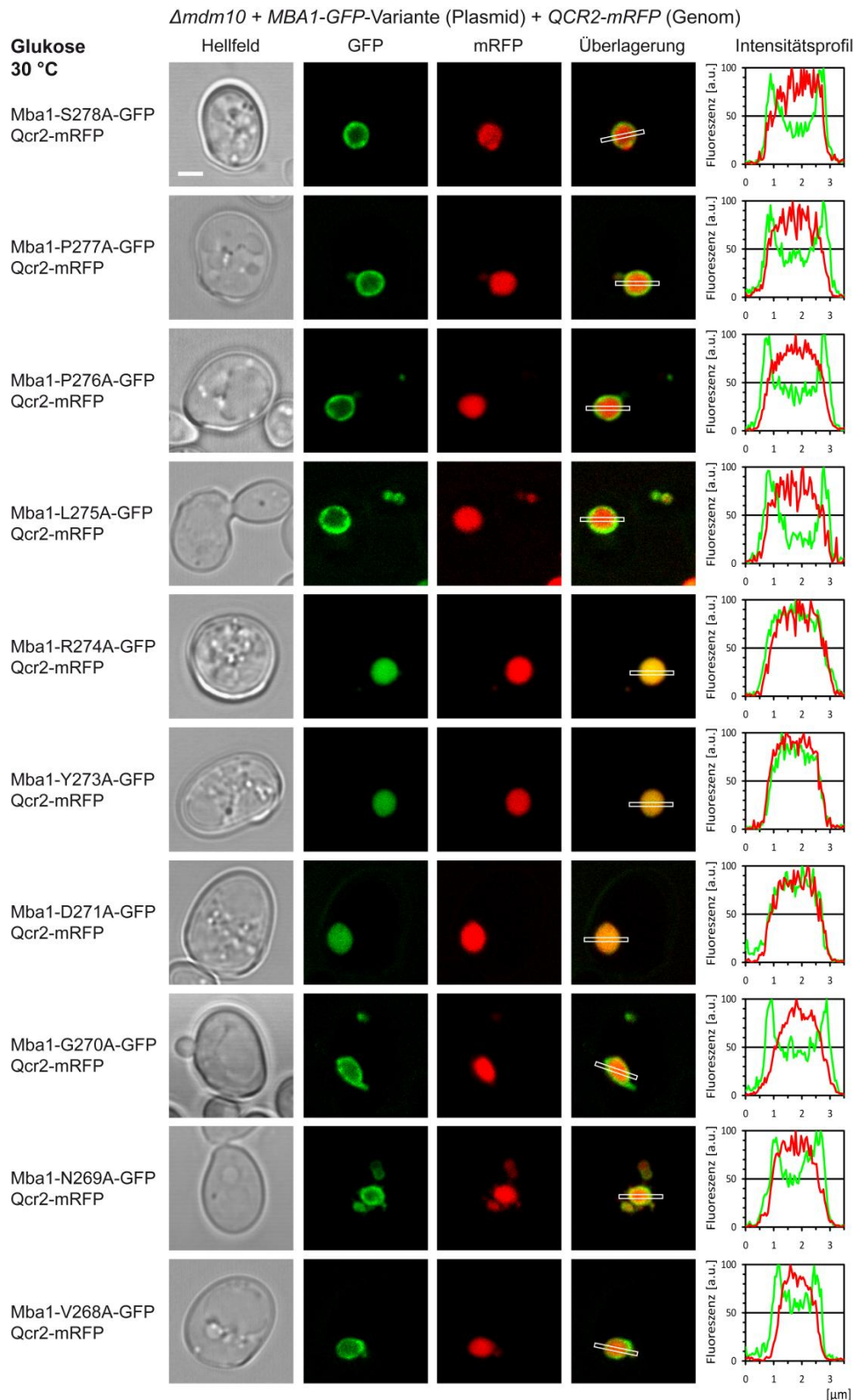


Abb. 8.28: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP-Varianten mit C-terminalen Substitutionen in vergrößerten Mitochondrien unter fermentativen Wachstumsbedingungen.

QCR2-mRFP-Hefen (*BY4741*), die *mba1-S278A-GFP*, *mba1-P277A-GFP*, *mba1-P276A-GFP*, *mba1-L275A-GFP*, *mba1-R274A-GFP*, *mba1-Y273A-GFP*, *mba1-D271A-GFP*, *mba1-G270A-GFP*, *mba1-N269A-GFP* oder *mba1-V268A-GFP* vom Plasmid exprimierten, wurden auf Glukoseplatten bei 30 °C kultiviert. Mba1-S278A-GFP, Mba1-P277A-GFP, Mba1-P276A-GFP, Mba1-L275A-GFP, Mba1-G270A-GFP, Mba1-N269A-GFP und Mba1-V268A-GFP lokalisieren am Rand und Mba1-R274A-GFP, Mba1-Y273A-GFP, Mba1-D271A-GFP und Qcr2-mRFP im Inneren vergrößerter Mitochondrien. Von links nach rechts sind das Hellfeld-, das Fluoreszenzbild für GFP und mRFP, eine Überlagerung sowie ein Intensitätsprofil der Fluoreszenzsignale dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 μm.

Für die Analyse der submitochondrialen Lokalisation von Mba1-GFP-Varianten, bei denen einzelne Aminosäuren im C-Terminus gegen Alanin ausgetauscht wurden, wurden $\Delta mba1$ -Hefezellen (*BY4741*) verwendet. Die Hefestämme exprimierten *mba1-S278A-GFP*, *mba1-P277A-GFP*, *mba1-P276A-GFP*, *mba1-L275A-GFP*, *mba1-R274A-GFP*, *mba1-Y273A-GFP*, *mba1-D271A-GFP*, *mba1-G270A-GFP*, *mba1-N269A-GFP* oder *mba1-V268A-GFP* unter der Kontrolle des *nativen MBA1-Promotors* von einem Plasmid. Nachdem das Gen *MDM10* deletiert wurde, wodurch Zellen mit vergrößerten Mitochondrien erzeugt wurden, wurden die Hefestämme auf Agarplatten mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose bei 30 °C kultiviert.

Die konfokalmikroskopische Analyse zeigt, dass Mba1-S278A-GFP, Mba1-P277A-GFP, Mba1-P276A-GFP, Mba1-L275A-GFP, Mba1-G270A-GFP, Mba1-N269A-GFP sowie Mba1-V268A-GFP, genau wie Mba1-GFP (Abb. 4.11, A), am Rand der vergrößerten Mitochondrien lokalisieren (Abb. 8.27). Im Gegensatz dazu weisen Mba1-R274A-GFP, Mba1-Y273A-GFP und Mba1-D271A-GFP, genau wie Mba1-I272A-GFP (Abb. 4.19, A), eine Anreicherung im Inneren der vergrößerten Mitochondrien auf (Abb. 8.27).

Die in Abbildung 8.27 beobachteten submitochondrialen Verteilungen der Mba1-Substitutionsvarianten konnten in *QCR2-mRFP* koexprimierenden Hefen (*BY4741*) bestätigt werden (Abb. 8.28). Die konfokalmikroskopische Analyse zeigt, dass Qcr2-mRFP stets im Inneren der vergrößerten Mitochondrien angereichert ist (Abb. 8.28), was auf eine intakte Cristastruktur der untersuchten Zellen hindeutet. Auch für diese konfokalmikroskopische Analyse wurden die verwendeten $\Delta mdm10$ -Zellen auf glukosehaltigen Agarplatten bei 30 °C kultiviert.

8.12.4 Lokalisation von Mba1-Varianten in vergrößerten Mitochondrien bei verschiedenen Wachstumstemperaturen

Um den Einfluss niedrigerer sowie höherer Wachstumstemperaturen auf die submitochondriale Lokalisation von Mba1¹⁻²⁷³ zu analysieren, wurden sowohl *mba1*¹⁻²⁷³-*GFP* exprimierende $\Delta mba1$ -Hefezellen der *YKODC* als auch *QCR2-mRFP* koexprimierende Hefen (*BY4741*) verwendet. Nach Erzeugung vergrößerter Mitochondrien wurden die Hefezellen auf Glukoseplatten bei 25 °C, 30 °C oder 37 °C kultiviert und konfokalmikroskopisch *in vivo* analysiert.

Für Mba1¹⁻²⁷³-GFP ist bei 30 °C und 37 °C eine Anreicherung im Inneren der vergrößerten Mitochondrien und bei 25 °C eine intermediäre Lokalisation zu verzeichnen (Abb. 8.29, A und B). Qcr2-mRFP ist bei allen Temperaturen im Inneren der vergrößerten Mitochondrien angereichert, was auf eine intakte Cristastruktur hindeutet (Abb. 8.29, B).

Demnach findet bei einer Temperatur von 25 °C, jedoch nicht bei 37 °C, eine Verlagerung der Mba1¹⁻²⁷³-GFP-Verteilung vom Inneren zum Rand der vergrößerten Mitochondrien statt.

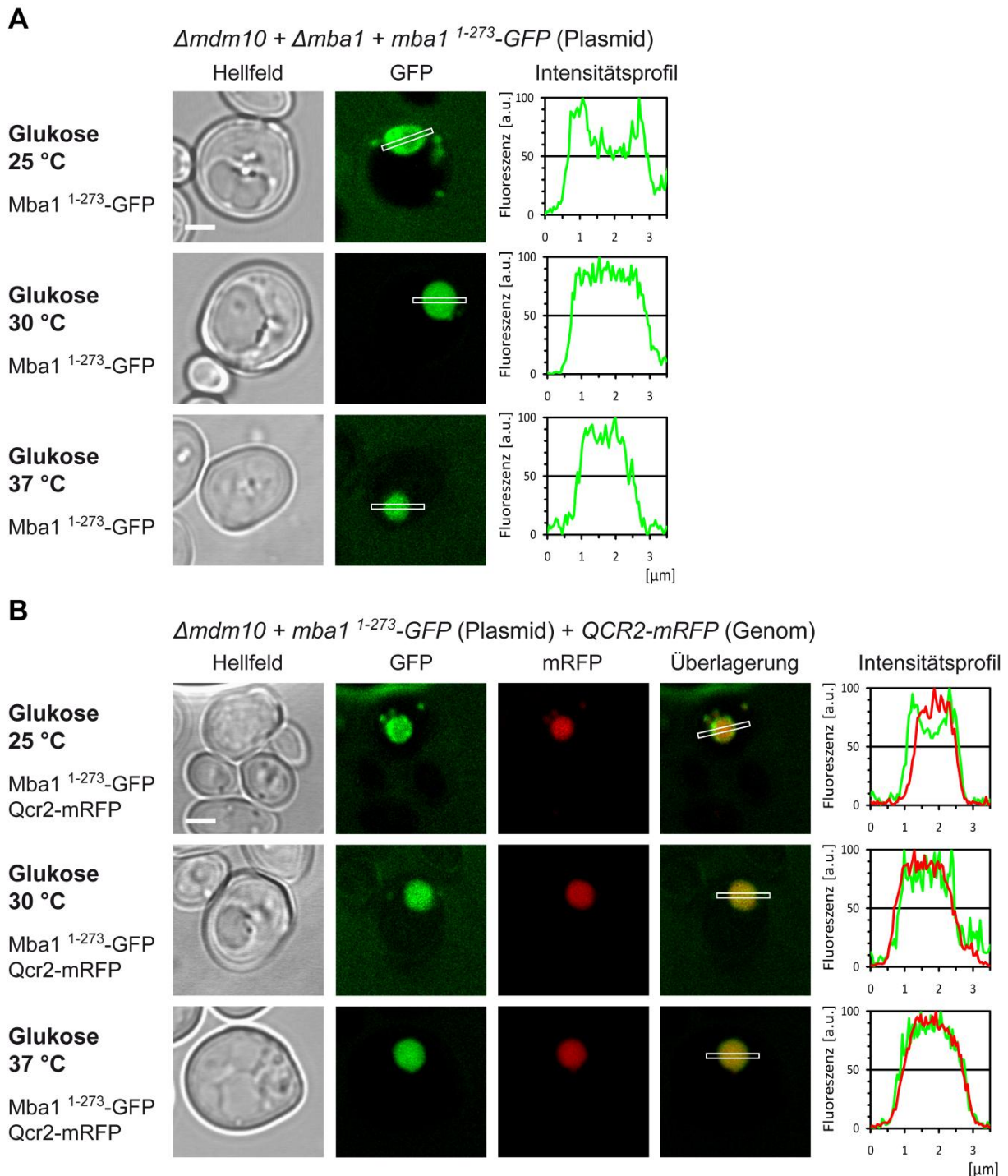


Abb. 8.29: Konfokalmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1¹⁻²⁷³-GFP in vergrößerten Mitochondrien unter dem Einfluss der Wachstumstemperatur.

Δmba1-Hefen (BY4741) (A) bzw. *QCR2-mRFP*-Hefen (BY4741) (B) mit *mba1¹⁻²⁷³-GFP*-Plasmid wurden auf Glukoseplatten bei 25 °C, 30 °C bzw. 37 °C kultiviert. Bei 30 °C bzw. 37 °C lokalisiert Mba1¹⁻²⁷³-GFP im Inneren der vergrößerten Mitochondrien, wohingegen es bei 25 °C eine intermediäre bis randständige Lokalisation aufweist (A, B). *Qcr2-mRFP* ist stets im Inneren der vergrößerten Mitochondrien angereichert (B). Von links nach rechts sind das Hellfeldbild (A, B), das Fluoreszenzbild für GFP (A, B) und mRFP (B), eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale (B) und ein Intensitätsprofil der Fluoreszenzsignale (A, B) dargestellt. Weißer Kasten: für die Intensitätsprofilerstellung verwendeter Bereich. Größenstandard = 2 μm.

8.13 Elektronenmikroskopische Analysen

Für die elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP wurden $\Delta mba1$ -Hefen (BY4741) verwendet, die *MBA1-GFP* unter der Kontrolle des *nativen MBA1-Promotors* von einem Plasmid exprimierten. Die Kultivierung erfolgte mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Galaktose bei 30 °C. Es wurden insgesamt 114 Goldpartikel ausgewertet, von denen 60 % der inneren Grenzflächenmembran und 40 % der Cristaemembran zuzuordnen sind (Abb. 8.30). Unter fermentativen Bedingungen ist Mba1-GFP in der inneren Grenzflächenmembran angereichert.

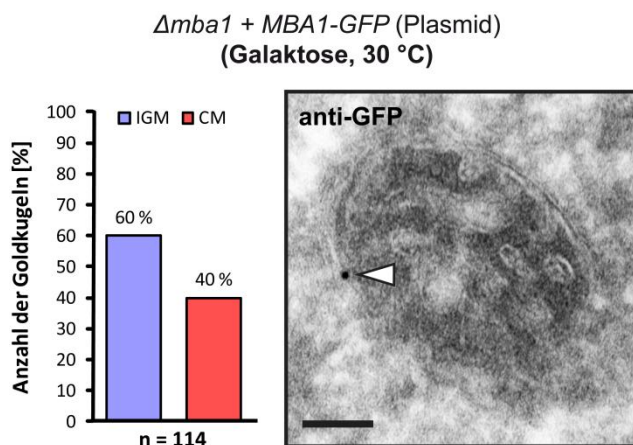


Abb. 8.30: Elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1-GFP in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie unter fermentativen Bedingungen.

Der $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) mit *MBA1-GFP*-Plasmid wurde in Galaktosemedium bei 30 °C kultiviert. Mba1-GFP ist in der IGM angereichert. Gezeigt ist eine statistische Auswertung der Mba1-GFP-Verteilung (links) sowie eine repräsentative Aufnahme (rechts). Zum Nachweis wurde Mba1-GFP immunologisch mit Goldpartikeln markiert (Pfeil). IGM (innere Grenzflächenmembran) und CM (Cristaemembran). Größenstandard = 100 nm.

Um den Einfluss der Absenkung der Wachstumstemperatur auf die Lokalisation von Oxa1-GFP und Oxa1-W128F-GFP in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie zu untersuchen, wurde eine elektronenmikroskopische Analyse durchgeführt.

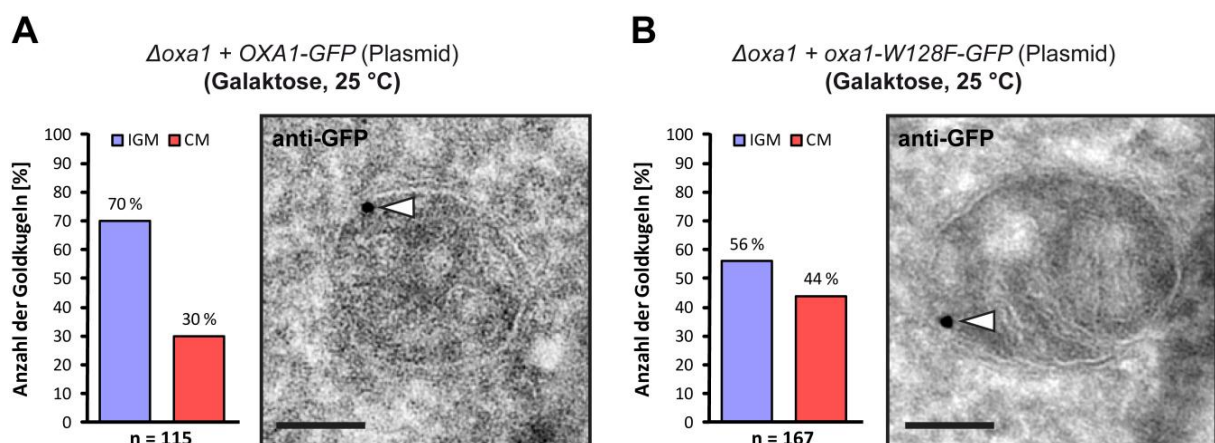


Abb. 8.31: Elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Oxa1-GFP und Oxa1-W128F-GFP in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie bei einer Wachstumstemperatur von 25 °C.

Die $\Delta oxa1$ -Stämme (für Mikroskopie) mit *OXA1-GFP*- (A) bzw. mit *oxa1-W128F-GFP*-Plasmid (B) wurden in Galaktosemedium bei 25 °C kultiviert. Oxa1-GFP und Oxa1-W128F-GFP sind in der IGM angereichert (A, B). Gezeigt sind jeweils eine statistische Auswertung der Verteilung der Fusionsproteine (links) sowie eine repräsentative Aufnahme (rechts). Zum Nachweis wurden die Fusionsproteine immunologisch mit Goldpartikeln markiert (Pfeile). IGM (innere Grenzflächenmembran) und CM (Cristaemembran). Größenstandard = 100 nm.

Hierzu wurden $\Delta oxa1$ -Stämme (für Mikroskopie) verwendet, die *OXA1-GFP* bzw. *oxa1-W128F-GFP* unter der Kontrolle des *nativen OXA1-Promotors* von einem Plasmid exprimierten. Die Kultivierung erfolgte mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Galaktose bei 25 °C.

Für Oxa1-GFP ergibt sich nach einer Auswertung von 115 Goldpartikeln eine Verteilung von 70 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 30 % in der Cristaemembran (Abb. 8.31, A). Für Oxa1-W128F-GFP wurde bei 167 ausgewerteten Goldpartikeln eine Verteilung von 56 % in der inneren Grenzflächenmembran gegenüber 44 % in der Cristaemembran gefunden (Abb. 8.31, B). Sowohl für Oxa1-GFP als auch für Oxa1-W128F-GFP ist bei einer Wachstumstemperatur von 25 °C und unter fermentativen Bedingungen eine Anreicherung in der inneren Grenzflächenmembran zu verzeichnen. Für Oxa1-W128F-GFP fand eine deutliche Verlagerung der Proteinverteilung in Abhängigkeit der Wachstumstemperatur statt, da es bei einer Temperatur von 30 °C und Wachstum mit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle eine bevorzugte Lokalisation in der Cristaemembran aufweist (Stoldt, 2010).

Für die elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1¹⁻²⁷³-FLAG unter dem Einfluss der Absenkung der Wachstumstemperatur wurden $\Delta mba1$ -Hefen (BY4741) verwendet. Sie exprimierten *mba1*¹⁻²⁷³-FLAG unter der Kontrolle des *nativen MBA1-Promotors* von einem Plasmid und wurden mit der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Galaktose bei 25 °C kultiviert.

Es wurden 89 Goldpartikel ausgewertet, von denen 66 % der inneren Grenzflächenmembran und 34 % der Cristaemembran zuzuordnen sind (Abb. 8.32). Mba1¹⁻²⁷³-FLAG ist bei 25 °C und Wachstum mit Galaktose in der inneren Grenzflächenmembran angereichert.

Es fand eine deutliche Verlagerung der Proteinverteilung von Mba1¹⁻²⁷³-FLAG in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur statt, da es bei einer Temperatur von 30 °C und unter fermentativen Bedingungen eine bevorzugte Lokalisation in der Cristaemembran aufweist (Abb. 4.15, B). Bei der elektronenmikroskopischen Analyse von Mba1¹⁻²⁷³-FLAG wurden außerdem ausschließlich Mitochondrien mit Wildtypmorphologie, d. h. ohne Proteinaggregationen, beobachtet (Abb. 8.32).

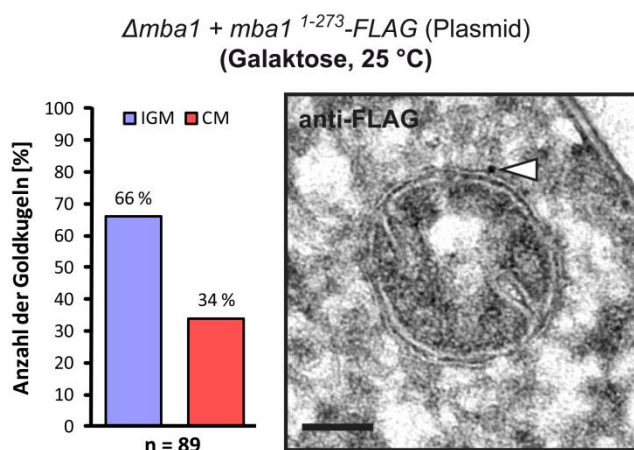


Abb. 8.32: Elektronenmikroskopische Lokalisationsanalyse von Mba1¹⁻²⁷³-FLAG in Mitochondrien mit Wildtypmorphologie bei einer Wachstumstemperatur von 25 °C.

Der $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) mit *mba1*¹⁻²⁷³-FLAG-Plasmid wurde in Galaktosemedium bei 25 °C kultiviert. Mba1¹⁻²⁷³-FLAG ist in der IGM angereichert. Gezeigt ist eine statistische Auswertung der Mba1¹⁻²⁷³-FLAG-Verteilung (links) sowie eine repräsentative Aufnahme (rechts). Zum Nachweis wurde Mba1¹⁻²⁷³-FLAG immunologisch mit Goldpartikeln markiert (Pfeil). IGM (innere Grenzflächenmembran) und CM (Cristaemembran). Größenstandard = 100 nm.

8.14 Auswirkungen von MBA1-Mutationen

8.14.1 Analyse des Wachstumsverhaltens von Hefestämmen, die MBA1-GFP-Varianten exprimieren

Um das Wachstumsverhalten verschiedener Stämme zu untersuchen, wurde ein Wachstumstest, wie in Kapitel 4.3.5 beschrieben, durchgeführt. Es wurden $\Delta mba1$ -Hefen (BY4741) eingesetzt, die den Vektor1 trugen oder MBA1-GFP, $mba1^{1-275}$ -GFP, $mba1^{1-273}$ -GFP bzw. $mba1$ -I272A-GFP unter der Kontrolle des nativen MBA1-Promotors von einem Plasmid exprimierten. Weiterhin wurden die den Vektor1 enthaltenden Kontrollstämme BY4741 WT (Positivkontrolle) und $\Delta oxa1$ der YKODC (Negativkontrolle) verwendet. Die Kultivierung der Hefen erfolgte bei 25 °C, 30 °C und 37 °C auf Agarplatten, die entweder die fermentierbare Kohlenstoffquelle Glukose oder die nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle Laktat beinhalten.

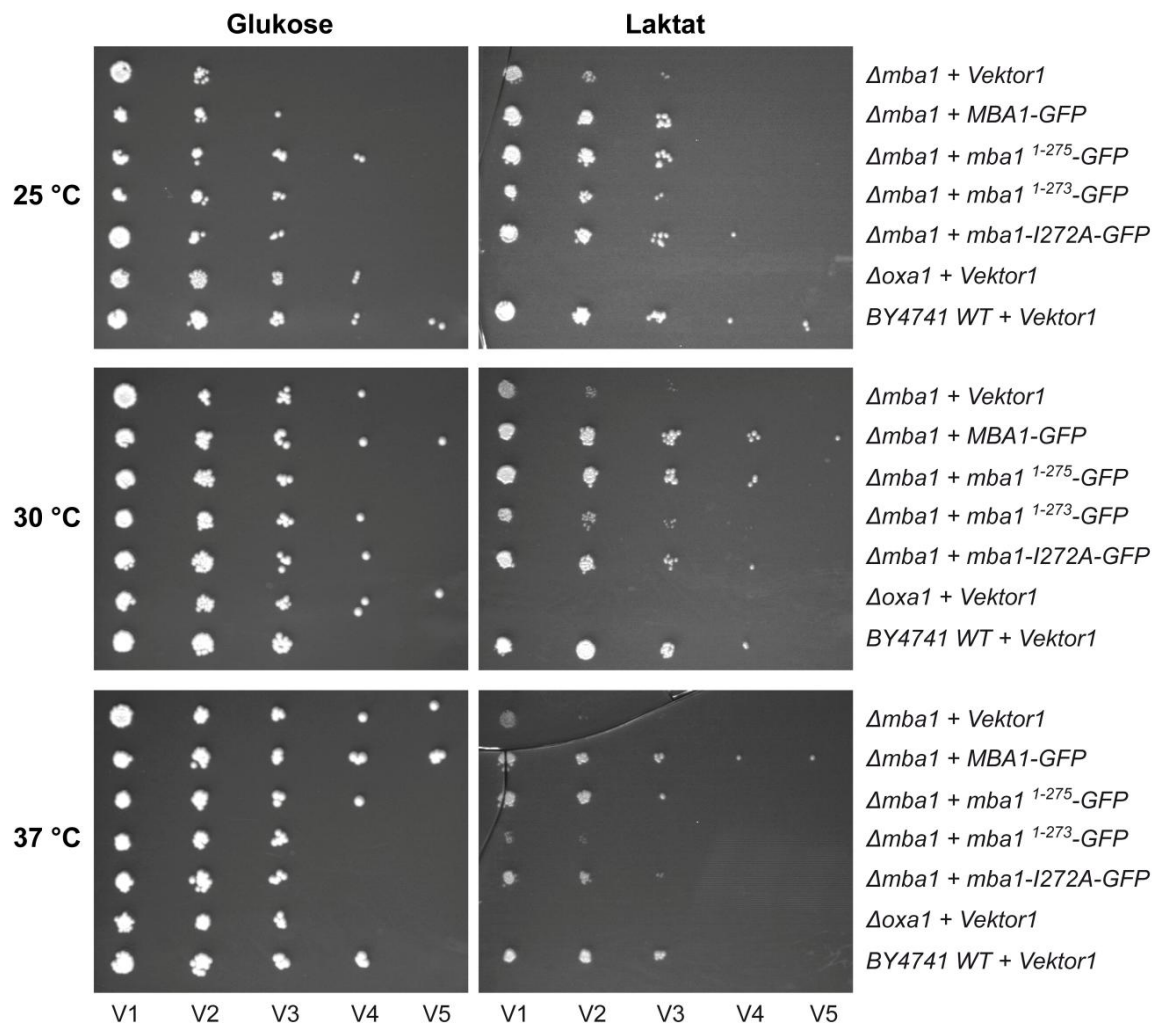


Abb. 8.33: Wachstumstest von MBA1-GFP-Varianten exprimierenden Hefezellen.

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten der $\Delta mba1$ -Stämme (BY4741) mit Vektor1, mit MBA1-GFP-Plasmid, mit $mba1^{1-275}$ -GFP-Plasmid, mit $mba1^{1-273}$ -GFP-Plasmid bzw. mit $mba1$ -I272A-GFP-Plasmid sowie des $\Delta oxa1$ -Stamms (YKODC) mit Vektor1 und des Wildtyps BY4741 WT mit Vektor1. Die Flüssigkulturen wurden ausgehend von einer OD_{600} von ~ 0,7 seriell 1:10 verdünnt (V1 - V5). Durch einen Stempel wurden Tropfen der verdünnten Kulturen auf Glukose- bzw. Laktatplatten übertragen und bei 25 °C, 30 °C und 37 °C kultiviert.

Auf den Glukoseplatten zeigen die Stämme unabhängig von der Temperatur prinzipiell ein ähnliches Wachstumsverhalten. Bei 25 °C wächst der $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) etwas schlechter und der Wildtyp etwas besser als die anderen Stämme. Bei 37 °C wachsen der $mba1^{1-273}$ -GFP-, der $mba1$ -I272A-GFP- sowie der $\Delta oxal$ -Stamm (YKODC) geringfügig langsamer und die $\Delta mba1$ -Stämme (BY4741) mit *Vektor1* bzw. mit *MBA1-GFP* etwas besser (Abb. 8.33, links).

Bei Laktat und den verschiedenen Temperaturen wächst der $\Delta oxal$ -Stamm (YKODC) gar nicht und der $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) deutlich schlechter als der Wildtyp. Beim Vergleich des Wachstums des Wildtyps, des *MBA1-GFP*- und des $mba1^{1-275}$ -GFP-Stamms ist, unabhängig von der Temperatur, kein Unterschied erkennbar. Für den $mba1$ -I272A-GFP-Stamm lässt sich bei 25 °C kein Unterschied zu den eben erwähnten Stämmen und bei 30 °C sowie 37 °C ein geringfügig verlangsamtes Wachstum beobachten. Der $mba1^{1-273}$ -GFP-Stamm weist im Vergleich zum $\Delta mba1$ -Stamm (BY4741) ein etwas besseres Wachstum und im Vergleich zum Wildtyp und den Stämmen, die eine andere *MBA1-GFP*-Variante exprimieren, bei 30 °C und 37 °C ein deutlich reduziertes und bei 25 °C nur noch ein geringfügig vermindertes Wachstum auf. Weiterhin ist zu beobachten, dass bei 37 °C auf Laktat alle analysierten Stämme schlechter wachsen (Abb. 8.33, rechts).

8.14.2 Koimmunopräzipitationen mit Mba1-FLAG-Varianten

Tab. 8.5: Mittels LC-MS/MS-Analyse detektierte Anzahl an Peptiden von Kandidatenproteinen der Koimmunopräzipitationen mit Mba1-FLAG-Varianten.

Kategorie	Protein	Anzahl detektierter Peptide		
		BY4741 WT + Vektor2	$\Delta mba1$ + MBA1-FLAG	$\Delta mba1$ + $mba1^{1-273}$ -FLAG
Zielprotein	Mba1-Variante ¹	0	59	58
Protein mit Chaperonfunktion	Ssc1 ¹	4	16	57
	Hsp60 ¹	6	25	62
Prozessierung und Assemblierung von Cox2	Cox20 ¹	0	7	3
Komponente einer Protease	Pim1 ¹	1	0	12
	Yta12 ¹	0	6	11

(¹) Scaffold Viewer-Einstellung: Protein Threshold: 99,9 %; Peptide Threshold: 95 %; Minimum Number of Peptides: 5

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Stefan Jakobs für die Betreuung dieser Arbeit, die freundliche Übernahme des Korreferats, seine stetige Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen sowie seine wertvollen Ratschläge, die den Verlauf dieser Arbeit immer wieder positiv gefördert haben.

Bei PD Dr. Wilfried Kramer bedanke ich mich sowohl für die Übernahme des Referats als auch seine hilfreichen Hinweise und Diskussionen, die einen erfolgreichen Abschluss ermöglichten.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der Prüfungskommission für die freundliche Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten: PD Dr. Thomas Teichmann, Prof. Dr. Peter Rehling, Prof. Dr. Michael Meinecke und Dr. Hans Dieter Schmitt.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. Stefan W. Hell für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner internationalen und interdisziplinären Abteilung anfertigen zu dürfen.

Bei Dr. Dirk Wenzel möchte ich mich für seine Hilfe bei der Elektronenmikroskopie bedanken.

Bei Dr. Miroslav Nikolov und Monika Raabe bedanke ich mich für ihre Hilfestellung bei den massenspektrometrischen Analysen und deren Auswertungen.

Bei PD Dr. Markus Deckers, Jan Moritz Wuttke, Mirjam Wissel und Isotta Lorenzi bedanke ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Unterstützung bei biochemischen Fragestellungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Rita Schmitz-Salue, Silvia Löbermann, Maria Sermond und Dr. Ellen Rothermel für ihre äußerst tatkräftige Unterstützung im Labor sowie in der Spülküche.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen meinen Kollegen, die mich in vielfältiger Weise unterstützt und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Insbesondere danke ich an dieser Stelle sowohl Dr. Christian Wurm als auch dem „Bay Boy“ Dr. Stefan Stoldt für die Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen, für die kreativen Problemlösungen sowie die wertvollen Anregungen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein riesengroßes Dankeschön gilt auch Dr. Franziska Stagge, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, und Dr. Peter Ilgen für seine Hilfsbereitschaft und eine unvergessliche, unterhaltsame, lautstarke Zeit an unserer Bench.

Herzlichst bedanken möchte ich mich auch bei meinen lieben Eltern, meiner Schwester Jeannette sowie meinen sehr guten Freunden Martin Bauerfeind und Natalie Wolf, die mich in meinen Zielen und Entscheidungen immer bestärkt und motiviert haben.

Abschließend möchte ich dem wichtigsten Menschen in meinem Leben ganz besonderen Dank aussprechen: meinem Verlobten Matthias Koche, der mir stets zuhörte und helfend zur Seite stand, mich immer wieder ermutigte und mir wundervolle Momente schenkte. Du bist mein Held.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marlen Marina Stäglich
Anschrift: Rosa-Luxemburg-Straße 6
04416 Markkleeberg
Geburtsdatum/-ort: 29.03.1985 in Dresden
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Universitäts- und Schulausbildung

09 / 2010 - 10 / 2015 Georg-August-Universität Göttingen
Promotion im Fachbereich Biologie
Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen,
Arbeitsgruppe „Struktur und Dynamik von Mitochondrien“ (Prof. Dr. Stefan
Jakobs), Abteilung für NanoBiophotonik (Prof. Dr. Dr. Stefan W. Hell)
Thema der Doktorarbeit: „*Untersuchung der submitochondrialen Verteilung von
Oxa1 und Mba1 in Saccharomyces cerevisiae*“

10 / 2006 - 02 / 2010 Friedrich-Schiller-Universität Jena
Hauptstudium der Biologie
Schwerpunkte: Genetik, Zellbiologie und Medizinische Mikrobiologie
Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut
Jena, Arbeitsgruppe „Molekularbiologie“ (Prof. Dr. Stephan Diekmann)
Thema der Diplomarbeit: „*Lokalisation, Dynamik und Nachbarschaftsstudien
von BubRI-Subdomänen in vivo und in situ*“
erworbener Abschluss: Diplom Biologie (Note 1,0)

10 / 2004 - 09 / 2006 Universität Bayreuth
Grundstudium der Biologie
erworbener Abschluss: Vordiplom Biologie (Note 1,8)

08 / 1997 - 07 / 2004 Romain-Rolland-Gymnasium Dresden
erworbener Abschluss: Abitur (Note 1,9)

Auslandserfahrung

08 / 2001 - 06 / 2002 Schüleraufenthalt in Jellico, TN, USA
10-monatiges HighSchool-Programm der GIJK in den USA im Rahmen des
Academic Year in America Program der AIFS Foundation